

## تجزیه و تحلیل بیان ژن های گیاه برنج تحت تنش شوری و شناسایی نقش عناصر cis راه انداز ژن TPC1 مسئول پیام رسانی دوربرد در تحمل شوری

شادی حیدری<sup>۱</sup>، پیوند حیدری<sup>۱</sup>، بهارک حیدری<sup>۲\*</sup>

۱. دانش آموخته دکتری، گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه کامپیوتر، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۰

### چکیده

شوری خاک یکی از محدودیت های عمده تولید برنج در سراسر جهان به ویژه در نواحی ساحلی است. حساسیت یا تحمل گیاه برنج به شوری به عملکرد هماهنگ ژن های پاسخ دهنده به تنش وابسته است. به منظور بررسی ژن های مرتبط با پاسخ تنش، تجزیه و تحلیل برجسب های توالی بیان شده از کتابخانه های برنج متحمل و حساس به شوری با ۴۵۷۱ و ۳۸۲۳ توالی EST از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد انجام شد. برای پیدا کردن شباهت بین دو کتابخانه، توالی های EST با استفاده از نرم افزار EGAAssembler هم گذاری شدند. یونیشن ها با استفاده از بلاست X توسط نرم افزار CLCbio در مقابل پروتئین های غیر تکراری بانک ژن آنالیز شدند. برای شناسایی ژن ها با بیان افتراقی بین کتابخانه ها، نرم افزار آماری IDEG6 و آماره Audic-Claverie استفاده شد. برای دسته بندی کاتالوگ های عملکردی، ابزار طبقه بندی مقایسه ای GoMapMan استفاده شد. اختلاف آماری معنی دار بین ژن های دو کتابخانه در ۹ گروه کارکردی مشاهده شد. نتایج، اهمیت ژن های دخیل در ۳ گروه کارکردی کلیدی نقل و انتقال، اجزای تشکیل دهنده مسیر پیام رسانی دوربرد و تنظیم اپی ژنتیک را در رقم متحمل به شوری مشخص و TPC1 را به عنوان نامزد احتمالی برای اصلاح مولکولی ژنوتیپ های برنج حساس به شوری معرفی می کند. عملکرد عناصر cis-acting ناحیه پروموتور این ژن، شبکه تنظیم کننده سازوکارهای پاسخ تنش شوری را مشخص می کند که برای درک بهتر مدیریت تنش در تحمل شوری گیاه برای کنار آمدن با پیامدهای تغییر اقلیم و سایر چالش های محیطی ضروری خواهد بود. بهبود سیستم پاسخ به تنش و سازگاری با آن ها در گیاهان می تواند در رسیدن به اهداف کشاورزی پایدار و امنیت غذایی در سراسر جهان کمک کند.

**کلیدواژگان:** برجسب های توالی بیان شده (EST)، بیان ژن، پروتئین کانال دو حفره ای کلسیم (TPC)، شوری خاک، نواحی تنظیمی پروموتور

## مقدمه

بخش چشم‌گیری از سطح قابل کشت گیاه برنج در نواحی ساحلی ایران تحت تأثیر شوری خاک است که بیشتر به دلیل نفوذ آب دریا است که باعث تجمع نمک می‌شود. تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری خاک از جدی‌ترین مشکلات کشت گیاه برنج به‌عنوان یکی از غلات اصلی در ایران است که باعث اثرات نامطلوب بر رشد، نمو و کاهش بیش از ۵۰ درصدی عملکرد و حتی مرگ گیاه می‌شود (Heidari et al., 2020). معرفی منابع جدید تحمل شوری به برنامه‌های اصلاح نژاد گیاه برنج برای تضمین امنیت غذایی نه‌تنها برای جمعیت رو به افزایش، بلکه برای افزایش پیوسته سطوح شوری از سواحل به اراضی کشاورزی ضروری است. بنابراین شناسایی صفات تحمل به تنش و ادغام آن‌ها در لاین‌های حساس برای تحمل پایدار ارزشمند است. تحمل به شوری به‌طور گسترده در گیاه برنج مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص شده است ارقام متحمل احتمالاً با کنترل روزه‌های خود و تولید املاح سازگار، به تنش شوری پاسخ می‌دهند. یک مکانیسم متداول برای تحمل شوری در گیاه برنج، حفظ محتوای کمتر  $Na^+$  سلول است که می‌تواند به دلیل حذف سدیم، جذب مؤثر نمک‌های سمی در برگ‌های مسن‌تر و ریشه‌ها و بخش‌بندی  $Na^+$  به داخل واکوئل‌ها و خارج از سلول‌ها باشد. علاوه‌براین، مکانیسم تحمل، فرآیندهای مختلف پیام‌رسانی شامل فعال‌سازی انتقال‌دهنده‌های  $Ca^{+2}$ ، پروتئین‌های متصل شونده به  $Ca^{+2}$ ، ABA، مسیر SOS، فراتنظیم بیان ژن‌های  $NHX1$  و مسیر  $MAPK$  و تولید ROS را تشکیل می‌دهد که هر کدام دارای چندین اثر پایین‌دستی در گیاهان متحمل هستند. تحقیقات نشان می‌دهند تحمل به شوری نه‌تنها یک صفت چندژنی است و تحت تأثیر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی متعدد مستقل است، بلکه در بین ژنوتیپ‌ها نیز بسیار متغیر می‌باشد (Tester and Davenport, 2003).

یک راهکار ایده‌آل، کارآمد، سریع و نسبتاً ارزان به‌منظور تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن برای ارزیابی تنوع در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری روش ژنومیکس مقایسه‌ای EST است (Vassilev et al., 2005). در مطالعه Chen و همکاران (2010) بیش از ۵۰ ژن مربوط به تنش شوری بالا از کتابخانه cDNA کلزا با استفاده از تجزیه و تحلیل بیان ژن شناسایی شدند و الگوی بیان ۱۳ ژن که بیشتر تحت

تأثیر تنش واقع شده بودند مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه‌ی آن چندین مکانیسم ژنتیکی مهم در تحمل تنش شوری شناسایی شد. Heidari و همکاران (2021) با استفاده از تجزیه و تحلیل EST داده‌های جمع‌آوری شده از پایگاه داده دانشگاه هاروارد، ژن‌های دخیل در مراحل تکاملی گونه‌های براسیکا را گزارش دادند و از نرم‌افزار IDEG6 برای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی بین کتابخانه‌ها استفاده کردند. از آنجایی که سازگاری گیاهان با تنش شوری نیازمند هموستاز یونی سلولی است و کانال‌های یون نقش مهمی در این هموستازی ایفا می‌کنند، درک شبکه‌های ژن تنظیم‌کننده در سازوکارهای پاسخ تنش، به تحلیل‌های عملکردی موفقیت‌آمیز عناصر cis-acting بستگی دارد. برای فرآیندهای اختصاصی از جمله پاسخ‌های تنش غیرزیستی و هورمونی، پروتئین‌های ناقل توسط عناصر cis واقع در ناحیه بالادست ژن‌های خودتنظیم رونویسی می‌شوند. با توجه به اهمیت عملکرد پروموتور، ابزارهای محاسباتی برای پیش‌بینی و طبقه‌بندی عناصر تنظیمی یک پروموتور بسیار مورد نیاز است. Kaur و همکاران (2017) تجزیه و تحلیل اینسلیکو عناصر تنظیمی cis-acting پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) را در آرآبیدوپسیس و گیاه برنج با استفاده از plantCARE پیش‌بینی نمودند. نتایج بررسی توزیع عناصر cis-acting، تعدد عملکردی PRs را نشان داد و بینشی را در مورد تنظیم آن ژن‌ها فراهم کرد. ژن‌های جدید و ژن‌هایی با عملکردهای ناشناخته که از طریق روش‌های اینسلیکو در مقیاس بزرگ شناسایی می‌شوند، تصویری از پاسخ شوری هم‌افزایی ارائه می‌دهند که نشان‌دهنده مکانیسم‌های بالقوه اساسی است که در زمینه ژنتیکی طبیعی گسترده برنج فعال هستند و زمانی که نقش‌هایشان از نظر عملکردی تأیید شود، کاربرد مؤثری در به‌نژادی لاین‌های حساس خواهند داشت. از این رو، هدف از این پژوهش، شناسایی ژن‌های دخیل در پاسخ تحمل به تنش شوری با استفاده از تجزیه و تحلیل منابع EST گیاه برنج جمع‌آوری شده از بانک اطلاعاتی دانشگاه هاروارد بود. علاوه بر این، نقش عناصر cis-acting ناحیه پروموتور ژن  $TPC1$  در درک شبکه تنظیمی این ژن در پاسخ به تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری داده‌ها و خصوصیات کتابخانه‌ها

