

Expression regulation of sucrose-phosphate phosphatase gene in bread wheat and its progenitors under salt stress

Elham Obeidnejad 

MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: elham.obeidnejad@yahoo.com

Mehdi Mansouri 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: m.mansouri@uk.ac.ir

Hamid Reza Kavousi 

Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: hrkavousi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Sucrose, the final product of photosynthesis, plays important roles in growth, development, storage, signal transduction, and acclimation to environmental stresses in higher plants. Sucrose-phosphate phosphatase (*SPP*) catalyzes the final irreversible step in the sucrose biosynthesis pathway. In this study, the *SPP* orthologous genes in wheat and progenitors were selected, and the expression regulation of the orthologous *SPP* genes were analyzed in response to salinity stress.

Materials and methods

Seeds of bread wheat (*Triticum aestivum* CV. Rooshan), durum wheat (*Triticum turgidum* CV. Hana), and *Aegilops tauschii* were provided by the Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. In order to quantify the expression of *SPP* genes, qRT-PCR was performed on total RNA extracted from leaf and root tissues of control and salt-treated (NaCl 200 mM) samples. A gene tree was constructed to calculate the evolutionary and phylogenetic relationships of the *SPP* protein family in bread wheat and its progenitors. The possibility of post-transcriptional regulation of the *SPP* genes was also evaluated using the online tool psRNATarget.

Results

The results of the phylogenetic analysis showed that 6, 4, and 2 *SPP* paralogous genes have evolved on chromosomes 1 and 5 of bread wheat, durum wheat, and *Ae. tauschii*, respectively. Additionally, we predicted 16 different microRNAs can target some of the *SPP* gene transcripts in bread wheat and *Ae. tauschii*. Gene expression results also indicated that *SPP* gene expression increased in the root and leaf tissues of bread wheat in response to salinity stress, while it decreased in durum wheat. The response of *Ae. tauschii* to salinity stress was different, with decreased expression observed in leaf tissue but increased expression in root tissue.

Conclusions

Post-transcriptional regulation through miRNAs can play an important role in the regulation of the complex sucrose metabolism, especially in the regulation of *SPP* gene expression. Gene expression results showed that under salinity stress conditions, bread wheat increases sucrose production, while in durum wheat, which is more sensitive to salinity stress, sucrose production is disrupted or decreased. This reduction in sucrose production can lead to a decrease in yield.

Keywords: Sucrose, Gene expression, Salinity stress.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Obeidnejad E, Mansouri M, Kavousi H (2023) Expression regulation of sucrose-phosphate phosphatase gene in bread wheat and its progenitors under salt stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 173-188.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (4), 173-188. DOI: 10.22103/jab.2023.22056.1507

Received: September 21, 2023.

Received in revised form: November 11, 2023.

Accepted: November 12, 2023.

Published online: December 30, 2023.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

تنظیم بیان ژن سوکروز-فسفات فسفاتاز در گندم نان و گونه های اجدادی آن تحت تنش

شوری

الهام عبیدنژاد 


دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

elham.obeidnejad@yahoo.com

مهدی منصور 

*نویسنده مسئول: استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

m.mansouri@uk.ac.ir

حمید رضا کاوسی 

دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: hrkavousi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

چکیده

هدف: سوکروز یا ساکارز محصول اصلی فتوسنتز در گیاهان می باشد که نقش های مهمی در رشد، نمو، ذخیره انرژی، انتقال سیگنال و سازگاری با تنش های محیطی دارد. ژن سوکروز فسفات فسفاتاز (SPP)، آخرین مرحله در مسیر بیوسنتز سوکروز که یک واکنش غیر برگشت پذیر است را کاتالیز می کند. در این پژوهش ژن های اورتولوگ SPP در گندم نان و گونه های اجدادی آن شناسایی و انتخاب شد و تغییرات میزان بیان آنها در پاسخ به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: بذور گندم نان (*Triticum aestivum* CV. Rooshan)، گندم دوروم (*Triticum turgidum* CV. Hana) و آجیلوپس (*Aegilops tauschii*) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. استخراج RNA از بافت های ریشه و برگ گیاهان کنترل و تحت تیمار (NaCl 200 mM) انجام شد و تغییرات بیان با روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور مطالعه رخدادهای تکاملی و شناسایی روابط فیلوژنی بین اورتولوگ ها و پارالوگ های ژن SPP، درخت ژنی رسم شد. با استفاده از ابزار آنالین psRNATarget امکان تنظیم پس از رونویسی با واسطه miRNA ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج آنالیز فیلوژنی نشان داد که بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۵ گندم نان، گندم دوروم و آجیلوپس به ترتیب ۶، ۴ و ۲ ژن پارالوگ *SPP* تکامل یافته است. هم‌چنین مشخص شد که ۱۶ *miRNA* متفاوت می‌توانند برخی از رونوشت ژن‌های *SPP* را در گندم نان و آجیلوپس، به عنوان ژن هدف شناسایی نمایند. نتایج تغییرات بیان ژن نیز نشان داد که در بافت ریشه و برگ گندم نان در پاسخ به تنش شوری بیان ژن *SPP* افزایش یافت اما در گندم دوروم کاهش بیان ژن *SPP* مشاهده شد. واکنش گیاه آجیلوپس به تنش شوری متفاوت بود به طوری که در بافت برگ کاهش بیان ولی در بافت ریشه افزایش بیان ژن *SPP* مشاهده شد.

