

«مقاله پژوهشی»

شناسایی خانواده ژنی پروتئین فسفاتاز 2C (AIPP2C) در گیاه شور دوست آلوروپوس لیتورالیس

سید حمیدرضا هاشمی‌پطرودی^{۱*}، سمیرا محمدی^۱، اسماعیل بخشنده^۱، مارکوس کولمن^۲

۱. پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲. گروه ژنتیک مولکولی، مؤسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی لیبینز (IPK)، آلمان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰)

An investigation of the protein phosphatase 2C (AIPP2C) gene family in halophile plant, *Aeluropus littoralis*

Seyyed Hamidreza Hashemipetroudi^{1*}, Samira Mohammadi¹, Esmail Bakhshandeh¹, Markus Kuhlmann²

1. Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran, P. O. Box 578

2. RG Abiotic Stress Genomics/ RG Heterosis, Department Molecular Genetics, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany

(Received: Jun. 20, 2022 - Accepted: Dec. 11, 2022)

Abstract

From prokaryotes to higher eukaryotes, protein phosphatase 2Cs (PP2Cs) play a critical role in the stress response. For the purpose of identifying the AIPP2C gene and examining its expression, *Aeluropus littoralis*, a salt-secreting halophytic grass belonging to the Poaceae family, was genome-wildly analyzed. Based on the unique structure of the PP2C domain, 34 AIPP2C genes were discovered and classified into ten evolutionary branches based on homology with *Arabidopsis thaliana*. According to exon-intron structural analyses, they possessed a wide range of exon counts. AIPP2Cs shared similar motif organization in the same evolutionary branches based on motif distribution. The motifs ABRE, MBS, DRE, STRE, and LTR, which are related with stress, were discovered in the promoter region of the AIPP2C. AIPP2Cs displayed varied expression patterns in leaf and root tissues in response to salt stress and recovery conditions, according to transcriptome analyses. The AIPP2C4 gene is only expressed in the root tissues. These results expand our understanding of the PP2C gene family and provide valuable information for future research on PP2Cs molecular function and biological processes studies.

Keywords: Abiotic stress, Expression pattern, Halophyte, Salt stress, Signaling.

چکیده

پروتئین فسفاتازهای 2C (PP2Cs)، نقشی کلیدی در بیان ژن‌های پاسخگو به تنش از موجودات پست پروکاریوتی تا یوکاریوت‌های عالی ایفا می‌نمایند. در این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی اعضای خانواده ژنی PP2C به منظور شناسایی و تجزیه و تحلیل ژن‌های اورتولوگ مرتبط با تنش در ژنوم گیاه هالوفیت علفی یک‌لپه *Aeluropus littoralis* انجام شد. در مجموع ۳۴ ژن AIPP2C بر اساس ساختار اختصاصی دمین PP2C، در ژنوم این گیاه شناسایی گردید. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده از پروتئین‌های AIPP2C همراه با پروتئین‌های *Arabidopsis thaliana*، پروتئین‌های AIPP2C و AtPP2C در ده گروه مختلف بر مبنای همولوژی طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های خانواده AIPP2C نشان داد که گروه‌بندی فیلوژنتیکی از تطابق بالایی با الگوی پراکنش موتیف‌های هر گروه داشت. تجزیه و تحلیل ساختار آگزون - اینترون توالی ژنی نشان داد که اعضای این خانواده به لحاظ آرایش و فراوانی آگزون‌ها از الگوی متفاوتی برخوردارند. شناسایی و طبقه‌بندی عناصر تنظیمی سیس در هشت گروه مختلف صورت گرفت که از مهم‌ترین عناصر سیس مرتبط به تنش می‌توان به موتیف‌های ABRE، MBS، DRE، STRE و LTR اشاره نمود. بررسی الگوی ترانسکریپتوم (RNA-Seq) نشان داد که ژن‌های AIPP2C الگوهای بیان متفاوتی در پاسخ به تنش شوری و شرایط بازیابی در دو بافت برگ و ریشه ارائه نمودند که احتمالاً بیانگر مسیرهای تنظیمی متفاوت در بیان این ژن‌هاست. الگوی بیان مشاهده شده ژن AIPP2C4 در بافت ریشه، حاکی از تنظیمات بیان بافت - اختصاصی این ژن می‌باشد. این تحقیق با شناسایی ژن‌های اورتولوگ PP2C مرتبط با تنش در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، اطلاعات ارزشمندی را برای مطالعات عملکرد ژنی و فرایندهای بیولوژیکی ژن‌های PP2C فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش شوری، تنش غیرزنده، پیام‌رسانی، هالوفیت.

مقدمه

گیاهان معمولاً در معرض محرک‌های محیطی مختلفی مانند خشکی خاک، شوری بالای آب و خاک، دمای شدید هوا و ... فلزات سنگین و آلودگی‌های پاتوزنی قرار می‌گیرند که بر رشد و نمو آن‌ها تأثیر منفی می‌گذارد (Van den Broeck *et al.*, 2017). گیاهان برای سازگاری با چنین تنش‌های محیطی، مکانیسم‌های پیام‌دهی متنوعی را تکامل داده‌اند. فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر پروتئین به‌عنوان یکی از رویدادهای کلیدی در انتقال پیام تنش‌های مختلف شناخته شده است. پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها با کاتالیز فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون^۱ پروتئین می‌توانند تعادل وضعیت فسفوریلاسیون یک سلول را در شرایط عادی و نامطلوب حفظ کنند (Li *et al.*, 2018).

از میان انواع گروه‌های پروتئینی ذکرشده، پروتئین فسفاتازهای 2C (PP2Cs) گروهی از سرین/ترئونین فسفاتازهای حفاظت‌شده در طی تکامل هستند که در انتقال پیام تنش در پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی‌تر نقش دارند (Cao *et al.*, 2016). در گیاهان، پروتئین‌های PP2C بزرگترین خانواده از ژن‌های فسفاتاز را تشکیل می‌دهند که ۶۰ تا ۶۵ درصد از تمام فسفوریلازها را شامل می‌شوند (Singh *et al.*, 2010). نسبت بالای ژن‌های PP2C نشان‌دهنده اهمیت و نقش مهم آن‌ها در عملکرد سلول‌های مختلف گیاهی است. PP2C‌ها به‌عنوان یک گروه اصلی از پروتئین فسفاتازها، دفسفوریلاسیون پروتئین‌های سوبسترا را برای تنظیم مسیرهای پیام‌دهی و مشارکت در فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف در گیاهان کاتالیز می‌کنند (Singh *et al.*, 2016). پروتئین‌های PP2C متعلق

به آنزیم‌های مونومری بوده و فعالیت آن‌ها به یون‌های منیزیم و منگنز بستگی دارد. در یوکاریوت‌ها، دامنه کاتالیزوری پروتئین‌های PP2C در هر دو انتهای آمینی و کربوکسیلی قرار دارد. تحقیقات بیشتر نشان داده است که نواحی دامنه کاتالیزوری در پروتئین‌های PP2C یوکاریوتی نسبتاً حفاظت‌شده می‌باشند، در حالی که مناطق دامنه غیرکاتالیزوری دارای توالی‌های آمینواسیدی متنوعی هستند (Schweighofer *et al.*, 2004). مطالعات قبلی نشان داده است که PP2C‌ها نقش‌های مهمی در فرآیندهای مختلف مانند پیام‌دهی ABA، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و همچنین رشد و نمو گیاهان ایفا می‌نمایند (Singh *et al.*, 2016).

