

ORIGINAL ARTICLE

Analyzing the expression data (*RNA-Seq*) in *Catharanthus roseus* plant in order to identify key genes of the active substances (vinblastine and vincristine) in different organs (root, leaf and flower) and to investigate their anticancer effects using docking analysis and molecular dynamics.

Masoud Tohidfar^{1*,2}, Yousef Saeedi Honar¹, Naser Farrokhi^{1,2}

¹Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

²Center for International Scientific Studies and Collaboration (CISSC), Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran.

Correspondence

Masoud Tohidfar

Email: m_tohidfar@sbu.ac.ir

How to cite

Tohidfar, M., Saeedi Honar, Y., & Farrokhi, N. (2023). Analyzing the expression data (*RNA-Seq*) in *Catharanthus roseus* plant in order to identify key genes of the active substances (vinblastine and vincristine) in different organs (root, leaf and flower) and to investigate their anticancer effects using docking analysis and molecular dynamics. *Crop Biotechnology*, 13(44), 1-11.

ABSTRACT

Catharanthus roseus is one of the most important medicinal plants that contains two antitumor substances, vinblastine and vincristine. It is important to identify the involved genes and their expression pattern and anti-tumor effect in different tissues of this plant. By using the expression data of RNA sequencing of different tissues, differential expression genes and their antitumor effects were investigated as in silico. The results showed that the total number of differentially expressed genes in the organs varied between 120 and 1238. The highest number of DEGs compared to the root was related to the leaf and the lowest number was related to the flower. Subsequently, 13 common genes between three different organs and 22 common genes were observed between leaves versus flowers and leaves versus roots. Among them, 6 common genes were observed in all three tissues, and the annotation analysis showed that these genes are involved in the biosynthetic pathway of two important compounds, vinblastine and vincristine. The highest expression of these genes was related to leaves and the lowest was related to roots. Protein network analysis determined that a number of genes that showed the most interaction with other genes were related to the genes of the biocentric pathway of antitumor compounds. Docking and molecular dynamics analysis showed that vinblastine and vincristine, while having good interaction as inhibitors with phosphoglycoprotein (drug resistance protein in tumor cells), also have good stability in interaction with phosphoglycoprotein. Generally DAT, STR, TDC, G10H, D4H, T16H2, Tryptophandecar-boxylase and Strictosidine synthase genes that were in the biosynthesis pathway of vinblastine and vincristine had an effective role in different organs. The obtained results give new insights about the mechanism of treatment with natural products, which can be used to improve the patients.

KEYWORDS

Bioinformatics, *Catharanthus roseus*, gene expression, vinblastine and vincristine

© 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/>

نشر به علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

آنالیز داده‌های بیانی (RNA-Seq) در گیاه *Catharanthus roseus* به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی مواد مؤثره (وین بلاستین و وین کریستین) در اندام‌های مختلف (ریشه، برگ و گل) و بررسی اثرات ضد سرطانی آنها با استفاده از آنالیز داکینگ و دینامیک مولکولی

مسعود توحیدفر^{۱*}، یوسف سعیدی هنر^۱، ناصر فرخی^۲

^۱گروه سلولی و مولکولی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
^۲آمرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران، ایران.

چکیده

گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که حاوی دو ماده‌ی ضدتوموری وین‌بلاستین و وین‌کریستین است و شناسایی ژن‌های درگیر و الگوی بیانی و اثرات ضدتوموری آنها در بافت‌های مختلف این گیاه حایز اهمیت است. در همین راستا، با استفاده از داده‌های بیانی (RNA sequencing (RNA-seq) و بافت‌های مختلف به بررسی ژن‌های با بیان افتراقی (Differential Expression Gene) و اثرات ضدتوموری آنها بصورت این سیلکو پرداخته شد. نتایج نشان داد که تعداد کل ژن‌های با بیان افتراقی در اندام‌ها بین ۱۲۰ تا ۱۲۳۸ متغیر بود. بیشترین تعداد DEG نسبت به ریشه مربوط به برگ و کمترین آن متعلق به گل بود. در ادامه، ۱۳ ژن مشترک بین سه اندام مختلف و ۲۲ ژن مشترک بین برگ در برابر گل و برگ در برابر ریشه مشاهده شد که از بین آنها، ۶ ژن مشترک در هر سه بافت بودند. آنالیز مستندسازی نشان داد که این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی دو ترکیب مهم وین‌بلاستین و وین‌کریستین نقش دارند. بیشترین بیان این ژن‌ها مربوط به برگ و کمترین آن مربوط به ریشه بود. آنالیز شبکه‌ی پروتئین مشخص کرد که تعدادی از ژن‌ها که بیشترین برهم‌کنش را با سایر ژن‌ها نشان دادند مربوط به ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات ضد توموری بودند. آنالیز داکینگ و دینامیک مولکولی نشان داد که وین‌بلاستین و وین‌کریستین ضمن اینکه برهم‌کنش خوبی به‌عنوان بازدارنده با فسفولیکوپروتئین (پروتئین مقاومت دارویی در سلول‌های توموری) دارند، از پایداری خوبی هم در برهم‌کنش با فسفولیکوپروتئین برخوردار هستند. بطورکلی، ژن‌های *G10H*، *TDC*، *STR*، *DAT*، *T16H2*، *D4H* و *Strictosidine synthase* و *Tryptophandecar-boxylase* که در مسیر بیوسنتزی وین‌بلاستین و وین‌کریستین بودند، نقش موثری در اندام‌های مختلف داشتند. نتایج بدست آمده بینش‌های جدیدی در مورد مکانیسم درمان با محصولات طبیعی می‌دهد که می‌توان جهت بهبود افراد مبتلا مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک، گیاه پروانش، بیان ژن، وین بلاستین و وین کریستین.

نویسنده مسئول:

مسعود توحیدفر

رایانامه: m_tohidfar@sbu.ac.ir

استناد به این مقاله:

توحیدفر، مسعود، سعیدی هنر، یوسف و فرخی، ناصر (۱۴۰۲). آنالیز داده‌های بیانی (RNA-Seq) در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) به منظور شناسایی ژن‌های کلیدی مواد مؤثره (وین بلاستین و وین کریستین) در اندام‌های مختلف (ریشه، برگ و گل) و بررسی اثرات ضد سرطانی آنها با استفاده از آنالیز داکینگ و دینامیک مولکولی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۴)، ۱-۱۱.

مقدمه

نویسنده همچون روش‌های زیست‌فناوری می‌تواند مورد توجه قرار گیرد (سهندی، ۱۳۹۵).

فسفولیکوپروتئین در بسیاری از فرایندهای سلولی از قبیل التهاب، تمایز سلول‌های ایمنی، سمیت‌زدایی و ترشح هورمون‌ها نقش دارد. کاهش کارایی درمان و عود بیماری متعاقب آن به علت مقاومت دارویی مهم‌ترین پیامد عملکرد این پروتئین بوده است و به عنوان یکی از پرچالش‌ترین موانع در درمان سرطان مورد توجه است. گلیکوپروتئین‌ها، پروتئین حاوی یک یا تعداد بیشتری واحد اولیگوساکاریدی غیر تکراری (گلیکان) هستند. همچنین، تومورهای تخمدان و سایر تومورها از گلیکوپروتئین‌های خاص و توالی گلیکان مرتبط برای تعدیل پاسخ‌های ایمنی استفاده می‌کنند. گلیکوپروتئین‌ها سلول‌های توموری را که این مولکول‌ها را بیان یا ترشح می‌کنند، قادر می‌سازند تا از حمله سلول‌های ایمنی فرار کنند و سیستم ایمنی را برای تقویت رشد تومور تحریک کنند (فاطمی و همکاران ۱۳۸۶).

یکی از روش‌های افزایش آکالوئیدها (وین بلاستین و وین کریستین)، شناسایی ژن‌های کلیدی و دخیل در سنتز این آکالوئیدها (وین بلاستین و وین کریستین) و افزایش بیان آنها است. هدف از انجام این تحقیق بررسی الگوی بیانی ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات ضدسرطانی (وین بلاستین و وین کریستین) در گیاه پروانش و برهمکنش آنها با استفاده از داکینگ مولکولی با پروتئین‌های مقاومت دارویی نظیر فسفولیکوپروتئین (P-Glycoprotein) در سلول سرطانی است

روش شناسی پژوهش

در این مطالعه از داده‌های RNA-Seq مربوط به ۳ نمونه از گیاه پروانش استفاده شد. نمونه‌ها شامل اندام‌های مختلف ریشه، گل و برگ بود. داده‌های مربوطه از بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، بخش GEO دریافت شد. کیفیت خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار FASTQC کنترل شد. خوانش‌های دارای آلودگی‌های آدپتوری و غیره و خوانش‌های با کیفیت کمتر از ۳۰ توسط Trimmomatic ویرایش شدند.

سپس هم‌ردیفی خوانش‌ها با دونه اسمبلی و فایل‌هایی حاشیه‌نویسی شده GTF (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Lusitattissimum) با استفاده از HISAT و

انسان با شناخت گیاهان دارویی از گذشته به شفا بخشی و اثرات درمانی این گیاهان پی برد و به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها از آنها استفاده کرد. در ایران نیز هزاران گونه گیاهی کشت و کار می‌شود که دارای اثرات دارویی هستند و در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما با توجه به محدود بودن زیستگاه طبیعی گیاهان و پایین بودن مواد موثره، استفاده از گیاهان دارویی با محدودیت‌هایی همراه است. بر این اساس محققین جهت بهره‌وری بیشتر از گیاهان دارویی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از آنها به استفاده از فناوری زیستی روی آورده‌اند (سهندی ۱ و همکاران ۱۳۹۵).

پروانش (*Catharanthus roseus L.*) متعلق به خانواده خرزهره بوده و ۱۶ کروموزوم دارد ($2n=16$). این گیاه چند ساله است که در مناطق سرد به صورت یکساله کشت می‌شود. این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و طبی است که دارای بیش از ۴۰۰ نوع آکالوئید از نوع ترپنوئید ایندول آکالوئید است (Verpoorte, 2004). دو آکالوئید وین بلاستین و وین کریستین به خاطر اتصال به میکروتوبول‌ها و توقف تقسیم سلولی در طی متافاز میتوز، خاصیت ضد توموری داشته (سلطانی ۱۴۰۰) و مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Heijden der Van, 2004).

پیشینه پژوهش

ارزش اقتصادی دوماه وین بلاستین و وین کریستین بالا است، بطوریکه قیمت هر کیلوگرم وین بلاستین یک میلیون دلار و تولید سالانه آن ۱۲ کیلوگرم و قیمت هر کیلوگرم وین کریستین ۵/۳ میلیون دلار و تولید سالانه آن یک کیلوگرم است (Loyola-Vargas et al, 2007) در حال حاضر این دو ماده از طریق استخراج از گیاه بدست می‌آیند. استخراج آن بعلا غلظت کم این ترکیبات مقرون به صرفه نیست. میزان سنتز این ترکیبات به قدری کم است که برای تولید یک گرم وین بلاستین نزدیک ۵۰۰ کیلوگرم برگ خشک و برای تولید یک گرم وین کریستین حدود ۲ تن برگ خشک نیاز است (همتی ۱۴۰۰). از طرفی روش‌های سنتز هم بخاطر هزینه مناسب نیستند. بنابراین افزایش مقدار آنها از طریق فناوری‌های

Anders *et al.*, 2015; Pertea) صورت گرفت HTSeq-count
(*et al.*, 2016).

آنالیز DEGs

برای این منظور ماتریس بیان ژن هر نمونه در مقایسه با نمونه بعدی مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از بسته DESeq2 نرم افزار R بر اساس مدلی مبتنی بر توزیع دوجمله‌ای منفی انجام شد. در این آنالیز ژن‌های با مقادیر $P < 0.05$ که با روش FDR تصحیح شده بودند جداسازی شد.

آنالیز هستی شناسی^۱

آنالیز هستی شناسی ژن‌های با بیان افتراقی با به کارگیری ابزار آنالیز agriGO^۲، با استفاده از روش^۳ SEA انجام شد و دسته‌بندی DEGs بر اساس سه پارامتر اجزاء سلولی، عملکرد مولکولی و فرایندهای زیستی صورت گرفت (Tian *et al.*, 2017).

آنالیز غنی سازی مسیر KEGG

تجزیه غنی‌سازی مسیر برای شناسایی مسیرهایی که ژن‌های با بیان افتراقی در آنها درگیرند با استفاده از پایگاه داده KEGG^۴ انجام شد (Kanehisa & Goto, 2000).

شبکه پروتئینی و هاب ژن‌ها

برای بررسی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین، از پایگاه String استفاده شد. برای شناسایی ژن‌های هاب، نرم‌افزار Cytoscape گزینه Cytohubba براساس الگوریتم محاسباتی MNC بکاررفت.

آماده سازی مولکول کوچک زیستی (لیگاند)

برای استفاده از ساختار وین‌بلاستین لازم است ساختار سه‌بعدی آن طراحی شود زیرا تنها در پایگاه داده Pubchem ساختار دو بعدی آن موجود است. نرم‌افزار تخصصی این حوزه مجموعه نرم‌افزار «کم بایو آفیس» است که تمام چالش‌های موجود در طراحی ساختار لیگاند را برطرف می‌کند. در نهایت ساختار لازم بدست آمد.

آماده سازی گیرنده (رستپور)

برای بدست آوردن ساختار رستپورها (فسفوگلیکوپروتئین و لیوین) از پایگاه داده پروتئین PDB استفاده شد.

بررسی ساختار پروتئین با نرم‌افزار پایمول

این نرم‌افزار بر اساس زبان برنامه نویسی پایتون ارائه شده و می‌توان با استفاده از دستور نوشتن همانند نرم‌افزار پایتون فرمان انجام فعالیت را صادر کرد. و برای ساخت پپتیدهای بهینه برای آنالیزهای ضد میکروبی استفاده شده است.

نرم‌افزار کایمرا

نرم افزار کایمرا یک بسته نرم افزاری شیمی و بیوانفورماتیک برای تجسم و شبیه سازی تعاملی، نمایش، تجزیه و تحلیل و آنالیز ساختار مولکولی و داده‌های مرتبط با آن‌ها استفاده شده است.

نرم‌افزار مادلر

از نرم افزار مادلر به منظور همولوژی مدلینگ اتوماتیک پروتئین‌ها استفاده شد. نرم افزار مادلر یکی از نرم افزارهای جامع به منظور همولوژی و یا مقایسه‌ی مدلینگ‌های ساختار سه بعدی پروتئین است.

داکینگ مولکولی

یکی از سرورهای آنلاین کاربردی در زمینه داکینگ مولکولی سرور سوئیس داک است (<http://www.swissdock.ch>). این سرور با استفاده از گیرنده و مولکول کوچک زیستی که در اختیار آن قرار داده شده به بررسی برهم‌کنش آن‌ها می‌پردازد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

برای دینامیک مولکولی از گرومکس، با نام مختصر (Groningen Machine for Chemical Simulations) استفاده شد. گرومکس یک بسته نرم افزاری تطبیق پذیر و متنوع برای انجام دینامیک مولکولی است که از طریق حل معادلات حرکت نیوتنی امکان شبیه سازی سامانه‌هایی متشکل از صدها تا میلیون‌ها ذره را فراهم می‌کند.

3. Singular Enrichment Analysis
4. <https://www.genome.jp/kegg/>

1. GO Enrichment
2. <http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>

آنالیز مسیرهای سیگنالینگ

پس از مشخص شدن ارتباط بین ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده Enrichr مسیرهای سیگنالینگ مشخص شدند (Subramanian, 2007).

یافته‌های پژوهش

برای آنالیزیابی، از داده‌های RNA-Seq مربوط به پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets با شماره شناسه GSE57326 و پلت فرم GPL22656 استفاده شد. این داده‌ها مربوط به بیان ژن در سه نمونه ریشه، برگ و گل بود. در مجموع ۲۱۰۱۸۱۳۱۴ خوانش حاصل شد که بین ۷۰ تا ۱۵ میلیون در هر نمونه متغیر بود. از این میان ۷۱۰۶۰۴۳۸، ۸۰۸۷۹۶۷۴ و ۶۱۸۹۶۴۳۲ میلیون خوانش بترتیب مربوط به نمونه ریشه، برگ و گل بود (جدول ۱).

جدول ۱. اطلاعات کلی مربوط به داده‌های RNA-Seq در گیاه

پروانش مربوط به شناسه GSE57326

نمونه	تعداد خوانش‌ها	نرخ نقشه‌برداری (%)
ریشه	۷۱۰۶۰۴۳۸	۸۹/۲۵
برگ	۸۰۸۷۹۶۷۴	۹۰/۷۶
گل	۶۱۸۹۶۴۳۲	۹۴/۸۹

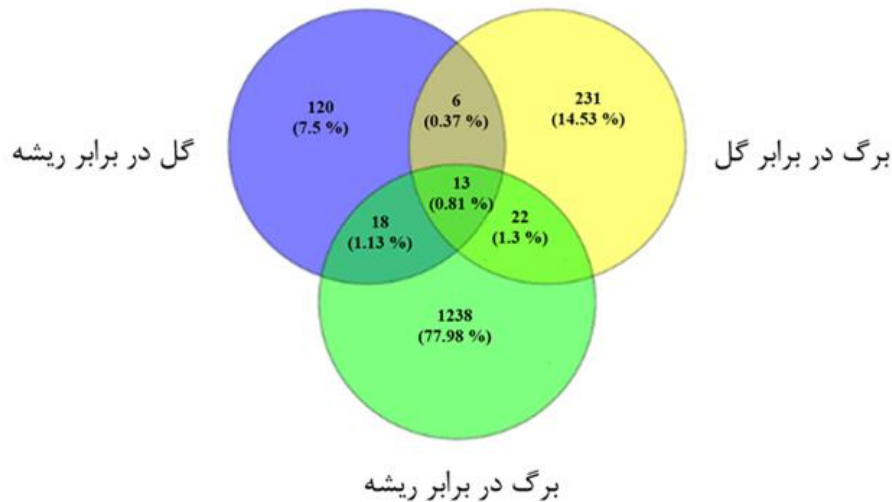
در مجموع به طور متوسط ۸ درصد داده‌ها در مرحله پیرایش حذف شدند که نشان‌دهنده کیفیت بسیار مناسب داده‌ها بود. بیشترین تعداد کل خوانش‌ها مربوط به نمونه برگ و کمترین آن برای نمونه گل گزارش شده است. در ادامه، خوانش‌های با میانگین ۹۱/۵۵ درصد با ژنوم هم‌ردیف شدند (جدول ۱).

شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs)

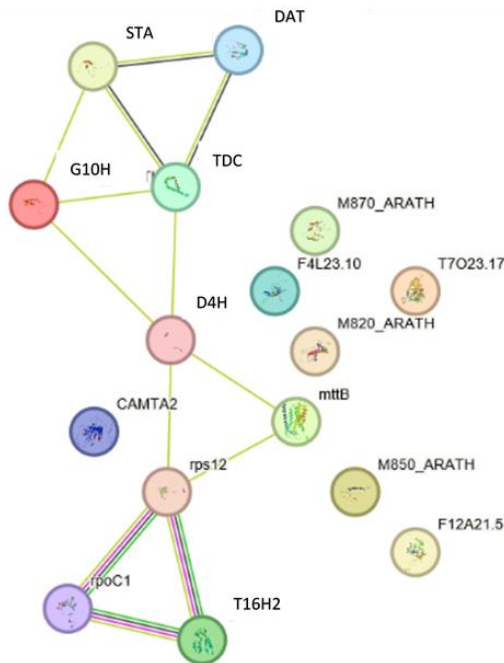
جهت شناسایی ژن‌هایی با بیان افتراقی معنی‌دار، آنالیز تفاوت بیان ژن بین بافت‌ها صورت گرفت و پارامترهای بیان افتراقی مانند مقادیر p -values، FDR و مقادیر \log_2 fold change (FC) از ماتریس داده‌های شمارش شده ترانسکریپتوم با استفاده از بسته نرم‌افزاری DESeq2 و edgeR محاسبه شدند. نتایج نشان داد که تعداد کل ژن‌ها با بیان افتراقی در اندام‌ها نسبت به هم بین ۱۲۰ تا ۱۲۳۸ متغیر بود. بیشترین تعداد DEG ها برای اندام برگ نسبت به ریشه و کمترین آن متعلق به نمونه گل در برابر ریشه بود (شکل ۱).

برای بررسی ژن‌های مشترک، نمودار Venn بین اندام‌های مختلف رسم شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که ۱۳ ژن مشترک بین سه اندام مختلف و ۲۲ ژن مشترک بین برگ در برابر گل و برگ در برابر ریشه مشاهده شد. همچنین ۶ ژن مشترک بین گل در برابر ریشه و برگ در برابر گل مشاهده شد، و سایر ژن‌ها به طور اختصاصی نسبت به بافت پاسخ دادند.

از جمله ژن‌های مشترک در هر سه بافت شامل DAT، Tryptophandecarboxylase، T16H2، D4H، G10H، TDC، STR و boxylase و Strictosidine synthase بودند که آنالیز مستند سازی نشان داد که در مسیر بیوسنتزی دو ترکیب مهم وین بلاستین و وین کریستین نقش دارند. ولی تغییرات بیان آنها فرق داشت بطوریکه که بیشترین بیان آنها مربوط به برگ و کمترین آن مربوط به ریشه بود. درحالی‌که ژن‌های مشترک مربوط به ریشه به طور اختصاصی در فرآیندهای تردوکس، سلول، ترانسپورت، متابولیسم هورمونی و کینازهای گیرنده سیگنالینگ تغییر بیان نشان دادند.



شکل ۱. ژن های با بیان افتراقی و نمودار ون دیاگرام در اندام های مختلف در گیاه پروانش



شکل ۲. شبکه پروتئینی بین ژن های مشترک بافت های برگ، ریشه و گل در گیاه پروانش

بررسی مسیره های KEGG برای ژنهای مشترک پروانش نشان داد که در بین این مسیرها ژن های مرتبط با بیوسنتز متابولیت های ثانویه و بیوسنتز وین بلاستین و وین کریستین که مختص این نوع گونه گیاه است در پاسخ به نوع اندام تغییرات بیانی متفاوتی داشتند.

هستی شناسی (GO) ژن های مشترک

آنالیز هستی شناسی بر روی ژن های مشترک انجام شد. این ژن ها در سه دسته اصلی GO شامل فرآیندهای بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی تقسیم شدند. در اینجا دسته بندی اصطلاحات GO از فرآیندهای بیولوژیکی صورت گرفت. در این حالت، ۹ ژن کدکننده ترانسکریپت های متعلق به دو ترکیب مهم وین بلاستین و وین کریستین وجود داشت که به طور معنی داری در برگ افزایش بیان داشتند و بالعکس در ریشه کاهش بیان نشان دادند. علاوه بر این در برگ نسبت به ریشه TF های با بالاترین تغییرات مشاهده شد که در مسیر عملکردی وین بلاستین و وین کریستین نقش داشتند. از ۵ گروه عملکردی مرتبط با ۶ ژن اختصاصی که به طور مشترک در ریشه بیان شدند، به طور معنی دار در فرآیندهای پاسخ به تنش ها، پاسخگو بودند.

به منظور فهم بهتر ارتباط بین ژن های مشترک شبکه برهمکنش پروتئینی بر اساس الگوریتم MNC رسم شد (شکل ۲). در بین بافت های مختلف ژن های DAT، STR، TDC، G10H، D4H، T16H2 بیشترین برهمکنش را با سایر ژن ها نشان دادند. ژن STR علاوه بر این که با سایر ژنهای مشترک پاسخ به بافتها با درجه بالایی برهمکنش می دهد، بیشترین کاهش بیان را در ریشه داشت و به شدت تحت تاثیر بافت بود (شکل ۲).

آماده سازی لیگاند

وین‌بلاستین پروانش طبق جدول ۲ با احتمال ۰.۹۶۳ توانایی مهار فسفوگلیکوپروتئین را دارد. که برای ادامه کار، فسفوگلیکوپروتئین به عنوان پروتئین هدف انتخاب شد.

آماده سازی رسپتور فسفوگلیکوپروتئین

ابتدا ساختار فسفوگلیکوپروتئین با شماره دسترسی (pdb id 3G5U) از پایگاه داده پروتئین دریافت شد. پس از آنالیز ساختار، مشخص شد که این پروتئین حاوی آمینواسیدهای هرز در جایگاه فعال خود است برای رفع این مشکل ابتدا ساختار توسط نرم افزار مدلر و سوئیس مدل به رفع این آمینواسیدهای هرز پرداخته شد. سپس با استفاده از سرور ucla آنالیز نمودار رامچاندرا پلات صورت گرفت و نرم افزار و سرور با یک دیگر مقایسه شدند (شکل ۳). نتایج نشان داد که سرور سوئیس مدل بر اساس هوش مصنوعی و الگوریتم آلفا فولد تولنایی بهتری برای رفع مشکل آمینواسیدهای هرز را دارند.

داکینگ مولکولی

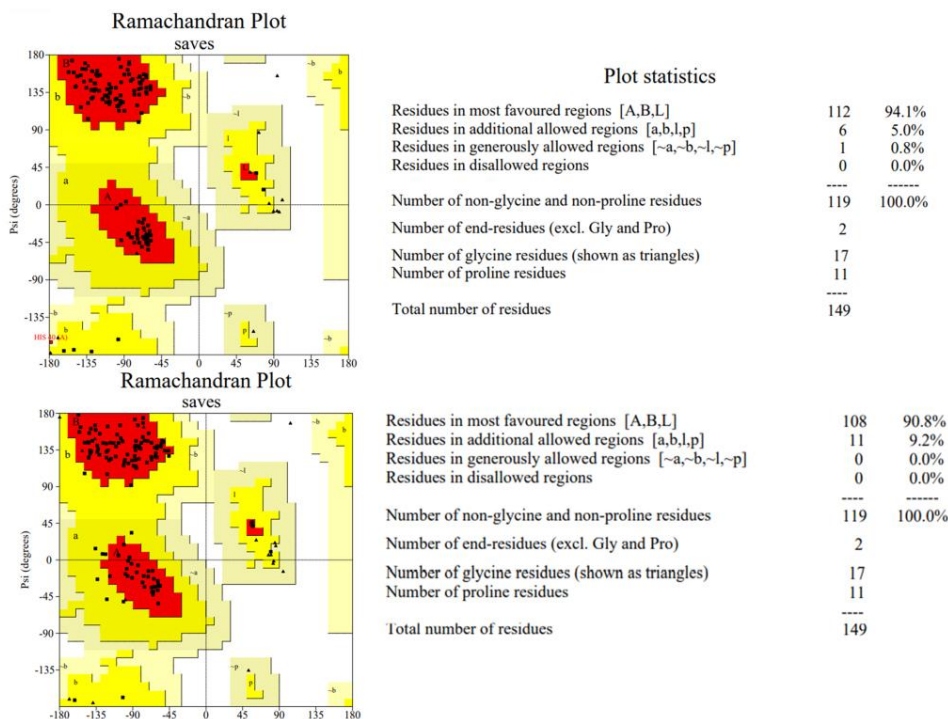
پس از آماده سازی ساختار رسپتورها و لیگاندها، داکینگ مولکولی بر روی ساختار فسفوگلیکوپروتئین صورت گرفت. با استفاده از نرم افزار اتوداک وینا ابتدا فراخوانی رسپتورها انجام شد. کاهش سطح انرژی ساختارها و فرآیند داکینگ انعطاف پذیر با نرم افزار کایمرا صورت گرفت. نتایج نشان داد که از بین متابولیت‌های غربال شده، متابولیت‌های ثانویه گیاه پروانش به خوبی تولنایی برهم‌کنش را با رسپتور فسفوگلیکوپروتئین دارند. از بین متابولیت‌های پروانش، وین‌بلاستین و وین‌کریستین بهترین برهم‌کنش را نشان دادند (جدول ۳ و ۴).

با استفاده از سرور way2drug خواص متابولیت‌های ثانویه از جمله وین‌بلاستین، وین‌کریستین در گیاه پروانش طبق جدول ۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، نتایج نشان داد که خواص ضد سرطانی، افزایش بیان ژن TP53، خواص ضد میکروبی و مهار فسفوگلیکوپروتئین در متابولیت‌های وین‌بلاستین، وین‌کریستین، ویندولین، اولاندرین و نیرین به میزان بالایی وجود دارد.

جدول ۲. خواص ضد سرطانی و میکروبی متابولیت‌های ثانویه در گیاه پروانش

ردیف	احتمال مهارکنندگی	رسپتور
۱	۰.۹۸۹	TP53 expression enhancer
۲	۰.۹۷۵	Tubulin antagonist
۳	۰.۹۶۶	CYP3A4 substrate
۴	۰.۹۶۳	P-glycoprotein substrate
۵	۰.۹۶۰	Lactose synthase inhibitor
۶	۰.۹۵۲	CYP3A substrate
۷	۰.۹۴۷	Xenobiotic-transporting ATPase inhibitor
۸	۰.۹۳۸	Cytostatic
۹	۰.۹۳۶	P-glycoprotein inhibitor
۱۰	۰.۹۳۱	Antineoplastic alkaloid
۱۱	۰.۸۷۲	Antineoplastic
۱۲	۰.۸۵۰	Beta tubulin antagonist
۱۳	۰.۸۰۹	Antineoplastic (Cervical cancer)
۱۴	۰.۷۶۸	Anticarcinogenic
۱۵	۰.۷۰۷	Antimitotic

بر اساس اطلاعات سرور way2drug که با استفاده از الگوریتم‌های هوش مصنوعی فعالیت می‌کند متابولیت



شکل ۳. نمودار رامچاندران پلات پروتئین فسفولیگوپروتئین

جدول ۳. نتایج داگینگ متابولیت وین بلاستین با رسپتور فسفولیگوپروتئین

ViewDock - C:\Users\AL\Desktop\پروانش\docking result\vincristin\7.pdbqt

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	-8.8	0.0	0.0	3	3	3
V	-8.6	2.548	9.109	1	1	1
V	-8.1	2.489	5.151	2	2	2
V	-7.8	1.898	4.382	3	3	2
V	-7.4	2.283	4.596	2	2	2
V	-7.3	2.414	5.292	0	0	0
V	-7.3	2.669	4.953	2	2	2
V	-6.7	2.209	8.571	3	3	3
V	-6.5	2.487	3.855	0	0	0
V	-6.5	2.572	5.083	1	1	1

جدول ۴. نتایج داگینگ متابولیت وین کریستین با رسپتور فسفولیگوپروتئین

ViewDock - C:\Users\AL\Desktop\پروانش\docking result\vinblastin\10.pdbqt

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	-9.2	0.0	0.0	1	1	1
V	-8.9	1.624	2.193	1	1	1
V	-8.3	2.061	9.157	1	1	1
V	-7.7	2.154	4.541	1	1	1
V	-7.5	2.28	4.817	0	0	0
V	-6.9	2.015	5.036	1	1	1
V	-6.8	2.184	4.541	1	1	1
V	-6.7	2.454	9.057	2	2	2
V	-6.4	2.112	8.707	0	0	0

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

میزان ثابت بودن لیگاند در جایگاه فعال فسفوگلیکوپروتئین با استفاده از نمودار RMSD مشخص می‌شود (شکل ۴). نتایج RMSD ثابت کرد که وین‌بلاستین از پایداری خوبی در برهم‌همکنش با فسفوگلیکوپروتئین برخوردار است.

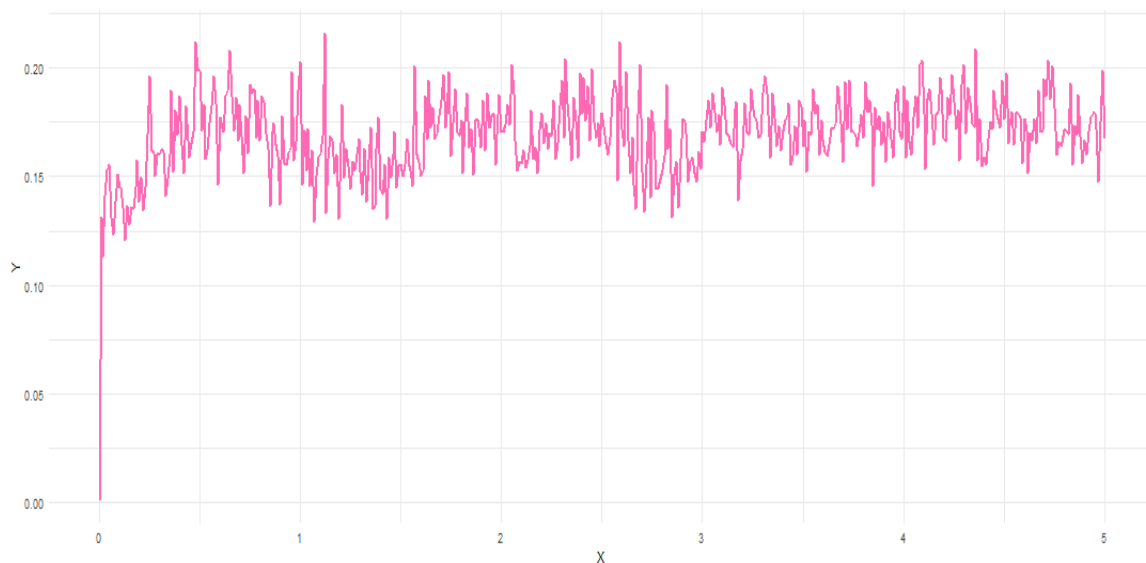
ایجاد می‌شود و فرد بیمار داروی وین‌بلاستین را مصرف می‌کند علاوه بر مهار فسفوگلیکوپروتئین، افزایش بیان TP53 رخ می‌دهد بنابراین این متابولیت ارزشمند به صورت هدفمند سرکوب ژن‌های مقاومت دارویی را انجام می‌دهد و منجر به افزایش بیان ژن‌های می‌شود که توسط فسفوگلیکوپروتئین محدود شده‌اند.

آنالیز شبکه ژنی

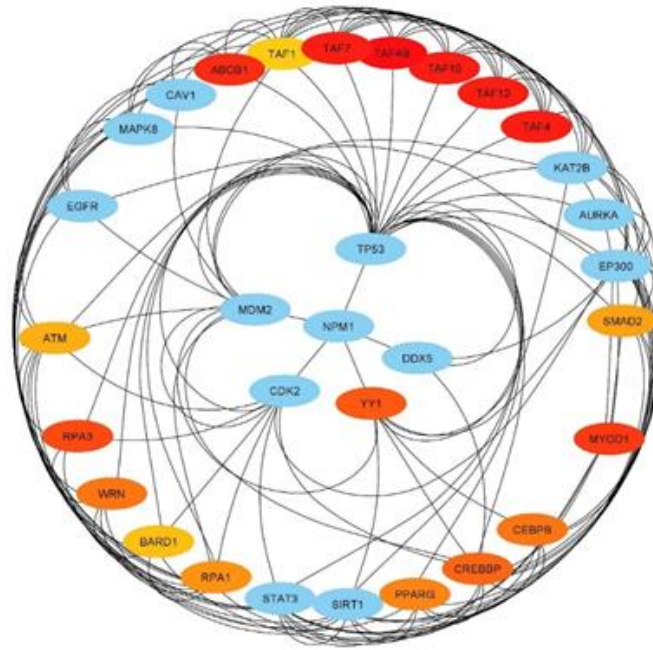
پس از آنکه مشخص شد که وین‌بلاستین توانایی مهار فسفوگلیکوپروتئین را دارد، آنالیز شبکه ژنی نشان داد (شکل ۵) که ارتباط هم‌بیانی بین افزایش بیان ژن MDM2 و کاهش بیان TP53 وجود دارد. همانگونه که در جدول (۲) مشخص شد که وین‌بلاستین تولنایی افزایش بیان ژن TP53 را دارد از نظر تئوری بیان ژن و آنالیز هم‌بیانی ژن‌ها، فسفوگلیکوپروتئین منجر به سرکوب ژن TP53 می‌شود. نکته قابل توجه این است که در زمانی که مقاومت دارویی

آنالیز مسیرهای سیگنالینگ

با استفاده از ۲۰ ژن‌ها که از آنالیز شبکه ژنی فسفوگلیکوپروتئین بدست آمد، آنالیز مسیرهای سیگنالینگ این ژن‌ها ثابت می‌کند زمانی که فسفوگلیکوپروتئین در ایجاد شبکه با ژن‌های سرکوب‌گر است DNA دچار آسیب‌های جدی می‌شود (شکل ۶). مسیرهای متفاوتی ممکن است در زمان بیان ژن MDR1 رخ دهد که با استفاده از پایگاه داده Enrichr شناسایی آن‌ها امکان‌پذیر است.



شکل ۴. آنالیز نمودار RMSD



شکل ۵. آنالیز شبکه ژنی با استفاده از سایتواسکب به منظور شناسایی اثرات متقابل بین ژن های هاب

The Overlap Between Signal Transduction Pathways that Contribute to a Range of LMNA Laminopathies WP4879

DNA IR-damage and cellular response via ATR WP4016

Pregnane X receptor pathway WP2876

DNA Repair Pathways Full Network WP4946

Integrated Cancer Pathway WP1971

G1 to S cell cycle control WP45

Irinotecan pathway WP229

Transcriptional cascade regulating adipogenesis WP4211

Homologous recombination WP186

Retinoblastoma gene in cancer WP2446

شکل ۶. آنالیز مسیرهای سیگنالینگ برای ۲۰ ژن هاب حاصل از آنالیز شبکه ژنی

نتیجه گیری و پیشنهادها

در تحقیق حاضر، الگوی بیانی در اندام های مختلف در گیاه پروانش و شناسایی ژن های درگیر در مسیر بیوسنتزی وین کریستین و وین بلاستین با استفاده از داده های RNA-Seq بررسی شد. در این مطالعه تعداد ژن های با بیان افتراقی در اندام های مختلف برگ، گل و ریشه متفاوت بود، اما در مجموع تعداد ژن های با بیان افتراقی در اندام برگ در برابر ریشه بیشترین بود که نشان می دهد فعل و انفعالات سلولی در برگ نسبت به ریشه فعالتر است. زیرا بیشترین تعداد متابولیت ها در گیاه پروانش در برگ تولید می شود (سجادی ۱۳۷۹). در مطالعه حاضر ۶ و ۱۳

ژن مشترک به ترتیب برای برگ در برابر گل با گل در برابر ریشه و برای برگ در برابر گل با گل در برابر ریشه و برگ در برابر ریشه بدست آمد. نتایج آنالیز GO نشان داد که فرآیندهای زیستی اختصاصی پروانش، فرآیندهای متابولیکی و فرآیندهای سلولی مرتبط با متابولیت های ثانویه بیشترین تعداد ژن ها را داشتند که حاکی از وضعیت فعال متابولیکی سلول است.

بیشترین تغییر بیان ژن در هر سه هسته مشترک ژن های پاسخگو به اندام، مربوط به ژن های دخیل در مسیر بیوسنتزی وین کریستین و وین بلاستین مشاهده شد که بیشترین آن مربوط به ژن STR بود. بطوریکه در برگ و ریشه به ترتیب بیشترین و کمترین

توانایی آنها در مهار مقاومت دارویی فسفولیپوپروتئین (P-Glycoprotein) آنالیز داکینگ و دینامیک مولکولی انجام شد. مطالعه داکینگ ثابت کرد که این دو ماده می‌توانند فسفولیپوپروتئین را مهار کنند. با توجه به اینکه دو متابولیت ثانویه وین‌بلاستین، وین‌کریستین به خوبی با رسپتور فسفولیپوپروتئین متصل شدند هنوز مشخص نیست که اگر فرمولاسیون دارویی با این سه ترکیب طراحی شود آیا ممکن است مقاومت تومرهای بدخیم بخصوص در بخش شیمی درمانی بشکند؟ و یا پروتئین فسفولیپوپروتئین که با وین‌بلاستین اینترکشن قوی داده است آیا از مهاجرت تومرهای تخمدان به سایر بخش‌ها جلوگیری می‌شود؟ در مجموع فرآیند داکینگ مولکولی گام اولیه‌ای است برای پاسخ به این سوالات که در آینده قطعا این موارد، پژوهشگران را به سمت خود جذب خواهد کرد. نتایج دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GROMACS2022، پایداری و عملکرد کمپلکس وین‌بلاستین و وین‌کریستین را با پذیرنده نشان داده است. این کمپلکس، RMSD کمتر و تغییرات متعادل تری داشت، که تایید کننده ثبات کمپلکس وین‌بلاستین با فسفولیپوپروتئین بود.

در مجموع، تکنیک داکینگ برای یافتن ترکیب صحیح لیگاند (پپتید) و گیرنده طراحی شده است و اکنون برای موارد دیگری هم مورد استفاده قرار گرفته است. فرآیند اتصال یک مولکول کوچک (پپتید) به پروتئینی هدف (پاتونژن) آن ساده نیست، چندین عامل بر تعامل بین آنها تاثیر می‌گذارد. پروتکل‌های سریع و ارزان داکینگ را می‌توان با تکنیک‌های دقیق همانند دینامیک مولکولی برای پیش بینی قابل اعتمادتر کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند ترکیب کرد. بنابراین، ترکیبی از دو تکنیک در یک پروتکل که در آن داکینگ برای غربالگری سریع کتابخانه‌های بزرگ و دینامیک مولکولی برای بررسی پایداری استفاده می‌شود می‌تواند راهگشای خوبی برای شناسایی پپتیدهای هدف باشد. با توجه به اطلاعات بدست آمده نتایج به خوبی برهم‌کنش پروتئین‌های هم خانواده مقاومت دارویی و همچنین پذیرنده را نشان داد. این فرآیند تاثیر متابولیت‌های ثانویه بر روی مقاومت دارویی را که مدتی است که مورد توجه محققان حوزه طراحی دارو قرار گرفته است را نشان داده است. با توجه به پیشرفت‌های اخیر بیوانفورماتیک و هوش مصنوعی توجه به فرمولاسیون دارویی و غربالگری مجازی پیشرفت‌های زیادی در این حوزه حاصل شده است و آینده نیز با توجه به فراگیر شدن علم بیوانفورماتیک، پیشرفت الگوریتم‌ها نیز اتفاق می‌افتد و در نهایت حوزه بیوانفورماتیک روز به روز گسترده‌تر خواهد شد.

بیان را نشان داد. نتایج مربوط به شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین نشان داد که ژن‌های DAT، STR، TDC، G10H، D4H، T16H2 بیشترین برهمکنش را با سایر ژن‌ها دارد که نقش مهمی را در مسیر بیوستتزی وین‌بلاستین و وینکریستین ایفا می‌کنند (Salami *et al.*, 2020). نتایج مربوط به آنالیز KEGG برای ژن‌های مشترک سه مقایسه نشان داد که در بین این مسیرها ژن‌های مرتبط با بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی دارند. در بافت برگ مسیرهای دیگر هم تغییر بیان معنی‌داری نشان دادند. این حالت نشان می‌دهد که بیشترین متابولیت‌ها در برگ فعال هستند. در حالیکه در ریشه به‌طور اختصاصی‌تر مسیرهای متابولیت‌های ثانویه کمتری تغییر کردند (Liu *et al.*, 2022).

دو ماده وین‌بلاستین و وینکریستین در مسیر ترپنوئید ایندول آلکالوئیدی به میزان کم در گیاه ساخته می‌شوند. فراهم نبودن سنتز آن بروش شیمیایی باعث شد تا استفاده از روش‌های زیست‌فناوری در راستای افزایش متابولیت‌های ثانویه از اهمیت بسزایی برخوردار شود. برخی از محرک‌های رشد به‌نظر می‌رسد توانایی افزایش این ترکیبات را داشته باشند. یکی از این محرک‌های رشد اسید سالیسیلیک است که سیستم دفاعی گیاه را تحریک می‌کند که در نهایت باعث بهبود عملکرد و افزایش محتوای کلی آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌شود. (Guo *et al.*, 2014; سلطانی، ۱۴۰۰).