کتابخانه‌های EST گیاه برنج متحمل (Pokk-13) و حساس به شوری (IR29-25) به ترتیب با ۴۵۷۱ و ۳۸۲۳ توالی EST تحت شرایط تنش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها از پایگاه داده دانشگاه هاروارد جمع‌آوری شدند. مشخصات کتابخانه‌ها به این صورت است که گیاهان در محلول هیدروپونیک با استفاده از سه تکرار از گیاه برنج متحمل و حساس به شوری رشد کردند. دو هفته پس از جوانه‌زنی (در مرحله چهاربرگی)، تنش شوری با ۱۲۰ میلی‌مولار (NaCl) به تدریج اعمال گردید و سپس نمونه‌ها از گیاهچه‌های ۱۴ روزه که با آبیاری حاوی غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار NaCl و پاسخ میان مدت (۸ ساعت تنش شوری) تیمار شده بودند، جمع‌آوری شدند. گروه‌های نمونه در نیتروژن مایع منجمد شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA و ساخت کتابخانه cDNA نگهداری شدند.

### پردازش توالی‌ها و تفسیر آماری

مراحل توالی‌یابی پس از ایجاد کتابخانه cDNA برش‌خورده طبق دستورالعمل انجام شد. سپس توالی‌ها در پایگاه داده دانشگاه هاروارد ذخیره شدند. در مرحله پیش‌پردازش، خالص‌سازی توالی‌های EST شامل پاک‌سازی توالی، پوشاندن تکرار، پوشاندن ناقل، پوشاندن اندامک و هم‌گذاری توالی با درصد تطابق  $N \geq 95$  cutoff انجام شد. برای یافتن شباهت‌های دو کتابخانه، تمام توالی‌های EST توسط نرم‌افزار Egassembler هم‌گذاری شد. در مرحله هم‌گذاری، توالی‌های EST در کانتیگ‌ها شامل دو یا چند EST و سینگلتن شامل فقط یک EST دسته‌بندی شدند (Masoudi Nejad et al., 2006). سپس همه یونیزن‌ها با استفاده از X-blast توسط نرم‌افزار CLC bio برابر پایگاه داده پروتئین‌های غیرتکراری با- $E$ -value  $\leq 10^{-5}$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (McGinnis et al., 2004). برای شناسایی ژن‌های با بیان

افتراقی در کتابخانه‌ها، از نرم‌افزار IDEG6 و آماره Audic-Claverie (Romualdi et al., 2003) استفاده شد.

### دسته‌بندی عملکردی و تجزیه و تحلیل GO

برای دسته‌بندی کاتالوگ‌های عملکردی، ابزار طبقه‌بندی مقایسه‌ای و کاربردی GoMapMan<sup>۴</sup> به صورت آنلاین استفاده شد (Ramsak et al., 2014). جهت یافتن کاتالوگ‌های عملکردی متفاوت از نظر آماری در دو کتابخانه، از نرم‌افزار IDEG6 و آزمون Audic-Claverie استفاده گردید.

### تحلیل اینسیلیکو نواحی تنظیمی ۵' ژن

به منظور تجزیه و تحلیل نواحی پروموتور ژن، توالی کامل ژن *TPC1* از سایت دانشگاه هاروارد دانلود شد. ناحیه پروموتوری ژن با استفاده از سایت BDGP<sup>۵</sup> با نمره cutoff ۰/۸۰ که شامل رشته معکوس نمی‌باشد، پیش‌بینی شد (Reese et al., 2001). به منظور تجزیه و تحلیل ناحیه پروموتوری و عناصر cis-acting ناحیه پروموتوری ژن *TPC1*، توالی پیش‌بینی‌شده پروموتور به عنوان ورودی به سایت plantCARE<sup>۶</sup> وارد شد (Lescot et al., 2002).

## نتایج و بحث

### تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن‌ها و نقش آن‌ها در

#### تحمل گیاه برنج به تنش شوری

نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن دو کتابخانه متحمل و حساس گیاه برنج تحت شرایط تنش شوری در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. بعد از هم‌گذاری با استفاده از نرم‌افزار Egassembler، تعداد ۱۳۴ کانتیگ و ۱۷۴۵ سینگلتن در کتابخانه گیاه برنج متحمل و ۹۸ کانتیگ و ۱۴۳۲ سینگلتن در کتابخانه گیاه برنج حساس تشکیل شد. ۱۲ درصد از کل EST ها در گیاه برنج سهم خیلی ضعیفی ( $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند. به عبارت دیگر، هیچ توالی مشابهی با آن‌ها وجود نداشت و یا با پروتئین‌های ناشناخته و فرضی همولوژی داشتند. کانتیگ ۱۷ و ۸۶ (به ترتیب با

<sup>۱</sup> <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>

<sup>۲</sup> <http://egassembler.hgc.jp>

<sup>۳</sup> <http://telethon.bio.unipd.it/ideg6>

<sup>۴</sup> <http://www.gomapman.org>

<sup>۵</sup> [https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

<sup>۶</sup> <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare>

و پاسخ به تنش، تنظیم رونویسی، سنتز و تخریب پروتئین، تاخوردگی پروتئین، فتوسنتز، تنظیم اپی ژنتیک، رشد و نمو و پیام‌رسانی بودند.

تعداد ۲۵ و ۱۶ EST، در کتابخانه گیاه برنج متحمل به تنش شوری، می‌توانند به‌عنوان کاندیدای ژن‌هایی که هنوز شناخته نشده‌اند جداسازی و توالی‌یابی شوند. ۹ گروه کارکردی با اختلاف معنی‌دار شامل نقل و انتقال، دفاع گیاه

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

| کتابخانه‌های برنج                                 | متحمل | حساس | کل   |
|---------------------------------------------------|-------|------|------|
| تعداد EST                                         | ۴۵۷۱  | ۳۸۲۳ | ۸۳۹۴ |
| تعداد کانتینگ                                     | ۱۳۴   | ۹۸   | ۲۳۲  |
| تعداد سینگلتن                                     | ۱۷۴۵  | ۱۴۳۲ | ۳۱۷۷ |
| تعداد EST در تطابق با پروتئین‌های ناشناخته و فرضی | ۶۰۹   | ۳۹۸  | ۱۰۰۷ |