گیاه هالوفیت تک‌لپه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus litoralis*)، بومی مناطق کویری ایران و بسیاری از مناطق بیابانی کشورهای آسیایی و آفریقایی بوده که به نظر می‌رسد با توجه به خاستگاه اکولوژیک خود، علاوه بر تحمل به تنش شوری به طیف وسیعی از شرایط سخت محیطی نظیر تنش خشکی متحمل می‌باشد. این گیاه امکان بقا در شرایط تنش شوری کلرید سدیم تا میزان ۱۱۰۰ میلی‌مولار را داشته، در حالی که تجمع یون‌های سدیم و کلر در بافت خشک آن نسبتاً کم می‌باشد (Barhoumi *et al.*, 2007a; Barhoumi *et al.*, 2007b). به دلیل سازگاری و تحمل بالای این گیاه به تنش‌های غیرزنده، جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی این گیاه به‌منظور شناسایی عناصر تنظیمی سیس و ترانس ژن‌های پاسخگو به تنش مورد توجه قرار گرفته است (Arab *et al.*, 2021; Hashemi-petroudi & Mohammadi, 2021; Mohammadi *et al.*, 2021; Mohammadi *et al.*, 2022). با توجه به انتشار توالی ژنومی (WGS) گیاه آلوروپوس لیتورالیس در سال ۲۰۲۲ (Hashemi-Petroudi *et al.*, 2022)، امکان مطالعات ژنومیکس و ژنومیکس عملکردی در گیاهان

شده‌اند (Xue et al., 2008). چندین عضو *PP2C* به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی در سیگنال‌دهی تنش به‌واسطه ABA نقش دارند (González-García et al., 2004; Saez et al., 2003; al., 2003). در گیاهان عالی، ژن‌های *PP2C* به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی مسیر سیگنال‌دهی ABA عمل می‌کنند و تحمل در برابر تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (Haider et al., 2017). پروتئین‌های کدشده توسط این ژن‌ها نقش مهمی در سیگنال‌دهی تنش‌های غیرزیستی مختلف مانند شوری، خشکی، سرما، گرما و ABA دارند (Cao et al., 2016; Khan et al., 2019; Li et al., 2020; Wang et al., 2018; al., 2018). بیش‌بیان ژن *TaPP2C1* گندم در گیاه توتون موجب کاهش حساسیت به ABA و افزایش مقاومت به شوری در گیاهچه‌های تراریخته شده است (Hu et al., 2015). همچنین با انتقال ژن *TaPP2C135* گندم به آرابیدوپسیس و ارزیابی جوانه‌زنی مشاهده شد که بیان اکتوپیک *TaPP2C135* در آرابیدوپسیس منجر به افزایش تحمل گیاهان تراریخت نسبت به تیمار ABA شده است (Yu et al., 2019). بیش‌بیان ژن *ZmPP2C26* ذرت در آرابیدوپسیس نشان داد که این ژن به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی تحمل به تنش خشکی عمل می‌نماید (Zhang et al., 2018). در بررسی دیگری نیز بیان ژن *ZmPP2C26* در شاخه و ریشه ذرت تحت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری مهار شد (Lu et al., 2020). Liang et al. (2020)، ژن *SIPP2C3* گوجه‌فرنگی را به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی پیام‌دهی ABA و رسیدن میوه شناسایی کردند (Liang et al., 2020). در بررسی Wang et al. (2020) مشخص شد که بیشتر ژن‌های *StPP2C* در سیب‌زمینی، الگوهای بیان اختصاصی بافت را نشان داده و برخی از اعضا تحت تنش‌های غیرزیستی بیان متفاوتی را نشان می‌دهند (Wang et al., 2020).

غیرمدل نظیر آلوروپوس جهت شناسایی ژن‌های پاسخگو به تنش، بیش از پیش فراهم گردیده است. در مطالعه حاضر، خانواده ژنی *AIPP2C* از نظر فیلوژنی، تجزیه و تحلیل دمین و موتیف حفاظت شده مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، برای درک بیشتر کارکرد این ژن‌ها، الگوی بیان آن‌ها با استفاده از داده‌های RNA-seq مطالعه شد.

پیشینه پژوهش

مطالعات متعددی نشان داده است که اعضای خانواده *PP2C* نقش‌های مهمی در پاسخ به تنش ایفا می‌نمایند. به‌عنوان مثال، بیش‌بیان ژن *ZmPP2C2* میزان و سرعت جوانه زنی را تحت تنش سرما با افزایش فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی در توتون‌های تراریخته افزایش داد (Hu et al., 2010). ژن *BdPP2CA6* یک زیرگروه از گروه A خانواده *PP2C* در *Brachypodium distachyon* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در مسیرهای پیام‌دهی ABA و تنش در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تراریخته مشاهده شد (Zhang et al., 2017). بررسی دیگری ژن *OsPP108* یک زیرگروه بالقوه از گروه A خانواده *PP2C* در برنج را شناسایی کرده است که پیام‌دهی ABA را به‌طور منفی و پیام‌دهی تنش غیرزیستی را به‌طور مثبت تنظیم می‌کند (Singh et al., 2015). بیشتر اعضای زیرگروه A خانواده *PP2C* آرابیدوپسیس از طریق مسیرهای پیام‌دهی وابسته به ABA در تحمل به تنش مشارکت می‌کنند، اما در مطالعات دیگری مشخص شده است که برخی از اعضای *PP2C* مانند *OsPP18* در برنج می‌توانند تحمل در برابر تنش را از طریق مسیرهای پیام‌دهی مستقل از ABA تنظیم نمایند (You et al., 2014).

در آرابیدوپسیس و برنج، به‌ترتیب ۸۰ و ۷۸ ژن *PP2C* طبقه‌بندی شده در گروه‌های مختلف شناسایی

در آلورپوس، از برنامه WoLF PSORT استفاده گردید (Horton *et al.*, 2007). تعداد اسیدآمین، نقاط ایزوالکتریک (PI)، وزن مولکولی (MW)، شاخص ناپایداری^۲، شاخص آلیفاتیک^۳ و متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY)^۴ پروتئین‌ها نیز با استفاده از ابزار ExPasy-ProtParam برآورد شد (Gasteiger *et al.*, 2005).

شناسایی ساختار اگزون-اینترن

با استفاده از توالی‌های CDS و ژنومی آلورپوس، ساختار اگزون-اینترن ژن‌های PP2C در آلورپوس لیتورالیس با استفاده از برنامه GSDS ترسیم گردید (Hu *et al.*, 2014).

شناسایی موتیف‌ها

به‌منظور شناسایی موتیف‌های حفاظت شده در توالی‌های پروتئینی PP2C آلورپوس، از برنامه MEME استفاده شد (Bailey *et al.*, 2009). پارامترهای مورد استفاده شامل شناسایی حداکثر ۱۲ موتیف، و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمین بود.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

روابط تکاملی میان ژن‌های PP2C گونه‌های آلورپوس و آراییدوپسیس به کمک توالی‌های پروتئینی حاصل از آن‌ها بررسی شد. ابتدا آنالیز هم‌ردیفی چندگانه با نرم‌افزار muscle (Thompson *et al.*, 2003) انجام و در نهایت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0 بر مبنای روش اتصال همسایه (NJ) با آزمون بوت‌استرپ (Felsenstein, 1985) با تکرار ۱۰۰۰ برای اطمینان از صحت گروه‌بندی ترسیم شد (Kumar *et al.*, 2016).

در مجموع، مطالعات فوق بیانگر نقش متنوع ژن‌های PP2C در رشد و نمو گیاه و همچنین پاسخگو به تنش‌های محیطی می‌باشد. از این رو، شناسایی و بررسی عملکردی خانواده ژنی PP2C که پایه‌ای جهت درک مکانیسم مولکولی آن در سیگنال‌دهی تنش است، ضروری به‌نظر می‌رسد.

روش‌شناسی پژوهش

شناسایی اعضای خانواده ژنی PP2C در آلورپوس لیتورالیس

در این مطالعه جهت شناسایی اعضای خانواده ژنی PP2C در آلورپوس لیتورالیس ابتدا توالی‌های پروتئینی ژن‌های خانواده مذکور در برنج به‌عنوان گیاه مدل تک‌لپه و یک محصول مهم از غلات، و آراییدوپسیس به‌عنوان گیاه مدل دولپه، به‌ترتیب از پایگاه‌های اطلاعاتی RGAP (Kawahara *et al.*, 2013) و TAIR (Lamesch *et al.*, 2012) دریافت شدند. سپس، آنالیز جستجوی tBLASTN با استفاده از توالی‌های پروتئینی خانواده PP2C در آراییدوپسیس و برنج به‌عنوان query در توالی ژنوم آلورپوس به‌صورت Local BLAST در نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) با E-value $\leq e-10$ انجام شد. پس از تأیید نهایی حضور دمین اختصاصی این خانواده (PP2C) با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی InterProScan (Jones *et al.*, 2014)، SMART (Finn *et al.*, 2015) و Pfam (Letunic *et al.*, 2014)، توالی‌های CDS پروتئینی و ژنومی این خانواده در گیاه آلورپوس لیتورالیس شناسایی شدند.

تجزیه و تحلیل خصوصیات فیزیکیوشیمیایی پروتئین‌ها

برای پیش‌بینی جایگاه سلولی پروتئین‌های PP2C

2. Instability index

3. Aliphatic index

4. Grand average of hydropathicity

1. Coding sequence

Workbench, (version 6.5.1) بررسی گردید (, 2019). بدین ترتیب که پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها می‌باشد، بیان ژن‌های کاندید، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج حاصله در نمودار Heatmap ترسیم شده توسط نرم‌افزار CIMminer ارائه شد (Scherf *et al.*, 2000).

