

ORIGINAL ARTICLE

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

Samira Mohammadi*

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

Correspondence

Samira Mohammadi
Email: s.mohamadi@stu.sanru.ac.ir

How to cite

Mohammadi, S. (2023). Identification of *HSP60* family gene in the soybean genome and their functional analysis in response to abiotic stresses. *Crop Biotechnology*, 13(43), 11-28.

ABSTRACT

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

KEYWORDS

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

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی ژن‌های خانواده *HSP60* در گستره ژنوم سویا و بررسی کارکردی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

سمیرا محمدی*

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

چکیده

پروتئین‌های شوک حرارتی ۶۰ کیلو دالتونی (*HSP60*) که به‌عنوان چاپرونین (*cpn60*) نیز شناخته می‌شوند، نقش مهمی در رشد و نمو و پاسخ گیاه به تنش ایفا می‌نمایند. در این مطالعه از طریق ابزارهای بیوانفورماتیکی، ۳۲ ژن *HSP60* در ژنوم سویا شناسایی شد که روی ۱۴ کروموزوم توزیع شده‌اند. بیشتر این پروتئین‌ها آب‌دوست، اسیدی، ناپایدار با شاخص آلیفاتیک بالا هستند. درخت تکاملی، پروتئین‌های *HSP60* سویا، آرابیدوپسیس و برنج را بر مبنای جایگاه سلولی در سه گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. پروتئین‌های واقع در زیرگروه‌های مختلف از نظر ساختار ژنی، موتیف‌های حفاظت‌شده، فاز اینترون و ساختار سه‌بعدی از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار بوده که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های کارکردی آن‌ها در زیرگروه‌های مختلف باشد. چندین عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌گو به تنش‌ها، رشد و نمو و هورمون‌ها در پروموتور ژن‌های *GmHSP60* یافت شد که بیانگر نقش آن‌ها در رشد و نمو و پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی می‌باشد. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (*GO*)، پیش‌بینی کرد که ژن‌های *GmHSP60* در پاسخ به تنش‌های مختلف، مسئول تاخوردگی و تاخوردگی مجدد پروتئین به روشی وابسته به *ATP* هستند. بررسی الگوی ترانسکریپتوم (*RNA-Seq*) نشان داد که بیشتر ژن‌های *GmHSP60* دارای بیان بالایی در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی بودند که بیانگر نقش آنها در افزایش تحمل سویا به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد. به‌طور کلی، این یافته‌ها اطلاعات مفیدی را برای درک بهتر کارکرد ژن‌های *GmHSP60* در سویا فراهم آورده و راه را برای استفاده از ژن‌های خانواده چاپرونین برای دستیابی به تحمل گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی تسهیل می‌نمایند.

واژه‌های کلیدی

پروتئین شوک حرارتی، چاپرونین، ساختار سه‌بعدی، عناصر تنظیمی سیس، هستی‌شناسی ژن.

نویسنده مسئول:

سمیرا محمدی

رایانامه: s.mohamadi@stu.sanru.ac.ir

استناد به این مقاله:

محمدی، سمیرا (۱۴۰۲). شناسایی ژن‌های خانواده *HSP60* در گستره ژنوم سویا و بررسی کارکردی آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۳)، ۱۱-۲۸.

مورد نیاز هستند. آنها در آرکتی‌ها، یوباکتری‌ها و یوکاریوت‌ها وجود داشته و تاخوردگی پروتئین، تاخوردگی مجدد، تجمع و انتقال به کلروپلاست و میتوکندری را تسهیل می‌کنند (Balchin et al., 2011; Hartl et al., 2016). کمپلکس‌های پروتئینی الیگومری ساختارهای دوحلقه‌ای را تشکیل داده و در ترکیب کارکردی پروتئین، تاخوردگی پروتئین‌های دناتوره شده و تازه سنتز شده از طریق هیدرولیز ATP مشارکت می‌کنند (Ditzel et al., 2013; Saibil et al., 1998). تاکنون دو نوع چاپرونین، نوع I در باکتری‌ها (به نام GroEL)، پلاستیدها (HSP60) و میتوکندری‌ها (Hsp60)، و نوع II در آرکتی‌ها و سیتوزول یوکاریوتی (CCT/TriC)، با ساختار کریستالی مشخص و حفاظت‌شده شناسایی شده‌اند (Braig et al., 1994; Ditzel et al., 2001; Hill & Hemmingsen, 1998). در گیاهان، ژنوم هسته‌ای، همولوگ‌های چاپرونین میتوکندری و پلاستییدی را کد می‌کند (Hill & Hemmingsen, 2001; Peng et al., 2011). GroEL در *Escherichia coli* و HSP60 میتوکندری حاوی ۱۴ زیرواحد یکسان بوده، در حالی که HSP60 پلاستید شامل دو زیرواحد مجزای α و β می‌باشد (Martel et al., 1999; Nishio et al., 1990).

HSP60 در کلروپلاست‌های گیاهی و *E. coli*، از آنزیم روبیسکو به عنوان یک پروتئین اصلی تثبیت‌کننده CO₂، محافظت می‌نماید (Hemmingsen et al., 1988; Wang et al., 2004). مشاهده شده است که تاخوردگی زیرواحد‌های RbcL گیاهی توسط چاپرونین HSP60 و همچنین کوفاکتور آن HSP20 انجام می‌شود (Wang et al., 2004; Wilson & Hayer-Hartl, 2018). زمانی که چاپرونین کلروپلاست و فاکتورهای کمکی در سویه *E. coli* بیش‌بیان شد، آنزیم عملکردی گیاهی روبیسکو مشاهده شد (Wilson & Hayer-Hartl, 2018). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که که چاپرونین‌ها با هم همکاری می‌کنند و نقش‌های حیاتی در بیان کارکردی پروتئین‌های کدشده توسط ترانس‌ژن‌ها دارند. علاوه بر این، HSP60 نقش مهمی در متابولیسم RNA، حفاظت و پردازش RNA نیز ایفا می‌نماید (Ruggero et al., 1998).

