

تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی سیس مرتبط با تنش‌های غیرزیستی در پروموتر ژن‌های

NAC گیاه آلوروپوس لیتورالیس

سمیرا محمدی^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^۲، حمید نجفی زرینی^۲ و سیدحمیدرضا هاشمی‌پطودی^{۳*}^۱ ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، اصلاح نباتات^۲ ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی،^۳ ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، گروه مهندسی ژنتیک و

بیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

پروتئین‌های NAC (*NAM*، *ATAF1-2* و *CUC2*)، فاکتورهای رونویسی مختص گیاهان هستند و در فرآیندهای مختلف نمو گیاهان و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. در این مطالعه، ۶۸ ژن NAC در گیاه *Aeluropus littoralis* بعنوان گیاه هالوفیت متعلق به خانواده *Poaceae* شناسایی شدند. با تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتر ژن‌های *AINAC* بسیاری از عناصر مرتبط با رشد و نمو، فیتوهورمون‌ها و دفاع در برابر تنش‌ها یافت شدند. از جمله عناصر پاسخگو به هورمون‌ها می‌توان به TCA element، P-box، موتیف‌های CGTCA و TGACG، TGA-element، ERE و ABRE اشاره نمود که بترتیب در پاسخگویی به جیبرلیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، جاسمونیک‌اسید، اکسین، اتیلن و آبسزیک‌اسید نقش دارند. برای عناصر پاسخگو به تنش می‌توان *TC-rich repeats*، *ARE*، *MBS*، *LTR* و *W box* را ذکر نمود که بترتیب مرتبط با دفاع و تنش، القای بی‌هوازی، القای خشکی، القای دمای پایین و تنش آسیب‌های مکانیکی می‌باشند. انواع مختلف عناصر تنظیمی سیس در پروموتر ژن‌های *AINAC* و تنوع در فاکتورهای رونویسی که به این عناصر متصل می‌شوند، حاکی از نقش مهم این ژن‌ها در نمو گیاه و دفاع در برابر تنش‌ها می‌باشند. با تجزیه و تحلیل بیان ژن کاندید *AINAC32* با استفاده از RT-qPCR مشخص شد که این ژن تحت تنش‌های شوری، خشکی و ABA، در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، افزایش بیان نشان می‌دهد که بیانگر نقش این ژن در تحمل به چندین تنش غیرزیستی می‌باشد. این یافته‌ها اطلاعات ارزشمندی جهت تحقیقات بیشتر در مورد عملکرد و کاربرد ژن‌های *AINAC* در رشد و سازگاری به تنش در *A. littoralis* فراهم آورده است.

واژه‌های کلیدی: آلوروپوس لیتورالیس، الگوی بیان ژن، خانواده ژنی، فاکتور رونویسی، هالوفیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۳۶۸۷۷۴۷، پست الکترونیکی: shr.hashemi@sanru.ac.ir

مقدمه

مطالعات زیادی نشان می‌دهند که، فاکتورهای رونویسی (TFها) در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی و پاسخ‌های هورمونی مشارکت می‌نمایند (۵). فاکتورهای رونویسی که حاوی دمین‌های متصل‌شونده به DNA و تنظیم‌کننده رونویسی

گیاهان در طول دوره رشد و نمو خود، تحت تأثیر شرایط نامساعد محیطی و یا تنش‌ها قرار می‌گیرند و گیاهان با تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله، بیان ژن‌های تنظیمی و عملکردی جهت کارکرد بیولوژیکی پایدار، پاسخ به آنها را مدیریت می‌کنند (۱).

خشکی، شوری و آبسزیک‌اسید (ABA) بطور همزمان القاء شدند (۴۸). ژن‌های *ThNAC* در گیاه هالوفیت *Tamarix hispida* در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، فلزات سنگین و ABA بیان شدند و این امر نشان می‌دهد که، ژن‌های *NAC* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، نقش‌های تنظیمی ایفا می‌کنند و در مسیرهای پیام‌دهی تنش وابسته به ABA دخیل می‌باشند (۵۱).

عناصر تنظیمی سیس (CRE= Cis-acting regulatory element) در نواحی پروموتور ژن‌ها، سوئیچ‌های مولکولی مهمی بوده که با تنظیم رونویسی ژن‌ها، شبکه بزرگی از ژن‌های دخیل در پدیده‌های مختلف بیولوژیکی از جمله فرآیندهای رشد و نمو و پاسخ به تنش‌ها را، کنترل می‌کنند (۷). تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور *OsNAC6* به روش الحاق به ژن گزارشگر (Reporter gene) *GUS* نشان می‌دهد که این ژن توسط ABA، جاسمونیک‌اسید (JA) و تنش‌های محیطی مختلف القاء می‌شود. بررسی این سیلیکو توالی پروموتور، مؤید حضور عناصر تنظیمی سیس پاسخگو به تنش‌های محیطی مختلف بوده است (۳۵). همچنین تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور فاکتور رونویسی *NAC* پنبه (*GhNAC4*) بر مبنای ژن گزارشگر *GUS* نشان می‌دهد که، تنظیم این پروموتور تحت تیمار فیتوهورمون‌ها و تنش‌های محیطی القاء می‌شود (۴۹).

آلوروپوس لیترالیس (*Aeluropus litoralis*) یک گیاه هالوفیت چندساله C4 متعلق به خانواده *Poaceae* می‌باشد. این گیاه معمولاً در باتلاق‌های شور رشد می‌کند و می‌تواند سطوح بالای شوری (عمدتاً کلرید سدیم) را تا بیش از ۶۰۰ میلی‌مولار تحمل نماید (۱۲، ۲). این گیاه، علاوه بر مقاومت به شوری، بعنوان گیاهی مقاوم به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود (۱۸-۱۶، ۵۹). با توجه به اینکه هالوفیت‌ها با ساختار ژنتیکی متمایز خود، پتانسیل بالایی جهت بقا و تکمیل چرخه زندگی خود در زیستگاه‌های با شوری بالا دارند، شناسایی و تعیین خصوصیات فاکتورهای

هستند، می‌تواند با شناسایی و اتصال به عناصر سیس موجود در پروموتورهای ژن هدف، بیان ژن‌های پایین‌دست خود را تنظیم کنند (۵۷). فاکتورهای رونویسی *NAC* (*NAM*، *ATAF1-2* و *CUC2*) یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی مختص گیاهان با بیش از ۱۰۰ عضو در آرکیدوپسیس و برنج (۳۷)، صنوبر (۲۰)، سویا (۲۶) و ارزن ایتالیایی (۴۰) شناسایی شدند. پروتئین‌های خانواده ژنی *NAC*، شامل یک دمین متصل‌شونده به DNA بسیار حفاظت‌شده در انتهای آمینی و یک دمین بسیار متغیر در انتهای کربوکسیلی هستند. دمین انتهای آمینی متشکل از حدود ۱۵۰ تا ۱۶۰ اسید آمینه با پنج زیردمین A-E بوده که برای اتصال این فاکتورها به DNA ضروری می‌باشند (۳۹)، در حالی که دمین انتهای کربوکسیلی، برای خاصیت ترانس‌اکتیواسیون (فعال‌سازی از راه دور) (-activationTrans) این پروتئین‌ها حیاتی می‌باشد (۴۶).

شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد، فاکتورهای رونویسی *NAC*، نقش‌های مهمی در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی مانند توسعه مریستم انتهایی شاخه (۴۴)، رشد بذر (۴۵)، پیری برگ (۱۴)، تشکیل گل (۴۱)، رشد فیبر (۲۵) و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی (۱۹، ۳۵) ایفا می‌کنند. بعنوان مثال، بیش‌بیان *AINAC4* از گیاه *Aeluropus lagopoides* تحمل توتون تراریخت را به تنش اکسیداتیو بهبود بخشید (۲۳). بیش‌بیان ژن *MdNAC047* از *Malus hupehensis* با تنظیم پاسخ به اتیلن می‌تواند تحمل به شوری را در *Arabidopsis thaliana* تراریخته افزایش دهد (۶)؛ بیش‌بیان *AhNAC3* از *Arachis hypogaea* با افزایش ترشح سوپراکسید موجب افزایش تحمل گیاه توتون در برابر تنش خشکی و کم‌آبی می‌گردد (۳۰). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که برخی از فاکتورهای رونویسی *NAC* قادرند به تنش‌های غیرزیستی مختلف پاسخ دهند. بعنوان مثال، در آرکیدوپسیس، سه ژن *ANAC019*، *ANAC055* و *ANAC072* در تنش‌های

پروتئین‌های ناقص و تکراری، حضور دمین (NAM) NAC، با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) (۲۲)، Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (۱۳) و SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (۲۹) تأیید شد.