یافته‌های پژوهش

شناسایی اعضای خانواده ژنی PP2C در گیاه آلوروپوس لیتورالیس جهت شناسایی ژن‌های PP2C بالقوه در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، از الگوریتم tBLASTn توالی‌های پروتئینی خانواده PP2C آرآیدوپسیس و برنج با ژنوم آلوروپوس استفاده شد. بر این اساس پس از تأیید نهایی حضور دمین PP2C با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی InterProScan، Pfam و SMART، ۳۴ توالی پروتئینی شناسایی شد. جهت نام‌گذاری ژن‌های PP2C آلوروپوس، ابتدا پیشوند Al برگرفته از گیاه *A. littoralis* و سپس PP2C و در نهایت شماره‌گذاری بر اساس همولوژی ژن‌ها با آرآیدوپسیس در درخت فیلوژنتیکی انجام گرفت. بر اساس پایگاه اطلاعاتی ProtParam، طول پروتئین‌های این خانواده از ۱۳۷ (AIPP2C35) تا ۹۵۴ اسید آمینه (AIPP2C32) برآورد شد. وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۱۵/۰۷ تا ۱۰۵/۱۹ کیلودالتون بر اساس پایگاه اطلاعاتی ProtParam برآورد شدند. شاخص ایزوالکتریک پروتئین‌های مورد مطالعه متغیر و در محدوده ۴/۲۰ در AIPP2C35 تا ۸/۷۹ در AIPP2C46 و AIPP2C64 برآورد شدند. بیشتر پروتئین‌های AIPP2C (۵۱ از ۶۸) به دلیل شاخص ناپایداری بیشتر از ۴۰، ناپایدار در نظر گرفته می‌شوند. پروتئین‌های AIPP2C حاوی شاخص آلیفاتیک پیش‌بینی شده بین ۶۲/۶۵ تا ۹۵/۸۰ بودند. متوسط

شناسایی عناصر تنظیمی سیس

برای جستجوی عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای خانواده PP2C در آلوروپوس لیتورالیس، ۱۰۰۰ نوکلئوتید بالادست جایگاه شروع ترجمه (ATG) ژن‌ها به‌عنوان توالی پروموتور در نظر گرفته شد. بررسی موتیف‌های تنظیمی سیس در پایگاه تخصصی بررسی پروموتورهای گیاهی و با ابزار PlantCare صورت گرفت (Lescot *et al.*, 2002). شناسایی و طبقه‌بندی این عناصر در هشت گروه شامل عناصر عمومی پروموتورها، عناصر مرتبط با رشد و نمو، عناصر مرتبط با پاسخ هورمونی، عناصر مرتبط با پاسخ نوری، جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی، عناصر مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، عناصر مرتبط با بیان اختصاصی بافت، و عناصر با عملکرد نامشخص صورت گرفت. جهت شناسایی جایگاه موتیف‌ها و پراکنش آن در نواحی پروموتوری از ابزار PlantPAN استفاده شد (Chow *et al.*, 2016).

آنالیز بیان ژن‌ها با استفاده از داده‌های RNA-seq برای آنالیز الگوهای بیان ژن‌های PP2C در آلوروپوس لیتورالیس، از داده‌های RNA-seq استفاده شد (Hashemi-petroudi & Mohammadi, 2020). بدین ترتیب که نمونه‌گیری از دو بافت برگ و ریشه در دو مرحله (۱) یک هفته پس از اعمال تنش ۶۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و (۲) یک هفته پس از شرایط بازیابی (محیط هیدروپونیک فاقد نمک) انجام گرفت. سطح بیان ژن بر اساس مقدار بیان نرمال شده، یعنی خواندن در هر کیلو باز در میلیون (RPKM) برای هر بافت تعریف شد. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به‌صورت Log2FC در شرایط تنش شوری و ریکاوری نسبت به شرایط کنترل با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench

فعالیت سلولی مشارکت داشته باشد و به‌طور کارآمدی در انتخاب جایگاه درست سلولی عمل کند (Zhang *et al.*, 2008). مکان‌یابی پروتئین‌ها مشخص نمود که ۱۶ پروتئین در کلروپلاست، هشت پروتئین در هسته، هشت پروتئین در سیتوپلاسم، یک پروتئین در میتوکندری و یک پروتئین در اسکلت سلولی، فعال هستند (جدول ۱).

هیدروپاتی کل (GRAVY) که نشان‌دهنده شاخص آبگریزی پروتئین است برای تمام پروتئین‌های AIPP2C به‌جز AIPP2C5.2، منفی است. به‌عبارت دیگر تمام پروتئین‌ها به‌جز پروتئین مذکور، آب دوست هستند (جدول ۱). یکی از ویژگی‌های کلیدی در بررسی کارکرد پروتئین‌ها، مکان‌یابی سلولی است که می‌تواند در

جدول ۱. خصوصیات خانواده ژنی *PP2C* در آلورپوس لیتورالیس. تعداد اسیدآمین، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص آلفاتیکی 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.

