



تجزیه بیوانفورماتیکی پروتئین‌های حاوی دُمین ARID-PHD و بررسی بیان ژن آن تحت تنش شوری در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis*

حمیدرضا قربانی^۱، حبیب اله سمیع‌زاده لاهیجی^۲ و قربانعلی نعمت‌زاده^۳

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: ghorbani.hreza@gmail.com)

۲- استاد دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۹

صفحه: ۱۴۳ تا ۱۵۲

چکیده

تنش‌های غیرزیستی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شوند. تحلیل داده‌های زیستی به واسطه علم بیوانفورماتیک، نقش مهمی در بررسی ژن‌ها، ارتباطات و نیز پیشگویی کارکرد آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی دارد. پروتئین‌های دارای دُمین ARID-PHD در گیاهان و جانوران شناسایی شده و نقش بسیار مهمی در تنظیم رشد، چرخه سلولی و بیان ژن‌های اختصاصی هر بافت دارند. در این تحقیق، توالی مربوط به ناحیه محافظت شده دُمین ARID در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف همچون NCBI در برابر توالی‌های ثبت شده برای گیاهان مختلف جستجو و در نتیجه آن ۱۰ پروتئین گیاهی حاوی دُمین ARID-PHD یافت شد. گیاهان شامل آرابیدوپسیس، آجیلوپس، براکیودیوم، سویا، برنج وحشی، برنج ژاپونیکا، ارزن دم روباهی، سورگوم، ذرت و آلورپوس بود. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، رسم درخت فیلوژنتیکی، بررسی ویژگی‌های پروتئینی و الگوی بیان نسبی ژن ARID در گیاه شوری‌زی آلورپوس انجام گرفت. نتایج نشان داد که علاوه بر شباهت توالی‌های اسید آمینه، پروتئین‌ها نیز به دو گروه گیاهان تک لپه و دو لپه تقسیم شدند. بررسی ساختار و ویژگی پروتئین‌ها بیانگر درجه حفاظت بالای پروتئین در گیاهان مختلف بود. بررسی میزان بیان ژن در گیاه آلورپوس نشان داد که حداکثر تعداد رونوشت‌های ژن در اندام هوایی گیاه بوده و این افزایش معنی‌دار بعد از ۶ ساعت از اعمال تنش شوری در حداکثر مقدار بوده و تا ۲۴ ساعت بعد از تنش نیز کاهش معنی‌داری نشان نداد که بیانگر نقش احتمالی این پروتئین در تحمل گیاه به تنش می‌باشد. در بافت ریشه گیاه، میزان بیان ژن نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. به طور کلی، این مطالعه اولین گزارش در مورد بررسی ویژگی توالی پروتئینی و تغییرات بیان ژن ARID در گیاه هالوفیت آلورپوس در شرایط تنش بوده و می‌تواند به عنوان گام ابتدایی در استفاده از این خانواده ژنی به منظور اصلاح و دست‌ورزی گیاهان در جهت تحمل به تنش‌های غیرزیستی به ویژه شوری باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیرزیستی، روابط فیلوژنتیکی، ساختار پروتئین، *In silico*، هالوفیت

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شوند (۴۰). با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به‌منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت. اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی با استفاده از بیوانفورماتیک، به هم‌ردیفی^۱ توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیشگویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (۳۰). پروتئین‌های موجود در جانداران هر کدام به علت فعالیت ویژه‌ای که دارند از اهمیت خاصی برخوردار هستند. در سال‌های اخیر، خانواده پروتئین‌های ARID^۲ توجه محققان را به خود جلب کرده و این پروتئین‌ها به عنوان دُمین اتصال به DNA با درجه محافظت شدگی بسیار بالا شناخته می‌شوند (۱۲). توالی ARID دارای حدود ۱۰۰ اسید آمینه بوده و مطالعات ساختاری آن نشان داد که جایگاه اتصال آنها شکاف بزرگ رشته DNA می‌باشد (۱۱،۳۲). دُمین ARID ابتدا در پروتئین BRIGHT موش (۱۰) و سپس در پروتئین DRI مگس سرکه (۸) شناسایی شد. شناسایی توالی‌های حفاظت شده