تجزیه و تحلیل توالی پروموتور ژن‌های *AINAC*: تجزیه و تحلیل عناصر سیس (Cis element) در پروموتور ژن‌های *AINAC* به درک اطلاعات مربوط به تنظیم بیان ژن کمک می‌نماید. پس از تعیین توالی ژنومی هر یک از اعضای خانواده *AINAC*، ۲۰۰۰ جفت‌باز بالا دست کدون شروع (ATG) ژن‌ها بعنوان توالی پروموتور در نظر گرفته شده و شناسایی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از PlantCARE

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/e/>) انجام گردید (۲۸). جهت مقایسه، توالی پروموتور گیاه مدل آراییدوپسیس نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت، نقشه توزیع عناصر سیس در پروموتور ژن‌های *AINAC* با استفاده از ابزار MAST (<http://meme-suite.org/tools/mast/>) (۸) انجام گردید.

پیش‌بینی برهم‌کنش‌های تنظیمی بالقوه بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های *AINAC*: فاکتورهای رونویسی (TFs) با تنظیم بیان ژن‌های مرتبط، نقش اصلی، در بسیاری از فرآیندهای سلولی و بیولوژیکی ایفا می‌نمایند. جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه مکانیسم‌های تنظیمی احتمالی خانواده ژنی *AINAC*، برهم‌کنش‌های تنظیمی بالقوه بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های *AINAC* با استفاده از ابزار آنلاین Promoter Analysis نرم‌افزار PlantPAN2.0 (http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter_multiple.php) پیش‌بینی گردید (۱۰).

آنالیز بیان ژن کاندید *AINAC32* با استفاده از RT-qPCR: در این بررسی از نمونه‌های کلون آلوروپوس لیتورالیس استفاده گردید. کشت نمونه‌های کلون‌شده در

رونویسی پاسخگو به تنش در این گیاهان بسیار مهم می‌باشد. این ژن‌ها با تنظیم ژن‌های پاسخگو به تنش و افزایش تحمل به تنش قادرند در مهندسی ژنتیکی محصولات زراعی استفاده شوند (۳،۴). بنابراین در مطالعه حاضر، جهت درک مکانیسم‌های تحمل به تنش‌های غیرزیستی، ژن‌های *NAC* در ژنوم *A. littoralis* شناسایی و توالی‌های پروموتور آنها برای یافتن عناصر تنظیمی سیس بالقوه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه مکانیسم‌های تنظیمی احتمالی خانواده ژنی *AINAC*، برهم‌کنش‌های تنظیمی بالقوه بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های *AINAC* پیش‌بینی شد. در نهایت، جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه تأثیر تنش‌های خشکی و شوری و همچنین فیتوهورمون ABA بر بیان ژن‌های *AINAC*، تجزیه و تحلیل بیان ژن کاندید *OsNAP32* بعنوان یک همولوگ از ژن *OsNAP32* (Os03g0327800) که بطور قابل توجهی در اثر تنش‌های ABA و غیرزیستی القاء شده است (۹)، با استفاده از RT-qPCR انجام گردید.

مواد و روشها

شناسایی ژن‌های *NAC* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس: در این تحقیق از توالی ژنوم مرجع گیاه *A. littoralis* موجود در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان (منتشر نشده) برای شناسایی ژن‌های *NAC* بالقوه در ژنوم *A. littoralis* استفاده گردید. بدین منظور، توالی‌های پروتئینی *NAC* در گیاهان مدل برنج و آراییدوپسیس، برترتیب از پایگاه‌های داده RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) و TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) دریافت شدند. سپس از توالی‌های دریافت شده بعنوان توالی مورد نظر (Query) در توالی ژنوم گیاه آلوروپوس لیتورالیس برای جستجوهای Local tBLASTn با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (۱۵) با E-value کمتر از 1E-10 استفاده شدند. پس از حذف

میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه نیز، با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار در ۳ تکرار بیولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 و مقایسه میانگین با آزمون t-test در اکسل انجام شد.

نتایج

شناسایی ژن‌های NAC در گیاه آلوروپوس لیتورالیس: جهت شناسایی ژن‌های NAC بالقوه در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، آنالیز همولوژی بر مبنای پروتئین‌های NAC آرآبیدوپسیس و برنج با ژنوم آلوروپوس، منجر به شناسایی ۶۸ ژن گردید. با بررسی این پروتئین‌ها در پایگاه‌های InterProScan، Pfam و SMART، دمین اختصاصی NAM (PF02365) یا NAC (PF01849) مشاهده گردید. برای نام‌گذاری این ژن‌های NAC، پیشوند AI قرار گرفته و به صورت *AINAC.01* تا *AINAC.68* نام‌گذاری شدند.

عملکردهای متنوع عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای AINAC: جهت شناسایی عناصر تنظیمی سیس ژن‌های *AINAC*، ۲۰۰۰ جفت‌باز بالادست توالی ژنومی کدون شروع هر ژن بعنوان منطقه پروموتور در نظر گرفته شد. از ۶۸ ژن شناسایی شده اطلاعات مربوط به توالی‌های پروموتور ۳۸ ژن، کامل بوده و در این بررسی فقط این تعداد ژن‌هایی که دارای توالی پروموتور کامل (۲۰۰۰ جفت‌باز) بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این بررسی، جعبه‌های CAAT و TATA که بترتیب در نواحی افزاینده (Enhancer regions) و عنصر پروموتور مرکزی (Core promoter element) قرار داشته در نواحی پروموتور تمام ژن‌های مورد بررسی، مشاهده شد. تقریباً تمام ژن‌های *AINAC* مورد بررسی در پروموتورهای خود، عناصر تنظیمی سیس پاسخگو به نور، تنش آبی و تنش خشکی را دارا بودند. عناصر تنظیمی سیس پاسخگو به تنش‌های القای بی‌هوازی (Anoxic)، پاتوژن و آسیب‌های مکانیکی در نواحی پروموتوری حدود ۹۰ درصد از ژن‌های *AINAC*

محلول هوگلند با شرایط دمایی 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد، و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی/۱۶ ساعت روشنایی و شدت نوری $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ صورت پذیرفت. سپس نمونه‌های کلون‌شده به محلول هوگلند منتقل شدند و پس از دو ماه، تنش شوری (کلرید سدیم ۲۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار) و تنش خشکی (PEG ۲۰ درصد) اعمال گردید. تیمار ABA نیز با اسپری هورمون ABA ۱۰۰ میکرومولار روی برگ‌ها انجام شد. سپس نمونه‌برداری از بافت‌های برگ، ساقه و ریشه (۳ تکرار بیولوژیکی)، در سری زمانی صفر (شاهد)، ۳ و ۶ ساعت بعد از اعمال تنش انجام شد و نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از کیت تریزول (Threazol, Riragene) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA به ترتیب با روش اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد صورت گرفت. جهت حذف DNA ژنومی، از تیمار DNase I (Thermo Scientific) استفاده گردید. سنتز cDNA به وسیله کیت شرکت ترمو (Thermo Scientific) طبق دستورالعمل شرکت، انجام و به نسبت ۴ برابر رقیق گردیدند. طراحی آغازگر اختصاصی ژن *AINAC32* (Forward: GGTCACAACGCCAACAG; Reverse: CGCCGCTCTCTCTGAT) با استفاده از نرم‌افزار AlleleID انجام شد. هر واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر از The Maxima SYBR Green/ROX RT-qPCR Master Mix (Thermo Scientific)، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۰/۳ میکرولیتر آغازگر و ۲/۷ میکرولیتر آب عاری از RNase، با استفاده از چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه در ۴۰ چرخه بوده و ۶ کنترل منفی (NTC) نیز، در نظر گرفته شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها و سیکل آستانه با نرم‌افزار CFX (Bio-Rad) محاسبه و ژن *UBQ* بعنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل عناصر سیس، روشی مؤثر جهت پیش‌بینی مکانیسم‌های تنظیمی در مرحله رونویسی است (۴۸). در بین عناصر شناسایی شده، ARBE در پاسخ به تنش‌های خشکی و ABA، و عنصر DRE نیز در تنش‌های خشکی و اسمری القاء می‌شوند، همچنین MBS بعنوان جایگاه اتصال MYB در پاسخ به تنش خشکی دخیل می‌باشد. پروموتور *AINAC28* دارای ۷ عنصر ARBE، ۴ عنصر DRE و یک عنصر MBS می‌باشد. در مجموع، ۱۰ پروموتور دارای هر ۳ عنصر ARBE، DRE و MBS بودند (شکل ۱). بیشتر ژن‌های *AINAC* دارای عناصر تنظیمی ARBE (۳۴ ژن، عنصر سیس پاسخگو به آبسزیک‌اسید)، motif CGTCA (۳۳ ژن، عنصر تنظیمی پاسخگو به جاسمونیک‌اسید، G-Box (۲۶ ژن، عنصر سیس پاسخگو به نور) و ARE (۳۰ ژن، عنصر تنظیمی ضروری برای القای بی‌هوازی) بودند (شکل ۱).