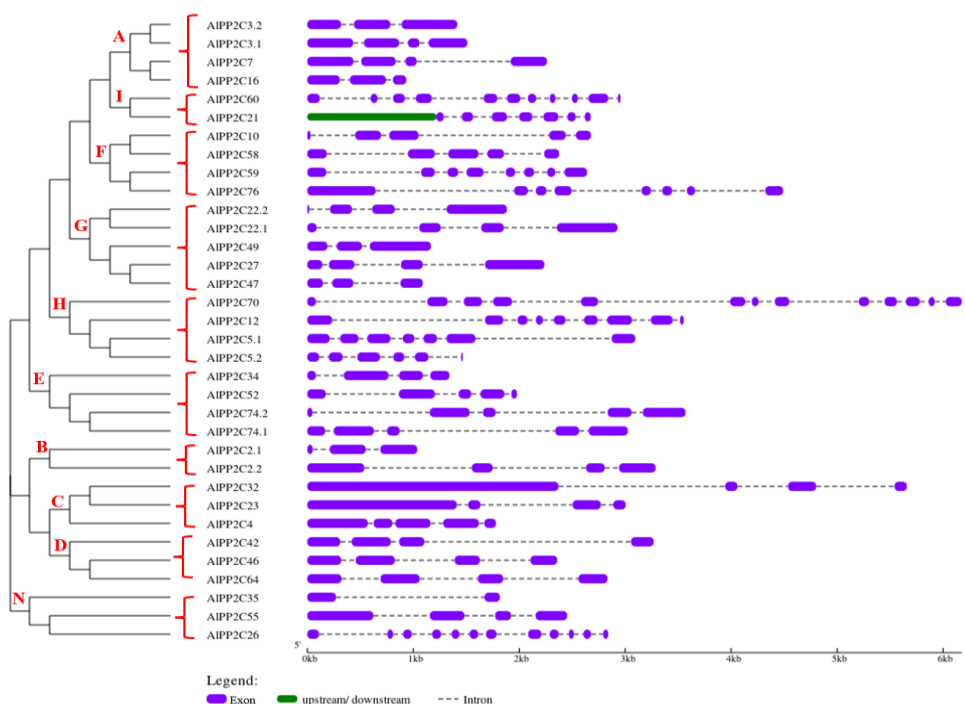
Gene name	شماره ژن Gene ID	طول پروتئین Protein length (aa)	وزن مولکولی Molecular weight (kD)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	شاخص ناپایداری Instability index	شاخص آلفاتیکی Aliphatic index	مؤسوس هیدروپاتی کل GRAVY	جایگاه سلولی Subcellular localization
<i>AIPP2C2.1</i>	Alg9359	245	26.63	5.52	37.38	84.37	-0.294	chlo: 8, cyto: 6
<i>AIPP2C2.2</i>	Alg11862	416	44.11	6.47	53.42	77.21	-0.232	mito: 7, chlo: 5, nucl: 1, vacu: 1
<i>AIPP2C3.1</i>	Alg14174	410	43.76	5.81	61.04	75.00	-0.252	nucl: 6, cyto: 4, chlo: 3, plas: 1
<i>AIPP2C3.2</i>	Alg5949	394	42.04	5.33	67.39	69.85	-0.415	nucl: 5, cyto: 5, chlo: 4
<i>AIPP2C4</i>	Alg2840	506	-	-	54.56	72.69	-0.286	chlo: 5, nucl: 3, cyto: 3, mito: 2, plas: 1
<i>AIPP2C5.1</i>	Alg7528	442	47.29	6.43	38.89	86.00	-0.104	chlo: 9, nucl: 2, cyto: 2, extr: 1
<i>AIPP2C5.2</i>	Alg10714	231	24.60	5.11	33.46	95.80	0.038	cyto: 7, pero: 3, chlo: 2, nucl: 1, mito: 1
<i>AIPP2C7</i>	Alg7949	401	43.15	5.55	44.56	86.63	-0.136	chlo: 4, plas: 3, vacu: 2, E.R.: 2, nucl: 1, cyto: 1, mito: 1
<i>AIPP2C10</i>	Alg10658	281	30.86	6.39	31.01	86.41	-0.288	cyto: 8, chlo: 3, pero: 2, mito: 1
<i>AIPP2C12</i>	Alg10818	422	45.34	5.42	38.87	86.21	-0.228	nucl: 13, cyto: 1
<i>AIPP2C16</i>	Alg10524	256	27.50	5.84	43.68	81.88	-0.230	chlo: 6, cyto: 2, plas: 2, vacu: 2, mito: 1, E.R.: 1
<i>AIPP2C21</i>	Alg3379	247	27.60	8.18	34.46	82.63	-0.315	chlo: 5, cyto: 4, extr: 3, mito: 1, plas: 1
<i>AIPP2C22.1</i>	Alg8809	356	39.11	5.06	41.10	88.43	-0.208	cyto: 11, nucl: 2, chlo: 1
<i>AIPP2C22.2</i>	Alg4516	334	36.65	5.01	59.66	75.96	-0.225	chlo: 7, mito: 6, nucl: 1
<i>AIPP2C23</i>	Alg6655	634	68.28	5.47	55.19	76.14	-0.279	chlo: 6, nucl: 6, mito: 1, pero: 1
<i>AIPP2C26</i>	Alg8637	314	33.84	5.20	41.69	84.84	-0.097	chlo: 14
<i>AIPP2C27</i>	Alg5348	381	40.69	5.72	49.40	92.65	-0.065	cyto: 6.5, cyto_nucl: 5.5, nucl: 3.5, chlo: 1, plas: 1, cysk: 1, E.R._vacu: 1
<i>AIPP2C32</i>	Alg115	954	105.19	5.57	48.66	69.92	-0.538	nucl: 10, cysk: 2, chlo: 1, cyto: 1
<i>AIPP2C34</i>	Alg5563	301	32.88	5.67	53.71	84.92	-0.130	chlo: 5, cyto: 4, plas: 3, nucl: 1, mito: 1
<i>AIPP2C35</i>	Alg4074	137	15.07	4.20	41.88	86.06	-0.116	cyto: 9, chlo: 2, extr: 2, nucl: 1
<i>AIPP2C42</i>	Alg13821	375	41.08	6.87	42.78	91.60	-0.190	chlo: 7, cyto: 3, plas: 3, extr: 1
<i>AIPP2C46</i>	Alg5619	391	43.26	8.79	50.04	90.20	-0.219	chlo: 11, mito: 2, cyto: 1
<i>AIPP2C47</i>	Alg15316	184	19.31	5.79	52.16	73.21	-0.098	cysk: 6, cyto: 4, chlo: 2, nucl: 1, extr: 1
<i>AIPP2C49</i>	Alg713	333	36.92	4.98	56.81	89.37	-0.219	chlo: 9, cyto: 2, extr: 2, nucl: 1
<i>AIPP2C52</i>	Alg15600	302	33.40	5.17	37.45	70.43	-0.433	nucl: 11, cyto: 3
<i>AIPP2C55</i>	Alg3936	464	49.60	8.54	39.22	75.32	-0.241	chlo: 9, nucl: 2, mito: 2, cyto: 1
<i>AIPP2C58</i>	Alg15353	337	37.16	7.70	44.01	84.78	-0.318	chlo: 11, vacu: 2, nucl: 1
<i>AIPP2C59</i>	Alg12454	343	37.00	4.88	36.69	78.51	-0.291	cyto: 3.5, extr: 3, E.R.: 2.5, cyto_nucl: 2.5, E.R._plas: 2.5, mito: 2, plas: 1.5, vacu: 1
<i>AIPP2C60</i>	Alg3122	360	39.71	5.15	34.81	78.31	-0.333	nucl: 5, chlo: 4, cysk: 3, cyto: 1, vacu: 1
<i>AIPP2C64</i>	Alg9193	399	44.25	8.79	46.23	85.04	-0.327	chlo: 10, mito: 3, E.R.: 1
<i>AIPP2C70</i>	Alg2856	553	60.31	6.26	43.56	81.10	-0.337	nucl: 12, chlo: 1, plas: 1
<i>AIPP2C74.1</i>	Alg6151	418	45.66	5.41	33.53	89.09	-0.119	cyto: 9, cysk: 3, nucl: 1, E.R._vacu: 1
<i>AIPP2C74.2</i>	Alg5087	388	41.82	5.28	38.30	83.92	-0.235	cyto: 7, chlo: 2, mito: 2, cysk: 2, nucl: 1
<i>AIPP2C76</i>	Alg13076	483	52.70	4.72	59.18	62.65	-0.749	nucl: 14

chlo: chloroplast, cyto: cytoplasm, mito: mitochondria, nucl: nucleus, vacu: vacuole, plas: plasma membrane, pero: peroxide, cysk: cytoskeleton, E.R.: Endoplasmic Reticulum, extr: extracellular

شناسایی ساختار اگزون - اینترون

بررسی ساختار ژنی می‌تواند شواهد ارزشمندی جهت تأیید درخت فیلوژنتیکی و روابط تکاملی درون خانواده‌های ژنی ارائه کند. زیرا این نوع تنوع ساختاری فرآیند مهمی در تکامل خانواده‌های ژنی به‌شمار می‌رود. در این بررسی مبتنی بر برنامه GSDS، با استفاده از توالی‌های CDS و ژنومی آلوروپوس ساختار ژنی ژن‌های PP2C ترسیم شد. با مقایسه ساختار اگزون-اینترون ژن‌های PP2C آلوروپوس لیتورالیس، مشخص شد که تمام ژن‌ها دارای اینترون بودند. ژن AIPP2C35 با دو اگزون و یک اینترون بلند دارای کمترین تعداد اگزون بود. بیشترین تعداد اگزون متعلق به ژن AIPP2C70 با تعداد ۱۳ اگزون بود (شکل ۱). خصوصیات اگزونی ژن‌های PP2C آلوروپوس لیتورالیس با آراییدوپسیس (دارای ۱ تا ۱۳ اگزون)

(Xue et al., 2008) سازگار بوده، که بیانگر حفاظت‌شدگی بالای ژن‌های AIPP2C و نقش مهم این ژن‌ها در رشد گیاه می‌باشد. همان‌گونه که در آراییدوپسیس و برنج گزارش شده است، در این بررسی نیز بیشتر اعضای یک زیرخانواده، ساختار اگزون-اینترون و تعداد اینترون مشابهی را به اشتراک می‌گذارند. این ساختار اگزون-اینترون حفاظت شده در هر زیرخانواده می‌تواند بیانگر رابطه تکاملی نزدیک آن‌ها و تأییدی بر صحت گروه‌بندی زیرخانواده‌ها باشد (Xue et al., 2008). به‌طور مثال زیرخانواده A (شکل ۱) که از چهار ژن شامل AIPP2C3.1، AIPP2C3.2، AIPP2C7 و AIPP2C16 تشکیل شده‌اند از همولوژی بالایی با گروه ژن‌های PP2C مرتبط با تنش‌های غیرزنده در دو گیاه مدل برنج و آراییدوپسیس برخوردار هستند (Xue et al., 2008).



شکل ۱. روابط فیلوژنتیکی و ساختار ژنی ژن‌های AIPP2C (الف) درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 7.0 با استفاده از توالی آمینواسیدی پروتئین‌های AIPP2C بر مبنای روش اتصال همسایه بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. (ب) ساختار اگزون - اینترونی ژن‌های AIPP2C، جعبه‌های بنفش نمایانگر اگزون و خطوط تیره نمایانگر اینترون‌ها هستند. مناطق ترجمه نشده (UTR) با جعبه‌های سبز نشان داده شده‌اند. اندازه اگزون و اینترون را می‌توان با استفاده از مقیاس موجود در پایین تخمین زد. نام زیرگروه‌ها (A, B, C, D, E, F, G, H, I, N) نیز با فونت قرمز مشخص شده است.