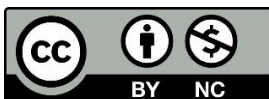
نتیجه‌گیری: تنظیم پس از رونویسی با واسطه *miRNA* ها می‌تواند نقش مهمی در تنظیم متابولیسم پیچیده سوکروز و بطور ویژه تنظیم بیان ژن *SPP* داشته باشد. نتایج بیان ژن نشان داد که گیاه گندم نان تحت شرایط تنش شوری تولید سوکروز را افزایش داد در حالی که در گندم دوروم که حساسیت بیشتری به تنش شوری دارد تحت شرایط تنش شوری تولید سوکروز مختل و یا کاهش یافت که این کاهش تولید سوکروز در کنار سایر اثرات مخرب تنش شوری در کاهش عملکرد نقش خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: سوکروز، بیان ژن، تنش شوری.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عبیدنژاد الهام، منصوری مهدی، کاوسی حمید رضا (۱۴۰۲) تنظیم بیان ژن سوکروز-فسفات فسفاتاز در گندم نان و گونه های اجدادی آن تحت تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۴)، ۱۷۳-۱۸۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گندم (*Triticum spp.*) یکی از غلات مهم است و جزء مهمی از مصرف غذای جهان را تشکیل می‌دهد و حدود ۲۰ درصد از انرژی غذایی انسان را تامین می‌کند. رشد جمعیت و تقاضای روزافزون جهانی، اصلاح نباتات و تولید ارقام جدید گندم که عملکرد بیشتری تحت شرایط تنش‌های محیطی داشته باشند را الزامی کرده است (Jing et al. 2022). فرایندهای اهلی‌سازی و تکامل، مانند دیپلوئید شدن سطح ژنوم پس از رخدادهای هیبریداسیون و پلی‌پلوئیدی، ژنوم گندم نان امروزی را شکل داده است. یکی از فاکتورهای کلیدی در موفقیت گندم نان به کسب عنوان «اصلی‌ترین منبع غذایی جهان» میزان سازگاری آن به شرایط اقلیمی متفاوت می‌باشد. بخشی از این توانایی در ساختار ژنومی آلوپلوئید آن قرار دارد و نتیجه رخدادهای هیبریداسیونی است که در طی تکامل آن انجام شده است (Consortium et al. 2014). در طی تکامل، بسیاری از ژن‌ها یا خانواده‌های ژنی از بین رفته‌اند، در حالیکه ژن‌هایی که به لحاظ تکاملی قوی‌تر بودند حفظ یا ایجاد شده‌اند (Murat et al. 2013). در طول روند تکامل گندم

نان، اولین رخداد هیبریداسیونی در چند صد هزار سال قبل اتفاق افتاد که بین دو گونه وحشی *Aegilops* و *Triticum urartu* انجام شد. این هیبریداسیون منجر به تشکیل گونه آلتراپلوئید، *Triticum turgidum* شد. هیبریداسیون دوم بین *Triticum turgidum* و گونه *Aegilops tauschii* روی داد و گونه گندم نان *Triticum aestivum* به وجود آمد که بیش از ۹۵ درصد از سطح زیر کشت گندم را شامل می‌شود (Petersen et al. 2006).

تنش‌های محیطی محدودیت بزرگی را در مسیر تولیدات کشاورزی ایجاد می‌کند و منجر به کاهش عملکرد می‌شوند. تغییرات اقلیمی حادث شده، خطر آسیب‌رسانی عوامل تنش‌زا بر تولید محصولات زراعی را افزایش داده است (Storey & Tanino 2012). این تنش‌ها نه تنها بر روی گونه‌های زراعی فعلی اثر می‌کنند، بلکه برای معرفی گیاهان زراعی به نواحی که در حال حاضر برای کشاورزی استفاده نمی‌شوند نیز موانع مهمی هستند (Duncan 2000). پاسخ‌های متابولیکی، آناتومیکی و مورفولوژیکی به تنش‌ها، برخی از رخدادهای ابتدایی تکامل توسط انتخاب طبیعی است. بنابراین یکی از نیروهای اصلی که ساختار و عملکرد گیاهان را شکل می‌دهد، تنش‌های محیطی است (Orcutt & Nilsen 2000). تنش شوری یکی از بزرگ‌ترین مشکلات موجود در کشاورزی و تولیدات زراعی ایران و بسیاری از مناطق دنیا است که به شدت عملکرد زراعی را کاهش می‌دهد. علاوه بر خاک‌های شور و یا سدیمی که به طور طبیعی تشکیل می‌شوند گسترش خاک‌های تحت تاثیر شوری ثانویه که حاصل روش‌های آبیاری زمین‌های کشاورزی می‌باشد به طور روز افزون قابل مشاهده است (Pessarakli & Szabolcs 1999).

سوکروز یا ساکارز محصول اصلی فتوسنتز در گیاهان می‌باشد که نقش‌های مهمی در رشد، نمو، ذخیره انرژی، انتقال سیگنال و سازگاری با تنش‌های محیطی را دارد (Jiang et al. 2015). در گیاهان زراعی سوکروز نقش مهمی در میزان عملکرد و کیفیت دانه دارد (Halford et al. 2011). سوکروز در سیتوزول توسط آنزیم‌های سوکروز فسفات سینتاز (SPS)، سوکروز سینتاز (SuSy) و سوکروز فسفات فسفاتاز (SPP) سنتز می‌شود (Leloir & Cardini 1955). آنزیم سوکروز فسفات سینتاز، ساخته شدن سوکروز-۶ فسفات را از UDP-گلوز و فروکتوز-۶-فسفات کاتالیز می‌کند و در مرحله آخر آنزیم سوکروز فسفات فسفاتاز با هیدرولیز سوکروز-۶ فسفات، تولید سوکروز را کاتالیز می‌کند. ژن‌های مسئول ساخت آنزیم سوکروز فسفات فسفاتاز در گونه‌های مختلفی از گیاهان همچون آرابیدوپسیس، گوجه، ذرت، برنج و گندم شناسایی شده‌اند (Lunn 2003). در گیاه آرابیدوپسیس، ۴ ژن و در گندم و برنج به ترتیب ۳ و ۴ ژن *SPP* شناسایی شده است. در سال ۲۰۰۳ ژن‌های *TaSPP1*، *TaSPP2* و *TaSPP3* در گندم با تشابه ۹۴٪ در سطح نوکلئوتید شناسایی و کلون شده‌اند. نتایج نشان داد که با ژن‌های *SPP1* در جو و ذرت و همچنین با ژن‌های *SPP1* و *SPP2* در برنج در سطح پروتئین تشابه بالایی دارند (Lunn 2003). امروزه با دسترسی به انبوه داده‌های ژنومی حاصل از توالی‌یابی بسیاری از گونه‌های زراعی و همچنین گونه‌های اجدادی گندم، امکان آنالیزهای مقایسه‌ای در عملکرد این ژن‌ها فراهم شده است. لذا در این تحقیق با انجام مطالعه مقایسه‌ای و بهره‌گیری از اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی سعی بر مطالعه رخدادهای تکاملی و مکانیسم‌های تنظیمی ژن *SPP* و نقش آن در پاسخ به تنش شوری در گندم نان و گونه‌های اجدادی آن از طریق روش‌های بیوانفورماتیکی و اندازه‌گیری تغییرات بیان آن با استفاده از روش qRT-PCR شد.