مشاهده شد. علاوه بر این، ۹۷/۳۷ درصد از ژن‌ها دارای عناصر تنظیمی سیس پاسخگو به تنش‌های گرما، pH پایین، کمبود مواد مغذی و تنش اسمری در نواحی پروموتور خود بودند. عناصر پاسخگو به ABA، سالیسیلیک‌اسید (SA) و JA در نواحی پروموتور حدود ۹۰ درصد از ژن‌های *AINAC* مشاهده شد. عناصر پاسخگو به اتیلن (ETH)، جیبرلین (GA) و اکسین (Auxin) در بسیاری از پروموتور ژن‌های مورد بررسی (بترتیب ۲۶/۳۲ درصد، ۶۵/۷۹ درصد، ۵۵/۲۶ درصد) یافت شدند. عناصر TC-rich repeats (دفاعی و پاسخگو به تنش) و LTR= Low Temperature Response (پاسخگو به دمای پایین) بترتیب در ۳۹/۴۷ و ۵۷/۸۹ درصد از پروموتورهای ژن‌ها مشاهده گردید. بیش از ۸۹ درصد ژن‌ها دارای عناصر مرتبط با چرخه سلولی و تکثیر سلولی در نواحی پروموتور خود بودند. فقط ژن *AINAC47* (Alg10334) دارای عناصر تنظیمی مرتبط با پاسخ به یون‌های فلزی سنگین بود (جدول ۱).

	Plant growth and development										Phytohormones responsiveness										Biotic/abiotic stress																		
	CAZ-box	GCN4_motif	CGGTCC_motif	Myb-binding site	O2-site	MBS1	MBSA-like	GCCT	ARBE	ARBEa	AuxRE-core	TGA-element	TGA-element	CGTCA-motif	GAR1E-motif	P-box	ERRE	G-box	G-box	Box 4	TCP-motif	W-box	WRKY3	TC-rich repeats	AP-1	ARE	STRF	LTR	ac-1	MBS	DRE-core	DRE3	MYC	MYF					
AINAC01 (Alg20)	3	1	1					1	2		1	2	5				1	1	1			3			3	4	5					6	4						
AINAC03 (Alg571)		1	4					1	1		2	2	2		1										1	2	1	2	2	2			1	7					
AINAC04 (Alg719)			2	1				8			2	2	2		2										1	3	2	1	1				4	4					
AINAC07 (Alg1315)			1	1		1		9	1		2	2	6												1	4	5	1					1	5					
AINAC08 (Alg1777)			1	1		1		9	1		2	2	6												1	4	5	1					1	5					
AINAC11 (Alg2014)	2			1	3			7	1	1	1	2	2		1	1	2	1	1						3	3	1	2	1				5	2					
AINAC12 (Alg2015)	2			1				5	1		1	2	1		1	2	1	1	1	5	1				1	4	1	1	1				6	2					
AINAC15 (Alg3184)	1			1				4	1	1	1	2	5												3	2	1						5	1					
AINAC15 (Alg4287)	2			1	4	2		1	7		2	2	5	1				2	3		1	2	2		1	1	2	5	3				5	5					
AINAC16 (Alg4514)		1						1	1		1	1	2		1	1	1	1	1	1					1	2	1	2					5	1					
AINAC17 (Alg4534)	4			1	1	2		1	4	2		1	1		1	1	1	1	2					1	4	1	1	1	1				5	2					
AINAC19 (Alg4685)				1	2			1	4	1		1	3						1						5		1	1						1	3				
AINAC20 (Alg4919)				1				5			3	2	1		1	2	1	2						1	3	2	2	1						3	3				
AINAC21 (Alg4990)	1			3							1	1	1	1					4	1	1				2	2	2	1	2					2	4				
AINAC24 (Alg5250)				1				10	3	1	2	2	2					3	1	2	1	1	1		1	2	2	1						2	3				
AINAC25 (Alg5423)				1				10			1	4	2		1	5	1	1	4						1	1	4	2							3	8			
AINAC26 (Alg5425)	2			1	1			5			1	3	2		2	2	3		1	1	1			1	10	1	3	1	3					4	3				
AINAC27 (Alg5538)		1						2			1	1	2					1	2	1	2		1		3	2	2	2	1	4					6	2			
AINAC28 (Alg5607)	3	1	1	1				1	7	4		1	2	1				2	4					1	4	2	2	2	1	4					6	2			
AINAC30 (Alg6072)	2							4			1	1	2	1		1			2	4				1	4	2	2	2	1						3	3			
AINAC31 (Alg6305)	1				1			2	1		1	2	2		1			4						1	2	2	2	2	1						4	3			
AINAC32 (Alg6358)				1	1			4	1	1	1	7					1	1	2		1			2	5	3	7								1	3			
AINAC35 (Alg6756)				1	1			4	1		1	7					1	1	2		1			2	8	7									1	3			
AINAC38 (Alg7821)	1			1	4			1	1			1	4	1				2	1					2	5	4	2									4	4		
AINAC39 (Alg7978)				3	1							3	2											1	1	1	1	1	1	1							3	1	
AINAC41 (Alg8413)				3	1							4	2					1	2	3	2	1	1		3	3	1	4								1	2		
AINAC43 (Alg8618)				3	1						2	1	4		1	2	3	2	1	1	1			4	3	1	4		2							1	2		
AINAC44 (Alg9548)				1				2	1		1	3	1		1	1	2	2	1	3	1			1	2	3										7	2		
AINAC45 (Alg10052)	1		2	2				6	1		1	2			3	1	3	2	1					3	2	1	3	2	1	3	2					5	2		
AINAC46 (Alg10248)	2			1								3	1				1	1	3	3	1			1	1	3	1	1	1	1						3	2		
AINAC47 (Alg10334)	1		1	1	2	1			2	1			4				2	3						1	7	1	4	1	1								3	1	
AINAC49 (Alg10583)	3		1	2	2	1			7	1	1	1	5				2	2	1	1	2	2		2	1	1	5	3								3	2		
AINAC51 (Alg10929)				3	1		1		3	1	2	2	5	1	1			2	1	1	2	2		3	4	1	5	1	3							3	13		
AINAC58 (Alg12127)	1			1	1				2	1	2	2	1		1									4	2	1	1	1	1								4	2	
AINAC61 (Alg12728)	1			1	1		1		3	1		1	1		3	1		1	3	1	3			1	1	1	1	1	1								3	2	
AINAC62 (Alg13108)				1	1				6			4						3	1	3	2		1		1	1	4	1	1								1	1	
AINAC64 (Alg13731)	2			1					4	1		2	3					2	2	2					3	1	3	1									2	5	
AINAC88 (Alg15536)	2			1		1			10	1		4						2	2	2					10	1	4	1										2	5

شکل ۱- تجزیه و تحلیل تعداد عناصر سیس در ژن‌های *NAC* گیاه آلوروپوس لیترالیس. رنگ‌ها و اعداد مختلف، تعداد عناصر مختلف موجود در پروموتور ژن‌های *AINAC* را نشان می‌دهد.

جدول ۱- عناصر تنظیمی سیس شناسایی شده در نواحی پروموتور ژن‌های *NAC* در آلورپوس لیتورالیس و آرابیدوپسیس همراه با عملکرد بالقوه آنها.