موتیف‌های ۱، ۳ و ۵ به‌عنوان دمین PP2C پیش‌بینی شدند (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیشتر اعضای مرتبط به هم در درخت فیلوژنتیکی، ترکیب موتیف مشترکی را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های عملکردی در میان پروتئین‌های PP2C در همان زیرشاخه باشد. چهار توالی آمینواسیدی حفاظت‌شده ([DGXXG]، [DG]، [GXXDN] و [XXD]) که به تناسب منگنز/ منیزیم کمک می‌کنند (Bork *et al.*, 1996)، به‌ترتیب در موتیف‌های ۱، ۲، ۶ و ۹ شناسایی شدند (جدول ۲).

به‌نظر می‌رسد با توجه به رابطه قوی ارتولوژی بین ژن‌های این زیرگروه با ژن‌های تحمل به تنش در برنج و آراییدوپسیس، بررسی بیان اعضای این زیرگروه تحت تنش‌های مختلف غیرزنده جهت تأیید کارکرد این ژن‌ها می‌تواند بسیار راهگشا باشد.

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده

در این بررسی، ۱۲ موتیف حفاظت‌شده در میان پروتئین‌های خانواده AIPP2C با استفاده از نرم افزار MEME شناسایی شد (شکل ۲). با مستندسازی موتیف‌های شناسایی شده با استفاده از InterPro،



شکل ۲. موتیف‌های حفاظت‌شده توالی‌های پروتئینی AIPP2C. موتیف‌های شناسایی شده با شماره‌های ۱ تا ۱۲ با رنگ‌های مختلف و اندازه موتیف در پایین شکل، E -value و اسامی اعضای AIPP2C در سمت چپ شکل نشان داده شده است.

جدول ۲. توالی موتیف‌های شناسایی شده در پروتئین‌های AIPP2C توسط برنامه MEME.

موتیف	طول موتیف	توالی موتیف	مستندسازی
Motif	Motif length	Motif sequence	Annotation
1	29	PEVKVHRLTEDEFLIJASDGLWDVLSNZ	PP2C domain
2	15	SFFGVFDGHGGPDAA	-
3	21	VANVGDSRAVLGRGGEAIALS	PP2C domain
4	17	GGLAVSRAIGDVYLKEY	-
5	21	DHKPNRPDERERIEASGGRVI	PP2C domain
6	19	EAJRRGSHDBITVIVVDLK	-
7	11	GSTAVTAVIQG	-
8	37	YVKKNLFKNIVEDPEFPKNLEKAIRSAFLKTDSAFAD	-
9	27	PVIRSGSFSDIGRRAYMEDAHVCPBL	-
10	41	EAVEIVNSTPRGGPARRLVKEALQEAARKREMRYSDLIKID	-
11	38	QLSSEHNASQEA VRKELQSQHPDDPHIVVLKHNVWRVK	-
12	39	QDGLLWYKDAGQCVTGDFSMVAVQANQLLEDQCQIESGP	-

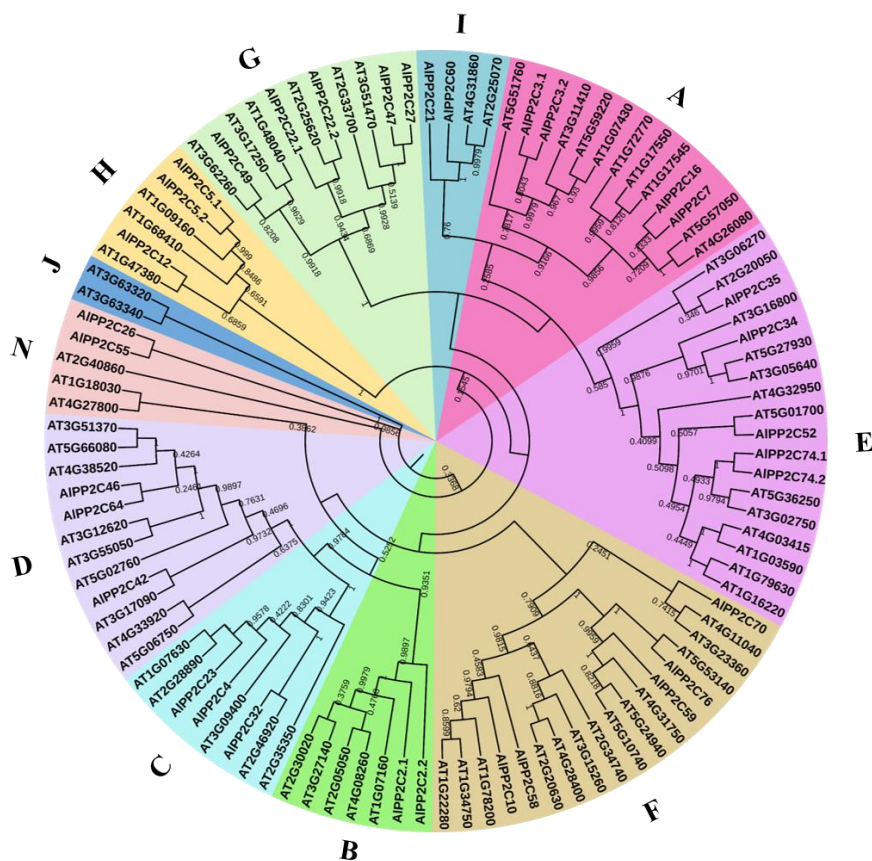
تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

جهت بررسی روابط تکاملی ژن‌های *PP2C* در گونه‌های آلوروپوس و آرابیدوپسیس، ابتدا، ۳۴ توالی آمینواسیدی *PP2C* آلوروپوس و ۷۰ توالی آرابیدوپسیس، مورد آنالیز هم‌ردیفی چندگانه قرار گرفتند، سپس درخت فیلوژنتیکی بر مبنای روش اتصال همسایه (NJ) ترسیم گردید (شکل ۳). نتایج نشان داد که ۱۰۴ توالی *PP2C* آلوروپوس و آرابیدوپسیس را می‌توان به ۱۱ زیرگروه (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J و N) تقسیم‌بندی نمود. این نحوه گروه‌بندی در سایر گونه‌ها نیز مشاهده شده است (Li et al., 2018; Wang et al., 2020). با بررسی بیشتر مشخص شد که خانواده ژنی *PP2C* آلوروپوس در زیرگروه J فاقد عضو می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که گروه A ژن‌های *PP2C* در آرابیدوپسیس (مانند ABI1 و ABI2)، با سیگنال‌دهی آبسزیک‌اسید (ABA) همراه است، گروه B به‌عنوان محرک سیگنال‌دهی پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) شناخته شده است، و گروه C نیز در تنظیم نمو گل نقش دارد (Wei & Pan, 2014).

شناسایی عناصر تنظیمی سیس در پروموتورها

جهت شناسایی عناصر تنظیمی سیس ژن‌های *AIPP2C*، ۱۰۰۰ جفت‌باز بالادست توالی ژنومی کدون شروع هر ژن، به‌عنوان منطقه پروموتور در نظر گرفته شد. با توجه به بررسی توالی پروموتوری ژن‌های

AIPP2C در داده‌های ژنومی گیاه آلوروپوس لیتورالیس، ۱۲ ژن برای بررسی عناصر سیس انتخاب شدند. تعداد کل عناصر شناسایی‌شده در توالی پروموتور ۱۲ ژن از خانواده ژنی *AIPP2C* ۹۱۳ عنصر بود که از این تعداد، ۳۳۳ عنصر با عملکرد نامشخص، ۲۲۲ عنصر عمومی پروموتور، ۹۸ عنصر پاسخ‌گو به هورمون، ۸۹ عنصر مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی، ۸۵ عنصر مرتبط با جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی، ۷۸ عنصر مرتبط با پاسخ نوری، ۶ عنصر مرتبط با رشد و نمو، و در نهایت ۲ عنصر اختصاصی بافت هستند (شکل ۴-الف). عناصر پاسخ‌گو به هورمون، مانند عناصر پاسخ‌گو به آبسزیک‌اسید (ABA)، متیل جاسمونات (MeJA)، سالیسیلیک‌اسید (SA)، اتیلن (ETH)، جیبرلین (GA) و اکسین (Auxin) در توالی پروموتوری شناسایی شدند. پراکنش این عناصر در ناحیه بالادست ژن‌های *AIPP2C* در شکل ۴-ب نشان داده شده است. تعداد زیادی از مطالعات نشان می‌دهند که این عناصر نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند نمو گیاه، پیری و بلوغ، متابولیسم ثانویه گیاهان و همچنین پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف ایفا می‌کنند (T. F. Yu et al., 2018). MeJA در بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ گیاهان به صدمات بافتی (Creelman et al., 1992) و اکسین با القای نرم‌شدن دیواره سلولی در تنظیم خواص دیواره سلولی نقش دارند (Majda & Robert, 2018).



