CC BY

DOR 20.1001.1.17354226.1400.16.4.3.2

Original paper

Role of cis-acting elements of the promoter region in regulating the spatio-temporal expression of the salinity stress-responsive *NHX1* gene in *Triticum aestivum* L.

Shadi Heidari [1], Peivand Heidari [1], Baharak Heidari [2,*]

1. Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Computer Science, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

***Corresponding author:** e-mail: b_heidari@iauksh.ac.ir

Received:3/9/2022 Acceped:7/27/2022

Abstract

Soil salinity is one of the most serious issues in wheat cultivation in Iran, which has a detrimental impact on crop production and plant growth. To investigate genes associated with the response to salinity stress in wheat, 3567 expressed sequence tags (ESTs) were analyzed from salinity-tolerant wheat leaf and root libraries collected from the Harvard University Database. EGassembler, CLCbio and IDEG6 softwares were used to analyze gene expression and the GoMapMan comparative classification tool was used to classify functional catalogs. Statistically significant differences were observed between the genes of the two libraries in 7 functional groups. The results showed that *NHX1* ion exchangers play an important role in ion homeostasis and salinity stress tolerance in both leaf and root tissues. Because a full understanding of the gene transcription regulation system depends on functional analysis of cis-acting elements, the regulatory elements in the 5' regulatory region of the *NHX1* genes were identified using Plant CARE databases. Several regulatory elements related to biological processes, hormonal regulation, and stress response and environmental stimuli were identified. This study provides an insight into the role of the promoter's cis-acting in regulating the spatio-temporal expression of *NHX1* gene under salinity stress.

Keywords: Gene spatio-temporal expression pattern, *NHX1* ion exchangers, Salinity stress, Cis-acting promoter elements, Ionic homeostasis

Iranian Journal of Biological Sciences
Vol 16, Issue 4, Winter 2022

مقاله تحقیقی

نقش عناصر cis-acting ناحیه پروموتر در تنظیم بیان مکان - زمانی ژن *NHX1* پاسخگو به تنش شوری در *Triticum aestivum L.*

شادی حیدری[1]، پیوند حیدری[1]، بهارک حیدری[2،*]

۱. گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه کامپیوتر، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

***مسئول مکاتبات:** تلفن محل کار: ۰۸۳-۳۷۲۴۳۱۸۱، آدرس الکترونیکی: b_heidari@iauksh.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۹ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۵/۵

چکیده

شوری خاک یکی از جدی ترین مشکلات در کشت گندم در ایران است که تأثیر زیان آور بر تولید محصول و رشد گیاه دارد. به منظور بررسی ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش شوری در گندم، تجزیه و تحلیل ۳۵۶۷ برچسب توالی بیان شده (EST) از کتابخانه‌های برگ و ریشه گندم متحمل به شوری جمع‌آوری شده از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد انجام شد. نرم افزارهای EGassembler، CLCbio و IDEG6 به منظور تجزیه و تحلیل بیان ژن و ابزار طبقه‌بندی مقایسه‌ای GoMapMan به منظور دسته‌بندی کاتالوگ‌های عملکردی استفاده شد. اختلاف آماری معنی‌دار بین ژن‌های دو کتابخانه در ۷ گروه کارکردی مشاهده شد. نتایج نشان داد که تبادلگرهای یون *NHX1* نقش مهمی در هومئوستاز یون و تحمل تنش شوری در هر دو بافت برگ و ریشه ایفا می‌کنند. از آنجا که درک کامل سیستم تنظیم رونویسی ژن به تجزیه و تحلیل عملکردی عناصر cis-acting بستگی دارد، بنابراین عناصر تنظیم‌کننده موجود در ناحیه '۵ تنظیمی ژن‌های *NHX1* با استفاده از پایگاه های داده Plant CARE شناسایی شدند. چندین عنصر تنظیمی مرتبط با فرآیندهای بیولوژیکی، تنظیم هورمونی و پاسخ به تنش‌ها و محرک‌های محیطی شناسایی شدند. این پژوهش بینشی در مورد نقش عناصر cis-acting پروموتر در تنظیم بیان مکان- زمانی ژن *NHX1* تحت تنش شوری ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: الگوی بیان مکان-زمانی ژن، تبادلگرهای یون *NHX1*، تنش شوری، عناصر cis-acting پروموتر، هومئوستاز یونی

مقدمه

تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری خاک از جدی ترین مشکلات کشت گندم به عنوان یکی از غلات اصلی در ایران است که باعث اثرات نامطلوب بر رشد، نمو و کاهش بیش از ۵۰ درصدی عملکرد می‌شود (۱). شوری خاک از طریق تنش اسمزی، سمیت سلولی ناشی از جذب بیش از حد یون‌های سدیم و کلراید و عدم تعادل غذایی بر گیاه اثر منفی می‌گذارد. علاوه بر این شوری به دلیل تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)[1] به طور معمول با تنش اکسیداتیو همراه است (۲). بنابراین، کشت گندم متحمل به شوری در خاک شور دارای پتانسیل اقتصادی قابل توجهی است که باید بیشتر مورد کاوش و توسعه قرار گیرد. به حداقل رساندن جذب خالص یون‌های سدیم و کلراید