جدول ۲- تفسیر و سطح بیان ESTها با اختلاف معنی‌دار بین کتابخانه‌های گیاه برنج متحمل و حساس به تنش شوری

| تطابق فرضی                                         | Accession ID (Uniprot) | اجزای سلولی     | فرآیندهای بیولوژیکی | متحمل | حساس | p-value*   |
|----------------------------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|-------|------|------------|
| Two pore calcium channel protein 1                 | Q94KI8                 | غشاء سلولی      | نقل و انتقال        | ۱۲    | ۳    | $5E^{-32}$ |
| Respiratory burst oxidase homolog protein D        | Q9FIJ0                 | غشاء سلولی      | دفاع گیاه           | ۹     | ۱    | $3E^{-17}$ |
| Trehalase                                          | Q9SU50                 | غشاء سلولی      | پاسخ تنش            | ۱۳    | ۵    | $2E^{-19}$ |
| S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme       | A0A3B6C                | سیتوزول         | پاسخ به کم‌آبی      | ۱۱    | ۴    | $3E^{-70}$ |
| Abscisic acid responsive elements-binding factor 2 | F4HRC9                 | هسته            | تنظیم رونویسی       | ۵     | ۱    | $3E^{-18}$ |
| Cysteine protease 1                                | Q7XR52                 | لیزوزوم         | پروتئولیز           | ۲     | ۹    | $1E^{-12}$ |
| Calreticulin                                       | A0A287SV               | شبکه اندوپلاسمی | تاخوردگی پروتئین    | ۶     | ۱    | $1E^{-69}$ |
| Chlorophyll a/b-binding proteins                   | A0A251VQ               | کلروپلاست       | فتوسنتز             | ۹     | ۲    | $2E^{-19}$ |
| Expansin                                           | A0A446SD               | دیواره سلولی    | سازمان‌دهی دیواره   | ۹     | ۴    | $3E^{-37}$ |
| DNA (cytosine-5)-methyltransferase                 | M7ZDP6                 | هسته            | تنظیم بیان ژن       | ۴     | ۱۱   | $7E^{-82}$ |
| Histone deacetylase                                | I1I3A6                 | هسته            | تنظیم کروماتین      | ۱     | ۷    | $1E^{-66}$ |
| Mitogen-activated protein kinase 1                 | Q8VXC2                 | سیتوپلاسم       | پیام‌رسانی          | ۶     | ۰    | $5E^{-12}$ |

\*p-value به آماره Audic-Claverie برای بیان متفاوت اشاره دارد.

واکوئولی *TPC1* در انتشار امواج کلسیم و در هموستاز کاتیون‌ها نقش دارد. در سال‌های اخیر، نقشی برای *TPC1* در یک سیستم پیام‌رسانی سریع و دوربرد مبتنی بر امواج  $Ca^{2+}$  کشف شده است. مشخص شده است در پاسخ به محرک شوری موضعی در ریشه آرابیدوپسیس، موج کلسیم عمدتاً از طریق قشر اندودرمیس با سرعت حداکثر ۴۲۰ میکرومتر بر ثانیه حرکت می‌کند و برای فعال‌سازی ژن‌های پاسخ به تنش در ساقه مورد نیاز است. کمبود *TPC1* سرعت حرکت این موج محرک را تا حد زیادی کاهش

در گروه کارکردی نقل و انتقال، ژن کدکننده پروتئین کانال دو حفره‌ای کلسیم (*TPC*) بین دو کتابخانه گیاه برنج تحت تنش شوری، بیشترین اختلاف معنی‌دار را داشت. خانواده ژن‌های (*TPC*) کانال‌های یونی نفوذپذیر  $Ca^{2+}$  داخل سلولی را با اختصاصیت و عملکردهای مختلف در گیاهان تشکیل می‌دهند. آن‌ها توسط ولتاژ و  $Ca^{2+}$  در واکوئل‌های گیاهی تنظیم می‌شوند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد میزان بیان این ژن‌ها با افزایش تنش شوری افزایش می‌یابد (Choi et al., 2014). کانال کاتیون

می‌دهد، درحالی‌که بیان بیش‌ازحد *TPC1*، آن را تسریع می‌کند. بنابراین *TPC1* نقش مهمی در پیام‌رسانی دوربرد در پاسخ به تنش شوری دارد (Choi et al., 2014). اینکه چطور تراکم یا توزیع *TPC1* در غشای واکوئل بر سرعت موج کلسیم دوربرد تأثیر می‌گذارد، خصوصاً در گیاهان زراعی، تا حد زیادی ناشناخته مانده است. این نتایج نقش مهم *TPC1* را در توانایی تحمل شوری گیاه برنج مشخص می‌کند و لزوم تعیین عملکرد عناصر *cis-acting* ناحیه پروموتور این ژن را در فهم شبکه تنظیم‌کننده سازوکارهای پاسخ تنش شوری نشان می‌دهد. ضمن اینکه *TPC1* را به‌عنوان یک ژن، نامزد احتمالی برای اصلاح مولکولی ژنوتیپ‌های برنج حساس به شوری معرفی می‌کند.

از ژن‌هایی که در گروه کارکردی دفاع گیاه و پاسخ تنش در کتابخانه گیاه برنج متحمل افزایش معنی‌دار داشتند، EST تفسیرشده به پروتئین‌های دخیل در بیوسنتز اسمولیت‌های سازگار شامل پرولین، گلیسین بتائین، قندها، پلی‌آمین‌ها، پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین‌زایی (*LEA*) و پروتئین D همولوگ‌های اکسیداز انفجار تنفسی (*RBOHD*) بودند. نقش اسمولیت‌ها و *LEA* در پاسخ به تنش شوری به‌طور گسترده در گیاهان مختلف مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. ژن‌های دخیل در بیوسنتز اسمولیت‌های سازگار راهکار اصلی گیاهان برای حفظ پتانسیل اسمزی داخل سلولی تحت شوری بالا است. از بین قندها، ژن دخیل در بیوسنتز ترهالوز (*TRE1*) که یک دی‌ساکارید غیر کاهنده گلوکز است، در گیاه برنج متحمل افزایش بیان قابل توجهی داشت. مشخص شده است گیاهان برنج تراریخته با بیان بیش‌ازحد *TRE1* از گونه‌های هالوفیت، تحمل تنش شوری را افزایش داده‌اند (Islam et al., 2019). پرولین، گلیسین بتائین و ترهالوز علاوه بر نقش آن‌ها در تنظیم اسمزی، برای ایجاد ثبات در پروتئین‌ها و ساختارهای غشایی و همچنین یک مهارکننده ROS عمل می‌کنند که تنش اکسیداتیو را تحت شوری زیاد کاهش می‌دهند (Kubala et al., 2015). از ژن‌های دخیل در بیوسنتز پلی‌آمین‌ها، ژن بیوسنتز اسپرمین یعنی پیش‌آنزیم S-آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز (*AMD*) در برنج متحمل افزایش بیان نشان داد. پژوهش‌های زیادی نشان داده است فراوانی اسپرمین (از شایع‌ترین پلی‌آمین‌ها)

با افزایش تحمل شوری همراه است (Alet et al., 2012). Ma و همکاران (2012) نشان داده‌اند *RBOHD* تحت تنش شوری فراتنظیم می‌شود و جهش‌یافته‌های ژن منجر به افزایش حساسیت به تنش شوری می‌گردند. تولید ROS ناشی از شوری توسط *AtRbohD* حرکت  $K^+$  به سیتوزول را پیش می‌برد و بنابراین نسبت  $Na^+/K^+$  را کاهش می‌دهد. تولید  $H_2O_2$  به واسطه *AtRbohD* در مرحله اولیه تنش شوری می‌تواند سیگنالی باشد که باعث پاسخ آنتی‌اکسیدانی می‌شود و آسیب اکسیداتیو سلول‌ها را کاهش می‌دهد (Ben Rejeb et al., 2015). *AtRbohD* واسطه‌ای انتشار سیگنال‌های دوربرد است که توسط محرک‌های مختلف محیطی از جمله شوری بالا، زخمی‌شدن، گرما، سرما و نور با شدت زیاد تحریک می‌شوند و ROS ناشی از آن‌ها برای پیام‌رسانی سیستمیک در گیاهان موردنیاز است (Miller et al., 2009). تاکنون گزارش‌های اندکی در مورد نقش *RBOHD* در پیام‌رسانی دوربرد در گیاهان زراعی گزارش شده است. Yamauchi و همکاران (2017) عملکرد NADPH اکسیداز *RBOH* را در گیاه برنج در شرایط کمبود اکسیژن گزارش نمودند. این پژوهش لزوم تحقیقات بیشتر در آینده در زمینه نقش *RbohD* در پیام‌رسانی سیستمیک SAA دوربرد در گونه‌های زراعی را ایجاب می‌کند.