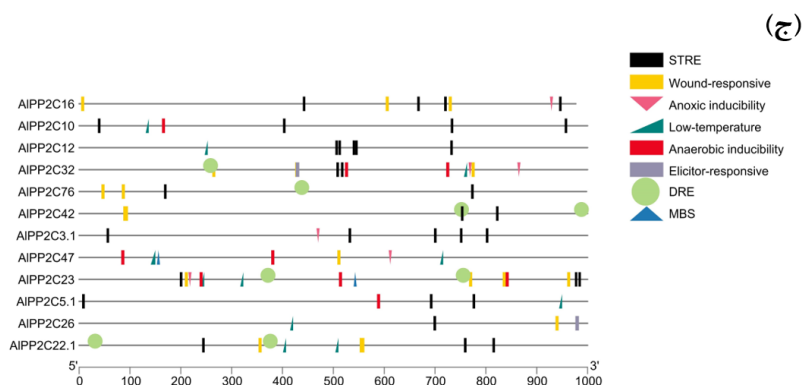
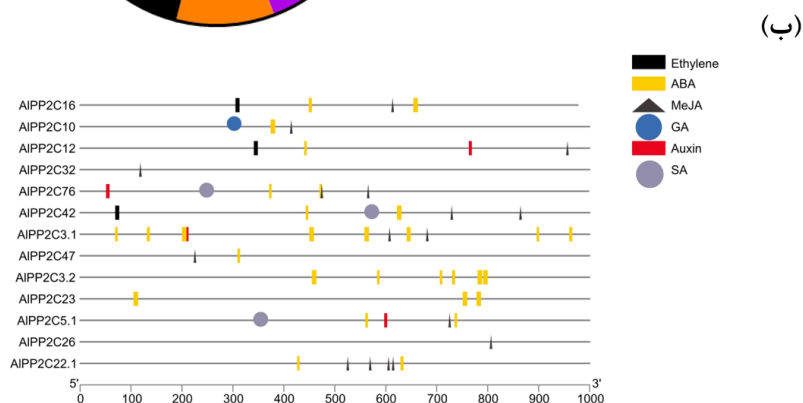
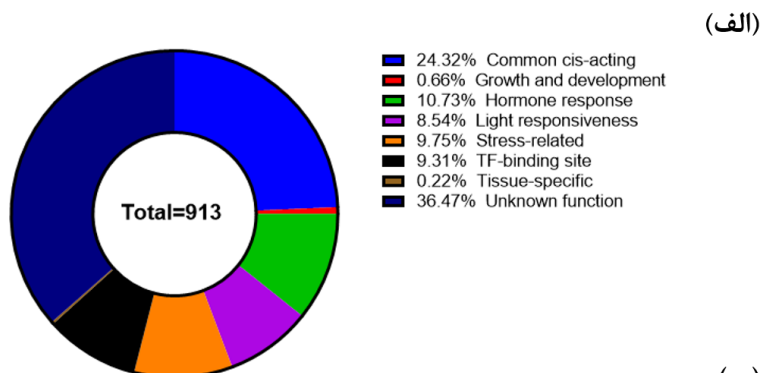
شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های PP2C آلورپوس و آرابیدوپسیس. درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 7.0 با استفاده از ۳۴ توالی آمینواسیدی AIPP2C و ۷۰ توالی AtPP2C بر مبنای روش اتصال همسایه با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد. پروتئین‌های مورد بررسی در ۱۱ زیرگروه (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) تقسیم‌بندی شدند.

جهش در موتیف ABRE در پروموتور *OsNAC5* برنج، منجر به عدم فعال‌سازی پروموتور بواسطه هورمون ABA گردید (Takasaki *et al.*, 2010).

آنالیز بیان ژن‌های AIPP2C

تجزیه و تحلیل پروفایل بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد عملکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao & Chen, 2012). تکنیک RNA-seq ضمن ارائه همزمان توالی و کمیت ژن هدف از اختصاصیت و حساسیت بالایی در شناسایی ایزوفرم‌های مختلف یک ژن برخوردار است. ضمن اینکه امکان ارائه اطلاعات بیانی تمام ژن‌ها را در قالب یک آزمایش فراهم می‌نماید (Fassbinder-Orth, 2014; VanGuilder *et al.*, 2008).

از مهم‌ترین عناصر پاسخ‌گو به تنش شناسایی‌شده در پروموتور ژن‌های AIPP2C می‌توان به عناصر پاسخ‌گو به تنش خشکی و ABA (ARBE)، عناصر پاسخ‌گو به تنش خشکی و اسمزی (DRE)، عناصر پاسخ‌گو به سرما (LTR)، عناصر پاسخ‌گو به تنش گرما و اسمزی (STRE) و عناصر پاسخ‌گو به تنش خشکی به‌عنوان جایگاه اتصال MYB (MBS) اشاره نمود. در شکل ۴-ج نیز پراکنش عناصر سیس مرتبط با تنش در ناحیه بالادست ژن‌های AIPP2C نشان داده شده است. مشخص شده است عنصر ABRE که با مسیر پیام‌دهی وابسته به ABA همراه است، در پاسخ گیاه به تنش خشکی و شوری از نقشی کلیدی برخوردار است (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). به نحوی که



شکل ۴. عناصر تنظیمی سیس شناسایی شده در پروموتور ژن‌های AIPP2C (الف) طبقه‌بندی عناصر سیس شناسایی شده. عناصر به صورت درصد در نمودار بیان شده است. (ب) توزیع عناصر مرتبط با هورمون. (ج) توزیع عناصر مرتبط با مرتبط با تنش.

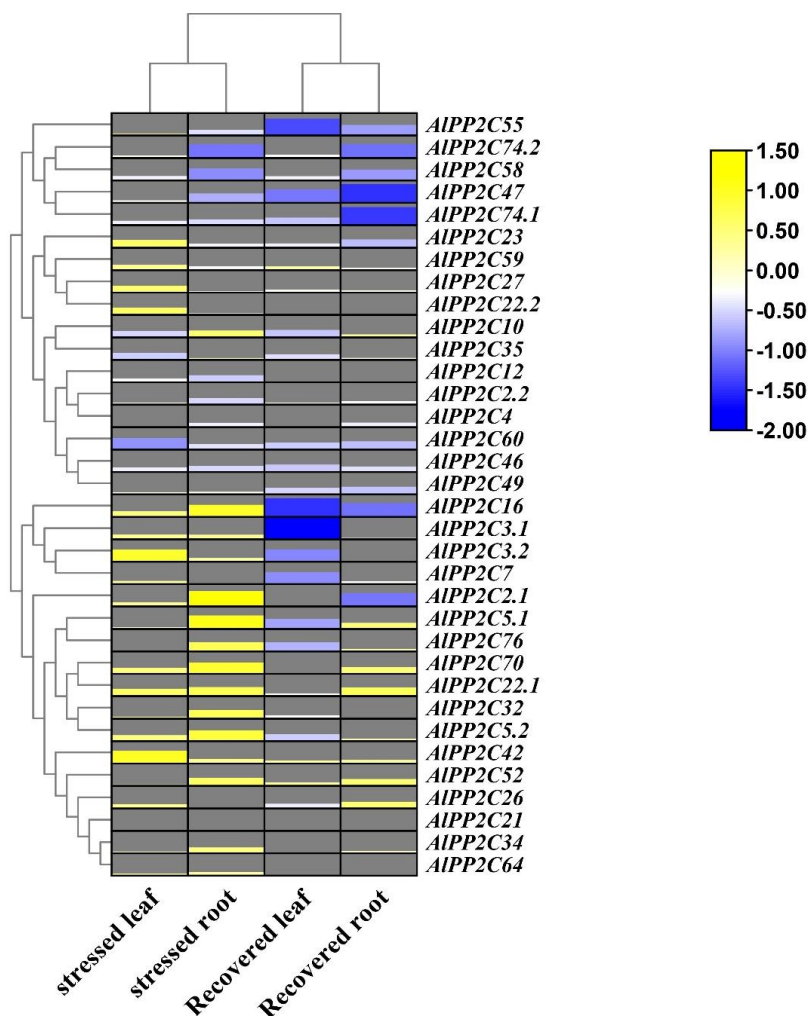
حاصله در این بخش جهت غربال تمام اعضای این خانواده ژنی در سطح ترانسکریپتوم به منظور شناسایی ژن‌هایی با بیشترین و کمترین بیان و ژن‌هایی با بیان بافت-اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. الگوی بیان ژن‌های AIPP2C نشان‌دهنده اهمیت نقش آن‌ها در پاسخ گیاه به تنش شوری بود (شکل ۵).