[1] Reactive oxygen species

ورودی، بارگذاری این یون‌ها در آوند چوبی، بخش‌بندی[1] واکوئولی و ترشح نمک از سطح برگ‌ها مکانیسم‌هایی هستند که گیاهان متحمل به کار می‌گیرند تا از تجمع این یون‌های سمی در سیتوزول جلوگیری کنند و آسیب ناشی از آنها را کاهش دهند (۳). گیاهان با تنظیم طیف وسیعی از ژن‌ها به این شرایط واکنش نشان می‌دهند و با آن سازگار می‌شوند. مطالعه‌های زیادی بینش در مورد مکانیسم سازگاری گیاه برای بهره‌وری بالا و تحمل تنش را ارائه داده‌اند. این مطالعه‌ها اساس مولکولی تحمل شوری را در سطح بیان ژن در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، توتون، برنج، گندم و یونجه مشخص کرده‌اند و بسیاری از ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی القا شده با تنش شوری در این گونه ها جداسازی شده است. آزمایش‌های تجربیِ مهندسی ژنتیک از طریق رویکرد بیان بیش از حدِ ژن‌های[2] فاکتورهای رونویسی و بیان اختصاصی مکان-زمانی آنها، گیاهان زراعی را ایجاد کردند که فنوتیپ‌های مقاوم به تنش را نشان داده‌اند. این در حالیست که گزارش‌های اندکی الگوی بیان مکان-زمانی[3] اختصاصی بافتِ تبادلگرهای یون را مشخص کرده‌اند و از بیان بیش از حد ژن‌های این ناقل‌ها در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده کرده‌اند. یکی از روش‌های موثر، کارآمد، نسبتاً ارزان، سریع و قدرتمند به منظور تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن تحت شرایط محیطی خاص و مراحل تکوینی مختلف، روش‌های ژنومیکس مقایسه‌ای EST[4] است (۴). در رابطه با تجزیه و تحلیل منابع EST، حیدری و همکاران (۵) داده‌های کتابخانه سه گونه براسیکا را با استفاده از نرم‌افزار IDEG6 بررسی کردند و ژن‌های افتراقی بین کتابخانه‌ها را در طی مراحل تکاملی این سه گونه، شناسایی و اهمیت بررسی بیان ژن با استفاده از این روش را نشان دادند. علاوه براین، از آنجایی که سازگاری گیاهان با تنش شوری نیازمند هومئوستاز یونی سلولی است و تبادلگرهای یون نقش مهمی در این هومئوستازی ایفا می‌کنند، درک شبکه‌های ژن تنظیم‌کننده در سازوکارهای پاسخ تنش به تحلیل‌های عملکردی موفقیت آمیز عناصر cis-acting بستگی دارد. در پاسخ به تنش‌های محیطی، فرآیندهای هورمونی و رشدی، پروتئین‌های ناقل به صورت رونویسی توسط عناصر cis واقع در ناحیه بالادست ژن‌های خود تنظیم می‌شوند (شکل ۱). وجود عناصر cis مختلف، تداخل[5] بین مسیرهای مختلف را تسهیل و امکان بیان مکان-زمانی اختصاصی بافت را فراهم می‌کند. اتصال TFهای مختلف از مسیرهای مختلف به موتیف‌های DNA بیان ژن‌ها را توسط فاکتورهای متعدد تعدیل می‌کند (۶). در مورد اهمیت پدیده تداخل در تنظیم رونویسی ژن به تازگی گزارش شده است که انتخاب طبیعی در پدیده تداخل بین شبکه‌های تنظیم کننده ژن (GRN)[6]، حتی می‌تواند سازگاری موجودات را با محیط‌های جدید تسهیل کند (۷). با توجه به اهمیت عملکرد پروموتر، ابزارهای محاسباتی برای پیش‌بینی و طبقه‌بندی عناصر تنظیمی یک پروموتر مورد نیاز است. کر و همکاران (۸) تجزیه و تحلیل درون رایانه‌ای عناصر تنظیمی cis-acting پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی[7] (PR) را در آرابیدوپسیس و برنج با استفاده از plantCARE پیش بینی نمودند. نتایج بررسی توزیع عناصر cis-acting، تعدد عملکردی PRs را نشان داد و بینشی را در مورد تنظیم آن ژن‌ها فراهم کرد. دراین تحقیق به منظور شناسایی و مقایسه ژن‌های دخیل در تحمل به شوری در واریته گندم متحمل شوری، تجزیه و تحلیل EST دو کتابخانه برگ و ریشه تحت شرایط نرمال و تنش شوری انجام شد. به منظور تعیین عناصر cis-acting ناحیه پروموتر مرتبط با الگوی بیان مکان-زمانی اختصاصی بافت، تجزیه و تحلیل نواحی پروموتر ژن‌های تبادلگرهای یون *NHX1* بافت برگ و ریشه انجام شد و ژن‌های مرتبط با این اختصاصیت مشخص گردید.