در گروه کارکردی تنظیم رونویسی، افزایش بیان فاکتور اتصال به عناصر پاسخگو به آب‌سبزیک ۲ (*ABF2*) مشاهده شد. مشخص شده است بیان *ABF2* توسط ABA و تنش‌های کم‌آبی مانند خشکی و شوری زیاد القا می‌شود و این فاکتور، تنظیم‌کننده اصلی پیام‌رسانی ABA در پاسخ به تنش اسمزی است (Fujita et al., 2011). در پنبه گزارش شده است بیان بیش‌ازحد *ABF*، از طریق تنظیمات روزنه‌ای که باعث کاهش تعرق و بهره‌وری فتوسنتز می‌شود، به میزان قابل توجهی تحمل به شوری را افزایش می‌دهد (Kerr et al., 2018).

در گروه کارکردی سنتز و تخریب پروتئین، در گیاه برنج حساس به شوری، سیستمین پروتئاز ۱ (*CP*) افزایش بیان داشت. پروتئولیز توسط سیستمین پروتئازها، یک فرآیند بسیار تنظیم‌شده است و *CP*‌ها در پاسخ به محرک‌های مختلف خارجی در بلوغ، تخریب و بازسازی پروتئین نقش

الگوهای مختلف بیان را در بافت های مختلف نشان می دهند و تحت تنش شوری گندم، به شدت القاء می شوند. بیان بیش از حد ژن *TaCRT1* در توتون باعث کاهش آسیب تنش شوری در گیاهان توتون تراریخته شد و در نهایت منجر به افزایش تحمل قابل توجهی به تنش شوری گردید. مطالعات فیزیولوژیکی نشان داد گیاهان توتون تراریخته فعالیت های بیشتری از سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز نسبت به توتون غیر تراریخته در شرایط رشد طبیعی نشان می دهند.

از ژن های با بیان متفاوت در گروه کارکردی فتوسنتز، پروتئین متصل شونده به کلروفیل a-b (*LHCB*) تحت تنش شوری بود. Seemann و Critchley (1985) گزارش کردند افزایش شوری به طور مستقیم بر آنزیم های فتو سنتز تأثیر می گذارد و موجب مهار فتوسنتز می گردد. Yeo (1998) گزارش کرد بین فعالیت فتو سنتز و محتوای  $\text{Na}^+$  در برگ، در تعدادی از گونه های زراعی مانند گیاه برنج، رابطه منفی وجود دارد.

از ژن های متفاوت دخیل در گروه کارکردی رشد و نمو، ژن اکسپانسیون در گیاه برنج تحت تنش شوری بود. اکسپانسیون به خانواده ای از پروتئین های غیر آنزیمی مربوط به دیواره سلول های گیاهی متعلق است که در رشد سلول های گیاهی و فرآیندهایی که در آن سست شدن دیواره سلول اتفاق می افتد، نقش دارد. تأثیر pH آپوپلاستیک بر رشد سلول ها به طور عمده با تنظیم فعالیت های اکسپانسیون واسطه می شود. اکسپانسیون ها با سست شدن دیواره های سلولی تحت تنش های مختلف محیطی از جمله شوری زیاد و تنش خشکی، گسترش سلول را تسهیل می کنند و به تنش ها پاسخ می دهند (Wu and Cosgrove, 2000).

در گروه کارکردی تنظیم اپی ژنتیک، افزایش بیان ژن های DNA (سیتوزین-۵)، متیل ترانسفراز و هیستون دی استیلاز (*HDA*) در گیاه برنج، اساس مشاهده شد. تنظیمات اپی ژنتیکی تحت تنش های مختلف در گیاهان زراعی نیز به طور گستره گزارش شده است. ارزیابی سطح کلی متیلاسیون DNA در انواع گیاه برنج که تا حد زیادی در تحمل شوری متفاوت است، نشان داد متیلاسیون DNA پس از قرار گرفتن در معرض تنش شوری کاهش می یابد. در برگ های رقم متحمل به شوری، کاهش کل متیلاسیون DNA به ۷۰ درصد متیلاسیون رسید. در

دارند و همچنین عملکرد خانه داری برای از بین بردن پروتئین های غیر طبیعی و غلط تاخورد دارند. در پاسخ به عوامل زیستی و غیرزیستی محیطی، تخریب پروتئین های آسیب دیده یا دنا توره شده تحت تنش با سنتز پروتئین های جدید همراه است، به طوری که پروتئین های غلط تاخورد و آسیب دیده با تخریب پروتئازی از بین می روند. آمینواسیدهای آزاد شده، برای سنتز پروتئین های جدید مورد استفاده مجدد قرار می گیرند و پروتئین های تازه تشکیل شده دوباره ساخته و به عنوان پروتئین های شوک سرما و گرما، پروتئین های ناشی از کم آبی و پروتئین های دفاع مرتبط جایگزین می شوند (Schaffer and Fischer, 1990). اظهارات متناقضی در مورد نقش CP ها گزارش شده است؛ برخی از شواهد تجربی نشان می دهد گونه های حساس به خشکی در مقایسه با گونه های مقاوم، دارای فعالیت پروتئولیتیک بالاتری هستند که در توافق با نتایج مطالعه حاضر است (Hieng et al., 2004). گندم تراریخته با کاهش فعالیت پروتئاز سیستمین هنگام قرار گرفتن در معرض خشکی، افت تأخیر آب و پیری را نشان می دهند و دارای سرعت فتوسنتز بالاتر و همچنین کلروفیل کل بالاتر در مقایسه با گیاهان نرمال بودند. از طرفی، گزارش شده است برخی پروتئازها مجموعه ای از مکانیسم ها را در گندم تحت تأثیر قرار می دهند تا محصول تحمل بیشتری نسبت به تنش آبی ناشی از خشکی کسب کند (Bailey et al., 2015). در مطالعه Chen و همکاران (2010) مشخص شده است افزایش فراوانی CP می تواند تحمل آرابیدوپسیس به تنش شوری را افزایش دهد. این نتایج متناقض احتمالاً حاکی از آن است که این ژن ها در مواجهه با تنش های مختلف دارای عملکرد اختصاصی می باشند و باید بیشتر مورد تحقیق قرار گیرند.

ژن دیگری که در تاخوردگی پروتئین نقش دارد و بین دو کتابخانه اختلاف بیان نشان داد، کالریتیکولین بود. (*CRT*) یک پروتئین چندمنظوره بسیار حفاظت شده و فراگیر است که توسط یک خانواده ژنی کوچک رمزگذاری می شود و اغلب با پاسخ تنش ها در گیاهان همراه است. با این حال، نقش های این پروتئین در پاسخ های تنش شوری در گیاه برنج همچنان مبهم است. در مطالعه Xiang و همکاران (2015) سه ژن *TaCRT1*، *TaCRT2* و *TaCRT3-1* نام گذاری شدند. داده های بیان PCR در زمان واقعی، نشان داد این سه ژن

در گروه کارکردی پیام‌رسانی، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن، در ژنوتیپ متحمل، افزایش بیان نشان داد. در گیاهان چندین *MAPK* وجود دارد که به‌طور هماهنگ تکثیر، تمایز، تحرک و بقای سلول را تحت تنش‌های مختلف تنظیم می‌کنند. در آرابیدوپسیس، مطالعه قبلی نشان داده است که رونوشت *MAPK* در پاسخ به تنش‌های محیطی، از جمله شوری زیاد تجمع می‌یابد (Mizoguchi et al., 1996). Munnik و همکاران (1999) گزارش کردند *MAPK* القاء‌شده با شوری ۴۶ کیلو دالتونی در یونجه توسط شوری فعال می‌شود. گزارش شده است تنش اسمزی، بیان *AtMPK3*، *AtMPK4* و *AtMPK6* را در آرابیدوپسیس فعال می‌کند (Droillard et al., 2004). سه *MAPK* ناشی از تنش شوری، *ZmMPK3*، *ZmMAPK5* و *ZmSIMK1* در گیاه ذرت شناسایی شده‌اند (Wang et al., 2010). *OsMAPK5* با بیان بیش‌از حد در گیاهان تراریخته تحمل را افزایش می‌دهند در حالی که سرکوب منجر به حساسیت شدید به تنش‌های مختلف، از جمله شوری می‌شود (Xiong et al., 2003). بنابراین پژوهش حاضر نشان می‌دهد پروتئین *MAPK* در گیاه برنج متحمل، احتمالاً وقایع متنوع سلولی را با پخش سیگنال‌های خارج سلولی به پاسخ‌های داخل سلولی تنظیم می‌کند.

