

بررسی مقایسه‌ای پروموتورهای ژنهای *Thioredoxin H5* و *Catalase2* در آرابیدوپسیس به منظور تعیین نحوه کارکرد آنها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی

زهرا زیتی^{۱*} و روح‌اله شاملو دشت پاگردی^۲

^۱ داراب، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، بخش اگرواکولوژی

^۲ شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی، بخش زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۹

چکیده

به منظور بررسی نقش عناصر تنظیمی سیس نواحی پروموتری بر الگوی بیان ژنهای *Catalase 2 (CAT2)* و *Thioredoxin H5 (TRX5)* در گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی، توالی پروموتری ژنهای مورد نظر، عناصر تنظیمی سیس موجود در آنها و داده‌های مربوط به بیان این ژنها در تنش‌های مختلف به ترتیب با استفاده از Phytozome، PlantCARE و The Bio-Array Resource for Plant Biology دریافت گردید. به منظور تعیین تفاوت‌های معنی‌دار در تعداد تکرارهای هر کدام از عناصر تنظیمی سیس بین پروموترها از آزمونهای آماری مختلف موجود در ابزار بیوانفورماتیک IDEG6 استفاده شد. نتایج نشان داد که ۸ عنصر تنظیمی شامل ARE، CAAT-box، ABRE، Unnamed_4، Box-W1، TGA-element، W box و TATA-box بین دو پروموتر دارای تعداد تکرار متفاوت و معنی‌داری بودند. به نظر می‌رسد وجود تعداد بیشتری از عناصر اختصاصی تنظیمی پاسخ به پاتوزن (Box-W1 و W box) و پاسخ به اکسین (TGA-element)، ژن *TRX5* را برخلاف ژن *CAT2* قادر به پاسخ به تنش زیستی می‌کند. همچنین وجود تعداد تکرارهای متفاوتی از عنصر تنظیمی اختصاصی پاسخ به اکسین (TGA-element) در پروموتر ژن *TRX5* و عناصر تنظیمی پاسخ بی‌هوازی (ARE) و پاسخ به آبسزیک اسید (ABRE) در پروموتر ژن *CAT2* بخشی از الگوی بیان این دو ژن را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی توجیه نمود. بر اساس این نتایج، *TRX5* هم در پاسخ به تنش‌های زیستی و هم غیرزیستی نقش دارد. شناسایی این گونه ژنها با کارکرد پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌تواند پیشرفت بزرگی در جهت انتخاب ژنهای کاندید مناسب جهت دست‌ورزی ژنتیکی به منظور افزایش تحمل به تنشها در گیاهان به شمار رود.

واژه‌های کلیدی: *TRX5*، *CAT2*، آنالیز پروموتر، بیان ژن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۱۳۶۱۳۹۹۴۰، پست الکترونیکی: zahrazinati@shirazu.ac.ir

مقدمه

منجر به افزایش تحمل شود، حمایت می‌کند (۱۴، ۲۰ و ۳۲). تنظیم بیان ژن شامل یک شبکه مولکولی پیچیده می‌باشد. پروموترها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف رشدی و پاسخ به محیط دارند. رونویسی از ژنها در درجه اول توسط شناسایی عوامل رونویسی متصل شونده به DNA (TF= Transcription factors) و اتصالشان به

در سیستمهای کشاورزی، تنش‌های غیرزیستی و زیستی باعث تفاوت عملکرد برداشت شده نسبت به عملکرد بالقوه می‌شوند. شواهد زیادی وجود دارند که بیانگر تغییر بیان ژنهای گیاهی در اثر تنش‌های مختلف هستند که احتمالاً به دلیل نقش آنها در مکانیسمهای تحمل می‌باشد. مطالعه گیاهان تراریخته این نظریه را که تغییر بیان ژنها می‌تواند

CAT2 و *TRX5*، از تلفیق آنالیز مقایسه‌ای پروموتورها و داده‌های بیان ژن استفاده شد. این مطالعه اولین گزارش پیرامون بررسی مقایسه‌ای پروموتور ژنهای رمزکننده *CAT2* و *TRX5* می‌باشد.

مواد و روشها

آنالیز مقایسه‌ای پروموتورهای ژنهای *CAT2* و *TRX5* :
توالی پروموتور ژنهای *CAT2* و *TRX5* (شامل ۱۵۰۰ جفت باز بالادست نقطه آغاز رونویسی) از پایگاه اطلاعاتی www.phytozome.net دریافت شد. برای شناسایی نوع و تعداد عناصر تنظیمی توالی‌های پروموتوری، از سایت <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html> استفاده گردید. به منظور تعیین تفاوت‌های معنی‌دار در تعداد تکرارهای هر کدام از عناصر تنظیمی سیس بین پروموتورها، از آزمونهای آماری مختلف (Fisher، Audic and Claverie، R of Grellier and Tobin، Chi-squared 2x2، exact test، Stekel and Falciani و General Chi-squared) با در نظر گرفتن $P\text{-value} \leq 0.05$ و با به کارگیری ابزار IDEG6 (۲۹) استفاده شد (۳۴).