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

مقدمه

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

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

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

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

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

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

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

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

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

پیشینه پژوهش

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

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

روش‌شناسی پژوهش

شناسایی و آنالیز توالی خانواده ژنی *HSP60* در سویا

ابتدا توالی کامل ژنوم سویا از پایگاه اطلاعاتی Phytozome v13 (www.phytozome.net)، دانلود شد. برای جمع‌آوری توالی‌های آمینواسیدی خانواده ژنی *HSP60* سویا، ابتدا مشخصات HMM دمین اختصاصی Cpn60_TCP1 (PF00118) از پایگاه اطلاعاتی Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)، دانلود و سپس به‌عنوان query در جستجوی BLASTP ($P = 0.001$) در پایگاه اطلاعاتی ژنوم سویا ارسال شد (Finn et al., 2015). تمام توالی‌های پروتئینی به‌دست آمده جهت حضور دمین Cpn60_TCP1 توسط پایگاه InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) مورد بررسی قرار گرفتند (Jones et al., 2014).

در نهایت، پروتئین‌های غیر تکراری و دارای دمین Cpn60_TCP1 با وزن مولکولی بین ۵۰ تا ۶۹ کیلو دالتون به‌عنوان پروتئین‌های خانواده ژنی *HSP60* سویا شناسایی شدند (Haq et al., 2019).

تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی پروتئین‌ها

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

تعیین جایگاه سلولی و موقعیت کروموزومی

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

هم‌ردیفی چندگانه و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

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

تجزیه و تحلیل ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های

حفاظت شده

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

تجزیه و تحلیل توالی پروموتور ژن‌های *GmHSP60*

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

1. Neighbor-Joining
2. Bootstrap
3. Annotation

HSP60 برنج و آرآبیدوپسیس، ۵۲ پروتئین HSP60 در پایگاه اطلاعاتی ژنوم سویا شناسایی شدند. علاوه بر این، بر اساس ابزار InterProScan، ۲۰ توالی انتخابی با وزن مولکولی بیشتر از ۶۹ کیلودالتون و کمتر از ۵۰ کیلودالتون و بدون دمین Cpn60_TCP1، حذف شدند. در نهایت ۳۲ ژن HSP60 شناسایی شده در ژنوم سویا بر اساس جایگاه کروموزومی از GmHSP60-1 تا GmHSP60-32 نام‌گذاری شدند (جدول ۱).

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

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

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

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

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

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

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های GmHSP60 در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

برای تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های HSP60 سویا در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی از داده‌های RNA-Seq (<http://ipf.sustech.edu.cn/pub/soybean/>) استفاده شد. داده‌های بیانی FPKM دریافتی جهت نرمال‌سازی به‌صورت Log2(FPKM+1) تبدیل و نمودار Heatmap توسط نرم‌افزار CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do/>) ترسیم شد (Scherf *et al.*, 2000).

یافته‌های پژوهش

شناسایی اعضای خانواده ژنی HSP60 در سویا

بر مبنای پروفایل HMM دمین حفاظت‌شده Cpn60_TCP1 (PF00118) و الگوریتم BLASTP توالی‌های پروتئینی

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

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

پیش‌بینی شد

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

توسعه ژنومیکس مقایسه‌ای امکان تجزیه و تحلیل خانواده‌های پروتئینی یکسان را در میان گونه‌های مختلف فراهم آورده است. درخت فیلوژنتیکی بر مبنای روش اتصال همسایه (NJ) با استفاده از ۷۰ توالی پروتئینی HSP60 از گونه‌های سویا، آرابیدوپسیس و برنج ترسیم شد تا روابط تکاملی بین این پروتئین‌ها آشکار شود (شکل ۲). درخت تکاملی پروتئین‌ها را بر مبنای جایگاه سلولی در سه گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. بدین صورت که پروتئین‌های HSP60 فعال در هسته یا سیتوپلاسم در گروه اول واقع شدند. در گروه‌های دوم و سوم نیز به ترتیب، پروتئین‌های فعال در میتوکندری و کلروپلاست قرار گرفتند. در این بررسی از ۷۰ پروتئین HSP60، ۳۸ پروتئین در گروه اول، ۱۲ پروتئین در گروه دوم و ۲۰ پروتئین در گروه سوم قرار گرفت. این نحوه گروه‌بندی

مکان‌یابی کروموزومی ژن‌های GmHSP60

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

مطالعه روابط تکاملی و گروه‌بندی خانواده ژنی HSP60

سویا

GmHSP60-8 و *GmHSP60-10* یافت نشد، با این حال، ۱۷ اینترون در ژن‌های *GmHSP60-16*، *GmHSP60-17*، *GmHSP60-30* و *GmHSP60-31* مشاهده شد.

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

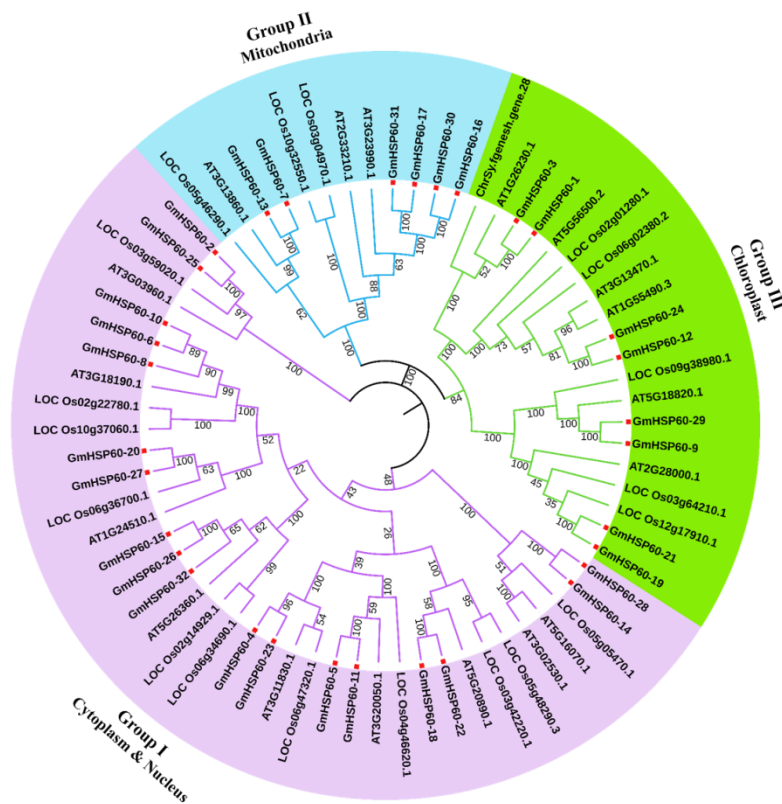
با مطالعات قبلی در ارزن دم روباهی و لفل مطابقت دارد (Singh et al., 2016; et al., 2019).