از بین ۹ ژنی که در هر سه بافت تغییرات بیانی داشتند، به ترتیب بیشترین و کمترین بیان آنها مربوط به برگ و ریشه بود. آنالیزها نشان داد که این ۹ ژن در مسیر بیوستتزی وین‌بلاستین و وین‌کریستین نقش دارند. با توجه به اینکه بیشترین میزان این ترکیبات در برگ است به همین دلیل بیشترین تغییرات بیانی را در برگ نشان دادند. در این میان ژن STR، علاوه بر اینکه، بالاترین برهمکنش را به بقیه ژن‌های پاسخ به بافتها نشان داد، به شدت تحت تاثیر بافت بود. بنابراین انتخاب دقیق استراتژی تنظیم بیان ژن در بافت‌های مختلف می‌تواند نقش مهمی در افزایش متابولیت‌های ثانویه همچون وینکریستین و وین‌بلاستین داشته باشد (Soltani *et al.*, 2021).

در این تحقیق، تعدادی ژن به عنوان کلنید برای بهبود عملکرد وین‌کریستین و وین‌بلاستین معرفی شد که می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. در ادامه به منظور بررسی اثر پذیری خواص ضد سرطانی متابولیت‌های ثانویه گیاه پروانش (وین‌بلاستین و وین‌کریستین) و

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاریهای علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شده است.

References

- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-169.
- Bomzan, D., Shilpashree, H., Nagegowda, D. (2022). Agrobacterium-Mediated in Planta Transformation in Periwinkle. doi: 10.1007/978-1-0716-2349-7_22.
- Fatemi, F., Dadkhah, A., Honardoost, M., Ebrahimi, M., Hedayati, M., Shadnough, M. (2007). Mechanism of drug resistant in cancer. *Research in Medicine*, 31, 91-97. (in Persian)
- Guo, X.R., Chang, B.W., Zu, Y.G., Tang, Z.H. (2014). The impacts of increased nitrate supply on *Catharanthus roseus* growth and alkaloid accumulations under ultraviolet-B stress. *J Plant Interact* 9(1), 640-646.
- Heijden, R., Jacobs, D.L., Snoeijs, W., Hallard, D., Verpoorte, R. (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem* 11(5), 607-628.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., Badri, D.V., Vivanco, J.M. (2007). Effect of transporters on the secretion of phytochemicals by the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 301-310.
- Noble, R.L. (1990). The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol*, 68(12):1344-1351.
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G.M., Leek, J.T., Salzberg, S.L. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.* 11, 1650-1667.
- Sajjadi, E., and Hallard, D. (1959). Comparison of different organs of *Parvanesh* plant in terms of indole alkaloids production. *Pajohesh Sazandegi*, 13, 30-33. (in Persian)
- Soltani, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Shafeinia, A., Sadr, A.S., Shirali, M. (2021). Expression analysis of some genes involved in Terpenoid Indole Alkaloids pathway in periwinkle (*Catharanthus roseus*) following foliar application of salicylic acid. *Novin Genetic*, 16, 25-32. (in Persian)
- Sahandi Khalifeh-Kandy, A., Pazhouhandeh, M and Mohajjel-Shoja H. (2016). The effect of rolC gene the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Genetic engineering and biosafety*, 5, 41-50. (in Persian)
- Subramanian, A., Kuehn, H., Gould, J., Tamayo, P. & Mesirov, J. P. GSEA-P: A desktop application for gene set enrichment analysis. *Bioinformatics* 23(23), 3251-3253.
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., & Su, Z. (2017). agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W122–W129.
- Verpoorte, R. (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem* 11(5), 607-628.

ORIGINAL ARTICLE

Genome-wide bioinformatic analysis of MYB gene family in monocotyledons and dicotyledons

Sara Dezhsetan^{1*}, Parivash Nezami Anbaran¹, Mahdi Behnamian²

¹Department of Plant Production & Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

²Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Correspondence

Sara Dezhsetan

Email: sdezsetan@uma.ac.ir

ABSTRACT

The MYB transcription factor superfamily has a fundamental role in plant growth and development, activation of stress-responsive genes, and in some cases biosynthesis of key metabolites. The availability of potato, Arabidopsis (dicotyledonous), maize and barley (monocotyledonous) genome sequences provided the opportunity to identify 121, 139, 190 and 144 non-redundant MYB genes in these lineages, respectively. In the study of the evolutionary characteristics of MYB conserved domains in two monocotyledonous plants, corn and barley, they were remarkably similar to each other in terms of alignment and order of placement. This characteristic was also true in relation to two dicotyledonous plants, potato and Arabidopsis, but the difference between MYB conserved domains in monocots and dicots was significant. In other words, it seems that despite the similarity of MYB genes in monocots and dicots, this gene family in the evolution in monocots and dicots have derived from each other. The 2R-MYB members were the most common subgroup of the MYB family in monocots and dicots and only one member of the 4R-MYB subfamily was observed in maize. In all four plants, the main reason for the functional differentiation of genes in this gene family was segmental duplication that has led to positive and purifying evolutionary selection. MYB gene family was located on all chromosomes of potato, Arabidopsis, maize and barley with non-uniform distribution. The expression pattern of AT1G57560, AT2G47190, AT3G23250 and AT1G56650 genes changed in more than one test of abiotic stress and hormonal response. Also, the expression pattern of AT1G74080, AT4G12350, AT4G22680, AT2G47190, AT1G48000, AT2G39880, AT5G40330 and AT5G16600 genes changed in more than one biotic stress test. On the other hand, the expression pattern of the AT2G47190 gene showed increased expression in several biotic and abiotic stresses. The presence of diverse and numerous regulatory Cis elements in response to stresses and hormones in the promoter region of MYB genes and the investigation of the expression profiles of this gene family in biotic and abiotic stresses in Arabidopsis indicates the functional diversity of the genes of this superfamily. *In silico* investigation of MYB gene superfamily in monocots and dicots provides a framework for comparative, evolutionary and functional studies of the members of this important gene superfamily.

KEY WORDS

dicot, gene expression profile, monocot and transcription factors

How to cite

Dezhsetan, S., Nezami Anbaran, P., & Behnamian, M. (2023). Genome-wide Bioinformatic Analysis of MYB Gene Family in Monocotyledons and Dicotyledons. *Crop Biotechnology*, 13(44), 13-29.

© 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/>

رونویسی را تشکیل می‌دهند و آن‌ها نیز به عنوان عوامل رونویسی طبقه‌بندی می‌شوند. برای مثال عوامل رونویسی انگشت‌روی B-BOX، خانواده AUX/IAA و خانواده پروتئینی JAZ از این نوع پروتئین‌ها هستند (Gangappa & Botto, 2014).

پیشینه پژوهش

خانواده عوامل رونویسی MYB از متنوع‌ترین گروه‌های پروتئینی متصل‌شونده به DNA محسوب می‌شوند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی دخالت دارند (Jin & Martin, 1999). پروتئین‌های میلوبلاستوز (MYB) برای اولین بار در ویروس میلوبلاستوز پرندگان (AMV) شناسایی شدند (Klemppner *et al.*, 1982). خانواده پروتئینی MYB در همه گیاهان یافت شده است (Lipsick, 1996). عوامل رونویسی MYB حاوی یک DBD حفاظت‌شده (دامنه اتصال به DNA) هستند که به طور کلی از ۱ تا ۴ تکرار ناقص تشکیل شده‌اند که این تکرارها R نامیده می‌شوند (Lipsick, 1996; Dubos *et al.*, 2010). هر تکرار R شامل ۵۰ تا ۵۵ اسید آمینه در طول خود می‌باشد که سه ماریچ α را تشکیل می‌دهند. ماریچ‌های α هنگامی که به ناحیه خاص راه‌انداز ژن هدف متصل می‌شوند تشکیل می‌گردند (Lipsick, 1996; Ogata *et al.*, 1994).

خانواده عوامل رونویسی MYB براساس تعداد تکرارهای موجود در هر پروتئین به چهار زیرخانواده شامل 1R-MYB (MYB-related)، 2R-MYB (R2R3-MYB)، 3R-MYB (R1R2R3-MYB) و 4R-MYB گروه‌بندی می‌شوند. پروتئین‌های 4R-MYB کوچک‌ترین عضو این گروه هستند که هر ژن در این گروه حاوی چهار تکرار R1/R2 می‌باشد و در گیاهان این گروه از پروتئین‌ها کمتر شناخته شده‌اند (Dubos *et al.*, 1994; Ogata *et al.*, 2010). خانواده ژنی 1R-MYB (MYB-related) حاوی یک تکرار ناقص یا منفرد از MYB، خانواده‌ی ژنی 2R-MYB دارای دو تکرار مجاور و 3R-MYB حاوی سه تکرار مجاور هستند. اعضای 2R-MYB رایج‌ترین زیرگروه از خانواده MYB هستند که در گیاهان یافت می‌شوند درحالی‌که در حیوانات پروتئین‌های 3R-MYB گروه غالب هستند (Dubos *et al.*, 2010). پیشنهاد شده است که ژن‌های 2R-MYB احتمالاً از اجداد R1R2R3-MYB در اثر از دست دادن تکرار R1 تکامل پیدا کرده‌اند. با این حال، بسیاری از گزارش‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های 3R-MYB از ژن‌های 2R-

مقدمه

امروزه امنیت غذایی جهان با چالش بزرگی مواجه است که به طور مداوم با افزایش سریع جمعیت و تغییرات شدید آب و هوا نشان داده شده است. این امنیت غذایی عمدتاً به بخش کشاورزی و به‌ویژه تولید محصولات کشاورزی ارتباط دارد. بهره‌وری کشاورزی با تنش‌های مختلفی مواجه است که ممکن است در مورد تنش‌های غیرزیستی ۵۰ تا ۷۰ درصد و در مورد تنش‌های زیستی ۴۰ تا ۶۰ درصد تلفات ایجاد کند (Tiwari *et al.*, 2020). رایج‌ترین تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سیل، تنش‌های شدید دما و غیره هستند، در حالی که باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها تنش‌های زیستی می‌باشند. پیشرفت در ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی منجر به توسعه فناوری توالی‌یابی با توان بالا شده است. در نتیجه، گیاه‌شناسان توانستند ژن‌ها و مناطق ژنتیکی مرتبط با صفات موردتوجه را شناسایی کنند. طی سال‌ها، این ژن‌ها و اطلاعات ژنتیکی با موفقیت برای بهبود محصول از نظر عملکرد، ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته است.

گیاهان مکانیسم‌های پیچیده‌ای را در سطوح مختلف برای افزایش تحمل و سازگاری با شرایط نامطلوب ایجاد کرده‌اند. شناسایی نشانه‌های تنش و انتقال پیام‌ها برای فعال کردن پاسخ‌های سازگار و تنظیم ژن‌های مرتبط با تنش، گام‌های کلیدی برای تحمل تنش‌های گیاهی می‌باشد (Matsui *et al.*, 2008). القای ژن‌های مرتبط با تنش عمدتاً در سطح رونویسی رخ می‌دهد و اصلاح الگوهای بیان زمانی و مکانی ژن‌های خاص مرتبط با تنش بخش مهمی از پاسخ به تنش در گیاه است (Rushton & Somssich, 1998).

عوامل رونویسی طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های دفاعی را در گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی فعال می‌کنند. شناسایی اعضای خانواده‌های عوامل رونویسی گامی موثر برای شناخت ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد و البته با شناخت هر چه بیشتر آن‌ها می‌توان به اصلاح و مقاوم‌سازی گیاهان زراعی در برابر تنش‌ها کمک موثری نمود (Century *et al.*, 2008). عوامل رونویسی پروتئین‌هایی هستند که توالی‌های اختصاصی DNA در راه‌اندازها را شناسایی می‌کنند. هر چند که پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های تنظیمی فاقد نواحی اتصال به DNA نیز وجود دارند که مستقیماً با عوامل رونویسی متصل‌شونده به DNA برهمکنش داشته و کمپلکس‌های

رونویسی 2R-MYB متعددی در گیاهانی مانند برنج (Yanhui et al., 2006)، ذرت (Du et al., 2012)، کلزا (Hajiebrahimi et al., 2017) و گیاهان باغبانی گل اطلسی (Chen et al., 2021) و توت‌فرنگی (Liu et al., 2021) شناسایی و از نظر عملکردی آنالیز شده‌اند.

در سیب‌زمینی ژن‌های MYB نقش حیاتی در تنظیم سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (Mehrtens et al., 2005; Paz-Ares et al., 1987; Stracke et al., 2007) و ایجاد مقاومت در برابر تنش غیرزیستی (Yao et al., 2016) دارند. در ژنوم ذرت، بیان ZmMYB30 به‌طور قابل‌توجهی در شرایط خشکی و شوری بالا افزایش یافته است (Chen et al., 2018). همچنین افزایش بیان ZmMYB-IF35 در لاین M54 ذرت مقاوم به سرما گزارش گردید. در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس با بیان بیش از حد ZmMYB-IF35 تحمل سرما بهبود بخشیده شد، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی بالاتر، سطوح کمتر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و نشت یونی کمتر مشاهده شد (Yang et al., 2012). تجزیه و تحلیل الگوهای بیانی ۴۶ ژن ZmMYB تحت تنش غیرزیستی مختلف نشان داد که ۲۲ ژن به تیمارهای تنش متفاوت پاسخ دادند. ژن ZmMYB30 تحت چهار تنش به‌شدت افزایش بیان نشان داد، اما ژن ZmMYB53 فقط در تنش سرما افزایش بیان نشان داد (Chen et al., 2018). مطالعه عملکرد عامل رونویسی HvMYB1 در جو نشان داد که بیان ژن در ریشه‌ها و برگ‌های جو نوع وحشی تحت تنش خشکی و اسمری تنظیم مثبت می‌شود. بیان بیش از حد ژن HvMYB1 در گیاهان جو تراریخته منجر به مقاومت بیشتر به خشکی در مقایسه با شاهد گردید، محتوای نسبی آب افزایش، سرعت اتلاف آب کاهش و هدایت روزنه‌ای کمتر شد (Alexander et al., 2019). ژن TaMYB31 به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت مقاومت به خشکی از طریق تنظیم مثبت ژن‌های بیوستنزکننده موم و ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی عمل می‌کند (Zhao et al., 2018). عملکرد ژن‌های 2R-MYB‌ها در تنظیم مسیرهای بیوستنز فنیل-پروپانوئید، فلاونوئید و لیگنین به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Liu et al., 2015; Ma & Constabel, 2019). راه‌انداز ژن‌های CBF آرابیدوپسیس حاوی یک توالی شناسایی MYB هستند و می‌توانند توسط عوامل رونویسی MYB فعال شوند. بیان ژن ZmMYB31 (2R-MYB) در دمای پایین القا می‌شود که بیان بیش از حد این ژن در

MYB در اثر اکتساب تکرار R1 تکامل یافته‌اند (Jiang et al., 2004). زیرخانواده 2R-MYB بزرگترین زیرخانواده MYB است که برخی از اعضای آن در رشد و نمو گیاه و تنظیم متابولیک نقش دارند (Du et al., 2012; Liu et al., 2021; Stracke et al., 2001; J. Wang et al., 2020; N. Wang et al., 2020; Zhang et al., 2019)، که متابولیسم اولیه و ثانویه تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف (Fang et al., 2017; Song et al., 2020) و سنتز هورمون و انتقال پیام را شامل می‌شود (Ke et al., 2021). اخیراً، افزایش دسترسی به توالی‌های ژنوم گیاهی، درک بهتر این خانواده ژنی بزرگ را آسان‌تر کرده است (Liu et al., 2021; J. Wang et al., 2019; N. Wang et al., 2020). در سال‌های اخیر، مطالعات بیشتری روی عوامل رونویسی 2R-MYB متمرکز شده است. اولین ژن گیاهی (C1) R3R3-MYB COLORED1 از گیاه ذرت (*Zea mays* L.) جداسازی شد که یک پروتئین تنظیمی دخیل در بیوستنز آنتوسیانین را رمزگذاری می‌کند (Paz-Ares et al., 1987). همچنین RCP1 از خانواده رونویسی 2R-MYB، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی را در گل‌های *Mimulus lewisii* تنظیم می‌کند (Sagawa et al., 2016). در گوجه‌فرنگی، SIMYB72 با کاهش بیان ژن‌های فیتوئن سنتز (PSY)، cis-۱۵-کارتوتن ایزومراز (ZISO) و لیکوپین بتا سیکلاز (LCYB) بیوستنز کاروتنوئید را به‌طور منفی تنظیم می‌کند (Wu et al., 2020). در مرکبات، CrMYB68 مستقیماً با تنظیم بیان راه‌اندازهای CrBCH2 و CrNCED5، تبدیل آلفا و بتاکاروتن را سرکوب می‌کند (Zhu et al., 2017). ژن فرایبان‌شده AdMYB7 در کیوی راه‌انداز LCY-β را تنظیم مثبت می‌کند و محتوای رنگدانه کاروتنوئید و کلروفیل را افزایش می‌دهد (Ampomah-Dwamena et al., 2019).

به‌دلیل عملکرد قدرتمند ژن‌های MYB، تعداد فزاینده‌ای از ژن‌های MYB در سطح کل ژنوم بسیاری از گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای شناسایی شده‌اند. در گزارشات اخیر، به عنوان مثال ۱۹۷ ژن MYB در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* L.، ۱۵۵ ژن MYB در برنج (Katiyar et al., 2012)، ۱۰۸ ژن *R2R3 MYB* در انگور (Matus et al., 2008)، ۱۵۷ ژن *R2R3 MYB* در ذرت (Du et al., 2012)، ۱۸۵ ژن *R2R3 MYB* در گلابی سفید (Li et al., 2016) و ۵۲۴ ژن MYB در پنبه (Salih et al., 2016) شناسایی شدند. همچنین در سال‌های اخیر، عوامل

همچنین، برای تایید مجدد حضور دامنه‌های MYB در توالی‌ها از پایگاه اطلاع‌رسانی <http://smart.emblheidelberg.de/> استفاده گردید.

دسته‌بندی خانواده ژنی MYB هر یک از گیاهان

برای تایید ژن‌های MYB شناسایی شده بر اساس MAST در سایت Ensembl Plant از پایگاه اطلاعاتی ITAK-Plant (<http://itak.feilab.net>) استفاده شد و ژن‌های MYB استخراج شده از سایت Ensembl Plant به ژن‌های خانواده MYB، MYB-related، GARP-G2-like، GARP-ARR-، B، Trihelix و ARID دسته‌بندی شدند و در نهایت برای ادامه‌ی پروژه فقط ژن‌های MYB و MYB-related جداسازی شدند.

محاسبه duplicate gene و انواع آن

رویدادهای تکراری در ژن‌های MYB با همدریف کردن توالی‌های DNA رمزکننده (CDS) MYB از طریق نرم‌افزار CLUSTALW ([https://www.genome.jp/tools-](https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw)) شناسایی شدند.

جفت ژن‌های تکراری با بیش از ۸۵ درصد تشابه به عنوان duplicate gene لحاظ شدند. بر اساس قرارگیری duplicate gene segmental و tandem duplication و duplication مشخص شدند. توالی‌های tandem duplication روی یک کروموزوم قرار دارند و فاصله آن‌ها کمتر از ۱۰۰ kb است و segmental duplication توالی‌هایی هستند که روی یک کروموزوم با فاصله بیش از ۱۰۰ kb قرار دارند یا روی دو کروموزوم متفاوت واقع شده‌اند (Li et al., 2012).

محاسبه میزان Ks و Kn

برای تخمین واگرایی MYB‌های همولوگ و فشار انتخابی بر ژن‌های تکراری، از نرم‌افزار MEGA برای محاسبه نرخ جایگزینی Ks (مترادف) و Kn (غیرمترادف) در هر سایت بین اعضای هر جفت ژن استفاده شد. سپس با استفاده از فرمول زیر نسبت Kn/Ks و Data Million Years Ago (MYA) برای هر ژن محاسبه شد و جدول مربوطه به دست آمد.

رابطه (۱) Lynch & Conery, 2000) MYA: $[T = (Kn/2\lambda)] \times 10^{-6}$ ($\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$)

آرابیدوپسیس، بیان ژن‌های CBF را افزایش داد و در نتیجه منجر به مقاومت گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس در برابر دمای پایین و تنش اکسیداتیو گردید (M. Li et al., 2019). همچنین، اعضای عوامل رونویسی MYB R2R3 در آرابیدوپسیس چندین عملکرد متفاوت دارند. برخی از عوامل رونویسی MYB R2R3 قادر به تنظیم رشد و نمو گیاه هستند، به‌عنوان مثال، MYB7 و MYB70 جوانه‌زنی بذر را تنظیم می‌کنند (Kim et al., 2015; Wan et al., 2021).

در این پژوهش، به بررسی تعداد، طبقه‌بندی و مقایسه روابط خویشاوندی اعضای خانواده‌ی ژنی عوامل رونویسی MYB در گیاهان تک‌لپه‌ای (ذرت و جو) و گیاهان دولپه‌ای (سیب‌زمینی و آرابیدوپسیس)، مقایسه‌ی توالی‌های حفاظت شده اعضای خانواده ژنی عوامل رونویسی MYB گیاهان تک‌لپه‌ای و دو لپه‌ای، مقایسه ویژگی‌های راه‌اندازهای اعضای خانواده ژنی MYB گیاهان تک‌لپه‌ای و دو لپه‌ای و مطالعه نقش عملکردی اعضای خانواده ژنی عوامل رونویسی MYB در گیاه آرابیدوپسیس پرداخته شد.

روش شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های خانواده MYB گیاهان مورد مطالعه

ژن‌های خانواده ژنی MYB دو گیاه تک‌لپه‌ای ذرت (*Zea mays* L.) و جو (*Hordeum vulgare* L.) و دو گیاه دولپه‌ای سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.) با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Ensembl Plant (<https://plants.ensembl.org>) جست‌وجو و شناسایی شدند.

شناسایی ژن‌های رمزکننده دامنه MYB

با استفاده از پایگاه اطلاعاتی MEME ([https://meme-](https://meme-suite.org))، با استفاده از نرم‌افزار آنالین MEME، ۵ دامنه مشترک معنی‌دار توالی‌های پروتئینی MYB استخراج شده از پایگاه اطلاعاتی Ensembl Plant در هر گیاه شناسایی شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار آنالین MAST در پایگاه اطلاعاتی Ensembl Plants Genomes and Proteins پروتئین‌های دارای ۵ دامنه مشترک معنی‌دار با Evaluate کمتر از ۱۰^{-۵} شناسایی شدند. توالی‌های تکراری نسخه‌های یک پروتئین و توالی‌های ناقص به‌صورت دستی حذف شدند.

سرما و گرما، پاسخ به هورمون‌های گیاهی و تنش‌های زیستی از پایگاه داده بیانی دانشگاه علوم و تکنولوژی Peking (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/soybean/>) داده‌های مربوط به ژن‌های MYB آراییدوپسیس استخراج گردید. اطلاعات مربوط به آزمایشات مذکور برای تنش‌های زیستی و غیرزیستی در جدول ۱ ذکر شده است. داده‌های بیانی FPKM دریافتی جهت نرمال‌سازی به $\log_2(\text{FPKM}+0.1)$ تبدیل و سپس نقشه حرارتی با استفاده از نرم‌افزار TBtools رسم گردید (Chen *et al.*, 2020).

یافته‌های پژوهش

شناسایی اعضای خانواده ژنی عوامل رونویسی MYB

در این پژوهش توالی‌های ژنی خانواده عوامل رونویسی MYB هر یک از گیاهان سیب‌زمینی، ذرت، جو و آراییدوپسیس در سایت Ensembl Plants جست‌وجو شدند که در مجموع به ترتیب ۲۲۴، ۳۲۱، ۲۰۴ و ۲۴۱ توالی احتمالی پروتئینی به‌عنوان اعضای خانواده ژنی MYB در این گیاهان مشخص شد و در انتها پس از تایید وجود و بررسی سطح معنی‌داری و بررسی مجدد این پروتئین‌ها در سایت iTAK-Plant، به ترتیب ۱۲۱، ۱۹۰، ۱۴۴ و ۱۳۹ توالی پروتئینی که دارای توالی کامل MYB بودند شناسایی شدند و توالی‌های تکراری، توالی‌های پروتئینی که دامنه MYB ناقص داشتند و یا به علت شباهت کاذب شناسایی شده بودند حذف شدند.

در این پژوهش، برای سهولت در خواندن نام توالی‌های گیاهان تغییراتی ایجاد شد، به این صورت که در سیب‌زمینی به جای PGSC0003DMT400 عبارت PGS، در ذرت به جای Zm00001eb عبارت Zm جایگذاری شد و در جو عبارت HORVU.MOREX.r3 کاملاً حذف شد (جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴، [supplemental 1](#)).

همردیفی چندگانه و ترسیم درخت فیلوژنتیک

همردیفی توالی‌های پروتئینی MYB شناسایی‌شده با استفاده از Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) انجام شد. براساس داده‌های همردیف‌شده فایل درخت فیلوژنتیکی با استفاده از سایت IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) به دست آمد و با استفاده از نرم‌افزار آنالین iTOL (<https://itol.embl.de/>) درخت فیلوژنتیک ترسیم گردید.

ترسیم جایگاه کروموزومی ژن‌های MYB روی ژنوم

ژن‌های MYB شناسایی‌شده با استفاده از نرم‌افزار TBtools روی کروموزوم‌های سیب‌زمینی، ذرت، جو و آراییدوپسیس براساس موقعیت پیش‌بینی‌شده‌شان در Ensembl Plant نگاشت شدند.

آنالیز عوامل تنظیمی Cis ناحیه راه‌انداز ژن‌های MYB

به‌منظور شناسایی عوامل تنظیمی Cis (همسو) در ناحیه راه‌انداز ژن‌های MYB ۱۵۰۰ نوکلئوتید بالادست جایگاه شروع رونویسی (TSS) از پایگاه اطلاعاتی Ensembl Plants استخراج شدند. برای شناسایی عوامل تنظیمی Cis (همسو)، از پایگاه اطلاعاتی Plant CARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار TBtools یک نقشه کلی از عناصر Cis (همسو) ناحیه راه‌انداز خانواده ژنی MYB در هر گیاه ترسیم شد.

آنالیز الگوی بیانی خانواده ژنی MYB گیاه

آراییدوپسیس

به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های MYB و درک کارکرد احتمالی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری،

جدول ۱. شماره دسترسی و مشخصات آزمایش‌ها برای آنالیز بیان ژن‌های MYB در تنش‌های زیستی و غیرزیستی در آراییدوپسیس

NO	Accession number test	Characteristics assessed	Tissue	Reference
1	PRJNA295091	Salt and heat stress	leaves	(Suzuki <i>et al.</i> , 2016)
2	PRJNA354369	MeJA and BTH	seedlings	(Yang <i>et al.</i> , 2017)
3	PRJNA324514	Cold, heat and wounding	leaves	(Klepikova <i>et al.</i> , 2016)
4	PRJNA488799	Heat	whole plant	(Grinevich <i>et al.</i> , 2019)
5	PRJNA411947	Cold stress	cotyledon, hypocotyl, seed, flower and leaves	(Klepikova <i>et al.</i> , 2019)
6	PRJNA413141	<i>Verticillium dahliae</i>	roots and hyphae	(Scholz <i>et al.</i> , 2018)
7	PRJNA261035	<i>Vibrio vulnificus</i>	leaf	(Park <i>et al.</i> , 2019)
8	PRJNA326102	<i>Alternaria brassicicola</i>	rosette leaves	(Rausch, 2016)
9	PRJNA413057	<i>P. xylostella larvae</i>	leaves	--

گروه‌بندی خانواده ژنی عوامل رونویسی MYB

عوامل رونویسی MYB گیاهان به ۴ زیرخانواده طبقه‌بندی شدند که این طبقه‌بندی شامل MYB-relate (1R-MYB)، R2R3- MYB (2R-MYB)، R1R2R3-MYB (3R-MYB) و 4R- MYB است که زیرخانواده 4R-MYB فقط در ذرت مشاهده شد. در این پژوهش به ترتیب در سیب‌زمینی ۲، ۱۱۶، ۳ و ۰ در ذرت ۱۲، ۱۷۳، ۴ و ۱، در جو ۴، ۱۳۵، ۵ و ۰ و در آرابیدوپسیس ۶، ۱۲۷، ۶ و ۰ MYB-relate (1R-MYB)، R2R3-MYB (2R-MYB)، R1R2R3-MYB (3R-MYB) و 4R-MYB شناسایی شد (جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴، [supplemental 1](#)) که اعضای 2R-MYB رایج‌ترین زیرگروه از خانواده MYB در گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای بودند.

شناسایی و طبقه‌بندی duplicate gene

رویدادهای تکراری در ژن‌های MYB با هم‌ردیفی توالی‌های DNA رمزکننده (CDS) MYB از طریق نرم‌افزار CLUSTALW با استفاده از معیارهای ارزیابی دقیق E-value $\leq 10^{-5}$ و $\text{identity} > 80\%$ و $\text{length of aligned sequences} > 80\%$ براساس روش کلونجر و همکاران (Clevenger *et al.*, 2016) انجام شد و تعداد ژن‌های تکراری در هر گیاه، tandem duplication و segmental duplication مشخص گردید. همچنین، CDS ژن‌هایی که به‌عنوان duplicate gene شناسایی شدند با استفاده از نرم‌افزار MEGA (نسخه 11.0.10) مجدداً هم‌ردیف شدند تا مقادیر Kn و Ks تعیین شوند. Kn/Ks (نسبت جایگزینی غیرمتراصف به مترادف) و Date (million years ago, MYA) محاسبه شد. مقدار Kn/Ks می‌تواند زمان وقوع تکرار ژن و فشار تکاملی روی ژن را نشان دهد. رویداد تکرار ژن عامل مهمی در تمایز عملکردی ژن‌ها در گونه است. براساس نقشه‌یابی ژن‌های تکراری روی کروموزوم‌ها هیچ tandem duplication شناسایی نشد. بنابراین، یک مسیر مهم برای تکثیر ژن‌های MYB در این گیاهان، segmental duplication است و دلیل اصلی تمایز عملکردی ژن‌ها می‌باشد (جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴، [supplemental 2](#)).

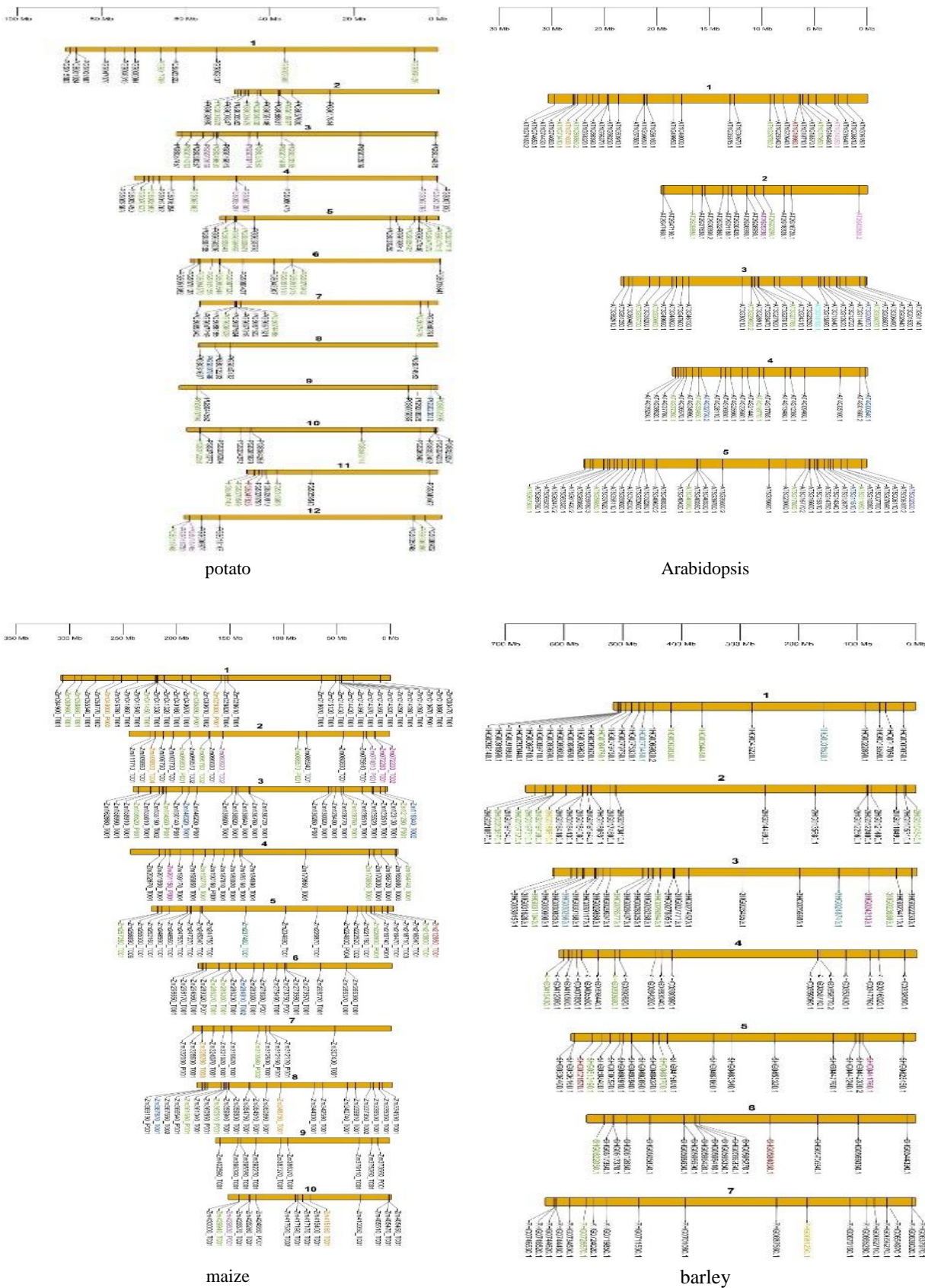
مقادیر Kn/Ks معرف موارد زیر است (Yang & Bielawski, 2000):

Kn/Ks = 1 reveals neutral selection
Kn/Ks < 1 Shows purifying selection
Kn/Ks > 1 Implicates accelerated evolution with positive selection

با تجزیه و تحلیل duplicate gene در سیب‌زمینی ۴ جفت ژن تکراری منجر به گزینش تکاملی مثبت و ۳ جفت ژن تکراری منجر به گزینش تکاملی منفی، در ذرت ۹ جفت ژن تکراری منجر به گزینش تکاملی مثبت و ۵۶ جفت ژن تکراری منجر به گزینش تکاملی منفی، در جو هر ۱۰ جفت ژن تکراری منجر به گزینش تکاملی منفی و در آرابیدوپسیس یک جفت ژن تکراری با گزینش تکاملی منفی شناسایی شد.

هم‌ردیفی چندگانه و ترسیم درخت فیلوژنتیک

سایت iTOL (<https://itol.embl.de>) یک ابزار آنلاین برای نمایش، دستکاری و حاشیه‌نویسی روابط خویشاوندی است. این ابزار به‌صورت رایگان در دسترس می‌باشد. بررسی فیلوژنتیک و ترسیم درخت فیلوژنتیک (Phylogenetic Tree) در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی و سایر مطالعات علمی حائز اهمیت می‌باشند. برای ترسیم درخت فیلوژنتیک، دامنه‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های MYB با استفاده از نرم‌افزار آنلاین MEME شناسایی شدند. سپس با استفاده از سایت Clustal Omega داده‌ها هم‌ردیف و با استفاده از نرم‌افزار آنلاین iTOL نقشه فیلوژنتیک ترسیم گردید و براساس تعداد، نوع و پراکنش دامنه‌های اعضای خانواده ژنی MYB به چند دسته تقسیم شدند که با رنگ‌های مختلف علامت‌گذاری شده‌اند (اشکال، [supplemental 1](#)). قسمت بیرونی دایره درخت فیلوژنتیک نمایانگر درخت فیلوژنتیک توالی‌های MYB، دامنه‌های مختلف حفاظت‌شده و طول پروتئین‌ها می‌باشد. در مجموع با تجزیه و تحلیل دامنه‌ها در گیاه سیب‌زمینی مشخص شد که توالی‌های مشخص شده با رنگ سیاه بیشترین فراوانی را داشتند و هر چهار دامنه مشخص شده در شکل (قرمز، سبز، آبی و بنفش) را شامل می‌شدند که این امر نشان‌دهنده اصلی‌ترین دامنه‌های حفاظت‌شده در حوزه ساختاری پروتئین‌های MYB سیب‌زمینی هستند. توالی‌های باقیمانده براساس دامنه‌های سبز، قرمز، بنفش و آبی نشانه‌گذاری شدند. همچنین توالی‌های مشخص شده با رنگ قرمز و آبی خاص و ناهماهنگ با بقیه توالی‌های بود. تعداد و نوع دامنه‌های موجود در توالی‌های مختلف پروتئین‌های MYB متفاوت است و تفاوت در تعداد، نوع و پراکنش دامنه‌های حفاظت‌شده ممکن است منجر به عملکردهای متفاوت هر ژن گردد. نشانه‌گذاری و دسته‌بندی توالی‌ها در آرابیدوپسیس، ذرت و جو براساس رنگ‌بندی انجام شد. همچنانکه براساس تصاویر مشخص است مسیر تکاملی خانواده ژنی MYB در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها اختصاصی شده است.



شکل ۲. مکان ژن‌های خانواده MYB روی کروموزوم‌های سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس، ذرت و جو. رنگ‌بندی آنها منطبق بر رنگ‌بندی درخت فیلوژنتیک است.

ABRE2، ABRE3a و ABRE4 (۲۲۶)، پاسخ‌دهنده به اتیلین ERE (۱۴۰)، عنصر همسو پاسخ به دمای پایین LTR (۳۲)، عنصر همسو پاسخ به جیبرلین P-box (۳۳)، عناصر پاسخ به زخم W box (۶۷) و WUN-motif (۷۱) و عنصر پاسخ به الیستینور WRE3 (۴۷) دارای فراوانی قابل ملاحظه بودند. در گیاه آرابیدوپسیس عناصر همسو پاسخ‌دهنده به خشکی MBS (۴۲)، MYB recognition site و MYC (۳۶۴) MYB (۴۱۵) و (۲۵)، پاسخ به اسید آسبیزیک ABRE2، ABRE3a و ABRE4 (۴۵۱)، پاسخ‌دهنده به اتیلین ERE (۱۳۰)، عنصر همسو پاسخ به دمای پایین LTR (۶۸)، عنصر همسو پاسخ به جیبرلین P-box (۴۰)، عناصر پاسخ به زخم W box (۷۳) و WUN-motif (۷۷) و عنصر پاسخ به الیستینور WRE3 (۴۶) فراوانی قابل توجهی را به خود اختصاص دادند. در گیاه ذرت عناصر همسو پاسخ‌دهنده به خشکی MBS (۹۵)، MYC (۴۶۹)، MYB recognition site (۶۱۹) MYB (۹۹)، DRE core (۱۰۸) و DRE1 (۲۱)، پاسخ به اسید آسبیزیک ABRE2، ABRE3a و ABRE4 (۷۷۱)، پاسخ‌دهنده به اتیلین ERE (۶۶)، عنصر همسو پاسخ به دمای پایین LTR (۸۹)، عنصر همسو پاسخ به جیبرلین P-box (۵۹)، عناصر پاسخ به زخم W box (۱۰۴) و WUN-motif (۳۸) و عنصر پاسخ به الیستینور WRE3 (۱۱۷) فراوانی قابل توجهی داشتند. در گیاه جو، بیشترین فراوانی را عناصر همسو پاسخ‌دهنده به خشکی MBS (۸۶)، MYC (۳۵۵)، MYB recognition site (۴۴۳) MYB (۷۷)، DRE core (۹۶) و DRE1 (۱۱)، پاسخ به اسید آسبیزیک ABRE2، ABRE3a و ABRE4 (۵۲۰)، پاسخ‌دهنده به اتیلین ERE (۳۶)، عنصر همسو پاسخ به دمای پایین LTR (۶۹)، عنصر همسو پاسخ به جیبرلین P-box (۴۴)، عناصر پاسخ به زخم W box (۹۳) و WUN-motif (۲۴) و عنصر پاسخ به الیستینور WRE3 (۹۵) به خود اختصاص دادند. تعداد تکرار عناصر همسو در ناحیه راه‌انداز اعضای خانواده ژنی MYB از صفر، یک تا بیش از یک تکرار متغیر بود.

الگوهای بیان ژن‌های MYB در گیاه آرابیدوپسیس

بررسی رابطه فیلوژنتیک و الگوهای عناصر همسو نشان می‌دهد که MYBها در گروه‌های مختلف قابل طبقه‌بندی هستند. فراوانی بیان متفاوت این ژن‌ها در بافت‌های مختلف اطلاعاتی را در رابطه با نقش آن‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف فراهم می‌کند. در این

شناسایی عناصر تنظیمی همسو پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها

هورمون‌ها تأثیر عمیقی بر فیزیولوژی گیاهان دارند و تقریباً در تمام جنبه‌های فرآیند رشد و نمو گیاه شرکت می‌کنند. در این پژوهش عناصر تنظیمی همسو که شامل عناصر پاسخ به ABA (ABRE)، ABRE2، ABRE3a و ABRE4 (AT-ABRE)، پاسخ به جیبرلین (GARE، P-box و TATC-box)، پاسخ به اسید سالیسیلیک (SARE، TCA-element)، پاسخ به اتیلین (ERE)، پاسخ به اکسین (TGA-box، TGA-element و AuxRR-core) و پاسخ همزمان به جیبرلین و ABA (CARE)، عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و الیستینور (WRE3، AT-rich sequence)، پاسخ به زخم و پاتوژن (W box، W box، WUN-motif)، پاسخ به خشکی (DRE core، DRE1، MBS، MYB، MYB recognition site)، پاسخ به سرما (LTR)، پاسخ به تنش (TC-rich repeats) و پاسخ به anoxic (GC-motif) در ۱۵۰۰ نوکلئوتید در ناحیه بالادست (راه‌انداز) ژن‌های MYB شناسایی شدند (جدول، اشکال ۱، ۲، ۳ و ۴، [supplemental 3](#)). به‌عنوان مثال اکسین به‌عنوان یک عامل زیستی با تنظیم بیان ژن‌های پاسخ به اکسین، اثرات پلئوتروپیک عمیقی بر رشد و تمایز گیاهان دارد. واکنش اکسین معمولاً توسط عوامل پاسخ به اکسین (ARFs) هدایت می‌شود که به عنصر پاسخ به اکسین (AuxRE) در ناحیه راه‌انداز ژن هدف متصل می‌شوند. هورمون گیاهی اکسین که در تمامی مراحل رشد گیاهان نقش دارد، نقش مهمی در حفظ عملکرد فیزیولوژیکی و تنظیم اکثر پاسخ‌های اصلی گیاه از جمله طول‌شدن، تقسیم و تمایز سلولی، همچنین شروع ریشه‌دهی و ... دارد (Abel et al., 1996). آزمایش‌ها تنها تعداد محدودی از ژن‌های گیاهی را با عملکردهای مشخص شناسایی می‌کنند ولی در آنالیز بیوانفورماتیکی ناحیه راه‌انداز خانواده ژنی MYB گیاهان سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس، ذرت و جو بیست و نه عنصر فعال همسو شناسایی شد که به‌طور بالقوه در تنظیم بیان ژن‌های خانواده MYB نقش دارند. ترکیب عناصر همسو و عوامل رونویسی در توالی راه‌انداز ژن به‌طور مشترک شروع رونویسی ژن را تنظیم می‌کنند و تفاوت‌ها و الگوهای توزیع عناصر همسو کارایی رونویسی را تنظیم و عملکرد ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

در این مطالعه، در گیاه سیب‌زمینی عناصر همسو پاسخ‌دهنده به خشکی MBS (۲۵)، MYC (۲۷۷)، MYB (۲۳۵) و MYB recognition site (۱۲)، پاسخ به اسید آسبیزیک ABRE،

در آزمایش [PRJNA324514](#) تنش‌های گرما، سرما و زخم در ساعت‌های مختلف بر بیان ژن‌های برگ بررسی شد. به عنوان مثال، ژن‌های AT5G07690 و AT5G61420 ۲۴ ساعت پس از تنش گرما کاهش بیان قابل ملاحظه‌ای داشتند. ژن‌های AT5G07700 و AT1G56650 بر اثر تنش گرما کاهش بیان ولی بر اثر زخم افزایش بیان نشان دادند. همچنین ژن AT2G47190 در اثر تنش گرما افزایش بیان نشان داد. ژن AT3G23250 در اثر تنش زخم در ۱ تا ۱۲ ساعت افزایش بیان و در اثر تنش سرما کاهش بیان نشان داد.