اتصال به DNA در بین DRI و BRIGHT، پارامترهایی از یک دُمین اتصال به DNA جدید را معرفی و اسم آنها نیز الهام گرفته از نوع واکنش این پروتئین‌ها با نواحی DNA غنی از AT می‌باشد. امروزه پروتئین‌های حاوی ARID در تمامی موجودات توالی‌یابی شده اعم از پستانداران، حشرات، گیاهان، جلبک‌های سبز، نماتدها و مخمرها یافت می‌شوند (۳۳). اگرچه ARID به صورت دُمین اتصال به DNA بر اساس helix- می‌باشد ولی ساختار و نحوه عملکرد پروتئین‌های حاوی ARID بسیار گسترده و متنوع می‌باشد. (۳۳) مشخص شده است که این پروتئین‌ها نقش بسیار مهم و حیاتی در تنظیم رشد و بیان ژن‌های اختصاصی در هر بافت دارند. دُمین‌های ARID در ساختار ۳ بعدی پروتئین در بین گیاهان و حیوانات بسیار محافظت شده بوده و تنوع موجود در ساختار پروتئین‌های حاوی این دُمین مربوط به وجود دیگر دُمین‌ها می‌باشد. در حیوانات، پروتئین‌های ARID طیفی وسیعی از فعالیت‌های سلولی شامل شرکت در تنظیم اپی ژنتیکی بیان ژن در طی تقسیم و رشد سلولی را از خود نشان می‌دهند. در حیوانات پروتئین‌های ARID بر اساس وجود دُمین‌های محافظت شده اضافی به چندین زیر خانواده گروه‌بندی می‌شوند. (۳۴). در موش پروتئین‌های ARID4b و ARID4a برای نرابوروی لازم بوده (۳۵) و با کمپلکس هیستون داستیلاز^۳ پیوسته می‌باشد (۴). پروتئین JARID2

در این گیاه پرداخته شد تا بتوان در برنامه‌های اصلاحی آینده با کسب شناخت بیشتر از تمامی اعضای این خانواده ژنی، اقدام به اصلاح و مقاوم سازی گیاهان زراعی نمود.

مواد و روش‌ها

دریافت توالی‌های ARID و بررسی نواحی محافظت شده توالی‌ها

توالی‌های نوکلئوتیدی ARID گیاهی با جستجوی نام ژن در قسمت نوکلئوتید سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و همچنین توالی‌های اسید آمینه مربوط به پروتئین‌های ARID گیاهان با جستجو در قسمت پروتئین سایت NCBI دریافت شد. دُمین‌های محافظت شده پروتئین‌های ARID گیاهی با استفاده از نرم‌افزار CDD مربوط به سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) (۱۵) و سایت InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro) بررسی شده و بعد از تجزیه و تحلیل مناطق محافظت شده، توالی‌های حاوی دُمین ARID-PHD انتخاب و برای نام‌گذاری آن‌ها، از نام علمی گیاهی استفاده شد که ژن در آن شناسایی شده بود.

همردیفی و رسم نمودار فیلوژنی

همردیف‌سازی چندگانه طول کامل پروتئین‌های ARID مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClustalW (۳۱) انجام و سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار 4.0 MEGA (۲۹) و با روش نزدیک‌ترین همسایه^۵ رسم شد (۲۳). جهت بررسی و صحت تکرارپذیری درخت ترسیم شده، از آزمون بوت استرپ^۶ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

بررسی توالی و پیش بینی ساختارهای پروتئین

خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین‌های به دست آمده شامل تعداد اسید آمینه سیستئینی، شاخص آلفاتیک، وزن مولکولی، میزان تئوری pI و شاخص ناپایداری با استفاده از ابزار <http://www.expasy.org/tools/protpar-> protparam (ref.html (۵) محاسبه شدند. برای شناسایی جایگاه سلولی پروتئین‌ها از نرم‌افزار پیش‌بینی جایگاه سلولی CELLO استفاده شد (۳۹). ساختار دوم توالی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp>) (۶) تعیین گردید.

بررسی بیان ژن ARID در گیاه *Aeluropus littoralis*

بذرهای گیاه آلروپوس از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان دریافت شد. بعد از شستشو و استریل کردن، بذور در محیط جامد MS کشت و بعد از دو هفته، گیاهچه‌های حاصل به سیستم کشت هیدروپونیک حاوی محلول هوگلند انتقال یافت. بعد از ۳۰ روز، تیمار شوری به میزان ۵۰۰ mM در صورت پاساژدهی (با اضافه کردن NaCl به میزان ۱۰۰ mM در هر ۴۸ ساعت) اعمال شد (۹). سپس در فواصل زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری ۵۰۰ mM، ریشه‌ها و اندام هوایی گیاهان تنش دیده و گیاه شاهد، به طور جداگانه برداشت و در ازت مایع برای استخراج RNA فریز شدند. کل RNA با استفاده از روش *Invitrogen* Trizol (مطابق دستورالعمل ارائه شده استخراج