بررسی الگوی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی: سایت The Bio-Array Resource for Plant Biology (BAR) (<http://bar.utoronto.ca>) به منظور دریافت داده‌های بیان ژن-های رمزکننده *CAT2* (AT4G35090) و *TRX5* (AT1G45145) در تنشهای مختلف زیستی و غیر زیستی مورد استفاده قرار گرفت. این سایت برای جستجو و اکتشاف در میان مجموعه داده‌های بزرگ مقیاس ریزآرایه و پروژه‌های با بازدهی بالا در آراییدوپسیس و گونه‌های دیگر استفاده می‌شود. به منظور تسهیل تفسیر و آنالیز داده‌های بیان حاصل از آزمایشهای ریزآرایه و پروژه‌های با بازدهی بالا، نرم‌افزاری با نام electronic Fluorescent Pictograph browser (eFP) توسط Winter و همکاران در سال ۲۰۰۷ ایجاد شده است که در سایت BAR قابل دسترس می‌باشد

توالی کوتاه خاصی (TFBS= Transcription factor binding site) یا عناصر تنظیمی سیس (CREs= Cis regulatory elements) در منطقه تنظیمی (پروموتور) کنترل می‌شود و سپس به فعال شدن یا سرکوبی رونویسی در پاسخ به تغییرات محیطی و در طی نمو منجر می‌گردد (۲۷). بنابراین شناسایی عناصر تنظیمی سیس یکی از گامهای اساسی برای فهم شبکه تنظیمی رونویسی است که در نهایت اطلاعات لازم را برای ساخت مدل‌های شبکه‌های تنظیمی فراهم می‌سازد (۲۳). پروموتور منطقه بالادست مجاور شروع نقطه رونویسی (TSS= Transcription start site) می‌باشد. هر ژن دارای ترکیبی منحصر به فرد از عناصر تنظیمی در نواحی پروموتوری خود می‌باشد که الگوی بیان زمانی و مکانی آن ژن را تعیین می‌کند. پیشرفتهای اخیر تکنولوژی ریزآرایه و در دسترس بودن تعداد زیادی از توالیهای ژنوم کامل، استفاده از روشهای محاسباتی را جهت یافتن عناصر تنظیمی و شفاف سازی شبکه تنظیمی امکان پذیر ساخته است (۲۷). *Thioredoxin H5* (*TRX5*) یکی از هشت عضو متعلق به خانواده *Thioredoxin* های *H* سیتوزولی می‌باشد (۲۲ و ۲۵). در گیاهان *Thioredoxin H* در طول جوانه زنی و نمو اولیه گیاهچه (۵، ۱۸، ۲۴ و ۴۰) و احتمالاً جذب سولفات (۲۶)، زخم، ریزش و پیری، برهمکنش‌های ناسازگار با پاتوژن، تنش اکسیداتیو (۲۱) شرکت دارد. وجود آنها در شیره آوندی برنج و طیف وسیعی از گونه‌های تک لپه و دولپه نشان می‌دهد که آنها می‌توانند به عنوان پروتئینهای پیام رسان عمل کنند (۱۷) و *Catalase 2* (*CAT2*) نیز یکی از سه ژن خانواده کاتالاز می‌باشد (۱۱). کاتالاز جزئی از ماشین دفاعی آنتی اکسیدانی در گیاهان در مقابل صدمات تنش اکسیداتیو است. *CAT2* از کنترل کننده‌های اصلی H_2O_2 است که به هم ایستایی گونه‌های اکسیژن فعال کمک می‌کند (۱۳). علاوه بر این، فعالیت کاتالاز در تنشهای سرما و خشکی افزایش می‌یابد (۹). در این پژوهش به منظور شناسایی ارتباط عناصر تنظیمی سیس با الگوی بیان ژنهای رمزکننده

بررسی توالی پروموتوری ژنهای *CAT2* و *TRX5*، ۳۱ عنصر تنظیمی سیس را در هر ژن پیش بینی کرد. ۱۹ عنصر تنظیمی بین دو پروموتر مشترک بود. ۱۲ عنصر تنظیمی خاص *CAT2* و ۱۲ عنصر تنظیمی نیز خاص *TRX5* بود. عمده‌ترین عنصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژنهای *CAT2* و *TRX5*، TATA-box و CAAT-box بودند که به ترتیب توالی شروع رونویسی (۶) و توالی افزاینده (۲۸) می‌باشند.

نتایج آزمونهای آماری نشان داد ۸ عنصر تنظیمی یعنی ARE، CAAT-box، ABRE، Unnamed_4، Box-W1، TGA-element، W box و TATA-box بین پروموتورهای ژنهای *CAT2* و *TRX5* دارای تعداد تکرار متفاوت و معنی‌داری بودند (جدول ۱). از این تعداد، عنصر تنظیمی ARE خاص ژن *CAT2*، سه عنصر تنظیمی Box-W1، TGA-element و W box خاص ژن *TRX5* و چهار عنصر تنظیمی CAAT-box، Unnamed_4، ABRE و TATA-box بین دو پروموتر مشترک بودند.

الگوی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* در تنشهای مختلف زیستی و غیر زیستی در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. همچنین ضرایب همبستگی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* تحت تنشهای مختلف غیر زیستی و زیستی در جدول ۲ نشان داده شده است. همبستگی مثبت بیانگر روند تغییرات بیان نسبتاً مشابه و همبستگی منفی نشان دهنده روند تغییرات بیان متفاوت ژنهای *CAT2* و *TRX5* تحت تنشهای مختلف غیر زیستی و زیستی می‌باشد. بین بیان دو ژن در تنش شوری و اشعه ماوراء بنفش (در بافت شاخساره) و تنش سرما (در بافت ریشه) همبستگی منفی معنی‌داری وجود داشت. به علاوه آنالیز همبستگی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* تحت تنشهای مختلف غیرزیستی و زیستی نشان داد که در اکثر تنشها همبستگی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* منفی می‌باشد، هرچند این همبستگی از لحاظ آماری معنی‌داری نبود. آنالیز مقایسه‌ای پروموتر می‌تواند راهکار