آزمایش [PRJNA488799](#) برای درک تغییرات زمان روز در پاسخ‌های شوک حرارتی آرابیدوپسیس انجام شد. تفاوت‌های قابل توجهی از نظر بقای گیاه در پاسخ به شوک گرمایی در زمان‌های مختلف روز مشاهده شد. به همین دلیل احتمال می‌رود پاسخ‌های رونویسی ممکن است یک عامل اساسی مهم باشند که در تغییرات فیزیولوژی مشارکت دارند و به قابلیت بقا پس از تنش گرمایی کمک می‌کنند. نمونه‌های بافتی چهار تکرار در دو نوبت در روز (سپیده‌دم و غروب) جمع‌آوری شدند و به جز شاهد، تنش حرارتی (۳۰ درجه سانتیگراد) به مدت ۱ ساعت اعمال گردید. به عنوان مثال، در این آزمایش در اثر تنش حرارتی ژن‌های AT5G65230، AT1G79180، AT1G17950، AT1G73410، AT5G23000، AT3G12720، AT1G57560، AT3G12820 در سپیده‌دم و غروب کاهش بیان نشان دادند.

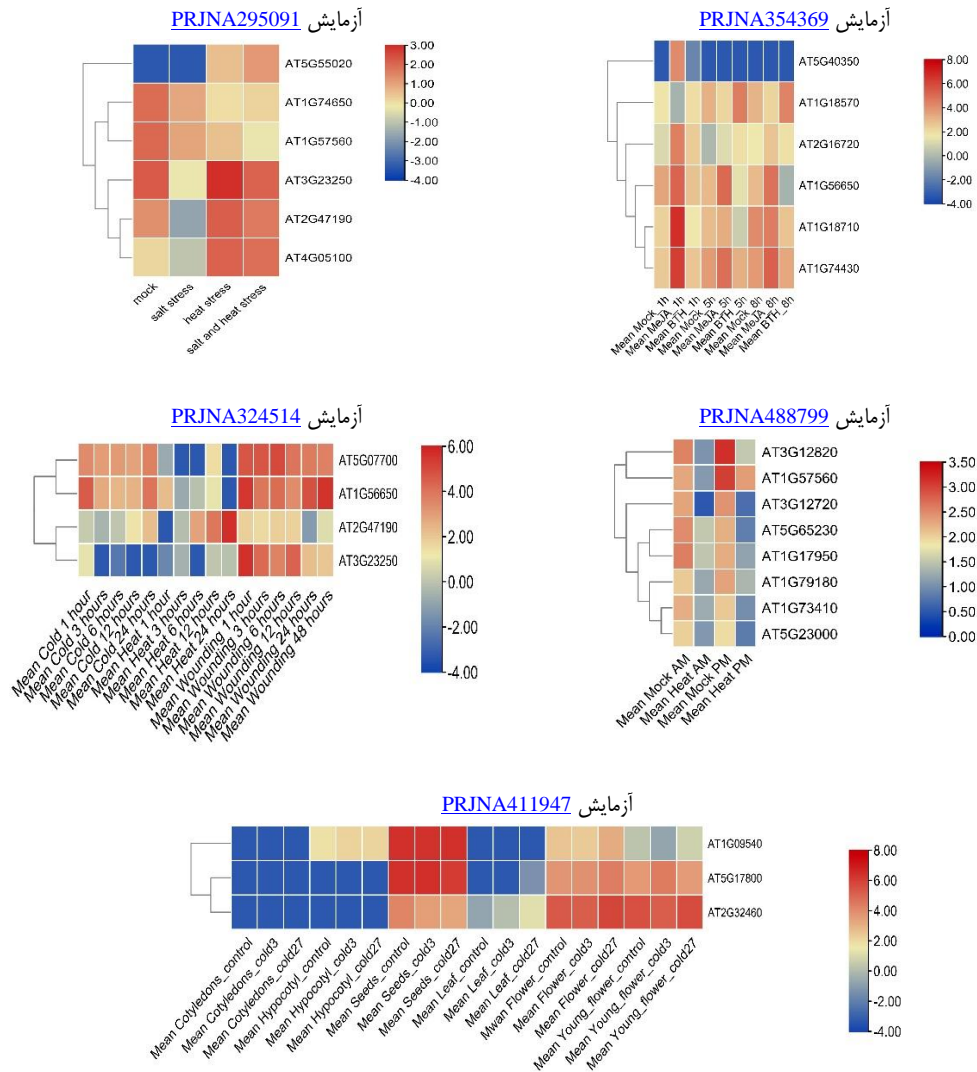
آزمایش [PRJNA411947](#) به منظور به دست آوردن دیدگاهی در رابطه با استراتژی‌های شبکه ژنی اختصاصی اندام‌ها در پاسخ به تنش سرما انجام شد. تغییرات بیانی ژن‌ها با اعمال تنش سرما 4°C روی دانه، لپه، هیپوکوتیل، گل‌های جوان و بالغ و برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس انجام شد. پس از ۳ و ۲۷ ساعت بیان ژن‌ها در اندام‌های مختلف بررسی گردید. مشخص گردید روند افزایش یا کاهش بیان ژن‌های MYB در پاسخ به تنش سرما کاملاً وابسته به اندام گیاهی است. به عنوان مثال، ژن AT1G09540 در بذر نسبت به لپه و برگ افزایش چشمگیری نشان داد. ژن AT5G17800 در بذر، گل‌های جوان و بالغ نسبت به لپه، هیپوکوتیل و برگ افزایش بیان چشمگیری نشان داد. ژن AT2G32460 در بذر، گل بالغ و جوان نسبت به دیگر بافت‌ها افزایش بیان نشان داد.

پژوهش، سطح بیان ژن‌های MYB آرابیدوپسیس در چندین آزمایش براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده بیانی دانشگاه علوم و تکنولوژی <http://ipf.sustech.edu.cn/pub/soybean/> به صورت بیوانفورماتیکی بررسی شد. در ۹ آزمایشی که به منظور شناسایی الگوهای بیان ژن‌های MYB در آرابیدوپسیس بررسی شد. ۴ آزمایش مربوط به تنش‌های غیرزیستی یک آزمایش پاسخ به هورمون‌ها و ۴ آزمایش مربوط به تنش زیستی بودند. نقشه حرارتی کامل خوشه‌بندی سلسله‌ای این آزمایشات در پیوست آورده شده است ([supplemental 4](#)).

آنالیز بیان ژن‌های MYB در تنش‌های غیرزیستی

در آزمایش [PRJNA295091](#) تغییرات در سطح رونوشت‌برداری در برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس که در معرض تنش شوری، گرما و هر دو تنش قرار گرفته بودند مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به عنوان مثال، در این آزمایش ژن‌های AT1G74650 و AT1G57560 بر اثر تنش‌های گرما، شوری و شوری-گرما کاهش بیان نشان دادند و بیان ژن‌های AT2G47190، AT3G23250 و AT4G05100 در تنش شوری کاهش و در تنش گرما و تنش همزمان شوری-گرما افزایش نشان دادند. همچنین ژن AT5G55020 در تنش گرما و تنش همزمان شوری-گرما افزایش بیان نشان داد.

در آزمایش [PRJNA354369](#) گیاهچه‌های آرابیدوپسیس *تالیانا* با ۵۰ میکرومولار MeJA (methyl jasmonate) و ۳۰۰ میکرومولار BTH (salicylic acid analog benzothiadiazole) و محلول کنترل (۰/۰۲٪ سیلوت، ۰/۱٪ اتانول) اسپری شدند. گیاهچه‌های آرابیدوپسیس *تالیانا* دو هفته‌ای (اکوتیپ Col-0) رشد کرده در شرایط روز کوتاه (۹ ساعت روشنایی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ساعت تاریکی در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد)، نمونه‌ها ۱، ۵ و ۸ ساعت پس از محلول‌پاشی برداشت شدند. به عنوان مثال، در این آزمایش مشاهده شد که ژن‌های AT2G16720، AT5G40350 و AT1G18710 پس از یک ساعت تیمار با متیل جاسمونات (MeJA) افزایش بیان، ژن‌های AT1G74430 و AT1G56650 پس از ۱، ۵ و ۸ ساعت افزایش بیان نشان دادند. ژن AT1G18570 بر اثر همین تیمار پس از ۱ ساعت کاهش بیان و در تیمار با BTH پس از ۱، ۵ و ۸ ساعت افزایش بیان نشان داد.

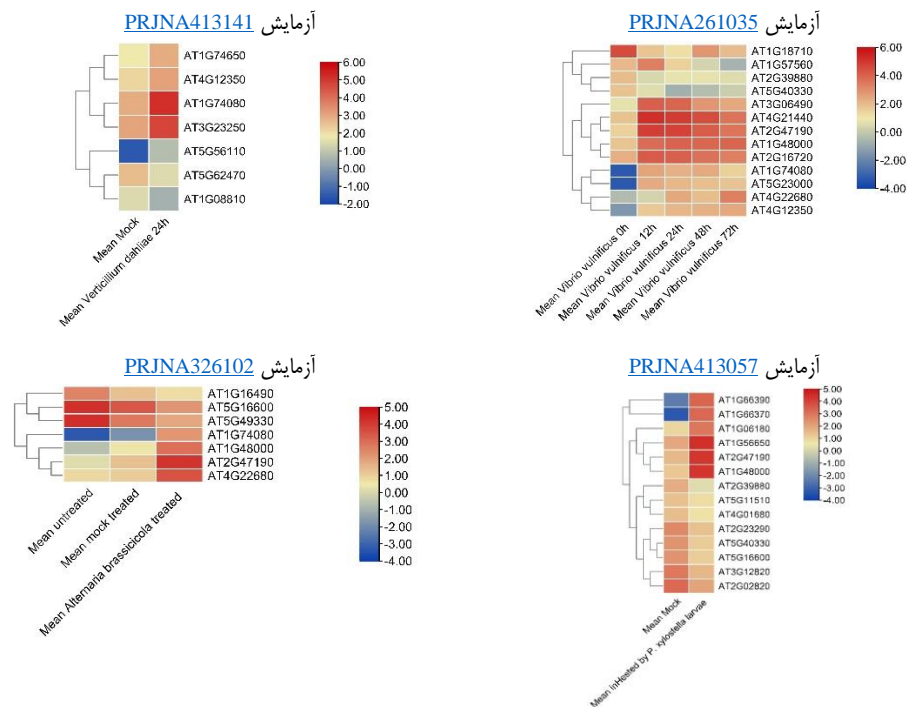


شکل ۳. نقشه‌های حرارتی الگوی بیان ژن‌های MYB در اثر تنش‌های غیرزیستی و پاسخ هورمونی در آراییدوپسیس

در آزمایش [PRJNA261035](#) پروفایل بیان ژن‌ها در آراییدوپسیس آلوده به باکتری *Vibrio vulnificus* مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها در آراییدوپسیس با گذشت زمان پس از آلودگی به *Vibrio vulnificus* بود. پروفایل بیان ژن در صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با *Vibrio vulnificus* به دست آمد. مشخص گردید برخی از ژن‌های MYB در پاسخ به این باکتری در دوره‌های زمانی مختلف افزایش یا کاهش بیان نشان داده‌اند. به‌عنوان مثال، ژن‌های AT5G23000، AT4G22680، AT1G74080، AT4G12350، AT4G21440، AT2G47190، AT1G48000، AT2G16720 و AT3G06490 پس از ساعت صفر افزایش بیان و ژن‌های AT1G18710، AT1G57560، AT5G40330 و AT2G39880 کاهش بیان نشان دادند.

آنالیز بیان ژن‌های MYB در تنش‌های زیستی

در آزمایش [PRJNA413141](#) تغییرات در پروفایل بیان ژن‌ها در تعامل *Verticillium dahliae*-*Arabidopsis* بررسی گردید. *Verticillium dahliae* یک پاتوژن آوندی خاکزی است که منجر به علائم شدید پژمردگی در طیف وسیعی از گیاهان می‌شود. کشت همزمان قارچ با ریشه‌های آراییدوپسیس به مدت ۲۴ ساعت باعث ایجاد تغییرات زیادی در پروفایل بیان ژن‌ها در هر دو موجود گردید. در این آزمایش به‌عنوان مثال، ژن‌های AT1G74080، AT3G23250، AT5G56110، AT4G12350 و AT1G74650 در تنش زیستی *V. dahliae* افزایش بیان و ژن‌های AT1G08810 و AT5G62470 کاهش بیان نشان دادند.



شکل ۴. نقشه‌های حرارتی الگوی بیان ژن‌های MYB در اثر تنش‌های زیستی در آرابیدوپسیس

تا در تنش‌های زیستی و غیرزیستی که گیاهان در فرآیند رشد با آن مواجه می‌شوند، مقاومت نشان دهند. امروزه موضوع اکثر تحقیقات کشاورزی مولکولی شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در فرآیند رشد و نمو، پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و بررسی مکانیسم‌های مولکولی آن‌ها می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد عوامل رونویسی در طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های رشد و نمو و پاسخ‌های دفاعی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش کلیدی ایفا می‌کنند.

در این مطالعه، اعضای خانواده ژنی MYB در دو گیاه دولپه‌ای سیب‌زمینی (۱۲۱) و آرابیدوپسیس (۱۳۹) و دو گیاه تک‌لپه‌ای ذرت (۱۹۰) و جو (۱۴۴) شناسایی و از نظر تکاملی و پراکنش ژنومی بررسی شدند و خصوصیات عملکردی این خانواده ژنی در تنش‌های زیستی و غیرزیستی و پاسخ هورمونی براساس داده‌های بیانی RNAseq در آرابیدوپسیس ارزیابی گردید. در بررسی خصوصیات تکاملی دامنه‌های حفاظت‌شده MYB در دو گیاه تک‌لپه‌ای ذرت و جو از نظر هم‌ردیفی و ترتیب قرار گرفتن، شباهت چشمگیری با یکدیگر داشتند و این خصوصیت در رابطه با دو گیاه دولپه‌ای سیب‌زمینی و آرابیدوپسیس نیز صادق بود؛ ولی تفاوت دامنه‌های حفاظت‌شده MYB در تک‌لپه‌ای‌ها از دولپه‌ای قابل توجه بود. به عبارت دیگر، چنین به نظر می‌رسد که علی‌رغم شباهت ژن‌های MYB در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها، این خانواده

در آزمایش PRJNA326102 قارچ *Alternaria brassicicola* روی آرابیدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت. *Alternaria brassicicola* یک پاتوژن قارچی نکروتروفیک مخرب است که سبب ایجاد بیماری لکه سیاه در خانواده براسیکا می‌گردد. به عنوان مثال، در این آزمایش ژن‌های AT1G74080، AT1G48000، AT2G47190 و AT4G22680 نسبت به تیمار با این قارچ افزایش بیان نشان دادند و در مواردی مانند AT1G16490، AT5G49330، AT5G16600 کاهش بیان نشان دادند.

در آزمایش PRJNA413057 بیان ژن‌های آرابیدوپسیس نسبت به نفوذ لارو *Plutella xylostella* مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های AT1G66370، AT1G66390، AT1G06180، AT1G48000، AT2G47190 و AT1G56650 با نفوذ این لارو افزایش بیان نشان دادند و ژن‌های AT4G01680، AT5G11510، AT2G39880، AT5G16600، AT5G40330، AT2G23290 و AT3G12820 کاهش بیان نشان دادند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در هر لحظه از زندگی یک گیاه، هزاران ژن به صورت هماهنگ بیان می‌شوند تا رشد و نمو آن را تنظیم کنند و به آن کمک کنند

پاسخ هورمونی و چهار آزمایش تنش زیستی در آرابیدوپسیس بیانگر الگوی بیانی متفاوت ژن‌های خانواده MYB بود. به‌عنوان مثال، در بیش از یک آزمایش تنش غیرزیستی و پاسخ هورمونی، الگوی بیان ژن‌های AT1G57560، AT2G47190، AT3G23250 و AT1G56650 تغییر کردند. همچنین، در بیش از یک آزمایش تنش زیستی، الگوی بیان ژن‌های AT1G74080، AT4G12350، AT4G22680، AT2G47190، AT1G48000، AT2G39880، AT5G40330 و AT5G16600 تغییر کردند. از طرف دیگر، الگوی بیان ژن AT2G47190 در چندین تنش زیستی و غیرزیستی افزایش بیان نشان داد. بررسی بیوانفورماتیکی ابرخانواده ژنی MYB، مطالعات تکمیلی داده‌های بیانی ژن‌های منتخب، مسیر را برای تولید گیاهان تراریخته مدل با هدف بررسی ژن‌های القاکننده مقاومت به تنش تسهیل می‌نماید که در نهایت نتایج تحقیقات می‌تواند منجر به تولید گیاهان مقاوم به تنش از طریق اصلاح نباتات یا بیوتکنولوژی گردد.

ژنی در مسیر تکاملی در تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها از یکدیگر انشقاق یافته‌اند. اعضای 2R-MYB رایج‌ترین زیرگروه از خانواده MYB در گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای بودند و تنها یک عضو از زیرخانواده 4R-MYB فقط در ذرت مشاهده شد. رویداد تکرار ژن عامل مهمی در تمایز عملکردی ژن‌ها در گونه است. در گیاهان مورد بررسی یک مسیر مهم برای تکثیر ژن‌های MYB و دلیل اصلی تمایز عملکردی ژن‌ها در این خانواده segmental duplication بود که منجر به گزینش تکاملی مثبت و منفی گردیده است. همچنین، رویداد تکرار ژن‌های خانواده MYB در ژنوم ذرت در مقایسه با سه گیاه دیگر قابل توجه بود. خانواده ژنی MYB روی تمامی کروموزوم‌های سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس، ذرت و جو با پراکنش غیریکنواخت قرار گرفته بودند. در این پژوهش، وجود عناصر تنظیمی متنوع و متعدد پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در ناحیه راه‌انداز ژن‌های MYB دلالت بر تنوع کارکردی ژن‌های این ابرخانواده دارد. همچنین بررسی پروفایل بیانی این خانواده ژنی در پنج آزمایش تنش غیرزیستی و

References

- Abel, S., Ballas, N., Wong, L., & Theologis, A. (1996). DNA elements responsive to auxin. *BioEssays*, 18(8), 647–654. <https://doi.org/10.1002/bies.950180808>
- Alexander, R. D., Wendelboe-Nelson, C., & Morris, P. C. (2019). The barley transcription factor HvMYB1 is a positive regulator of drought tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.014>
- Ampomah-Dwamena, C., Thrimawithana, A. H., Dejnopratt, S., Lewis, D., Espley, R. V., & Allan, A. C. (2019). A kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) R2R3-MYB transcription factor modulates chlorophyll and carotenoid accumulation. *New Phytologist*, 221(1), 309–325. <https://doi.org/10.1111/nph.15362>
- Anwar, M., Yu, W., Yao, H., Zhou, P., Allan, A. C., & Zeng, L. (2019). NtMYB3, an R2R3-MYB from Narcissus, regulates flavonoid biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5456. <https://doi.org/10.3390/ijms20215456>
- Century, K., Reuber, T. L., & Ratcliffe, O. J. (2008). Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant Physiology*, 147(1), 20–29. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117887>
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8), 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>
- Chen, G., He, W., Guo, X., & Pan, J. (2021). Genome-wide identification, classification and expression analysis of the MYB transcription factor family in Petunia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4838. <https://doi.org/10.3390/ijms22094838>
- Chen, Y. H., Cao, Y. Y., Wang, L. J., Li, L. M., Yang, J., & Zou, M. X. (2018). Identification of MYB transcription factor genes and their expression during abiotic stresses in maize. *Biologia Plantarum*, 62(2), 222–230. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0756-1>
- Clevenger, J., Chu, Y., Scheffler, B., & Ozias-Akins, P. (2016). A developmental transcriptome map for allotetraploid *Arachis hypogaea*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01446>
- Du, H., Feng, B.-R., Yang, S.-S., Huang, Y.-B., & Tang, Y.-X. (2012). The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PLoS ONE*, 7(6), e37463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037463>

- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Fang, Q., Jiang, T., Xu, L., Liu, H., Mao, H., Wang, X., Jiao, B., Duan, Y., Wang, Q., Dong, Q., Yang, L., Tian, G., Zhang, C., Zhou, Y., Liu, X., Wang, H., Fan, D., Wang, B., & Luo, K. (2017). A salt-stress-regulator from the Poplar R2R3 MYB family integrates the regulation of lateral root emergence and ABA signaling to mediate salt stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.018>
- Gangappa, S. N., & Botto, J. F. (2014). The BBX family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 19(7), 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.010>
- Grinevich, D. O., Desai, J. S., Stroup, K. P., Duan, J., Slabaugh, E., & Doherty, C. J. (2019). Novel transcriptional responses to heat revealed by turning up the heat at night. *Plant Molecular Biology*, 101(1–2), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00873-3>
- Hajiebrahimi, A., Owji, H., & Hemmati, S. (2017). Genome-wide identification, functional prediction, and evolutionary analysis of the R2R3-MYB superfamily in Brassica napus. *Genome*, 60(10), 797–814. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0059>
- Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X., & Peterson, T. (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene*, 326, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.049>
- Jin, H., & Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*, 41, 577–585. <https://doi.org/10.1023/a:1006319732410>
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., & Bansal, K. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, 13(1), 544. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-544>
- Ke, Y., Abbas, F., Zhou, Y., Yu, R., & Fan, Y. (2021). Auxin-responsive R2R3-MYB transcription factors HcMYB1 and HcMYB2 activate volatile biosynthesis in *Hedychium coronarium* flowers. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710826>
- Kim, J. H., Hyun, W. Y., Nguyen, H. N., Jeong, C. Y., Xiong, L., Hong, S., & Lee, H. (2015). AtMyb7, a subgroup 4 R2R3 Myb, negatively regulates ABA-induced inhibition of seed germination by blocking the expression of the bZIP transcription factor ABI5. *Plant, Cell & Environment*, 38(3), 559–571. <https://doi.org/10.1111/pce.12415>
- Klempnauer, K., Gonda, T., & Bishop, J. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 31, 453–463.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Klepikova, A. V., Kulakovskiy, I. V., Kasianov, A. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2019). An update to database TraVA: organ-specific cold stress response in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 19(S1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1636-y>
- Li, M., Lin, L., Zhang, Y., & Sui, N. (2019). ZmMYB31, a R2R3-MYB transcription factor in maize, positively regulates the expression of CBF genes and enhances resistance to chilling and oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 46(4), 3937–3944. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04840-5>
- Li, X., Xue, C., Li, J., Qiao, X., Li, L., Yu, L., Huang, Y., & Wu, J. (2016). Genome-Wide Identification, Evolution and Functional Divergence of MYB Transcription Factors in Chinese White Pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 824–847. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw029>
- Li, Y., Xiao, J., Wu, J., Duan, J., Liu, Y., Ye, X., Zhang, X., Guo, X., Gu, Y., Zhang, L., Jia, J., & Kong, X. (2012). A tandem segmental duplication (TSD) in green revolution gene Rht-D1b region underlies plant height variation. *New Phytologist*, 196(1), 282–291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04243.x>
- Lipsick, J. S. (1996). One billion years of Myb. *Oncogene*, 13(2), 223–235. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8710361/>
- Liu, J., Osbourn, A., & Ma, P. (2015). MYB Transcription Factors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(5), 689–708. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.012>
- Liu, J., Wang, J., Wang, M., Zhao, J., Zheng, Y., Zhang, T., Xue, L., & Lei, J. (2021). Genome-wide

- analysis of the R2R3-MYB gene family in *Fragaria× ananassa* and its function identification during anthocyanins biosynthesis in pink-flowered strawberry. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702160>
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494), 1151–1155. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1151>
- Ma, D., & Constabel, C. P. (2019). MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, 24(3), 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.12.003>
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T. A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Kawashima, M., Satou, M., Kim, J.-M., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K., & Seki, M. (2008). Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology*, 49(8), 1135–1149. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn101>
- Matus, J. T., Aquea, F., & Arce-Johnson, P. (2008). Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biology*, 8(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-83>
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., & Weisshaar, B. (2005). The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 138(2), 1083–1096. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058032>
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., & Nishimura, Y. (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, 79(4), 639–648. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90549-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90549-5)
- Park, Y.-S., Kim, S.-K., Kim, S.-Y., Kim, K. M., & Ryu, C.-M. (2019). The transcriptome analysis of the *Arabidopsis thaliana* in response to the *Vibrio vulnificus* by RNA-sequencing. *PLOS ONE*, 14(12), e0225976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225976>
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P., & Saedler, H. (1987). The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO Journal*, 6, 3553–3558.
- Rausch, S. (2016). *The function of Arabidopsis microRNAs in defense against the necrotrophic fungal pathogen Alternaria brassicicola*.
- Rushton, P. J., & Somssich, I. E. (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(4), 311–315. [https://doi.org/10.1016/1369-5266\(88\)80052-9](https://doi.org/10.1016/1369-5266(88)80052-9)
- Sagawa, J. M., Stanley, L. E., LaFountain, A. M., Frank, H. A., Liu, C., & Yuan, Y. (2016). An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers. *New Phytologist*, 209(3), 1049–1057. <https://doi.org/10.1111/nph.13647>
- Salih, H., Gong, W., He, S., Sun, G., Sun, J., & Du, X. (2016). Genome-wide characterization and expression analysis of MYB transcription factors in *Gossypium hirsutum*. *BMC Genetics*, 17(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0436-8>
- Scholz, S. S., Schmidt-Heck, W., Guthke, R., Furch, A. C. U., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Oelmüller, R. (2018). *Verticillium dahliae*-*Arabidopsis* interaction causes changes in gene expression profiles and jasmonate levels on different time scales. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00217>
- Song, Y., Yang, W., Fan, H., Zhang, X., & Sui, N. (2020). TaMYB86B encodes a R2R3-type MYB transcription factor and enhances salt tolerance in wheat. *Plant Science*, 300, 110624. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110624>
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrtens, F., Niehaus, K., & Weisshaar, B. (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 50(4), 660–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x>
- Stracke, R., Werber, M., & Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 447–456. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- Suzuki, N., Bassil, E., Hamilton, J. S., Inupakutika, M. A., Zandalinas, S. I., Tripathy, D., Luo, Y., Dion, E., Fukui, G., Kumazaki, A., Nakano, R., Rivero, R. M., Verbeck, G. F., Azad, R. K., Blumwald, E., & Mittler, R. (2016). ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PLOS ONE*, 11(1), e0147625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147625>
- Tiwari, R. K., Lal, M. K., Naga, K. C., Kumar, R., Chourasia, K. N., S, S., Kumar, D., & Sharma, S. (2020). Emerging roles of melatonin in mitigating

- abiotic and biotic stresses of horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 272, 109592. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109592>
- Wan, J., Wang, R., Zhang, P., Sun, L., Ju, Q., Huang, H., Lü, S., Tran, L.-S., & Xu, J. (2021). MYB70 modulates seed germination and root system development in *Arabidopsis*. *IScience*, 24(11), 103228. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103228>
- Wang, J., Liu, Y., Tang, B., Dai, X., Xie, L., Liu, F., & Zou, X. (2020). Genome-wide identification and capsaicinoid biosynthesis-related expression analysis of the R2R3-MYB gene family in *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.598183>
- Wang, N., Ma, Q., Ma, J., Pei, W., Liu, G., Cui, Y., Wu, M., Zang, X., Zhang, J., Yu, S., Ma, L., & Yu, J. (2019). A comparative genome-wide analysis of the R2R3-MYB gene family among four *Gossypium* Species and their sequence variation and association with fiber quality traits in an interspecific *G. hirsutum* × *G. barbadense* Population. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00741>
- Wu, M., Xu, X., Hu, X., Liu, Y., Cao, H., Chan, H., Gong, Z., Yuan, Y., Luo, Y., Feng, B., Li, Z., & Deng, W. (2020). SIMYB72 regulates the metabolism of chlorophylls, carotenoids, and flavonoids in tomato fruit. *Plant Physiology*, 183(3), 854–868. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00156>
- Yang, A., Dai, X., & Zhang, W.-H. (2012). A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2541–2556. <https://doi.org/10.1093/jxb/err431>
- Yang, L., Teixeira, P. J. P. L., Biswas, S., Finkel, O. M., He, Y., Salas-Gonzalez, I., English, M. E., Epple, P., Mieczkowski, P., & Dangl, J. L. (2017). *Pseudomonas syringae* type III effector HopBB1 promotes host transcriptional repressor degradation to regulate phytohormone responses and virulence. *Cell Host & Microbe*, 21(2), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.003>
- Yang, Z., & Bielawski, J. P. (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(12), 496–503. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01994-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01994-7)
- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G., & Li-Jia, Q. (2006). The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60(1), 107–124. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2910-y>
- Yao, L., Jiang, Y., Lu, X., Wang, B., Zhou, P., & Wu, T. (2016). A R2R3-MYB transcription factor from *Lablab purpureus* induced by drought increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*, 43(10), 1089–1100. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4042-7>
- Zhang, Y., Zhang, B., Yang, T., Zhang, J., Liu, B., Zhan, X., & Liang, Y. (2020). The GAMYB-like gene SIMYB33 mediates flowering and pollen development in tomato. *Horticulture Research*, 7(1), 133. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00366-1>
- Zhao, Y., Cheng, X., Liu, X., Wu, H., Bi, H., & Xu, H. (2018). The wheat MYB transcription factor TaMYB31 is involved in drought stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01426>
- Zhu, F., Luo, T., Liu, C., Wang, Y., Yang, H., Yang, W., Zheng, L., Xiao, X., Zhang, M., Xu, R., Xu, J., Zeng, Y., Xu, J., Xu, Q., Guo, W., Larkin, R. M., Deng, X., & Cheng, Y. (2017). An R2R3-MYB transcription factor represses the transformation of α - and β -branch carotenoids by negatively regulating expression of CrBCH2 and CrNCED5 in flavedo of *Citrus reticulata*. *New Phytologist*, 216(1), 178–192. <https://doi.org/10.1111/nph.14684>

ORIGINAL ARTICLE

Genetic diversity of *Tortrix viridana* L. (Lep. Tortricidae) in Zagros Oak forests using 28s gene

Rezvan Mousivand¹, Mohammad Majdi¹, Foad Fatehi^{2*}, Hamed Ghobari³

¹Department of Plant Production and Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj Iran.

²Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran Iran.

³Department of Plant Protection, University of Kurdistan, Sanandaj Iran.

Correspondence

Foad Fatehi

Email: ffatehi@Pnu.ac.ir

How to cite

Mousivand, R., Majdi, M., Fatehi, F., & Ghobari, H. (2023). Genetic diversity of green oak leaf roller moth, *Tortrix viridana* L. (Lep., Tortricidae) in northern Zagros region using 28s gene. *Crop Biotechnology*, 13(44), 31-44.

ABSTRACT

One of the most harmful pests of Zagros forests is the *Tortrix viridana* (Lep. Tortricidae). Genetic diversity of *Tortrix viridana* host plant populations in the oak forests of northwestern Iran and the northern Zagros region was investigated using 28s gene sequence. The samples were collected from the forest areas of west Azarbaijan, Lorestan, Kurdistan and Kermanshah provinces. They were in the larval stage, were kept in laboratory conditions until they turned into pupa and then into a complete insect. DNA extraction was done by CTAB method. Also, in order to amplify the 28s region, the 28s gene sequence of *Tortrix* genus was used from NCBI for primer design. The desired region was amplified using the PCR method and the PCR products were sequenced. 21 samples were selected to investigate genetic diversity using the 28s gene, and 18 sequences DNAs were of suitable quality for further investigations. The DNA sequences were edited using Bioedit software and aligned using MegaX software, and the phylogenetic tree was drawn by UPGMA method with 1000 sampling repetitions. The evaluation of the genetic structure of populations showed that the diversity between populations is greater than within populations. The results of the phylogenetic tree also showed that different samples of the *Tortrix viridana* have genetic diversity based on geographical distance. Therefore, the time of appearance of the pest, their behavior and their type of control and management are also different.

KEYWORDS

Tortrix viridana, Pest, geographical distance, 28s rDNA.

© 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»

بررسی تنوع ژنتیکی پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana* L. (Lep. Tortricidae) در جنگل‌های بلوط زاگرس با استفاده از 28s rDNA

رضوان موسیوند^۱، محمد مجدی^۱، فواد فاتحی^{۲*}، حامد غباری^۳

چکیده

یکی از مضرترین آفات جنگل‌های زاگرس، پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana* (Lep. Tortricidae) است. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه میزبان پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط در جنگل‌های بلوط شمال غرب ایران و منطقه‌ی زاگرس شمالی با استفاده از توالی ژن 28s بررسی شد. جمع‌آوری نمونه‌ها، در مناطق جنگلی استان‌های آذربایجان غربی، لرستان، کردستان و کرمانشاه صورت گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده که در مرحله‌ی لاروی بودند تا زمانی که به شفیره و سپس به حشره‌ی کامل تبدیل شوند، در آزمایشگاه نگهداری شدند. استخراج DNA به روش CTAB انجام و به منظور تکثیر ناحیه 28s از توالی ژن 28s جنس *Tortrix* از NCBI برای طراحی پرایمر استفاده شد. ناحیه‌ی مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر و محصولات PCR توالی‌یابی شدند. ۲۱ نمونه برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از ژن 28s انتخاب شد که ۱۸ نمونه با کیفیت بالاتر توالی DNA برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های DNA با استفاده از نرم افزار Bioedit ویرایش و با نرم افزار MegaX تراز شد و درخت فیلوژنتیک به روش UPGMA با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری ترسیم گردید. ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها نشان داد که تنوع مابین جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌ها است. نتایج درخت فیلوژنتیک نیز نشان داد که نمونه‌های مختلف پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط بر اساس فاصله‌ی جغرافیایی دارای تنوع ژنتیکی هستند. بنابراین زمان ظهور آفت، رفتار و نوع کنترل و مدیریت آفت آنها هم متفاوت است.

واژه‌های کلیدی

Tortrix viridana، آفت، فاصله جغرافیایی، 28s rDNA.

^۱گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

^۲گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

^۳گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

فواد فاتحی

رایانامه: ffatehi@pnu.ac.ir

استناد به این مقاله:

موسیوند، رضوان، مجدی، محمد، فاتحی، فواد و غباری، حامد (۱۴۰۲). تنوع ژنتیکی پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط در جنگل‌های بلوط زاگرس با استفاده از 28s rDNA. (۴۴)۱۳، ۳۱-۴۴.

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

مقدمه

جنگل‌ها یکی از منابع تجدیدپذیر و از سرمایه‌های طبیعی و پشتوانه‌های اصلی توسعه و رشد اقتصادی هر کشوری می‌باشند. جنگل‌های ایران ۱۲/۴ میلیون هکتار وسعت دارند و حدود ۷/۴ درصد از سطح کشور را پوشش داده‌اند (غباری و همکاران، ۱۳۸۶). بعد از جنگل‌های شمال، جنگل‌های زاگرس مهم‌ترین و با ارزش‌ترین جنگل‌های کشور هستند که حفاظت از آب و خاک از جنبه ملی، مهیا کردن شرایط زیستی برای ساکنان محلی و تولید محصولات چوبی از مهم‌ترین فواید این جنگل‌ها به شمار می‌آیند (Jazirehi and Ebrahimi-Rastaghi, 2003).

اصلی‌ترین و وسیع‌ترین رویشگاه گونه‌های مختلف بلوط در ایران، رشته‌کوه‌های زاگرس هستند و به همین دلیل این منطقه اهمیت بسیار ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. جنگل‌های زاگرس با مساحتی بالغ بر ۵ میلیون هکتار، ۴۰ درصد از جنگل‌های ایران را به خود اختصاص داده است و بیش‌ترین تأثیر را در تأمین منابع آب زیرزمینی، تولید اکسیژن، حفاظت خاک، تعدیل آب و هوا و امرار معاش ساکنین منطقه دارند (طالابی و همکاران، ۱۳۸۴). حدود ۷۰ درصد تیپ گونه‌های غالب در جنگل‌های زاگرس شامل درختان بلوط می‌باشد. که این درختان بلوط شامل گونه‌های دارمازو (*Quercus infectoria*)، ویول (*Quercus libani*) و بلوط برودار (*Quercus brantii*) می‌باشد. که از انتهای شمال غرب کشور آغاز و تا مناطق غرب و جنوب غرب را دربر گرفته‌اند (مظفریان، ۱۳۸۴). در سالیان اخیر در اثر تغییرات ایجادشده در زیست‌بوم‌ها و شرایط اقلیمی بخش‌هایی از جنگل‌های زاگرس مورد هجوم آفات و بیماری‌هایی واقع شده‌اند که وضعیت بسیار حادی داشته و شرایطی را برای مرگ و زوال آن‌ها فراهم کرده است (Marvi-Mohajer, 2005).

یکی از آفات مخرب که در چند دهه اخیر، گونه‌های مختلف بلوط را در جنگل‌های زاگرس مورد حمله قرار داده است، پروانه جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana*) است. پایداری جنگل‌های زاگرس به وسیله‌ی عوامل متعددی از جمله پروانه جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana*) تهدید می‌شود (غباری و همکاران، ۱۳۸۶). شیوع پروانه جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana*) محدود به منطقه خاصی نبوده و در بسیاری از نقاط وجود دارد و با طغیان هر ساله به‌ویژه در مناطق جنگلی زاگرس شمالی و میانی خسارات چشمگیری به درختان بلوط تحمیل می‌کند و یکی از مهم‌ترین مشکلات درختان جنگلی در منطقه رویشی زاگرس است (زرگران و همکاران، ۱۳۹۴). در ایران این آفت در حال

حاضر به شدت در استان‌های آذربایجان غربی، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان، لرستان و کرمانشاه پراکنده است (Sabeti, 1995) پروانه جوانه‌خوار بلوط از طریق تغذیه از جوانه‌های زایای درختان خسارت سنگینی به درختان بلوط وارد می‌کند (Hunter et al., 2008). این آفت دارای یک نسل در سال بوده و زمستان‌گذرانی آن به صورت تخم است. خسارت آن هم‌زمان با خروج لاروها از اواخر اسفندماه شروع می‌شود و سن‌های اول و دوم لاروها در داخل جوانه زندگی می‌کنند (Serra et al., 2014). لاروهای سن سوم پس از خروج از جوانه‌ها شروع به تغذیه از برگ‌های جوان می‌کنند و در ضمن تغذیه، برگ‌ها را تا کرده و تار می‌تنند، ولی شدت تغذیه و خسارت بالا در سن‌های چهارم و پنجم لاروی ظاهر شده به طوری که در بعضی از موارد و در دوره‌های طغیان درختان را به طور کلی عاری از برگ می‌کنند (Fazeli and Abaei, 1990).

عوامل مختلفی از جمله گونه‌های میزبان، کنترل‌های شیمیایی، فاصله جغرافیایی و موانع جغرافیایی، روی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی حشرات تأثیر می‌گذارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط، به تعیین ساختار ژنتیکی این آفت، میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها و وضعیت تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک کند. چنین اطلاعاتی برای پی بردن به وضعیت پراکنش این آفت در جنگل بلوط زاگرس شمالی حیاتی خواهد بود، چرا که پراکنش این آفت یکی از مؤلفه‌های کلیدی و مهم در رابطه با اجرای برنامه‌های مدیریت آفت به منظور کنترل موثر آن است. افزون بر این، این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب استراتژی‌های مناسب و کارآمد کنترل این آفت سودمند باشد (مرادی و همکاران، ۱۴۰۱).

هم‌چنین مدیریت پایدار جنگل‌ها و شناسایی تنوع ژنتیکی برای محافظت از جنگل‌های کشور به عنوان ذخیره‌گاه‌های ژنتیکی بسیار حائز اهمیت است. این ضرورت در مواقعی که توده‌های طبیعی یک گونه دارای اهمیت اقتصادی ویژه‌ای هستند بسیار دارای اهمیت‌اند (Jones and Despland, 2006). شناخت و گسترش یک شیوه کارآمد برای مدیریت هرچه بهتر و کارآمدتر آفت مهم مذکور، نیازمند شناخت هرچه بیشتر آفت و میزبان آن است (غیاث‌الدین و همکاران، ۱۳۹۹). یکی از جنبه‌هایی که در کنار شناخت دشمنان طبیعی، سموم مؤثر و عادات رفتاری، تولیدمثلی و تغذیه‌ای آفت مورد نیاز است، بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه‌خوار بلوط (*T. viridana*) است که منجر به درک درست و دقیق‌تری از بیولوژی آفت و تغییرات

(Sunde *et al.*, 2020). مطالعه و بررسی ساختار ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در حشرات امکان دارد از عواملی چون گونه‌های میزبان، فاصله‌ی جغرافیایی و موانع جغرافیایی تاثیر پذیرد و همچنین در برخی از گونه‌های Lepidopterous ساختار و تنوع ژنتیکی به تعداد نسل و ظرفیت مهاجرت آن‌ها بستگی دارد (Men *et al.*, 2017).

در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی جوانه‌خوار بلوط در دنیا بررسی‌های متعددی انجام گرفته است. به‌طور مثال، در مطالعه‌ای در کشور آلمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره انجام شده، اثر فاصله جغرافیایی بر جدایی جمعیتی پروانه جوانه‌خوار بلوط مورد بررسی قرار گرفته است (Schroeder *et al.*, 2010).

در شهر مونستر کشور آلمان بررسی تنوع درون گونه‌ای جمعیتی از پروانه جوانه خوار بلوط انجام شد که در آن بررسی از نشانگرهای سیتوکروم اکسیداز ۱ و ۲ استفاده کردند که بیانگر آن بود که تنوع درون گونه‌ای در این شب پروانه بیش‌تر از تنوع درون گونه‌ای سایر حشراتی است که قبلاً روی آنها بررسی انجام داده اند و همچنین تفاوت در فراوانی انواع هاپلوטיפ‌ها در بین جمعیت‌های مورد بررسی بالا است که این بیانگر آن است که مارکرهای توسعه‌یافته تا کنون برای مطالعات ژنتیکی در *T. viridana* مناسب هستند (Schroeder and Scholz, 2005). در بررسی دیگر که توسط Serra و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد، از نشانگرهای ریزماهوره و نشانگرهای سیتوکروم اکسیداز ۱ و ۲ استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط بر روی گونه‌های مختلف بلوط در منطقه ساردینین و سایر مناطق مدیترانه‌ای براساس فاصله جغرافیایی، گونه‌های بلوط، فنولوژی برگ و زمان خروج از تخم پروانه‌ها دارای تنوع ژنتیکی هستند. در زمینه استفاده از ژن 28S نیز مطالعاتی صورت گرفته است. به عنوان مثال از RNA ریبوزومی 28S برای بررسی تنوع ژنتیکی زنبور عسل اروپایی (*Apis mellifera*) به منظور کمک به حفظ تنوع ژنتیکی زنبور عسل اروپایی در زمینه کمک به گرده افشانی طیف گسترده‌ای از گل‌های زراعی استفاده شد و شاخص‌های تنوع ژنتیکی پایین و تنوع درون و بین گونه‌ها را نشان دادند (Meemongkolkiat *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای دیگر از ژن‌های 28S در خانواده شپشک‌های گیاهی (*Hemiptera: Coccoidea*) که یکی از مهاجم‌ترین و آسیب‌رسان‌ترین گروه‌های حشرات هستند برای شناسایی ژنتیکی و مورفولوژیکی آن‌ها استفاده شد (Amouroux *et al.*, 2017). در بررسی دیگر، از ژن 28S در کنه شکارچی *Amblyseius largoensis* استفاده شد که در آن موفق به

درون گونه‌ای آن می‌شود که می‌تواند در امر مدیریت آفت مذکور به عنوان یکی از مهمترین آفات جنگل‌های بلوط بسیار مؤثر باشد (DuMerle, 1999).

اخیراً روش‌های ژنتیک مولکولی، پیشرفت بزرگی را در زمینه زیست‌شناسی تکاملی ایجاد کرده‌اند. هم‌چنین مجموعه‌ای از ابزارهای مولکولی برای مطالعه تنوع ژنتیکی به کار برده می‌شوند که این مطالعات با استخراج DNA از ارگانسیم‌های خاصی آغاز شده و برای اهدافی چون بازسازی تاریخ فیلوژنیک هر گونه داخل مجموعه، ژنتیک جمعیت و بررسی ویژگی‌های ژنتیکی گیاهان و جانوران به کار می‌روند (Wharton *et al.*, 2000; Wang and Messing, 2003).