**تجزیه و تحلیل ناحیه پروموتور ژن *TPC1* و نقش عناصر cis در تنظیم پاسخ گیاه برنج به تنش شوری**

نتایج تجزیه و تحلیل نواحی پروموتور پیش‌بینی‌شده ژن *TPC1* در شکل ۱ آورده شده است. عناصر هسته پروموتور از جمله چندین جعبه TATA و CAAT، در موقعیت‌های مختلف پیش‌بینی شد. مجموعه‌ای از عناصر تنظیم‌کننده cis از جمله عناصر پاسخگو به تنش‌ها و محرک‌های محیطی شامل تنش خشکی (DRE/CRT و Myb)، عنصر مرتبط با پاسخ‌های اکسیداتیو (as-1)، عناصر پاسخ‌دهنده به نور (Box 4، TCT-motif)، عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون متیل جاسمونات (CGTCA-motif، TGACG-motif) و اسید سالیسیلیک (TCA-element)، عنصر درگیر در پاسخگویی به ساعت شبانه (circadian) و عنصر دیگر با کارکرد ناشناخته شامل (Unnamed-4) شناسایی شدند.

مقابل، در رقم حساس به شوری، افت متیلاسیون فقط ۱۴ درصد و از نظر آماری معنی‌دار نبود (Ferreira et al., 2015). برخلاف مطالعه فوق، تحقیق دیگری در ارقام گیاه برنج تحت تنش شوری تغییرات جزئی متیلاسیون DNA در برگ‌ها را مشخص نمود (Wang et al., 2015). این تناقض ممکن است به دلیل روش متفاوت در شناسایی و تعیین کمی تغییرات متیلاسیون DNA (پلی‌مورفیسم طول قطعه تکثیر شده حساس به متیلاسیون-MSAP) در مقابل روش ایمونولوژیک یا لاین‌های مختلف گیاه برنج باشد.

علاوه بر این، مشخص شده است آنزیم‌های هیستون دی‌استیلاز ۶ (HDA6) با سرکوب بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده ABA مانند *ABI1* و *ABI2* تحمل شوری را کاهش می‌دهند (Luo et al., 2012). Ullah و همکاران (2021) گزارش دادند گیاه برنج جهش‌یافته *hda710* تحمل شوری را افزایش داده و حساسیت ABA را کاهش می‌دهد، در حالی که گیاه تراریخته با بیان بیش‌از حد *HDA710* فنوتیپ‌های مخالف را نشان می‌دهند. تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ به تنش، به‌ویژه ژن‌های مربوط به تنش کمبود آب، در جهش‌یافته‌های *hda9* تنظیم شده و بیش‌از حد استیله شدند، که نشان می‌دهد *HDA9* ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی در تعدیل بیان ژن پاسخ‌دهنده به تنش از طریق داستیلاسیون هیستون عمل کند (Chen et al., 2016). اختصاصیت بیان این دسته از ژن‌ها تا حدی است که مشخص شده است *OsHDA709* توسط تیمار خشکی القا می‌شود، اما با شوری زیاد سرکوب می‌گردد (Zhong et al., 2013). با توجه به نتایج این مطالعه، تغییرات اپی‌ژنتیکی به‌عنوان یکی از جنبه‌های مهم در بررسی بیان ژن‌ها تحت شوری مرتبط با ژنوتیپ‌های مختلف گیاه برنج پیشنهاد می‌شود. در مطالعه Jiang و Berger (2017) عنوان شده است برخی تغییرات کروماتین مانند متیلاسیون DNA و هیستون H3 لیزین ۲۷ تری‌متیلاسیون (H3K27me3) می‌تواند از طریق میوز یا میتوز منتقل شود و به توارث برسد. از این رو، مکانیسم‌هایی کلیدی را برای حافظه تنش گیاه فراهم می‌کند که گیاهان را قادر می‌سازد تا با یادآوری تنش‌های قبلی "تنش پرایمینگ" پاسخ تنش خود را افزایش دهند و یا در مقابل سایر تنش‌ها مقاومت کسب نمایند.



```

>PlantCARE_14929
+ ATCCAGAAGT GAGCATCAGG CAGATGCGAC GTCAGGCTTT GTCTATAAGA GTGGTGTTC TATGTTCTCT
- TAGGTCTTCA CTCGTAGTCC GTCTACGCTG CAGTCCGAAA CAGATATTCT CACCACAAAG ATACAAGAGA
+ GAAAACTTTA ATTCTTAAAC TGATATATTT GACGCAAACT TGCCGTTCCT TTCAATTTTA GGTGTTTCT
- CTTTGTAAAT TAATAATTAG ACTATATATA CTGCGTTTGA ACGGCAAGAA AAGTTAAAGT CCCACAAAGA
+ CTCTAAAAAT GTGTCTTCT TACTGCTTCA CAACTGTGG TCTCCAAGGG TATGT CAAT CTCTAATTGC
- GAGATTTTCA CACAGAAAGA ATGACGAAGT GTTGACACC AGAGGTTCCC ATATTCTTCA GAGATTAAC
+ CCCACTTCCG TGCAAGCTTG ATGATAAGAA GTCTCTAATT GCCCACTTC CGTGCAAGCT TGATGCTATC
- GGGTGAAGGC ACGTTCGAAC TACTATTCTT CAGAGATTAA CCGGTGAAG GCACGTTCGA ACTACGATAG
+ TGTTTTTTTG GTGCAAAAAA GCACATTCA GTAGTTCGGG AAGCATGCTC ATGAGTGTCA AGGATATAAA
- ACAAAAAAAC CACGTTTTTT CGTGGAAGT CATCAAGCCC TTCGTACGAG TACTCACAGT TCCTATATTT
+ TACGTCGATG TTGCACTGTT TGCAGCAACA TTCTATCTAT GCTAATATAA AAGATGGTAA TGGTGAGTCT
- ATGCAGCTAC AACGTGACAA ACGTCGTTGT AAGATAGATA CGATTATATT TTCTACCATT ACCACTCAGA
+ ACCACCACCA ACACAGCTGG ATATAGAAAA CAGCTCCCTCG CAGAAAGTGT GGCAAGAAGT TGATGTTGAA
- TGGTGGTGGT TGTGTCGACC TATATCTTTT GTCGAGGAGC GTCTTTCACA CCGTCTTCA ACTACAACCT
+ TCTTAATAAT TGCCCTGAAC TTTACTTTGA ATCATCACTT TAAGGTGTAG CTATATTTAT GGTGCCATAT
- AGAATTATTA ACGGACTTG AAATGAACT TAGTAGTGA ATCCACATC GATATAAATA CCACGGTATA
+ TTTTCATCAA AAAATAGTCG GCAATTTTTC ATCAAAAAAT AGTCGGCATG TATTACATT GTAAGTCCCT
- AAAAGTAGTT TTTTATCAG CGTTAAAAAG TAGTTTTTTA TCAGCCGTAC ATAAATGTA CATTCAGGGA
+ AAATAATTAC ATATGTAAGT GGGGTGTAAA TGAGGTGTAA CTACTGTGTA AGTTTTTTTT TTTAAAAAAA
- TTTATTAATG TATACATTCA CCCACATTT ACTCCACATT GATGACACAT TCAAAAAAAA AAATTTTTTT
+ AGGCCCTGCA GGAAGAAAGC AAGAACAGAA AAAAGGAAGA ATATATATAA TCGCAAAAAA AAAGGTAGAG
- TCCGGGACGT CCTTCTTTCG TTCTTGCTCT TTTTCCTTCT TATATATATT AGCGTTTTTT TTTCCATCTC
+ TATACATACT TTCTTCCTAC ACATATAAAC TTCCAACCTT TTTCTTCAA TTTCAATTTT AG
- ATATGTATGA AAGAAGGATG TGTATATTTG AAGGTTGAAA AAAGAAGTTT AAAGTTAAAA TC
TATA-box

```

شکل ۱- نتیجه تجزیه و تحلیل پروموتور پیش‌بینی‌شده ژن *TPC1* توسط وبسایت plantCARE موتیف‌ها و عناصر cis-acting با رنگ‌های مشخص توالی‌های آن‌ها در شکل نشان داده شده‌اند.