شناسایی ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *GmHSP60*

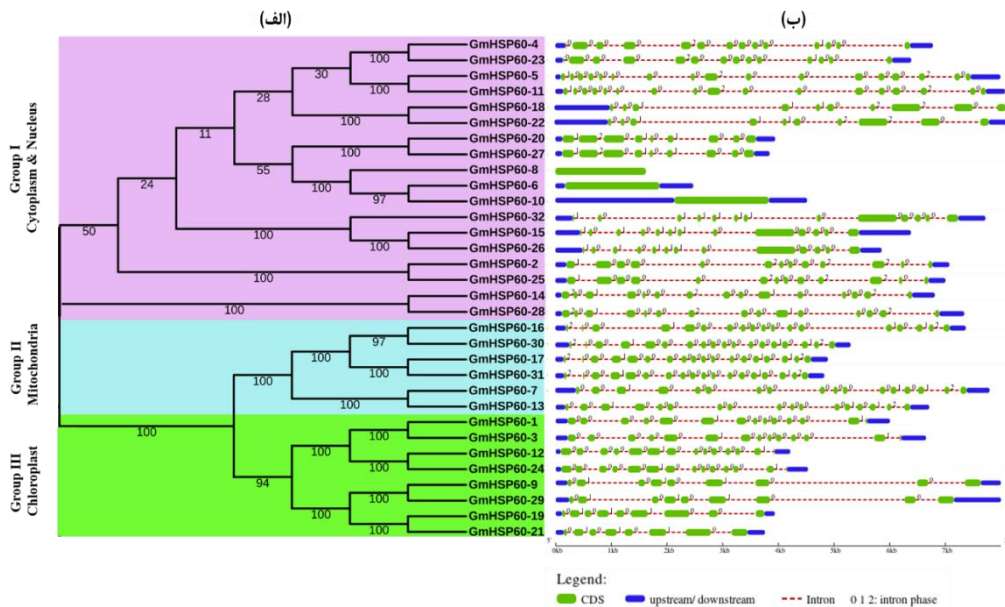
بررسی ساختار ژنی می‌تواند شواهد بیشتری جهت تأیید روابط فیلوژنتیکی ارائه نماید. زیرا وجود یا عدم وجود اینترون فرآیند مهمی در تکامل ژنوم و یک مقیاس تطبیقی برای تکامل گونه می‌باشد (Moore & Purugganan, 2003). در این بررسی، ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *HSP60* در سویا با استفاده از پایگاه GSDS، ترسیم شد.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



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



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

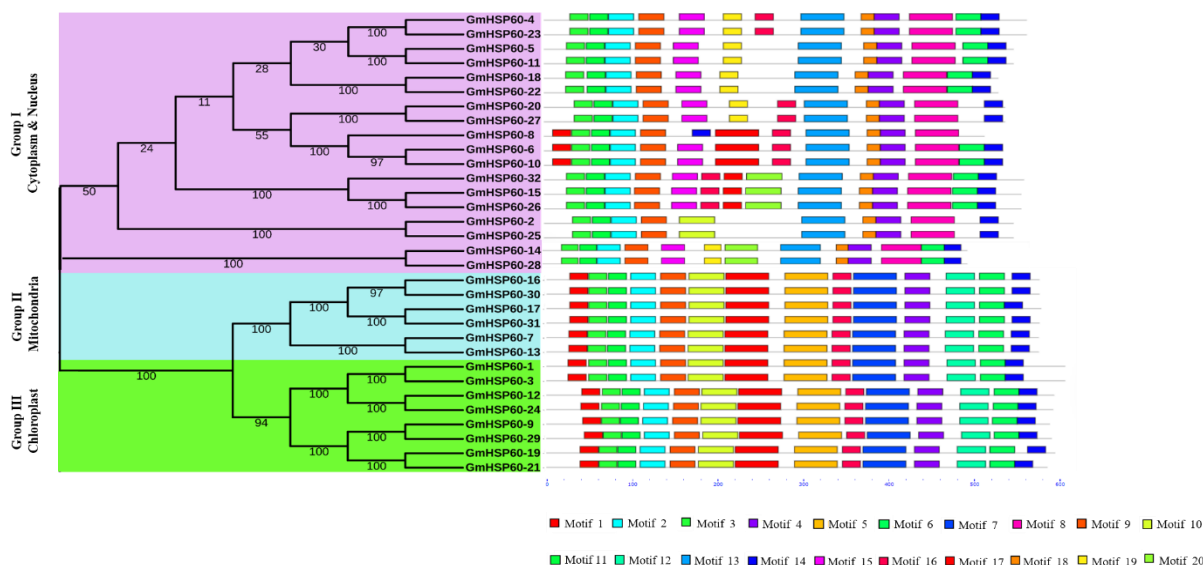


شکل ۳. روابط فیلوژنتیکی و ساختار اگزون - اینترون ژن‌های *HSP60* سویا، (الف) روابط فیلوژنتیکی: با استفاده از توالی آمینواسیدی ۳۲ پروتئین *HSP60* سویا، درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم افزار MEGA 7.0 بر مبنای روش اتصال همسایه با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. (ب) ساختار اگزون - اینترون. جعبه‌های سبز نمایانگر اگزون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

شناسایی شده با استفاده از InterPro، موتیف‌های ۲، ۸ و ۱۳ به‌عنوان دمین Cpn60_TCP1 پیش‌بینی شدند (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نوع، ترتیب و تعداد موتیف‌های گروه‌های دوم و سوم مشابه بودند، اما با پروتئین‌های گروه اول تفاوت داشتند. مطابق با گزارش‌های قبلی، موتیف‌ها به‌طور قابل توجهی در گروه‌های مختلف، حفاظت شده هستند (Singh et al., 2016; Zhang et al., 2015).