نشانگرهای مولکولی توالی‌هایی از DNA یا پروتئین هستند که دارای جایگاه‌های مشخصی روی کروموزوم‌ها می‌باشند و با یک سری صفات بخصوص ارتباط و پیوستگی دارند (Bhau *et al.*, 2014). انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی وجود دارد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و موجودات مختلف را نشان می‌دهند و دارای مزیت‌هایی از جمله سنجش آسان و سریع، تکرار پذیر بودن، دسترسی آسان می‌باشند و امکان تبادل اطلاعات بین آزمایشگاه‌های مختلف دارند (Schroeder *et al.*, 2010).

RNA ریبوزومی 28S یک RNA ساختاری ریبوزومی برای زیر واحد بزرگ ریبوزومی ریبونوکلیئیک اسید در ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی سلول‌های یوکاریوتی و یکی از اجزاء پایه‌ای آن‌هاست. این RNA، هم‌ساخت RNA ریبوزومی 23S در پروکاریوت‌ها و 16S RNA کُدشونده توسط میتوکندری است. به ژن‌های کُدکننده RNA ریبوزومی 28S، rDNA 28S گفته می‌شود. گاهی از مقایسه توالی اسید نوکلئیک این ژن‌ها، برای تجزیه و تحلیل مولکولی ساختار درخت‌های فیلوژنتیکی و بررسی تنوع ژنتیکی در آغازیان، قارچ‌ها، حشرات، خرس‌های آبی و مهره‌داران استفاده می‌شود (Nugnes *et al.*, 2015). در این مطالعه تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط با استفاده از ژن 28S، بر اساس فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی بررسی می‌شود.

پیشینه پژوهش

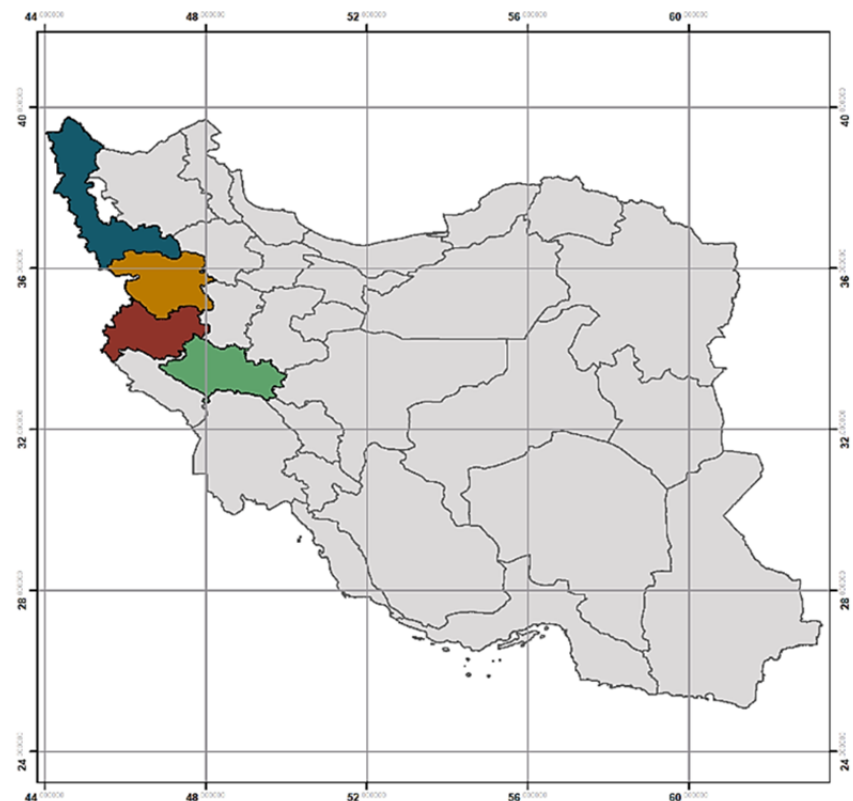
مطالعه ژنتیک جمعیت، الگوهای تنوع زیستی را نشان می‌دهد و در مورد محرک‌های تمایز و سازگاری تکاملی، از جمله جریان ژن، رانش ژن و انتخاب طبیعی اطلاعاتی را به ما می‌دهد. این موضوع می‌تواند درک ما را نسبت به تصمیم‌گیری در مورد انتخاب روش‌های صحیح مدیریت و حفاظت افزایش دهد

بوده که نتایج نهایی حاصله حاکی از آن بود که تنوع ژنتیکی در جمعیت جدا شده بیشتر از جمعیت در مرکز منطقه توزیع بوده است. در طی آنالیزهایی که می‌توانست مخزن ژنی این جمعیت را شکل دهد اثرات محدود کننده‌ای کشف نشد. پدیده انتخاب طبیعی موجب حفظ آل‌های خاص در درون این جمعیت شده و این عامل می‌تواند توجیهی برای ایجاد تنوع ژنتیکی بالای غیرمنتظره‌ای در این جمعیت ایزوله شده باشد (Shroeder et al., 2010).

روش شناسی پژوهش

در این مطالعه از جنگل‌های بلوط استان‌های کردستان، کرمانشاه، آذربایجان غربی و لرستان به صورت تصادفی و براساس فاصله جغرافیایی، تعداد ۱۸ ژنوتیپ به صورت لارو و شفیره از روی گونه بلوط برودار (*Quercus branti*) جمع‌آوری شد. به ترتیب در استان کردستان ۷ ایستگاه، در کرمانشاه ۵ ایستگاه، در آذربایجان غربی ۵ ایستگاه، و همچنین در استان لرستان ۴ ایستگاه نمونه‌برداری، مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱). حداقل فاصله بین ایستگاه‌های نمونه برداری ۳۰ کیلومتر بود و در هر ایستگاه نمونه‌برداری ۱ نمونه که نماینده یک جمعیت است، جمع‌آوری شد. طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا نیز به وسیله دستگاه GPS ثبت گردید.

شناسایی و طبقه‌بندی کنه‌ها شدند (Navia et al., 2014). ارزیابی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط *Tortrix viridana* فعال بر روی گونه‌ی بلوط *Quercus robur* در داخل و بین جمعیت‌های حشره مذکور با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و کلروپلاستی و AFLP بر روی ۱۰ توده بلوط در شمال غربی آلمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله از نشانگر میتوکندریایی و AFLP تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط بیشتر از بین جمعیت‌ها بود که نشان‌دهنده‌ی جریان ژنی بالا مابین جمعیت‌ها است. در بررسی که توسط (Schroeder and Degan, 2008) روی تنوع ژنی بلوط‌ها و پروانه جوانه خوار بلوط انجام شد، نتایج همبستگی منفی معنی‌داری را برای هر دو نشانگر نشان داد. به طور خلاصه، دلایل این تفاوت در الگوهای تنوع ژنتیکی میزبان و حشره‌ی گیاهخوار را می‌توان در زمان‌های مختلف ظهور نسل، مکانیسم‌ها و پتانسیل پراکندگی آفت مذکور یافت در مطالعه‌ای توسط Schroeder و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای تعیین تنوع ژنتیکی یک جمعیت ایزوله و جداده‌ی پروانه جوانه‌خوار بلوط از لحاظ جغرافیایی در منطقه Bashkir Transural (جنوب روسیه) با پنج جمعیت دیگر با استفاده از هشت نشانگر ریزماهوره مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد نمونه مورد بررسی در هر جمعیت ۴۸ تا ۶۲ نفر



شکل ۱. نمایش مناطق جغرافیایی که نمونه برداری در آنجا انجام شد (کردستان، کرمانشاه، آذربایجان، لرستان) (Gao et al., 2020)

میکرو لیتر مرکاپتواتانول به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار گرفت. پس از لیز شدن کامل نمونه، ۲۵۰ میکرو لیتر کلروفرم به آن اضافه شد و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه به صورت دستی تکان داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. این مرحله برای از بین بردن آلودگی پروتئینی یکبار دیگر تکرار شد. فاز رویی را به یک میکروتیوب انتقال داده و ۷۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ انجام گرفت. سپس فاز رویی را دور ریخته و با ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد پلت (رسوب) را شستشو داده و نهایتاً پلت با جریان هوا خشک شد. سپس با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. و جهت مشاهده باندها و همچنین بررسی کیفیت DNA، از دستگاه UV doc استفاده شد. با به کارگیری دستگاه بیوفتومتر، جذب محلولهای رقیق شده DNA در طول موج ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب حداکثری نوری پروتئینها) و ۲۶۰ نانومتری (طول موج جذب اسید نوکلئیک) اندازه گیری شد و همچنین نسبت جذب نوری محلولهای DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر که خود شاخص میزان خلوص DNA است، محاسبه شد.

لاروها و شفیره‌های پروانه جوانه خوار بلوط جمع‌آوری شده و در محیط مناسب در آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه کردستان، نگهداری شدند تا زمانی که تبدیل به حشره کامل شوند. و در پایان حشرات کامل ظهور یافته را به وسیله اتیل استات معدوم نموده و به تفکیک منطقه جغرافیایی میزبان، آن‌ها را در ظروف شیشه‌ای حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سپس به منظور انجام بررسی‌های مولکولی استخراج DNA از قسمت سر و تنه حشره کامل با روش CTAB (Dumolin et al., 1995) با مقداری تغییر انجام گرفت. در مرحله‌ی اول برای فریز و خرد کردن نمونه‌های حشره مذکور، از نیتروژن مایع استفاده شد. در مرحله‌ی اول برای خرد کردن نمونه‌های حشره مذکور، آن‌ها را به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری که هر یک دارای برچسب مربوط به نمونه مورد نظر بودند منتقل کرده و با استفاده از نیتروژن مایع نمونه‌ها فریز و خرد شدند. سپس ۶۳۰ میکرولیتر از بافر CTAB (CTAB ۱ درصد، Tris Base pH: ۵۰/۷/۵ میلی‌مولار، NaCl، ۷۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۱۴۰ میلی‌مولار) و ۷۰ میکرولیتر از SDS ۱۰ درصد از پیش گرم شده (با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد) و همچنین ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K به آن افزوده شده و به مدت ۱۲ الی ۱۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده شد و سپس ۲۴۰ میکرو لیتر از NaCl ۵ مولار و ۳

جدول ۱. ویژگی‌های مناطق نمونه‌برداری از نظر ارتفاع از سطح دریا و موقعیت جغرافیایی

شناسه	گونه میزبان	نام محل	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا
4kurd	برودار	کردستان، بانه، کانی سوره	32°20'N 46°04' E	۱۲۸۶
5kurd	برودار	کردستان، بانه، سورین	32°16'N 46°16' E	۱۲۳۸
14kurd	برودار	کردستان، بانه، سیف تاله	32°16'N 46°16' E	۱۳۶۰
17kurd	برودار	کردستان، مریوان، کانی دینار	32°04'N 46°13' E	۱۲۸۶
15kurd	برودار	کردستان، مریوان، بسطام	32°07'N 46°13' E	۱۳۶۷
16kurd	برودار	کردستان، مریوان، چناره	32°11'N 46°18' E	۱۳۹۵
18kurd	برودار	کردستان، مریوان، دزلی	32°11'N 46°18' E	۱۳۹۵
2k-r	برودار	کرمانشاه، نودشه	35°02'N 46°07' E	۱۳۶۷
3k-r	برودار	کرمانشاه، پاره	35°02'N 46°07' E	۱۳۶۰
6k-r	برودار	کرمانشاه، قوری قلعه	35°02'N 46°07' E	۱۳۶۰
7k-r	برودار	کرمانشاه، جوانرود	35°02'N 46°07' E	۱۵۳۵
1kr	برودار	کرمانشاه، هرسین	36°01'N 45°11' E	۱۵۲۰
9az	برودار	آذربایجان غربی، پیرانشهر	36°01'N 45°11' E	۱۵۲۰
10az	برودار	آذربایجان غربی، بادین آباد	35°42'N 45°57' E	۱۳۷۴
11az	برودار	آذربایجان غربی، میرآباد	36°28'N 45°19' E	۱۳۱۲
12az	برودار	آذربایجان غربی، نلاس	36°28'N 45°19' E	۱۳۱۲
13az	برودار	آذربایجان غربی، سردشت	36°25'N 45°23' E	۱۳۴۰
8lores	مازودار	لرستان، نورآباد	36°25'N 45°23' E	۱۳۴۰

نرم افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.9.0 ویرایش شده و به طول ۸۵۰ جفت باز درآمدند.

یافته‌های پژوهش

در کل از بین ۲۱ نمونه، ۱۸ نمونه که از کیفیت مناسبی برخوردار بودند (جدول ۳)، برای بررسی مولکولی انتخاب شدند. ناحیه 28s در تمام جمعیت‌هایی که بررسی شد در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد و اندازه آن حدود ۸۵۰ جفت باز بود (شکل ۲). محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد مشاهده قرار گرفتند. که نشان داد آغازگر مورد استفاده به خوبی عمل کرده و قطعات اختصاصی برای ناحیه 28s تهیه شده است. وجود یک باند اختصاصی بیانگر آن بود که توالی مشابهی برای جفت شدن با آغازگر مورد استفاده در این محل وجود ندارد.

جدول ۳. نمونه‌های بررسی شده در مطالعات مولکولی

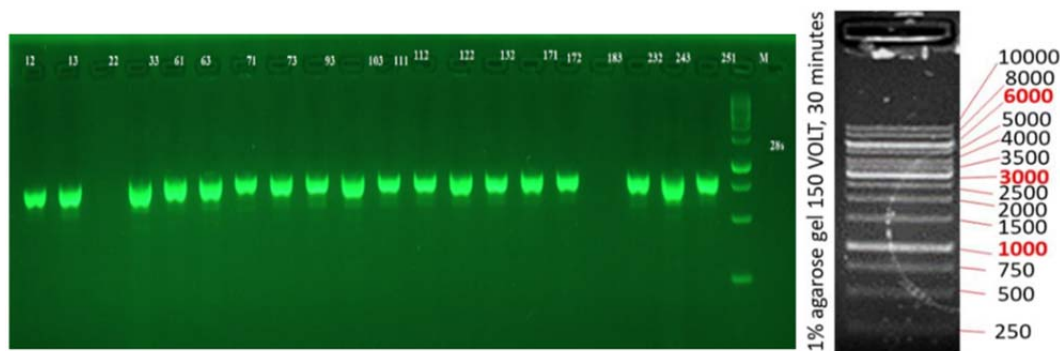
نمونه‌ها	علامت اختصاری
5kurd	12
4kurd	13
14 kurd	33
17 kurd	61
15 kurd	63
16 kurd	71
18 kurd	93
2k-r	111
3 k-r	103
6 k-r	122
7 k-r	112
1 k-r	132
9az	232
10 az	171
11 az	243
12 az	172
13 az	251
8lores	73

طراحی پرایمرها، با استفاده از توالی گونه‌های نزدیک در پایگاه اطلاعاتی NCBI به وسیله نرم افزار آنلاین Primer3، انجام شد.

در این مرحله DNAهای استخراج شده را رقیق کرده و در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از آن استفاده کردیم. به منظور انجام واکنش PCR^۱ از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از کیت (PCR Master mix، Primer-F، R، DNA الگو، آب دوبار تقطیر شده) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و استفاده از آغازگرهای از پیش طراحی شده انجام شد (Hebert *et al.*, 2004). در این تحقیق طراحی آغازگر از RNA ریبوزومی 28s صورت گرفت. ابتدا منطقه کنترلی از RNA ریبوزومی برای گونه‌های نزدیک به گونه *T. viridana* در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) در بخش نوکلئوتید جست‌وجو شد و توالی به دست آمده از این سایت برای ادامه مراحل طراحی آغازگر، مورد استفاده قرار داده شد. سپس با استفاده از نرم افزار primer3 آغازگر مورد نظر طراحی شد (جدول ۲) و در نهایت توالی نوکلئوتیدی جهت سنتز به شرکت Genscript آمریکا ارسال گردید. بعد از سنتز آغازگر مورد نظر و دریافت آن با توجه به دستورالعمل‌های شرکت مربوطه رقیق شد و مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR جهت مشاهده قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. سپس باندها توسط دستگاه UVdoc مشاهده شدند. الگوهای نواری به صورت کدگذاری حروف لاتین امتیازدهی شد. فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس ضریب نئی محاسبه و دندروگرام به روش neighbor-joining^۲ با استفاده از نرم افزار Bioedit و MEGA برای دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها رسم شد. برای تعیین توالی ژن 28s از همان آغازگرهایی که برای تکثیر آن به کار برده شد استفاده شد. تکثیر توالی‌ها توسط شرکت بیومجیک انجام گرفت. پس از تکثیر، توالی‌های به کار رفته در این بررسی توسط

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده در مطالعات مولکولی

آغازگر	توالی
28s_F	GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC
28s_R	TCGGARGGAACCAGCTACTA



شکل ۲. تصویر خطکش مولکولی 1kb، الگوی بانندی ناحیه تکثیر شده 28s

دست آمده مورد بررسی و کنترل قرار گرفت. سپس به کمک همین نرم افزار توالی‌ها اصلاح شدند و نوکلئوتیدهای با کیفیت کم از ابتدا و انتهای توالی‌ها حذف شدند. در نهایت نتیجه حاصل منجر به تولید یک قطعه به طول ۸۵۰ نوکلئوتید شد. فرآوانی هر یک از نوکلئوتیدهای آدنین، سیتوزین، گوانین و تیمین برای پروانه جوانه خوار بلوط با استفاده از نرم افزار MEGA X محاسبه شد به طوری که بازگوانین بیش‌ترین فرآوانی و باز آدنین کم‌ترین فرآوانی را در بین نوکلئوتیدهای ذکر شده داشت (جدول ۶).

جدول ۵. تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی و تعداد هر یک از

جمعیت‌های مورد بررسی

گروه بندی	جمعیت موجود در هر گروه	تعداد توالی (N)	تنوع هاپلوتیپی (Hd)	تنوع نوکلئوتیدی (pi)
گروه اول	۱۸ توالی‌های مورد بررسی در این مطالعه	۱۸	۰/۹۸	۰/۰۶
گروه دوم	توالی جمعیت‌های استان کردستان	۷	۱	۰/۰۰۶
گروه سوم	توالی جمعیت‌های استان کرمانشاه	۵	۱	۰/۰۰۷
گروه چهارم	توالی جمعیت‌های استان آذربایجان غربی	۵	۱	۰/۲

جدول ۶. فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از مجموع تمام مناطق نمونه‌گیری

نوکلئوتیدها	T	C	A	G	C+G	T+A
میانگین فراوانی	۲۱/۴۶	۲۷/۴۰	۱۹/۶۷	۳۱/۴۷	۵۸/۸۷	۴۱/۱۳

نتایج اولیه PCR نشان داد که از تعداد ۲۱ نمونه مورد مطالعه، ۳ نمونه دارای کیفیت لازم برای تولید نبودند، که در ادامه کار از آن‌ها استفاده نکردیم و از مابقی ۱۸ نمونه استفاده شد و جهت توالی‌یابی ارسال شدند.

باندهای مشاهده شده توسط دستگاه UV doc، به وسیله خطکش مولکولی 1kb مورد بررسی قرار گرفتند. باندها همگی در ناحیه حدود ۸۵۰ bp ایجاد شده‌اند.

هم‌چنین تنوع ژنتیکی مابین جمعیت‌های (Fst) آذربایجان غربی و کرمانشاه بسیار کم بوده و معادل ۰/۰۰۱ است درحالی که مابین جمعیت‌های کردستان و آذربایجان غربی تنوع ژنی متوسطی وجود دارد و مقدار آن برابر با ۰/۰۰۴ است.

توسط نرم‌افزار DNAsp تعداد ۵ هاپلوتایپ، ۱۳ ناحیه متغیر (پلی مورفیسم) و ۱۴ جهش ژنتیکی^۱ تشخیص داده شد. میزان تنوع هاپلوتیپی برای جمعیت‌های انتخاب شده از استان کردستان، کرمانشاه و آذربایجان غربی ۱ بود که نشان می‌دهد جمعیت‌های این ۳ استان از لحاظ ژنتیکی کاملاً متفاوت هستند. اما در استان لرستان به علت دارا بودن فقط یک جمعیت قادر به اندازه‌گیری میزان تنوع هاپلوتیپی نبودیم.

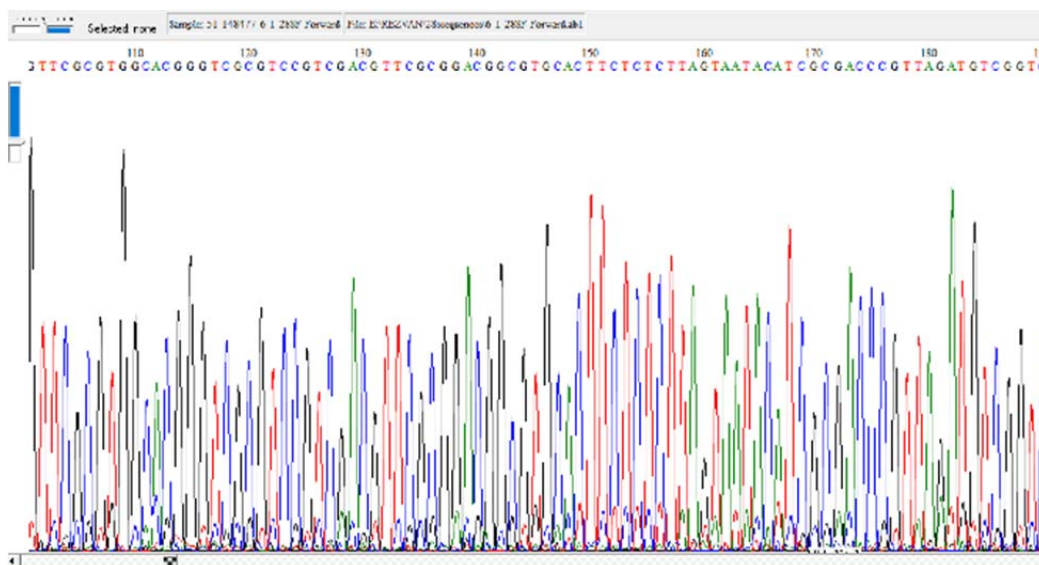
جدول ۴. شاخص آماره Fst و جریان ژن بین جمعیت‌ها

اندازه جمعیت	نام	Fst	Nm
۱	کردستان - کرمانشاه	۰/۰۷۲	۱/۷۵
۲	کردستان - آذربایجان غربی	۰/۰۰۴	۱/۷۲
۳	آذربایجان غربی - کرمانشاه	۰/۰۰۱	۱/۹۸

بعد از دریافت نتیجه توالی‌یابی (شکل ۲)، الکتروگرام مربوط به هر نمونه، با نرم‌افزار BioEdite باز شد و کیفیت توالی‌های به

چون هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف پروانه جوانه‌خوار بلوط در بخشی از جنگل‌های زاگرس غربی است پس با مقایسه نتایج توالی‌یابی متوجه شدیم که میزان اختلاف بالایی در ناحیه 28s وجود دارد. درخت فیلوژنتیک (شکل ۴) به کمک ۱۸ توالی ناحیه 28s پروانه جوانه‌خوار بلوط که از مناطق جغرافیایی مختلف چهار استان حوزه غرب جنگل‌های زاگرس جمع‌آوری شده بودند، ترسیم شد. با توجه به درخت فیلوژنتیک تمامی نمونه‌ها از یک ریشه جد مشترک و قدیمی منشعب شده‌اند و به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شده‌اند.

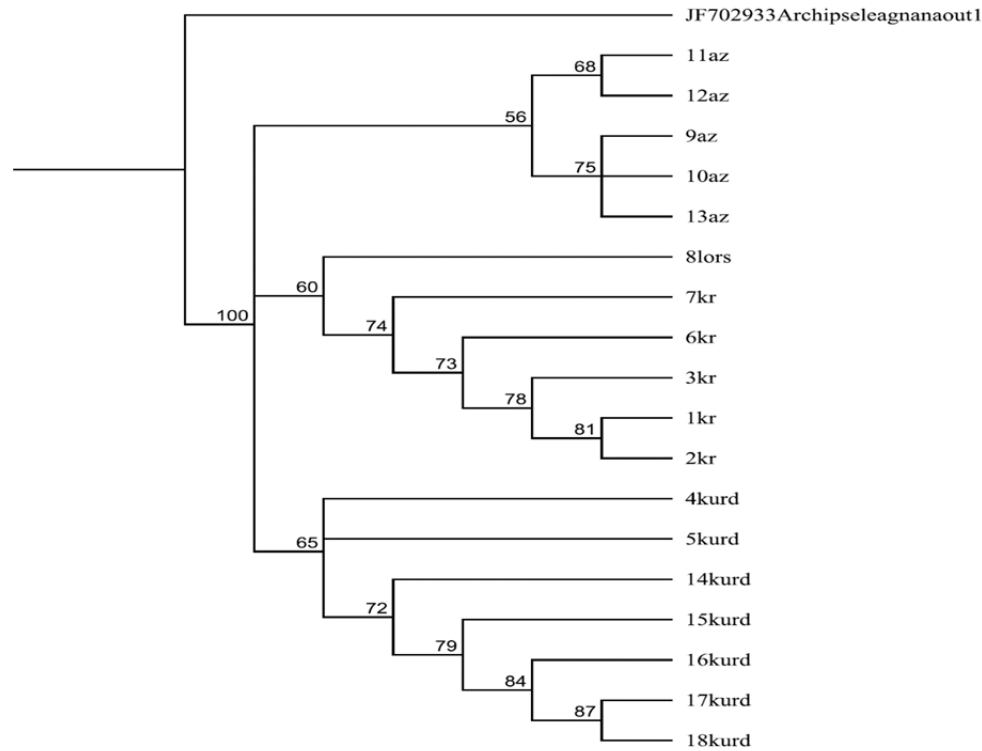
میزان فاصله ژنتیکی میان توالی‌های به دست آمده از ۱۸ جمعیت مورد مطالعه، به دست آمد (جدول ۷). بر طبق این جدول فاصله ژنتیکی بین ۱۸ جمعیت مرتبط با ۴ استان غربی کشور از صفر تا ۱/۲۰ متغیر است. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۱/۲۰) مابین دو جمعیت 10az (بادین آباد پیرانشهر) و 3k-r (پاوه-کرمانشاه) بود. با در نظر گرفتن این نکته که مقادیر عددی کمتر از یک درصد میزان اختلاف ژنتیکی پایین را نشان می‌دهند، می‌توان نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی بین اکثر جمعیت‌های مورد بررسی بالا بوده است.



شکل ۳. بخشی از توالی 28s

1k-r																			
2k-r	0.00																		
3k-r	0.00	0.00																	
4kurd	0.00	0.00	0.01																
5kurd	0.00	0.00	0.00	0.00															
6k-r	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
7k-r	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01													
8lores	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02												
9az	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01											
11az	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00										
12az	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01									
13az	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01								
10az	1.18	1.19	1.20	1.18	1.19	1.19	1.18	1.19	1.17	1.19	1.17	1.19							
14kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	1.19						
15kurd	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	1.17	0.01					
16kurd	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.01	0.00				
17kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	1.18	0.00	0.00	0.01			
18kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1.20	0.01	0.01	0.01	0.01		

جدول ۷. تخمین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های T viridana با نرم‌افزار MEGA و بوت استرپ ۱۰۰۰.



شکل ۴. نمودار فیلوژنتیکی (درخت فیلوژنتیک با روش neighbor-joining) بر اساس ناحیه 28S پروانه جوانه خوار بلوط، اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار است.

با در نظر گرفتن شاخص‌های مورد بررسی (جدول تعیین فاصله ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک و آماره F_{st}) در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، میزان تنوع هاپلوتیپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی کم در بین جمعیت‌ها مشاهده شد که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی پروانه جوانه‌خوار بلوط که با تکنیک‌های مختلفی انجام شده بودند تطابق چشم‌گیری داشت، به گونه‌ای که در طی یک بررسی در سال ۲۰۱۴ با استفاده از ژن‌های COI و COII، در جمعیت‌های *T. viridana* بیان شد که تنوع هاپلوتیپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی کم بین جمعیت‌ها وجود دارد که ای عامل می‌تواند به دلیل رانش ژن باشد (Serra *et al.*, 2014).

طبق درخت فیلوژنتیکی، فاصله ژنتیکی کردستان و آذربایجان غربی بیش‌تر از فاصله بین کردستان و کرمانشاه بوده چون کردستان و آذربایجان در دو گروه دور از هم قرار گرفته اند که این نتایج با برسی فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های استان کرمانشاه و جمعیت‌های استان آذربایجان غربی که در حدود ۵۴۰ کیلومتر بوده، و هم چنین استان کردستان و کرمانشاه که ۱۳۵ کیلومتر فاصله دارند بیانگر اثر فاصله جغرافیایی بر تنوع ژنتیکی بود که با تایید حاصل از بررسی‌های (Men *et al.*, 2017)

نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنتیک بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا مابین جمعیت‌های نقاط جغرافیایی مختلف و تنوع کم در درون جمعیت‌ها بود. هم چنین سه جمعیت 1kr, 2kr, 3kr که از یک استان (کرمانشاه) هستند، طبق جدول فاصله ژنتیکی، اختلاف ژنتیکی مابین این سه جمعیت وجود ندارد (صفر بوده) با توجه به مطالعه حال حاضر و هم چنین مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت به علت فاصله جغرافیایی کم و عدم وجود تنگه جغرافیایی مابین این سه جمعیت اختلاف ژنتیکی هم وجود ندارد. این نتایج برای جمعیت‌های 12az, 11az هم صدق می‌کند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط با استفاده از ژن 28S نشان‌دهنده این بود که تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌هایی که مطالعه شدند وجود دارد. در بررسی تنوع هاپلوتیپی (Hd)، استان‌های کردستان، آذربایجان غربی و کرمانشاه هر کدام دارای تنوع هاپلوتیپی ۱ بوده و کاملاً از نظر ژنتیکی این جمعیت‌ها از هم جدا هستند. هم‌چنین بیشترین تنوع نوکلئوتیدی (π) مربوط به استان آذربایجان غربی و کمترین تنوع نوکلئوتیدی مربوط به استان کردستان بود.

همچنین طبق درخت فیلوژنتیکی، دو جمعیت موجود در استان کردستان (7 kurd و 18 kurd) در یک گروه قرار گرفته‌اند که نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی در این دو منطقه (کانی‌دینار میوان و دزلی میوان) کمتر می‌باشد. می‌توان علت وجود تنوع ژنتیکی کم درون جمعیت‌ها را بیانگر وجود فاصله جغرافیایی کم دانست. جمعیتی که تنوع ژنتیکی غنی دارد اغلب دارای سازگاری قوی با محیط است و بنابراین شیوع و گسترش آن افزایش می‌یابد (Li et al., 2022).

در بررسی کنونی ما، تنوع داخل جمعیت‌های مورد مطالعه کمتر از تنوع مشاهده شده در بین جمعیت‌ها بود که این نتایج در دو بررسی دیگر که توسط Schroder and Degan (2008a, b) انجام شده بود نیز چنین نتایجی حاصل شده بود. تقسیم‌بندی میزان تنوع ژنتیکی در داخل و مابین جمعیت‌های آفت‌های جنگلی، با مهاجرت و پتانسیل جابه‌جایی آن‌ها و در نهایت با میزان توانایی آن‌ها در انتقال ژن ارتباط مستقیم دارد. بنابراین بسیار دارای اهمیت است که جریان ژن، تنوع ژنتیکی و ویژگی‌های اکولوژیکی جمعیت‌های آفات مورد نظر، قبل از سرمایه‌گذاری برای کنترل آفت، تشخیص داده شود.

تهیه استراتژی‌های مدیریت آفات، به اطلاعاتی مانند اندازه جمعیت آفت، عوامل موثر بر آن و حتی سطح تعامل بین افراد جمعیت از مکان‌های مختلف بستگی دارد که همگی می‌توانند در ایجاد روش تاثیرگذار برای کنترل آفات نقش موثری داشته باشند (Assefa et al., 2017). داده‌های مولکولی قادر هستند که میزان تنوع ژنتیکی را به ما نشان دهند و با کمک این داده‌ها می‌توانیم به پیش‌بینی توسعه، انتشار و طغیان آفات بپردازیم. با بهینه کردن یک نشانگر خوب که قادر باشد تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را به درستی نشان دهد، قادر خواهیم بود که جمعیت‌های آفات را شناسایی کنیم و به مبارزه تلفیقی علیه آن‌ها اقدام کنیم. هم چنین با مطالعه جدول فاصله ژنتیکی چنین استنباط شد که، جمعیت 10az (بادین آباد پیرانشهر) بیشترین فاصله ژنتیکی را با جمعیت‌های دیگر استان آذربایجان غربی دارد این در حالی است که همین جمعیت کمترین میزان فاصله جغرافیایی را با جمعیت‌های مورد بررسی این استان دارد. که همین موضوع حاکی از آن است که این جمعیت یا از ژنوتیپ‌های متفاوت گونه میزبان (برو) تغذیه کرده‌اند و یا گونه مهاجر بوده است و به تازگی وارد منطقه شده است. این نتایج با نتایج حاصل از بررسی روی پروانه Danaus plexippus که در آمریکای شمالی انجام شد، مطابقت دارد که نشان می‌دهد جمعیت مهاجر دارای فاصله

مطابقت دارد. طبق درخت فیلوژنتیکی جمعیت مربوط به استان لرستان در یک گروه با جمعیت‌های استان کرمانشاه قرار گرفته که بررسی فاصله جغرافیایی هم صحت این موضوع را تایید می‌کند (فاصله جغرافیایی استان لرستان تا کرمانشاه ۱۹۳ کیلومتر می‌باشد) که از فاصله استان‌های بررسی شده نسبت به یکدیگر کمتر است پس جریان ژن بین این دو استان زیاد است که این نتایج با نتایج (Men et al., 2017) که بیانگر اثر فاصله جغرافیایی بر جدایی جمعیت‌ها از هم است مطابقت دارد.

همچنین از مقایسه درخت فیلوژنتیکی براساس مقایسه درون جمعیتی برداشت شد، جمعیت‌های 1az و 12az در یک گروه و جمعیت‌های 9az, 10az و 13az در یک گروه قرار گرفتند. فاصله جغرافیایی 11az مربوط به میرآباد آذربایجان غربی و 12az مربوط به نلاس آذربایجان غربی از روی نقشه 5km می‌باشد. لذا قرارگیری نمونه‌های برداشت شده از میرآباد و نلاس در یک گروه در درخت فیلوژنتیکی منطقی می‌باشد زیرا فاصله جغرافیایی بسیار کمی با یکدیگر دارند. این در حالی است که فاصله مابین جمعیت 11az با سه جمعیت دیگر آذربایجان غربی (9az, 10az و 13az) که در یک گروه دیگر قرار گرفته‌اند بیش‌تر است که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی روی پروانه جوانه‌خوار بلوط که در سال ۲۰۲۰ انجام شده مطابقت دارد (Ghiasoddin et al., 2020).

همچنین از مطالعه جریان ژن (NM) و تنوع ژنتیکی (Fst) مشخص شد که بیشترین جریان ژن، بین استان‌های کردستان و کرمانشاه است و کمترین آن بین استان‌های کردستان و آذربایجان غربی است و بیشترین تنوع ژنتیکی طبق جدول به دست آمده مربوط به تنوع ژنتیکی بین استان‌های کرمانشاه و آذربایجان غربی و کمترین تنوع ژنتیکی بین استان‌های کردستان و کرمانشاه است.

طبق نتایج این بررسی مابین جمعیت‌های ذکر شده تنوع ژنتیکی مشاهده شد و میزان این تنوع بسیار بالا بوده که این موضوع را می‌توان با نتایج حاصل از تحقیق Salvato et al. (2008) که از نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی پروانه زمستانه کاج (از آفات مهم درختان جنگلی کاج) استفاده شد و تنوع ژنتیکی قوی را بین جمعیت‌ها نشان داد. هم‌چنین نشان داد که به دلیل مهاجرت کم، جریان ژنی نیز کم است و تنوع ژنتیکی در طیف وسیعی افزایش یافته است.

با بررسی درخت فیلوژنتیک می‌توان دریافت که جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند که این خود بیانگر وجود تنوع بالا بین مناطق جغرافیایی مختلف است.

مذکور، آن هم به علت ایجاد جریان ژن بین جمعیت‌ها که در کنار نحوه جفت‌گیری نرها که با اولین ماده در جایی که نر از تخم خارج می‌شود، جفت‌گیری انجام می‌دهد و علاوه بر این‌ها میزان تحرک کم در حشرات بالغ ماده می‌تواند دلیل جدایی جمعیت‌ها از هم و همچنین ایجاد سازگاری با مکان و میزبان خاص باشد که ترکیب هردوی این‌ها باعث تنوع بالایی مابین جمعیت‌ها می‌شود و جمعیتی مختص به یک منطقه جغرافیایی ایجاد می‌کند که در مورد مطالعه کنونی هم مشاهده شد. هرچند که عواملی همچون طغیان آفت که باعث شیوع آفت مذکور در ابعاد وسیع‌تر می‌شود و در نهایت جریان ژنی بیش‌تری ایجاد می‌کند و نیز عواملی مثل توپوگرافی مختص به هر ناحیه و موانع جغرافیایی که از جریان ژن جلوگیری می‌کنند را باید مورد مطالعه قرار داد.

نتیجه‌گیری کلی

۱. نشانگر 28S تنوع ژنتیکی مابین جمعیت‌های مورد بررسی و همچنین تنوع درون جمعیت‌های پروانه جوانه خوار بلوط را به درستی نشان داد.

۲. نشانگر 28S قادر بود به خوبی جمعیت‌های مورد بررسی پروانه جوانه خوار بلوط را بر اساس فاصله جغرافیایی تفکیک کند.

پیشنهادات

۱. استفاده از ژن 28S برای بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط در جنگل‌های سایر استان‌های حوزه زاگرس (زاگرس جنوبی) و جنگل‌های استان‌های حوزه استان‌های شمالی کشور (جنگل‌های هیرکانی).

۲. انجام تحقیقات مورفومتریک و مقایسه آن با نتایج تحقیقات ژنتیکی.

۳. استفاده از سایر نشانگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط و یافتن بهترین نشانگر.

۴. بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط *T. viridana* با استفاده از ژن 28S در جمعیت‌های خسارت‌زا و کمتر خسارت‌زای آفت.

۵. بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط *T. viridana* با بهره‌گیری از سایر نشانگرهای مولکولی در مناطق مورد مطالعه.

ژنتیکی بیشتری با سایر جمعیت‌ها هستند. در تحقیق بر روی ساختار ژنتیکی پروانه جوانه‌خوار بلوط با کمک بررسی درخت فیلوژنتیک و جدول تعیین فاصله ژنتیکی مشاهده کردیم که علاوه بر وجود میزان تنوع ژنتیکی بالا مابین جمعیت‌هایی که بررسی نمودیم آن هم به علت وجود فاصله جغرافیایی، جمعیت‌های موجود در این تحقیق به تفکیک منطقه جغرافیایی از هم جدا شدند. دو جمعیت از یک منطقه در استان آذربایجان غربی (میرآباد آذربایجان غربی و سردشت) مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به جدول تعیین فاصله ژنتیکی، این دو جمعیت ۱/۱۹ فاصله از هم داشته، که وجود این مشاهدات می‌تواند به علت سازگار شدن آفت با درخت میزبان باشد.

هر اندازه که آگاهی در مورد چگونگی سازگاری جمعیت‌های آفات به یک یا انواع میزبان داشته باشیم، به طراحی موفق‌تر و موثرتر راهکارهای مدیریتی مبارزه علیه آفات با حداقل تخریب نظام اکولوژیکی یک سیستم که آفت نیز جزو آن است نزدیک‌تر می‌شویم (Bhau et al., 2014).

در بررسی تاثیرات متقابل بین پروانه جوانه‌خوار بلوط و درخت میزبان، مشخص شد که در اثر فعالیت حشره مذکور تفاوت‌های زیادی در سطح بی‌برگی درختان بلوط ایجاد می‌شود. نتایج این بررسی به این صورت بود که برخی از درختان دارای قدرت تحمل نسبی به فعالیت لارو آفت مذکور هستند. این در حالی است که برخی دیگر از درختان بلوط نسبت به فعالیت لاروهای این آفت بسیار حساس هستند. همچنین بیان شده است که لاروهای این آفت توانایی بالایی در انتخاب بین برگ‌های درختان مقاوم و حساس دارند (Schroder et al., 2011). علاوه بر این‌ها نتایج انجام آزمایش‌های بویایی‌سنجی^۲ روی حشرات ماده بالغ بیانگر آن بود که پروانه‌های بالغی که جفت‌گیری کرده‌اند قادرند مابین پایه‌های حساس و مقاوم یکی را انتخاب کنند و این گونه به نظر می‌رسد که با توجه به توانایی حشره مذکور در انتخاب بین میزبان‌ها و همچنین لیگوفاز بودن آن، *T. viridana* قادر به تشخیص نوع میزبان باشد و این توانایی در کنار تفاوت در انتقال ژن، می‌تواند گروه بندی ایجاد شده در درخت فیلوژنتیک را توجیه کند.

رفتار تولیدمثلی پروانه جوانه‌خوار بلوط در مورد حشرات نر، توجیهی است برای وجود تنوع کم مابین جمعیت‌های آفت

References

- Zargaran, M. Mousavi Mirkla, S.R. Banj Shafi'i, A. and Ramezani Kakroudi, A. (2014). Studying the biology of the oak borer and its distribution in West Azarbaijan province. *Journal of Forest Research and Development*, 1 (1), 31-42.
- Talebi, Kh. Sajdi, T., & Yazdian, F. (2014). A look at the forests of Iran. The second edition, published by the Forestry and Rangeland Research Institute. Pages 1-65.
- Ghabari, H. Guldansaz, S.H. Ashuri, A., Kharazi, A., & Bi-Hamta, M. (2016). Investigating the presence and distribution of the oak bud-eating moth in the forests of Kurdistan province. *Entomological Society letter*. 27 (1), 47-59.
- Ghiyasuddin, H., Shabaniyan, N., Kavossi, M., & Talebi, R. (2019). Genetic diversity and population structure of the oak bud-eating butterfly in the forests of North Zagros. *Journal of modern genetics*. 15 (2), 136-123.
- Assefa, Y., Goftishu, M., Capdevielle-Dulac, C., & Le Ru, B. (2017). Clarifying the source of *Conicofrontia sesamoides Hampson* (Lepidoptera: Noctuidae) population in South African sugarcane using morphological identification and mitochondrial DNA analysis. *Phytoparasitica*, 45(1), 45-55.
- Aylor, D.E., & Irwin, M.E. (1999). Aerial dispersal of pests and pathogens: implications for integrated pest management. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97, 233-234.
- Bhau, B.S., Mech, J., Borthakur, S., Bhuyan, M., & Bhattacharyya, P.R. (2014). Morphological and genetic diversity studies among populations of tea mosquito bug, *Helopeltis theivora* from Assam, India. *Molecular Biology Reports*, 41, 7845-7856.
- Castagneyrol, B., Jactel, H., Vacher, C., Brockerhoff, E.G., & Koricheva, J. (2014). Effects of plant phylogenetic diversity on herbivory depend on herbivore specialization. *Journal of Applied Ecology*, 51(1), 134-141.
- Du Merle, P. (1999). Egg development and diapause: ecophysiological and genetic basis of phenological polymorphism and adaptation to varied hosts in the green oak tortrix, *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Physiology*, 45(6), 599-611.
- Fazeli, M.J., & Abai, M. (1990). Green oak leaf-roller moth in Kohkiluyeh and Boyer-Ahmad province (*Tortrix viridana* L., Lep.: Tortricidae). *Applied Entomology and Phytopathology*, 57(1-2), 1-2.
- Gao, B., Hedlund, J., Reynolds, D. R., Zhai, B., Hu, G., & Chapman, J. W. (2020). The 'migratory connectivity' concept, and its applicability to insect migrants. *Movement Ecology*, 8, 1-13.
- Ghobari, H., Goldansaz, S.H., Askari, H., Ashouri, A., Kharazi, P.A., & Bihamta, M.R. (2007). Investigation of presence, distribution and flight period of oak leaf roller moth, *Tortrix viridana* (Lep.: Tortricidae) using pheromone traps in Kurdistan province. *Journal of Entomological Society of Iran*, 27(1), 47-59.
- Guo, J., Wang, Z., & Francis, F. (2017). Use of molecular markers for entomological diversity assessment and their application in population study of aphids. *Entomologie faunistique-Faunistic Entomology*.
- Haase, J., Castagneyrol, B., Cornelissen, J.H.C., Ghazoul, J., Kattge, J., Koricheva, J., Scherer-Lorenzen, M., Morath, S., & Jactel, H. (2015). Contrasting effects of tree diversity on young tree growth and resistance to insect herbivores across three biodiversity experiments. *Oikos*, 124(12), 1674-1685.
- Hunter, M.D. (2008). A variable insect-plant interaction: the relationship between tree budburst phenology and population levels of insect herbivores among trees. *Journal of Ecological Entomology*, 17(1), 91-95.
- Jazirehi, M.H., & Ebrahimi-Rastaghi, M. (2003). *Silviculture in Zagros*. Tehran University publications. (In Farsi).
- Jones, B.C., & Despland, E. (2006). Effects of synchronization with host plant phenology occur early in the larval development of a spring folivore. *Canadian Journal of Zoology*, 84(4), 628-633.
- Li, X., Wu, S., Xu, Y., Liu, Y., & Wang, J. (2022). Population Genetic Structure of *Chlorops oryzae* (Diptera, Chloropidae) in China. *Insects*, 13(4), 327.
- Marvi mohajer, MR. (2005). *Silviculture*, Tehran University Press, Tehran, 388p. (In Persian).
- Nugnes, F., Gebiola, M., Monti, M.M., Gualtieri, L., Giorgini, M., Wang, J., & Bernardo, U. (2015). Genetic Diversity of the Invasive Gall Wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its Rickettsia Endosymbiont, and Associated Sex-Ratio Differences. *Journal of Plos one*, 10(5), 1-20.
- Sabeti, H.A. (1995). *Forests, trees and shrubs of Iran*. Yaz University publications. (In Farsi).
- Salvato, P., Battisti, A., Concato, S., Masutti, L., Patarnello, T., & Zane, L. (2002). Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa-wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* 11, 2435-2444.