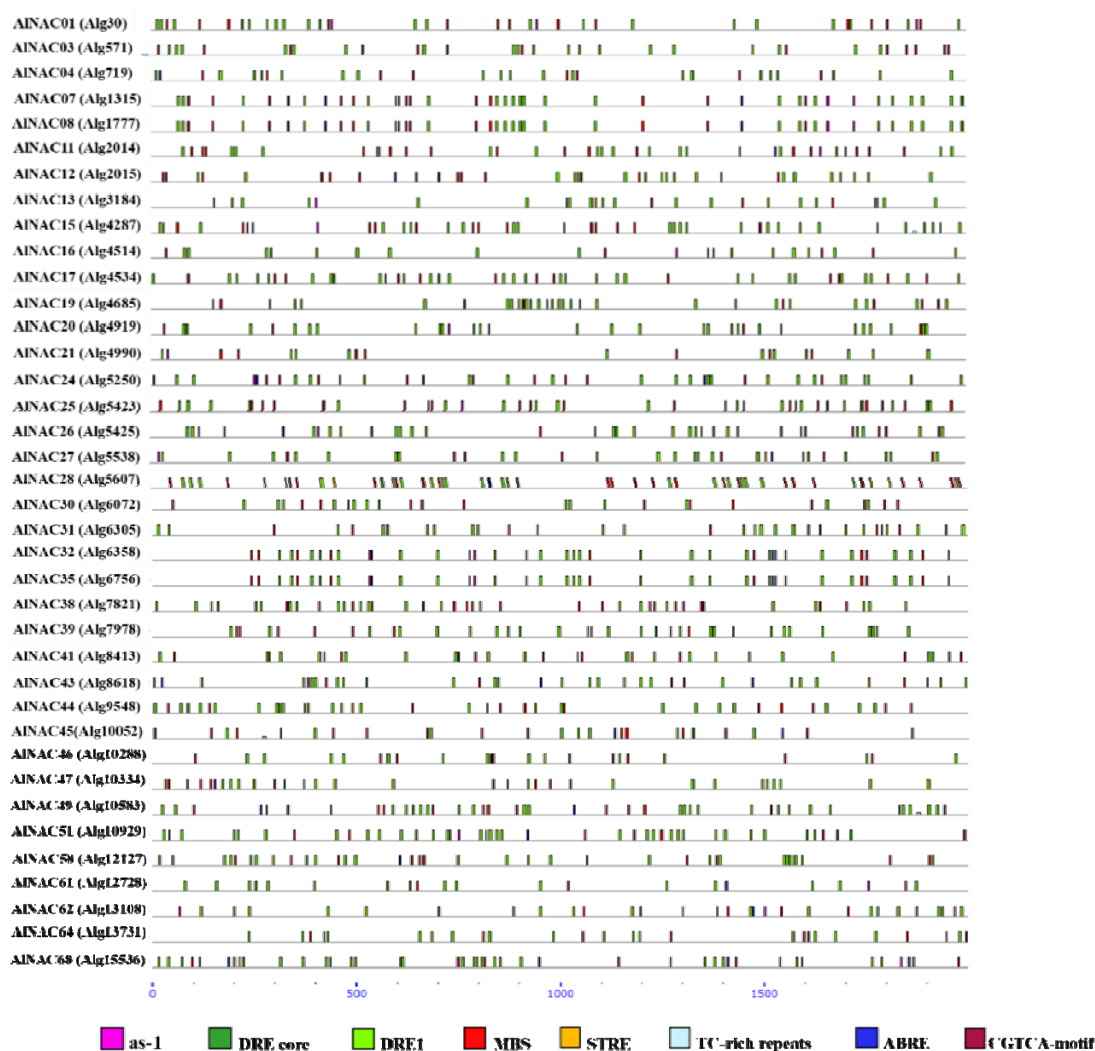
Element Species (ID of CARE)	Number (Percentage) of Elements in Promoters of <i>NAC</i> Genes	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Aeluropus littoralis</i>
Core promoter/enhancer element (AT-TATA-box, CAAT-box, TATA, TATA-box)	113(100.0%*)	38(100.0%)
Water response (AT-rich element, MYB)	87(77.00%)	37(97.37%)
Drought response (ACTCATCCT sequence, as-1, DRE core, DRE1, MBS, MYB recognition site, MYC)	104(92.04%)	38(100.0%)
Cold response (LTR)	36(31.86%)	22(57.89%)
Heat, osmotic stress, low pH, nutrient starvation stresses response (STRE)	40(35.40%)	37(97.37%)
Anoxic response (ARE, GC-motif)	81(71.68%)	34(89.47%)
Cd response (AP-1)	5(4.42%)	1(2.63%)
Defense response (TC-rich repeats)	33(29.20%)	15(39.47%)
Wounding and pathogen response (box S, W box, WRE3, WUN-motif)	72(63.72%)	36(94.74%)
Light response (3-AF1 binding site, AAAC-motif, ACE, AE-box, AT1-motif, ATC-motif, ATCT-motif, Box 4, Box II, CAG-motif, chs-CMA1a/2a, GA-motif, Gap-box, GATA-motif, G-Box, GT1-motif, GTGGC-motif, I-box, LAMP-element, MRE, Pc-CMA2a, 4cl-CMA2b, Sp1, TCCC-motif, TCT-motif, chs-Unit 1 ml)	113(100.0%)	38(100.0%)
Circadian response (circadian)	7(6.19%)	6(15.79%)
ETH response (ERE)	46(40.71%)	10(26.32%)
ABA response (ABRE, ABRE2, ABRE3a, ABRE4, AT-ABRE, CARE)	78(69.03%)	34(89.47%)
GA response (GARE-motif, P-box, TATC-box, CARE)	31(27.43%)	25(65.79%)
JA response (CGTCA-motif, TGACG-motif, JERE)	65(57.52%)	35(92.11%)
SA response (SARE, TCA-element)	38(33.63%)	34(89.47%)
Auxin response (TGA-element, TGA-box, AuxRR-core)	43(38.05%)	21(55.26%)
Cell cycle and cell proliferation response (CCGTCC motif, dOCT, E2Fb, MSA-like, Myb-binding site, NON, OCT, re2f-1, HD-Zip 1, O2-site, MBS1)	62(54.87%)	34(89.47%)
Tissue specific/preferential expressed (AC-I, AC-II, CAT-box, GCN4_motif, RY-element, Unnamed_1)	36(31.86%)	26(68.42%)
No functional description (AAGAA-motif, CCAAT-box, A-box, Unnamed__1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, MYB-like sequence, TCA, F-box, CTAG-motif, 3-AF3 binding site, Box III, plant AP-2-like, E2F, HD-Zip 3, Box II-like sequence, AT-rich sequence, GC-repeat, Y-box)	113 (100.0%)	38(100.0%)

*درصد برآوردشده از تقسیم تعداد پروموتورهای دارای عناصر تنظیمی سیس مورد نظر بر تعداد کل پروموتورها به دست آمده است.

مورد از این عنصر در پروموتورهای *AINAC07* و *AINAC08* یافت گردید (شکل ۱).

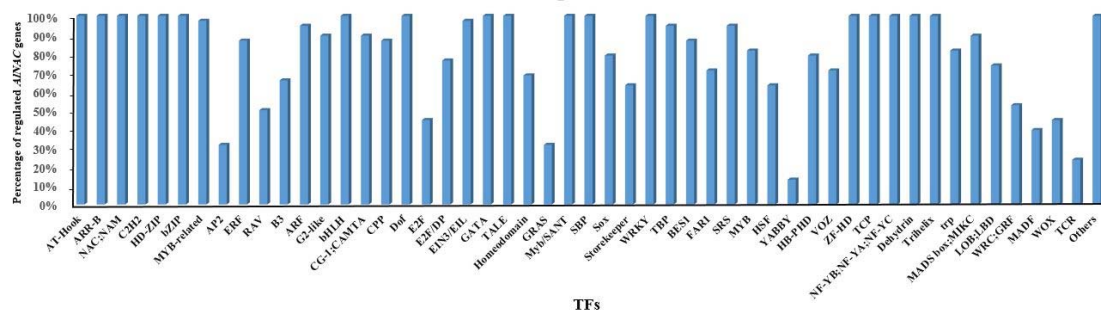
به منظور درک بهتر مکانیسم‌های تنظیمی احتمالی ژن‌های *AINAC* تحت تنش‌های غیرزیستی، ۸ عنصر سیس *as-1*، *DRE core*، *DRE1*، *MBS*، *STRE*، *TC-rich repeats*، *ABRE* و *GCTCA-motif* را انتخاب کرده و نواحی پروموتور (۲۰۰۰ جفت‌باز بالادست جایگاه شروع رونویسی) ژن‌ها بررسی و نتیجه در شکل ۲ نشان داده شده است.