مواد و روش ها

کتابخانه گندم متحمل شوری با ۳۵۶۷ توالی EST شامل ۱۱۳۵ EST برگ و ۲۴۳۲ EST ریشه تحت شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط نرمال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها از پایگاه داده دانشگاه هاروارد

[1] Compartmentalization
[2] Gene overexpression
[3] Spatio-temporal expression patterns
[4] Expressed sequence tag
[5] Cross-talk
[6] The gene regulatory network
[7] Pathogenicity

(http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi) تحت شرایطی که گیاهچه‌های دو هفته ای با آبیاری حاوی غلظت ۲۵۰ میلی مولار NaCl و پاسخ میان مدت (۸ ساعت تنش شوری) تیمار شده بودند، جمع‌آوری شدند. در مرحله پیش پردازش، خالص سازی توالی‌های EST شامل پاکسازی توالی، پوشاندن تکرار، پوشاندن وکتور، پوشاندن اندامک و هم‌گذاری توالی با درصد تطابق cutoff N≥95 انجام شد. برای یافتن شباهت‌های دو کتابخانه، تمام توالی‌های EST توسط نرم افزار Egassembler (http://egassembler.hgc.jp) هم‌گذاری شد. در مرحله هم‌گذاری، توالی‌های EST در کانتیگ‌ها شامل دو یا چند EST و سینگلتون شامل فقط یک EST دسته‌بندی شدند (۹). سپس همه یونیژن‌ها با استفاده از X-blast توسط نرم افزار CLC bio در برابر پایگاه داده پروتئین‌های غیر تکراری با E-value $\leq 10^{-5}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۰). برای شناسایی ژن ها با بیان افتراقی در کتابخانه ها، از نرم افزار IDEG6 و آماره Audic-Claverie (http://telethon.bio.unipd.it/ideg6) استفاده شد (۱۱). برای دسته‌بندی کاتالوگ‌های عملکردی، ابزار طبقه‌بندی مقایسه‌ای و کاربردی GoMapMan (http://www.gomapman.org) به صورت آنلاین استفاده شد (۱۲). از نرم افزار IDEG6 و آزمون Audic-Claverie برای یافتن کاتالوگ‌های عملکردی متفاوت از نظر آماری در دو کتابخانه استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل نواحی پروموتر ژن‌ها، توالی کامل ژن‌های *NHX1* اختصاصی ریشه و برگ دو واریته مقاوم گندم از سایت دانشگاه هاروارد دانلود شد. ناحیه پروموتری ژن‌ها با استفاده از سایت BDGP (https://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html) با نمره cutoff ۰/۸۰ که شامل رشته معکوس نمی‌باشد، پیش بینی شد. این سایت یک مدل شبکه عصبی را از خواص ساختاری و ترکیبی ناحیه پروموتر هسته یوکاریوتی توسعه داده است. این مدل از معماری تاخیر زمانی[1]، یک مورد خاص از یک شبکه عصبی پیش‌خور[2] استفاده می‌کند. ساختار این مدل، برای فاصله‌گذاری متغیر بین سایت‌های اتصال عملکردی، که نقش کلیدی در فرآیند شروع رونویسی ایفا می‌کند را اجازه می‌دهد. بکارگیری این مدل در مجموعه آزمایشی از هسته پروموترها نه تنها نسبت به مدل‌های آماری یا شبکه عصبی قبلی، تمایز بهتری از سایت‌های پروموتور بالقوه ایجاد کرده است، بلکه ویژگی‌های ظریف سیگنال آغاز رونویسی را نیز به طور غیرمستقیم نشان می‌دهد (۱۳). به منظور تجزیه و تحلیل ناحیه پروموتری، توالی پیش‌بینی شده پروموتر به عنوان ورودی به سایت plantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare) وارد شد (۱۴) و عناصر cis-acting ناحیه پروموتری دو ژن *NHX1* اختصاصی ریشه و برگ با یکدیگر مقایسه گردید. در نهایت ژن‌های اختصاصی بیان شده در کتابخانه‌های برگ و ریشه منتسب به این عناصر تعیین گردید.

نتایج

تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن‌ها

نتایج تجزیه تحلیل بیان ژن کتابخانه گندم متحمل شوری با ۳۵۶۷ توالی EST شامل ۱۱۳۵ EST برگ و ۲۴۳۲ EST ریشه تحت شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط نرمال در جدول ۱ آورده شده است. بعد از هم‌گذاری با استفاده از نرم افزارEGassembler، تعداد ۱۰۲ کانتیگ و ۱۶۱ سینگلتن در کتابخانه برگ و ۴۵۱ کانتیگ و ۳۹۴ سینگلتن در کتابخانه ریشه تشکیل شد. ۱۱درصد از کل EST ها در گندم متحمل به شوری سهم خیلی ضعیفی (E-value $>10^{-5}$) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند و هیچ توالی مشابهی با آنها وجود نداشت و یا با پروتئین های ناشناخته و فرضی همولوژی داشتند. کانتیگ ۸۹ و ۲۷۵ (به ترتیب با تعداد ۲۴ و ۱۷ EST) در کتابخانه گندم متحمل تنش شوری می‌توانند به عنوان کاندیدای ژن‌هایی که هنوز شناخته نشده‌اند جداسازی و توالی‌یابی شوند و به عنوان ژن‌های جدید در پاسخ به تنش شوری معرفی گردند. ۷ گروه کارکردی با اختلاف معنی‌دار شامل خانواده های ژنی کد کننده فتوسنتز، هومئوستاز ردوکس، پاسخ به تنش و دفاع گیاه، سنتز و تخریب پروتئین، تنظیم رونویسی، پاسخ های هورمونی و نقل و

[1] Time-delay architecture
[2] Feed-forward neural network

انتقال بودند. در گروه کارکردی نقل و انتقال در گندم متحمل شوری، ژن تبادلگرهای سدیم/ هیدروژن (*NHX1*)[1] در کتابخانه برگ و ریشه تحت تنش شوری (با بیان ۲/۵ برابر در بافت برگ نسبت به ریشه) افزایش بیان داشت. این یافته نقش مهم *NHX1* در توانایی تحمل شوری در گندم را مشخص می‌کند و لزوم تعیین عملکرد عناصر cis-acting در فهم شبکه ژن‌های تنظیم‌کننده سازوکارهای پاسخ تنش شوری را نشان می‌دهد. ضمن اینکه *NHX1* را به عنوان یک ژن با الگوی بیان مکان-زمانی اختصاصی بافت، نامزد احتمالی برای اصلاح مولکولی گندم حساس به شوری معرفی می‌کند.