- Schroeder, H. (2008). Genetic differentiation of populations of the green oak leaf roller (*Tortrix viridana* L.) and its host (*Quercus robur* L.) using nuclear gene markers. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 16(4), 237-242.
- Schroeder, H., & Degen, B. (2008a). Genetic structure of the green oak leaf roller (*Tortrix viridana* L.) and one of its hosts, *Quercus robur* L. *Forest Ecology and Management*, 256, 1270-1279.
- Schroeder, H., & Degen, B. (2008b). Spatial genetic structure in populations of the green oak leaf roller, *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *European Journal of Forest Research*, 127(6), 447-453.
- Schroeder, H., Arens, P., & Smulders, M.J.M. (2010). Autosomal and sex-linked microsatellite loci in the green oak leaf roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Journal of Molecular Ecology Resources*, 9(3), 809-811.
- Serra, G., Maestrale, G.B., Baratti, M., & Lentini, A. (2014). Genetic variation in Sardinian populations of the Green oak leaf roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Integrated protection in oak forests. IOBC/wprs Bulletin*, 101, 221-225.
- Shuster, S.M., Lonsdorf, E.V., Wimp, G.M., Bailey, J.K., & Whitham, T.G. (2006). Community heritability measures the evolutionary consequences of indirect genetic effects on community structure. *Evolution*, 60(5), 991-1003.
- Wang, X., & Messing, R.H. (2003). Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biological Control*, 27, 251-259.
- Wharton, R.A., Trostle, M.K., Messing, R.H., Copeland, R.S., Kimani-Njogu, S.W., Lux, S., Overholt, W.A., Mohamed, S., & Sivinski, J. (2000). Parasitoids of medfly, *Ceratitis capitata*, and related tephritids in Kenyan coffee: a predominantly koinobiont assemblage. *Bulletin of Entomological Research*, 90, 517-526.
- Xu, Y., Mai, J.W., Yu, B.J., Hu, H.X., Yuan, L., Jashenko, R., & Ji, R. (2019). Study on the genetic differentiation of geographic populations of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) in sino-kazakh border areas based on mitochondrial COI and COII genes. *Journal of Economic Entomology*, 112(4), 1912-1919.

ORIGINAL ARTICLE

Analyzing the reverse transcriptase sequence of viruses using bioinformatics methods

Samira Karimi¹, Mahin Pouresmaeil^{2*}

¹M.Sc, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

²Postdoctoral Researcher, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Correspondence

Mahin Pouresmaeil

Email: pouresmaeil.mahin@gmail.com

How to cite

Karimi, S., & Pouresmaeil, M. (2024). Probing the Reverse transcriptase Sequences of Viruses Using bioinformatics methods. *Crop Biotechnology*, 13(44), 45-52.

ABSTRACT

Bioinformatics is an interdisciplinary science that utilizes information technologies to organize and analyze biological data. This science enables researchers to perform comprehensive and documented investigations on various biological problems without the need for expensive and time-consuming laboratory experiments. In this study, we acquired the reverse transcriptase (RT) sequence of eight virus strains from NCBI with the following accession numbers: NC_001497.2, NC_001648.1, NC_001839.2, NC_003977.2, AF053008.1, EF428979.1, NC_001802.1. We investigated the structural and functional characteristics, domains, and motifs. The analysis revealed that the proteins from the eight virus strains, belonging to different families, exhibited distinct properties that set them apart from one another. The analysis also showed that these proteins are found in the membrane, cytoplasm, and periplasm, and all of them contain at least one specific domain of the reverse transcriptase enzyme. Based on all the analyses performed, *Cauliflower mosaic virus*, *Cassava vein mosaic virus*, and *Soybean chlorotic mottle virus*, all belonging to the *Caulimoviridae* family, were suitable for producing RT enzymes. The ability of these viruses to adapt to different plant hosts could potentially lead to the development of more efficient and cost-effective methods for producing RT enzymes. This adaptability could also open up new possibilities for genetic engineering and biotechnology, enabling the development of more effective enzymes.

KEYWORDS

Reverse transcriptase, Bioinformatics, Protein domain, Virus

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی توالی ترانس کریپتاز معکوس ویروس‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک.

سمیرا کریمی^۱، مهین پوراسمعیل^{۲*}

چکیده

بیوانفورماتیک یک علم بین‌رشته‌ای است که از فناوری اطلاعات برای سازماندهی و تجزیه و تحلیل داده‌های بیولوژیکی استفاده می‌کند. این علم به پژوهشگران امکان می‌دهد که بدون نیاز به انجام آزمایش‌های زمان‌بر و پرهزینه، مطالعات مستند و جامعی در مورد مسائل مختلف علوم زیستی انجام دهند. هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی توالی‌های مربوط به Reverse transcriptase (RT) در ویروس‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک است. بدین منظور هشت سویه ویروس دارای توالی RT با شماره دسترسی NC_001497.2، NC_001648.1، NC_001839.2، NC_003977.2، AF053008.1، EF428979.1، NC_001802.1 از پایگاه NCBI استخراج گردید. در این مطالعه، خصوصیات ساختاری و عملکردی، دمین‌ها و موتیف‌های این پروتئین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزها نشان داد که پروتئین‌های هشت سویه ویروس، متعلق به خانواده‌های مختلف، ویژگی‌های متمایزی را از خود نشان می‌دهند که آنها را از یکدیگر متمایز می‌سازد. همچنین مشخص شد این پروتئین‌ها در غشاء، سیتوپلاسم و پری پلاسم قرار دارند و همه آنها حاوی حداقل یک دمین مربوط به آنزیم ترانس کریپتاز معکوس هستند. بر اساس آنالیزهای صورت گرفته *Cauliflower mosaic virus*، *Cassava vein mosaic virus* و *Soybean chlorotic mottle virus* که همگی متعلق به خانواده *Caulimoviridae* هستند، برای تولید آنزیم RT مناسب می‌باشند. توانایی این ویروس‌ها برای سازگاری با میزبان‌های مختلف گیاهی می‌تواند به طور بالقوه منجر به توسعه روش‌های کارآمدتر و مقرون به صرفه‌تر برای تولید آنزیم RT شود. این سازگاری همچنین می‌تواند فرصت‌های جدیدی را برای مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایجاد کرده و امکان ایجاد آنزیم‌های با کارایی بیشتر را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم رونویسی معکوس، بیوانفورماتیک، دمین پروتئینی، ویروس.

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
^۲پژوهشگر پس‌دکتری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

نویسنده مسئول:

مهین پوراسمعیل

رایانامه: pouresmaeil.mahin@gmail.com

استناد به این مقاله:

کریمی، سمیرا و پوراسمعیل، مهین (۱۴۰۲). بررسی توالی ترانس کریپتاز معکوس در ویروس‌ها با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۴)، ۴۵-۵۲.

مقدمه

ویروس‌ها عامل بیماری‌زای میکروسکوپی هستند که از یک مولکول اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) تشکیل شده‌اند که توسط یک پوشش پروتئینی احاطه شده است. ویروس‌ها برای تکمیل چرخه زندگی خود به سلول‌های میزبان وابسته هستند. هنگامی که ویروس‌ها وارد سلول میزبان می‌شوند، ماشین‌های سلولی میزبان را در اختیار گرفته و تکثیر می‌یابند و در نهایت موجب ایجاد بیماری در میزبان خود می‌شوند (Harper, 2011). طبقه‌بندی و نام‌گذاری رسمی ویروس‌ها توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (ICTV) صورت می‌گیرد. بر اساس طبقه‌بندی این کمیته، ویروس‌های دارای مکانیسم رونویسی معکوس به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که عبارتند از: *Caulimoviridae*, *Pseudiviridae*, *Metaviridae*, *Hepadnaviridae* و *Retroviridae*. آنزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcription) نقش مهمی در روند تکثیر این پنج خانواده ویروس دارد (Álvarez, 2017). به طوری که آلوده‌سازی میزبان را از طریق تولید آنزیم رونویسی معکوس در طی فرآیند تکثیر انجام می‌دهند (Krupovic et al., 2018).

پیشینه پژوهش

رونویسی معکوس فرآیندی است که تبدیل RNA به مولکول‌های DNA مکمل (cDNA) را امکان‌پذیر می‌سازد و ابزار ارزشمندی را برای مطالعه الگوهای بیان RNA در اختیار محققان قرار می‌دهد. اولین مرحله شامل استفاده از ترانس کریپتاز معکوس است، آنزیمی که cDNA را از یک الگوی RNA سنتز می‌کند. این آنزیم به عنوان یک کاتالیزور بسیار خاص و کارآمد برای سنتز رشته‌های DNA با استفاده از RNA به عنوان یک الگو عمل می‌کند (Haddad & Baldwin, 2010). آنزیم رونوشت بردار معکوس با کاربردهای گسترده خود در رشته‌های مختلف علمی، نقش اساسی در روشن کردن فرآیندهای پیچیده بیولوژیکی و پیشرفت تحقیقات زیست پزشکی ایفا می‌کند (Menéndez-Arias & Delgado, 2022). این آنزیم در سال ۱۹۷۰ توسط دیوید بالتیمور و تیمین هاوارد کشف شد و موجب انقلاب در زیست‌شناسی مولکولی گردید (Coffin & Fan, 2016).

آنزیم رونوشت بردار معکوس کدشده توسط ویروس‌های مختلف اگر چه بر اساس ساختاری باهم متفاوتند اما همه آن‌ها توانایی تبدیل RNA را به DNA دو رشته‌ای از طریق فعالیت DNA پلیمرز وابسته به RNA، ریبونوکلاز H (RNase H) و فعالیت DNA پلیمرز وابسته به DNA را دارند (Sluis-Cremer, 2021). این آنزیم بعنوان یک RNA polymerase وابسته به RNA که فاقد دنباله اگزونوکلازی کنترل کننده خطا بوده و قادر به سنتز DNA از روی RNA می‌باشد (Bhagavan et al., 2016; Ellefson & Ha, 2015). آنزیم رونوشت بردار معکوس یکی از اجزای ضروری در تحقیقات علم ژنتیک در زمینه‌های مختلف محسوب می‌شود، و برای کلون کردن mRNA به صورت cDNA، تولید پروب، آنالیز رونوشت به وسیله گسترش پرایمر، جهت تعیین مقدار کمی RNA، تهیه کتابخانه‌ی cDNA و بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Brown, 2020).

خانواده *Caulimoviridae* شامل ۸ جنس که بر اساس مورفولوژی ویریون در دو گروه ویروس‌های دارای ویریون کروی و ویروس‌های باسیلی شکل قرار می‌گیرند. این دو گروه دارای ژنوم DNA دورشته‌ای (dsDNA) بوده که فقط گیاهان را آلوده می‌کنند (Schoelz & Adhab, 2021; Teycheney et al., 2020). خانواده *Hepadnaviridae* دارای ۵ جنس از ویروس‌های کوچک با ژنوم DNA دو رشته‌ای که پرندگان و پستانداران را آلوده می‌کنند. همانندسازی این گروه از ویروس‌ها شامل رونویسی معکوس در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی است (Magnius et al., 2020). اعضای خانواده *Pseudoviridae* و *Metaviridae* ویروس‌های DNA دار و دارای ساختار ۲۰ وجهی که نقش مهمی در چرخه عفونت آن‌ها ایفا می‌کند، همچنین این ویروس‌ها دارای رتروترانسپوزون‌های تکراری طولانی می‌باشند (Leonetti et al., 2021; Llorens et al., 2020). خانواده *Retroviridae* گروهی از ویروس‌های دارای دو نسخه از RNA تک رشته‌ای مثبت و شامل دو زیر خانواده *Orthoretrovirinae* و *Spumaretrovirinae* که طیف وسیعی از حیوانات و مهره‌داران را آلوده می‌کنند (Passos et al., 2021; Sluis-Cremer, 2021).

ویروس‌ها نقش مهمی در تنظیم اکوسیستم ایفا می‌کنند از این رو امروزه فناوری‌های توالی‌یابی به همراه ابزارهای جدید بیوانفورماتیکی زمینه‌های مناسبی برای مطالعه ویروس‌ها فراهم کرده است (Auslander et al., 2021; Hufsky et al., 2022). بیوانفورماتیک یک دانش بین رشته‌ای که شامل استفاده

ویروس‌ها به فرمت FASTA توسط ابزار MultAlin انجام شد، این سرور قابلیت مقایسه چندین توالی را دارد و در نهایت درخت فیلوژنتیک توسط نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از روش (N.J) Neighbor joining و بوت استراپ (Bootstrap) 1000 رسم گردید (Allahi, Sohani, & Hasani Kumleh, 2017).

امروزه در بیوانفورماتیک، پیشرفت روش‌های محاسباتی برای شناسایی و بررسی موتیف‌ها یکی از چالش‌های بزرگ محسوب می‌شود. موتیف‌ها پپتیدهایی هستند که به عملکرد پروتئین‌ها و برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین کمک ویژه‌ای می‌کنند. ویروس‌ها از موتیف‌ها برای ورود به میزبان، تعامل با پروتئین‌های سلولی یا خروج از سلول‌های میزبان استفاده می‌کنند. در این راستا مطالعه موتیف‌ها نقش احتمالی پروتئین‌ها را آشکار کرده و به درمان علیه بیماری‌ها و ویروسی کمک شایانی می‌کند (Sobhy, 2016).

موتیف‌ها و دامین‌ها از واحدهای مهم و عملکردی توالی‌های اسیدآمینه می‌باشند و بیشتر توسط ابزارهایی مانند Pfam/NCBI-CDD و SMART شناسایی می‌شوند. شناسایی و مطالعه موتیف پروتئین‌های مربوط به هشت سویه ویروس از طریق سرور Motif search با کمک پایگاه داده Pfam و NCBI-CDD انجام شد. در این پژوهش بررسی دامین نیز توسط سرور SMART صورت گرفت.

از ابزارها و تکنیک‌های محاسباتی برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیولوژیکی می‌باشد. بیوانفورماتیک نقش مهمی در درک سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده و پیشرفت تحقیقات در زمینه‌هایی مانند ژنومیک، پروتئومیکس و زیست‌شناسی تکاملی دارد. با ادغام روش‌های محاسباتی و آماری با دانش بیولوژیکی، بیوانفورماتیک به دانشمندان اجازه می‌دهد تا مجموعه داده‌های بزرگ و متنوع را درک کنند و در نهایت منجر به اکتشافات و بینش‌هایی در مورد فرآیندهای اساسی زندگی شود (Gauthier et al., 2019; Rhee et al., 2006). در مطالعه حاضر توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده (CDs) و پروتئینی آنزیم RT در ۸ سویه ویروس از ۵ خانواده *Metaviridae*, *Hepaviridae*, *Caulimoviridae*, *Retroviridae*, *Pseuviridae* (به جز خانواده *Metaviridae* که سویه آن فاقد CDs کدکننده آنزیم RT می‌باشد) با بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک بین ۸ سویه ویروسی که دارای توالی کدکننده آنزیم معکوس هستند ابتدا توالی‌ها از وب سایت (National Center for Biotechnology Information) با فرمت FASTA استخراج شد (جدول ۱). مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی

جدول ۱. شماره دسترسی توالی‌های ۸ سویه ویروس

خانواده ویروسی	سویه ویروس	شماره دستیابی توالی نوکلئوتیدی	شماره دستیابی توالی اسیدآمینه
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	NC_001497.2	NP_056728.1
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	NC_001648.1	NP_056848.1
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Petunia vein clearing virus</i>	NC_001839.2	NP_127504.1
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	NC_001739.2	NP_068729.1
<i>Hepaviridae</i>	<i>Hepatitis B virus</i>	NC_003977.2	YP_009173866.1
<i>Metaviridae</i>	-----	-----	-----
<i>Pseuviridae</i>	<i>Glycine max SIRE1 virus</i>	AF053008.1	AAC64917.1
<i>Retroviridae</i>	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>	EF428979.1	ABO25842.2
	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	NC_001802.1	NP_057849.4

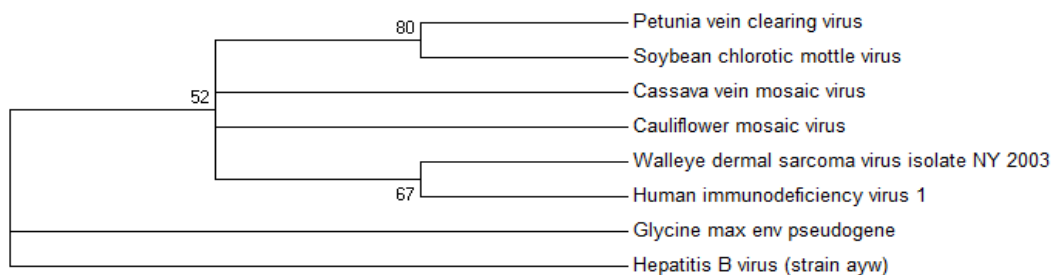
نوکلئوتید شماره ۱۸۴۳ تا نوکلئوتید شماره ۵۱۵۰ مشهود است. این شباهت‌ها می‌توانند نشان‌دهنده انتقال ژنی یا تکامل مشترک بین این سویه‌های ویروسی باشند. این پژوهش می‌تواند برای شناسایی منشأ و تکامل ویروس‌های دارای توالی آنزیم RT مفید باشد.

جدول ۳. نتایج بلاست توالی‌های نوکلئوتیدی

شماره دسترسی توالی	شماره دسترسی نتیجه بلاست	درصد شباهت
NC_001497.2	KY703614.1	97.01%
NC_001648.1	HQ694978.1	97.47%
NC_001839.2	AY228106.1	98.55%
NC_001739.2	MH718847.1	94.17%
NC_003977.2	MFG18341.1	99.97%
AF053008.1	AC235444.1	98.77%
EF428979.1	AF033822.1	99.81%
NC_001802.1	KU521529.1	98.99%

برای فهم بیشتر روابط فیلوژنتیکی و بررسی تنوع زیستی داده خام توالی‌ها نیاز به مطالعه مقایسه‌ای دارند (Kumar et al., 2018). بنابراین درخت فیلوژنتیک برای ژن‌های کد کننده آنزیم RT در ۸ سویه ویروس به روش NJ رسم و بوت استرپ‌های زیر ۵۰ به دلیل ارزش کمتر حذف گردید (شکل ۱).

نکته جالب توجه در درخت فیلوژنتیکی قرارگرفتن ژن‌های با توالی مشابه در یک کلاستر و همچنین تشکیل یک گروه پارانیایی بین اعضای خانواده (*Retroviridae* و *Caulimoviridae*) که دارای بوت استرپ ۵۲ و نشان‌دهنده شباهت زیاد توالی هدف، در این دو خانواده می‌باشد. براساس درخت فیلوژنتیکی سویه‌های ویروس در دو خانواده *Retroviridae* و *Caulimoviridae* ارتباط تکاملی نزدیکی نسبت به اعضای دو گروه دیگر یعنی *Hepaviridae* و *Pseudoviridae* دارند، و همچنین سویه‌های *Hepatitis B virus* و *Glycine max SIRE1 virus* تغییرات بیشتری را در ژن مورد مطالعه نسبت به حالت اجدادی نشان می‌دهند (شکل ۱).



شکل ۱. رابطه فیلوژنی ژن‌های کدکننده آنزیم رونویسی معکوس در ۸ سویه ویروس. درخت فیلوژنتیکی توسط نرم افزار MEGA6 با روش NJ و آزمون بوت استرپ رسم شده است.

در این مطالعه از سرور PIR و ابزار Analysis برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد. همچنین از سرور targetP برای مشخص کردن وظیفه پروتئین‌ها استفاده گردید. محل پروتئین موردنظر نیز از طریق سایت Cello مورد بررسی قرار گرفت. در جدول شماره ۲ اسامی پایگاه داده‌های استفاده شده در این پژوهش اشاره شده است.

جدول ۲. نام و آدرس پایگاه داده‌های استفاده شده در پژوهش

Website	URL
Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
MultAlin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
Motif search	https://www.genome.jp/tools/motif
https://pfam.xfam.org	https://pfam.xfam.org/
NCBI-CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/
PIR	https://proteininformationresource.org/pirwww/
targetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
Cello	http://cello.life.nctu.edu.tw/
Expasy	http://web.expasy.org/compute_pi/

بحث و نتایج

شناسایی سویه‌های مشابه به ۸ سویه ویروسی تولیدکننده آنزیم RT

مطالعه توالی‌های مشابه نقش مهمی در درک و مطالعه توالی هدف ما دارد، از این رو در این مطالعه توالی‌هایی با بیشترین شباهت به توالی‌های نوکلئوتیدی هدف در ۸ سویه ویروسی از طریق بلاست استخراج و نتیجه آن در جدول ارائه شده هست (جدول ۳).

بررسی روابط تکاملی و فیلوژنتیکی

مقایسه چندین توالی یک راهکار مفید برای مطالعه تکامل ملکولی و تجزیه تحلیل روابط ساختاری در توالی‌ها می‌باشد (Naznin et al., 2011). نتایج بررسی روابط فیلوژنتیک در این پژوهش نشان داد که توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده RT در این سویه‌های ویروسی دارای شباهت‌های زیادی هستند که از

بررسی اعضا ژنی کدکننده آنزیم RT

مطالعه ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی ژن‌های هدف و همچنین محصول رونویسی آن‌ها (پروتئین) حاکی از آنست که این ژن‌ها نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی متفاوتی دارند، نقطه ایزوالکتریک، pH هست که پروتئین در آن فاقد بارالکتریکی می‌باشد و نقش مهمی در خالص‌سازی و رسوب پروتئین‌ها و طیف‌سنجی جرمی دارد (Kozlowski, 2017). بر طبق نتایج بدست‌آمده از ابزار تحلیل پروتئین (Expasy)، پروتئین به شماره دسترسی YP_009173866.1 بیشترین نقطه ایزوالکتریک و پروتئین NP_127504.1 وزن مولکولی بیشتری نسبت به سایر پروتئین‌ها دارد (جدول ۴).

مکان‌یابی پروتئین هدف در ۸ سویه ویروس نشان می‌دهد، پروتئین موردنظر (آنزیم) با توجه به میزبان هدف ویروس‌های موردبحث در غشاها، سیتوپلاسم، پری‌پلاسم تولید و فعال می‌باشد و از همین طریق موجب اختلال در فعالیت‌های سلولی میزبان می‌شوند (جدول ۴).

شناسایی دمین و موتیف مربوط به پروتئین‌های هدف

بر اساس مطالعات صورت گرفته دمین‌ها و موتیف توالی‌های هدف شناسایی شدند، طبق نتایج بدست‌آمده پروتئین شماره ABO25842.2 دارای بیشترین تعداد موتیف و پروتئین شماره NP_127504.1 دارای بیشترین تعداد دمین در توالی اسیدآمینو ای می‌باشند، در بین پروتئین‌های مورد بررسی همه آن‌ها شامل حداقل یک دمین اختصاصی آنزیم Reverse transcriptase بوده با این حال پروتئین شماره NP_057849.4 بیشترین دمین مربوط به آنزیم RT (RVT) دارد و همین امر نقش بسزایی در تولید این نوع آنزیم از ویروس مربوطه دارد (جدول ۵).

مطالعه دمین‌ها برخلاف موتیف‌ها درک ما را از اطلاعات ساختاری و عملکردی ژنوم افزایش می‌دهد، دمین‌ها به طور طبیعی تعامل و عملکرد پروتئین را تعیین و با تجزیه، تحلیل آن‌ها در توالی ژنوم نقش پروتئین مشخص می‌شود (Kozlowski, 2017; Vogel et al., 2004). موتیف‌ها می‌توانند در ایجاد ساختار پروتئین، تعامل و اتصال آن‌ها نقش مهمی داشته باشند (Kaiser et al., 2015).

جدول ۴. برخی ویژگی‌های پروتئین‌های هدف بر اساس شماره دسترسی در NCBI

شماره دسترسی پروتئین	طول پروتئین (اسیدآمینو)	وزن ملکولی (کیلودالتون)	pH ایزوالکتریک	میزبان ویروس	جایگاه سلولی
NP_056728.1	679	78629.04	9.21	گل کلم	سیتوپلاسم
NP_056848.1	652	77054.06	8.96	مانیوک (کاساوا)	سیتوپلاسم
NP_127504.1	2179	252213.98	8.68	پتونیا هیبرید cv	غشا پری‌پلاسم
NP_068729.1	692	80373.94	9.20	سویا	سیتوپلاسم
YP_009173866.1	832	93676.73	9.80	پستانداران	غشا
AAC64917.1	1550	176659.19	8.11	سویا	سیتوپلاسم
ABO25842.2	1752	196238.96	9.05	آزبان	پری‌پلاسم
NP_057849.4	1435	162041.90	8.88	پستانداران، انسان	سیتوپلاسم

جدول ۵. دمین‌ها و تعداد موتیف‌های پروتئینی

شماره پروتئین	اسامی دمین	کدون آغاز	کدون پایان	تعداد موتیف
NP_056728.1	Peptidase-A3	20	24	17
	RVT-1	293	452	
NP_056848.1	Low complexity	535	544	20
	Peptidase-A3	2	206	
	RVP	3	104	
	RVT-1	250	413	
NP_127504.1	Low complexity	458	472	26
	Mp	85	237	
	Coiled coil	569	592	
	Low complexity	643	658	
	Low complexity	705	716	
	Low complexity	783	806	
	Low complexity	831	845	
	Low complexity	1084	1098	
	Znf - C ₂ HC	1111	1127	
	RVT-1	1428	1591	
	Low complexity	1661	1673	
	Low complexity	1822	1840	
	Low complexity	2121	2141	

ادامه جدول ۵. دمین‌ها و تعداد موتیف‌های پروتئینی

شماره پروتئین	اسامی دمین	کدون آغاز	کدون پایان	تعداد موتیف
NP_068729.1	Peptidase-A3	16	210	20
	RVT-1	246	411	
YP_009173866.1	Low complexity	549	557	15
	DNApol- N ter	1	341	
	Low complexity	400	417	
	RVT-1	490	589	
	DNApol- C ter	590	832	
AAC64917.1	Retrotran- gag- 2	52	191	31
	Znf- C ₂ HC	274	290	
	Low complexity	304	316	
	Low complexity	326	343	
	Coiled coil	353	409	
	Znf- C ₂ HC	477	493	
	rve	722	840	
	RVT-2	1068	1311	
ABO25842.2	Low complexity	146	186	70
	Low complexity	484	495	
	Znf- C ₂ HC	502	518	
	Low complexity	521	537	
	RVP	603	703	
	RVT-1	812	977	
	RNase- H	1223	1368	
	rve	1483	1596	
	Low complexity	1734	1743	

نتیجه‌گیری کلی

Soybean chlorotic mottle virus و *vein mosaic virus* دارای تعداد اسیدآمینه کمتر و نقطه ایزوالکتریک بیشتری می‌باشد که این دو پارامتر در خالص‌سازی پروتئین تولیدی نقش مهمی دارد. در مقابل طول ژن هدف در این سویه‌ها کمتر هست که این ویژگی هم در اهداف مربوط به PCR و کلونینگ ژن، نقطه مثبت و قابل توجهی می‌باشد. با توجه به شباهت زیاد توالی مربوط به ژن RT در سه سویه موردنظر و سویه *Human immunodeficiency virus* از خانواده *Retroviridae* گزینه بعدی برای تولید آنزیم هدف می‌تواند باشد از جمله این که توالی هدف در این ویروس دارای بیشترین دمین مربوط به آنزیم RT بوده و بالطبع قابلیت بهتری خواهد داشت ولی از آنجایی که میزبان این ویروس، انسان است ادامه مطالعات عملی با محدودیت و هزینه‌های بالایی روبرو خواهد شد. برخلاف این خانواده، سه سویه ویروس ذکر شده مربوط به خانواده *Caulimoviridae* هستند که دارای میزبان گیاهی می‌باشند بنابراین براحتی می‌توان ویروس موردنظر را در محیط کنترل شده القا و مطالعات بعدی را انجام داد. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک منبع مفید برای شناخت و استفاده از این سویه‌های ویروسی در تولید آنزیم رونویسی معکوس در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) برای پژوهشگران علوم زیستی باشد.

پیشرفت‌های گسترده علم زیست‌شناسی و کثرت داده‌های موجود در این علم، ابزارهای موجود در حوزه بیوانفورماتیک را تقریباً به بخش جدایی‌ناپذیر مطالعات زیستی تبدیل کرده است به طوری که دسترسی محققان را به اطلاعات و آنالیزهای مربوط به DNA و پروتئین موجودات را بیش از پیش سرعت و دقت بخشیده است. از این رو استفاده از داده‌ها و اطلاعات بیوانفورماتیکی قبل از انجام مطالعات پژوهشی کمترین هزینه را برای محقق دربر خواهد داشت و این نقطه مثبت مهمی در پیشبرد تحقیقات می‌باشد. رونویسی از روی RNA یکی از اقدامات کاربردی در کارهای تحقیقاتی و تشخیصی بخصوص در علم پزشکی می‌باشد. امروزه انواعی از پرکاربردترین آنزیم‌های M-MLV RT و AMV RT بصورت تجاری تولید و استفاده می‌شوند که هر یک به نوبه خود مزایا و معایبی دارند، بنابراین پژوهش حاضر می‌تواند به عنوان راه‌گشای پایه و علمی برای تولید آنزیم RT در مراکز تحقیقاتی، سودمند و کارساز واقع شود و توجه محققان این عرصه را به تولید آنزیم‌های رونویسی معکوس (RT) متنوع با قابلیت و کارایی بهتر و بیشتر سوق دهد. بر اساس نتایج حاصله از آنالیزهای بیوانفورماتیکی در پژوهش حاضر پروتئین تولیدی (آنزیم RT) در سویه *Cassava* و *Cauliflower mosaic virus*

References

- Allahi, S., Sohani, M. M., & Hasani Kumleh, H. (2017). In silico identification of the pld gene family and analysis of their expression pattern in response to salt stress in medicago truncatula. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 6(1), 143-156.
- Auslander, N., Gussow, A. B., & Koonin, E. V. (2021). Incorporating machine learning into established bioinformatics frameworks. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2903.
- Bhagavan, N., & Ha, C.-E. (2015). DNA replication, repair, and mutagenesis. *Essentials of Medical Biochemistry*, 2, 401-417.
- Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*: John Wiley & Sons.
- Coffin, J. M., & Fan, H. (2016). The discovery of reverse transcriptase. *Annual review of virology*, 3, 29-51.
- Ellefson, J. W., Gollihar, J., Shroff, R., Shivram, H., Iyer, V. R., & Ellington, A. D. (2016). Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science*, 352(6293), 1590-1593.
- Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J., & Derome, N. (2019). A brief history of bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*, 20(6), 1981-1996.
- Gupta, A., Gangotia, D., & Mani, I. (2021). Bioinformatics tools and software. *Advances in Bioinformatics*, 15-35.
- Haddad, F., & Baldwin, K. M. (2010). Reverse transcription of the ribonucleic acid: The first step in rt-pcr assay. *RT-PCR Protocols: Second Edition*, 261-270.
- Harper, D. (2011). *Viruses: Biology, applications, and control*: Garland Science.
- Hufsky, F., Abecasis, A., Agudelo-Romero, P., Bletsa, M., Brown, K., Claus, C., ... Gismond, M. I. (2022). Women in the european virus bioinformatics center. *Viruses*, 14(7), 1522.
- Kaiser, F., Eisold, A., & Labudde, D. (2015). A novel algorithm for enhanced structural motif matching in proteins. *Journal of Computational Biology*, 22(7), 698-713.
- Kozłowski, L. P. (2017). Proteome-pi: Proteome isoelectric point database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D1112-D1116.
- Krupovic, M., Blomberg, J., Coffin, J. M., Dasgupta, I., Fan, H., Geering, A. D., . . . Johnson, W. (2018). Ortervirales: New virus order unifying five families of reverse-transcribing viruses. *Journal of virology*, 92(12), 10.1128/jvi.00515-00518.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). Mega x: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Kuznetsov, A., & Bollin, C. J. (2021). Ncbi genome workbench: Desktop software for comparative genomics, visualization, and genbank data submission. *Multiple Sequence Alignment: Methods and Protocols*, 261-295.
- Leonetti, P., Miesen, P., van Rij, R. P., & Pantaleo, V. (2020). Viral and subviral derived small rnas as pathogenic determinants in plants and insects. *Advances in Virus Research*, 107, 1-36.
- Llorens, C., Soriano, B., Krupovic, M., & Consortium, I. R. (2021). Ictv virus taxonomy profile: Pseudoviridae. *Journal of General Virology*, 102(3), 001563.
- Magnius, L., Mason, W. S., Taylor, J., Kann, M., Glebe, D., Dény, P., ... Consortium, I. R. (2020). Ictv virus taxonomy profile: Hepadnaviridae. *Journal of General Virology*, 101(6), 571-572.
- Menéndez-Arias, L., & Delgado, R. (2022). Update and latest advances in antiretroviral therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 43(1), 16-29.
- Menéndez-Arias, L., Sebastián-Martín, A., & Álvarez, M. (2017). Viral reverse transcriptases. *Virus research*, 234, 153-176.
- Naznin, F., Sarker, R., & Essam, D. (2011). Vertical decomposition with genetic algorithm for multiple sequence alignment. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1-26.
- Passos, D. O., Li, M., Craigie, R., & Lyumkis, D. (2021). Retroviral integrase: Structure, mechanism, and inhibition. In *The enzymes* (Vol. 50, pp. 249-300): Elsevier.
- Rhee, S. Y., Dickerson, J., & Xu, D. (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 335-360.
- Schoelz, J. E., & Adhab, M. (2021). Caulimoviruses (caulimoviridae).
- Sluis-Cremer, N. (2021). Retroviral reverse transcriptase: Structure, function and inhibition. In *The enzymes* (Vol. 50, pp. 179-194): Elsevier.
- Sobhy, H. (2016). A review of functional motifs utilized by viruses. *Proteomes*, 4(1), 3.
- Teycheney, P.-Y., Geering, A. D., Dasgupta, I., Hull, R., Kreuze, J. F., Lockhart, B., . . . Pooggin, M. M. (2020). Ictv virus taxonomy profile: Caulimoviridae. *Journal of General Virology*, 101(10), 1025-1026.
- Vogel, C., Berzuini, C., Bashton, M., Gough, J., & Teichmann, S. A. (2004). Supra-domains: Evolutionary units larger than single protein domains. *Journal of molecular biology*, 336(3), 809-823.
- Zhang, Y., Zhang, Q., Zhou, J., & Zou, Q. (2022). A survey on the algorithm and development of multiple sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*, 23(3), bbac069.

REVIEW ARTICLE

A review on reactive oxygen species (ROS): production, function, and their influence on plants

Armin Saed-Moucheshi¹, Fatemeh Sohrabi², Ali Shirkhani^{1*}

¹Crop and Horticulture Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Kermanshah, Iran.

² Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Shiraz University, Fars, Iran.

Correspondence

Ali Shirkhani

Email: Ali.shirkhani@gmail.com

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) produced in organelles such as mitochondria, chloroplast, and peroxisome play an important role in plant signaling and signal transduction pathways. ROSs basically are able to regulate oxidation-reduction (known as redox) reactions, plant growth and defense responses to environmental stimuli. Therefore, they affect every aspect at all life cycle stages of plants. ROSs such as hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen act as secondary messengers in plant cells to regulate a diverse range of protein functions (with post-translational modifications) and gene expression. They are produced naturally during the plant responses to environmental conditions and intra-/inter-cellular communications. Recent researches are indicating that ROS compounds play a key role in the plants response under both biotic and abiotic stresses. Biotic stresses such as fungi, viruses, mites, insects and other organisms, along with abiotic stresses such as drought, salinity and heavy metals, increase the production of ROS in plant cells. Plants possess various mechanisms to deal with the destructive effects of ROS increased production. ROS removal in plants is usually performed by two main groups of enzymatic and non-enzymatic antioxidant molecules. Antioxidant molecules play important roles in plant tolerance under stressful conditions by neutralizing ROS and converting them into water molecules. However, under severe stress conditions, plants are not able to eliminate the entire content of extra produced ROS molecules; as a result, the high amount of ROS causes oxidative stress in plants leading to various damages to the main components of the cells, such as proteins, lipids, DNA, carbohydrates, and ultimately cell death. There are still many unanswered questions regarding the plant specific responses to oxidative stress and regulation of cell communication during stress conditions. This review article tries to introduce the origin, location, and pathways of ROS production along with their types and effects on the cellular signal transduction system in stimulating adaptive responses of plants under stress conditions. Moreover, this review discusses the effectiveness of antioxidants systems in maintaining cell homeostasis and neutralizing the negative impacts of oxygen free radicals in plants.

KEYWORDS

reactive oxygen species, oxidative stress, plant messenger, oxidation-reduction, antioxidant.

How to cite

Saed-Moucheshi, A., Sohrabi, F., & Shirkhani, A. (2023). A review on Reactive Oxygen Species (ROS): production, function, and their influence on plants. *Crop Biotechnology*, 13(44), 53-70.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله مروری»

مروری بر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS): تولید، کارکرد و تأثیر آن‌ها در گیاهان

آرمین ساعدموچشی^۱، فاطمه سهرابی^۲، علی شیرخانی^{۱*}

چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولیدشده در اندامک‌هایی مانند میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم نقش مهمی در مسیرهای انتقال پیام در گیاهان دارند و واکنش‌های اکسایش-کاهش، رشد و نمو و همچنین پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تغییرات محیطی را تنظیم می‌کنند. بنابراین، ROSها بر هر جنبه و مرحله‌ای از گیاه تأثیرگذار هستند. ROSها مانند پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل و اکسیژن منفرد، در سلول‌های گیاهی به‌عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه جهت تنظیم طیف متنوعی از عملکردهای پروتئینی (با تغییرات پساترجمه) و تنظیم بیان ژن عمل می‌کنند. ROSها به صورت طبیعی در جریان پاسخ گیاه به شرایط محیطی و ارتباطات داخل و بین سلولی تولید می‌گردند. با این حال تحقیقات اخیر نشان داده است که این ترکیبات نقش مهمی در پاسخ گیاهان به شرایط تنش بر عهده دارند. تنش‌های زیستی مانند: قارچ‌ها، ویروس‌ها، کنه‌ها، حشرات و سایر جانداران، به همراه تنش‌های محیطی غیرزیستی مانند: خشکی، شوری و فلزات سنگین موجب افزایش تولید ROS در گیاهان می‌شود. گیاهان مکانیسم‌های متنوعی جهت مقابله با تأثیرات منفی افزایش تولید ROS دارند. حذف ROS در گیاهان به طور معمول توسط دو گروه اصلی از مولکول‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر-آنزیمی صورت می‌پذیرد. مولکول‌های آنتی‌اکسیدان با خنثی کردن ROS و تبدیل آن به آب، به‌عنوان محصول نهایی، نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش‌ها را ایفا می‌کنند. با این حال در شرایط تنش شدید، گیاهان قادر به حذف همه‌ی مولکول‌های تولید شده مازاد نیستند و در نتیجه مقدار بالای ROS موجب ایجاد تنش اکسیداتی و آسیب به ترکیبات اصلی سلول مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA، کربوهیدرات‌ها و در نهایت مرگ سلول می‌شود. هنوز به بسیاری از سوالات در مورد واکنش گیاهان به تنش اکسیداتی و تنظیم ارتباطات سلولی در زمان تنش پاسخ داده نشده است. این مقاله‌ی مروری به بررسی محل و نحوه‌ی تولید ROSها، انواع و تأثیرات آن‌ها بر سیستم پیام‌رسانی سلول‌ها و ایجاد پاسخ‌های سازگاری گیاهان در شرایط تنش می‌پردازد. همچنین، نحوه کارکرد آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر در حفظ هموستازی سلول و کارایی آن‌ها در حذف یا خنثی‌سازی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن مورد بررسی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی

گونه‌های فعال اکسیژن، تنش اکسیداتیو، پیام‌رسان گیاهی، اکسایش-کاهش، آنتی‌اکسیدان.

^۱ بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

^۲ بخش بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، فارس، ایران.

نویسنده مسئول:

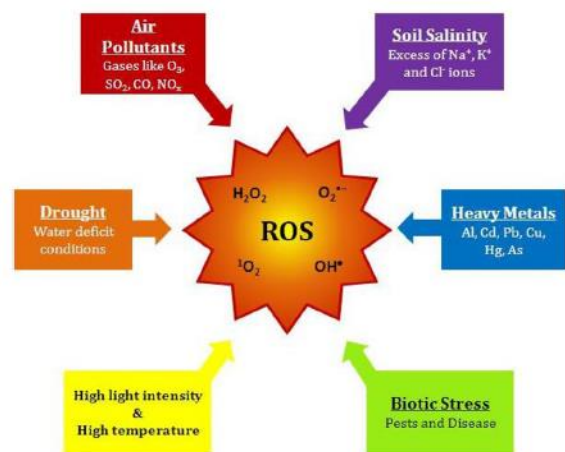
علی شیرخانی

ایمانامه: Ali.shirxhani@gmail.com

استناد به این مقاله:

ساعدموچشی، آرمین، سهرابی، فاطمه و شیرخانی، علی (۱۴۰۲). مروری بر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS): تولید، کارکرد و تأثیر آن‌ها در گیاهان. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۴)، ۷۰-۵۳.

آن‌ها و واکنش‌های اکسایش-کاهش در اندامک‌های گیاهی، تولید و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و تنظیم عملکرد ژن‌های مرتبط با مسیرهای پاسخ به محرک‌های محیطی است.



شکل ۱. دلایل مختلف که در ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند (Sharma *et al.*, 2012).