شناسایی موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های GmHSP60

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



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

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

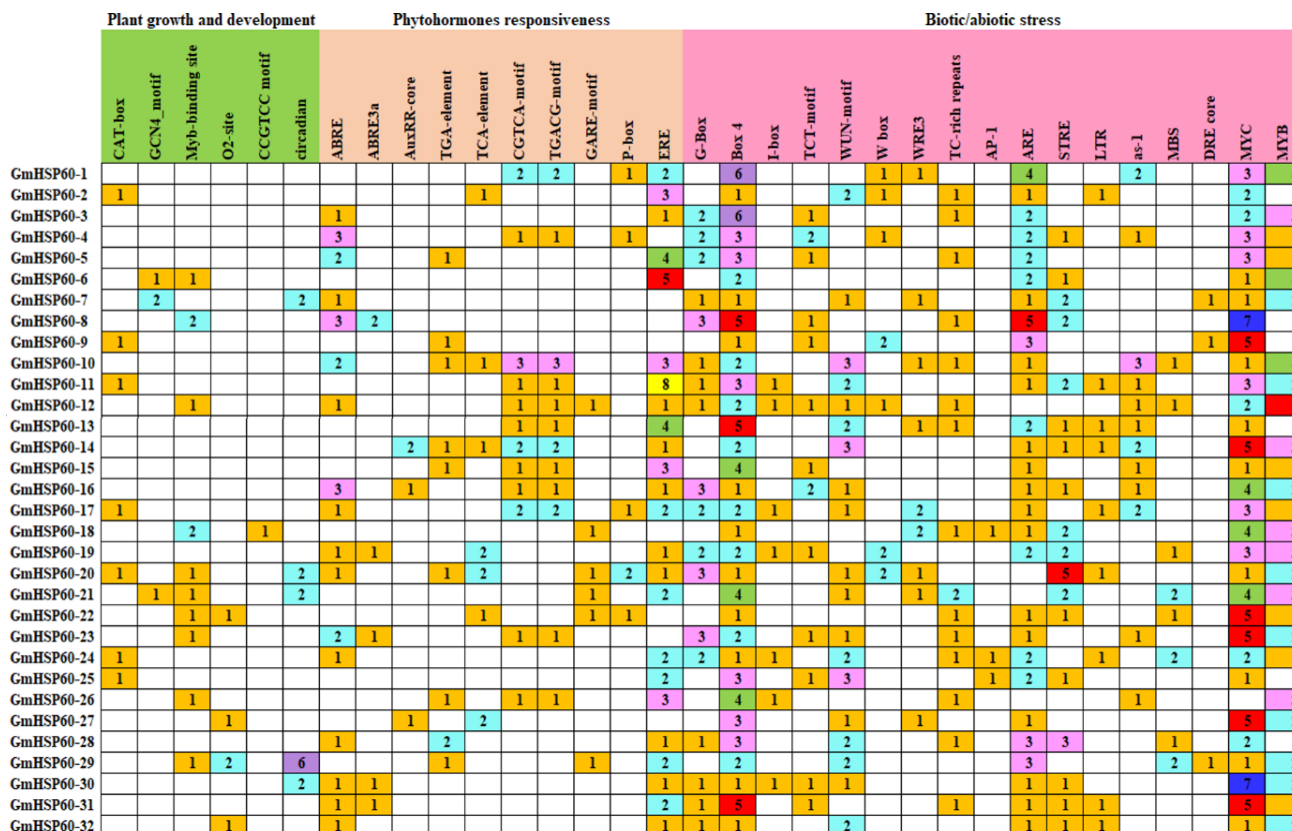
موتیف	طول موتیف	توالی موتیف	E-value	مستندسازی
Motif	Motif length	Motif sequence		Annotation
1	50	DGKSLENELEVVEGMKLDGRGYISPYFVTNQKKQKVELENPKILIHDKKIS	2.2e-344	-
2	29	NPAAKLLVZVAKAQBDEAGDGTITVVVLA	9.4e-338	Cpn60_TCP1 domain
3	21	GVKAVADAVKTTLGPKGMBKM	1.5e-249	-
4	29	ELDEKRRRLHDALNATKAAVEEGIVVGGG	5.4e-286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

تجزیه و تحلیل توالی پروموتور ژن‌های *GmHSP60*

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

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

تجزیه و تحلیل پروموتور ژن‌های خانواده *GmHSP60* نشان داد که آن‌ها ممکن است با تحمل به تنش‌های غیرزیستی و زیستی همراه با سایر عناصر پاسخ‌گو به رشد مرتبط باشند. وجود عناصر پاسخ‌گو به ABA در نواحی پروموتور نشان می‌دهد که این ژن‌ها ممکن است در مسیر وابسته به ABA فعالیت داشته باشند که بیانگر نقش HSP60ها در تنش‌های متعدد می‌باشد (Nagaraju *et al.*, 2021).