(۴۱). موتور مرورگر Arabidopsis eFP داده‌های بیان تقریباً ۲۲۰۰۰ ژن در آرآیدوپسیس که توسط کنسرسیوم AtGenExpress (کنسرسیوم بین المللی کشف ترانسکریپتوم آرآیدوپسیس) و آزمایشگاههای دیگر تولید شده است را ارائه می‌دهد. تقریباً بیشتر از ۱۰۰۰ مجموعه داده ریزآرایه در این نرم‌افزار بارگذاری شده است. در مرورگر Arabidopsis eFP پس از وارد کردن IDهای ژن مورد بررسی، انتخاب منبع داده‌ها از لیست پیش فرض و انتخاب روش تفسیری بیان ژن (مطلق، نسبی و مقایسه‌ای)، مقادیر نرمال شده بیان ژن مورد نظر، بازیابی می‌شود. علاوه بر این، سایر جزئیات آزمایشها، از قبیل تعداد تکرارها، شرایط رشدی، نحوه اعمال تیمارها و نوع روش نرمال سازی داده‌ها در سایت BAR قابل دسترس می‌باشند (۴۱). در مطالعه حاضر با انتخاب روشهای زیستی و غیر زیستی از لیست پیش فرض منبع داده‌ها و انتخاب روش تفسیری مطلق در مرورگر Arabidopsis eFP، داده‌های بیان مطلق ژنهای *CAT2* و *TRX5* مربوط به بافت شاخساره و ریشه گیاه آرآیدوپسیس (اکوتیپ Clumbia-0) ۱۸ روزه، در زمانهای ۰، ۰/۵، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنشهای غیر زیستی (شوری، سرما، اسمزی، ژنوتوکسیک، خشکی، اکسیداتیو، اشعه ماوراء بنفش، زخم و گرما) و همچنین داده‌های بیان مطلق ژنهای *CAT2* و *TRX5* در شاخساره گیاه آرآیدوپسیس ۴ هفته‌ای، در زمانهای ۲، ۶ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنشهای زیستی (باکتریهای غیر بیماریزای *Pseudomonas Syringae*، باکتریهای بیماریزای *Pseudomonas Syringae* و قارچ *Phytophthora infestans*) دریافت شدند. همبستگی بین الگوی بیان دو ژن *CAT2* و *TRX5* در تنشهای مختلف زیستی و غیر زیستی نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS تعیین شد. در نهایت، ارتباط بین الگوی بیان ژنها و نتایج حاصل از بخش آنالیز مقایسه‌ای پروموتورها بررسی گردید.

نتایج

مناسی برای توجیه بخشی از این روند تغییرات بیان و غیرزیستی باشد. متفاوت دو ژن *CAT2* و *TRX5* در پاسخ به تنش‌های زیستی

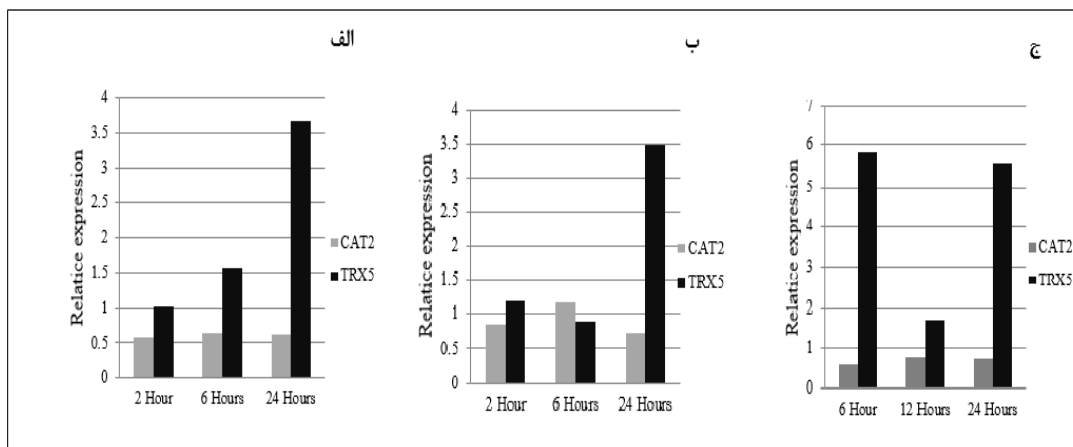
جدول ۱- نتایج مقایسه جفتی تعداد تکرارهای عناصر تنظیمی واقع در نواحی پرموتری ژنهای *CAT2* و *TRX5* با استفاده از آزمونهای آماری Audic and Claverie، Fisher exact test، Chi-squared 2X2، Greller and Tobin، R of Stekel and Falciani، General Chi-squared و مقادیر *p*-value هر آزمون برای هر عنصر تنظیمی آورده شده است.

Cis-acting elements	کارکرد	<i>CAT2</i>	<i>TRX5</i>	<i>CAT2</i> (norm)	<i>TRX5</i> (norm)	Audic and Claverie	Fisher exact test	Chi-squared 2x2	Greller and Tobin	R of Stekel and Falciani	General Chi-squared
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	10	1	657.9	88.5	0.0103	0.0269	0.0215	.	0.0133	0.0215
ARE	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	4	0	263.2	0	0.0620	0.1384	0.0822	.	0.0349	0.0822
CAAT-box	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	30	14	1973.7	1238.9	0.0248	0.1337	0.1119	.	0.1400	0.1119
TATA-box	core promoter element around -30 of transcription start	62	52	4078.9	4601.8	0.03498	0.4518	0.3952	0.1531	0.5201	0.3952
Unnamed_4		1	5	65.8	442.5	0.02783	0.0866	0.0414	.	0.0396	0.0414
Box-W1	fungal elicitor responsive element	0	3	0	265.5	0.0444	0.0763	0.0433	.	0.0237	0.0433
TGA-element	auxin-responsive element	0	5	0	442.5	0.0080	0.0133	0.0088	.	0.0035	0.0088
W box	pathogen-induced activity	0	3	0	265.5	0.0444	0.0763	0.0433	.	0.0237	0.0433