تجزیه و تحلیل ناحیه پروموتر ژن *NHX1*

نتایج تجزیه و تحلیل نواحی پروموترهای پیش بینی شده دو ژن *NHX1* اختصاصی ریشه و برگ در شکل ۱ آورده شده است. عناصر هسته پروموتر از جمله چندین جعبه TATA و CAAT، در موقعیت‌های مختلف پیش بینی شد. مجموعه‌ای از عناصر تنظیم‌کننده cis که بیان مکان-زمانی اختصاصی بافت *NHX1* را امکان‌پذیر می‌سازد، از جمله عناصر پاسخگو به تنش‌ها و محرک‌های محیطی شامل تنش خشکی (DRE/CRT و MYB)، دمای پایین (LTR) ، عنصر درگیردر القای اختصاصی آنوکسیک (شرایط بدون اکسیژن) (GC-motif)، عناصر پاسخ‌دهنده به نور (Sp1،MRE)، دو نوع عنصر پاسخ‌دهنده به هورمون (P-box، TCA-element)، و چندین عنصر دیگر با کارکرد ناشناخته شامل (STRE، WRE3 و Unnamed__4) شناسایی شدند. پروموتر *NHX1* ریشه، دارای عناصر اختصاصی DRE core، GC-motif و P-box است که احتمالاً الگوی بیان مکان-زمانی اختصاصی ریشه را فراهم می‌کنند و پروموتر *NHX1* برگ دارای عناصر اختصاصیMYB، MRE، Sp1، STRE و WRE3 است. عناصر cis-acting درگیر در پاسخگویی به دمای پایین Myb، LTR، عنصر در گیر در پاسخگویی به اسید سالیسیلیک TCA-element و Unnamed__4 در هر دو بافت ریشه و برگ مشترک بودند (جدول۲).

بحث

خانواده ژن‌های NHX بازیگران اصلی در پاسخ گیاهان به شوری هستند و نقش اصلی در ایجاد هومئوستاز یونی دارند. NHX ها در غشای اندامک های داخلی قرار می گیرند و با مبادله یون‌های سدیم با پروتون، یون‌های اضافی را از سیتوزول به واکوئل منتقل می‌کنند. پاردو و همکاران (۱۵) نشان دادند که بیان اکثر ژن‌های NHX با تیمار شوری فرا تنظیم می‌شود و NHX3 نقش مهمی در انتقال سدیم به واکوئل‌ها تحت شوری بالا و کاهش آسیب سدیم دارد. علاوه بر این تحمل به تنش شوری بهبود یافته، با بیان بیش از حد NHX3 در گیاهان توتون با بهبود فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط است.

نقش عناصر تنظیم کننده cis مرتبط با پاسخ تنش‌ها و محرک‌های محیطی و بیان ژن‌های مرتبط با آنها

ژن DREB2[2] که در گروه کارکردی تنظیم رونویسی قرار می‌گیرد در کتابخانه ریشهٔ تحت تنش شوری بیان شد. فاکتورهای رونویسی DREB با اتصال اختصاصی به عناصر DRE/CRT cis-acting[3] برای کنترل بیان ژن پایین دست، تحمل گیاه را در برابر تنش‌های غیرزیستی عمدتاً خشکی و شوری افزایش می‌دهند (۱۶). بنابراین این احتمال وجود دارد که عناصر DRE/CRT در تعامل با DREB2 الگوی بیان مکان- زمانی ژن *NHX1* اختصاصی ریشه را در تنش میان مدت شوری فراهم کند. علاوه بر این، در گروه کارکردی پیام رسانی، ژن SOS2[4] اختصاصی ریشه افزایش بیان داشت. SOS2 یک پروتئین کیناز از نوع سرین/ترئونین را رمزگذاری می کند. چندین شواهد نشان می دهد که SOS2 فعالیت تبادلگرهای یون *NHX1* را تنظیم می‌کند و در جهش‌یافته‌های sos2 تا حد زیادی فعالیت پروتئین‌های AtNHX کاهش می‌یابد (۱۷). علاوه بر این در ریشه در گروه کارکردی پاسخ تنش و دفاع گیاه افزایش بیان پروتئین‌های گروه دهیدرین مشاهده شد که دومین گروه

[1] Sodium/hydrogen exchanger (*NHX1*)

[2] Dehydration responsive element binding factor
[3] Dehydration responsive element/C-repeat
[4] Salt Overly Sensitive 2