انواع ROS

فتوتروف‌ها انرژی نور خورشید را توسط فتوسنتز به انرژی بیوشیمیایی تبدیل می‌کنند و بنابراین برای حفظ زندگی روی زمین بسیار مهم هستند. انواع مختلف ROS شامل 1O_2 (اکسیژن منفرد)، H_2O_2 (پراکسید هیدروژن)، $O_2^{\bullet-}$ (رادیکال سوپراکسید) و OH^{\bullet} (رادیکال هیدروکسیل) هستند که به عنوان محصولات ناخواسته تولید می‌شوند (Sonmez *et al.*, 2023) (جدول ۱). اینها فقط از یک تا دو درصد از کل O_2 مصرفی گیاهان تولید می‌شوند (Bhattacharjee, 2005). واکنش‌های تولید کننده اعضای مختلف ROS در شکل ۲ نشان داده شده است.

رادیکال سوپراکسید $O_2^{\bullet-}$

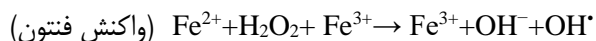
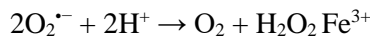
ROS به طور مداوم در کلروپلاست به دلیل کاهش جزئی O_2 (اکسیژن) یا به عنوان نتیجه انتقال انرژی به اکسیژن تولید می‌شود. رادیکال سوپراکسید عمدتاً در فتوسیستم I تیلوکوئیدی طی زنجیره انتقال الکترون غیرچرخه‌ای^۵ (ETC) و هم چنین بخش‌های دیگر سلولی تولید می‌شود. گاهی اوقات، اکسیژن با اجزای مختلف ETC واکنش می‌دهد تا رادیکال سوپراکسید را ایجاد کند (Guo *et al.*, 2023). این رادیکال معمولاً اولین ROSی است که تشکیل

مقدمه

گیاهان به طور مداوم با محیط اطراف خود در ارتباط هستند و سیستم‌های متابولیک خود را مطابق با شرایط محیطی تنظیم می‌کنند تا بهره‌وری گیاهی را بهبود ببخشند. سلول‌های گیاهی درجه بالایی از انعطاف‌پذیری را نشان می‌دهند که آن‌ها را قادر می‌سازد به تغییرات محیطی که روزانه در معرض آن قرار می‌گیرند، واکنش نشان دهند. این انعطاف‌پذیری در فرایندهای اکسایش-کاهش سلولی^۱ و به ویژه تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن^۲ (ROS) منعکس می‌شود که نقش مهمی در پاسخ‌های مناسب به تغییرات محیطی مانند شدت نور و دسترسی به آب دارند (Sonmez *et al.*, 2023). عدم تعادل متابولیک ناشی از تنش‌ها می‌تواند منجر به فعال شدن آنزیم NADPH اکسیداز^۳ (NOX) و افزایش تولید ROS از منابعی مانند میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم می‌شود و در نهایت تجمع ROSها منجر به فعال کردن مسیر پیام‌رسانی^۴ می‌شود (Guo *et al.*, 2023). جمع‌آوری شواهد و بررسی منابع مرتبط با ROSها نشان دهنده نقش کلیدی آن‌ها به عنوان پیام‌رسان‌های زیستی است. عوامل گوناگونی که موجب ایجاد انواع ROS می‌شود در شکل ۱ نشان داده شده است.

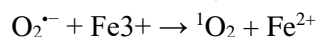
یافته‌های جدید نشان می‌دهد که ROSها تقریباً بر همه جنبه‌های زیست‌شناسی گیاهی تأثیر می‌گذارند و سهم مهمی در کنترل تبادل اطلاعات سلولی و تعیین عملکرد و سرنوشت سلول‌ها دارند (Sonmez *et al.*, 2023). بررسی مقالات و مطالعات چاپ شده در ارتباط با ROSها در طی سال‌های اخیر نشان دهنده اهمیت نقش این مولکول‌ها در گیاهان است. این مولکول‌ها پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را تسهیل می‌کنند (Guo *et al.*, 2023). علاوه بر این، تعاملات ROSها دارای اثرات فراوان در تنظیم طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیک به محیط زیست مانند جوانه زنی، نمو ریشه و بسته شدن روزنه‌های برگ دارد (Vavilala *et al.*, 2015). با این حال مطالعات کمی در ارتباط با نحوه تولید ROSها، تأثیر و پیام‌رسانی آن‌ها در شرایط نرمال و تنش به زبان فارسی به چاپ رسیده است. بنابراین، هدف ما در این مقاله ارائه پیشرفت‌های اخیر در درک چگونگی مدیریت و استفاده از ROSها توسط سلول‌های گیاهی، پیام‌رسانی آن‌ها، تعاملات

1. Redux
2. Reactive oxygen species
3. NADPH oxidase
4. Signaling



(واکنش فنتون)

می‌شود. رادیکال سوپراکسید همچنین می‌تواند واکنش‌های بیشتری را برای تولید سایر اعضای خانواده ROS انجام دهد.



جدول ۱. اعضای مختلف خانواده ROS و مشخصات آن‌ها

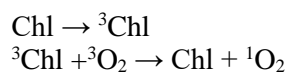
ROS	t _{1/2}	Migration distance	Sources	Mode of action	Reaction with DNA	Reaction with protein	Scavenging systems	Scavenging system
Superoxide (O ₂ ^{·-})	1-4 μs	30 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Reacts with double bond containing compounds such as (Fe-S) proteins	No	Via the Fe-center	Extremely low	SOD
Hydroxyl radical (OH [·])	1 μs	1 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Extremely reactive with all biomolecules	Rapidly reacting	Rapidly reacting	Rapidly reacting	Flavonoids and Proline
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	1 ms	1 μm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria, Peroxisomes	Oxidizes proteins and forms OH [·] via O ₂ ^{·-}	No	Attacks the Cys residue	Extremely low	CAT, PDXs and Flavonoids
Singlet Oxygen (O ₂ ¹)	1-4 μs	30 nm	Membranes, Chloroplasts, Mitochondria	Oxidizes proteins, PUFAs and DNA	Reacts with G residue	Attacks Trp, His, Tyr, Met and Cys residues	PUFA	Carotenoids and α-Tocopherol

وسیع‌تری از اهداف آسیب برسانند. این اهداف شامل مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها هستند (Sonmez *et al.*, 2023). این ترکیبات عامل اصلی از دست دادن فعالیت PSII ناشی از نور و در نتیجه مرگ سلولی هستند. گیاهان توانسته‌اند اکسیژن منفرد را با کمک بتاکاروتن، توکوفرول، پلاستوکینون به طور موثری خنثی کنند. از طرف دیگر، اکسیژن منفرد در افزایش بیان ژن‌هایی که مسئول محافظت در برابر تنش اکسیداتیو نوری^۲ هستند، نقش دارد (Guo *et al.*, 2023).

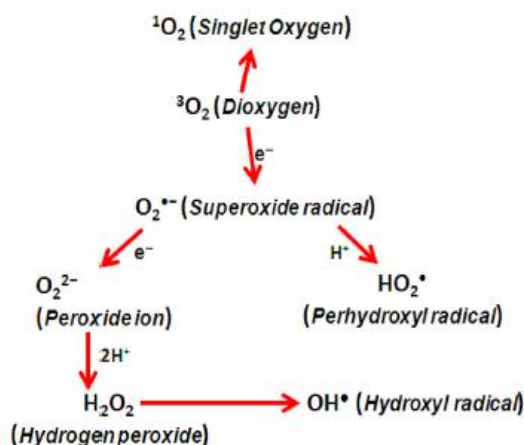
رادیکال سوپراکسید واکنش پذیری متوسط با نیمه عمر کوتاه ۲ تا ۴ میکرو ثانیه دارد و به خودی خود آسیب زیادی ایجاد نمی‌کند. در عوض، به رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد (واکنش پذیرتر و سمی‌تر) تبدیل می‌شود و باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شود (Halliwell, 2006).

اکسیژن منفرد (O₂¹)

اکسیژن منفرد یک ROS غیرمعمول است که نه تنها از طریق انتقال الکترون به اکسیژن مولکولی، بلکه با واکنش کلروفیل‌های (Chl) موجود در سیستم آنتن که در مرحله سه گانه^۱ قرار دارند با اکسیژن، ایجاد می‌شود.



تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و فلزات سنگین باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود در نتیجه غلظت دی‌اکسید کربن درون سلولی کاهش یافته و این امر به تشکیل اکسیژن منفرد کمک می‌کند. اکسیژن منفرد می‌تواند به هر دو سیستم فتوسنتزی، سیستم I (PSI) و سیستم II (PSII) آسیب جدی وارد ساخته و کل سیستم‌های فتوسنتزی را در معرض خطر قرار دهد. اگرچه اکسیژن منفرد نیمه عمر کوتاهی در حدود ۳ میکرو ثانیه دارد (Guo *et al.*, 2023)، می‌تواند حدود ۱۰۰ نانومتر پخش شود و به طیف

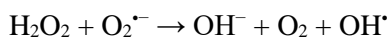


شکل ۲. ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن با انتقال انرژی.

مختلف مانند فروکتوز ۱، ۶ بیس فسفاتاز^۶، سدوهپتولوز ۱، ۷ بیس فسفاتاز ۷ و فسفوریبولوکیناز^۸ در غلظت ۱۰ میکرومولار شده و همچنین مسئول مرگ برنامه ریزی سلولی در غلظت‌های بالای سلولی است. با این حال، مانند رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن نسبتاً واکنش پذیر است. بنابراین، آسیب آن به طور کامل تنها زمانی قابل درک است که به گونه های فعال تر تبدیل شود.

رادیکال هیدروکسیل (OH•)

در میان اعضای خانواده ROS، رادیکال هیدروکسیل (OH•) واکنش پذیرترین و سمی ترین ROS شناخته شده است. در pH خنثی توسط واکنش فنتون بین پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید تولید می شود که توسط فلزات واسطه مانند آهن (Fe²⁺ و Fe³⁺) کاتالیز می شود. این رادیکال، توسط پراکسیداسیون لیپیدی^۹ (LPO)، موجب تخریب غشاء می شود. از آنجایی که سیستم آنزیمی برای حذف این رادیکال سمی وجود ندارد، تجمع بیش از حد رادیکال هیدروکسیل مرگ سلولی را در پی دارد (Pinto et al., 2003).



محل های تولید ROS

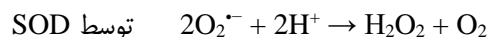
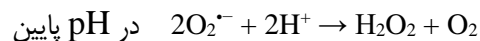
ROS در هر دو حالت تنش و غیرتنش در چندین مکان در کلروپلاست، میتوکندری، غشای پلاسمایی، پراکسیزوم، آپوپلاست، ER و دیواره های سلولی تولید می شود (شکل ۳). ROS همیشه از نشت اجتناب ناپذیر الکترون ها به اکسیژن از فعالیت های انتقال الکترون در کلروپلاست ها، میتوکندری ها و غشای پلاسمایی یا به عنوان یک محصول جانبی از مسیرهای متابولیک مختلف که در بخش های مختلف سلولی قرار دارند، تشکیل می شود.

کلروپلاست ها

در کلروپلاست ها، اشکال مختلف ROS از چندین مکان تولید می شوند. ETC های موجود در PSI و PSII منابع اصلی ROS در کلروپلاست هستند. تولید ROS توسط این منابع شرایط

پراکسید هیدروژن (H₂O₂)

پراکسید هیدروژن، یک ROS نسبتاً واکنش پذیر است و زمانی تشکیل می شود که رادیکال سوپر اکسید هم کاهش یک ظرفیتی و هم چنین پروتونه شدن را تجربه کند. این امر می تواند هم به صورت غیر آنزیمی با تبدیل شدن به پراکسید هیدروژن در شرایط pH پایین یا عمدتاً توسط واکنشی که توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز^۱ (SOD) کاتالیز می شود، رخ دهد.



پراکسید هیدروژن در سلول های گیاهی نه تنها در شرایط عادی، بلکه در اثر تنش اکسیدی^۲، ناشی از عواملی مانند خشکی، سرما، نور شدید، اشعه ماوراء بنفش، زخم و عفونت پاتوژن نیز تولید می شود (Sharma et al., 2012). منابع اصلی تولید پراکسید هیدروژن در سلول های گیاهی شامل ETC در کلروپلاست، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی^۳ (ER)، غشای سلولی، اکسیداسیون بتای اسید چرب و تنفس نوری است. منابع دیگر شامل اکسیداسیون نوری^۴ توسط NOX و گزانتین اکسیداز^۵ (XOD) می شود.

پراکسید هیدروژن در گیاهان مانند شمشیر دو لبه رفتار می کند. در غلظت های پایین مفید اما در غلظت های بالاتر مضر است. در غلظت های درون سلولی اندک، به عنوان یک پیام تنظیم کننده برای فرآیندهای فیزیولوژیکی ضروری مانند پیری، تنفس نوری، فتوسنتز، حرکت روزنه ای، چرخه سلولی و رشد و نمو عمل می کند (Kawaguchi et al., 2023). به دلیل نیمه عمر طولانی ۱ میلی ثانیه در مقایسه با سایر اعضای ROS، می تواند مسافت های طولانی تری را طی کند و از غشای سلولی گیاه عبور کند. این ترکیب می تواند از طریق آکوپورین ها از غشاها عبور و به قسمت های مختلف سلول دست یابد و موجب تنش اکسیدی شود. پراکسید هیدروژن در غلظت بالا، هر دو اسید آمینه سیستئین (SH⁻) و متیونین (SCH³⁻) را اکسید می کند و آنزیم های چرخه کالوین، Cu/Zn-SOD و Fe-SOD را با اکسید کردن گروه های تیول آن ها غیرفعال می کند (Ozgun et al., 2015). این امر موجب کاهش ۵۰ درصدی فعالیت آنزیم های

6. Fructose 1, 6 bisphosphatase
7. Sedoheptulose 1, 7 bisphosphatase
8. Phosphoribulokinase
9. Lipid peroxidation

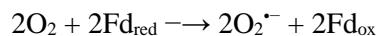
1. Superoxide dismutase
2. Oxidative stress
3. Endoplasmic Reticulum
4. Photo-oxidation
5. Xanthine oxidase

میتوکندری

میتوکندری می‌تواند ROS را در چندین قسمت ETC تولید کند. در میتوکندری احیای مستقیم اکسیژن به رادیکال سوپراکسید در ناحیه فلاووپروتئینی NADH دهیدروژناز^۳ زنجیره تنفسی (کمپلکس I) رخ می‌دهد. هنگامی که پیش ماده مرتبط با NAD^+ برای کمپلکس I محدود می‌شود، انتقال الکترون می‌تواند از کمپلکس II به کمپلکس I (جریان الکترون معکوس) رخ دهد. نشان داده شده است که این فرآیند تولید ROS را در کمپلکس I افزایش می‌دهد که توسط هیدرولیز ATP تنظیم می‌شود (Turrens, 2003). ناحیه یوبی‌کینون - سیتوکروم^۴ ETC (کمپلکس III)، نیز رادیکال سوپراکسید را از اکسیژن تولید می‌کند. اعتقاد بر این است که یوبی‌کینون کاملاً احیا شده یک الکترون به سیتوکروم C1 می‌دهد و یک رادیکال یوبی‌سمی‌کینون^۵ بسیار احیاکننده ناپایدار ایجاد می‌کند که برای نشت الکترون به اکسیژن و در نتیجه تولید رادیکال سوپراکسید مناسب است. در گیاهان، تحت شرایط هوازی معمولی، ETC و تولید ATP به یکدیگر کاملاً وابسته هستند. با این حال، عوامل تنش مختلف منجر به مهار و تغییر اجزای آن می‌شود. این امر منجر به کاهش بیش از حد حامل‌های الکترون و در نتیجه تشکیل ROS می‌شود (Noctor *et al.*, 2007).

چندین آنزیم موجود در ماتریکس میتوکندری می‌توانند ROS تولید کنند. برخی از آن‌ها مانند آکونیتاز^۶ به طور مستقیم ROS تولید می‌کنند در حالی که برخی دیگر مانند 1-galactono- γ -lactone dehydrogenase (GAL)، که قادر به انتقال الکترون‌ها به ETC هستند. رادیکال سوپراکسید از اولین ROSها است که از کاهش تک ظرفیتی در ETC تشکیل می‌شود. این ترکیب به سرعت توسط MnSOD (شکل میتوکندریایی SOD) یا آسکوربات پراکسیداز^۷ (APX) به پراکسید هیدروژن نسبتاً پایدار و نفوذپذیر از غشاء تبدیل می‌شود. پراکسید هیدروژن نیز توسط واکنش فنتون به رادیکال هیدروکسیل تبدیل می‌شود (Rasmusson *et al.*, 2008).

محدود کننده تثبیت دی اکسید کربن، مانند تنش‌های خشکی، شوری، دما و همچنین با ترکیب این شرایط با تنش نور زیاد، افزایش می‌یابد. در شرایط نرمال، جریان الکترون از فتوسیستم‌های برانگیخته شده به NADP رفته و به NADPH احیا می‌شود. NADPH سپس وارد چرخه کالوین می‌شود و گیرنده نهایی الکترون، دی اکسید کربن را احیا می‌کند. در صورت بارگذاری بیش از حد ETC، به دلیل کاهش عرضه NADP ناشی از شرایط تنش، نشت الکترون از فرودوکسین به اکسیژن وجود دارد و تحت فرایندی به نام واکنش مهمل^۱ رادیکال سوپراکسید تولید می‌شود (Cleland & Grace, 1999).



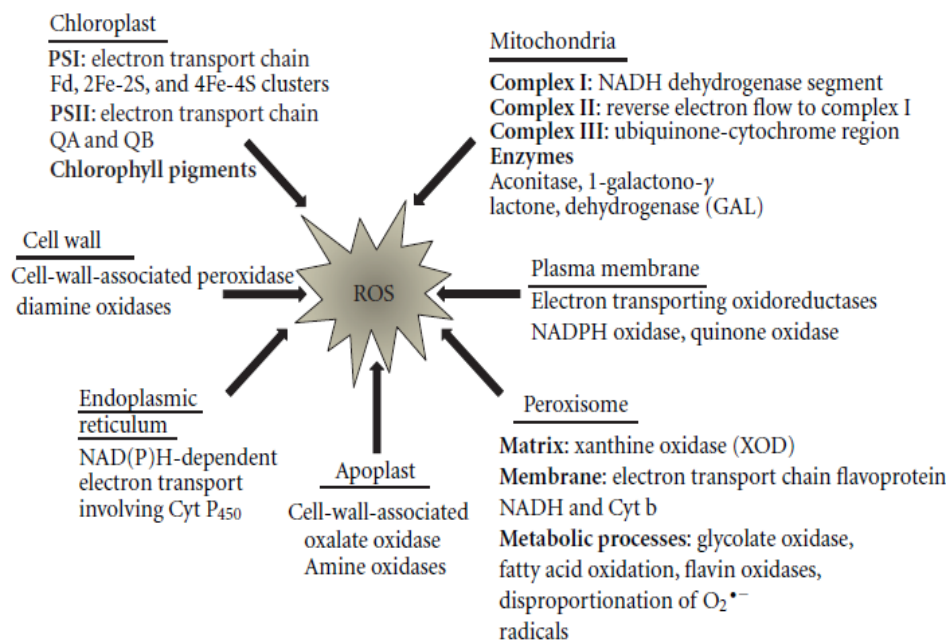
نشت الکترون‌ها به اکسیژن نیز ممکن است از دسته‌های فتوسیستم، سمت پذیرنده شامل کینون A (QA) و کینون B (QB) است. نشت الکترون از این محل به اکسیژن به تولید رادیکال سوپراکسید کمک می‌کند. تشکیل رادیکال سوپراکسید با احیای اکسیژن یک مرحله محدود کننده سرعت است. سپس رادیکال سوپراکسید ممکن است روی سطح غشای داخلی "لومن" به رادیکال HO_2^{\cdot} پروتونه شود یا به صورت آنزیمی (توسط SOD) یا به طور خود به خود به پراکسید هیدروژن در سطح غشای "استرومایی" خارجی تبدیل شود. در مراکز Fe-S که Fe_2^+ در دسترس است، پراکسید هیدروژن ممکن است از طریق واکنش فنتون به رادیکال هیدروکسیل (بسیار خطرناک‌تر) تبدیل شود (Guo *et al.*, 2023).

شبکه آندوپلاسمی (ER)

در ER، انتقال الکترون وابسته به NAD(P)H که شامل Cyt P450 می‌شود، رادیکال سوپراکسید را تولید می‌کند. پیش ماده ارگانیک، RH، ابتدا با Cyt P450 واکنش نشان می‌دهد و سپس توسط یک فلاووپروتئین احیا می‌شود تا یک رادیکال حد واسط (Cyt P450R-) تشکیل دهد. اکسیژن سه گانه^۲ می‌تواند به راحتی با این رادیکال حدواسط واکنش نشان دهد زیرا هر یک دارای یک الکترون جفت نشده هستند. این کمپلکس اکسیژن‌دار (Cyt P450ROO-) ممکن است توسط سیتوکروم b احیا شود یا گاهی اوقات کمپلکس‌ها ممکن است تجزیه شوند و رادیکال سوپراکسید آزاد کنند (Mittler, 2002).

3. NADH dehydrogenase
4. Ubiquinone-cytochrome region
5. Ubisemiquinone
6. Aconitase
7. Ascorbate peroxidase

1. Mehler
2. Triplet oxygen



شکل ۳. محل‌های تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان. ROS در چندین مکان مانند کلروپلاست، میتوکندری، غشای پلاسمایی، پراکسی‌زوم، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی و دیواره سلولی تولید می‌شود (Sharma *et al.*, 2012).

پراکسی‌زوم

پراکسی‌زوم‌ها احتمالاً به دلیل متابولیسم اکسیدی خود، مکان‌های اصلی تولید پراکسید هیدروژن سلولی هستند. فرآیندهای متابولیکی اصلی تولید پراکسید هیدروژن در انواع مختلف پراکسی‌زوم شامل واکنش گلیکولات اکسیداز^۱، بتا اکسیداسیون اسید چرب، واکنش آنزیمی اکسیدازهای فلاوین، و عدم تناسب رادیکال‌های سوپراکسید است (Baker & Graham, 2013). در طول تنفس نوری، اکسیداسیون گلیکولات توسط گلیکولات اکسیداز در پراکسی‌زوم بیشترین عامل تولید پراکسید هیدروژن است. مانند میتوکندری و کلروپلاست، پراکسی‌زوم نیز در نتیجه متابولیسم طبیعی خود سوپراکسید تولید می‌کند. در پراکسی‌زوم‌های برگ نخود و لپه‌های هندوانه حداقل، دو محل تولید رادیکال سوپراکسید با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و طیف سنجی شناسایی شده است. یکی از این دو در ماتریس اندامک، سیستم مولد XOD است که اکسیداسیون گزانتین یا هیپوگزانتین به اسید اوریک را کاتالیز می‌کند که در این فرآیند رادیکال سوپراکسید تولید می‌شود. محل دیگر در غشاهای پراکسی‌زوم است که در آن یک ETC کوچک متشکل از فلاوپروتئین NADH و Cyt b وجود دارد (Noctor *et al.*, 2002).

سه پلی‌پپتید غشای پراکسی‌زومی^۲ (PMPs) با جرم مولکولی ۱۸، ۲۹، و ۳۲ کیلو دالتون در تولید رادیکال سوپراکسید دخیل هستند. در حالی که PMP های ۱۸ و ۳۲ کیلو دالتونی از NADH به عنوان دهنده الکترون برای تولید رادیکال سوپراکسید استفاده می‌کنند، PMP، ۲۹ کیلو دالتون به وضوح به NADPH وابسته است و قادر به احیای سیتوکروم c با NADPH به عنوان دهنده الکترون است. در میان سه PMP، تولید کننده اصلی رادیکال سوپراکسید، PMP ۱۸ کیلو دالتونی است که پیشنهاد می‌شود سیتوکرومی احتمالاً متعلق به گروه نوع b باشد. رادیکال سوپراکسید تولید شده متعاقباً توسط SOD به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود (Datta *et al.*, 2023).

غشای پلاسمایی

اکسیدوردوکنازهای انتقال دهنده الکترون در همه قسمت‌های غشای پلاسمای وجود دارند و منجر به تولید ROS در غشا می‌شوند. تولید ROS با استفاده از تکنیک‌های مختلف در غشاهای پلاسمایی جدا شده از مناطق در حال رشد زیر لپه^۳ و ریشه‌های نهال سویای ایتوله و همچنین کلتوتیپیل و ریشه‌های نهال ذرت ایتوله مورد مطالعه قرار گرفت (Heyno *et al.*, 2011).

2. Peroxisomal membrane polypeptides
3. Hypocotyls

1. Glycolate oxidase reaction

آپوپلاست

به نظر می‌رسد آنزیم‌های واقع در دیواره سلولی مسئول تولید ROS آپوپلاستی هستند (Hashem & Khalil, 2023). اگزالات اکسیداز^{۱۱} مرتبط با دیواره سلولی (ژرمین)^{۱۲} پراکسید هیدروژن و دی اکسید کربن را از اگزالیک اسید آزاد می‌کند. گزارش شده است که این آنزیم در تجمع پراکسید هیدروژن آپوپلاستی طی تعاملات بین گونه‌های مختلف غلات و قارچ‌ها نقش دارد (Lane, 2002). آنزیم‌های شبه آمین اکسیداز^{۱۳} ممکن است به واکنش‌های دفاعی که در آپوپلاست به دنبال استرس زیستی رخ می‌دهد، عمدتاً به تولید پراکسید هیدروژن کمک کند (Cona et al., 2006). آمین اکسیدازها^{۱۴}، دامیناسیون اکسیداتیو پلی‌آمین‌ها (یعنی پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین) را با استفاده از FAD به عنوان کوفاکتور کاتالیز می‌کنند (Yan et al., 2023).

مروری بر نقش‌ها و عملکردهای ROS در گیاهان

در بررسی نقش ROS در مطالعه مربوط به de Pinto et al. (2015) عنوان شد که متابولیت‌های اکسایش-کاهش و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مسیرهای پیام‌رسانی و پاسخ سلول‌های گیاهی بسیار موثر هستند. به جهت حضور کلروپلاست و فتوستنتز در گیاهان، تفاوت‌های واضحی در روش‌های تولید ROS در حیوانات و گیاهان وجود دارد. اکنون نقش ROS در مسیرهای پیام‌رسانی میان اندامک‌ها و هسته بستر بسیاری از تحقیقات علمی در گیاهان است. در این زمینه، (Ozgun et al., 2015) به بررسی چگونگی اثر اندامک‌های مختلف گیاهی بر بیان یا عدم بیان ژن‌های مرتبط با پروتئین‌ها با واسطه ROS در ER پرداختند. پروتئین‌هایی که به واسطه تأثیر ROS‌ها در سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند به نام پروتئین‌های پیچ‌خورده پاسخی^{۱۵} (UPR) شناخته می‌شوند. آن‌ها در تسهیل پیچش^{۱۶}، شکل‌دهی پروتئین‌ها و تخریب پروتئین‌های اشتباه نقش دارند. گفته می‌شود که قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های طولانی مدت می‌تواند منجر به تجمع بیش از حد پروتئین‌های اشتباه شود. این موضوع باعث افزایش میزان تخریب پروتئین‌ها در نتیجه تأثیر

NAD(P)H واسطه‌ای برای تولید رادیکال سوپراکسید در تمام نمونه‌های غشای پلاسمایی بود. بنابراین پیشنهاد شد که در غشاهای پلاسمایی سوپراکسید تولید رادیکال سوپراکسید را می‌توان به عملکرد حداقل دو آنزیم، NOX و منادیون^۱ (یک ردوکتاز کینونی)^۲ نسبت داد (Noctor et al., 2002). انتقال الکترون‌ها را از NADPH سیتوپلاسمی به اکسیژن برای تشکیل رادیکال سوپراکسید کاتالیز می‌کند. رادیکال سوپراکسید به صورت خود به خود یا با فعالیت آنزیم SOD به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. NOX برای ایفای نقش کلیدی در تولید و تجمع ROS در گیاهان تحت شرایط تنش پیشنهاد شده است (Kwak et al., 2003).

دیواره‌های سلولی

دیواره‌های سلولی نیز به عنوان مکان‌های فعال برای تولید ROS در نظر گرفته می‌شوند. نقش پراکسیداز مرتبط با دیواره سلولی^۳ در تولید پراکسید هیدروژن نشان داده شده است. در ترب، پراکسیداز مرتبط با دیواره سلولی جدا شده، تشکیل پراکسید هیدروژن را در حضور NADH کاتالیز می‌کند. واکنش توسط مونوفنل‌های مختلف، به ویژه کانی‌فریل‌الکل^۴ تحریک می‌شود و مشخص شد که مالات دهیدروژناز^۵ تنها کاندید برای تامین NADH است (Gross, 1977).

تولید ROS توسط پراکسیدازهای واقع در دیواره سلولی در طی پاسخ حساسیت بیش از حد^۶ (HR) القا شده توسط باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Martinez et al., 1998) و استرس کمبود پتاسیم (K) در آرابیدوپسیس (Kim et al., 2010) ایجاد می‌شود. دی‌آمین اکسیدازها^۷ همچنین در تولید ROS در دیواره سلولی با استفاده از دی‌آمین یا پلی‌آمین‌ها (پوترسین^۸، اسپرمیدین^۹، کاداورین^{۱۰} و غیره) برای احیای یک کینون که اکسید می‌شود و پراکسیدها را تشکیل می‌دهد، دخیل هستند (Pell & Steffen, 1991).

1. Menadione
2. Quinone reductase
3. Cell-wall-associated peroxidase
4. Coniferyl alcohol
5. Malate dehydrogenase
6. Hypersensitive response
7. Diamine oxidases
8. Putrescine
9. Spermidine
10. Cadaverine

11. Oxalate oxidase
12. Germin
13. Amine oxidase-like enzymes
14. Amine oxidases
15. Unfolded protein response
16. Folding

که جهش یافته‌های Vtc1-1 (دخیل در مسیر سنتز آسکوربات)، حساسیت کمتری نسبت به این تنش را نشان دادند (Jozefczak *et al.*, 2015).

Palma *et al.* (2015) نشان دادند که اکسیدان‌ها در مسیر و فرایند رسیدن میوه در گیاه دیفل تأثیر گذار هستند. بررسی آن‌ها نشان دهنده نقش آسکوربات در کنترل پاسخ‌های گیاه به شرایط محیطی و اثر آن در رسیدگی میوه بود. همچنین بر اساس پژوهش‌های Jeevan Kumar *et al.* (2015)، ROS با جنبه‌های مختلف فیزیولوژی بذر از تولد تا مرگ ارتباط نزدیکی داشته و همچنین در عملکرد نهایی محصولات دانه‌ای مانند غلات و کیفیت دانه تأثیر گذار است. از طرف دیگر، ROS نقش تنظیمی در خواب بذر داشته و می‌تواند در مبارزه با عفونت پاتوژن‌ها نقش داشته باشد. بر اساس گفته Morscher *et al.* (2015) اکسیدان‌ها می‌توانند نقش دوگانه‌ای را در جوانه‌زنی بذر ایفا کنند. به نظر می‌رسد که غلظت بالای اکسیژن به نفع خواب بذر است و از طرفی اکسیداسیون پروتئین‌های موجود در سیتوزول سلول‌های بذر می‌تواند به نفع شکستن خواب بذر باشد. بر اساس پژوهش‌ها Xiaochuang *et al.* (2018)، انتقال از حالت سکون به حالت متابولیک فعال در طول ظهور جوانه نیاز به مدیریت انتقال از حالت هیپوکسی به حالتی است که در آن سطح اکسیژن داخل سلولی به سطح اکسیژن اتمسفر می‌رسد. در این مسیر هماهنگی شبکه‌های پیام رسان مرتبط با مرکز اکسایش/کاهش سلولی بسیار مهم هستند. Meitha *et al.* (2015) نشان داد که تنظیم انتشار هیپوکسی در جوانه‌های نیمه‌فعال و تغییر حالت به صورت توسعه یافته نیازمند تجمع ROS در بافت‌های آوندی در سلول‌های در حال نمو جوانه انگور است. به صورت کلی، شکل ۴ خلاصه نقش گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ گیاهان به شرایط محیطی و تأثیر آنها بر نحوه تغییرات گیاهان را نشان می‌دهد.

نقش ROS در تنش اکسیدی گیاهان

ROS به عنوان نتیجه متابولیسم طبیعی در موجودات هوازی تولید می‌شود. تولید و تجمع ROS در سلول‌های گیاهی باید کنترل شود زیرا آن‌ها در غلظت‌های بالاتر بسیار واکنش پذیر و سمی هستند. نقش ROS به عنوان اکسیدان‌ها و یا مولکول‌های پیام-

منفی بر ER و در نهایت منجر به پدیده‌ای به نام تنش شبکه آندوپلاسمی شود.

Ozgun *et al.* (2015) رونویسی تعدادی از ژن‌های مرتبط با UPR را در پاسخ به غلظت‌های مختلف ROS در اندامک‌ها را بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها درک ما از پاسخ‌های ER به پیام‌های اکسیدی متعدد از اندامک‌های مختلف گیاهی گسترش می‌دهد. مطالعات آن‌ها نشان داد که مقدار پروتئین Ubiquinol oxidase 1a (AOX1a) نشانه‌ای از شدت تنش اکسیدی است. این پروتئین نقش کلیدی را در تنظیم رابطه‌ی متقابل میان میتوکندری-کلروپلاست و همچنین اندامک‌ها-هسته بر اساس مسیره‌های پیام رسانی برگشتی بر عهده دارد. همچنین Vishwakarma *et al.* (2015) نشان دادند که فقدان AOX1a عملکردی، در آراییدوپسیس تأثیر منفی بر فتوسنتز دارد. Serrano *et al.* (۲۰۱۵) نقش اصلی پراکسی‌زوم‌ها در تمایز و تحمل تنش در گیاهان را ارائه دادند. آن‌ها در ادامه توضیح دادند که پراکسی‌زوم‌ها از طریق تولید ROS و شبکه‌های پیام‌رسانی مرتبط با آن، تأثیر زیادی بر فرایندهای اکسایش-کاهش سلولی دارند. تنظیم رویدادهای مرگ سلولی برنامه ریزی شده^۱ (PCD) و مکانیسم‌های مرتبط با آن یکی دیگر از موضوعات مورد مطالعه در زمینه کارکردهای ROS و پاسخ‌های گیاهی وابسته به آن‌ها است. Ortiz-Espín *et al.* (2015) بررسی پتانسیل تیوردوکسین میتوکندریایی^۲ TRXO1 برای کاهش مرگ سلولی برنامه ریزی شده ناشی از ROS را در سلول‌های BY-2 تنباکو انجام دادند. بر این اساس افزایش بیان TRXO1 گیاه تنباکو باعث کاهش نشانه‌های تنش اکسیدی گردید و سطح H₂O₂ و نیتریک اکسید (NO) سلولی را کاهش داد که این موضوع باعث تأخیر در مرگ سلولی در این گیاه گردید. گفته می‌شود که این ویژگی‌ها با افزایش فعالیت کاتالاز^۳ و ظرفیت سلول در حفظ میزان گلوکاتایون سلولی مرتبط است. در این زمینه، پژوهش انجام شده توسط Pu *et al.* (2015)، نشان دهنده اهمیت حیاتی پروتئین‌های حامل الکترون در میتوکندری (مانند AOX)، در کنترل هموستازی سلولی و تنظیم مقدار اکسایش-کاهش سلولی است. در آزمایشی گیاهان آراییدوپسیس جهش یافته با تعداد کم ژن cad1-2 (دخیل در تولید گلوکاتایون)، حساسیت بیشتری نسبت به اثر سمیت کادمیوم نسبت به گیاهان نرمال نشان دادند در حالی

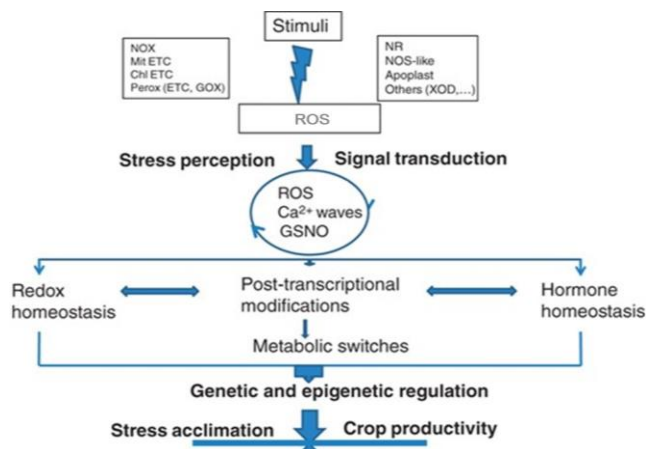
1. Programed Cell Death
2. Mitochondrial thioredoxin
3. Catalase

ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شدند، اکسیداسیون مولکول‌های RNA و DNA، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و تخریب پروتئین‌ها رخ داده و در نهایت مرگ سلولی دیده می‌شود (Petrov *et al.*, 2015). هنگامی که ROS در سلول‌های گیاهی تولید می‌شود، چندین تغییر پس از ترجمه^۴ (PTM) رخ می‌دهد که میزان این تغییرات در گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت است (Noctor *et al.*, 2018). در میان تغییرهای وابسته به ROS، کربونیل‌شدن، یک تغییر غیرآنزیمی غیرقابل برگشت است که می‌تواند بر ماکرومولکول‌هایی مانند چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها تأثیر گذار باشد و به‌عنوان یک نشانگر تنش اکسیدی^۵ استفاده شود (Friso & van Wijk, 2015).

مقابله گیاهان با تنش اکسیدی

گیاهان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی خود را به منظور کاهش اثرات نامطلوب تنش اکسیدی فعال می‌کنند. با این حال، نقش دفاع آنتی‌اکسیدانی بین گونه، ژنوتیپ، انواع و مدت زمان تنش متفاوت است. علاوه بر این، راه‌کارهای مختلفی برای بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان وجود دارد. آنتی‌اکسیدان‌ها به طور مستقیم یا غیرمستقیم ROS را جمع و یا تولید آن‌ها را مهار می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند توکوفرول‌ها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، آسکوربات^۶ (ASA)، گلوکاتیون احیا شده^۷ (GSH) و همچنین چندین اسید آمینه غیر پروتئینی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه را تشکیل می‌دهند (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). به منظور محدود کردن تولید ROS، این ترکیبات در یک رویکرد هماهنگ با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند SOD، CAT، POX، APX، مونودیهیدروآسکوربات ردوکتاز^۸ (MDHAR)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)، دهیدروآسکوربات^۹ (DHAR)، پراکسی ردوکتاز^{۱۰} (PRX)، گلوکاتیون S-ترانسفراز^{۱۱} (GST)، تیوردوکسین^{۱۲} (TRX) و پلی‌فنل اکسیداز^{۱۳} (PPO) عمل می‌کنند (شکل ۵). در سیستم دفاع گیاهی، واکنش‌های کاتالیزوری در اندام‌های سلولی،

رسان اکسایش-کاهش^۱ وابسته به تعادل میان تشکیل و حذف آن‌ها در اندام‌های مختلف سلولی است.



شکل ۴. تصویر نشان دهنده نقش مرکزی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در مسیرهای انتقال پیام است که موجب تسهیل سازگاری به تنش محیطی در گیاهان می‌شود (Considine *et al.*, 2015).

هنگامی که گیاهان در معرض شرایط استرس قرار می‌گیرند، غلظت بیش از حد ROS می‌تواند منجر به تنش اکسیدی شود. با این حال، در غلظت‌های پایین، آن‌ها به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان با تغییر خواص پروتئین و تشکیل پیوندهای کووالانسی در تنظیم بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی عمل می‌کنند. برای کاهش اثرات سمی ROS، گیاهان راه‌کارهایی را برای حفظ هموستازی با از بین بردن آن‌ها یا تحریک سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدان برای کنترل تولید و تجمع ROS بسته به نیازهای پیام‌رسانی سلولی ایجاد می‌کنند. به این ترتیب، سلول‌های گیاهی سطح متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی از جمله گلوکاتیون، آسکوربات و توکوفرول و شبکه گسترده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند SOD، CAT، APX و گلوکاتیون ردوکتاز^۲ (GR) را افزایش می‌دهند (Mittler *et al.*, 2004). حذف‌کننده‌های ROS^۳ در ابتدا مکانیسم‌های دفاعی در برابر سطوح بالای سمی ROS در نظر گرفته شدند. برعکس، مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که نقش سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی نه تنها برای حفظ هموستازی ROS در سلول‌های گیاهی است بلکه آن‌ها نیز در سیستم پیام‌رسانی وابسته به ROS در طول پاسخ گیاه به استرس‌های محیطی درگیر هستند (Noctor *et al.*, 2018). با این حال، زمانی که ROSها بیش از

4. Post transcriptional modification
5. Oxidative stress biomarker
6. Ascorbate
7. Reduced glutathione
8. Monodehydroascorbate
9. Dehydroascorbate reductase
10. Peroxiredoxins
11. Glutathione S-transferase
12. Thioredoxin
13. Polyphenol oxidase

1. Redox signalling molecules
2. Glutathione reductases
3. ROS scavengers

است که با از بین بردن ROS، عمدتاً رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید، از کلروپلاست محافظت می‌کند (ساعدموچشی و صفری، ۱۴۰۲). گروه دیگری از مولکول‌های غیرآنزیمی به نام کاروتنوئیدها نیز نقش مهمی در حفاظت از پروتئین‌های کمپلکس دریافت کننده نور^۲ و یکپارچگی غشای تیلاکوئید با از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارند (Terzi et al., 2014). برخی دیگر از ترکیبات مولکولی مانند فلاونوئیدها، به ویژه فلاوانول‌ها^۳ و حلقه B دی هیدروکسی فلاوون جایگزین شده با فلاوانون‌های^۴، همچنین نقش امیدوار کننده‌ای برای حذف ROS و کاهش پراکسیداسیون لیپید و آسیب سلولی دارند (Tiong et al., 2013). عوامل تنش‌زای غیرزیستی بیان ژن‌هایی را که در سیستم دفاع آنتی اکسیدان و تولید فلاونوئیدها دخیل هستند، افزایش می‌دهد. یک گروه مهم‌تر از آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی به نام اسیدهای فنلیک هستند که از اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک^۵ و هیدروکسی سینامیک^۶ تشکیل شده است که به عنوان کلاته کننده‌ها و حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد، به ویژه هیدروکسیل، سوپراکسید و هیدروپراکساید^۷ (ROOH) عمل می‌کنند. به عنوان حذف کننده‌های رادیکال آزاد، آلکالوئیدها همچنین پراکسید هیدروژن را در سلول‌ها کاهش می‌دهند و موجب اکسیداسیون در گیاهان می‌شوند (Carocho and Ferreira, 2013). اسیدهای آمینه غیرپروتئینی (گاما آمینوبوتیریک اسید^۸، اورنیتین و سیترولین) نیز آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند (Vranova et al., 2011).