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

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

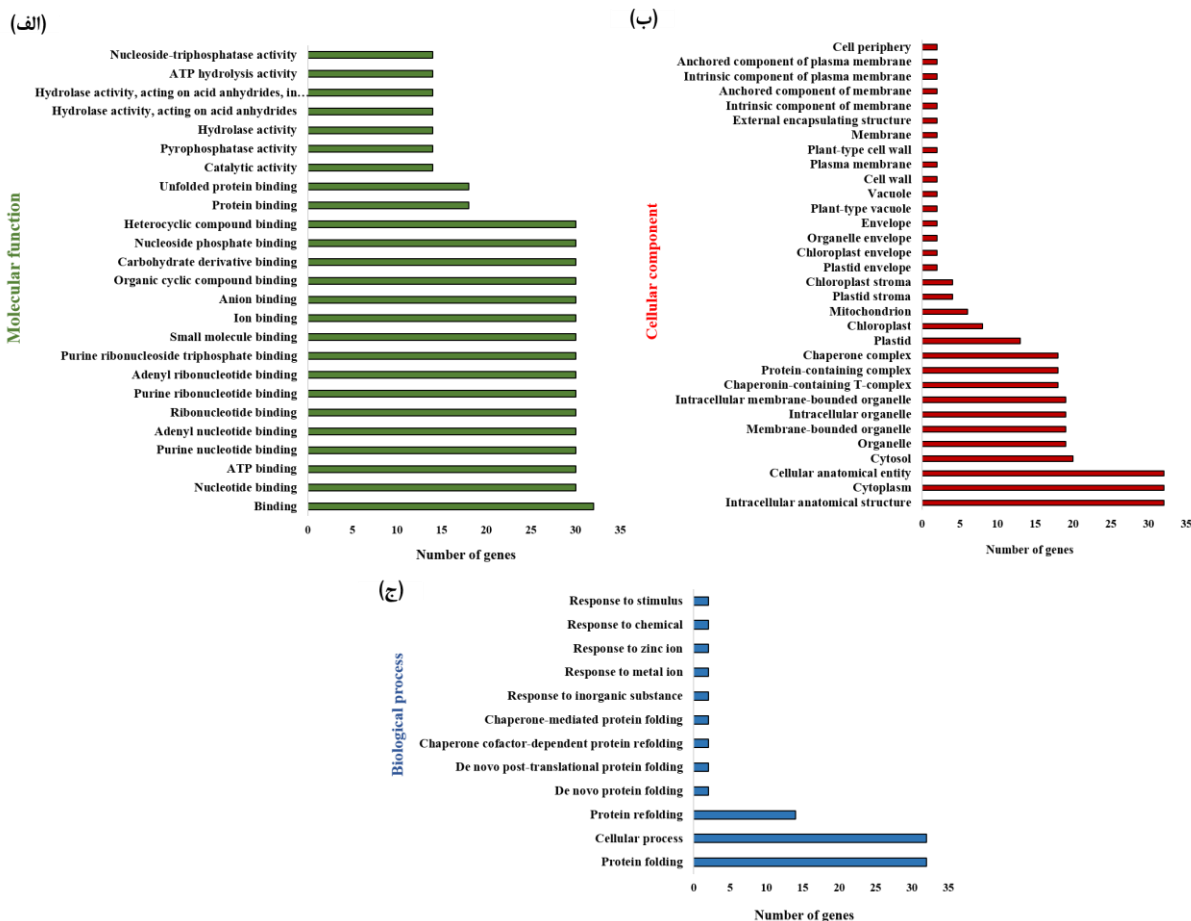
پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های GmHSP60

جهت پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های GmHSP60، مدل‌سازی همولوژی پروتئین با استفاده از برنامه Phyre2 انجام شد. ابتدا یک الگوی مناسب برای هر پروتئین GmHSP60 یافت شد، سپس یک مدل با استفاده از الگو تولید شد. همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است تمام پروتئین‌های مربوط به گروه دوم در درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوی c8pe8F در سطح اطمینان ۱۰۰ درصد مدل‌سازی شدند. بقیه پروتئین‌های مربوط به زیرگروه‌های مختلف نیز شباهت‌های ساختاری نشان دادند. با توجه به اینکه ساختار سه‌بعدی، عملکرد اختصاصی پروتئین را تضمین می‌کند، این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های عملکردی در میان پروتئین‌های GmHSP60 در زیرگروه‌های مختلف باشد.