بزرگ از خانواده ژن‌های فراوان در اواخر جنین‌زایی LEA[1] است. این امر می‌تواند با فعال‌سازی رونویسی این ژن‌ها توسط پروتئین‌های DREB مرتبط باشد که به عنصر cis-acting (DRE) این ژن‌ها نیز متصل می‌شود. بیان ژن‌های LEA راهکارهای اصلی گیاهان برای حفظ پتانسیل اسمزی داخل سلولی، کاهش آسیب و محافظت از سلول ها، تثبیت غشا و محافظت از پروتئین‌های عملکردی در برابر تجمع در شرایط تنش غیرزیستی است (۱۸) که همه این موارد برای ریشه تحت تنش شوری میان مدت حیاتی است. عنصر MYB cis-acting در '۵ ناحیه تنظیمی تبادلگرهای یون *NHX1* برگ تحت تنش شوری شناسایی شد. علاوه براین عنصر Myb cis-acting در *NHX1* دو بافت برگ و ریشه وجود داشت. گزارش شده است که فاکتورهای رونویسی MYB اعضای القا شده با ABA ناشی از تنش خشکی و شوری به این توالی‌ها متصل می‌شوند و نقش‌های متنوعی در پاسخ به تنش های غیر زیستی مانند خشکی، شوری و سرما ایفا می‌کنند (۱۹). با این حال مکانیسم تنظیمی پروتئین های MYB در تنش شوری هنوز به خوبی شناخته نشده است (۲۰) و ممکن است نقش آنها در پاسخ تنش شوری ناشی از القا اثر کم آبی باشد که تنش شوری ایجاد می‌کند. بنابراین فاکتورهای رونویسی MYB که به عناصر cis-acting در بالادست ژن‌های تبادلگرهای یون *NHX1* متصل می‌شوند، بیان این ژن را تحت تنش شوری در گندم تنظیم می‌کنند. عنصر GC-motif شبیه تقویت کننده درگیردر القای اختصاصی آنوکسیک (شرایط بدون اکسیژن) اختصاصی تبادلگرهای یون *NHX1* ریشه و عنصر پاسخگو به دمای پایین (LTR) در هر دو بافت برگ و ریشه وجود داشتند. نقش عنصر GC-motif در پروموتر ژن‌های این تبادلگرها در پاسخ های غیر زیستی از جمله تنش شوری ناشناخته باقی مانده است و احتمالاً همبستگی نزدیکی با پاسخ‌های اختصاصی تنش شوری در ریشه دارد. این یافته می‌تواند زمینه ساز تحقیقات آینده در مورد نقش این عوامل تنظیمی در پاسخ گندم به تنش شوری باشد. LTR یک موتیف شبیه به DRE می‌باشد، که مسئول القای ژن‌های تنظیمی سرما است (۲۱) که در '۵ ناحیه تنظیم‌کننده تبادلگرهای یون *NHX1* هر دو بافت برگ و ریشه شناسایی شد. جاگلو و همکاران (۲۲) در آرابیدوپسیس دریافتند که سازگاری با سرما شامل اتصال سریع TFهای اتصال DRE/CRT به DRE القایی با سرما است که منجر به بیان ژن مورد هدف عامل اتصال سرد (CBF)[2] می‌شود و تحمل به سرما را در آرابیدوپسیس افزایش می‌دهد. بنابراین این احتمال وجود دارد که نقش عناصر LTR در پاسخ تنش شوری نیز مانند عناصر MYB ناشی از القا اثر کم آبی تنش شوری باشد. تعداد بالای توالی‌های عناصر MRE و Sp1 که به عنوان عناصر (LREs)[3] شناخته می‌شوند در نواحی تنظیم کننده ژن تبادلگر یون *NHX1* برگ نشان می‌دهد که بیان این ژن به خوبی توسط نور تنظیم می‌شود. پاسخ‌گیاه به نور پیچیده است و بر فرآیندهای رشدی متعددی تأثیر می‌گذارد، بنابراین جایی که نور باید بر وضعیت یون‌ها در سلول ها نیز تأثیر بگذارد، یک پروموتور حساس به نور در ژن‌های تبادلگر لازم است تا عناصر cis-acting پاسخ به نور و TFهای اتصال آنها در تداخل با سایر مسیرهای هورمونی واحد پاسخ‌دهنده به تنش شوری را تشکیل دهند.

نقش عنصر تنظیم کننده cis پاسخ دهنده به هورمون و بیان ژن‌های مرتبط با آنها

عنصر تنظیمی TCA-element که در پاسخگویی به اسید سالیسیلیک دخیل است، در نواحی بالادستی تبادلگرهای یون *NHX1* هر دو بافت برگ و ریشه مشاهده شد. شناخته شده است که این عنصر در بسیاری از ژن‌های گیاهان وجود دارد و توسط تنش‌های مختلف القا می‌شوند. موتیف TCA و TCA-1 (یک فاکتور رونویسی) از طریق همکاری با سایر عناصر cis و TFs می‌توانند در بیان تنظیمی ژن‌های دفاعی که با تنش‌های مختلف مرتبط هستند، دخیل باشند (۲۳). تجمع سالیسیلیک اسید (SA) در گیاهان به عنوان یک مولکول سیگنال سیستمیک عمل می‌کند که به آنها کمک می‌کند تا خصوصاً با القا فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بر شرایط تنش غلبه کنند (۲۴).