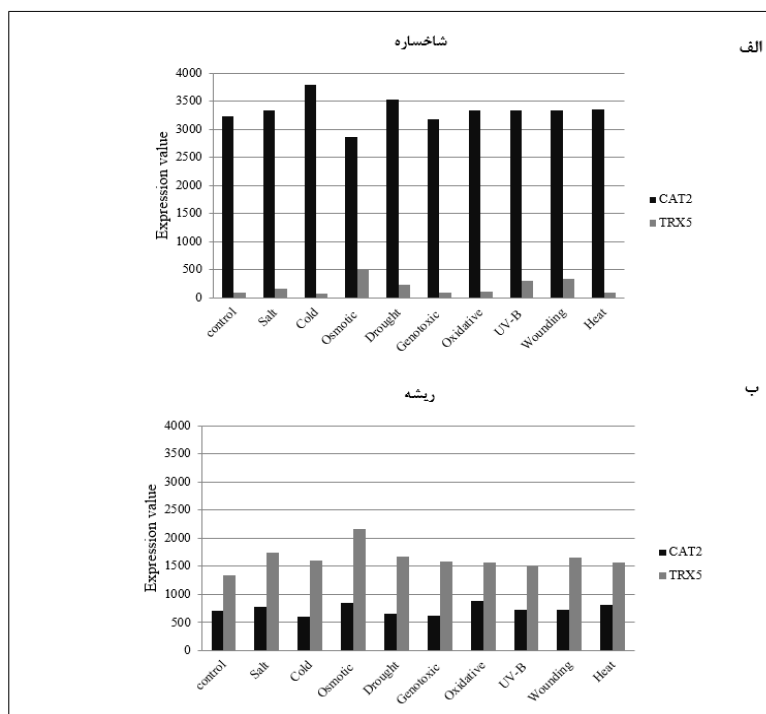
جدول ۲- همبستگی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* تحت تنش‌های مختلف غیر زیستی و زیستی

	شوری	سرما	اسهزی	خشکی	ژنوتوکسیک	اکسیدانتیو	اشعه ماوراء بنفش	زخم	گرما	باکتری غیر بیماری‌زای <i>Pseudomonas syringae</i>	باکتری بیماری‌زای <i>Pseudomonas syringae</i>	قارچ <i>Phytophthora infestans</i>
شاخصاره	-۰/۸۷۱**	-۰/۴۵۰	-۰/۵۹۹	-۰/۷۳۵	۰/۲۲۲	۰/۶۵۴	-۰/۷۹۰*	-۰/۰۲۲	۰/۴۱۵	۰/۹۷۷	-۰/۰۲۶	-۰/۶۶۹
ریشه	۰/۱۰۰	-۰/۹۶۶**	۰/۶۷۵	۰/۱۶۴	-۰/۳۲۵	۰/۲۶۷	-۰/۳۵۲	۰/۰۷۷	۰/۶۰۰			

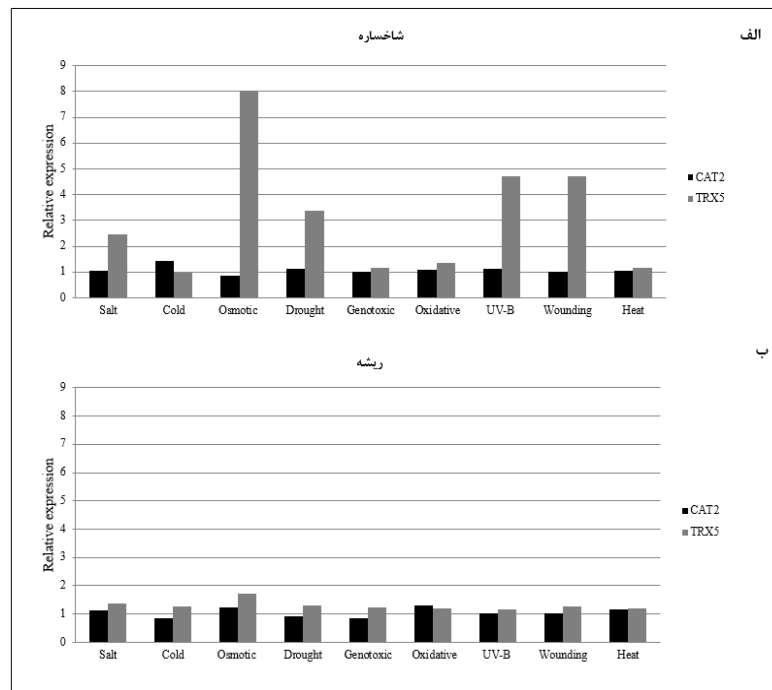
علامت * نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵٪ و علامت ** نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۱٪ می‌باشد.



شکل ۱- الگوی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* در تنشهای الف) باکتری غیر بیماریزای *Pseudomonas syringae*، ب) باکتری بیماریزای *Pseudomonas syringae* (ج) قارچ *Phytophthora infestans* در بافت شاخساره



شکل ۲- میزان بیان مطلق ژنهای *CAT2* و *TRX5* در شرایط نرمال و تنشهای غیر زیستی (شوری، سرما، اسمزی، خشکی، ژنوتوکسیک، اکسیداتیو، اشعه ماوراء بنفش، زخم و گرما) در بافت شاخساره (الف) و بافت ریشه (ب)



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژنهای *CAT2* و *TRX5* در شرایط نرمال و تنشهای غیر زیستی (شوری، سرما، اسمزی، خشکی، ژنوتوکسیک، اکسیداتیو، اشعه ماوراء بنفش، زخم و گرما) در بافت شاخساره (الف) و بافت ریشه (ب)

بحث

CAT2 بود. از سوی دیگر، آنالیز بیان ژن نشان داد که در شرایط تنش پاتوزن نسبت به شرایط کنترل، بیان ژن *TRX5* به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد در حالی که بیان ژن *CAT2* کاهش می‌یابد (شکل ۱). بنابراین تعداد بیشتر عناصر تنظیمی *W box* و *Box-W1* در ناحیه پروموتری ژن *TRX5* می‌تواند دلیلی بر افزایش بیشتر بیان این ژن در شرایط تنش پاتوزن نسبت به شرایط کنترل باشد.