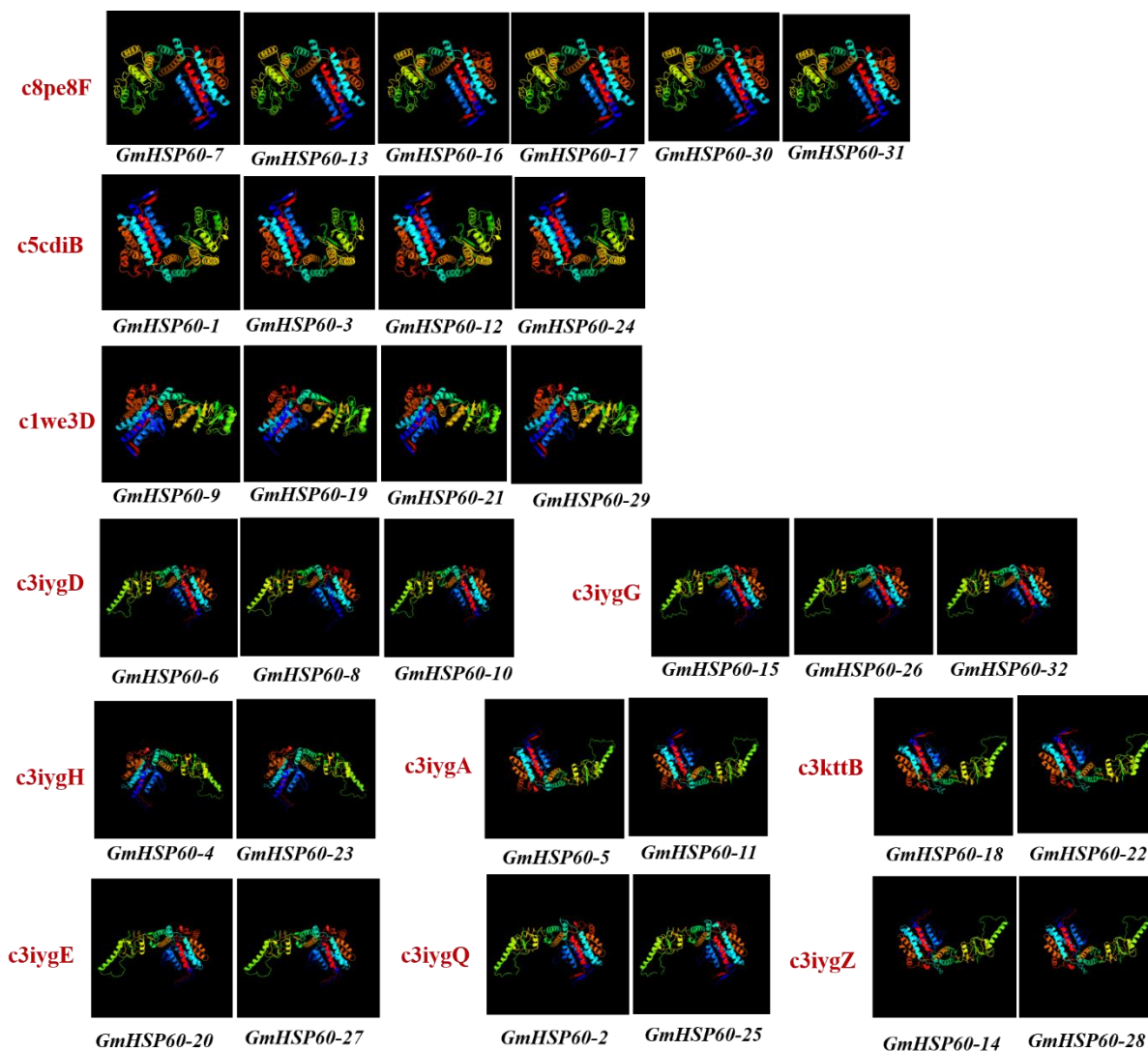
تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) ژن‌های

GmHSP60

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) جهت پیش‌بینی عملکرد مولکولی مورد انتظار (شکل ۶ الف)، موقعیت پروتئین‌های GmHSP60 در اجزای سلولی (شکل ۶ ب)، و مشارکت در فرآیندهای بیولوژیکی احتمالی (شکل ۶ ج) انجام شد. تجزیه و تحلیل GO نشان داد که ژن‌های *GmHSP60* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مسئول تاخوردگی و تاخوردگی مجدد پروتئین از طریق روشی وابسته به ATP می‌باشند. عملکردهای متنوع پروتئین‌های HSP60 از جمله اتصال یونی، اتصال به پروتئین‌های تانخورده و پروتئین‌های غشایی و نقش آن‌ها در پاسخ به محرک‌های محیطی نشان می‌دهد که پروتئین‌های HSP مسئول بازیابی هومئوستازی طبیعی سلول در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی هستند (Abbas et al., 2022).



شکل ۶. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) ژن‌های *HSP60* سویا. تجزیه و تحلیل GO ژن‌های *GmHSP60* با استفاده از نرم‌افزار Blast2GO انجام شد. (الف) عملکرد مولکولی: ستون‌های سبز نشان‌دهنده عملکرد مولکولی مورد انتظار ژن‌های *GmHSP60* هستند. (ب) اجزای سلولی: ستون‌های قرمز نشان‌دهنده اجزای سلولی هستند که در آن‌جا ژن‌های *GmHSP60* بیان می‌شوند. (ج) فرآیندهای بیولوژیکی: ستون‌های آبی نشان‌دهنده فرآیندهای بیولوژیکی هستند که در آن ژن‌های *GmHSP60* نقش خاص خود را ایفا می‌کنند.



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

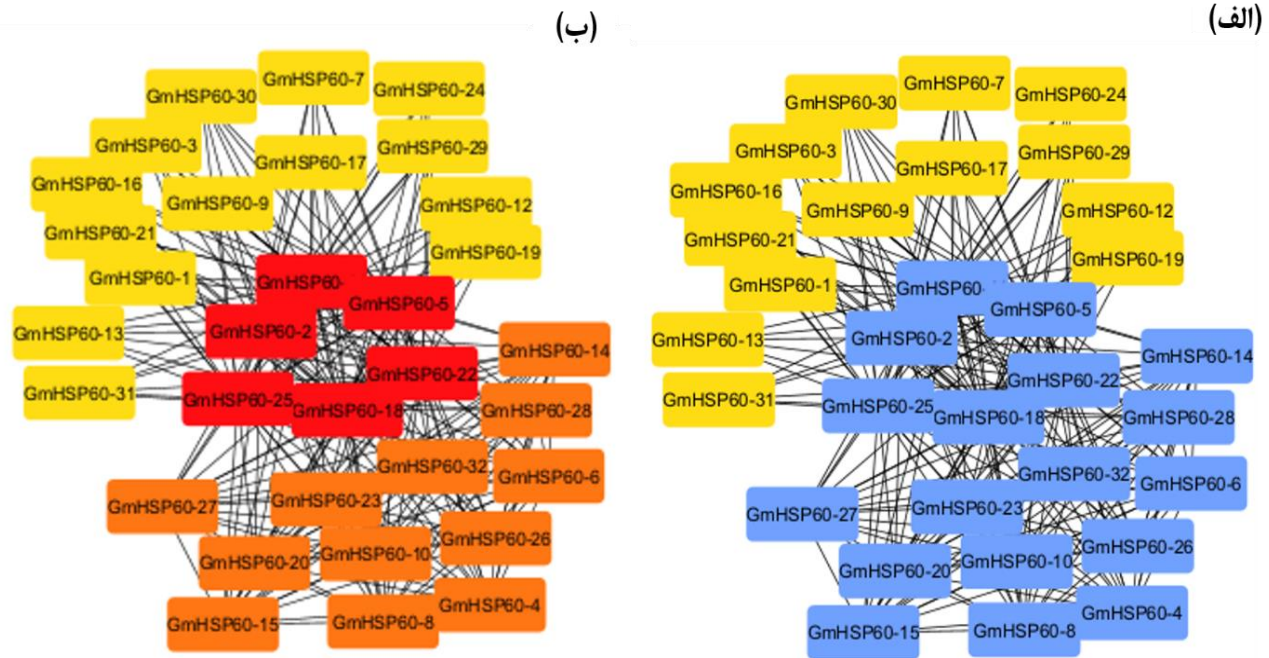
میان ژن‌ها در شبکه است (Saraei *et al.*, 2021). خوشه‌بندی شبکه با استفاده از الگوریتم MCODE نشان داد که این شبکه پروتئینی دارای دو خوشه می‌باشد که خوشه اول و دوم به ترتیب از ۱۸ و ۱۶ پروتئین (گره) تشکیل شده است (شکل ۸ الف). پروتئین‌های GmHSP60-2، GmHSP60-5، GmHSP60-11، GmHSP60-18، GmHSP60-22 و GmHSP60-25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

شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های

GmHSP60

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

1. Node
2. Edge



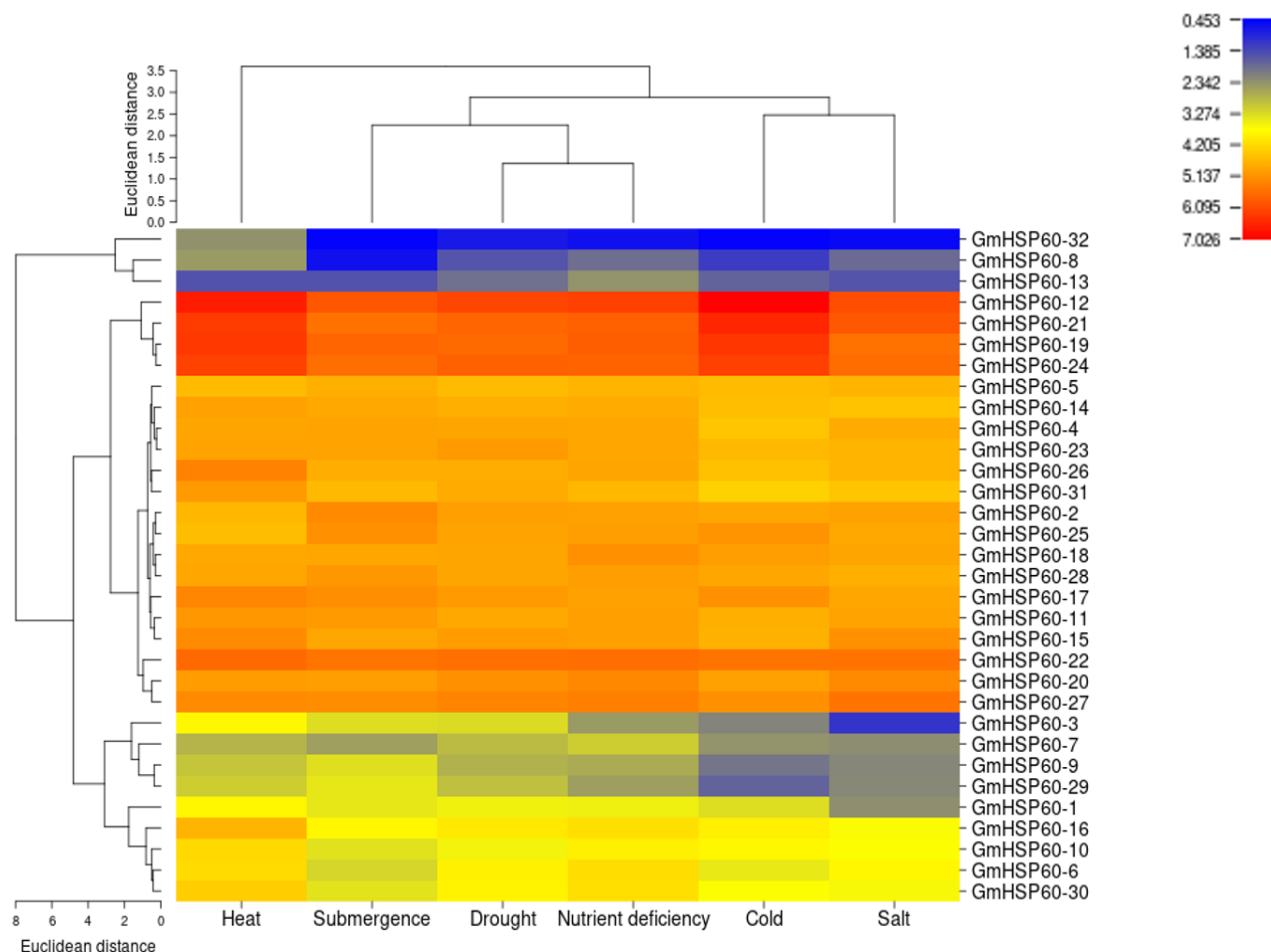
شکل ۸. شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های *HSP60* سویا. شبکه برهم‌کنش پروتئین - پروتئین بین پروتئین‌های *GmHSP60* با استفاده از پایگاه اطلاعاتی STRING استخراج و به کمک نرم‌افزار Cytoscape تجزیه و تحلیل شد. مستطیل‌های رنگی نشان‌دهنده گره‌ها و خطوط نمایانگر یال‌ها هستند. الف) خوشه‌بندی شبکه: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