رونویسی *MYB* با توجه به دخالت آن‌ها در تنظیم اپی‌ژنتیک پاسخ‌های تنش در گیاهان خصوصاً در آرابیدوپسیس به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و نقش فاکتورهای رونویسی *MYB* در تنظیم اپی‌ژنتیک پاسخ‌های تنش در گیاهان مشخص شده است (Roy, 2016). اگرچه این مطالعات نقش فاکتورهای رونویسی *MYB* را در تنظیم پاسخ‌های تنش غیرزیستی در ژنوم گیاه نشان داده‌اند، مکانیسم ارتباط آن با کنترل اپی‌ژنتیکی تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. مطالعات جانوری نیز جهت درک مکانیسم تنظیم اپی‌ژنتیکی ژن‌های هدف از طریق فاکتورهای رونویسی *MYB* انجام شده‌اند. انکوژن v-

مشخص شده است اتصال عنصر cis DRE/CRT با فاکتورهای رونویسی *DREB* برای کنترل بیان ژن پایین‌دست، تحمل گیاه را در برابر تنش‌های غیرزیستی و عمدتاً خشکی و شوری افزایش می‌دهد (Liu et al., 1998). Myb نیز یک عنصر cis القاء‌شونده با خشکی است که به‌عنوان یک محل اتصال برای فاکتور رونویسی *MYB* عمل می‌کند. گیاهان مکانیسم‌های بسیار کارآمد و قابل‌توجهی را برای زنده ماندن در شرایط تنش محیطی مکرر و شدید ایجاد کرده‌اند. قرار گرفتن گیاهان در معرض عوامل تنش مختلف با تغییرات هماهنگ در بیان ژن در سطح رونویسی همراه است؛ از این رو عوامل رونویسی، مانند آن‌هایی که به خانواده *MYB* تعلق دارند، نقش اصلی را در ایجاد پاسخ‌های مناسب ایفا می‌نمایند. فاکتورهای

<sup>1</sup> Dehydration responsive element/C-repeat



myb و ویروس میلوبلاستوز پرندگان AMV فاکتور رونویسی v-Myb را کد می‌کند که نشان داده شده است سلول‌های میلومونوسیتی<sup>۲</sup> را از طریق حذف تنظیم‌آز بیان ژن‌های هدف خاص تغییر می‌دهد. ژن *mim-1* مرغ، هدف ژن *c-Myb* توسط *v-Myb* فعال نمی‌شود و علاوه بر یک پروموتور پاسخ‌دهنده به *Myb*، حاوی یک عنصر تقویت‌کننده خاص سلولی و القایی *Myb* است. مطالعات نشان داده‌اند فعال‌سازی وابسته به *Myb* ژن *mim-1* با بازسازی گسترده معماری نوکلئوزومی در ناحیه تقویت‌کننده مرتبط است که نشان‌دهنده دخالت مستقیم بازسازی سازمان کروماتین ناشی از *Myb* در یک مکان هدف مربوطه است (Wilczek *et al.*, 2009). این نتایج می‌تواند بینشی در مورد عناصر تنظیمی *myb* در رابطه با تنظیم اپی‌ژنتیک ژن‌های *TPC1* در پاسخ به تنش شوری در گیاه برنج فراهم نماید.

عنصر دیگر مرتبط با پاسخ تنش اکسیداسیو (*as-1*) در توالی ژن *TPC1* گیاه برنج مشاهده شد. تنش اکسیداتیو جزء بسیاری از شرایط تنش غیرزیستی و زیستی است. گزارش شده است شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان و بافت‌های مختلف می‌شود. تحت تنش شوری، سطح ROS در بافت‌های گیاهی در نتیجه بی‌نظمی در زنجیره انتقال الکترون افزایش می‌یابد (Chawla *et al.*, 2013). بنابراین این احتمال وجود دارد که نقش عناصر پاسخگو به خشکی و اکسیداتیو بعد از رخداد تنش شوری ناشی از القاء اثر کم‌آبی تنش شوری باشد.

عناصر Box 4 و TCT-motif به‌عنوان عناصر (LREs) شناخته می‌شوند. آن‌ها در ناحیه تنظیم‌کننده ژن‌های تنظیم‌شده با نور، احتمالاً برای فعالیت رونویسی کنترل‌شده با نور ضروری هستند (Gilmarin *et al.*, 1990). تعداد و تنوع زیاد توالی‌های این عناصر در نواحی تنظیم‌کننده ژن *TPC1* در گیاه برنج نشان می‌دهد بیان این ژن ممکن است به‌خوبی توسط نور در پاسخ به تنش شوری تنظیم شود.

عنصر تنظیمی TCA-element که در پاسخگویی به اسید سالیسیلیک دخیل است، در نواحی بالادستی ژن *TPC1* گیاه برنج مشاهده شد. مشخص شده است که این عنصر

در بسیاری از ژن‌های گیاه وجود دارد و توسط تنش‌های مختلف القاء می‌شود. موتیف TCA و TCA-1 (یک فاکتور رونویسی) از طریق همکاری با سایر عناصر فعال *cis* و *TFs* می‌توانند در بیان تنظیم ژن‌های دفاعی که به شرایط تنش مختلف مرتبط هستند، دخیل باشند (Goldsbrough *et al.*, 1993). تجمع سالیسیلیک اسید (SA) در گیاهان به‌عنوان یک مولکول سیگنال سیستمیک عمل می‌کند که موجب سنتز پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی و سایر ترکیبات می‌شود که به گیاهان کمک می‌کند تا با القاء یا تقویت فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، به‌ویژه القای فعالیت آنتی‌اکسیدانی که گیاهان را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند، بر شرایط تنش غلبه کنند (Khodary *et al.*, 2004). بنابراین، حضور موتیف TCA در ۵ ناحیه تنظیمی ژن *TPC1* گیاه برنج نشان‌دهنده عملکرد حیاتی این عناصر تنظیمی است و ممکن است به تعامل مشترک بین این کانال‌های یونی و پروتئین‌های پاسخ تنش اشاره کند.

علاوه بر این، نتایج نشان داد موتیف Me-JA شامل (CGTCA-motif, TGACG-motif) در نواحی تنظیمی ژن *TPC1* گیاه برنج توزیع می‌شود. توزیع فراوانی و تنوع این موتیف‌های پاسخگو به هورمون متیل جاسمونات نشان‌دهنده اهمیت این هورمون در تنظیم ژن *TPC1* گیاه برنج است. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد عنصر circadian بخشی از یک ماژول پاسخ‌دهنده شبانه‌روزی را تعریف می‌کند و فاکتورهای رونویسی متصل شونده به این عناصر، مبنایی برای تنظیم شبانه‌روزی این ژن فراهم می‌سازد. در گیاهان، ساعت شبانه‌روزی، مجموعه‌ای از فرآیندهای بیولوژیکی را تنظیم می‌کند که از حرکات موزون برگ تا رونویسی ریتمیک بسیاری از ژن‌ها را شامل می‌شود. ریتم‌های شبانه‌روزی، موجودات زنده را قادر می‌سازد تا تغییرات روزانه محیط را پیش‌بینی کرده و به آن پاسخ دهند (Barak *et al.*, 2000).