بررسی الگوی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* در پاسخ به تنشهای غیرزیستی: یکی دیگر از عناصری که به طور اختصاصی در نواحی پروموتری ژن *CAT2* وجود داشت و بین پروموتراهای دو ژن تفاوت معنی‌داری نشان داد ARE (عناصر پاسخ بی‌هوازی) با توالی TGGTTT بود. مطالعات پیشین نشان دادند که یک پروتئین از خانواده MYB (عامل رونویسی *AtMYB2*) به عنصر تنظیمی ARE با توالی TGGTTT متصل می‌شود (۷ و ۱۶). برهمکنش بین عامل

بررسی الگوی بیان ژنهای *CAT2* و *TRX5* در پاسخ به تنشهای زیستی: بر اساس نتایج حاصل از آنالیز پروموتری، عنصر تنظیمی *W box* به طور اختصاصی در نواحی پروموتری ژن *TRX5* وجود داشت. این عنصر تنظیمی جایگاه اتصال عامل رونویسی WRKY و برای فعالیت ژن در برابر عامل بیماریزا ضروری می‌باشد (۱۵). در پژوهشی که توسط Laloj و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد در گیاهان با بیان بالای *WRKY6*، بیان ژن *TRX5* افزایش یافت. آنها گزارش کردند که *WRKY6* در تنظیم بیان *TRX5* درگیر است (۲۱). موتیف *Box-W1* نیز که بطور اختصاصی در نواحی پروموتری ژن *TRX5* وجود داشت، عنصر تنظیمی پاسخ به حمله پاتوزن می‌باشد (۳۰). تعداد عناصر تنظیمی *W box* و *Box-W1* در ناحیه پروموتری ژن *TRX5* به طور معنی‌داری بیشتر از تعداد آن در ناحیه پروموتری ژن

عملکرد گیاهان کلزای تحت تنش خشکی زمانی که غلظت پایین آبسزیک اسید اعمال شد در مقایسه با گیاهان کلزای تحت تنش خشکی افزایش یافت (۱).

بررسی داده‌های بیان ژن نشان داد که میزان بیان ژن *CAT2* در شاخساره تحت شرایط نرمال و تنش‌های مختلف غیر زیستی بیشتر از ژن *TRX5* بود در حالی که در ریشه عکس آن صادق بود. به عبارتی میزان بیان ژن *TRX5* در ریشه تحت شرایط نرمال و تنش‌های مختلف غیر زیستی بیشتر از ژن *CAT2* بود (شکل ۲). *CAT2* به عنوان کاتالاز الفاء شونده توسط نور شناخته شده است و بیان آن یک تناوب شبانه روزی با حداکثر بیان در صبح زود را نشان می‌دهد (۴۴ و ۴۵). همچنین ناکارایی *CAT2*، مقاومت به نور زیاد را در گیاهان آراییدوپسیس کاهش می‌دهد (۳۸). *Du* و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که *CAT2* عمدتاً در بافت‌های فتوسنتزی از جمله برگ‌ها بیان می‌شود و میزان بیان آن بالاتر از *CAT1* و *CAT3* می‌باشد. به علاوه فعالیت آن در تنش‌های سرما، خشکی و اکسیداتیو افزایش می‌یابد (۹). بررسی عناصر تنظیمی نواحی پروموتری نشان داد که عناصر تنظیمی پاسخ به نور با توالیهای متفاوت در *CAT2* و *TRX5* به ترتیب ۱۸ و ۱۲ عدد می‌باشد. از آنجا که بافت شاخساره در معرض روشنایی و بافت ریشه درون خاک در معرض تاریکی قرار دارد، احتمالاً می‌توان میزان بیان بالاتر ژن *CAT2* نسبت به ژن *TRX5* در بافت شاخساره و کمتر بودن میزان آن در بافت ریشه را به این عنصر تنظیمی نسبت داد.

بررسی بیان نسبی ژنهای *CAT2* و *TRX5* در بافت شاخساره و ریشه نیز نشان داد که بیان ژن *CAT2* تحت تنش‌های مختلف غیر زیستی تفاوت معنی‌داری با شرایط کنترل ندارد. بیان ژن *TRX5* در بافت شاخساره تحت تنش‌های مختلف غیر زیستی به میزان قابل توجهی افزایش یافت ولی در بافت ریشه تحت تنش‌های مختلف تغییر بیان محسوسی وجود نداشت (شکل ۳). *Taji* و همکاران

رونویسی *AtMYB2* و توالی TGGTTT نشان داد که توالی TGGTTT نقش مهمی در نواحی پروموتری ژنهای پاسخ دهنده به تنش ایفاء می‌کند (۷). خانواده MYB بزرگترین خانواده عوامل رونویسی در آراییدوپسیس می‌باشند که در فرآیندهای سلولی مختلف شرکت دارند (۱۰ و ۴۳). *MYB2* به عنوان عامل رونویسی هورمونهای آبسزیک اسید (ABA) و اتیلن (ET) در شرایط تنش عمل می‌کند (۸ و ۴۳) و همچنین بیان تعدادی از ژنهای پاسخ دهنده به شوری و خشکی را مدیریت می‌کند (۳، ۷ و ۱۰). به نظر می‌رسد AREها در شبکه‌های تنظیمی طیف گسترده‌ای از تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش‌های بی‌هوایی، خشکی و شوری با میانجیگری هورمونهای ABA و ET دخیل باشند (۳۱).