[1] Late embryogenesis abundant protein

[2] Cold binding factor

[3] Light responsive cis-elements

بنـابراین، حضـور موتیـف TCA در '۵ ناحیـه تنظیمـی تبادلگرهـای یـون *NHX1* در هـر دو بافـت ریشـه و بـرگ نشان‌دهنده عملکـرد حیـاتی ایـن عنصـر تنظیمـی اسـت و ممکن است به نقش این تبادلگرهـای یـون در پاسـخ تـنش شوری گندم اشاره کند. وجود این عناصر در بالادست ناحیـه تنظیمی تبادلگرهـای یـون در حالیسـت کـه ژن دخیـل در بیوسـنتز هورمـون سالیسـیلیک اسـید UDP-glycosyltransferase 74F2 در گنـدم متحمـل در هـر دو کتابخانه برگ و ریشه بیان شـد. ایـن هورمـون، فراینـدهای حیاتی برای رشد و عملکرد گیاه را تحت تنش شوری تنظیم و پاسخ‌های تنش شوری را تعدیل مـی‌کنـد (۲۵). از طرفـی نیز در گروه کارکردی هومئوستاز ردوکـس و سـم‌زدایـی ژن سوپراکسـید دیسـموتاز (*SOD*) در کتابخانـه بـرگ و ریشـه گنـدم متحمـل شـوری افـزایش معنـی‌دار داشـت، بنـابراین می‌توان اسـتدلال نمـود کـه احتمـالاً افـزایش سـطح بیـان محافظ‌های اسمزی و آنزیم‌های اکسیدانی در گندم متحمـل شوری ممکن است به افـزایش سـطح هورمـون SA مربـوط باشد که یکی از راهکارهای موثر برای بهبـود تحمـل شـوری در گیاهان است. حضور موتیف p-box در '۵ ناحیه تنظیمـی ژن‌های تبادلگرهای یون *NHX1* ممکـن اسـت شـواهدی بـر اهمیـت اختصاصـیِ بافـتِ ریشـه بـودن ایـن ناقـل‌هـا در هومئوستاز جیبرلین (GA)، رشد و توسعه، پاسخ‌های جاذبـه و تحمل تنش سلول‌های ریشـه باشـد. عناصـر پاسـخگو بـه جیبرلین از جمله p-box نقش اساسی در عملکـرد GA ایفـا می‌کند. عناصر پاسخ به جیبرلین در اکثـر ژن‌هـای مسـئول سنتز، انتقال و پیام‌رسانی هورمون‌ها یافـت شـده اسـت، امـا نقـش آنهـا هنـوز مشـخص نشـده اسـت، اگرچـه تـداخل نامشخصی بین GA و سایر هورمون‌ها پیشـنهاد شـده اسـت (۲۶). بنابراین ممکن است حضور این موتیف‌ها در پرومـوتر، شواهدی از پدیـده تـداخل هورمـونی در تنظـیم رونویسـی، خصوصاً در بیان اختصاصی مکـان-زمـانی تبادلگرهـای یـون *NHX1* باشد. به این صـورت کـه در ریشـه مسـیر هورمـونی اسـید سالیسـیلیک ممکـن اسـت بـا مهـار یـا فعـال سـازی فاکتورهای رونویسی کلیدی خاص مسیر هورمونی جیبـرلین مخالفت کند و یا آنرا فعال کند و بیان اختصاصیِ بافتِ ریشه تبادلگرهای یون *NHX1* را رقم بزند. همانطور که در پژوهش وان در دوس و همکاران (۲۷)، نشان داده شده است که یک پروموتر مصنوعی که فقط حاوی چهار تکرار از موتیف-GCC box است با تیمار منفرد MeJA القا شد اما با تیمار ترکیبی MeJA[1] و SA سرکوب شد. این می‌تواند به خاطر ERFهـای سرکوب‌کننده ناشی از SA باشـد و یـا بـه خـاطر ERFهـای حاوی دمین EAR باشد که ممکن است با فعـال‌کننـده‌هـای ERF القا شده توسط JA برای اتصال بـه ژن هـای هـدف در شاخه ERF رقابت کنند. از ایـن‌رو، تحقیقـات تجربـی بـرای درک بهتر نقش این عوامل تنظیمی خصوصاً تداخل آنهـا در پاسخ گندم به تنش شوری مورد نیاز است. شناسایی ژن‌های مهم دخیل در تنش شوری و مکانیسـم‌هـای تنظیمـی آنهـا، نقش کلیدی را در تمامی روش های اصلاحی جهت دستیابی به واریته‌های متحمل ایفا می‌کند (۲۸).

نتیجه گیری

پاسخ شـوری در گیاهـان یـک پدیـده پیچیـده اسـت و مکانیسم تداخل در تنظـیم رونویسـیِ ژن‌هـای پاسـخگو بـه تنش این پیچیدگی را بیشتر می‌کند و هنوز به خـوبی درک نشـده اسـت. در ایـن پـژوهش نـواحی پروموتری ژن‌هـای تبادلگرهـای یـون *NHX1* بـه عنـوان نـواحی کلیـدی در پاسخ‌دهی به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفـت و بیـنش احتمـالی از تـداخل هورمـونی در عناصـر cis پروموترهـا در تنظیم اختصاصیِ بیان مکـان- زمـانی ژن تبادلگرهـای یـون *NHX1* ریشه ارائه شد. در پاسخ گیاهـان بـه تـنش شـوری، مسـیرهای هورمـونی مختلـف در یـک شـبکه پیچیـده از برهم‌کنش‌های هـم‌افزایـی، آنتاگونیسـتی و افزایشـی ادغـام می‌شوند. این ارتبـاط بـین مسـیری، کـه تـداخل هورمـونی نامیـده مـی‌شـود، دانـش مـا را در مـورد چگـونگی ادغـام مسیرهای مختلف در اختصاصیت بیان ژن‌هـای تبادلگرهـای یـون *NHX1* بیشـتر خواهـد کـرد. شناسـایی موتیـف‌هـای اختصاصی و تداخل مسیرهای موجـود در سـطح مولکـولی و سیستمی با هم برای طراحی محصولاتی بـا پاسـخ قـوی بـه تنش شوری بدون ایجاد اثرات جانبی نامطلوب مانند افزایش

[1] Methyl jasmonate

حساسیت به تنش های دیگر یا کـاهش رشـد و عملکـرد گیاه بسیار مهم است.