مواد و روش‌ها

آنالیزهای بیوانفورماتیکی: به منظور مطالعه رخدادهای تکاملی و شناسایی روابط فیلوژنی بین اورتولوگ‌ها و پارالوگ‌های

ژن *SPP* در بین اعضای جنس *Triticum spp.* و گونه‌های اجدادی از پایلایین رسم درخت ژنی^۱ دادگان EnsemblPlant (<https://plants.ensembl.org>) استفاده شد. در این روش بلندترین پروتئین کد شده از ژن‌های اورتولوگ و پارالوگ *SPP* در تمام ژنوم‌های گیاهی موجود در دادگان EnsemblPlant، با استفاده از جستجوی BLAST شناسایی و انتخاب شد. نرم‌افزار M-Coffee یا mafft جهت هم‌ردیفی (Alignment) استفاده شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار TreeBeST (<https://github.com/Ensembl/treebest>) درخت ژنی اجماعی (Consensus) بر اساس روش ارایه شده توسط *viola et al.* (2009) رسم گردید. تنظیم بیان ژن *SPP* از طریق مکانیسم‌های تنظیم پس از رونویسی با واسطه miRNAها با استفاده از ابزار (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>) psRNATarget مورد ارزیابی قرار گرفت. از پارامترهای پیش فرض نسخه ۲ (release 2017) نرم‌افزار استفاده شد. شبکه برهمکنشی miRNAها با ژن‌های هدف با نرم‌افزار Cytoscape (3.7.1) ترسیم شد.

آزمایشات گلخانه‌ای: بذور گندم نان (*Triticum aestivum* CV. Rooshan)، گندم دوروم (*Triticum*

turgidum CV. Hana) و آجیلوپس (*Aegilops tauschii*) تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در این پژوهش استفاده شد. بذرها پس از جوانه‌زنی در پتری‌دیش به گلدان‌های با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و حاوی ماسه‌هایی با قطر ۵-۶ میلی‌متر، انتقال داده شدند. هر کدام از گیاهان در سه گلدان و در هر گلدان سه بوته کاشته شد. رشد گیاهان و اعمال تنش در یک سیستم هیدروپونیک بسته مشابه با آنچه که در مقاله مونز و جیمز (Munns & James 2003) استفاده شده بود انجام گردید. در این سیستم محلول غذایی در یک مخزن قرار دارد و توسط یک پمپ الکترونیکی متصل به زمان‌سنج دیجیتال در زمان‌های معین شده محلول غذایی را در مجاورت ریشه‌های گیاه قرار می‌دهد و مجدداً از طریق لوله‌هایی، محلول غذایی به مخزن برمی‌گردد. با استفاده از این سیستم هیدروپونیک، ریشه‌های گیاه هر ۳۰ دقیقه و به مدت ۴۰ ثانیه در معرض محلول غذایی قرار می‌گیرند. محلول هوگلند طبق دستورالعمل مونز استفاده گردید و همچنین محلول غذایی هفتگی تعویض گردید (Munns 2013). پس از طی ۴۵ روز، اعمال تنش شوری آغاز گردید. سه گلدان تحت تیمار تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار به همراه ۱۲ میلی‌مولار $CaCl_2$ (بعنوان مکمل) و سه گلدان بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تنش شوری به صورت تدریجی و طی دو روز انجام شد تا از ایجاد شوک اسمزی در گیاه جلوگیری شود.

¹ Ensemble Gene Tree Pipeline

استخراج RNA و ساخت cDNA: پس از طی شدن دوره ده روزه تنش شوری، برگ‌های جوان انتهایی از گیاهان شاهد و تیمار جهت استخراج RNA برداشت شدند و سریعاً در ازت مایع قرار داده شدند. جهت نگهداری طولانی مدت و آنالیزهای بعدی به آزمایشگاه منتقل و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از روش Sharifi-Sirchi et al. (2011) انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل ThermoScientific NanoDrop One^C) و ژل آگارز ارزیابی شد. ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده طبق دستورالعمل شرکت سازنده تحت تیمار داکسی ریبونوکلاز I (DNase I) (شرکت سیناکلون، تهران) قرار گرفت و با استفاده از آنزیم RevertAid M-MuLV RT (شرکت ThermoScientific) و با استفاده از آغازگر الیگو dT واکنش ساخت cDNA طبق پروتکل و برنامه دمایی پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد.

واکنش Quantitative Real time PCR: واکنش‌ها با استفاده از کیت 5X Hot FIREPOL Eva Green (شرکت Solis BioDyne) و در دستگاه Rotor-Gene Q (شرکت Qiagen) با استفاده از سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. در هر واکنش از ۱ میکرولیتر cDNA و آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی در حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برای تکثیر ژن *SPP* و ژن‌های خانه‌دار با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین موجود در سایت (www.idtdna.com) طراحی شد (جدول ۱). با استفاده از نرم‌افزار BLAST اختصاصی بودن آنها و قابلیت تکثیر ژن مورد نظر بر روی هر سه گیاه مورد استفاده در این پژوهش ارزیابی شد.

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 1. Sequence of primers used in this study

EnsemblGene ID	Amplicon length (bp)	توالی Sequence	نام ژن Gene name
TraesCS5A02G002700, TRITD5Av1G000440, AET5Gv20005800	121	GAGAAGCCTATGCTAACTCCAG TCCTGTCCCACTTATTGTTTCAG	<i>sucrose-6F-phosphate phosphohydrolase</i>
TraesCS4A02G107600, TRITD4Av1G050690, AET4Gv20509200	129	GGAAGGAGAAGATCCACATCAG CCTTCTCAAACCTCTCGATCAC	<i>Elongation factor1</i>
TraesCS3D02G326900, TRITD3Av1G206030, AET3Gv20755700	107	CCTCCTTCCTCACAACATCC CAACTTCGTCTTTGGGCAATC	<i>Tubulin</i>

چرخه دمایی تکثیر شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل شامل واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال بسته به نوع پرایمر دمای این مرحله متفاوت و به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس جهت ارزیابی اختصاصی بودن تکثیر، از الکتروفورز ژل آگارز و آنالیز منحنی ذوب در دمای ۶۷ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پس از تنظیم خط آستانه، داده‌های حاصل که شامل سیکل آستانه به همراه راندمان واکنش از نرم‌افزار دستگاه اخذ گردید و با استفاده از نرم‌افزار REST آنالیز افتراقی تغییرات بیان ژن انجام شد. نتایج بیان ژن با استفاده از ژن‌های *Elongation Factor 1* و *Tubulin* به عنوان ژن کنترل داخلی، نرمال گردید.