۱۱ عنصر *ABRE* در پروموتور ژن *AINAC68* و ۱۰ عنصر *ABRE* بترتیب در *AINAC24* و *AINAC25*، و عنصر *TC-rich* در دخیل در دفاع و پاسخ به تنش در پروموتور ۱۵ ژن *AINAC* یافت شدند. ۲ عنصر *TC-rich* در پروموتورهای *AINAC51* و *AINAC49*، *AINAC15* جایگاه اتصال *MYB* درگیر در تنش خشکی در پروموتور ۲۰ ژن مشاهده گردید، با این حال، ۳ عنصر *MBS* در پروموتورهای *AINAC45*، *AINAC15* و *AINAC49* یافت شدند. عنصر *CGTCA* در پروموتور ۳۵ ژن شناسایی و ۶



شکل ۲- شمای عناصر سیس مرتبط با تنش در پروموتور ژن‌های *AINAC* عناصر سیس مختلف با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند.

WRKY, Myb/SANT, bHLH, bZIP, HD-ZIP, C2H2, Dehydrin, Trihelix و ERF می‌توانند تمام ژن‌های *AINAC* را تنظیم کنند. بسیاری از خانواده‌های فاکتورهای رونویسی ذکر شده در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه، انتقال سیگنال هورمونی، دفاع از گیاه و پاسخ به تنش‌ها دخیل می‌باشند. این امر نشان می‌دهد که، ژن‌های *AINAC* با برهم‌کنش با این فاکتورهای رونویسی می‌توانند در نمو گیاه و فرآیندهای متنوع دفاع گیاه در برابر تنش مشارکت نمایند.



شکل ۳- تعداد ژن‌های *AINAC* تنظیم شده توسط خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی (TFs).

مشاهده نگردید. تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) منجر به افزایش بیان ۱۵/۵۶، ۴/۲ و ۱/۳۶ برابری ژن *AINAC32* بترتیب در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، ۳ ساعت بعد از اعمال تنش گردید، اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، بیان در بافت برگ با مقدار ۷/۲۸، کاهش بیان، و در بافت ساقه با مقدار ۴/۰۵ کاهش بسیار اندکی و در بافت ریشه با مقدار ۴/۳۲، افزایش بیان نشان دادند. سطح رونوشت *AINAC32* ۳ ساعت بعد از اعمال تیمار ABA در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، بترتیب افزایش بیان ۵/۸۳، ۴/۱۸ و ۲/۳۲ برابری نشان داد. در حالی که ۶ ساعت بعد از اعمال تیمار، بیان این ژن در بافت‌های برگ و ساقه بترتیب به ۰/۷۶ و ۰/۸۶ برابر کاهش پیدا نمود ولی در بافت ریشه، افزایش بیان (۲/۵۵ برابری) مشاهده گردید (شکل ۴).

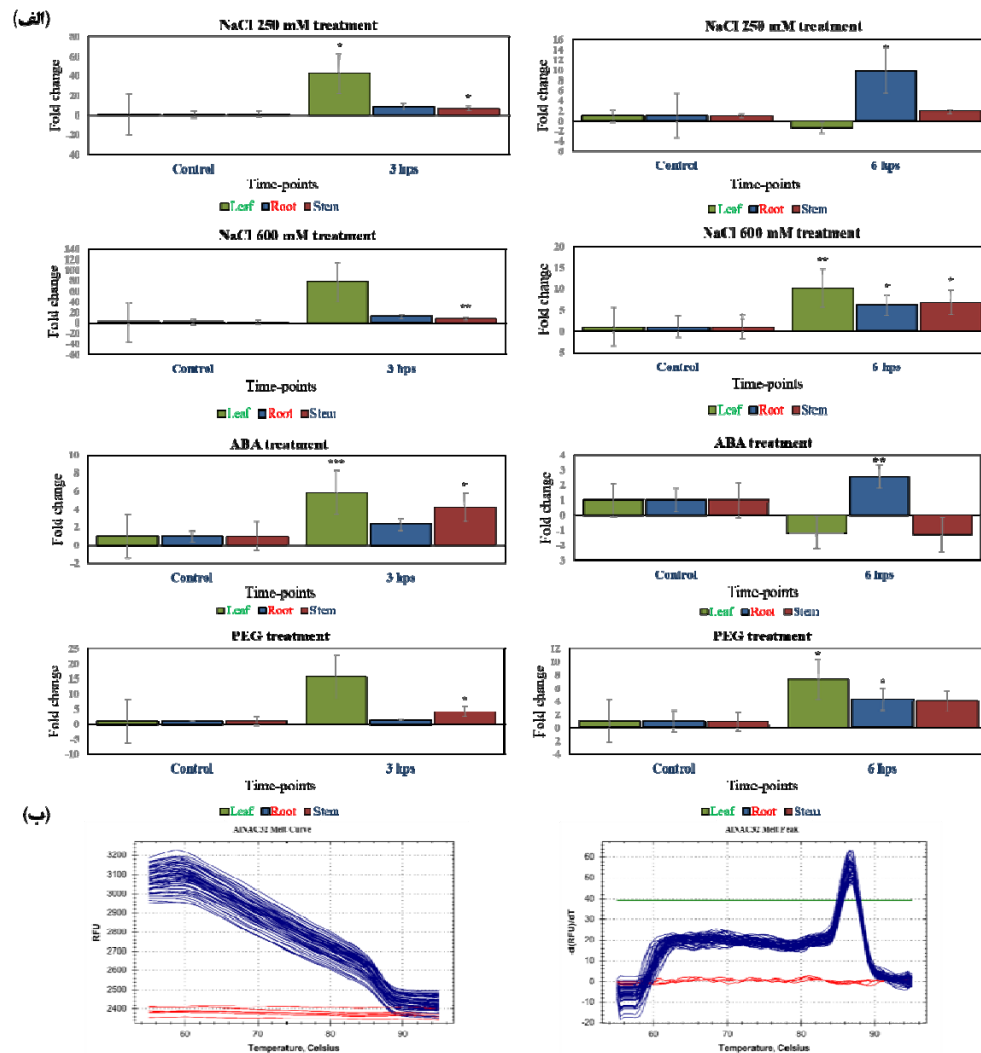
پیش‌بینی برهم‌کنش‌های تنظیمی بالقوه بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های *AINAC*: جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه مکانیسم‌های تنظیمی احتمالی خانواده ژنی *AINAC* برهم‌کنش‌های تنظیمی بالقوه بین فاکتورهای رونویسی و ژن‌های *AINAC* با استفاده از ابزار آنالین Promoter Analysis نرم‌افزار PlantPAN2.0 پیش‌بینی شد. نتایج نشان می‌دهد که، ژن‌های *AINAC* می‌توانند توسط ۵۰ خانواده فاکتور رونویسی تنظیم شوند (شکل ۳). فاکتورهای رونویسی از جمله AT-Hook، ARR-B،

آنالیز بیان ژن کاندید *AINAC32* با استفاده از RT-qPCR: جهت دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه تأثیر تنش‌های خشکی و شوری و همچنین فیتوهورمون ABA بر بیان ژن کاندید *AINAC32* تجزیه و تحلیل بیان با استفاده از RT-qPCR انجام گردید. ۳ ساعت بعد از تنش شوری ناشی از اعمال سدیم کلرید در سطح ۲۵۰ میلی‌مولار، افزایش بیان ۴۲/۴۲، ۶/۵۱ و ۸/۱۹ برابری ژن *AINAC32* نسبت به شاهد بترتیب در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه مشاهده گردید، اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، این مقادیر بترتیب به ۰/۷۴، ۱/۸ و ۹/۸۵ تغییر پیدا نمود. اما اعمال سدیم کلرید در سطح ۶۰۰ میلی‌مولار منجر به افزایش بیان ۷۷/۱۷، ۶/۴۷ و ۱۰/۶ برابری این ژن بترتیب در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، ۳ ساعت بعد از اعمال تنش گردید، اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، مقادیر بیان در بافت‌های برگ و ریشه بترتیب به ۱۰/۱۳ و ۶/۰۳ کاهش پیدا نمود، اما در بافت ساقه با بیان ۶/۶۵ تغییر چندانی

بحث و نتیجه‌گیری

تنظیم رونویسی، مکانیسم اصلی تنظیم بیان ژن‌های گیاهی می‌باشد.