به علاوه، در نواحی پروموتری ژنهای *TRX5* و *CAT2* به ترتیب ۱ و ۱۰ عنصر پاسخ دهنده به ABA (ABRE) وجود داشت. *Skriver* و همکاران (۱۹۹۱) گزارش دادند که وجود چند نسخه از ABRE در یک پروموتر، امکان پاسخ به ABA را به آن پروموتر می‌دهد در حالی که وجود تنها یک نسخه از ABRE در پروموتر، منجر به عدم پاسخ پروموتر به ABA می‌شود (۳۶). در پژوهشی که توسط رهنما و وکیلان (۱۳۹۲) انجام شد فعالیت القایی پروموتر *Rd29A* پس از همسانه‌سازی از گیاه آراییدوپسیس در گیاه توتون مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ABA، تنش شوری و تنش خشکی باعث القای پروموتر *Rd29A* گردید. آنها پیشنهاد کردند که با توجه به حضور عنصر ABRE در پروموتر *Rd29A* احتمالاً تنش شوری و خشکی با استفاده از سیگنال ABA در القای پروموتر عمل می‌کنند (۲). حضور تعداد زیاد ABRE در نواحی پروموتری *CAT2* نشان می‌دهد که مسیر سیگنالینگ ABA در تنظیم بیان این ژن نقش دارد و لذا سطح ABA در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی و شوری افزایش می‌یابد (۴۲). در پژوهشی که توسط جعفریه یزدی و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد،

تغییر بیان ژن *CAT2* تحت تنش‌های مختلف غیر زیستی محسوس نبود شاید بتوان القای *TRX5* در تنش‌های غیرزیستی را به حضور این عنصر تنظیمی در نواحی پروموتوری آن نسبت داد.

عنصر تنظیمی دیگر با اختلاف معنی‌دار بین نواحی پروموتوری دو ژن، Unnamed_4 با توالی CTCC بود. تعداد این عنصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن *TRX5* و *CAT2* به ترتیب ۵ و ۱ بود. کارکرد این عنصر تنظیمی کاملاً شناخته شده نیست. لذا این احتمال وجود دارد که ممکن است یکی از دلایل القای بیان *TRX5* تحت تنش‌های مختلف ناشی از عنصر تنظیمی CTCC باشد. به عبارتی این عنصر تنظیمی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش داشته باشد. این فرضیه برای اثبات نیاز به آنالیز پروموتوری ژن‌های بیشتری دارد. تا کنون مطالعات زیادی پیرامون کارکرد دقیق این عنصر تنظیمی انجام نشده است. با این حال، در پژوهشی که توسط Shumin و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، با توجه به حضور این عنصر در چند ژن تنظیمی لایه مغذی دانه گرده از جمله *DYTI*، *AMS*، *AtMYB103* پیشنهاد شد که این عنصر تنظیمی احتمالاً به طور گسترده-ای در تنظیم بیان ژنی خاص بساک نقش دارد. آنها بیان کردند موتیف Unnamed_4 با توالی CTCC یک عنصر تنظیمی بالقوه می‌باشد که یک سر نخ جدید برای بررسی ارتباط بین *DYTI* و ژن‌های بالادست آن فراهم می‌کند (۳۵). در پژوهش دیگری که توسط Ku و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، تغییر توالی CCCC به توالی CTCC در ناحیه 5'-UTR ژن *TAC1* (ژن کنترل‌کننده زاویه برگ) در ذرت منجر به افزایش بیان این ژن و تغییر زاویه برگ گردید (۱۹).

تلفیق نتایج آنالیز مقایسه‌ای پروموتور و نتایج الگوی بیان ژنها، ارتباط قوی و آشکاری را بین بیان ژنها و عناصر تنظیمی سیس‌شناسایی شده نشان داد. با بررسی عناصر تنظیمی موجود در نواحی پروموتوری مشخص گردید که

(۲۰۰۴) نشان دادند که تحت تنش ۲۵۰mM NaCl، تعداد ژن‌های کمتری در خویشاوند وحشی متحمل آراییدوپسیس (*Theilingiella halophila*) در مقایسه با آراییدوپسیس القا شد. این مطلب می‌تواند تأکیدی بر این نکته باشد که تحمل به تنش در *Theilingiella halophila* ممکن است ناشی از بیان بالای دائمی چندین ژن درگیر در تحمل به شوری باشد در حالی که این ژنها در آراییدوپسیس القاء شونده هستند (۳۷). همچنین از یک سو با توجه به پژوهشی که توسط Du و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد که در آن فعالیت *CAT2* در تنش‌های سرما، خشکی و اکسیداتیو در گیاهان آراییدوپسیس افزایش یافت و از سوی دیگر با توجه با عدم تغییر بیان این ژن در سطح رونویسی در تنش‌های مختلف، به نظر می‌رسد فعالیت این ژن وابسته به تنظیم در سطح پس از رونویسی باشد (۹).