نتایج و بحث

فرایند سازگاری در گیاهان اساساً مرتبط با توانایی در مدیریت تولید و مصرف کربوهیدرات‌ها در بافت‌های گیاهی می‌باشد. سوکروز به عنوان محصولی اصلی فرایند فتوسنتز، ارتباط مستقیمی با میزان عملکرد زراعی و نقش مهمی در گندم ایفا می‌کند. بسیاری از مطالعات قبلی متمرکز بر متابولیسم عمومی قندها در گیاهان بوده است و اطلاعات کمی در مورد شناسایی تعداد پارالوگ‌ها، نقش رخدادهای تکاملی همچون مضاعف شدگی ژن (*Gene duplication*) و گونه‌زایی و همچنین نقش عملکردی هر یک از پارالوگ‌ها در گندم و مطالعات مقایسه‌ای در گندم و گونه‌های اجدادی آن وجود دارد. گندم به دلیل ساختار ژنومی آلوپلوئید مزیت‌های بیشتری همچون سازگاری وسیع‌تر و مقاومت بیشتر در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی، نسبت به گونه‌های اجدادی خود کسب کرده است (Eckardt 2014). در گیاهان آلپلی‌پلوئید غالبیت ژنومی با این مفهوم که برخی از زیرژنوم‌ها نقش بیشتری در کنترل برخی صفات مورفولوژیک دارند مشخص شده است. برای مثال در گندم دوروم صفات مرتبط با نمو توسط زیرژنوم AA و صفات مرتبط با سازگاری همچون مقاومت به تنش‌ها توسط زیرژنوم BB کنترل می‌شود. در مطالعه‌ای که Yang et al. (2014) انجام دادند، ۹۲ صفت مورفوفیزیولوژیک به همراه آنالیز بیان ژن *HKT* در بین گندم و گونه‌های اجدادی آن در پاسخ به تنش شوری را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها نتیجه‌گیری کردند که افزایش سطح پلوئیدی در گندم نان با افزایش تحمل به تنش شوری افزایش می‌یابد و نقش زیرژنوم‌ها در ژنوم هگزاپلوئید گندم و واگرایی بیان ژن حائز اهمیت می‌باشد. موجود بودن اطلاعات ژنومی در گندم و گونه‌های اجدادی آن مطالعات مبتنی بر ژنومیکس عملکردی و مقایسه‌ای را امکان‌پذیر نموده است و در این تحقیق با هدف مطالعه ژن *SPP* به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی و انتهایی مسیر متابولیسم سوکروز اقدام به شناسایی اورتولوگ‌ها و پارالوگ‌ها، شناسایی *miRNA* ای بالقوه تنظیمی آن و اندازه‌گیری تغییرات بیان آن در بافت برگ و ریشه گندم نان و گونه‌های اجدادی آن در پاسخ به تنش شوری شد.

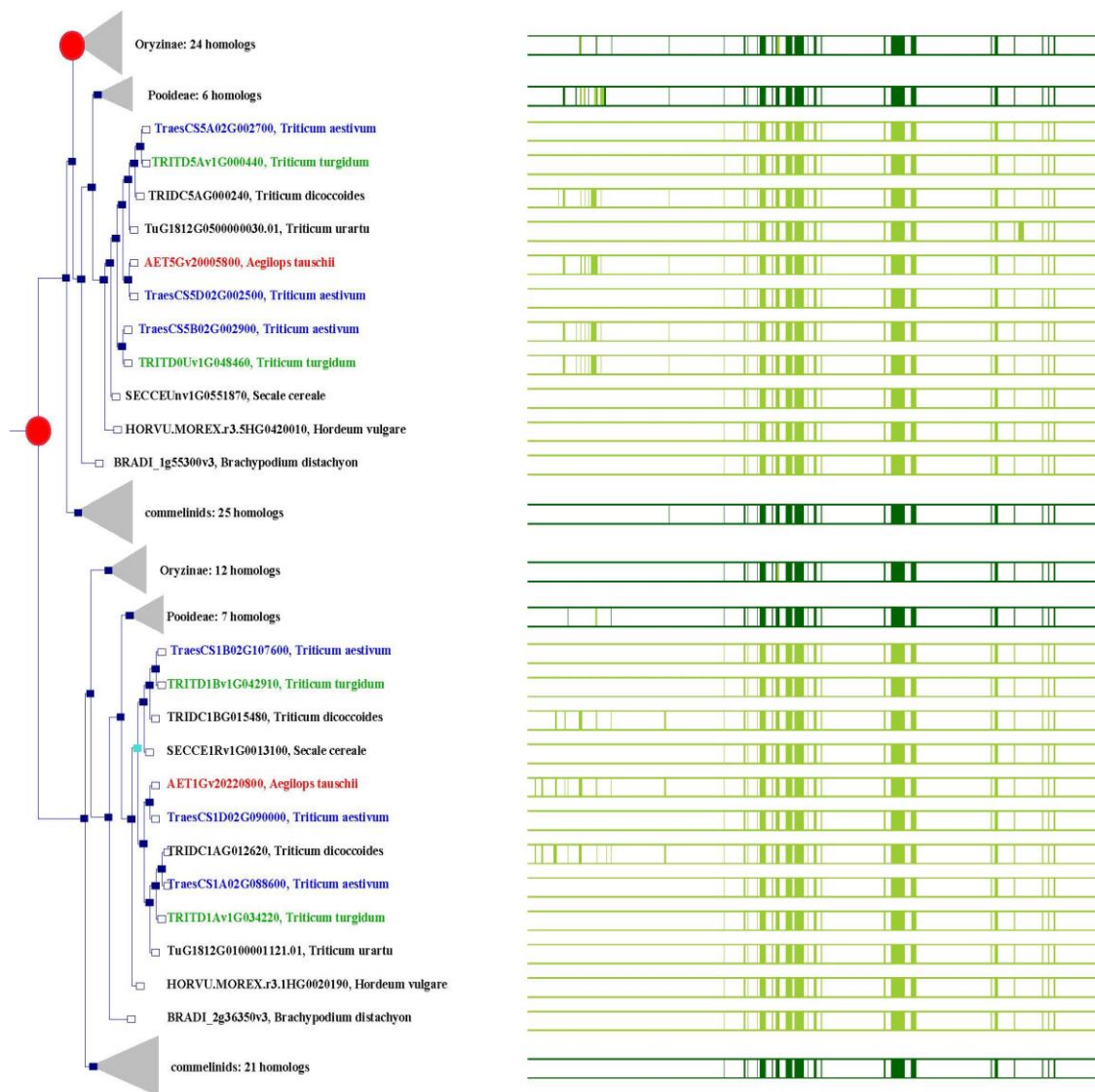
شناسایی اورتولوگ‌ها و پارالوگ‌های ژن *SPP*: به منظور مطالعه اثر رخدادهای تکاملی همچون مضاعف شدگی