مکانیسم‌های مولکولی دخیل در تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها بسیار پیچیده بوده و ژن‌های زیادی در این میان نقش ایفا می‌کنند (۱). تنظیم بیان ژن‌ها، چندسطحی بوده و



شکل ۴- الف) الگوی بیان ژن *AINAC32* تحت تیمارهای سدیم کلرید ۲۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، ABA ۱۰۰ میکرومولار و PEG ۲۰ درصد ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$). ب) منحنی ذوب (Melt curve) ژن *AINAC32* در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه.

پایداری عملکرد بالایی برخوردارند، صورت می‌گیرد (۵۲). ارزیابی عناصر سیس موجود در ناحیه پرموتور ژن‌های *AINAC* می‌تواند به درک بهتر تنظیم این ژن‌ها توسط فیتوهورمون‌های مختلف کمک نماید. تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی سیس نشان داد که تمام ژن‌های *AINAC*

برهم‌کنش میان جایگاه‌های اتصال پرموتور و فاکتورهای رونویسی، نقش مهمی در تنظیم ژن‌ها در سطح رونویسی ایفا می‌نماید. القاء (فعال/غیرفعال) پرموتورهای القایی توسط سیگنال‌های خارجی بوده، که به واسطه عناصر تنظیمی سیس موجود در پرموتورها که از اختصاصیت و

علاوه بر پاسخ به فاکتورهای مختلف تنش‌های غیرزیستی، مسئول میانجی‌گری مسیر پیام‌دهی سالیسیلیک‌اسید است (۳۳). علاوه بر این سایر عناصر سیس درگیر در تنش اسمزی مانند MBS نیز در پروموتورهای *AINAC* مشاهده شدند. تمام پروموتورها حاوی بیش از یک عنصر مرتبط با پاسخ به خشکی و ABA مانند عناصر MYC و MYB بودند. تشخیص این عناصر سیس پاسخگو به تنش نشان‌دهنده نقش کارکردی ژن‌های *AINAC* در تحمل گیاه آلروپوس لیپتورالیس به تنش خشکی و شوری می‌باشد.

جایگاه‌های اتصال برای چند TF شناخته شده دیگر مانند *GATA*، *AT-Hook*، *WOX*، *Dof*، *C2H2* و *WRKY* در نواحی پروموتور ژن‌های *AINAC* پیش‌بینی گردید که قادرند نقش‌های مهمی در اندام‌زایی و بیان‌های اختصاصی بافت ایفا نمایند. بعنوان مثال، موتیف *GATA* که جایگاه اتصال فاکتور رونویسی *GATA* می‌باشد، در پاسخگویی به نور و اختصاصیت بافت نقش دارد و در نمو وابسته به نور بافت آبکش نیز نقش‌آفرینی می‌کند (۵۵). فاکتور رونویسی *AT-Hook* در بیان اختصاصی بافت آوندی نقش دارد و فاکتور رونویسی *WOX* در چندین فرآیند نموی کلیدی دخیل می‌باشد (۴۹). فاکتورهای رونویسی *Dof* نیز فرآیندهای مرتبط با ایجاد و حفظ سیستم آوندی را بطور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم می‌کنند (۲۷). فاکتورهای رونویسی *C2H2* مانند *ZAT7*، *ZAT10* و *ZPT2* در تنظیم پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (۲۴). فاکتورهای رونویسی *WRKY* به موتیف *W box* در پروموتور ژن *ERF3* توتون متصل و موجب فعال‌سازی سریع آن هنگام آسیب‌های مکانیکی می‌شود (۳۶). پروموتور ژن *OsNAC6* برنج القاء‌شده تحت آسیب‌های مکانیکی دارای چهار نسخه از *W-box* بود (۳۵).

نتایج آنالیز بیان ژن کاندید *AINAC32* با استفاده از RT-qPCR نشان داد که در بافت برگ ۳ ساعت بعد از اعمال تیمارهای سدیم کلرید ۲۵۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار، PEG و

نواحی پروموتور خود دارای یک یا چند عنصر سیس پاسخگو به فیتوهورمون مانند اکسین، جاسمونیک‌اسید، جیبرلین، آبسزیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید و اتیلن می‌باشند. بعنوان مثال، عناصر P-box و GARE-motif مرتبط با مسیر انتقال سیگنال GA، و CGTCA-motif و TGACG-motif با پاسخ به MeJA همراه هستند (۵۶). 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 (۵۶). MeJA در وساطت بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ گیاهان به آسیب (۱۱) و اکسین با القاء نرم شدن دیواره سلولی در تنظیم خواص دیواره سلولی نقش دارند (۳۱). در این تحقیق چندین عنصر پاسخگو به ABA مانند *ABRE*، *ABRE2*، *ABRE3a*، *ABRE4* و *AT-ABRE* در پروموتور ژن‌های *AINAC* پیش‌بینی شد. مشخص شده است عنصر *ABRE* که با مسیر پیام‌دهی وابسته به ABA همراه است، پاسخ گیاه را به تنش خشکی و شوری افزایش می‌دهد (۴۳). در بررسی دیگری جهش در موتیف *ABRE* در پروموتور *OsNAC5* برنج، منجر به لغو فعال‌سازی پروموتور توسط ABA گردید (۴۷). علاوه بر این، در مجموع ۱۳۴۰ عنصر تنظیمی سیس مرتبط با تنش، شناسایی و به چند گروه تقسیم شدند (جدول ۱). عنصر پاسخگو به کم‌آبی (DRE) که در پروموتور ژن‌های *AINAC* یافت شد، نمونه دیگری از عناصر سیس است که در رونویسی پاسخگو به تنش اسمزی درگیر است (۳۴). این عنصر برای اولین بار بعنوان یک عنصر سیس ضروری در پروموتور ژن (*RD29A = RESPONSIVE TO DESSICATION 29A*) برای بیان مستقل از ABA در پاسخ به تنش‌های خشکی و سرما شناخته شد (۵۴). TC-rich repeat یک عنصر پروموتوری است که در دفاع و پاسخگویی به تنش در ژن (*DREB = Dehydrating Responsive Element Binding TCA-element*) نقش دارد (۴۲). عنصر

خشکی، شوری بالا و آسیب‌های مکانیکی القاء شد (۳۸). بیان *SINAC11* گوجه‌فرنگی در اثر گرما، کم‌آبی و سرما القاء شد (۵۰). ژن *TaNAC4* گندم توسط تیمارهای اتیلن، MeJA و ABA، سرما، شوری بالا، آسیب‌های مکانیکی و پاتوزن زنگ نواری افزایش بیان نشان داد و بیان این ژن در ریشه گیاهچه‌های گندم در مقایسه با برگ و ساقه، بالاتر بود. این نتایج نشان داد که ژن *TaNAC4* بعنوان یک فعال‌کننده رونویسی دخیل در پاسخ گندم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفای نقش می‌نماید (۵۳). افزایش بیان *GhNAC4* تحت تنش‌های مختلفی از جمله خشکی، شوری، تنش اسمزی، ROS و آسیب‌های مکانیکی نشان می‌دهد که این ژن‌ها ممکن است در مسیرهای پیام‌دهی چندین تنش محیطی، نقش بالقوه‌ای داشته باشد (۴۹).

انواع مختلف عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتور ژن‌های *AINAC* و تنوع در فاکتورهای رونویسی که به این عناصر تنظیمی متصل می‌شوند، نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها توسط طیف وسیعی از فیتوهورمون‌ها و سیگنال‌های تنش‌های زیستی و غیرزیستی تنظیم می‌شود و این امر حاکی از نقش مهم این ژن‌ها در نمو گیاه و دفاع در برابر تنش‌ها می‌باشد. با تجزیه و تحلیل بیان ژن کاندید *AINAC32* با استفاده از RT-qPCR نیز مشخص شد که این ژن تحت تنش‌های شوری، خشکی و ABA، در بافت‌های برگ، ساقه و ریشه، افزایش بیان نشان می‌دهد که بیانگر نقش این ژن در تحمل به چندین تنش غیرزیستی می‌باشد. این یافته‌ها اطلاعات پایه‌ای جهت تحقیقات بیشتر در مورد کارکرد ژن‌های *NAC* در رشد و تحمل به تنش‌های غیرزیستی در *A. littoralis* فراهم می‌آورد.