نتایج نشان داد که ژن AIPP2C4 دارای بیان اختصاصی بافت ریشه می‌باشند. با این حال، تعداد کمی از ژن‌ها بیان اختصاصی بافت را نشان داده‌اند، که

با توجه به عدم وجود سابقه و انجام تحقیقات پیشین در بررسی بیان خانواده ژنی PP2C در گیاه آلوروپوس و همچنین همسانی^۱ بالای اعضای این خانواده ژنی، در این تحقیق از داده‌های ترانسکریپتوم موجود در گیاه آلوروپوس، جهت شناسایی ژن‌های فعال و غیرفعال این خانواده استفاده گردید (Hashemi- petroudi & Mohammadi, 2020). اطلاعات

بررسی داده‌های ترانسکریپتوم خانواده *AIP2C* نشان می‌دهد که بیان اعضای این خانواده ژنی در دامنه ۲ و ۲- در نوسان می‌باشد که این نوسان محدود، احتمالاً با توجه به نقش این ژن‌ها در شبکه سیگنال‌دهی ABA حائز اهمیت می‌باشد. بررسی بیان ژن‌های زیرخانواده A نشان می‌دهد که چهار ژن *AIP2C3.1*، *AIP2C3.2*، *AIP2C7* و *AIP2C16* به لحاظ الگوی بیانی در بافت‌ها و تنش‌های مختلف در یک خوشه دسته‌بندی گردید که حاکی از تطابق الگوی بیانی و الگوی ساختاری این ژن‌ها می‌باشد.

نشان‌دهنده اهمیت مشترک آن‌ها برای رشد گیاه است (Shazadee *et al.*, 2019). در این تحقیق بیشترین افزایش بیان مشاهده شده (بر مبنای Log2FC) در ژن *AIP2C2.1* به‌عنوان همولوگ ژن *ATIG07160* تحت شرایط تنش شوری در بافت ریشه با مقدار بیان ۱/۲ مشاهده شد. این در حالی است در مطالعه دیگری مشخص شده است که ژن *ATIG07160* در پاسخ به تنش‌های شوری و خشکی، افزایش بیان نشان داد (Xue *et al.*, 2008). بیشترین کاهش بیان نیز به ژن *AIP2C3.1* در بافت برگ در شرایط بازیابی تعلق داشت (شکل ۵).



شکل ۵. پروفایل بیانی ژن‌های *AIP2C* بر اساس داده‌های RNA-seq. Heatmap ارائه شده میزان تغییر بیان ژن‌های *AIP2C* را در دو بافت برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و بازیابی نشان می‌دهد. ارزش نسبی سیگنال به‌صورت نوار رنگی در انتهای Heatmap ارائه شده است که در آن رنگ آبی نشان‌دهنده کاهش بیان، رنگ سیاه نشان‌دهنده عدم تغییر بیان و رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان است.

را القا می‌کند. به عبارت دیگر این تنظیم‌کننده‌ها، تغییر حالت PP2C از حالت بازدارنده رونویسی به حالت فعال‌کننده رونویسی را واسطه‌گری می‌کنند (Jung et al., 2020).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با بررسی داده‌های ژنومی گیاه آلوروپوس لیتورالیس، ۳۴ ژن PP2C در این گیاه شناسایی شد. تجزیه و تحلیل کلی این خانواده ژنی شامل خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها، جایگاه سلولی، ساختار ژنی و موتیف‌های حفاظت‌شده انجام شد. پروتئین‌های PP2C در آلوروپوس بر اساس همولوژی با پروتئین‌های PP2C در آرابی‌دوپسیس در ۱۱ زیرگروه طبقه‌بندی شدند. اما خانواده ژنی PP2C آلوروپوس در زیرگروه J فاقد عضو بود. بیشتر اعضای مربوط به هر زیرگروه در درخت فیلوژنتیکی، ساختار ژنی و ترکیب موتیف مشترکی را به نمایش گذاشتند که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های عملکردی در میان پروتئین‌های PP2C در همان زیرشاخه باشد. با توجه به روابط اورتولوژی، شباهت الگوی بیانی و همچنین الگوی ساختاری ژن‌های زیرخانواده AIPP2C A با زیرخانواده PP2C A های آرابی‌دوپسیس تالیانا و برنج، بررسی الگوی بیانی این ژن‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص نقش این ژن‌ها در شبکه پیام‌رسانی ABA تحت تنش‌های غیرزنده و در بافت‌های گیاهی متفاوت ارائه نماید. با توجه به نقش کلیدی ژن‌های PP2C در تحمل به تنش‌های غیرزیستی نظیر شوری آنالیز تمام اعضای خانواده ژنی AIPP2C در سطح ترانسکریپتوم به‌منظور شناسایی ژن‌هایی با بیشترین و کمترین بیان تحت تنش شوری و شرایط بازیابی، و همچنین شناسایی ژن‌های با بیان اختصاصی بافت انجام گرفت. لازم به ذکر است اگرچه داده‌های ترانسکریپتومی به‌کار رفته در این تحقیق، تصویری از ژن‌های فعال و

بررسی زیرگروه A در خانواده PP2C برنج نشان می‌دهد که بیان ژن‌های این زیرخانواده تحت تیمار ABA القا می‌گردد. ضمن اینکه سطح بیان نسبی آنها تحت تیمار شوری بالا و دمای پایین نیز افزایش می‌یابد. گزارش شده است که ژن‌های ABII، AB12، HAB1، HAB2، AHG1 و PP2C-A در شبکه‌های سیگنال‌دهی ABA نقش دارند. سایر مطالعات گزارش کرده‌اند که ژن‌های PP2C به‌طور مثبتی در برابر تحمل شوری در آرابی‌دوپسیس و خشکی در هلو تنظیم می‌شوند تا بتوانند شدت تنش را تعدیل کنند (Qiu et al., 2022).

ژن AIPP2C3.1 با مقدار بیان ۰/۹۴ در بافت برگ افزایش بیان تحت تنش شوری نشان داد. این ژن هومولوگ ژن ATIG07430 در آرابی‌دوپسیس می‌باشد که تحت تنش‌های شوری، اسمزی، سرما، گرما، نور بالا، ازون و آبسزیک‌اسید (ABA) افزایش بیان نشان داد (Xue et al., 2008). در بررسی دیگری مشخص شد که ژن‌های PP2C تحت تنش‌های گرما، سرما، خشکی و شوری تغییرات رونویسی قابل‌توجهی را نشان دادند (Li et al., 2018). مطالعات صورت گرفته روی آرابی‌دوپسیس و برنج نیز بیانگر نقش کلیدی ژن‌های PP2C در تحمل به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد (Shazadee et al., 2019; Singh et al., 2010;) (Xue et al., 2008).

PP2C‌ها به عنوان یک سوئیچ در مرکز شبکه سیگنال‌دهی ABA عمل می‌کنند. مکانیسم عمل PP2C‌ها به‌ویژه PP2C‌های گروه A بدین نحو بوده که با برهمکنش فیزیکی با کینازهای SnRK2، از فعال شدن فاکتورهای رونویسی که بیان ژن‌های پاسخگو به ABA را واسطه‌گری می‌کنند جلوگیری می‌کنند. تحت شرایط تنش، PP2C‌ها به گیرنده‌های محلول ABA متصل شده تا با مهار ABA، سبب رهاسازی SnRK2‌های فعال شوند. مقادیر ABA، رونویسی ژن‌های بازدارنده یا فعال‌کننده ژن PP2C

بیشتر در مورد عملکرد و کاربرد ژن‌های *AlPP2C* در رشد و سازگاری به تنش در گیاه آلوروپوس لیتورالیس فراهم می‌آورد.

سیاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره T271/98 انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را اعلام نمایند.