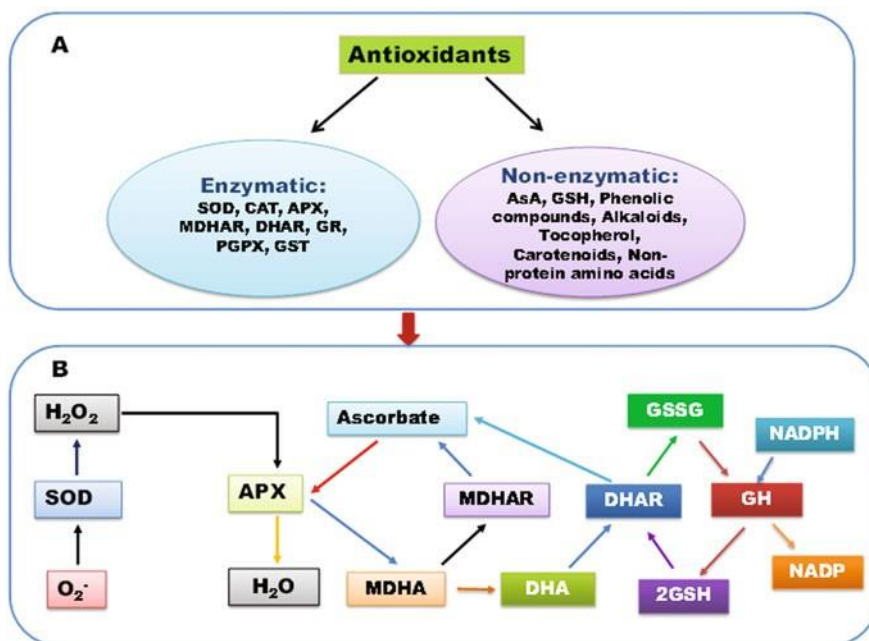
میان آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی رخ می‌دهد. در گیاهان، آنزیم SOD به طور مستقیم نقش مهمی در تحمل به تنش‌ها داشته و با تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن به عنوان اولین خط دفاعی در نظر گرفته می‌شود (Laxa et al., 2019). پراکسید هیدروژن‌های تولید شده توسط آنزیم‌هایی مانند CAT، GPX و APX به آب تبدیل می‌شوند یا می‌توانند در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون احیا شده (AsA-GSH) کاتالیز شوند. چرخه AsA-GSH، همچنین به عنوان چرخه Asada-Halliwell شناخته می‌شود. این چرخه به عنوان سیستم دفاع آنتی اکسیدانی عمده در گیاهان در نظر گرفته می‌شود و نقش مهمی در کاتالیز پراکسید هیدروژن دارد. این چرخه شامل چهار آنزیم آنتی اکسیدانی کلیدی مانند DHAR، MDHAR، APX و GR و همچنین آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی با وزن مولکولی کم مانند AsA و GSH است. در گیاهان، چرخه AsA-GSH با به حداقل رساندن غلظت پراکسید هیدروژن و حفظ هموستازی اکسایش-کاهش در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این، سم زدایی پراکسید هیدروژن و زنبوبوتیک‌ها^۱ نیاز به دو آنزیم حیاتی مانند GPX و GST دارد (شکل ۵) (Hasanuzzaman et al., 2018). در میان آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی، AsA و GSH فراوان‌ترین آنتی اکسیدان‌های محلول در گیاهان عالی هستند (Noctor et al., 2018). این‌ها نقش مهمی را به عنوان دهندگان الکترون بازی می‌کنند و به طور فعال ROS را از طریق چرخه AsA-GSH حذف می‌کنند. علاوه بر این، غلظت ROS سلولی با تعامل بتاکاروتن با رادیکال هیدروکسیل و یون سوپراکسید کاهش می‌یابد (Kapoor et al., 2019).

آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی

در میان آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی، آسکوربات نقش مهمی در حذف مولکول‌های ROS از طریق چرخه AsA-GSH با دادن الکترون ایفا می‌کند (Hasanuzzaman et al., 2019). آسکوربات، آلفا توکوفرول (ویتامین E) را از رادیکال توکوفرول با حذف رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید ایجاد و همچنین تعدادی از مسیرهای تولید فیتوکروم را تنظیم می‌کند (Naz et al., 2016). یکی دیگر از آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند GSH نیز مولکول‌های ROS را از بین می‌برد و هموستازی را حفظ می‌کند. از سوی دیگر، توکوفرول عضو مهمی از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی

2. Light harvesting complex proteins
3. Flavanols
4. Dihydroxy B-ring substituted flavones and flavano
5. Hydroxybenzoic
6. Hydroxycinnamicacids
7. Hydroperoxide
8. Gamma-aminobutyricacid

1. xenobiotic



شکل ۵. بررسی سیستم دفاع آنتی اکسیدان گیاهی: (الف) انواع آنتی اکسیدانها و (ب) مکانیسمهای ترکیبی آنتی اکسیدانهای آنزیمی و غیرآنزیمی. APX: آسکوربات پراکسیداز، ASA: آسکوربات، CAT: کاتالاز، DHA: دهیدروآسکوربات، DHAR: دهیدروآسکوربات ردوکتاز، GPX: گلوکاتیون پراکسیداز، GR: گلوکاتیون ردوکتاز، GSH: گلوکاتیون احیا شده، GSSG: گلوکاتیون اکسید شده، GST: گلوکاتیون S-ترانسفراز، H₂O₂: پراکسید هیدروژن، MDHA: مونودهیدروآسکوربات، MDHAR: مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز، O₂•: آنیون سوپراکسید، POX: پراکسیدازها، PRX: پراکسی ردوکسین، R: آلیفاتیک، معطر و یا گروه هتروسیکلیک، ROOH: هیدروپراکسید، SH-: تیولات، SOD: سوپراکسید دیسموتاز، SOH-: اسید سولفونیک، TRX: تیوردوکسین، X: سولفات، نیتريت یا گروه هاليد (Rai et al., 2022).

آنتی اکسیدان برای از بین بردن مولکولهای ROS است. این آنزیم عمدتاً در غشای تیلاکوئید کلروپلاست قرار دارد و می تواند به طور مستقیم بر فرایند فتوسنتز تاثیر گذار باشد. در واکنش مهار ROS، آنزیم PPO ممکن است با PRX یا چرخه آب-آب تعامل داشته باشد. یکی دیگر از عملکردهای مهم PPO این است که ترکیبات فنلی را با استفاده از اکسیژن موجود به کینون A و آب اکسید می کند (Boeckx et al., 2015). سلولهای گیاهی حاوی آنزیم آنتی اکسیدان دیگری به نام APX: (EC1.11.1.1) وابسته به ASA که در ایزوفرمهای مختلف APX میتوکندریایی (mtAPX)، APX کلروپلاستی (chlAPX) و APX سیتوزولی (cAPX) وجود دارد. APX تنها آنزیمی است که قادر به از بین بردن پراکسید هیدروژن در کلروپلاست گیاهان است زیرا آنزیم CAT در آنجا وجود ندارد و APX پراکسی زوم-گلی اکسی زوم (mAPX) به تولید MDHA از طریق چرخه AsA-GSH در گیاهان کمک می کند (Pandey et al., 2017). در گیاهان، MDHAR: (EC1.6.5.4) تولید شده، یک آنزیم فلاوین آدنین دی نوکلئوتید وابسته به

آنتی اکسیدان های آنزیمی

در میان آنزیمهای، آنزیم SOD: (EC1.15.1.1) که با سه نوع Cu/Zn-SOD، Fe-SOD و Mn-SOD مشخص می شود و خط مقدم سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را هدایت می کند (سهرابی و ساعدموچشی، ۱۴۰۲). این آنزیم رادیکال آزاد سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل و از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری می کند (Gill et al., 2015). یکی دیگر از آنزیمهای آنتی اکسیدان مهم CAT: (EC1.11.1.6) است که آنزیمی تترامریک حاوی هم برای سم زدایی ROS در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی است. در تحقیقاتی مشخص شده است که این آنزیم می تواند ۲۶ میلیون مولکول پراکسید هیدروژن را در یک دقیقه به آب کاتالیز کند. PRX: (EC1.11.1.7) در درجه اول ترکیبات فنلی را برای تولید رادیکال فنوکسیل (PhO•) اکسید می کند، این آنزیم هم چنین به عنوان کینون A (QA) شناخته می شود، که در آن پراکسید هیدروژن الکترون را می گیرد و به آب تبدیل می شود. رادیکال فنوکسیل در غیاب ASA، سوبرین، لیگنین و کینین را تولید می کند، اما در حضور ASA، با آسکوربات واکنش داده و در نتیجه MDHA و در نهایت DHA را به وجود می آورد (شکل ۵ و جدول ۲). PPO: (EC1.14.18.1)، یکی دیگر از آنزیمهای

آنزیمی آنتی اکسیدان شبه POX در سلول‌های گیاهی است که پراکسیدها (پراکسید هیدروژن و ROOH) را در سیتوزول، کلروپلاست‌ها، میتوکندری و هسته خنثی می‌کند. آنزیم‌های PRX وابسته به تیول (GSH یا هر گروه تیول دیگر) هستند و توانایی احیای پراکسیدهای آلی و معدنی متنوع را دارند و همچنین نقش مهمی در تنظیم مولکول‌های ROS دارند (شکل ۵ و جدول ۲) (Liebthal *et al.*, 2018).

پیام‌رسانی گونه‌های فعال اکسیژن گیاهان در پاسخ به تنش

ROS اضافی در پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزیستی به عنوان نتیجه اختلال در فعالیت‌های مختلف متابولیک و فیزیولوژیکی تولید می‌شود (Choudhury *et al.*, 2017). در مسیرهای دفاع آنتی اکسیدانی، به عنوان مثال، مسیر AsA-GSH از انرژی به شکل NADPH استفاده می‌کند و هنگامی که این انرژی مصرف می‌شود، این مسیرها قادر به فرار از سمیت ROS نخواهند بود (Choudhury *et al.*, 2017). با این حال، عملکردهای ROS (به ویژه پراکسید هیدروژن) در زیست‌شناسی تنش گیاهی در پایان قرن بیستم و آغاز قرن بیست و یکم مورد توجه قرار گرفت. تعداد کمی از گروه‌های علمی پراکسید هیدروژن را به عنوان مولکول پیام‌رسان شناسایی کردند که باعث ایجاد فرایندهای سازگاری و افزایش تحمل به تنش‌های مختلف محیطی می‌شود. ROS‌هایی که در کلروپلاست و میتوکندری تحت تنش به وجود آمده‌اند ممکن است الکترون‌ها را از اجزای فتوسنتزی و تنفسی منحرف کنند و مانع آسیب‌های ناشی از آن شوند (Asada, 2006). پراکسیداز دیواره سلولی ممکن است به تولید ROS رابطه با پیام‌رسانی کمک کند که در آن پراکسید هیدروژن از مسیرهای کلسیم و پروتئین‌کیناز فعال شده با میتوزن^۷ (MAPK) به عنوان آبشار پیام‌رسانی پایین دست استفاده می‌کند. علاوه بر این، هورمون‌های گیاهی، به ویژه اتیلن (ET) و اسید آبسزیک (ABA)، در پاسخ‌های مختلف به تنش‌های مختلف محیطی از طریق تعامل متقابل با ROS و در نتیجه افزایش تحمل تنش، که نشان‌دهنده نقش دوگانه ROS تحت تنش‌های مختلف است نقش دارند (Saed-Moucheshi *et al.*, 2019).

NADPH^۱ است که به صورت دو ایزوفرم در قسمت‌های متنوع سلولی یافت می‌شود (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). این آنزیم (حاوی گروه تیول) با تبدیل MDHA به AsA نقش مهمی در زندگی گیاه ایفا می‌کند. MDHAR به علاوه، به صورت غیرآنزیمی به DHA احیا می‌شود که پس از آن توسط فعالیت DHAR: (EC1.8.5.1) (وابسته به GSH) به AsA باز یافت می‌شود. علاوه بر این، GSH به GSSG اکسید شده و سپس توسط آنزیم GR: (EC1.6.4.2) (وابسته به NADPH) به GSH احیا می‌شود. GR آنزیم مهمی در تنظیم هموستازی واکنش‌های اکسایش-کاهش است (Couto *et al.*, 2016). در گیاهان GPX: (EC1.11.1.9)، آنزیمی آنتی اکسیدان، از خانواده POX بدون آهن با یک گروه تیول بسیار فعال است که پراکسید هیدروژن را از حذف کرده و چربی‌ها و اسیدهای آلی را از طریق GSH و TRX^۲ احیا می‌کند (Bela *et al.*, 2015). آنزیم GST: (EC2.5.1.18)، زئوبیوتیک‌ها (به ویژه علف‌کش‌ها و سایر ترکیبات فعال دارویی) را متابولیزه می‌کند و آن‌ها را به واکنش‌های گیاهی منتقل می‌کند (Christou *et al.*, 2016). آنزیم GST همچنین نقش مهمی در تجزیه پراکسیدها، تولید هورمون و پیام‌رسانی در زمان تنش و همچنین تسریع فعالیت GPX دارد (Nianiou-Obeidat *et al.*, 2017). یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی اکسیدان مهم در گیاهان با نقش مهم در حذف ROSها، TRX: (EC1.8.1.9) است. این آنزیم دارای ایزوفرم‌های مختلف (z و f, am, dh, o, y) است و حاوی یک جایگاه اکسایش-کاهش فعال آنزیمی به نام (WCG/PPG) است. این آنزیم پیوندهای دی سولفیدی^۲ را توسط پراکسید هیدروژن به دی تیول^۳ احیا کرده و پروتئین‌های هدف را سریع‌تر از آنزیم GSH یا دی تیوتریتول^۴ تنظیم می‌کند (Calderón *et al.*, 2018). در کلروپلاست گیاهان، دو ایزوفرم آنزیم TRX (TRX_y و TRX_x) با احیای^۲ سیستم PRX، هموستازی اکسایش-کاهش را تنظیم می‌کنند، در حالی که TRX01، دفاع آنتی اکسیدانی را در میتوکندری با تعامل با PRX و سولفیدوکسین^۵ فعال می‌کند (Sevilla *et al.*, 2015). یکی دیگر از آنزیم‌های PRX مبتنی بر تیول^۶؟ (EC1.11.1.15)،

1. NADPH-dependent flavin adenine dinucleotide enzyme
2. Disulfide bonds
3. Dithiol
4. Dithiothreitol
5. Sulfiredoxin
6. Thiol-based PRX enzyme

جدول ۲. مکانیسم واکنش آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی حذف کننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS).

Antioxidants	Reactions catalyzed	Catalytic reaction sites
Nonenzymatic		
Ascorbic acid	Scavenges $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, and $1O_2$	Chloroplast, peroxisomes, cytosol, mitochondria, apoplast
Glutathione	Scavenges H_2O_2 , $\bullet OH$, and $1O_2$	Chloroplast, peroxisomes, cytosol, mitochondria, apoplast
Tocopherol	Scavenges $\bullet OH$, $1O_2$, $ROO\bullet$, and $ROOH$	Thylakoid membrane of chloroplast
Carotenoids	Scavenges mainly $1O_2$	Chloroplast
Flavonoids	Scavenges $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , and $1O_2$	Chloroplast, vacuole
Phenolic acids	Scavenges $O_2\bullet$, $\bullet OH$, $ROO\bullet$, and $ONOO$	Cell wall
Alkaloids	Scavenges $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 , and $1O_2$	Vacuole
Nonprotein amino acids	Scavenges $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , and $1O_2$	Cytosol, mitochondria, cell wall
Enzymatic		
Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	$2 O_2^{\bullet-} + 2H \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Chloroplast, peroxisomes, cytosol, mitochondria, apoplast
Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Peroxisomes
Peroxidases (POX; EC 1.11.1.7)	$2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO\bullet + 2H_2O$ $2PhO\bullet \rightarrow$ cross-linked substances, $PhO\bullet + Asc \rightarrow PhOH + MDHA$, $PhO\bullet + MDHA \rightarrow PhOH + DHA$	Cell wall, apoplast, vacuole
Polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1)	$PhOH + O_2 \rightarrow$ Catechols + $O_2 \rightarrow Q + H_2O$	Thylakoid membrane of chloroplast, cytosol, vacuole
Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11)	$H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + MDHA$	Chloroplast, peroxisomes, cytosol, mitochondria, apoplast
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR; EC 1.6.5.4)	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AsA + NAD(P)^+$	Chloroplast, cytosol, mitochondria
Dehydroascorbate reductase (DHAR; EC 1.8.5.1)	$2GSH + DHA \rightarrow GSSG + AsA$	Chloroplast, cytosol, mitochondria
Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2)	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow GSH + NADP^+$	Chloroplast, cytosol, mitochondria
Glutathione peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9)	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$	Cytosol, mitochondria
Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18)	$R-X + GSH \rightarrow GS-R + H-X$	Chloroplast, cytosol, mitochondria
Peroxiredoxins (PRX; EC 1.11.1.15)	$H_2O_2 + PRX-S- \rightarrow OH + PRX-SOH$ $PRX-SOH + GSH \rightarrow PRX-SSG + H_2O$ $PRX-SSG + GSH \rightarrow PRX-S- + GSSG$	Cytosol, chloroplasts, mitochondria, nucleus, extracellular spaces
Thioredoxin (TRX; EC 1.8.1.9)	$TRX-RS_2 + NADPH + H^+ \rightarrow TRX-R(SH)_2 + NADP^+$	Chloroplast, cytosol, mitochondria

محوری در افزایش تحمل استرس غیرزیستی دارد، کاربرد خارجی پراکسید هیدروژن در حال افزایش است و کارایی آن در مقیاس بزرگ ثابت شده است (Hasanuzzaman *et al.*, 2017). از طرفی، ROS با گونه‌های گوگرد فعال^۱ (RSS)، گونه‌های نیتروژن فعال^۲ (RNS) و گونه‌های کربن فعال^۳ (RCS) تحت شرایط تنش ارتباط برقرار می‌کند و در مسیرهای انتقال پیام همکاری می‌کند (Kaur *et al.*, 2019a). سطوح آنتی اکسیدان

علاوه بر انتقال پیام و ارتباط با هورمون‌ها، ROS می‌تواند در تنش‌های غیرزیستی در انتقال متابولیت‌ها درگیر شود و فرایندهای سازگاری را در واکنش‌های اکسایش-کاهش، رونویسی و ترجمه پروتئین‌ها تنظیم کند و در نهایت از سلول‌های گیاهی در برابر آسیب دفاع کند (Choudhury *et al.*, 2017). علاوه بر این، پراکسید هیدروژن مسیرهای پیام‌رسانی NO و Ca^{2+} که در رشد و نمو، پاسخ‌های سلولی و فیزیولوژیکی تحت تنش‌های غیرزیستی دخالت دارند را مدیریت می‌کند (Janicka *et al.*, 2019). از آنجا که پراکسید هیدروژن درون‌زا نقش

1. Reactive sulfur species
2. Reactive nitrogen species
3. Reactive carbonyl species

رویکرد زیست شناسی مولکولی^۴ برای بیان بیش از حد کاست‌های ژن آنتی اکسیدانی می‌تواند منجر به افزایش تحمل به تنش‌های متعدد در آینده شود.

منابع

ساعدموچشی، آ.، و صفری، ه. (۱۴۰۲). بررسی عناصر تنظیم کننده ژن‌های کدکننده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گندم. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات ۲(۱): ۶۴-۷۳.

سهرابی، ف.، و ساعدموچشی، آ. (۱۴۰۲). بررسی عناصر تنظیم کننده ژن‌های NAD(P)H oxidase در گندم. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات: ۲(۳): ۶۷-۸۱.

Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* 141: 391-396.

Baker, A., & Graham, I. A. (2013). Plant peroxisomes: biochemistry, cell biology and biotechnological applications. Springer Science & Business Media.

Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., & Csiszár, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176: 192-201.

Biswas, M. S., Fukaki, H., Mori, I. C., Nakahara, K., & Mano, J. i. (2019). Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. *The Plant Journal* 100: 536-548.

Boeckx, T., Winters, A. L., Webb, K. J., & Kingston-Smith, A. H. (2015). Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of experimental botany* 66: 3571-3579.

Calderón, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2018). Redox protein thioredoxins: function under salinity, drought and extreme temperature conditions. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*: 123-162.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology* 51: 15-25.

در سلول ممکن است به منظور تولید ROS متفاوت باشد و نقش خاصی در پیام‌رسانی داشته باشد (Hancock and Whiteman, 2016). در مقابل، RSS بر تولید، دریافت و پیام‌رسانی بیشتر ROS و RNS تأثیر گذار است (Kaur et al., 2019b) و این در حالی است که RCS در پایین دست ROS به عنوان واسطه پیام در پاسخ به انواع تنش‌ها عمل می‌کند (Biswas et al., 2019).

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز مطالعات آینده

ROS نقش دوگانه‌ای را در گیاهان ایفا می‌کند که از یک سو محصول جانبی اجتناب‌ناپذیر متابولیسم هوازی است و از سوی دیگر به عنوان نشان‌گر در شرایط تنش عمل می‌کند. آن‌ها نه تنها به عنوان عوامل آسیب در گیاهان عمل می‌کنند، بلکه اجزای مسیر پیام‌رسانی را در شرایط تنش برای جلوگیری از آسیب‌های بیشتر، فعال می‌کنند. سنتز ROS گسترده است و در مکان‌های گوناگونی تولید می‌شود. تولید بیش از حد ROS به تمام مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد کرده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. با این حال، تکامل، گیاهان را به طیف وسیع‌تری از اقدامات دفاعی مجهز کرده است که شامل تغییرات در سطوح مورفولوژیکی، متابولیسمی و ژنتیکی برای سازگاری با شرایط نامطلوب محیطی است. یکی از این موارد، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه است. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، برای کاهش اثرات مخرب ROS و ایجاد تحمل در برابر شرایط تنش‌زای محیطی با یکدیگر همکاری می‌کنند. اگرچه پیشرفت‌های قابل توجهی در سال‌های اخیر حاصل شده است، اما هنوز ابهامات و شکاف‌هایی در درک ما از تشکیل ROS و نحوه تأثیر آن‌ها بر گیاهان وجود دارد که به دلیل نیمه عمر کوتاه و ماهیت بسیار واکنش‌پذیر آن‌ها است. تکنیک‌های جدید می‌توانند ما را در پاسخ به بسیاری از سوالات در زمینه تعاملات مختلف ROS با انواع مولکول‌های پیام‌رسان، ژن‌ها و مواردی از این قبیل یاری رسانند. پیشرفت‌های آینده در زمینه ژنومیکس^۱، همراه با پروتئومیکس^۲ و متابولومیکس^۳، بینش دقیقی را در مورد شبکه ROS و پاسخ‌های مربوط به آن ارائه می‌دهد. شکی نیست که

- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90: 856-867.
- Christou, A., Antoniou, C., Christodoulou, C., Hapeshi, E., Stavrou, I., Michael, C., Fatta-Kassinos, D., & Fotopoulos, V. (2016). Stress-related phenomena and detoxification mechanisms induced by common pharmaceuticals in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *Science of the Total Environment* 557: 652-664.
- Cleland, R. E., & Grace, S. C. (1999). Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS letters* 457: 348-352.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science* 11: 80-88.
- Considine, M. J., María Sandalio, L., & Helen Foyer, C. (2015). Unravelling how plants benefit from ROS and NO reactions, while resisting oxidative stress. *Annals of Botany* 116: 469-473.
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free radical biology and medicine* 95: 27-42.
- Datta, R., Roy, A., & Paul, S. (2023). Phytohormone signaling in osmotic stress response. In "Plant Hormones in Crop Improvement", Vol. 10, pp. 89-108. Elsevier.
- de Pinto, M. C., Locato, V., Paradiso, A., & De Gara, L. (2015). Role of redox homeostasis in thermo-tolerance under a climate change scenario. *Annals of Botany* 116: 487-496.
- Friso, G., & van Wijk, K. J. (2015). Posttranslational protein modifications in plant metabolism. *Plant physiology* 169: 1469-1487.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C., & Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental science and pollution research* 22: 10375-10394.
- Gross, G. G. (1977). Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish. *Phytochemistry* 16: 319-321.
- Guo, W., Xing, Y., Luo, X., Li, F., Ren, M., & Liang, Y. (2023). Reactive oxygen species: a crosslink between plant and human eukaryotic cell systems. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 13052.
- Hancock, J. T., & Whiteman, M. (2016). Hydrogen sulfide signaling: interactions with nitric oxide and reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1365: 5-14.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Nahar, K., Mohsin, S. M., Bhuyan, M. B., Parvin, K., Hawrylak-Nowak, B., & Fujita, M. (2019). Silicon-induced antioxidant defense and methylglyoxal detoxification works coordinately in alleviating nickel toxicity in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology* 28: 261-276.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Mahmud, J., Nahar, K., Mohsin, S., Parvin, K., & Fujita, M. (2018). Interaction of sulfur with phytohormones and signaling molecules in conferring abiotic stress tolerance to plants. *Plant signaling & behavior* 13: e1477905.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., Alharby, H. F., Razafindrabe, B. H., & Fujita, M. (2017). Hydrogen peroxide pretreatment mitigates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L.: an intrinsic study on antioxidant defense and glyoxalase systems. *Frontiers in plant science* 8: 115.
- Hashem, H. A., & Khalil, R. (2023). Insight into the Interaction of Strigolactones, Abscisic Acid, and Reactive Oxygen Species Signals. In "Reactive Oxygen Species: Prospects in Plant Metabolism", pp. 179-211. Springer.
- Heyno, E., Mary, V., Schopfer, P., & Krieger-Liszkay, A. (2011). Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234: 35-45.
- Janicka, M., Reda, M., Napieraj, N., & Kabała, K. (2019). Plant abiotic stress: Function of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Nitric oxide and hydrogen peroxide signaling in higher plants*: 201-219.
- Jeevan Kumar, S., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R., & Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of botany* 116: 663-668.
- Jozefczak, M., Bohler, S., Schat, H., Horemans, N., Guisez, Y., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2015). Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. *Annals of botany* 116: 601-612.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., & Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* 19: 100182.
- Kaur, N., Kaur, J., Grewal, S. K., & Singh, I. (2019a). Effect of heat stress on antioxidative defense system and its amelioration by heat acclimation and salicylic acid pre-treatments in three pigeonpea genotypes. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 32: 106-110.
- Kaur, P., Handa, N., Verma, V., Bakshi, P., Kalia, R., Sareen, S., Nagpal, A., Vig, A. P., Mir, B. A., & Bhardwaj, R. (2019b). Cross talk among reactive oxygen, nitrogen and sulfur during

- abiotic stress in plants. *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms*: 857-871.
- Kawaguchi, R., Suriyasak, C., Matsumoto, R., Sawada, Y., Sakai, Y., Hamaoka, N., Sasaki, K., Yamane, K., Kato, Y., & Bailly, C. (2023). Regulation of reactive oxygen species and phytohormones in osmotic stress tolerance during seed germination in indica rice. *Frontiers in Plant Science* 14: 1186960.
- Kim, M. J., Ciani, S., & Schachtman, D. P. (2010). A peroxidase contributes to ROS production during Arabidopsis root response to potassium deficiency. *Molecular plant* 3: 420-427.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., & Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal* 22: 2623-2633.
- Lane, B. G. (2002). Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB life* 53: 67-75.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K.-J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants* 8: 94.
- Liebthal, M., Maynard, D., & Dietz, K.-J. (2018). Peroxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxidants & redox signaling* 28: 609-624.
- Martinez, C., Montillet, J., Bresson, E., Agnel, J., Dai, G., Daniel, J.-F., Geiger, J.-P., & Nicole, M. (1998). Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1038-1047.
- Meitha, K., Konnerup, D., Colmer, T. D., Considine, J. A., Foyer, C. H., & Considine, M. J. (2015). Spatio-temporal relief from hypoxia and production of reactive oxygen species during bud burst in grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of botany* 116: 703-711.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9: 490-498.
- Morscher, F., Kranner, I., Arc, E., Bailly, C., & Roach, T. (2015). Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Annals of Botany* 116: 669-678.
- Naz, H., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2016). Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. *Pak J Bot* 48: 877-883.
- Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsiftaris, A., & Labrou, N. E. (2017). Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant cell reports* 36: 791-805.
- Noctor, G., De Paepe, R., & Foyer, C. H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in plant science* 12: 125-134.
- Noctor, G., Reichheld, J.-P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In "Seminars in cell & developmental biology", Vol. 80: pp. 3-12. Elsevier.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89: 841-850.
- Ortiz-Espín, A., Locato, V., Camejo, D., Schiermeyer, A., De Gara, L., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2015). Over-expression of Trx o 1 increases the viability of tobacco BY-2 cells under H-O² treatment. *Annals of Botany* 116: 571-582.
- Ozgun, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., & Turkan, I. (2015). The effects of induced production of reactive oxygen species in organelles on endoplasmic reticulum stress and on the unfolded protein response in Arabidopsis. *Annals of Botany* 116: 541-553.
- Palma, J. M., Sevilla, F., Jiménez, A., del Río, L. A., Corpas, F. J., Alvarez de Morales, P., & Camejo, D. M. (2015). Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. *Annals of botany* 116: 627-636.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y. K., Arora, S., & Reddy, M. K. (2017). Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in plant science* 8: 581.
- Pell, E. J., & Steffen, K. L. (1991). Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. In

- "Penn State Symposium in Plant Physiology 1991: Pennsylvania State University". ill.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science* 6: 69.
- Pu, X., Lv, X., Tan, T., Fu, F., Qin, G., & Lin, H. (2015). Roles of mitochondrial energy dissipation systems in plant development and acclimation to stress. *Annals of Botany* 116: 583-600.
- Rai, G. K., Mushtaq, M., Bhat, B. A., Kumar, R. R., Singh, M., & Rai, P. K. (2022). Reactive oxygen species: friend or foe. In "Thermotolerance in Crop Plants", pp. 129-162. Springer.
- Rasmusson, A. G., Geisler, D. A., & Møller, I. M. (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* 8: 47-60.
- Saed-Moucheshi, A., Razi, H., Dadkhodaie, A., Ghodsi, M., & Dastfal, M. (2019). Association of biochemical traits with grain yield in triticale genotypes under normal irrigation and drought stress conditions. *Australian Journal of Crop Science* 13: 272.
- Serrano, I., Romero-Puertas, M. C., Sandalio, L. M., & Olmedilla, A. (2015). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *Journal of experimental botany* 66: 2869-2876.
- Sevilla, F., Jiménez, A., & Lázaro, J. (2015). What do the plant mitochondrial antioxidant and redox systems have to say under salinity, drought, and extreme temperature? *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*: 23-55.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* 2012: 170-187.
- Sonmez, M. C., Ozgur, R., & Uzilday, B. (2023). Reactive oxygen species: connecting eustress, hormesis, and allostasis in plants. *Plant Stress*: 146-164.
- Terzi, R., Kadioglu, A., Kalaycioglu, E., & Saglam, A. (2014). Hydrogen peroxide pretreatment induces osmotic stress tolerance by influencing osmolyte and abscisic acid levels in maize leaves. *Journal of Plant Interactions* 9: 559-565.
- Tiong, S. H., Looi, C. Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W. F., Cheah, S.-C., Mustafa, M. R., & Awang, K. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules* 18: 9770-9784.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552: 335-344.
- Vavilala, S. L., Gawde, K. K., Sinha, M., & D'Souza, J. S. (2015). Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology* 50: 422-438.
- Vishwakarma, A., Tetali, S. D., Selinski, J., Scheibe, R., & Padmasree, K. (2015). Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany* 116: 555-569.
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R., & Formanek, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant and Soil* 342: 31-48.
- Xiaochuang, C., Chunquan, Z., Chu, Z., Junhua, Z., Lianfeng, Z., Lianghuan, W., Qingxu, M., & Qianyu, J. (2018). Nitric oxide synthase-mediated early nitric oxide-burst alleviates drought-induced oxidative damage in ammonium supplied-rice roots. *bioRxiv*: 383323.
- Yan, M., Li, M., Ding, Z., Qiao, F., & Jiang, X. (2023). Plant Hormone Signals Mediate Melatonin Synthesis to Enhance Osmotic Stress Tolerance in Watermelon Cells. *Horticulturae* 9: 927.

ORIGINAL ARTICLE

Germination of Iranian and European barley cultivars under salinity stress and its relationship with seed storage proteins

Ali Maleki¹, Leila Zarei^{*}, Sohbat Bahraminejad, Kianoosh Cheghamirza, Leila Akbari, Fardin Fatahi

Department of Plant Production and Genetics, Razi University, Kermanshah, Iran.

Correspondence

Leila Zarei

Email: lzarei1360@yahoo.com

How to cite

Maleki, A., Zarei, L., Bahraminejad, S., Cheghamirza, K., Akbari, L., & Fatahi, F. (2023). Germination of Iranian and European barley cultivars under salinity stress and its relationship with seed storage proteins. *Crop Biotechnology*, 13(44), 71-83.

ABSTRACT

Germination is one of the most important stages of crop plant growth and proper germination in a wide range of environmental conditions is necessary for plant establishment. In this research, 20 varieties of Iranian barley and 24 varieties of European barley were used in three salinity levels (100, 200 and 300 mM sodium chloride) and a control level (distilled water) in order to investigate the tolerance of salinity stress in the germination stage, as a factorial test based on a completely randomized design with three replications in the mushroom cultivation chamber with controllable temperature and light and sterile conditions in the Nosoud agricultural service center by a protein marker in the biotechnology laboratory of the agriculture and natural resources of Razi university. The results of analysis of variance of traits related to germination showed that the effect of salinity, cultivar and salinity × cultivar were significant for all traits. By increasing the salinity level from 0 to 300 mM, all traits and indices decreased except the average germination time. The germination percentage had a positive and significant correlation with the total seedling length, shoot length, seed germination index, average germination rate and germination rate index. Stepwise regression analysis of different traits with protein markers showed that there were 13 bands associated with different traits. The most significant correlation with traits was related to the 60 kDa marker which was related four indices of seed germ, average germination speed, shoot length and cleoptile length. After the validation studies and confirmation of the results, the identified markers can be used in marker-assisted selection for related traits.

KEYWORDS

Indices related to germination, Stepwise regression, Protein marker.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

جوانه‌زنی ارقام ایرانی و اروپایی جو در شرایط تنش شوری و ارتباط آن با پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

علی ملکی، لیلا زارعی*، صحبت بهرامی‌نژاد، کیانوش چقامیرزا، لیلا اکبری، فردین فتاحی

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

چکیده

جوانه‌زنی و سبزشدن یکی از مهم‌ترین مراحل رشد گیاه زراعی است. لذا جوانه‌زنی مناسب در محدوده وسیعی از شرایط محیطی برای استقرار گیاهچه ضروری است. در این تحقیق، ۲۰ رقم جو ایرانی و ۲۴ رقم جو اروپایی، به منظور بررسی تحمل تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی، در سه سطح شوری (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) و شاهد (آب مقطر) به صورت آزمایش فاکتوریل براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در اتاقک پرورش قارچ با شرایط دما و نور قابل کنترل و شرایط استریل واقع در مرکز خدمات کشاورزی نوسود و هم‌چنین توسط نشانگر پروتئینی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی ارزیابی شدند. نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با جوانه‌زنی نشان داد که اثر شوری، اثر رقم و اثر متقابل شوری × رقم برای سایر صفات مورد بررسی معنی‌دار شد. با افزایش شدت تنش شوری از صفر تا ۳۰۰ میلی‌مولار، کلیه صفات و شاخص‌ها به‌جز میانگین زمان جوانه‌زنی کاهش یافتند. درصد جوانه‌زنی همبستگی مثبت و معنی‌داری با طول کل گیاهچه، طول ساقه‌چه، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی و شاخص سرعت جوانه‌زنی داشت. تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام صفات مختلف با نشانگرهای پروتئینی نشان داد در مجموع ۱۳ نوار مرتبط با صفات مختلف بودند. بیشترین ارتباط معنی‌دار با صفات مربوط به نشانگر ۶۰ کیلودالتون بود که با چهار شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و طول کلتوتیل مرتبط بود. پس از مطالعات اعتبارسنجی و تأیید نتایج، می‌توان از نشانگرهای شناسایی شده در گزینش به کمک نشانگر برای صفات مرتبط استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

شاخص‌های مرتبط با جوانه‌زنی، رگرسیون گام‌به‌گام، نشانگر پروتئینی.

نویسنده مسئول:

لیلا زارعی

رایانامه: lzarei1360@yahoo.com

استناد به این مقاله:

ملکی، علی، زارعی، لیلا، بهرامی‌نژاد، صحبت، چقامیرزا، کیانوش، اکبری، لیلا و فتاحی، فردین (۱۴۰۲). جوانه‌زنی ارقام ایرانی و اروپایی جو در شرایط تنش شوری و ارتباط آن با پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۴)، ۸۳-۷۱.

مقدمه

جو یکی از مهم‌ترین غلات است که بطور گسترده جهت مصرف انسان، دام، تولید مالت و در انواع صنایع غذایی، دارویی و تبدیلی استفاده می‌شود و پس از گندم، برنج و ذرت در مرحله چهارم اهمیت جهانی قرار دارد (Langridge, 2018) از کل جو تولیدی در جهان ۷۰ درصد آن به‌عنوان خوراک دام، ۲۱ درصد در تولید نوشیدنی‌های مختلف و ۶ درصد مستقیماً توسط انسان به‌شکل غذا مصرف می‌گردد (Tricase et al., 2018). در نهایت به‌دلیل مطرح بودن جو به‌عنوان گیاه مدل در مطالعات ژنوم و اهمیت اقتصادی بالا، جو را به یک مدل ایده‌آل در بین غلات بدل کرده است (Mascher et al., 2017).

بیش از ۲۰ درصد از کل زمین‌های زیر کشت جهان و ۳۳ درصد از زمین‌های آبی تحت تأثیر تنش شوری قرار دارند (Rui et al., 2017). شوری یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش تولید و تهدیدی برای کشاورزی پایدار در مناطق خشک و نیمه خشک جهان ارزیابی می‌شود (Ashraf, 2010). در گیاهانی که با بذر تکثیر می‌شوند، مرحله جوانه‌زنی به‌علت تأثیری که بر تراکم گیاه دارد بسیار مهم است، زیرا بقاء و استقرار گیاه وابسته به جوانه‌زدن بذر آن است (جلالی و همکاران، ۲۰۲۰). جوانه‌زنی مرحله‌ای در چرخه زندگی گیاه است که بیشترین تأثیر نامطلوب را از شوری می‌گیرد (Mwando et al., 2020). تحقیقات نشان داده است که مهم‌ترین اثر تنش شوری بر روی جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه اعمال می‌گردد. هرچند شوری بر تمام مراحل رشد گیاهان موثر است، اما حیاتی‌ترین و مهم‌ترین تأثیر را بر جوانه‌زنی گیاهان می‌گذارد. در شوری از طریق کاهش پتانسیل آب و سمیت ناشی از یون‌های خاص مثل سدیم و کلر و کاهش یون‌های مورد نیاز مثل کلسیم و پتاسیم، جوانه‌زنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Cherki et al., 2002; Leidi et al., 1991; Soltani et al., 2005).

تنش شوری باعث کاهش درصد جوانه‌زنی، کاهش سرعت جوانه‌زنی، تأخیر در جوانه‌زنی، کاهش رشد گیاهچه می‌شود. شوری پتانسیل آبی سوبسترا را کاهش داده و جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه را محدود می‌کند. در آزمایشی بر روی ارقام گیاه کینوا، شوری باعث کاهش درصد جوانه‌زنی، کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و کاهش محسوس در وزن تر گیاهچه گردید. با افزایش سطح شوری تجمع مالون دی‌آلدید و فعالیت پراکسیداز و کاتالاز افزایش یافت و به موازات افزایش سطح شوری میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول هم افزایش یافت (Parvez

et al., 2020). در مورد تأثیر شوری بر جوانه‌زنی گندم و جو نتیجه نشان داده است که افزایش شوری باعث تأخیر در جوانه‌زنی و کاهش جوانه‌زنی نهایی به دلیل جذب کم آب و تجمع بالای سدیم و کلر می‌شود (Nawaz et al., 2022). همچنین در آزمایشات متعدد نتایج مشابهی به دست آمده است (Noroozi et al., 2022; Ghaffari Moghaddam et al., 2019).

گزینش از طریق نشانگر، روشی سودمند با کارایی بالا برای انتخاب صفاتی است که روش اندازه‌گیری آنها سخت بوده و یا در مراحل نهایی رشد بیان شده و وراثت‌پذیری آنها پایین است. استفاده از این روش، امکان ارزیابی ژنتیکی قبل از ارزیابی فنوتیپی را در دسترس قرار می‌دهد (Francia et al., 2005).

تکنیک‌های مولکولی امکان بررسی ژنتیکی دقیق‌تر و بررسی عوامل محیطی تنوع را امکان‌پذیر می‌سازد و سبب دقت بیشتر در اندازه‌گیری و ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌گردد. تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE به‌طور وسیعی برای بررسی تنوع پروتئینی دانه در محصولات زراعی استفاده شده است (Al-Huqail et al., 2015; Kakaie et al., 2014; Kakaie and Kahrizi, 2011). این روش همچنین می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مفید و مورد اطمینان برای تشخیص رقم‌های زراعی خاص استفاده گردد (Saiz and Rovira, 2020). به‌کارگیری نشانگرهای پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE برای شناسایی گونه‌ها، واریته‌ها و ارقام زراعی برای مقایسه الگوهای پروتئینی ارقام مختلف گیاهی معتبر، قابل تکرار، سریع و ارزان است. حضور یا عدم حضور و سطح بیان نوارهای پروتئینی، شاخص مهمی برای شناسایی گیاهان است (Dvoracek et al., 2003; Fufa et al., 2005). تشخیص ژنتیکی ژرم پلاسما جو از طریق روش‌های مولکولی و بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی و صفات مورد ارزیابی بسیار مهم است و از نتایج به‌دست آمده می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی جو و گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. انجام برنامه‌های به‌نژادی در بین صفات اندازه‌گیری شده بدون استفاده از نشانگرها مستلزم صرف زمان زیادی است. بنابراین گزینش نشانگرهای مرتبط به صفات یک روش قدرتمند برای شناسایی ژنوتیپ‌های امیدبخش و نیز تشخیص والدین مناسب برای تولید جمعیت نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده شود (Ruan et al., 2009).

هدف از این مطالعه بررسی واکنش ارقام جو ایرانی و اروپایی به تنش شوری در مرحله‌ی جوانه‌زنی و ارتباط صفات اندازه‌گیری

شده با نوارهای پروتئینی حاصل از بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای
بذر از طریق تجزیه رگرسیون گام به گام بود.

تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی و نیز بررسی ارتباط این صفات
با پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده گردید. ارقام ایرانی از
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه و ارقام
اروپایی از انستیتو ژنومیکس و پست ژنومیکس (CRA-GPG)
در شهر فیورنزا ایتالیا تهیه گردید. خصوصیات ارقام مورد
بررسی در جدول ۱ آمده است. ارقام از شماره‌ی ۱ تا ۴۴
کدگذاری شدند.