TRX5 به دلیل دارا بودن چندین عنصر TGA-element (عنصر پاسخ به اکسین) در نواحی پروموتوری، جزء ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین می‌باشد. این عنصر تنظیمی نیز به طور اختصاصی در نواحی پروموتوری ژن *TRX5* وجود داشت. Wang و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که هورمون اکسین در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در آراییدوپسیس دخیل است (۳۹). همچنین در پژوهشی که توسط Jain و Ghanashiam (۲۰۰۹) انجام شد تعداد زیادی ژن پاسخ دهنده به اکسین علاوه بر تنش‌های غیر زیستی به تنش زیستی نیز پاسخ دادند. نتایج آزمایشات حاکی از آن بود که اکسین یکی از اجزای مهم درگیر در پاسخ‌های دفاعی از طریق تنظیم بیان بسیاری از ژنها می‌باشد و تداخلی بین مسیرهای انتقال پیام تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایجاد می‌کند (۱۲). Bari و Jones نیز شواهدی برای درگیری مسیر انتقال پیام اکسین در پاسخ‌های دفاعی ارائه دادند (۴).

از آنجا که تعداد این عنصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن *TRX5* و *CAT2* به ترتیب ۵ و ۰ بود و نیز بیان ژن *TRX5* در بافت شاخساره تحت تنش‌های مختلف غیر زیستی به میزان قابل توجهی افزایش یافت و با توجه اینکه

در کل *TRX5* هم در پاسخ به تنش‌های زیستی و هم غیرزیستی نقش دارد. شناسایی این گونه ژنها با کارکردهای مقاومت در تنش‌های زیستی و غیر زیستی پیشرفت بزرگی در زمینه انتقال ژن به شمار می‌رود. به علاوه شناسایی عناصر تنظیمی می‌تواند افق جدیدی را در درک مکانیسم پاسخ به تنشها و ارتباط ژنهای مورد نظر با ژنهای بالادست باز نماید.

ژن *TRX5* با دارا بودن عناصر اختصاصی تنظیمی پاسخ به پاتوژن (Box-W1 و W box) و پاسخ به اکسین (TGA-element) در پاسخ به تنش زیستی نقش مؤثری ایفا می‌کند. همچنین ژن *TRX5* با دارا بودن عنصر تنظیمی اختصاصی پاسخ به اکسین (TGA-element) و ژن *CAT2* با دارا بودن عناصر تنظیمی پاسخ بی‌هوازی (ARE) و پاسخ به آبسزیک اسید (ABRE) در تنش‌های غیر زیستی نقش دارند.

منابع

- جعفریه یزدی ا.، مجد ا.، فلاحیان ف.، خاوری‌نژاد ر.، برنارد ف. و جاویدفر ف. ۱۳۸۵. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۹، شماره ۲، ص ۱۲۵-۱۳۵.
- رهنما ح. و مجد ا. ۱۳۹۲. همسانه‌سازی و ارزیابی فعالیت پیشبر *Rd29A* در گیاهان تراریخت توتون. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، ص ۴۸۰-۴۹۰.
- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78.
- Bari R. and Jones J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69:473-88.
- Besse I., Wong J.H., Kobrehel K. and Buchanan B.B. 1996. Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 3169-3175.
- Burley S.K. and Roeder R.G. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry*, 65: 769-799.
- Dolferus R., Klok E.J., Ismond K., Delessert C., Wilson S., Good A., Peacock J. and Dennis L. 2001. Molecular basis of the anaerobic response in plants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life*, 51: 79-82.
- Du H., Zhang L., Liu L., Tang X.F., Yang W.J. and Wu Y.M. 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Moscow)*, 74: 1-11.
- Du Y.Y., Wang P.C., Chen J. and Song C.P. 2008. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50:1318-1326.
- Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C. and Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15: 573-581.
- Frugoli J.A., Zhong H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L. and McClung C.R. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*, 112: 327-336.
- Ghanashyam C. and Jain M. 2009. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signaling and Behavior*, 4: 846-848.
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Hao D., Liu X., Yu Y., Liu Y., Qu Y., Yang S., Han S. and Feng S. 2014. A novel chitinase gene homologue from Chinese wild rye enhances tolerance to biotic and abiotic stress in transgenic tobacco. *New Biotechnology*, 31: S207.
- Himmelbach A., Liu L., Zierold U., Altschmied L., Maucher H., Beier F., Müller D., Hensel G., Heise A., Schützendübel A., Kümlehn J. and Schweizer P. 2010. Promoters of the barley germin-like *GER4* gene cluster enable strong transgene expression in response to pathogen attack. *Plant Cell*, 22: 937-952.