ژن و گونه‌زایی بر خانواده ژنی *SPP* از مقایسه توالی‌های پروتیینی اورتولوگ‌ها و پارالوگ‌های ژن *SPP* در گونه‌های اجدادی گندم

استفاده شد. تکمیل پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم گونه‌های اجدادی گندم شامل آجیلوپس و گندم دوروم و در دسترس بودن آنها در دادگان ژنومی مختلف امکان ارزیابی‌های دقیق تر روابط تکاملی و اهمیت ژن‌ها را در روند تکامل امکان‌پذیر می‌کند. نتایج نشان داد در گندم و گونه‌های اجدادی آن دو رخداد مضاعف شدگی ژن برای ژن *SPP* انجام شده است (شکل ۱). پارالوگ‌های ژن *SPP* در گندم نان شامل TraesCS5A02G002700، TraesCS5D02G002500، TraesCS5B02G002900 و بر روی کروموزوم‌های 5A، 5B، 5D و ژن‌های پارالوگ TraesCS1A02G088600، TraesCS1D02G090000 و TraesCS1B02G107600 بر روی کروموزوم‌های 1A، 1B و 1D تشکیل شده است که در درخت ترسیم شده در دو کلاد جدا گانه مشاهده می‌شوند. در پژوهش انجام شده توسط Jing et al. (2022) مشخص شده است که سه پارالوگ از ژن *SPP* بر روی کروموزوم‌های 5A، 5B و 5D شناسایی شد که ارتباط میزان بیان آنها با میزان سوکروز و وزن هزار دانه را مشخص کرده است. در گندم دوروم پارالوگ‌های ژن *SPP* بر روی کروموزوم‌های 1A، 5A، 1B به ترتیب TRITD5Av1G000440 و TRITD1Bv1G042910، TRITD1Av1G034220 قرار دارند اگر چه ژن TRITD0Uv1G048460 در ژنوم گندم دوروم شناسایی شده است اما جایگاه کروموزومی آن مشخص نشده است. در گیاه آجیلوپس دو ژن AET1Gv20220800 و AET5Gv20005800 بر روی کروموزوم‌های 5D و 1D شناسایی شده است.

تنظیم بیان ژن *SPP* با واسطه miRNA ها: نقش miRNA ها در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در گیاهان مختلفی

همچون برنج (Peng et al. 2013)، سیب زمینی (Xie et al. 2011)، کاساوا (Chen et al. 2015) و گندم (Meng et al. 2020; Hou et al. 2013) گزارش شده است. پر شدن دانه در غلات مرحله نموی مهمی می‌باشد که تعیین کننده میزان عملکرد زراعی نیز محسوب می‌شود. در گیاه برنج مطالعات متعددی نقش miRNA ها را در ارتباط با نمو دانه را بررسی کرده است (Xue et al. 2008; Zhang et al. 2013). در این پژوهش نقش تنظیم پس از رونویسی با واسطه miRNA ها مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور توالی ژن‌های کدکننده *SPP* در گندم نان، گندم دوروم و آجیلوپس از دادگان EnsemblPlant دانلود گردید و با استفاده از ابزار آنالین psRNATarget امکان تنظیم ژن‌های *SPP* در گیاهان مورد مطالعه با واسطه miRNA ها ارزیابی شد. با توجه به اینکه فقط miR160 از گندم دوروم در پایگاه miRBase ثبت شده است و ابزار آنالین psRNATarget نیز از اطلاعات miRBase استفاده می‌کند لذا هیچ یک از ژن‌های *SPP* در گندم دوروم توسط miR160 به عنوان ژن هدف شناسایی نشد. نتایج این تحقیق نشان داد در گیاه گندم نان، ژن TraesCS1B02G107600 به عنوان ژن هدف برای miR9670-3p و miR531 شناسایی شد و بیان ژن TraesCS1A02G088600 بوسیله miR9675-3p کنترل و تنظیم می‌شود (شکل ۲). همچنین مشخص شد که miR531 قادر به اعمال نقش تنظیمی بر روی ژن TraesCS1D02G090000 به عنوان ژن هدف می‌باشد. همچنین miR530، miR9674a-5p و miR9777 به طور مشترک ژن TraesCS5A02G002700 را به عنوان ژن هدف شناسایی و بیان آن را کنترل می‌نمایند.



شکل ۱. درخت ژنی رسم شده بر اساس داده‌های موجود در دادگان EnsemblPlant. سمت چپ: درخت ژنی و رخدادهای تکاملی مرتبط با گونه‌زایی (مربع آبی) و مضاعف‌شدگی ژن (دایره قرمز) ژن *SPP* در گندم نان (رنگ آبی)، گندم دوروم (رنگ سبز) و *Ae. tauschii* (رنگ قرمز) نشان داده شده است. سمت راست: هم‌ردیفی چندگانه توالی اسیدهای آمینه و نواحی حفاظت شده (بارنگ سبز) نشان داده شده است

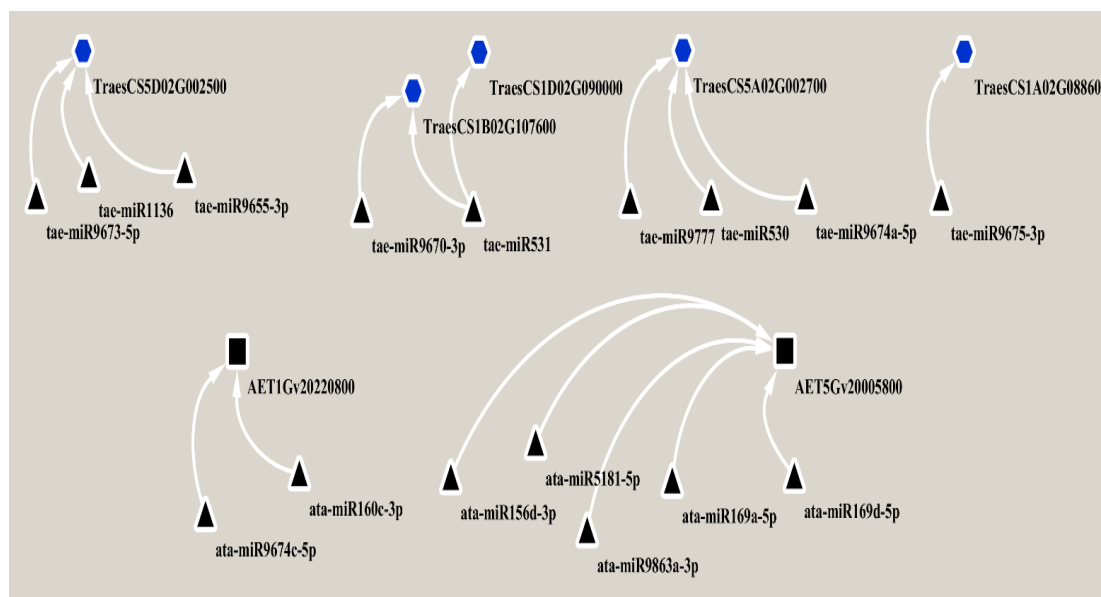
Figure 1. The gene tree was constructed based on sequencing data from the EnsemblPlant database. Left: The gene tree and evolutionary events associated with speciation (blue box) and gene duplication (red circle) of the *SPP* gene in bread wheat (Gene ID in blue), durum wheat (Gene ID in green), and *Ae. tauschii* (Gene ID in red) are shown. Right: A pictographic representation of multiple sequence alignment of amino acids and conserved regions (highlighted in green) are shown