مواد و روش‌ها

ارقام مورد بررسی

در این تحقیق از ۴۴ رقم جو ایرانی و اروپایی به منظور بررسی
صفات مرتبط با جوانه‌زنی و شناسایی ارقام مقاوم در شرایط

جدول ۱. مشخصات ۴۴ رقم جو ایرانی و اروپایی مورد ارزیابی

کد رقم	نام رقم	منشأ	شجره	تیپ سنبله	تیپ دانه
۱	فجر ۳۰	ایرانی	Lignee131/ Gerbet//Alger- Ceres/ jonoob	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۲	گرگان ۴	ایرانی	Herta	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳	ارس	ایرانی	Arumir	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۴	ماکویی	ایرانی	Star	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۵	زر جو	ایرانی	1/28/9963	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۶	افضل	ایرانی	Chahafzal	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۷	جنوب	ایرانی	Gloria [®] / Copal [®]	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۸	کارون	ایرانی	Strain- 205	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۹	دانمارک	ایرانی	Denmark55	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۰	صحرا	ایرانی	L. B. LRAN/ Una8271// Giorias [®] Com	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۱۱	ماهور	ایرانی	Wi2291/Wi2269//Er/Amp	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۲	یوسف	ایرانی	Lignee527/chn-01//Gustoe/4/Rhn-08/3/DeirAlla 106//DI71/strain 205	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۱۳	نیمروز	ایرانی	Trompillo, CMB74A-432-25B-1Y-IB-IY-OB	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۴	ریحانی	ایرانی	Rihane-03/4Alanda/Lignee527/Arar/3/Centinela/2*	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۱۵	سرارود	ایرانی	Chicm/An57//Albert	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۶	نصرت	ایرانی	Karoon/Kavir	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۱۷	ASTARTIS	اروپایی	(IABO x Arda3) x Amillis	دو ردیفه	بدون پوشینه
۱۸	COMETA	اروپایی	PO202.169 x FO 3358	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۹	EXPLORA	اروپایی	[(Onice\Arma\Onice\Mirco\Jaidor) x (Plaisant\Jaidor\Express)] x Gothic	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۲۰	RODORZ	اروپایی	Baraka x Gothic	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۱	MARTINO	اروپایی	FIOR 3007 x Federal	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۲۲	AQVIRONE	اروپایی	FIOR 5186 x Naturel	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۳	PONENTE	اروپایی	(Vetulio x Arma) x Express	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۲۴	ALCE	اروپایی	(Tipper x Igri3) x [(Tipper x Alpha)x(Sonja x Wb117/18)]	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۵	SIRIO	اروپایی	FIOR 2136 x Arco	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۶	PANAKA	اروپایی	Amillis x Diadem	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۷	PARIGLIA	اروپایی	Airone x Arco	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۸	SFERA	اروپایی	((Katy x HJ54/30) x Igri x Arda) x (Tipper x Sonja) x Amillis	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲۹	ALIMINI	اروپایی	FIOR 2551 x Federal	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۰	ALDEBARAN	اروپایی	Rebelle x Jaidor	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۱	VEGA	اروپایی	Rebelle x FIOR 1341	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۲	ALISEO	اروپایی	(Plaisant x Gerbel) x Express	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۳	NURE	اروپایی	(FIOR 40 x Alpha2) x Baraka	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳۴	AIRONE	اروپایی	Gitane x FIOR 763	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳۵	AIACE	اروپایی	FO 1078 x FO 1638	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳۶	SCIROCCO	اروپایی	FIOR 1000 x Express	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۷	TREBBIA	اروپایی	selection from FiorSynt 3	شش ردیفه	پوشینه‌دار
۳۸	ALFEO	اروپایی	Tipper x Igri	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳۹	ZACINTO	اروپایی	IABO 329 x Arda	دو ردیفه	بدون پوشینه
۴۰	ARDA	اروپایی	Igri x HJ 51-15-3	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۴۱	انصار	ایرانی	نامشخص	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۴۲	نادر	ایرانی	نامشخص	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۴۳	محلی	ایرانی	نامشخص	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۴۴	سرارود ۱	ایرانی	نامشخص	دو ردیفه	پوشینه‌دار

آزمون جوانه‌زنی

به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف شوری بر جوانه‌زنی ارقام جو مورد بررسی و شناسایی صفات مرتبط با جوانه‌زنی در تحمل به شوری، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در لتاقک پرورش قارچ با شرایط دما و نور قابل کنترل و شرایط استریل واقع در مرکز خدمات کشاورزی نوسود اجرا شد. عامل اول شامل سه سطح شوری (۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم) و یک سطح شاهد (آب مقطر) و عامل دوم شامل ۴۴ رقم جو ایرانی و اروپایی بود. از هر رقم جو برای هر واحد آزمایشی ۲۰ عدد بذر سالم جدا و طبق مراحل زیر ضد عفونی گردید:

ابتدا بذر با آب مقطر شسته شدند، سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت-سدیم سه درصد به مدت سه دقیقه ضد عفونی گردیدند. به دنبال آن سه مرتبه شستشو با آب مقطر به مدت یک دقیقه، سه دقیقه و پنج دقیقه انجام شد. سپس به قارچ کش مانکوزب دو در هزار آغشته شدند و کشت در پتری دیش‌های ضد عفونی شده توسط اتوکلاو، در شرایط استریل انجام شد. معیار بذر جوانه‌زده خروج ریشه‌چه به اندازه دو میلی‌متر در نظر گرفته شد (Willenborg *et al.*, 2005). شمارش بذرهای جوانه زده به صورت روزانه در ساعت معینی از روز دوم آغاز و هر ۴۸ ساعت یکبار و به مدت ۱۰ روز انجام شد.

صفات مورد اندازه‌گیری در بررسی جوانه‌زنی تحت

شرایط شوری

صفات مورد مطالعه شامل طول کل گیاه، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول کلوتیل، تعداد ریشه‌چه (همگی برحسب میلی‌متر) در ۱۰ نمونه تصادفی انتخاب شده، اندازه‌گیری شد. همچنین شاخص‌های مرتبط با جوانه‌زنی به شرح ذیل محاسبه گردیدند:

درصد جوانه‌زنی (GP)

$$GP = \frac{Ni}{S} \times 100$$

Ni: تعداد بذرهای جوانه زده تا روز دهم در هر پتری‌دیش
S: کل بذرهای کشت شده در هر پتری‌دیش (Bajji *et al.*, 2002).

میانگین سرعت جوانه‌زنی (AVG)

$$AVG = \frac{\sum Nt}{\sum t} \text{ (روز / تعداد)}$$

$\sum Nt$: کل بذر جوانه زده در زمان T، $\sum t$: مجموع زمان (روز) (Bajji *et al.*, 2002).

ضریب سرعت جوانه‌زنی (CVG)

این پارامتر نشان‌دهنده سرعت و شتاب جوانه زنی بذور است و جهت محاسبه آن از معادله ذیل (باجی و همکاران، ۲۰۰۲) استفاده گردید (t بر حسب روز):

$$C.V.G = \frac{N1+N2+\dots+Nx}{N1T1+\dots+NxTx} \times 100$$

که در این فرمول N1 تا NX تعداد بذرهای جوانه‌زده از روز اول تا آخرین روز آزمایش است.

شاخص سرعت جوانه‌زنی (PI)

$$PI = nd_2(1.0) + nd_4(0.8) + nd_6(0.6) + nd_8(0.4) + nd_{10}(0.2)$$

در این فرمول nd_2 ، nd_4 ، nd_6 ، nd_8 و nd_{10} بذور جوانه زده در روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم می‌باشد (Bouslama and Schapaugh., 1984).

شاخص بنیه بذر (SV)

$$SV = (PL + RL) \times GP$$

SV: بنیه بذر، RL: طول ریشه‌چه، PL: طول ساقه‌چه، GP: درصد جوانه‌زنی (باجی و همکاران، ۲۰۰۲).

میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT)

$$MGT = \frac{\sum (ND)}{\sum N}$$

N: تعداد بذر جوانه زده در طول D روز، D: تعداد روزها از شروع زمان آزمایش جوانه زنی $\sum N$: تعداد کل بذر جوانه زده (Ellis and Roberts., 1981).

استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین، ابتدا بذرهای سالم توسط آسیاب کاملاً خرد شد. سپس مقدار دو میلی‌لیتر بافر استخراج به هر نمونه اضافه و به‌خوبی مخلوط شد و محلول حاصل به میکروتیوپ دو میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه‌ها با کمک همزن مخلوط و سپس در دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد به مدت ده دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. قسمت بالایی به تیوپ جدید منتقل شد و عمل سانتریفیوژ چندین مرتبه تکرار شد (Kakaei and Kahrizi, 2011). سپس پروتئین استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه رازی انجام شد.

بررسی ارتباط بین نوارهای نشانگر پروتئینی و صفات مرتبط با جوانه‌زنی به کمک نرم‌افزار SPSS IBM23 انجام شد. نشانگرها به‌عنوان متغیر مستقل و هر کدام از صفات به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با جوانه‌زنی نشان داد که اثر شوری در مورد همه صفات معنی‌دار شد (جدول ۲). همچنین اثر رقم در همه صفات مورد مطالعه معنی‌دار گردید که بیانگر وجود تنوع زیاد بین ارقام مورد مطالعه بود. اثر متقابل شوری × رقم نیز در همه صفات معنی‌دار شد که نشان می‌دهد ارقام در شرایط سطوح مختلف شوری بصورت متفاوت عمل می‌کنند.

بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر توسط SDS-PAGE
برای انجام الکتروفورز تک بعدی (SDS-PAGE) از کیت و بافرهای آماده (SDS-PAGE) خریداری شده از شرکت کالازیست (شماره کاتالوگ: DSK100) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های اندازه‌گیری شده

پس از بررسی وجود توزیع نرمال در داده‌های اندازه‌گیری شده صفات مرتبط با جوانه‌زنی از طریق آزمون کلموگروف-اسمیرنوف توسط نرم‌افزار SPSS IBM23، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام گردید. ضرایب همبستگی به‌روش پیرسون برآورد شد. الگوهای نواری حاصل به‌صورت وجود یا عدم وجود باند به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. رگرسیون گام به گام (Stepwise) جهت

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات مرتبط با جوانه‌زنی در ارقام مختلف جو زراعی در سطوح مختلف تنش شوری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول کل گیاهچه	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	طول کولتوبیل
رقم	۳	۴۸۰۳۲۰/۱**	۱۵۹۰۵۲/۵**	۸۳۹۳۳/۱۷**	۷۲۱۷/۴۸**
شوری	۴۳	۵۰۴۳**	۲۴۰۵/۸۲**	۱۰۲۳/۷۲**	۳۴۲/۸۹**
رقم × شوری	۱۲۹	۳۳۳۰/۸۱**	۱۳۸۵/۱۳**	۷۴۹/۷۱**	۱۴۰/۲**
خطای آزمایش	۳۵۲	۲/۶۸	۲۳/۸۷	۷/۳۷	۳/۷۵
ضریب تغییرات (%)		۱/۲۹	۶/۶۴	۵/۲۸	۵/۴۶

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

تحت تأثیر تنش شوری می‌تواند ناشی از افت تحرک نشاسته باشد که بر اثر کاسته شدن از فعالیت آمیلاز و محتوای زیاد نشاسته موجود در لپه‌ها یا آندوسپرم گیاهان متأثر از تنش می‌باشد. کاهش فعالیت آمیلاز در بذرهای گیاهان در شرایط تنش باعث می‌شود تشکیل گلوکز از نشاسته کاسته شود که نتیجه آن کاهش ساخته شدن ساکارز بوده و نهایتاً منجر به محدود شدن محور جنین‌زا و محدودیت رشد گیاهچه تحت تنش می‌شود (Mehrabi Oladi et al., 2018).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و شوری نشان داد، بیشترین و کمترین طول کل گیاهچه به ترتیب مربوط به رقم ۱۴ (ریحان) تحت شرایط بدون تنش و رقم ۱۳ (نیمروز) تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری بود (اطلاعات نشان داده نشده است).

نتیجه مقایسات میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) برای صفات اندازه‌گیری شده به شرح ذیل می‌باشد و با توجه به طولانی بودن جداول، اطلاعات جدول نمایش داده نشده است.

طول کل گیاهچه

با افزایش سطح شوری از ۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، طول کل گیاهچه کاهش یافت. میزان کاهش طول کل در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۹/۷۱، ۵۱/۳۶، ۶۷/۲۱ درصد بود. در صورت وقوع تنش شوری و خشکی جوانه‌زنی و متعاقب با آن رشد گیاهچه به شدت کاهش می‌یابد (Ashraf and Rauf, 2001). کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در شرایط شوری ممکن است به خاطر پتانسیل اسمزی پایین و ممانعت از جذب آب، سمیت یون‌های Na یا Cl و یا عدم تعادل عناصر غذایی باشد (Bakhshayeshi Qashlaq et al., 2013). افت رشد گیاهچه

طول ساقه‌چه

با افزایش سطح شوری از ۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، طول ساقه شروع به کاهش نمود. میزان کاهش طول ساقه در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به سطح شاهد (آب مقطر) به ترتیب ۱۲/۸۲، ۵۰/۲۳، ۶۷/۹۹ درصد بود. شوری بر جنبه‌های مختلف رشد اثر گذاشته و موجب کاهش و به تأخیر افتادن جوانه‌زنی، کاهش رشد اندام‌های هوایی و کاهش تولید ماده خشک می‌گردد (Munns, 2002). از دلایل اصلی کاهش طول ساقه‌چه در هنگام مواجهه با تنش، کاسته شدن یا جلوگیری از انتقال مواد غذایی از لپه‌ها به جنین است. همچنین، کاهش جذب آب از طریق بذر در شرایط تنش باعث کم شدن ترشح هورمون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها و نهایتاً اختلال در رشد گیاهچه (ساقه‌چه و ریشه‌چه) می‌شود (Jahanbakhsh et al., 2019).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و رقم نشان داد بیشترین طول ساقه‌چه مربوط به رقم ۱۴ (ریحان) با طول ساقه ۲۱۱/۳۳ میلی‌متر تحت شرایط بدون تنش و کمترین طول ساقه‌چه مربوط به رقم ۱۳ (نیمروز) طول ساقه ۱۰/۵۴ میلی‌متر در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار بود.

طول ریشه‌چه

افزایش سطح شوری از ۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار منجر به کاهش طول ریشه‌چه گردید. میزان کاهش طول ریشه‌چه در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۳۴/۳۲، ۵۱/۰۷، ۶۷/۷۲ درصد بود. تنش شوری مانع رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه شده و در غلظت کم شوری با کاهش رشد و عملکرد و در غلظت‌های بالا با قرار گرفتن در معرض شوری برای مدت طولانی منجر به مرگ گیاه می‌شود (Munns et al., 2006). تحقیقات نشان داده که بیشترین تأثیر تنش شوری بر ریشه گیاه جو در مراحل رویشی بوده و در مراحل اولیه رشد گیاه شوری کاهش شدیدی در رشد و نفوذ ریشه در خاک داشت. همچنین، رشد اندام هوایی در مراحل مختلف و عملکرد جو وابسته به واکنش ریشه در خاک بود (Khazaee et al., 2016).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و شوری نشان داد بیشترین طول ریشه مربوط به رقم ۱۴ (ریحان) با طول ریشه‌چه ۱۴۴/۲۲ میلی‌متر تحت شرایط بدون تنش بود. همچنین کمترین طول ریشه‌چه مربوط به رقم ۱۳ (نیمروز) با طول ریشه ۱۱/۱۳ میلی‌متر تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری بود.

طول کولئوپتیل

با افزایش سطح شوری از ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، طول کولئوپتیل بطور نیز کاهش یافت. میزان تغییر طول کولئوپتیل در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۲۰/۷۵ درصد افزایش، ۸/۱۳ افزایش و ۲۸/۴۴ درصد کاهش بود. در آزمایشی بر روی بررسی میزان جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های مختلف جو در غلظت‌های مختلف شوری، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری بر تعداد ریشه‌چه، طول ریشه‌چه، طول کولئوپتیل و طول اندام هوایی بسیار معنی‌دار بود (Chekani et al., 2012).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و شوری نشان داد، بیشترین طول کولئوپتیل مربوط به ارقام ۱ (فجر ۳۰) با طول کولئوپتیل ۶۰/۰۵ میلی‌متر تحت شرایط بدون تنش بود و کمترین طول کولئوپتیل مربوط به رقم ۱۳ (نیمروز) با طول کولئوپتیل ۸/۵۷ میلی‌متر بود.

تعداد ریشه‌چه

با افزایش سطح شوری از ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، تعداد ریشه‌چه کاهش نشان داد. میزان تغییر تعداد ریشه‌چه در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به سطح شاهد به ترتیب ۱/۹۷ درصد افزایش، ۱/۰۴ درصد کاهش و ۶/۲۵ درصد کاهش بود. همانطور که گزینش و به‌نژادی برای ویژگی‌های مربوط به اندام هوایی باعث افزایش عملکرد شده است، انجام این اقدامات در مورد ریشه نیز می‌تواند سبب افزایش عملکرد شود و در شرایط بحرانی تنش، موفقیت تولید را تضمین نماید (Ganj Ali et al., 2006). گزارش شده که ریشه‌ها در مواجهه با تنش‌های مختلف محیطی، از جمله تنش‌های خشکی و شوری، نقش مهمی در بقا و عملکرد گیاهان زراعی ایفا می‌کنند (Kafi et al., 2017).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح شوری و رقم نشان داد بیشترین تعداد ریشه به ترتیب مربوط به ارقام ۱۴ (ریحان) تحت شرایط بدون تنش با تعداد ریشه ۶/۳۶ بود. کمترین تعداد ریشه در رقم ۱۳ (نیمروز) با تعداد ریشه ۳/۷۷ مشاهده شد.

تجزیه واریانس شاخص‌های مرتبط با صفات جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به جوانه‌زنی نشان داد که اثر شوری در همه شاخص‌ها به جز میانگین زمان جوانه‌زنی معنی‌دار شد. همچنین اثر رقم در مورد تمامی شاخص‌های مورد مطالعه معنی‌دار شد. اثر متقابل شوری × رقم نیز برای تمامی شاخص‌ها

سازوکارهای ژنتیکی درگیر با تحمل گیاه به شوری در ارقام مختلف آن دانست (Mehrabi Oladi *et al.*, 2018).

معنی دار شد (جدول ۳). تفاوت در شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تنش شوری در ارقام مختلف را می‌توان ناشی از تفاوت در

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات جوانه‌زنی در ارقام مختلف جو زراعی در سطوح مختلف تنش شوری

میانگین مربعات				شاخص بنیه بذر	درصد جوانه‌زنی	درجه آزادی	منابع تغییر
شاخص سرعت جوانه‌زنی	ضریب سرعت جوانه‌زنی	میانگین سرعت جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی				
۵۸۰/۸۳**	۰/۰۱۱*	۱۰۴/۰۷**	۰/۸۹ ^{ns}	۰۹E+۳/۷**	۲۱۴/۰۴/۱۷**	۳	شوری
۴۱/۴۵**	۰/۰۱**	۸/۲**	۱/۶۵**	۵۶۹۲۹۰۹۱**	۱۱۹۳/۶**	۴۳	رقم
۱۴/۸۲**	۰/۰۰۸**	۳/۳۳**	۱/۳۸**	۳۱۴۸۷۴۱۴**	۳۷۷/۸۷**	۱۲۹	رقم × شوری
۵/۸	۰/۰۰۴	۱/۳	۰/۷۸	۲۵۷۵۲۳۶	۱۵۱/۷۵	۳۵۲	خطای آزمایش
۲۳/۰۷	۲۲/۳۶	۲۵/۵۵	۲۳/۸۹	۱۸/۹	۱۹/۷۱		ضریب تغییرات (%)

ns, ** و * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

و با در نظر گرفتن روند کاهش‌ی این دو صفت بر اثر افزایش شوری، کاهش این صفت کاملاً مورد انتظار می‌باشد. گادفری و همکاران (Godfery *et al.*, 2007) رسوب نمک در ریشه عامل اصلی خشکی فیزیولوژیکی و کاهش در تقسیم سلولی و در نتیجه کاهش رشد ریشه و بنیه بذر معرفی نموده‌اند (نقل از Alipour *et al.*, 2022).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و شوری نشان داد، بیشترین شاخص بنیه بذر مربوط به رقم ۱۴ (ریحان) تحت شرایط بدون تنش با شاخص بنیه بذر ۲۹۶۴۳/۱۳ بود. همچنین تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری، کمترین شاخص بنیه بذر در رقم ۹ (جو دانمارک) با شاخص بنیه بذر ۴۷۱/۴۵ مشاهده شد.

میانگین زمان جوانه‌زنی

جوانه زنی و سبز شدن یکی از مهمترین مراحل رشد گیاه زراعی است، لذا جوانه زنی مناسب در محدوده وسیعی از شرایط محیطی برای استقرار گیاهچه ضروری است (Brar *et al.*, 1991). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح شوری و رقم نشان داد تحت شرایط بدون تنش، بیشترین و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به ارقام ۳۹ (ZACINTO) و ۱۵ (سراورد) با میانگین زمان جوانه‌زنی ۵/۸۲ و ۲/۶۱ روز بود. همچنین تحت شرایط ۱۰۰ میلی‌مولار شوری، بیشترین و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به ارقام ۴۰ (ARDA) و ۸ (کارون) با میانگین زمان جوانه‌زنی ۵/۱۲ و ۲/۵۸ روز بود. نتایج همچنین نشان داد که تحت شرایط ۲۰۰ میلی‌مولار شوری، بیشترین و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به ارقام ۱۷

درصد جوانه‌زنی

تحمل به شوری در طی این مرحله برای استقرار گیاهان مهم می‌باشد، زیرا که جوانه‌زنی ضعیف و کاهش رشد گیاهچه منجر به استقرار ضعیف و گاهی نابودی محصول می‌شود (Soltani *et al.*, 2005). میزان تغییر درصد جوانه‌زنی در سطوح ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد تغییر قبل ملاحظه‌ای نشان نداد، اما درصد جوانه‌زنی در سطوح ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۱۹/۸۳ درصد و ۳۴/۸۶ درصد کاهش نشان داد. بیشترین حساسیت گیاه به شوری به هنگام جوانه‌زدن و ابتدای رشد گیاهچه مشاهده می‌شود (Chekani *et al.*, 2012). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و رقم نشان داد، بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به رقم ۳۶ (SCIROCCO) با درصد جوانه‌زنی ۹۵ تحت شرایط بدون تنش بود. همچنین کمترین درصد جوانه‌زنی متعلق به رقم ۹ (جو دانمارک) با درصد جوانه‌زنی ۱۱/۶۷ تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری بود.

شاخص بنیه بذر

نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری از ۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، شاخص بنیه بذر کاهش یافت و میزان تغییر شاخص بنیه بذر در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۵/۸۸، ۶۱/۰۳ و ۷۹/۱۸ درصد کاهش بود. عالی‌پور و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه خود بروی تأثیر تنش شوری بر جوانه‌زنی جو تحت تنش شوری، بیان کردند که شاخص بنیه بذر با افزایش سطوح شوری کاهش معنی‌دار نشان داد. شاخص بنیه بذر تحت تأثیر دو صفت درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه قرار دارد

(ASTARTIS) و ۱۰ (صحرا) با میانگین زمان جوانه‌زنی ۵/۷۴ و ۲/۸۶ روز بود. همچنین تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری، بیشترین و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به ارقام ۴۱ (انصار) و ۲۰ (RODORZ) با میانگین زمان جوانه‌زنی ۵/۰۸ و ۲/۰۷ روز بود.

میانگین سرعت جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری از ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. میزان تغییر میانگین سرعت جوانه‌زنی در سطوح ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۲۲/۷۱ درصد و ۳۳/۲۸ درصد کاهش بود. کاهش درصد، سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه چه و ساقه‌چه در پتانسیل‌های حاصل از شوری و خشکی در آزمایشات متعددی گزارش شده است (Jahanbakhsh et al., 2019).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد، بیشترین سرعت جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به رقم ۸ (کارون) با سرعت جوانه‌زنی ۸/۲ تحت شرایط ۱۰۰ میلی‌مولار شوری بود. نتایج همچنین نشان داد که کمترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به رقم ۹ (جودانمارک) با سرعت جوانه‌زنی ۰/۶۵ تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری بود.

ضریب سرعت جوانه‌زنی

نتایج حاکی از این بود که با افزایش سطح شوری از ۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، ضریب سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. میزان تغییر ضریب سرعت جوانه‌زنی در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۲/۳۲ درصد کاهش و ۴/۶۶ درصد افزایش بود. علت کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی را می‌توان به حضور بیش از حد کاتیون‌ها و آنیون‌ها در محیط کشت نسبت داد، طوری که ظرفیت واکنش آن‌ها در اشغال بون‌های موجود در محیط قرار می‌گیرد و بنابراین گیاه قادر به جذب آب نیست و به نوعی با کمبود آب مواجه می‌شود (Jamil et al., 2006).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد بیشترین ضریب سرعت جوانه‌زنی مربوط به رقم ۱۵ (سرارود) با ضریب سرعت جوانه‌زنی ۰/۳۹ تحت شرایط بدون تنش همچنین تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری، بیشترین و کمترین ضریب سرعت جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به ارقام ۲۰ (RODORZ) و ۴۱ (انصار) با ضریب سرعت جوانه‌زنی ۰/۴۸ و ۰/۲ بود.

شاخص سرعت جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری از ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار، شاخص سرعت جوانه‌زنی روند کاهشی نشان داد. میزان تغییر شاخص سرعت جوانه‌زنی در سطوح ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۲۱ درصد و ۳۴/۷ درصد کاهش بود. سطح ۱۰۰ میلی‌مولار شوری با شاهد تفاوت چندانی از لحاظ این صفت نشان نداد.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح شوری و رقم نشان داد، بیشترین شاخص سرعت جوانه‌زنی مربوط به رقم ۳۶ (SCIROCCO) با شاخص سرعت جوانه‌زنی ۱۷/۷۳ تحت شرایط بدون تنش بود. کمترین شاخص سرعت جوانه‌زنی مربوط به رقم ۹ (جودانمارک) با شاخص سرعت جوانه‌زنی ۱/۷۳ تحت شرایط ۳۰۰ میلی‌مولار شوری بود.

تجزیه همبستگی صفات اندازه‌گیری شده

به منظور بررسی رابطه بین صفات اندازه‌گیری شده از تجزیه همبستگی به روش پیرسون استفاده شد (جدول ۴). نتایج نشان که صفت طول کل گیاهچه با صفات طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول کولئوپتیل، درصد جوانه زنی، شاخص بنیه بذر، میانگین زمان جوانه زنی و میانگین سرعت جوانه زنی رابطه مثبت و معنی‌دار داشت.

همچنین صفت طول ساقه‌چه با صفات طول کل گیاهچه، طول ریشه‌چه، طول کولئوپتیل، درصد جوانه زنی، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه زنی و شاخص سرعت جوانه زنی رابطه مثبت و معنی‌دار نشان داد. می‌توان این گونه توضیح داد که در شرایط تنش شوری، به دنبال افزایش سرعت جوانه زنی، ضمن رشد بیشتر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، بنیه بذرهای نیز افزایش خواهد یافت که تأثیر به سزایی در استقرار و رشد اولیه گیاهچه تحت شرایط تنش شوری خواهد داشت (Mostafavi et al., 2012). صفت طول ریشه‌چه با صفات طول کل، طول ساقه، طول کولئوپتیل و شاخص بنیه بذر، رابطه مثبت و معنی‌دار داشت. طول ریشه‌چه می‌تواند یک شاخص مهم جهت پیش‌بینی ظهور گیاهچه در مزرعه و تفاوت بین توده‌های بذر باشد. همچنین طول ریشه‌چه به عنوان شاخص اولیه رشد و نمو و بنیه بذر محسوب می‌شود و تغییرات آن به عنوان شاخصی از بنیه گیاهچه مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد (Bagheri et al., 2016). طول کولئوپتیل با صفات طول کل گیاهچه، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، درصد جوانه زنی، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی و شاخص سرعت

مطالعات مولکولی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام جو ایرانی و اروپایی براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، از روش SDS-PAGE استفاده گردید (شکل ۱). نتایج نشان داد به طور میانگین برای هر رقم جو ۲۴ نوار قابل امتیاز دیده شد. حداکثر تعداد باند مشاهده شده ۲۸ باند و مربوط به رقم ALCE و کمترین تعداد باند ۲۰ باند در رقم TREBBIA بود. اندازه باندها در دامنه‌ای بین ۹ تا ۱۵۵ کیلو دالتون قرار داشتند. در پژوهش سفالیان و همکاران (۱۳۹۳) برای ۱۷ لاین مورد مطالعه جو، ۱۱ نوار پروتئینی گزارش کردند که لاین‌های ۲ و ۱۷ بیشترین (۱۰ نوار) و لاین شماره ۶ و ۱۶ کمترین (یک نوار) تعداد نوار را داشتند. اگرچه باندهای پروتئینی مشترک نیز در داخل لاین‌ها وجود داشت، اما باندهای اختصاصی نیز مشاهده شد. باندهای پروتئینی نه تنها از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن مولکولی، بلکه از لحاظ تراکم و شدت نیز با یکدیگر اختلاف نشان دادند.

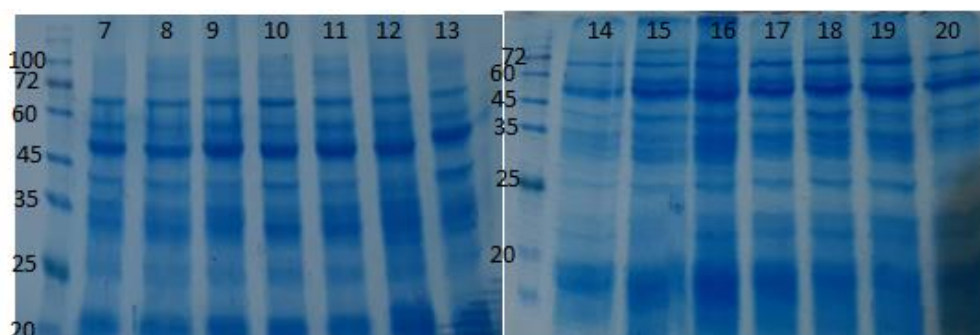
جوانه‌زنی رابطه مثبت و معنی‌دار و با صفت میانگین زمان جوانه‌زنی رابطه منفی و معنی‌دار نشان داد. اهمیت طول کلئوپتیل در سبز شدن سریع، استقرار زودتر و قوی شدن بوته‌ها که باعث حفاظت گیاه از صدمات محیطی مثل سرما و خشکی می‌شود گزارش شده است (Reynolds *et al.*, 2006). درصد جوانه‌زنی همبستگی مثبت و معنی‌داری با طول کل گیاهچه، طول ساقه‌چه، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی و شاخص سرعت جوانه‌زنی داشت.

صفت ضریب سرعت جوانه‌زنی با صفات میانگین زمان جوانه‌زنی رابطه منفی و معنی‌دار داشت. این گونه استنباط می‌شود که به دنبال افزایش میانگین مدت جوانه‌زنی، ضمن کاهش سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی نهایی بذرهای نیز افزایش خواهد یافت که این امری بدیهی به نظر می‌رسد (Mostafavi *et al.*, 2012).

جدول ۴. ماتریس همبستگی پیرسون صفات مرتبط با جوانه‌زنی در ۴۴ رقم جو زراعی

	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۱- طول کل گیاهچه											۱	
۲- طول ساقه‌چه										۰/۹۴**	۱	
۳- طول ریشه‌چه									۰/۶۵**	۰/۸۴**	۱	
۴- طول کلئوپتیل								۰/۵۸**	۰/۵۳**	۰/۵۹**	۰/۱۴	
۵- تعداد ریشه‌چه							۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۱۰	۰/۱۴	۰/۳۷*	
۶- درصد جوانه‌زنی						۰/۰۷	۰/۵۰**	۰/۲۹	۰/۳۵*	۰/۳۷*	۰/۸۸**	
۷- شاخص بنیه بذر					۰/۷۳**	۰/۱۲	۰/۶۴**	۰/۷۳**	۰/۸۵**	۰/۸۸**	۰/۱۱	
۸- میانگین زمان جوانه‌زنی				۰/۲۵	-۰/۲۷	-۰/۰۶	-۰/۳۱*	-۰/۱۸	-۰/۱۲	-۰/۱۱	-۰/۳۲*	
۹- میانگین سرعت جوانه‌زنی			۰/۵۹**	۰/۶۷**	۰/۹۱**	۰/۱۲	۰/۵۳**	۰/۲۷	۰/۳۱*	۰/۳۲*	۰/۰۴	
۱۰- ضریب سرعت جوانه‌زنی		۰/۴۳**	۰/۹۴**	۰/۱۱	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۲۴	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۳۵*	
۱۱- شاخص سرعت جوانه‌زنی	۰/۳۰*	۰/۹۸**	۰/۴۹**	۰/۷۲**	۰/۹۶**	۰/۰۸	۰/۵۳**	۰/۲۹	۰/۳۴*	۰/۳۵*	۰/۳۵*	

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.



شکل ۱. تنوع ارقام جو ایرانی و اروپایی بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر با روش SDS-PAGE

تجزیه رگرسیون گام به گام

به منظور تعیین ارتباط بین داده‌های حاصل از نشانگر پروتئینی با صفات مورد ارزیابی از روش رگرسیون مرحله‌ای گام به گام استفاده شد (جدول ۵)، صفات مورد بررسی به‌عنوان متغیر وابسته و نوارهای مشاهده شده در SDS-PAGE به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شد. در مجموع ۱۳ نوار مرتبط با صفات مختلف شناسایی گردید. برای صفات درصد جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه، دو نوار دارای بیشترین ارتباط معنی‌دار و برای سایر صفات یک نوار مرتبط مشاهده شد. بیشترین ارتباط معنی‌دار با صفات مربوط به نشانگر ۶۰ کیلودالتون بود که با چهار شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و طول کلئوپتیل مرتبط بود. صفات طول ساقه‌چه، طول کلئوپتیل، شاخص بنیه بذر و میانگین سرعت جوانه‌زنی

همبستگی مثبت و معنی‌داری نیز داشتند (جدول ۴). نشانگر ۱۳۰ کیلودالتونی با صفات درصد جوانه‌زنی، میانگین سرعت جوانه‌زنی و شاخص سرعت جوانه‌زنی دارای ارتباط معنی‌دار بود. درصد جوانه‌زنی همبستگی مثبت و معنی‌داری با میانگین سرعت جوانه‌زنی و شاخص سرعت جوانه‌زنی داشت (جدول ۴). نشانگر ۱۴۵ کیلودالتونی نیز با شاخص بنیه بذر، طول گیاهچه و طول ساقه‌چه ارتباط داشت؛ هر سه صفت دارای همبستگی معنی‌داری بودند (جدول ۴). بیشترین درصد ضریب تبیین مربوط به نشانگرهای ۶۰ و ۱۴۵ کیلودالتونی بود که در مجموع ۲۷ درصد تغییرات شاخص بنیه بذر را توجیه نمودند. با توجه به مقدار ضریب رگرسیون، اکثر نشانگرها با صفات مورد بررسی دارای رابط منفی بودند. تنها ارتباط تعداد ریشه‌چه با نشانگر ۲۶ کیلودالتونی مثبت بود.

جدول ۵. جدول تجزیه رگرسیون گام به گام برای بررسی ارتباط صفات ارزیابی شده با نشانگرهای پروتئینی در ارقام جو

نام صفت	نام نشانگر (کیلو دالتون)	ضریب رگرسیون	آماره T	سطح معنی‌داری	R Square Change	R ²	R ² adjusted
درصد جوانه‌زنی	۱۳۰	-۹/۱۳	-۳/۱۸	**	۰/۱۵	۰/۲۲	۰/۱۹
	۷۵	-۷/۶۳	-۲/۰۲	**	۰/۰۷		
شاخص بنیه بذر	۶۰	-۲۷۳۹/۸۲	-۲/۷۳	*	۰/۱۵		
	۱۴۵	-۲۵۷۷	-۲/۵۸	*	۰/۱۱	۰/۲۷	۰/۲۳
میانگین سرعت جوانه‌زنی	۱۳۰	-۰/۶۸	-۲/۵۹	*	۰/۱۴		
	۶۰	-۰/۸۱	-۲/۰۸	*	۰/۰۸	۰/۲۲	۰/۱۸
شاخص سرعت جوانه‌زنی	۱۳۰	-۱/۴۶	-۲/۷۴	*	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۳
	۱۴۵	-۳۴/۵۴	-۲/۴۵	*	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۰
طول کل گیاهچه	۶۰	-۱۷/۰۰	-۲/۵۸	*	۰/۱۳		
	۱۴۵	-۲۲/۸۴	-۲/۵۱	*	۰/۱۱	۰/۲۵	۰/۲۱
طول ریشه‌چه	۴۵	-۷/۲۰	-۲/۴۹	*	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۰
	۶۰	-۶/۶۷	-۲/۵۲	*	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۱
تعداد ریشه‌چه	۲۶	۰/۲۶	۲/۳۸	*	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۰۹

نتیجه‌گیری

اختلاف معنی‌دار بین ارقام در آزمایشات جوانه‌زنی در سطوح مختلف تنش شوری، بیانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در بین ارقام مورد مطالعه بود. افزایش سطوح تنش شوری باعث کاهش در صفات و شاخص‌های مورد مطالعه شد. حساس‌ترین صفات به تنش شوری، به ترتیب طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و طول گیاهچه و حساس‌ترین شاخص، بنیه بذر بود که در حدود ۸۰ درصد تحت تأثیر شوری کاهش یافتند. از صفات طول کل گیاهچه، طول ساقه‌چه، شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت

جوانه‌زنی و شاخص سرعت جوانه‌زنی که همبستگی مثبت و معنی‌داری درصد جوانه‌زنی داشتند می‌توان به‌عنوان شاخص انتخاب غیرمستقیم برای جوانه‌زنی بهتر در شرایط تنش شوری استفاده نمود.

تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام صفات مختلف با نشانگرهای پروتئینی نشان داد بیشترین ارتباط معنی‌دار با صفات مربوط به نشانگر ۶۰ کیلودالتون بود که با چهار شاخص بنیه بذر، میانگین سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و طول کلئوپتیل مرتبط بود.

References

- Ahakupaz, F., Abdi, H., Neyestani, E., Hesami, Ali., Mohammadi, Behrouz., Nader Mahmoudi, K., Abedi-Asl, Gh., Jazayeri Noshabadi, M., Reza., Ahakupaz, F., & Alipour, H. (2021). Genotype-by-environment interaction analysis for grain yield of barley genotypes under dryland conditions and the role of monthly rainfall. *Agricultural Water Management*, 245, 106665.
- Al-Huqail, A. A. & Abdelhaliem, E. (2015). Evaluation of genetic variations in maize seedlings exposed to electric field based on protein and DNA markers. *Biomedical Research International*, 2015, 1-15.
- Alipour, S., Soltani, E., Aalahdadi, I., Ghorbani Javid, M., & Akbari, Gh. (2022). Effect of planting date and salinity on biological stability of *Salicornia iranica* against fine dust stress. *Journal of Crop Production*, 15(1), 187-204. (in Persian).
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*, 28(1), 169-183.
- Ashraf, Muhammad & Rauf, Humera. (2001). Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salts: Growth and ion transport at early growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23, 407-414.
- Bagheri, A, R., & Heydari Sharif Abad, H. (2016). Investigating the effect of drought stress on yield and yield components and ion content in bare barley (*Hordeum sativum* L.). *Ecology of agricultural plants*, 3(7-2), 1-15.
- Bajji, M., Kinet, JM., & Lutts, S. (2002). Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 297-304.
- Bakhshayeshi Qashlaq, M., Kazemi Arbat, H., Sadeghzadeh Ahri, D., & Bakhshayeshi Qashlaq, H. (2013). Physiological effects of salt stress (sodium chloride) on germination and seedling growth of bread wheat genotypes. *Agricultural applied research* (research and development), 27(105), 119-126.
- Bousslama, M., & Schapaugh, W. T. (1984). Stress tolerance in soybean. I: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science*, 24, 933- 937.
- Brar, G. S., Gomez, J. F., McMichael, B. L., Matches, A. G. & Taylor, H. M. (1991). Germination of twenty forage legumes as influenced by temperature. *Agronomy journal*, 83(1), 173-175.
- Chekani, U, al-Binin, Ajam Nowrozi, H., & Faghani, E. (2012). Evaluation of salinity tolerance of different genotypes of barley at the germination stage. *Seed Research* (Seed Science and Technology), 3(3), 69-75.
- Cherki, Gh., Foursy, Ahmed., & Fares, Kh. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47(1), 39-50.
- Dvoracek, V., Curn, V. & Moudry, J. (2003). Suitability of oat-seed storage-protein markers for identification of cultivars in grain and flour samples. *Plant, Soil and Environment*, 49(11), 486-491.
- Ellis, R, A., & Roberts, E. H. (1981). The Quantification of Ageing and Survival in Orthodox Seeds. *Seed Science and Technology*, 9, 373-409.
- Francia, E., Tacconi, G., & Crosatti, C. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 82, 317-342.
- Fufa, H., Baenziger, P. S., Beecher, B. S., Dweikat, I., Graybosch, R. A. & Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145, 133-146.
- Ganj Ali, A., Parsa, H., & Hojjat, S. (2006). Genotypic diversity of root and aerial organ traits of chickpea seedlings (*Cicer arietinum* L.) in hydroponic and greenhouse environments. *Iranian Agricultural Research Journal*, 1, 143-155.
- Ghaffari Moghaddam, S., Sabouri, H., Abdollatif Gholizadeh, H., & Fallahi, A. (2019). Identification of QTLs associated with some (*Hordeum vulgare* L.) traits in a germination stage under salt stress conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 11(3), 74 -94. (in Persian)
- Jahanbakhsh, S., Parmoon, Gh., and Azad, H., & Ghatei, A. (2019). Modeling hydrotime and threshold tolerance to salinity on germination different species Basil (*Ocimum basilicum*). *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 7(2), 119-142.
- Jalali, P., Navabpour, S., Yamchi, A., Soltanloo, H., & Bagherikia, S. (2020). Differential responses of antioxidant system and expression profile of some genes of two rice genotypes in response to salinity stress. *Biologia*, 75(5), 785-793.
- Jamil, M., Bae Lee, D., Yony Jun, K., Ashraf, M., & Chin, S. (2006). Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetable species. *Journal Center Europ. Agriculture*, 7, 273-282.

- Kafi, M., Barzoui, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., & Nabati, J. (2017). Physiology of environmental stress in plants. Mashhad Academic Jihad Publications. 504 pp.
- Kakaei, M., & Kahrizi, D. (2011): Evaluation of seed storage protein patterns of ten wheat varieties using SDS-PAGE. *Biharean Biologist* 5, 116-118.
- Kakaei, M., Mazahery Laghab, H. & Kiani, S. (2014). Genetic variability of endosperm and embryo protein expression in some cultivated barley genotypes. *Biharean Biologist*, 8(1), 42-47.
- Khazaei, H. R., Nezami, A., Saadatian, B., Armand Pische, O., & Pordel, R. (2016). Effect of seed priming on seedling growth of barely (*Hordeumvulgare* L.), under salinity stress in phytozel. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 9(1), 87-97.
- Langridge., P. (2018). Economic and academic importance of barley." In *The barley genome*, pp. 1-10.
- Leidi, E. O., Silberbush, M., & Lips, S. H. (1991). Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. I. Biomass production and mineral composition. *Journal of Plant Nutrition*, 14(3), 235-246.
- Mascher, M., Gundlach, Heidrun, Himmelbach, A., Beier, Se., Twardziok, SO., Wicker, T., & Radchuk, V. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544(7651), 427-433.
- Mehrabi Oladi, A. A., Omid, M., & Fazli Nasab, B. (2018). Investigating the effects of salinity stress on seed germination, seedling growth and callus cultivation of rapeseed genotypes. *Journal of Agricultural Plant Sciences of Iran*, 42(1), 81-90.
- Mostafavi, Kh., Golbashi, M., Izadi Darbandi, A., & Zarrabi, M. (2012). The effect of salinity stress and estimation of genetic parameters of some cultivars and lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) in the stage of seed germination and early seedling growth. *Iran seed science and technology*, 1(2), 117-128.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25, 239-250.
- Munns, R., Richard A. James, & Läuchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1025-1043.
- Mwando, E., Angessa, T, Tolera., Han, Y., Zhou, G., & Chengdao Li. 2021. Quantitative trait loci mapping for vigour and survival traits of barley seedlings after germinating under salinity stress." *Agronomy*, 11(1), 103.
- Nawaz, M., Hassan, M. U., Chattha, M. U., Mahmood, A., Shah, A. N., Hashem, M., Alamri, S., Batool, M., Rasheed, A., Thabit, M. A., Alhathloul, H. A. S., & Qari, S. H. (2022). Trehalose: a promising osmo-protectant against salinity stress-physiological and molecular mechanisms and future prospective. *Molecular Biology Reports*, 49(12), 11255-11271.
- Noroozi, M., Chavoshie, E., & Ghajar Sepanlou, M. (2022). Effect of Irrigation Water Salinity on Relative Yield and Some Morphological and Physiological Characteristics of Sorghum, *Journal of Water Research in Agriculture (Soil and Water Sci.)*, 36(1), 55-74. (in Persian)
- Parvez., Shumaila, Abbas, Ghulam., Shahid, M., Amjad, M., Hussain, M., Ahmad Asad, S., Imran, M., & Asif Naeem, M. (2020). Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 109814.
- Ruan, CJ., Li, H., & Mopper, S. (2009). Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. *Molecular Breeding*, 24, 255.
- Reynolds, M.P., Rebetzke, G., Pellegrineschi, A., & Trethowan, R. (2006). Drought adaptation in wheat. In: Ribaut, J.M. (ed.), *Drought Adaptation in Cereals*. New York, NY, USA: Food Products Press, pp. 401-446.
- Rui, M., Almeida, M., & Serralheiro, P., R. (2017). Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulture*, 3(2), 30.
- Saiz-Rubio, V., & Rovira-Más, F. (2020). From Smart Farming towards Agriculture 5.0: A Review on Crop Data Management. *Agronomy*, 10, 207.
- Soltani, A., Gholipour, M., & Zeinali, E. (2005). Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 55(1-2), 195-200.
- Tricase, C., Lamonaca, E., Ingrao, C., Bacenetti, J., & Lo Giudice, A. (2018). A comparative Life Cycle Assessment between organic and conventional barley cultivation for sustainable agriculture pathways. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3747-3759.
- Willenborg, Ch, J., C. Wildeman, J., K. Miller, A., G. Rossnagel, B., & J. Shirliffe, S. (2005). Oat germination characteristics differ among genotypes, seed sizes, and osmotic potentials, *Crop Science*, 45(2), 2023-2029.