16. Hoeren F.U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W.J. and Dennis E.S. 1998. Evidence for a role for *AtMYB2* in the induction of the *Arabidopsis alcohol dehydrogenase* gene (*ADH1*) by low oxygen. *Genetics*, 149: 479-490.
17. Ishiwatari Y., Honda C., Kawashima I., Nakamura S., Hirano H., Mori S., Fujiwara T., Hayashi H. and Chino M. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, 195: 456-463.
18. Kobrehel K., Wong J.H., Balogh A., Kiss F., Yee B.C. and Buchanan B.B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiology*, 99: 919-924.
19. Ku L., Wei X., Zhang S., Zhang J., Guo S. and Chen Y. 2011. Cloning and characterization of a putative *TAC1* ortholog associated with leaf angle in maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE*, 6: e20621.
20. Kumar S., Asif M., Chakrabarty D., Tripathi R.D., Dubey R.S. and Trivedi P.K. 2015. Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249: 228-237.
21. Laloi C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer Y. and Reichheld J.P. 2004. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its W-Box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*, 134:1006-16.
22. Laloi C., Rayapuram N., Chartier Y., Grienenberger J.M., Bonnard G. and Meyer Y. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 14144-14149.
23. Lee T.I., Rinaldi N.J., Robert F., Odom D.T., Bar-Joseph Z., Gerber G.K., Hannett N.M., Harbison C.T., Thompson C.M., Simon I., Zeitlinger J., Jennings E.G., Murray H.L., Gordon D.B., Ren B., Wyrick J.J., Tagne J.B., Volkert T.L., Fraenkel E., Gifford D.K. and Young R.A. 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 298: 799-804.
24. Marx C., Wong J.H. and Buchanan B.B. 2003. Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta*, 216: 454-460.
25. Meyer Y., Vignols F. and Reichheld J.P. 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods in enzymology*, 347: 394-402.
26. Mouaheb N., Thomas D., Verdoucq L., Monfort P. and Meyer Y. 1998. In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 3312-3317.
27. Qiu P. 2003. Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309:495-501.
28. Ramji D.P. and Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochemical Journal*, 365: 561-575.
29. Romualdi C., Bortoluzzo S., Dalessi 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.
30. Rushton P.J., Reinstadler A., Lipka V., Lippok B. and Somssich I.E. 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 14:749-762.
31. Sadeghnezhad E., Askari H., Soltani S. and Honarvar F. 2014. Identification and distribution of anaerobic responsive elements (AREs) in genes functional categorization of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4: 135-141.
32. Safi H., Saibi W., Alaoui M.M., Hmyene A., Masmoudi K., Hanin M. and Brini F. 2015. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89: 64-75.
33. Schobert C., Baker L., Szederkenyi J., Grossmann P., Komor E., Hayashi H., Chino M. and Lucas W.J. 1998. Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta*, 206: 245-252.
34. Shamloo-Dashtpajardi R., Razi H., Aliakbari M., Lindlöf A., Ebrahimi M. and Ebrahimie E. 2015. A novel pairwise comparison method for in silico discovery of statistically significant cis-regulatory elements in eukaryotic promoter

- regions: Application to Arabidopsis. *Journal of Theoretical Biology*, 364: 364–376.
35. Shumin Z., Yan C., Hulin S., Bang Z., Licheng S. and Wei Z. 2015. One novel cis-element is essential for correct *DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1 (DYTI)* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, 34: 1773–1780.
 36. Skriver K., Olsen F.L., Rogers J.C. and Mundy J. 1991. cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 7266-7270.
 37. Taji T., Seki M., Satou M., Sakurai T., Kobayashi M., Ishiyama K., Narusaka Y., Narusaka M., Zhu J.K. and Shinozaki K. 2004. Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt cress using Arabidopsis microarray. *Plant Physiology*, 135: 1697–1709.
 38. Vanderauwera S., Zimmermann P., Rombauts S., Vandenabeele S., Langebartels C., Grisse W., Inzé D. and Van Breusegem F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139: 806–821.
 39. Wang Y., Mopper S. and Hasenstein K.H. 2001. Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 327–342.
 40. Wong J.H., Kim Y.B., Ren P.H., Cai N., Cho M.J., Hedden P., Lemaux P.G. and Buchanan B.B. 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16325–16330.
 41. Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V. and Provart N.J. 2007. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 8:e718.
 42. Xiong L. and Zhu J.K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133: 29-36.
 43. Yanhui C., Xiaoyuan Y., Kun H., Meihua L., Jigang L., Zhaofeng G., Zhiqiang L., Yunfei Z., Xiaoxiao W., Xiaoming Q., Yunping S., Li Z., Xiaohui D., Jingchu L., Xing-Wang D., Zhangliang C., Hongya G. and Li-Jia Q. 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60: 107-124.
 44. Zhong H. and McClung C. 1996. The circadian clock gates expression of two Arabidopsis catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Molecular and General Genetics*, 251: 196–203.
 45. Zhong H.H., Young J.C., Pease E.A., Hangarter R.P. and McClung C.R. 1994. Interactions between light and the circadian clock in the regulation of *CAT2* expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 104: 889–898.

A Comparative Investigation of *Catalase 2* and *Thioredoxin H5* Genes Promoters in Arabidopsis to Determine of Their Functions in Response to Biotic and Abiotic Stresses

Zinati Z.¹ and Shamloo-Dashtpajerdi R.²

¹ Agroecology Dept., College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Shiraz University, Darab, I.R. of Iran

² Crop Production and Plant Breeding Dept., College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, I.R. of Iran

Abstract

In order to investigate of *cis*-regulatory elements' role in the promoter region in the expression pattern of genes *Catalase 2* (*CAT2*) and *Thioredoxin H5* (*TRX5*) in Arabidopsis in response to different biotic and abiotic stresses, the promoter sequences of the genes, *cis*-regulatory elements in them, data relating to the expression of these genes in the different stresses were received using Phytozome, PlantCARE and the Bio-Array Resource for Plant Biology, respectively. Significant differences in the number of repetitions of each *cis*-regulatory element among promoters were determined by a variety of statistical methods available at bioinformatics IDEG6 tool. The results showed that eight *cis*-regulatory elements, including ARE, CAAT-box, ABRE, Unnamed-4, Box-W1, TGA-element, W box and TATA-box had significant and different occurrences between two promoters. It can be suggested that gene *TRX5* unlike gene *CAT2* is able to respond to biotic stress due to the presence of a greater number of specific regulatory elements in response to pathogen (Box-W1 and W box) and auxin (TGA-element). Also, a part of the expression pattern of these genes in response to abiotic stresses can be justified due to the presence of different number of repetitions of specific regulatory element in response to auxin (TGA-element) on the *TRX5* gene promoter and anaerobic regulatory element (ARE) and abscisic acid regulatory element (ABRE) on the *CAT2* gene promoter. Based on these results, *TRX5* plays a role in response to biotic and abiotic stresses. Identification of these genes with functional response to biotic and abiotic stresses can be considered a huge progress in order to select candidate genes for genetic manipulation to enhance plants stress tolerance.

Key words: *CAT2*, *TRX5*, Promoter analysis, Gene expression.