نتایج نشان داد که miR9674 در گیاه آجیلوپس هم ژن AET1Gv20220800 را به عنوان ژن هدف شناسایی می‌کند که این حفاظت‌شدگی در عملکرد miRNA ها به عنوان یک خصوصیت برای آنها تایید شده است (Bonnet et al. 2004; Xu et al. 2021). در این تحقیق مشخص شد ژن TraesCS5D02G002500 در گندم نان دارای جایگاه شناسایی و اتصال با miR9675-3p، miR1136، miR9655-3p و miR9673-5p دارد (شکل ۲). همچنین مشخص شد که miR9675-3p بر روی رونوشت‌های ژن TraesCS1A02G088600 جایگاه شناسایی و اتصال دارد و احتمالاً قادر به تنظیم بیان آن می‌باشد (شکل ۲). Li et al. (2019) گزارش کردند که در مراحل رشدی مختلف miR9674 به میزان زیادی در بافت برگ گندم و آجیلوپس بیان می‌شود. همچنین Han et al. (2014) افزایش بیان miR9670، miR9673، و miR9675 در گندم نان را به طور اختصاصی در برگ‌های پرچم گزارش کردند و miR9655 به میزان زیادی در نمونه‌های بافت دانه گندم ۱۰ روز و ۲۰ روز پس از گرده افشانی مشاهده کردند که نشان دهنده نقش آنها در نمو دانه گندم می‌باشد. مطالعات نشان داده است که miR530 بصورت حفاظت شده در گیاهان تک لپه و دو لپه در فرایندهای مهمی همچون نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارد. در گندم دوروم سطح بیان بالایی در بافت برگ دارد (Fileccia et al. 2017) و در گیاه برنج miR530 در میزان عملکرد، بلوغ و مقاومت به بیماری بلاست نقش دارد (Li et al. 2021).

در گیاه آجیلوپس نیز مشابه با گندم نان miR9674-5p قادر است ژن AET1Gv20220800 را به عنوان ژن هدف شناسایی نماید اگر چه miR160c-3p نیز قادر است این ژن را نیز تنظیم و کنترل نماید. در گیاه آجیلوپس ژن AET5Gv20005800 مشترکاً توسط ۵ miRNA، miR169d، miR169a، miR156d-3p، miR5181 و miR9863a-3p تحت تنظیم پس از رونویسی قرار می‌گیرد (شکل ۲). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد شناسایی miRNAهای متعدد برای تنظیم هریک از ژن‌های SPP، نقش تنظیم پس از رونویسی را مهم و بسیار دقیق نشان می‌دهد. اعتبار سنتی نتایج شناسایی بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف در این پژوهش از طریق مطالعه تغییرات میزان بیان رونوشت‌ها و شناسایی همبستگی منفی بین هر یک از ژن‌ها و miRNAها و آنالیز Degradom sequencing در مطالعات تکمیلی آینده پیشنهاد می‌شود.

تغییرات بیان ژن SPP: نتایج تجزیه و تحلیل منحنی ذوب، تکثیر اختصاصی قطعه ۱۲۱bp از ژن SPP را در ۳ گیاه گندم نان، گندم دوروم و آجیلوپس را نشان داد. همچنین تکثیر اختصاصی برای ژن‌های خانه دار *EFL* و توپولین انجام شد که در فرایند نرمال‌سازی تغییرات بیان ژن از آنها استفاده شد. مشخص شدن ارتباط بین افزایش میزان بیان ژن‌های SPP با افزایش محتوی سوکروز، افزایش عملکرد در گندم و همچنین ارتباط آن با تنش‌های محیطی اهمیت اندازه‌گیری و مطالعه تغییرات بیان این ژن را نشان می‌دهد (Jing et al. 2022). نقش سوکروز و ژن‌های دخیل در متابولیسم آن در گندم نان (Guo et al. 2015)، گندم دوروم (Annunziata et al. 2017) و آجیلوپس (Mansouri et al. 2019) در مطالعات قبلی گزارش شده است. از نظر تکاملی حفاظت‌شدگی ژن SPP بین گونه‌های اجدادی تایید شده است و آنچه اهمیت دارد اندازه‌گیری واگرایی بیان (Expression

(divergence) و مقایسه میزان بیان ژن مذکور در بین بافت‌ها و گونه‌های اجدادی است (Jiang et al. 2015). لذا در این پژوهش مقایسه تغییرات بیان ژن *SPP* بین گونه‌های اجدادی گندم نان تحت شرایط تنش شوری هدف‌گذاری شد.