<sup>1</sup> Avian myeloblastosis virus

<sup>2</sup> Myelomonocytic

<sup>3</sup> Dereglulation of the expression

<sup>4</sup> Light responsive cis-elements

### نتیجه‌گیری کلی

این بررسی اهمیت ۳ گروه کارکردی نقل و انتقال، اجزای تشکیل‌دهنده مسیر پیام‌رسانی دوربرد و تنظیم اپی‌ژنتیک را در رقم متحمل به شوری مشخص می‌کند. در گیاه برنج متحمل، از یک طرف افزایش بیان *TPC1* مشاهده شد و از طرف دیگر *RBOHD* افزایش بیان داشت. *RBOHD* به‌عنوان یکی از اجزای پیام‌رسانی ROS در سلول‌های گیاه با تلفیق مسیرهای انتقال سیگنال مختلف عمل نموده و در سازگاری سیستماتیک اکتسابی گیاهان نقش دارد، جایی که سیگنال‌های موضعی درک شده به اندام‌های دیستال منتقل می‌شوند تا پاسخ‌های گسترده سیستمیک سریع به طیف گسترده‌ای از تنش‌های محیطی را استخراج کنند. در گیاه مدل آرابیدوپسیس، تلفیق امواج مختلفی در طی پیام‌رسانی سیستمیک سریع را میانجی‌گری می‌کنند. محرک‌های موضعی باعث ایجاد امواج کلسیم و ROS از طریق عملکرد *RBOH* و *TPC1* در نتیجه ایجاد پاسخ در بافت‌های سیستمیک می‌شوند. این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های تجربی آینده در مورد نقش *RBOHD* در پاسخ تنش شوری گیاه برنج باشد.

علاوه بر این، با توجه به نقش مهم مهار پروتئازها در رشد و تحمل تنش، ضروری است که پتانسیل دست‌کاری آن‌ها در ارقام بااهمیت اقتصادی گیاه برنج بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. پتانسیل تجاری گیاهان مهندسی‌شده گیاه برنج در شرایط تنش با فعالیت پروتئیناز سیستمین کمتر، ممکن است یک نوع گیاه برنج جدید فراهم کند که از پروتئین‌های حیاتی لازم برای غلبه بر شرایط تنش محافظت می‌کند. گیاه برنج تراریخته با فعالیت سیستمین پروتئاز کمتر، همچنین می‌تواند در برابر تنش‌های زیستی ناشی از حمله قارچی، باکتریایی و همچنین حشره که منجر به پیری زودرس گیاه و در نهایت مرگ گیاه می‌شود، محافظت کند.

درک مسیرهای تنظیمی کلیدی از قبیل ادغام فاکتور رونویسی MYB با شرکای برهم‌کنش آن‌ها در شبکه تنظیمی پروموتور ژن‌های *TPC1* و همچنین بیان ژن‌های درگیر در گروه کارکردی اپی‌ژنتیک می‌تواند یافتن پاسخ‌سؤالات اساسی در زیست‌شناسی گیاهی باشد که چگونه فنوتیپ‌های پایدار متحمل‌قادرند از طریق تنظیم اپی‌ژنتیکی به‌سرعت به تغییرات محیطی پاسخ دهند. تنظیم اپی‌ژنتیک، یک حافظه‌ی تنش ایجاد می‌کند که به

گیاه کمک می‌نماید تا بهتر با قرار گرفتن در معرض تنش مکرر و مداوم پیش‌رو مبارزه کند. گیاهان متحمل، دارای مکانیسم‌های پاسخ به تنش "صرفه‌جویی در منابع قابل ابقاء" می‌باشند که فقط با تجربه‌ی یک تنش فعال می‌شوند. تنظیم اپی‌ژنتیک ممکن است در جهت به‌کارگیری حافظه به‌منظور اختصاص منابع گیاه جهت بهره‌برداری بیشتر به عملکرد باشد که از هدر رفت منابع در درک مجدد و پیام‌رسانی‌های متعاقب پی‌درپی تنش‌ها جلوگیری کند. گیاهان متحمل، سازوکارهایی را تکامل داده‌اند که به‌وسیله آن‌ها می‌توانند وقایع تنش گذشته را به خاطر بسپارند و عکس‌العمل‌های خود را برای پاسخ سریع‌تر یا شدیدتر نسبت به تنش بعدی نشان دهند. با توجه به ماهیت غیرقابل پیش‌بینی تنش شوری در مزارع خشک و نیمه‌خشک ایران، این موضوع در مورد تنظیم ژن‌های *TPC1* که نقش کلیدی را در پاسخ به تنش بازی می‌کنند حیاتی است. با توجه به اینکه تحقیقات اخیر، مکانیسم‌های ذخیره و بازیابی اطلاعات شامل تنظیم اپی‌ژنتیک و پرایمینگ رونویسی را در پاسخ تنش شوری در گیاهان مختلف نشان داده‌اند، پیشنهاد می‌شود جذب به‌های گسترده تغییرات اپی‌ژنتیک در تحمل به تنش‌های غیرزیستی پیش‌زمینه تحقیقات آینده باشد و با در نظر گرفتن مراحل رشدی، زمان وقوع تنش و انواع تنش‌ها به این سؤالات پرداخته شود که آیا تنش‌های مختلف می‌توانند مستقیماً باعث برخی از این تغییرات اپی‌ژنتیکی شوند و آیا تنش‌های مختلف یا تلفیق آن‌ها اثر اختصاصی روی بیان ژن‌ها دارند یا صرفاً یک عمل تصادفی است؟! بنابراین مدیریت بهتر تنش، با شناسایی و به‌کارگیری ژن‌های دخیل در تحمل شوری گیاه برای کنار آمدن با پدیده‌های تغییر اقلیم و سایر چالش‌های زیست‌محیطی که گیاهان تجربه می‌کنند، ضروری خواهد بود و بهبود سیستم پاسخ به تنش و سازگاری با آن‌ها در گیاه می‌تواند به کشاورزی پایدار و امنیت غذایی در سراسر جهان کمک نماید.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه برای حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

## منابع

- Alet, A., Sanchez, D. and Cuevas, J. 2012. New insights into the role of spermin in *A. thaliana* under longsalt stress. *Plant Science*, 182: 94-100.
- Bailey, M., Srivastava, A. and Conti, L. 2015. Stability of (SUMO) proteases OTS1 modulates salicylic acid signalling and SUMO1/2 conjugation in *Arabidopsis thaliana*. *experimental botany*, 67(1): 353-363.
- Barak, S., Tobin, E.M., Andronis, C., Sugano, S. and Green, R.M. 2000. All in good time: The *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Plant Science*, 5(12): 517-522.
- Ben Rejeb, K., Benzarti, M. and Debez, A. 2015. NADPH oxidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is required for salt-induced antioxidant defense in *A. thaliana*. *plant physiology*, 174: 5-15.
- Chawla, S., Jain, S. and Jain, V. 2013. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of (*O. sativa* L.). *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(1): 27-34.
- Chen, H., Su, C. and Lin, C. 2010. Expression of potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis*. *plant physiology*, 167(10): 838-847.
- Chen, L., Ren, F. and Zhong, H. 2010. Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(2): 154-164.
- Chen, X.S., Lu, L., Mayer, K.S., Scalf, M., Qian, S.M. and Lomax, A. 2016. Powerdress interacts with HDA9 to promote aging in *Arabidopsis*. *eLife*, 5: e17214.
- Choi, W.G., Toyota, M. and Kim, S.H. 2014. Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17): 6497-6502.
- Droillard, M.J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. and Lauriere, C. 2004. Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *A. thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters*, 574(1-3): 42-48.
- Ferreira, L.J., Azevedo, V., Maroco, J., Oliveira, M.M. and Santos, A.P. 2015. Salt tolerant and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress. *PLoS ONE*, 10(5), e124060.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *plant research*, 124(4): 509-525.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J. and Chua, N.H. 1990. Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, 2(5): 369-378.
- Goldsbrough, A.P., Albrecht, H. and Stratford, R. 1993. Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a sequence which is conserved among stress-inducible genes. *The Plant Journal*, 3(4): 563-571.
- 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. (In Persian).
- 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 biotechnology*, 10(4): 23-36. (In Persian).
- Heidari, Sh., Heidari, P., Azizinezhad, R., Etminan, A. and Khosroshahli, M. 2020. Assessment of genetic variability, heritability and genetic advance for agro-morphological and some in-vitro related-traits in durum wheat. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(1): 120-127.
- Hieng, B., Ugrinoviè, K., Sustar-Vozliè, J. and Kidriè, M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *plant physiology*, 161(5): 519-530.
- Islam, M.O., Kato, H., Shima, S., Tezuka, D., Matsui, H. and Imai, R. 2019. Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. *Gene*, 685: 42-49.
- Jiang, D. and Berger, F. 2017. DNA replication-coupled histone modification maintains Polycomb gene silencing in plants. *Science*, 35: 1146-1149.
- 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 *A. thaliana* and *O. sativa*. *PloS one*, 12(9): e0184523.