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

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

الگوی بیان ژن‌های *GmHSP60* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

تجزیه و تحلیل الگوی بیان خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد عملکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao & Chen, 2012). به منظور درک بهتر کارکرد ژن‌های *HSP60* در سویا، الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی شامل شوری، خشکی، سرما، گرما، غرقاب و کمبود مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از داده‌های ترانسکریپتوم سویا، یک نمودار Heatmap در مقیاس $\log_2(\text{FPKM}+1)$ ترسیم شد (شکل ۹). همان‌گونه که در نمودار Heatmap نشان داده شده است، بیشتر ژن‌های *GmHSP60* بیان بالایی در پاسخ به تنش‌های مورد مطالعه نشان داده‌اند که این امر نشان‌دهنده وجود همپوشانی و هماهنگی آن‌ها در پاسخ به شرایط مختلف تنش‌های غیرزیستی است. همچنین این امر می‌تواند بیانگر نقش مهم این ژن‌ها در پاسخ سویا به سرما، گرما، خشکی، شوری، غرقاب و کمبود مواد غذایی باشد. بالاترین بیان مربوط به ژن‌های *GmHSP60-12*، *GmHSP60-19*، *GmHSP60-21* و *GmHSP60-24* تحت



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

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

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

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

References

- Abbas, M., Li, Y., Elbaiomy, R. G., Yan, K., Ragauskas, A. J., Yadav, V., Soaud, S. A., Islam, M. M., Saleem, N., & Noor, Z. (2022). Genome-wide analysis and expression profiling of *SIHsp70* gene family in *Solanum lycopersicum* revealed higher expression of *SIHsp70-11* in roots under Cd²⁺ stress. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(6), 186.
- Azizi, S., & Zare, N. (2022). Genome-wide identification and functional analysis of *lipoxxygenase (LOX)* gene family in some *Fabaceae* species using bioinformatics methods. *Crop Biotechnology*, 11(37), 77-97.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294), aac4354.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, 371(6498), 578-586.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 619832.
- Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., & Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, 93(1), 125-138.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., & Sangrador-Vegas, A. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44, 279-285.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). New York City, New York, United States: Humana Press.
- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2016). The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 114.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86(11-12), 377-384.
- Haq, S. u., Khan, A., Ali, M., Gai, W.-X., Zhang, H. X., Yu, Q. H., Yang, S. B., Wei, A. M., & Gong, Z. H. (2019). Knockdown of *CaHSP60-6* confers enhanced sensitivity to heat stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta*, 250, 2127-2145.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., & Ellis, R. J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 333(6171), 330-334.
- Hill, J. E., & Hemmingsen, S. M. (2001). *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress & Chaperones*, 6(3), 190.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35, 585-587.
- Hsu, Y. W., Juan, C. T., Wang, C. M., & Jauh, G. Y. (2019). Mitochondrial heat shock protein 60s interact with what's this factor 9 to regulate RNA splicing of *ccmFC* and *rpl2*. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 116-125.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hu, W., Hu, G., & Han, B. (2009). Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176(4), 583-590.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., & Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., Schwartz, D. C., Tanaka, T., Wu, J., & Zhou, S. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next

- generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 4.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
- Kim, S.-R., Yang, J.-I., & An, G. (2013). OsCpn60 α 1, encoding the plastid chaperonin 60 α subunit, is essential for folding of rbcL. *Molecules and Cells*, 35, 402-409.
- Kim, T., Samraj, S., Jiménez, J., Gómez, C., Liu, T., & Begcy, K. (2021). Genome-wide identification of heat shock factors and heat shock proteins in response to UV and high intensity light stress in lettuce. *BMC Plant Biology*, 21, 1-20.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., & Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202-D1210.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E. (2012). Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, 1-19.
- Mao, D., & Chen, C. (2012). Colinearity and similar expression pattern of rice DREB1s reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. *PLoS One*, 7(10), e47275.
- Martel, R., Cloney, L. P., Pelcher, L. E., & Hemmingsen, S. M. (1990). Unique composition of plastid chaperonin-60: α and β polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene*, 94(2), 181-187.
- Mohammadi, S., Nematzadeh, G., Najafi Zarrini, H., & Hashemi-petroudi, S. (2022). Abiotic stress-related Cis-elements analysis in promoters of *Aeluropus littoralis* NAC genes. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 35(3), 632-648.
- Moore, R. C., & Purugganan, M. D. (2003). The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15682-15687.
- Nagaraju, M., Kumar, A., Jalaja, N., Rao, D. M., & Kishor, P. (2021). Functional exploration of chaperonin (HSP60/10) family genes and their abiotic stress-induced expression patterns in *Sorghum bicolor*. *Current Genomics*, 22(2), 137-152.
- Nishio, K., Hirohashi, T., & Nakai, M. (1999). Chloroplast chaperonins: evidence for heterogeneous assembly of α and β Cpn60 polypeptides into a chaperonin oligomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2), 584-587.
- Pareek, A., Sopory, S. K., & Bohnert, H. J. (2010). *Abiotic stress adaptation in plants* (Vol. 10). Berlin: Springer Dordrecht.
- Peng, L., Fukao, Y., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., & Shikanai, T. (2011). A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biology*, 9(4), e1001040.
- Prasad, T. K., Hack, E., & Hallberg, R. L. (1990). Function of the maize mitochondrial chaperonin hsp60: specific association between hsp60 and newly synthesized F1-ATPase alpha subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8):3979-3986.
- Prasad, T. K., & Stewart, C. R. (1992). cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Molecular Biology*, 18, 873-885.
- Rao, P. K., Roxas, B. A., & Li, Q. (2008). Determination of global protein turnover in stressed mycobacterium cells using hybrid-linear ion trap-fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(2), 396-406.
- Ruggero, D., Ciammaruconi, A., & Londei, P. (1998). The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing. *The EMBO Journal*, 17(12), 3471-3477.
- Saibil, H. R., Fenton, W. A., Clare, D. K., & Horwich, A. L. (2013). Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *Journal of Molecular Biology*, 425(9), 1476-1487.
- Saraei, F., Amini, K., Haddadi, A., & Larypoor, M. (2021). In search of *Zrt1* gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* under different concentrations of zinc in medium. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(3), 397-411.
- Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., & Andrews, D.T. (2000). A gene

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