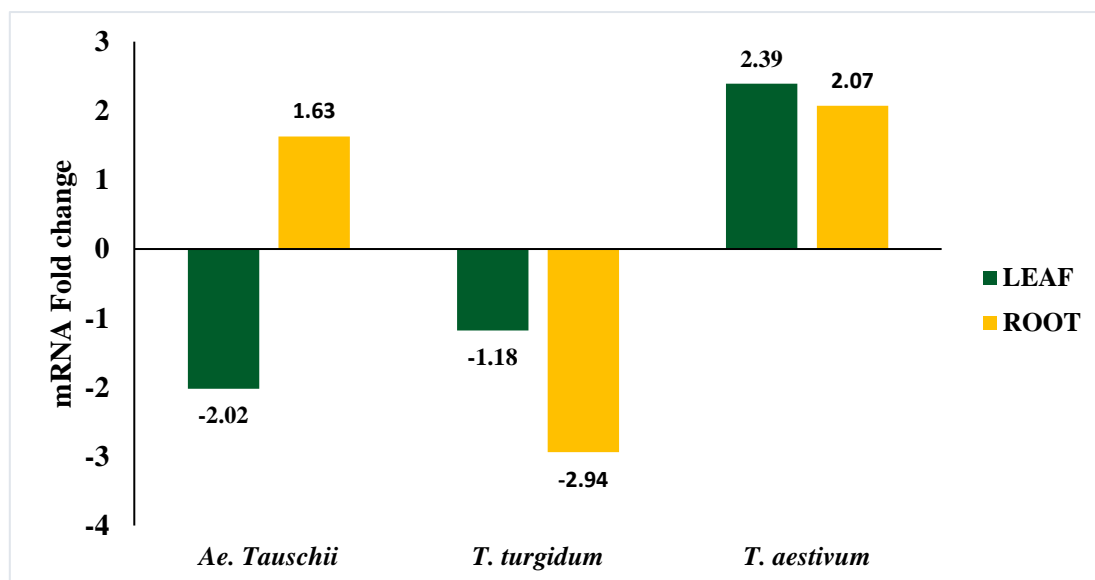


شکل ۲. شبکه ارتباطی بین miRNA با ژن‌های کدکننده *SPP* در گندم نان و گونه‌های اجدادی آن. ژن‌های miRNA با شکل مثلث، ژن‌های *SPP* در گندم نان با شکل شش ضلعی، ژن‌های *SPP* در آجیلوپس با شکل مربع نشان داده شده است. ID هر ژن و نام هر miRNA در شکل مشخص شده است

Figure 2. The *SPP*-miRNA interaction network in bread wheat and its progenitors. The miRNA genes are shown as triangles, the *SPP* genes in bread wheat are shown as hexagons, and the *SPP* genes in *Ae. tauschii* are shown as squares. The *SPP* gene ID and the miRNA names are shown

نتایج اندازه‌گیری میزان بیان ژن *SPP* در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد نشان داد که این ژن در بافت برگ گندم نان ۲/۳۹ برابر افزایش بیان داشت اما در بافت برگ آجیلوپس و برگ گندم دوروم به ترتیب ۲/۰۲ و ۱/۱۸ برابر کاهش بیان داشته است (شکل ۳). مطالعات قبلی نشان داده است که گندم نان نسبت به گونه‌های تتراپلوئید اجدادی خود مقاومت بیشتری به تنش شوری دارد که این مقاومت بیشتر احتمالاً بدلیل استفاده حداکثری از سطح پلوئیدی بالاتر آن نسبت به گونه‌های اجدادی خود می‌باشد (Dubcovsky & Dvorak 2007; Munns & Tester 2008). افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش اندازه سلول و اندازه واکوئل‌های سلولی می‌شود و از طرفی نقش سوکروز به عنوان تعدیل‌کننده فشار اسمزی باعث می‌شود که گیاهان تحت شرایط تنش شوری مقادیر بیشتری از سوکروز را تولید نمایند (Jibiki et al. 1993; Munns & Tester 2008). در گندم دوروم محتوی سوکروز در بافت ریشه با تنش شوری و میزان یون نیترات ارتباط دارد به طوری که در غلظت‌های کم یون نیترات در گیاهان

در معرض تنش شوری، میزان سوکروز افزایش می‌یابد و سوکروز نقش تعدیل کننده اسمز سلول را ایفا می‌کند اما در غلظت‌های بالای یون نیترات، میزان سوکروز در شرایط تنش شوری کاهش می‌یابد و نقش تعدیل کنندگی اسمز سلولی با گلایسین بتائین، پرولین و آسپارژین می‌باشد. (Annunziata et al. 2017). در برگ گیاه آجیلوپس نیز کاهش میزان بیان ژن *SPP* بیشتری نسبت به گندم نان و گندم دوروم مشاهده شد اگر چه گیاه آجیلوپس نسبت به گندم دوروم عموماً مقاومت بیشتری به تنش شوری دارد. لذا شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که در گیاه آجیلوپس در اثر تنش شوری، تولید سوکروز با کاهش شدیدتری روبرو می‌شود. نتایج اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن *SPP* در بافت ریشه گیاهان مورد مطالعه نیز افزایش ۱/۶۳ و ۲/۰۷ برابری به ترتیب در آجیلوپس و گندم نان را نشان داد (شکل ۳). اگر چه در ریشه گندم دوروم، کاهش بیان نزدیک به ۳ برابری مشاهده شد. کاهش بیان ژن‌های *SPP* در بافت برگ و ریشه گندم دوروم به دلیل حساسیت بیشتر این گیاه به تنش شوری می‌باشد که منجر به کاهش عملکرد این گیاه در شرایط تنش شوری می‌باشد. به طور کلی گندم دوروم حساسیت بیشتری نسبت به تنش شوری دارد و تحمل بیشتر به تنش شوری در گندم در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی و اثر مطلوب ژن‌های مقاومت موجود در زیر ژنوم DD که از گیاه آجیلوپس دریافت کرده است نسبت داده می‌شود. البته شایان ذکر است که تنش شوری اعمال شده در این تحقیق برای گیاه گندم نان نیز منجر به کاهش عملکرد خواهد شد اما این افزایش بیش از دو برابری در بیان ژن *SPP*، چنانچه منجر به افزایش محتوی سوکروز شود می‌تواند دلیلی بر نقش سوکروز در مدیریت پاسخ به تنش شوری باشد. احتمالاً با توجه به اینکه تنش شوری اثرات مخرب متعددی بر گیاهان دارد در این مطالعه اثرات این تنش بر یکی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سوکروز بررسی شد.