سپاسگزاری

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 T234/96 انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان

فیتوهورمون ABA، مقادیر بیان ژن کاندید افزایش می‌یابد اما ۶ ساعت بعد از اعمال تنش، این مقادیر، کاهش نشان دادند. با این حال، در بافت ساقه، ۳ ساعت بعد از اعمال تیمارهای سدیم کلرید ۲۵۰ میلی‌مولار و ABA، افزایش بیان مشاهده شد اما ۶ ساعت بعد، این مقادیر تقلیل پیدا نمودند، در حالی‌که تحت تیمارهای سدیم کلرید ۲۵۰ میلی‌مولار و تنش خشکی، افزایش بیان نشان داده شده در ۳ ساعت بعد از اعمال تنش، بدون تغییر چندانی در ۶ ساعت بعد از اعمال تنش نیز مشاهده گردید. اما در بافت ریشه تحت تیمارهای سدیم کلرید ۲۵۰ میلی‌مولار، ABA و تنش خشکی، ۶ ساعت بعد از تنش، افزایش بیان بالاتری در مقایسه با ۳ ساعت بعد از تنش مشاهده گردید. اگرچه تحت تیمار سدیم کلرید ۶۰۰ میلی‌مولار، در مدت زمان ۶ ساعت بعد از تنش در مقایسه با ۳ ساعت، مقدار بیان کاهش پیدا نمود (شکل ۴). ژن کاندید *AINAC32* یک همولوگ از ژن *OsNAP* (*Os03g0327800*) محسوب می‌شود که بطور قابل توجهی در اثر تنش‌های ABA و غیرزیستی، از جمله شوری بالا، خشکی و دمای پایین القاء شده است (۹). این امر می‌تواند بیانگر کارکرد مهم *AINAC32* بعنوان یک ژن کاربردی متحمل به تنش‌های غیرزیستی باشد.

فیتوهورمون ABA نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، مانند شوری، خشکی و سرما دارد (۳۲). شواهد نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی *NAC* در انتقال پیام وابسته به ABA درگیر می‌باشند. چندین *NAC* در آرابتیدوپسیس تنظیم فرآیندهای وابسته به ABA را نشان داده‌اند (۲۱). پاسخ ژن کاندید *AINAC32* به تیمار ABA، بیانگر نقش احتمالی این ژن در پیام‌دهی ABA می‌باشد.

ژن‌های *SgNAC1* و *SgNAC2* نیز بطور قابل توجهی در طول تنش سرما افزایش بیان نشان دادند (۵۸). بیان ژن *OsNAC6* برنج توسط تیمارهای ABA، JA، سرما،

بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام

نمایند.

منابع

- ۱- بنده حق، ع.، ش. علیپور قربانی، م. تورچی و ر. شکری قره لو. ۲۰۱۸. تجزیه پروتئوم بذر کلزا تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۱(۲): ۴۲۲-۴۳۳
- ۲- دشتبانی، ف.، ر. حاجی بلند و ن. علی اصغرزاد. ۲۰۱۸. جوانه‌زنی، فتوسنتز و رشد دو گونه هالوفیت پوکسنلیا دیستانس و آلوروپوس لیتورالیس تحت شرایط شوری و همزیستی آن‌ها با قارچ‌های میکوریز آربوسکول‌دار در شرایط طبیعی زیستگاه در دشت تبریز. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۰(۴): ۸۱۷-۸۳۳
- ۳- هاشمی پطرودی، ح.ر. و س. محمدی. ۲۰۲۰. شناسایی خانواده ژنی *ERF* در گیاه شورزیست *Aeluropus littoralis* و بررسی الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری. زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۹(۳): ۵۳-۶۶.
- ۴- هاشمی پطرودی، ح.ر.، ق.ع. نعمت‌زاده، س. محمدی و م. کولمن. ۲۰۱۹. بررسی الگوی بیانی خانواده ژنی فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی (HSFs) در گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری. تنش‌های محیطی در علوم زراعی، ۱۳(۲): ۵۸۱-۵۷۱
- 5- An, J.P., X.F. Wang, X.W. Zhang, H.F. Xu, S.Q. Bi, C.X. You and Y.J. Hao. 2020. An apple MYB transcription factor regulates cold tolerance and anthocyanin accumulation and undergoes MIEL1-mediated degradation. *Plant Biotechnol J*, 18(2): 337-353.
- 6- An, J.P., J.F. Yao, R.R. Xu, C.X. You, X.F. Wang and Y.J. Hao. 2018. An apple NAC transcription factor enhances salt stress tolerance by modulating the ethylene response. *Physiologia plantarum*, 164(3): 279-289.
- 7- Azim, J.B., M.F.H. Khan, L. Hassan and A.H.K. Robin. 2020. Genome-wide characterization and expression profiling of plant-specific PLATZ transcription factor family genes in *Brassica rapa* L. *Plant Breeding and Biotechnology*, 8(1): 28-45.
- 8- Bailey, T.L., M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W.W. Li and W.S. Noble. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37: 202-208.
- 9- Chen, X., Y. Wang, B. Lv, J. Li, L. Luo, S. Lu, X. Zhang, H. Ma and F. Ming. 2014. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant Cell Physiol*, 55(3): 604-19.
- 10- Chow, C.N., H.Q. Zheng, N.Y. Wu, C.H. Chien, H.D. Huang, T.Y. Lee, Y.F. Chiang Hsieh, P.F. Hou, T.Y. Yang and W.C. Chang. 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.
- 11- Creelman, R.A., M.L. Tierney and J.E. Mullet. 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.
- 12- Faraji, S., H. Najafi-Zarrini, S. Hashemi-Petroudi and G. Ranjbar. 2017. *AIGLYI* gene implicated in salt stress response from halophyte *Aeluropus littoralis*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(6): 850-860.
- 13- Finn, R.D., P. Coggill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, J. Mistry, A.L. Mitchell, S.C. Potter, M. Punta, M. Qureshi and A. Sangrador-Vegas. 2015. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44: 279-285.
- 14- Guo, Y. and S. Gan. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46(4): 601-612.
- 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.
- 16- Hashemi-Petroudi, S.H., G.A. Nematzadeh, H. Askari and S. Ghahary. 2014. Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus littoralis*.

- Journal of Plant Molecular Breeding, 2(2): 56-67.
- 17- Hashemi-Petroudi, S.H., G.A. Nematzadeh, H. Askari and Y. Ghasemi. 2012. Pattern of DNA cytosine methylation in *Aeluropus littoralis* during temperature stress. Journal of Plant Molecular Breeding, 1(1): 16-24.
- 18- Hashemi, S.H., G. Nematzadeh, G. Ahmadian, A. Yamchi and M. Kuhlmann. 2016. Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 23(1): 18.
- 19- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang and L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(35): 12987-12992.
- 20- Hu, R., G. Qi, Y. Kong, D. Kong, Q. Gao and G. Zhou. 2010. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. BMC plant biology, 10(1): 145.
- 21- Hu, W., Y. Wei, Z. Xia, Y. Yan, X. Hou, M. Zou, C. Lu, W. Wang and M. Peng. 2015. Genome-wide identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in cassava. PloS one, 10(8): e0136993.
- 22- Jones, P., D. Binns, H.-Y. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, H. McWilliam, J. Maslen, A. Mitchell and G. Nuka. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics, 30(9): 1236-1240.
- 23- Khedia, J., P. Agarwal and P.K. Agarwal. 2018. AlNAC4 transcription factor from halophyte *Aeluropus lagopoides* mitigates oxidative stress by maintaining ROS homeostasis in transgenic tobacco. Frontiers in plant science, 9: 1522.
- 24- Kielbowicz-Matuk, A. 2012. Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. Plant Science, 185: 78-85.
- 25- Ko, J.H., S.H. Yang, A.H. Park, O. Lerouxel and K.H. Han. 2007. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 50(6): 1035-1048.
- 26- Le, D.T., R. Nishiyama, Y. Watanabe, K. Mochida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and L.S.P. Tran. 2011. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. DNA research, 18(4): 263-276.
- 27- Le Hir, R. and C. Bellini. 2013. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. Frontiers in plant science, 4: 164.
- 28- Lescot, M., P. Déhais, G. Thijs, K. Marchal, Y. Moreau, Y. Van de Peer, P. Rouzé and S. Rombauts. 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.
- 29- Letunic, I., T. Doerks and P. Bork. 2014. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. Nucleic acids research, 43(D): D257-D260.
- 30- Liu, X., S. Liu, J. Wu, B. Zhang, X. Li, Y. Yan and L. Li. 2013. Overexpression of *Arachis hypogaea* NAC3 in tobacco enhances dehydration and drought tolerance by increasing superoxide scavenging. Plant physiology and biochemistry, 70: 3۳۵۹-۵۴
- 31- Majda, M. and S. Robert. 2018. The role of auxin in cell wall expansion. International journal of molecular sciences, 19(4): 951.
- 32- Mittler, R. and E. Blumwald. 2015. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. The Plant Cell, ۲۷: ۲۷-۶۴
- 33- Mou, S., Z. Liu, D. Guan, A. Qiu, Y. Lai and S. He. 2013. Functional analysis and expressional characterization of rice ankyrin repeat-containing protein, OsPIANK1, in basal defense against Magnaporthe oryzae attack. PloS one, 8(3): e59۶۹۹
- 34- Nakashima, K., Z.K. Shinwari, Y. Sakuma, M. Seki, S. Miura, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Organization and expression of two Arabidopsis *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration-and high-salinity-responsive gene expression. Plant molecular biology, 42(4): 657-665.