جدول ۱- مشخصات و نتایج تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن دو کتابخانه برگ و ریشه گندم

Table 1- Characteristics and results of comparatively gene expression analysis of two wheat leaf and root libraries

کتابخانه‌ها	برگ	ریشه	کل
تعداد EST	۱۱۳۵	۲۴۳۲	۳۵۶۷
تعداد EST فرا تنظیم شده	۴۱۳	۱۱۰۹	
تعداد EST فرو تنظیم شده	۶۰۵	۹۱۵	
تعداد EST بدون تغییر در بیان	۱۱۷	۴۰۸	
تعداد EST اختصاصی برگ	۷۰۸	-	٪ ۲۰
تعداد EST اختصاصی ریشه	-	۱۹۸۲	٪ ۵۶
تعداد EST مشترک در برگ و ریشه	۴۴۳		٪ ۱۳
تعداد EST در تطابق با پروتئین‌های ناشناخته و فرضی	۴۳۴		٪ ۱۱

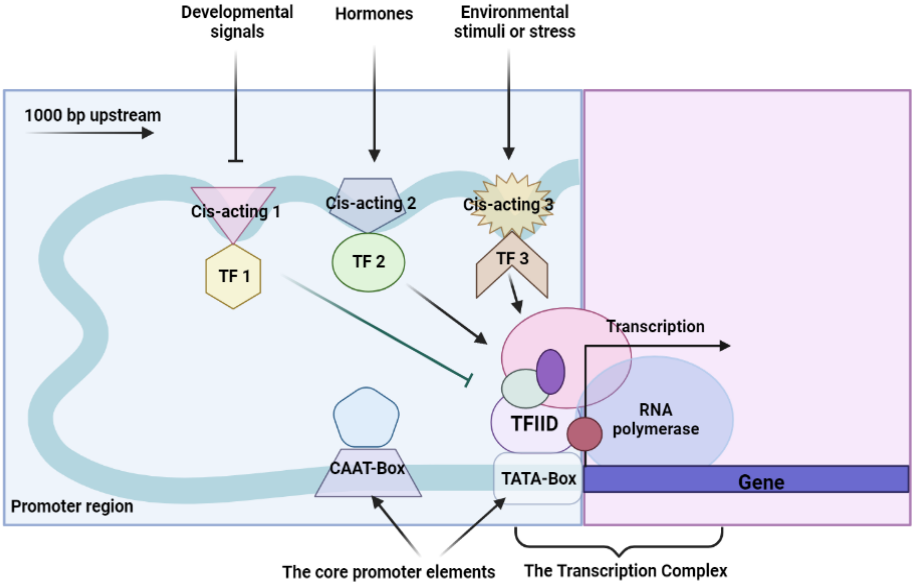
جدول۲- عناصر پروموتری ژن‌های *NHX1* به همراه توالی موتیف و اختصاصیت بیان و عملکرد عناصر تشکیل دهنده.

Table 2- Promoter elements of *NHX1* genes along with motif sequence and specificity of tissue and function of constituent elements.

عناصر پروموتر	توالی موتیف ('3-'5)	ریشه	برگ	عملکرد عنصر
AT~TATA-box	TATATA	×	×	عنصر اصلی پروموتر
CAAT-box	CAAT	×	×	عنصر مشترک تنظیمی در نواحی پروموتر و تقویت کننده
DRE core	GCCGAC	×	-	عنصر پاسخگو به شوری/خشکی
MYB	CAACCA	-	×	عنصر تنظیمی که در تنظیم بیان ژن القا شده با خشکی نقش دارد
GC-motif	CCCCCG	×	-	عنصر شبیه تقویت کننده که در القای اختصاصی آنوکسیک دخیل است
LTR	CCGAAA	×	×	عنصر تنظیمی که در پاسخگویی در دمای پایین نقش دارد
MRE	AACCTAA	-	×	سایت اتصال MYB که در پاسخگویی به نور نقش دارد
Myb	TAACTG	×	×	عنصر تنظیمی که در تنظیم بیان ژن القا شده باخشکی نقش دارد
STRE	AGGGG	-	×	ناشناخته
P-box	CCTTTTG	×	-	عنصر پاسخگو به جیبرلین
Sp1	GGGCGG	-	×	عنصر پاسخگو به نور
TATA-box	TATA	×	×	عنصر هسته پروموتر در ۳۰- شروع رونویسی
TCA-element	CCATCTTTTT	×	×	عنصر تنظیمی که در پاسخگویی به اسید سالیسیلیک نقش دارد
Unnamed__4	CTCC	×	×	ناشناخته
WRE3	CCACCT	-	×	ناشناخته

× نشاندهنده وجود عنصر تنظیمی در پروموتر ژن و – نشاندهنده عدم وجود عنصر تنظیمی در پروموتر ژن می‌باشد.