شکل ۳. نتایج تغییر بیان ژن *SPP* به روش qRT-PCR در بافت‌های برگ و ریشه گندم نان، گندم دوروم و آجیلوپس تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار

Figure 3. Expression analysis of *SPP* gene in leaf and root tissues of bread wheat, durum wheat and *Ae. tauschii* under salinity stress (200mM NaCl)

نتیجه گیری: در گیاهان سوکروز نقش های مهمی در رشد، نمو، ذخیره انرژی، انتقال سیگنال و سازگاری با تنش های محیطی دارد و تنظیم متابولیسم آن پیچیده می باشد. رخدادهای تکاملی گیاه گندم نان و در دسترس بودن گونه های اجدادی آن در کنار تکمیل پروژه های توالی یابی ژنوم آنها امکان مطالعات مقایسه ای از منظر تکاملی و عملکردی را فراهم آورده است. از آنجا که محصول ژن سوکروز فسفات فسفاتاز آنزیم نهایی در مسیر بیوسنتز سوکروز در گیاهان می باشد اهمیت ویژه ای دارد. نتایج این پژوهش نشان داد تنظیم پس از رونویسی با واسطه miRNA ها می تواند نقش مهمی در تنظیم متابولیسم پیچیده سوکروز و بطور ویژه تنظیم بیان ژن *SPP* داشته باشد. نتایج بیان ژن نشان داد گیاه گندم نان تحت شرایط تنش شوری تولید سوکروز را افزایش می دهد در حالی که در گندم دوروم که حساسیت بیشتری به تنش شوری دارد تحت شرایط تنش شوری تولید سوکروز مختل و یا کاهش می یابد که این کاهش تولید سوکروز منجر به کاهش عملکرد آن خواهد شد. اگر چه گیاه آجیلویس که زیرژنوم D گندم نان را تامین کرده است و به عنوان یک مخزن ژنی برای انتقال ژن های مقاومت به گندم شناخته می شود نیز در شرایط تنش شوری تولید سوکروز آن کاهش می یابد.

سپاسگزاری: این پژوهش با استفاده از حمایت مالی پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی به شماره ۹۰۰/۱۰۶/پ انجام شده

است. نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از آن مرکز پژوهشی ابراز می دارند.

References

- Annunziata MG, Ciarmiello LF, Woodrow P et al. (2017) Durum Wheat Roots Adapt to Salinity Remodeling the Cellular Content of Nitrogen Metabolites and Sucrose. *Front Plant Sci* 7, 2035.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P et al. (2004) Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci* 101, 11511-11516.
- Chen X, Xia J, Xia Z et al. (2015) Potential functions of microRNAs in starch metabolism and development revealed by miRNA transcriptome profiling of cassava cultivars and their wild progenitor. *BMC Plant Biol* 15, 33.
- Consortium IWGS, Mayer KF, Rogers J et al. (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345, 1251788.
- Dubcovsky J, Dvorak J (2007) Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316, 1862-1866.
- Duncan R (2000) Plant tolerance to acid soil constraints: genetic resources ,breeding methodology, and plant improvement. In: *plant-Environment Interactions*. CRC Press. pp. 19-56.

- Eckardt NA (2014) Genome dominance and interaction at the gene expression level in allohexaploid wheat. *Plant Cell* 26, 1834.
- Fileccia V, Bertolini E, Ruisi P et al. (2017) Identification and characterization of durum wheat microRNAs in leaf and root tissues. *Funct Integr Genomics* 17, 583-598.
- Guo R, Yang Z, Li F et al. (2015) Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress. *BMC Plant Biol* 15, 170.
- Halford N, Curtis T, Muttucumar N et al. (2011) Sugars in crop plants. *Ann Appl Biol* 158, 1-25.
- Han R, Jian C, Lv J et al. (2014) Identification and characterization of microRNAs in the flag leaf and developing seed of wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genom* 15, 1-14.
- Hou G, Du C, Gao H et al. (2020) Identification of microRNAs in developing wheat grain that are potentially involved in regulating grain characteristics and the response to nitrogen levels. *BMC Plant Biol* 20, 87.
- Jiang S-Y, Chi Y-H, Wang J-Z et al. (2015) Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Sci Rep* 5, 17583.
- Jibiki M, Kuno Y, Shinoyama H et al. (1993) Isolation and properties of large cell strains from a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp. N-16 by colchicine treatment. *J Gen Appl Microbiol* 39, 439-442.
- Jing F, Miao Y, Zhang P et al. (2022) Characterization of TaSPP-5A gene associated with sucrose content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol* 22, 58.
- Leloir LF, Cardini C (1955) The biosynthesis of sucrose phosphate. *J Biol Chem* 214, 157-165.
- Li Y-F, Wei K, Wang M et al. (2019) Identification and temporal expression analysis of conserved and novel microRNAs in the leaves of winter wheat grown in the field. *Front Genet* 10, 779.
- Li Y, Wang L-F, Bhutto SH et al. (2021) Blocking miR530 Improves Rice Resistance, Yield, and Maturity. *Front Plant Sci* 12, 729560.
- Lunn JE (2003) Sucrose-phosphatase gene families in plants. *Gene* 303, 187-196.
- Mansouri M, Naghavi MR, Alizadeh H et al. (2019) Transcriptomic analysis of *Aegilops tauschii* during long-term salinity stress. *Funct Integr Genomics* 19, 13-28.
- Meng F, Liu H, Wang K et al. (2013) Development-associated microRNAs in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol* 13, 140.
- Munns R, James RA (2003) Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil* 253, 201-218.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59, 651-681.

- Murat F, Zhang R, Guizard S et al. (2013) Shared subgenome dominance following polyploidization explains grass genome evolutionary plasticity from a seven protochromosome ancestor with 16K protogenes. *Genome Biol Evol* 6, 12-33.
- Orcutt DM, Nilsen ET (2000) *Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors*. Wiley.
- Peng T, Sun H, Du Y et al. (2013) Characterization and expression patterns of microRNAs involved in rice grain filling. *PloS one* 8, e54148.
- Pessaraki M, Szabolcs I (1999) Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. *Handbook of plant and crop stress* 1, 1-16.
- Petersen G, Seberg O, Yde M et al. (2006) Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol* 39, 70-82.
- Sharifi-Sirchi G, Beheshti B, Hosseinipour A et al. (2011) Priming against Asiatic citrus canker and monitoring of PR genes expression during resistance induction. *Afr J Biotechnol* 10, 3818-3823.
- Storey KB, Tanino KK (2012) *Temperature adaptation in a changing climate: nature at risk*. CABI.
- Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A et al. (2009) EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 19, 327-335.
- Xie F, Frazier TP, Zhang B (2011) Identification, characterization and expression analysis of MicroRNAs and their targets in the potato (*Solanum tuberosum*). *Gene* 473, 8-22.
- Xu T, Zhang L, Yang Z et al. (2021) Identification and functional characterization of plant MiRNA under salt stress shed light on salinity resistance improvement through MiRNA manipulation in crops. *Front Plant Sci* 12, 665439.
- Xue L-J, Zhang J-J, Xue H-W (2008) Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. *Nucleic Acids Res* 37, 916-930.
- Yang C, Zhao L, Zhang H et al. (2014) Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proc Natl Acad Sci* 111, 11882-11887.
- Zhang Y-C, Yu Y, Wang C-Y et al. (2013) Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat Biotechnol* 31, 848-852.