غیرفعال در بافت‌ها و تیمارهای مختلف ارائه می‌دهد ولی با توجه به زمان نمونه‌گیری (یک هفته پس از اعمال تنش در داده‌های ترانسکریپتوم)، بررسی بیان ژن‌های *PP2C* در زمان‌های اولیه اعمال تنش نیز ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نقش این ژن‌ها در شبکه پیام‌رسانی، به نظر می‌رسد بررسی بیان ژن‌های *ALPP2C* در سری زمان یک الی ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش به روش RT-QPCR می‌تواند تصویر کامل‌تری از این ژن‌ها در پاسخ به تنش ارائه دهد. این نتایج درک ما از خانواده ژنی *PP2C* را بهبود می‌بخشد و اطلاعات ارزشمندی جهت تحقیقات

REFERENCES

- Arab, M., Najafi Zarrini, H., Nematzadeh, G., & Hashemi-petroudi, S. H. (2021). Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase (CPK) in *Aeluropus littoralis* L. *Crop Biotechnology*, 10(33), 1-19.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- Barhoumi, Z., Djebali, W., Chaïbi, W., Abdelly, C., & Smaoui, A. (2007a). Salt impact on photosynthesis and leaf ultrastructure of *Aeluropus littoralis*. *Journal of plant research*, 120(4), 529-537.
- Barhoumi, Z., Djebali, W., Smaoui, A., Chaïbi, W., & Abdelly, C. (2007b). Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus littoralis* (Willd) Parl. *Journal of plant physiology*, 164(7), 842-850.
- Bork, P., Brown, N. P., Hegyi, H., & Schultz, J. (1996). The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Science*, 5(7), 1421-1425.
- Cao, J., Jiang, M., Li, P., & Chu, Z. (2016). Genome-wide identification and evolutionary analyses of the *PP2C* gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. *BMC genomics*, 17(1), 1-17.
- Chow, C. N., Zheng, H. Q., Wu, N. Y., Chien, C. H., Huang, H. D., Lee, T. Y., ... Chang, W. C. (2016). PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1154-D1160.
- Creelman, R. A., Tierney, M. L., & Mullet, J. E. (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 4938-4941.
- Fassbinder-Orth, C. A. (2014). Methods for quantifying gene expression in ecoimmunology: from qPCR to RNA-Seq. *Integrative and Comparative Biology*, 54(3), 396-406.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J. Mitchell, A. L., ... 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 *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607): Springer.
- González-García, M. P., Rodríguez, D., Nicolás, C., Rodríguez, P. L., Nicolás, G., & Lorenzo, O. (2003). Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* *FsPP2C1* plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant physiology*, 133(1), 135-144.
- Haider, M. S., Zhang, C., Kurjogi, M. M., Pervaiz, T., Zheng, T., Zhang, C., ... Fang, J. (2017). Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hashemi-petroudi, S., & Mohammadi, S. (2021). Identification, classification and expression analysis of *DREB* transcription factor gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(1), 224-235.
- Hashemi-Petroudi, S. H., Arab, M., Dolatabadi, B., Kuo, Y.-T., Baez, M. A., Himmelbach, A., ... Mälzer, M. (2022). Initial Description of the Genome of *Aeluropus littoralis*, a Halophile Grass. *Frontiers in plant science*, 13, 906462.
- Hashemi-petroudi, S. H., & Mohammadi, S. (2020). Identification of the *ERF* gene family in *Aeluropus littoralis* halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress. *Crop Biotechnology*, 9(29), 53-66. doi:10.30473/cb.2020.49234.1787
- 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.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2014). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- 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, X., Liu, L., Xiao, B., Li, D., Xing, X., Kong, X., & Li, D. (2010). Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by over-expression of a new maize protein phosphatase 2C, *ZmPP2C2*. *Journal of plant physiology*, 167(15), 1307-1315.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Jung, C., Nguyen, N. H., & Cheong, J.-J. (2020). Transcriptional regulation of protein phosphatase 2C genes to modulate abscisic acid signaling. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9517.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., ... Zhou, S. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 4.
- Khan, N., Ke, H., Hu, C.-M., Naseri, E., Haider, M. S., Ayaz, A., ... Hou, X. (2019). Genome-wide identification, evolution, and transcriptional profiling of *PP2C* gene family in *Brassica rapa*. *BioMed research international*, 2019.
- 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., ... Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res*, 40(D1), D1202-D1210.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... 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.
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2014). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D257-D260.
- Li, J., Jia, H., Zhang, J., Sun, J., Zhang, Y., Lu, M., ... Hu, J. (2018). Genome-wide characterization of protein phosphatase 2C genes in *Populus euphratica* and their expression profiling under multiple abiotic stresses. *Tree Genetics & Genomes*, 14(6), 80.
- Liang, B., Sun, Y., Wang, J., Zheng, Y., Zhang, W., Xu, Y., ... Leng, P. (2020). Tomato Protein Phosphatase 2C (SIPP2C3) negatively regulates fruit ripening onset and fruit gloss. *bioRxiv*.
- Lu, F., Wang, K., Yan, L., Peng, Y., Qu, J., Wu, J., ... Yu, H. (2020). Isolation and characterization of maize ZmPP2C26 gene promoter in drought-response. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(11), 2189-2197.
- Majda, M., & Robert, S. (2018). The role of auxin in cell wall expansion. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 951.
- 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.
- Mohammadi, S., Nematzadeh, G., Najafi Zarrini, H., & Hashemi-petroudi, S. H. (2021). Identification and evaluation of conserved miR164-targeted *Aeluropus littoralis* NAC genes in response to abiotic stress. *Crop Biotechnology*, 10(34), 27-41. doi:10.30473/cb.2021.60319.1851
- 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.
- Qiu, J., Ni, L., Xia, X., Chen, S., Zhang, Y., Lang, M., ... Li, J. (2022). Genome-Wide Analysis of the Protein Phosphatase 2C Genes in Tomato. *Genes*, 13(4), 604.
- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O., & Rodriguez, P. L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal*, 37(3), 354-369.
- Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., ... Andrews, D. T. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature genetics*, 24(3), 236.
- Schweighofer, A., Hirt, H., & Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in plant science*, 9(5), 236-243.
- Shazadee, H., Khan, N., Wang, J., Wang, C., Zeng, J., Huang, Z., & Wang, X. (2019). Identification and Expression Profiling of Protein Phosphatases (PP2C) Gene Family in *Gossypium hirsutum* L. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1395.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 217-223.
- Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A. K., & Pandey, G. K. (2010). Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC genomics*, 11(1), 435.

- Singh, A., Jha, S. K., Bagri, J., & Pandey, G. K. (2015). ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *PLoS one*, 10(4), e0125168.
- Singh, A., Pandey, A., Srivastava, A. K., Tran, L.-S. P., & Pandey, G. K. (2016). Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1023-1035.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., ... Nakashima, K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(3), 173-183.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D.G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, 1, 2-3.
- Van den Broeck, L., Dubois, M., Vermeersch, M., Storme, V., Matsui, M., & Inzé, D. (2017). From network to phenotype: the dynamic wiring of an Arabidopsis transcriptional network induced by osmotic stress. *Molecular systems biology*, 13(12), 961.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626.
- Wang, Y.F., Liao, Y.Q., Wang, Y.P., Yang, J.W., Zhang, N., & SI, H.J. (2020). Genome-wide identification and expression analysis of StPP2C gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 19(6), 1609-1624.
- Wei, K., & Pan, S. (2014). Maize protein phosphatase gene family: identification and molecular characterization. *BMC genomics*, 15(1), 1-20.
- Workbench, C. G. (2019). Version 6.5. 1. *CLC bio A/S science park aarhus finlandsgade*, 10-12.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehrling, J., Ni, F., Jakab, S., ... Zhong, Y. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC genomics*, 9(1), 1-21.
- You, J., Zong, W., Hu, H., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2014). A STRESS-RESPONSIVE NAC1-regulated protein phosphatase gene rice protein phosphatase18 modulates drought and oxidative stress tolerance through abscisic acid-independent reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant physiology*, 166(4), 2100-2114.
- Yu, T. F., Zhao, W. Y., Fu, J. D., Liu, Y. W., Chen, M., Zhou, Y. B., ... Xi, Y. J. (2018). Genome-wide analysis of CDPK family in foxtail millet and determination of SiCDPK24 functions in drought stress. *Frontiers in plant science*, 9, 651.
- Yu, X., Han, J., Wang, E., Xiao, J., Hu, R., Yang, G., & He, G. (2019). Genome-wide identification and homoeologous expression analysis of PP2C genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in genetics*, 10, 561.
- Zhang, F., Wei, Q., Shi, J., Jin, X., He, Y., Zhang, Y., ... Yang, G. (2017). *Brachypodium distachyon* BdPP2CA6 interacts with BdPYLs and BdSnRK2 and positively regulates salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 8, 264.
- Zhang, P., Zhang, X., Yu, H., Pan, L., Fu, F., & Li, W. (2018). Functions of two alternative spliced variants of protein phosphatase type 2C gene ZmPP2C26 of maize. *Journal of Northwest A & F University-Natural Science Edition*, 46(7), 23-72.
- Zhang, S., Xia, X., Shen, J., Zhou, Y., & Sun, Z. (2008). DBMLoc: a Database of proteins with multiple subcellular localizations. *BMC bioinformatics*, 9(1), 127.