- Kerr, T.C. 2018. Ectopic expression of two AREB/ABF orthologs increases drought tolerance in cotton. *Plant, Cell and Environment*, 41: 898-907.
- Khodary, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *Agriculture and Biology*, 6: 5-8.
- Kubala, S., Wojtyla, L., Quinet, M., Lechowska, K., Lutts, S. and Garnczarska, M. 2015. Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relation to seed osmopriming improvement of *B. napus* germination under salinity stress. *plant physiology*, 183: 1-12.
- 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 research*, 30(1): 325-7.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(8): 1391-406.
- Luo, M., Wang, Y.Y., Liu, X., Yang, S., Lu, Q., Cui, Y. and Wu, K. 2012. HD2C interacts with HDA6 and is involved in ABA and salt stress response in *Arabidopsis*. *Experimental Botany*, 63(8): 3297-3306.
- Ma, L., Zhang, H. and Sun, L. 2012. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Experimental Botany*, 63(1): 305-317.
- 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 research*, 34: 459-462.
- McGinnis, S. and Madden, T.L. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*, 32: 20-25.
- Miller, G., Schlauch, K. and Tam, R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2(84): 1-11.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Matsumoto, K. 1996. A gene encoding a MAPKKK is induced simultaneously with genes for a MAPK and an S6 RP kinase by touch, cold and water stress in *A. thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2):765-769.
- Munnik, T., Ligterink, W., Calderini, O. and Hirt, H. 1999. Distinct osmosensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyperosmos stress. *The Plant Journal*, 20(4): 381-388.
- Ramsak, Z., Baebler, S. and Rotter, A. 2014. GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. *Nucleic acids research*, 42: 1167-1175.
- Reese, M.G. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computational Chemistry*, 26(1): 51-56.
- 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. *Physiological Genomics*, 12: 159-162.
- Roy, S. 2016. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant signaling and behavior*, 11(1): e1117723.
- Schaffer, M.A. and Fischer, R.L. 1990. Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *plant physiology*, 93(4): 1486-1491.
- Seemann, J.R. and Critchley, C. 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 164(2): 151-162.
- Tester, M. and Davenport, R. 2003. Na<sup>+</sup> Tolerance in Plants. *Annals of Botany*, 91(5): 503-527.
- Ullah, F., Xu, Q., Zhao, Y. and Zhou, D.X. 2021. Histone deacetylase HDA710 controls salt tolerance by regulating ABA signaling in rice. *Integrative Plant Biology*, 63(3): 451-467.

- Vassilev, D., Leunissen, J. and Atanassov, A. 2005. Application of bioinformatics in plant breeding. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19: 139-152.
- Wang, J., Ding, H., Zhang, A., Ma, F., Cao, J. and Jiang, M. 2010. A novel MAPK gene in maize, ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *Integrative Plant Biology*, 52(5): 442-452.
- Wang, W., Huang, F., Qin, Q., Zhao, X. and Fu, B. 2015. Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress. *Biophysical Research Communications*, 465(4): 790-796.
- Wilczek, C., Chayka, O., Plachetka, A. and Klempnauer, K.H. 2009. Myb-induced chromatin remodeling at a dual enhancer/promoter element involves non-coding rna transcription and is disrupted by oncogenic mutations of v-myb. *Biological Chemistry*, 284(51): 35314-35324.
- Wu, Y. and Cosgrove, D.J. 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Experimental Botany*, 51(350): 1543-1553.
- Xiang, Y., Lu, Y.H., Song, M., Wang, Y., Xu, W., Wu, L. and Ma, Z. 2015. Overexpression of a T. aestivum (TaCRT1) improves salinity tolerance in Tobacco. *PLOS ONE*, 10(10): e0140591.
- Xiong, L. and Yang, Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible MAPK. *The Plant Cell*, 15(3): 745-759.
- Yamauchi, T., Yoshioka, M., Fukazawa, A., Mori, H., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., Yoshioka, H. and Nakazono, M. 2017. An NADPH Oxidase RBOH Functions in Rice Roots during Lysigenous Aerenchyma Formation under Oxygen-Deficient Conditions. *The Plant cell*, 29(4): 775-790.
- Yeo, A.R., Caporn, S.M. and Flowers, T.J. 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *Experimental Botany*, 36(8): 1240-1248.
- Zhong, X., Zhang, H., Zhao, Y., Sun, Q., Hu, Y. and Peng, H. 2013. The rice NAD (+)-dependent histone deacetylase OsSRT1 targets preferentially to stress- and metabolism-related genes and transposable elements. *PLOS ONE*, 8: e66807.
- Zhong, X., Zhang, H., Zhao, Y., Sun, Q., Hu, Y., Peng, H. and Zhou, D.X. 2013. The rice NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase OsSRT1 targets preferentially to stress-and metabolism-related genes and transposable elements. *PLoS One*, 8(6): e66807.

## Genes expression analysis of rice under salinity stress and identification of promoter's cis-elements role of TPC1 gene responsible for long-distance signaling in salinity tolerance

Shadi Heidari<sup>1</sup>, Peivand Heidari<sup>1</sup>, Baharak Heidari<sup>\*2</sup>

1. Ph.D. graduate, Department of Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Computer Science, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Received: 11-05-2022

Accepted: 11-08-2022

### Abstract

Soil salinity is one of the major limitations of rice production worldwide, especially in coastal areas. Sensitivity or tolerance of rice to salinity depends on the coordinated function of stress-responsive genes. In order to investigate the genes related to stress response, expressed sequence tags from salinity tolerant and sensitive rice libraries with 4571 and 3823 EST sequences from the Harvard University database were analyzed. EST sequences were assembled using EGAssembler software to find similarities between the two libraries. The unigenes were analyzed using X-blast by CLCbio software against non-redundant gene bank proteins. IDEG6 statistical software and Audic-Claverie statistics were used to identify differential expression genes between libraries. The GoMapMan comparative classification tool was used to classify the functional catalogs. Statistically significant differences were observed between the genes of the two libraries in 9 functional groups. The results indicate the importance of genes involved in the three key functional groups, transport, components of the long-distance signaling pathway and epigenetic regulation in salinity tolerant cultivars, introducing TPC1 as a possible candidate for molecular modification of salinity-sensitive rice genotypes. The function of the cis-acting elements in the promoter region of this gene determines the regulatory network of salinity stress response mechanisms that will be necessary to better understand stress management in plant salinity tolerance to cope with the consequences of climate change and other environmental challenges. Improving the stress response systems and adaptation to them in plants can contribute to achieving sustainable agricultural goals and food security around the world.

**Keywords:** Expressed sequence tags (EST), gene expression, two-pore calcium channel protein (TPC), soil salinity, promoter regulatory regions

---

\*Corresponding Author Email: [b\\_heidari@iauksh.ac.ir](mailto:b_heidari@iauksh.ac.ir)