- 35- Nakashima, K., L.S.P. Tran, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama, D. Todaka, Y. Ito, N. Hayashi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4): 617-630.
- 36- Nishiuchi, T., H. Shinshi and K. Suzuki. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53): 55355-55361.
- 37- Nuruzzaman, M., R. Manimekalai, A.M. Sharoni, K. Satoh, H. Kondoh, H. Ooka and S. Kikuchi. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465(1-2): 30-44.
- 38- Ohnishi, T., S. Sugahara, T. Yamada, K. Kikuchi, Y. Yoshida, H.Y. Hirano and N. Tsutsumi. 2005. *OsNAC6*, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes & genetic systems*, 80(2): 135-139.
- 39- Olsen, A.N., H.A. Ernst, L.L. Leggio and K. Skriver. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*, 10(2): 79-87.
- 40- Puranik, S., P.P. Sahu, S.N. Mandal, S.K. Parida and M. Prasad. 2013. Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and expression profiling of the NAC transcription factor family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PloS one*, 8(5): e64594.
- 41- Sablowski, R.W. and E.M. Meyerowitz. 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*, 92(1): 93-103.
- 42- Sazegari, S., A. Niazi and F.S. Ahmadi. 2015. A study on the regulatory network with promoter analysis for Arabidopsis DREB-genes. *Bioinformatics*, 11(2): 101.
- 43- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 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.
- 44- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol and R. Koes. 1996. The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85(2): 159-170.
- 45- Sperotto, R.A., F.K. Ricachenevsky, G.L. Duarte, T. Boff, K.L. Lopes, E.R. Sperb, M.A. Grusak and J.P. Fett. 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 230(5): 985-1002.
- 46- Stender, E.G., C. O'Shea and K. Skriver. 2015. Subgroup-specific intrinsic disorder profiles of arabidopsis NAC transcription factors: Identification of functional hotspots. *Plant signaling & behavior*, 10(6): e1010967.
- 47- Takasaki, H., K. Maruyama, S. Kidokoro, Y. Ito, Y. Fujita, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Nakashima. 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.
- 48- Tran, L.-S.P., K. Nakashima, Y. Sakuma, S.D. Simpson, Y. Fujita, K. Maruyama, M. Fujita, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9): 2481-2498.
- 49- Trishla, V.S., S. Marriboina, P. Boyidi and P.B. Kirti. 2020. GUS-reporter based analysis of the promoter activity of *Gossypium hirsutum* NAC transcription factor, GhNAC4 that is induced by phytohormones and environmental stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-12.
- 50- Wang, L., Z. Hu, M. Zhu, Z. Zhu, J. Hu, G. Qanmber and G. Chen. 2017. The abiotic stress-responsive NAC transcription factor SINAC11 is involved in drought and salt response in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(1): 161-174.
- 51- Wang, L., C. Wang, D. Wang and Y. Wang. 2014. Molecular characterization and transcript

- profiling of NAC genes in response to abiotic stress in *Tamarix hispida*. *Tree genetics & genomes*, 10(1): 157-171.
- 52- Wu, A., P. Hao, H. Wei, H. Sun, S. Cheng, P. Chen, Q. Ma, J.L. Gu, M. Zhang and H. Wang. 2019. Genome-wide identification and characterization of glycosyltransferase family 47 in cotton. *Frontiers in genetics*, 10: 824.
- 53- Xia, N., G. Zhang, X.Y. Liu, L. Deng, G.L. Cai, Y. Zhang, X.J. Wang, J. Zhao, L.L. Huang and Z.S. Kang. 2010. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular biology reports*, 37(8): 3703-3712.
- 54- Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki. 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6(2): 251-264.
- 55- Yin, Y., L. Chen and R. Beachy. 1997. Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *The Plant Journal*, 12(5): 1179-1188.
- 56- Yu, T.F., W.Y. Zhao, J.D. Fu, Y.W. Liu, M. Chen, Y.B. Zhou, Y.Z. Ma, Z.S. Xu and Y.J. Xi. 2018. Genome-wide analysis of CDPK family in foxtail millet and determination of SiCDPK24 functions in drought stress. *Frontiers in plant science*, 9: 651.
- 57- Yue, Y., L. Li, Y. Li, H. Li, W. Ding, T. Shi, G. Chen, X. Yang and L. Wang. 2020. Genome-wide analysis of NAC transcription factors and characterization of the cold stress response in sweet osmanthus. *Plant Molecular Biology Reporter*: 1-17.
- 58- Zhan, P.L., S.W. Ke, P.Y. Zhang, C.C. Zhou, B.L. Fu, X.Q. Zhang, T.X. Zhong, S. Chen and X.M. Xie. 2018. Overexpression of two cold-responsive ATAF-like NAC transcription factors from fine-stem stylo (*Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*) enhances cold tolerance in tobacco plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135(3): 545-558.
- 59- Zouari, N., R.B. Saad, T. Legavre, J. Azaza, X. Sabau, M. Jaoua, K. Masmoudi and A. Hassairi. 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene*, 404(1-2): 61-69.

Abiotic stress-related Cis-elements analysis in promoters of *Aeluropus littoralis* NAC genes

Mohammadi S.¹, Nematzadeh Gh.², Najafi Zarrini H.² and Hashemi-petroudi S.H.^{3*}

¹ Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R. of Iran.

² Dept. of Biotechnology and breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R. of Iran.

³ Dept. of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R. of Iran.

Abstract

NAC (NAM, ATAF1/2, and CUC2) proteins are the plant-specific transcription factors (TFs) that play roles in diverse developmental processes and stress responses. In the present study, a total of 68 NAC genes were identified in *Aeluropus littoralis*, a salt secreting halophytic grass, belongs to family *Poaceae*. By analysis of cis regulatory elements of *AINAC* genes promoter, many cis-acting regulatory elements related to growth and development, phytohormone and stresses defense were found in the promoter of *AINAC* genes. These hormone-responsive elements, include P-box, TCA element, CGTCA-motif and TGACG-motif, TGA-element, ERE and ABRE, which were associated with gibberellic acid, salicylic acid, jasmonic acid, Auxin, ethylene and abscisic acid response, respectively. For stress responsive elements, TC-rich repeats, ARE, MBS, LTR; and W box, can be noted which are related to defense and stress, anaerobic induction, drought inducibility, low-temperature inducibility, and wound stress, respectively. The different types of cis regulatory elements in the promoter of *AINAC* genes and the variability in transcription factors associated with these regulatory elements indicates the important role of these genes in plant development and defense against stress. By analyzing *AINAC32* candidate gene expression using RT-qPCR it was revealed that *AINAC32* was up-regulated under salt, drought and ABA phytohormone stresses in leaf, stem and root tissues, implying its role in multiple abiotic stresses tolerance. These findings provided valuable information for further research on the functions and applications of *AINACs* in *A. littoralis* growth and adaptation to stress.

Key words: *Aeluropus littoralis*, Gene expression pattern, Gene family, Halophyte, Transcription factor