× indicates the presence of a regulatory element in the gene promoter and - indicates the absence of a regulatory element in the gene promoter.



شکل ۱- طرح شبکه‌های تنظیمی رونویسی. مجموعه شروع رونویسی توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌شود که توسط محرک‌های محیطی و یا سیگنال‌های رشدی، فعال یا سرکوب می‌شوند. عناصر cis-acting و فاکتورهای رونویسی(TF) در طرح نشان داده شده است.

Fig. 1- Transcription regulatory networks scheme. The transcription initiation complex is regulated by transcription factors that are activated or suppressed by environmental stimuli or growth signals. cis-acting elements and TF transcription factors are shown in the scheme.

تشکر و قدردانی

از همه کسانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نموده اند سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

1. Heidari, S., Heidari, P. and Heidari, B., 2022. Evaluation of drought stress-responsive genes expression of durum wheat using comparative genomics. J. Genet. Resour. 8(2): 147-157.
2. Isayenkov, S.V., 2012. Physiologic and molecular aspect salt stress plant. Cytol. Genet. 46: 302-318.
3. Al-huraby, A. and Bafeel, S., 2022. The effect of salinity on the *P. vulgaris*. Afr. J. Biol. Sci., 4(1): 94-107.
4. Vassilev, D., Leunissen, J. and Atanassov, A., 2005. Application of bioinformatics in plant breeding. Biotechnol. Biotechnol. Equip., 19: 139-152.
5. Heidari, S., Heidari, P. and Heidari, B., 2021. A survey of evolutionary changes of fatty acids and storage proteins in three Brassica species by comparative genomics method. NCMBJ, 12 (45) :27-38.
6. Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P. and Solano, R., 2014. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: 2367-2372.
7. Taylor, T.B., Shepherd, M.J., Jackson, R.W. and Silby, M.W., 2022. Natural selection on crosstalk between gene regulatory networks facilitates adaptation to novel environments. Curr. Opin. Microbiol., 67: 102-140.
8. Kaur, A., Pati, P.K., Pati, A.M. and Nagpal, A.K., 2017. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of Arabidopsis thaliana and *O. sativa*. PloS one, 12(9): e0184523.
9. Masoudi Nejad, A., Tonomura, K. and Kawashima, Sh., 2006. EGassembler: online bioinformatics service for large-scale

processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. Nucleic Acids Res., 34: 459-462.
10. McGinnis, S. and Madden, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res., 32: 20-25.
11. Romualdi, C., Bortoluzzi, S., d' Alessi, F. and Danieli, G.A., 2003. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. Physiol. Genomics, 12: 159-162.
12. Ramšak, Ž., Baebler, Š. and Rotter, A., 2014, GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. Nucleic Acids Res., 42: 1167-1175.
13. Reese, M.G., 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the Drosophila melanogaster genome. Comput. Chem., 26(1): 51-6.
14. Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. and 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 Res., 30(1): 325-7.
15. Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. and Quintero, F.J., 2006. Alcali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. J. Exp. Bot., 57: 1181-1199.
16. Paes de Melo, B., Carpinetti, P.A., Fraga, O.T., Rodrigues-Silva, P.L., Fioresi, V.S., de Camargos, L.F., Ferreira, M.F., 2022. Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. Plants, 11(9): 1100.
17. Qiu, Q.S., Guo, Y., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K., 2004. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in A. thaliana by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. J. Biol. Chem., 279: 207-215.
18. Hincha, D.K. and Thalhammer, A., 2012. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. Biochem. Soc. Trans, 40: 1000-1003.
19. Cao, Z.H., Zhang, S.Z., Wang, R.K., Zhang, R.F., and Hao, Y.J., 2013. Genome wide analysis of the apple MYB transcription factor family allows the identification of MdoMYB121 gene confering abiotic stress tolerance in plants. PLoS ONE, 8: e69955.
20. Wang, X., Niu, Y. and Zheng, Y., 2021. Multiple Functions of MYB Transcription Factors in Abiotic Stress Responses. Int. J. Mol. Sci., 22(11): 25-61.
21. Du, L., Li, S. and Ding, L., 2022. Genome-wide analysis of trehalose-6-phosphate phosphatases gene family in wheat indicates their roles in plant development and stress response. BMC Plant Biol., 22: 120
22. Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T. and Thomashow, M.F., 2001. Components of the arabidopsis C-repeat/dehydrationresponsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *B. napus* and other plant species. Plant Physiol., 127: 910-917.
23. Li, A., Sun, X. and Liu, L., 2022. Action of Salicylic Acid on Plant Growth. Front. Plant Sci., 27, 13: 878076.
24. Misra, N. and Misra, R., 2012. Salicylic acid changes plant growth parameters and proline metabolism in *R. serpentina* leaves grown under salinity stress. Environ Sci., 12: 1601-1609.
25. Yang, Q., Chen, Z.Z. and Zhou, X.F., 2009. Overexpression of SOS genes increases salt tolerance in transgenic arabidopsis. Mol. Plant, 2: 22-31.
26. Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S., 2003. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis Seed germination. Plant Cell, 15: 1591-1604.
27. Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N. and Pauwels, L., 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. Plant Cell, 25: 744-761.
28. Heidari, Sh. and Heidari, P., 2022. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity of the three Brassica species using insilico comparative analysis of the related genes. Crop biotech., 10(4): 23-36.