تنظیم‌کننده رشد بسیار مهمی در طی تنظیم چرخه سلولی بوده (۲۸) و همچنین در پستانداران به عنوان عضوی از کمپلکس PRC2، نقش فعال‌کننده (۱۹) و بازدارنده (۱۸) فعالیت‌های ژنی را دارد. در حدود ۱۵ پروتئین حاوی دُمین ARID در ژنوم انسان و ۲ پروتئین در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* (Swi1p) یافت شده است (۳۳،۳۴). پروتئین At3g43240 تنها عضو زیرمجموعه آرابیدوپسیس است که دارای یک دُمین ARID و یک دُمین PHD می‌باشد (۴۳). دُمین PHD finger توانایی شناسایی دنباله‌های هیستونی H3 متیله شده و متیله نشده را داشته و برخی از آنها نیز توانایی واکنش با پروتئین‌های غیر هیستونی را دارند. در حیوانات، پروتئین‌های ARID با بیشترین شباهت شامل ۴ پروتئین از زیرمجموعه JARID1 می‌باشند که هر کدام حاوی ۲ یا تعداد بیشتری دُمین PHD بوده و علاوه بر این دارای چندین موتیف عملکردی دیگر هم می‌باشند (۳۴). پراکندگی و تنوع در طول پپتیدها و آرایش موتیف‌ها پیشنهاد می‌دهد که برخی زیرمجموعه‌های ARID، ظاهراً به صورت مستقل بعد از انشقاق اجداد گیاهی و جانوری از همدیگر، تکامل یافته‌اند (۲۱). اگرچه پروتئین‌های حاوی ناحیه ARID به صورت گسترده‌ای در ژنوم گیاهان نیز حضور دارند ولی مطالعات کمی در زمینه نقش و تأثیر آنها در شرایط مختلف گزارش شده است. در آرابیدوپسیس ۱۰ پروتئین حاوی دُمین ARID با طول‌های مختلف از ۳۱۹ اسید آمینه در atg13350 تا ۷۸۶ اسید آمینه در at2g17410 وجود دارد. این پروتئین‌ها بر اساس روابط فیلوژنتیکی و وجود دُمین‌های ناحیه انتهایی C پروتئین به ۴ زیرخانواده گروه‌بندی می‌شوند (۴۳). تمامی همولوگ‌های آرابیدوپسیس علاوه بر دُمین ARID حاوی موتیف‌های دیگری نیز می‌باشند که شامل HSP20^۱ (۲۴)، HMG^۲ (۲۷)، ELM2^۳ (۲) و PHD^۴ به عنوان پروتئین درگیر در سیستم‌های اتصال به هیستون متیله شده H3 (۲۰) و در نهایت، دُمین MYB می‌باشند. پروتئین SIP1 نیز به عنوان عضو جدید پروتئین‌های خانواده محافظت شده ARID در گیاهان شناسایی شده است (۴۳). همچنین در مطالعات اخیر به نقش ژن SIP1 (دارای دُمین ARID) در تومورزایی و تشکیل گره در گیاه *Lotus japonicas* (۴۳)، تأثیر پروتئین‌های ARID-HMG در تغییر ساختار دینامیکی کروماتین و نیز تنظیم فرآیند رونویسی در بافت‌های گیاه آرابیدوپسیس (۲۲)، نقش پروتئین ARID-ELM2 گیاهی در تنظیم تشکیل دانه گرده و کنترل باروری آرابیدوپسیس (۴۲)، نقش فاکتور رونویسی AtHMGB15 در رشد مناسب حفره دانه گرده در آرابیدوپسیس (۳۶) و نقش پروتئین OsARID3 در رشد مریستم نوک ساقه برنج و تولید اندام هوایی (۳۷) پرداخته شده است.

تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با نقش پروتئین‌های ARID در گیاه *Aeluropus littoralis* انجام نشده است و به عنوان اولین گام، در این تحقیق به بررسی بیوانفورماتیکی این پروتئین در گیاه آلروپوس و مقایسه آن با پروتئین‌های ARID سایر گیاهان و نیز بررسی الگوی بیان این ژن در شرایط تنش شوری با استفاده از تکنیک Real Time PCR

1- Heat Dress Protein 20-like
4- Plant HomeoDomain finger

2- High-Mobility Group
5- Neighbor joining method

3- EGL-27 and MTA1 homology 2
6- Bootstrap

شد (۷). کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفلورومتر بررسی شد. برای حذف آلودگی DNA از RNase-free DNase I (Thermo Scientific) استفاده شد و سنتز رشته cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo scientific (USA) و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. ژن Actin به عنوان ژن رفرنس (۷) در محاسبه میزان بیان نسبی ژن ARID در گیاه آلوروپوس انتخاب و آغازگرهای رفت و برگشت مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI 11.5.2 و primer 3 از دستگاه C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) SYBR Green I PCR Master Mix و کیت

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش real-time PCR

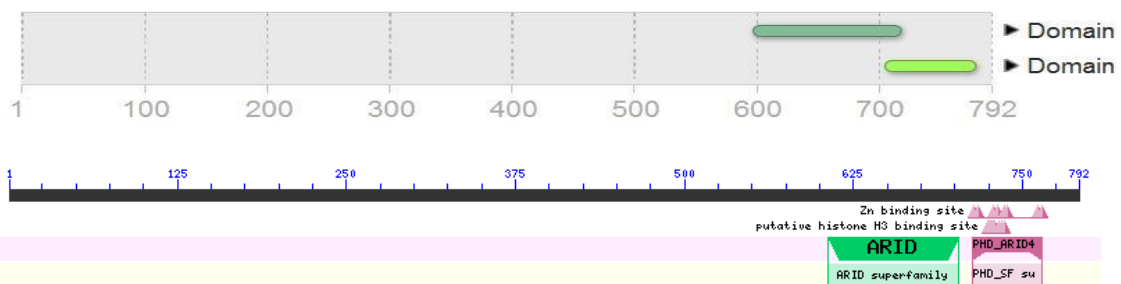
Table 1. Sequences of primers used for real-time PCR amplification

ژن	توالی آغازگر	شماره دسترسی	e-value
ACT11	5'-GTATGGCAACATTGTCCTCAG-3'	EE594539.1	1×10^{-66}
	5'-TGGAGCAACGACCTTGAT-3'		
ARID	5'-TCGCCATGCTTTGATGCTGTG-3	MF544039	2×10^{-53}
	5'-ATAGCCGGAAGGATGCATGA-3'		

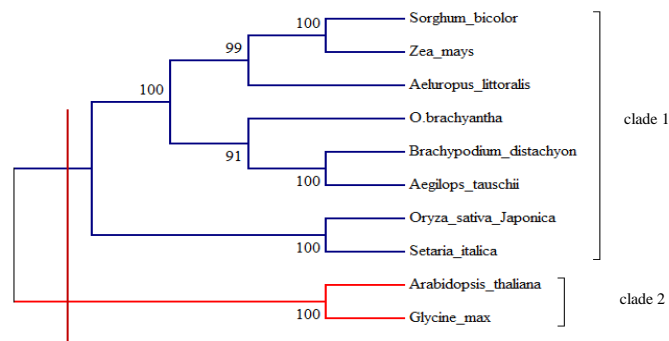
ژنوم گیاهان مختلف انتخاب (شکل ۱) و از نظر روابط فیلوژنتیکی، ساختارهای ژنی، خصوصیات بیوشیمیایی و الگوی بیانی ژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که توالی‌های مورد مطالعه دارای چارچوب قرائت آزاد 'ORF' در محدوده ۲۰۶۷ نوکلئوتیدی در گیاه آراییدوپسیس تا ۲۳۳۳ نوکلئوتیدی در گیاه آلوروپوس می‌باشند. هم‌ردیفی توالی‌ها مشخص نمود که توالی‌ها دارای درجه بسیار بالایی از مشابهت با یکدیگر بوده و بر اساس نتایج درخت فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی، می‌توان گیاهان را به دو گروه تقسیم نمود. در گروه اول گیاهان تک لپه‌ای مانند برنج، ارزن و آلوروپوس قرار داشته و گروه دوم نیز مربوط به گیاهان دو لپه‌ای شامل آراییدوپسیس و سویا بود (شکل ۲).

نتایج و بحث

پروتئین ARID یک دُمین متصل به DNA با قدمت یک بیلیون سال می‌باشد (۱۱) که به همراه دیگر دُمین‌ها، کارکردهای مختلفی در چرخه زندگی موجودات ایفا کرده که از آن جمله می‌توان به دُمین PHD اشاره کرد که به‌عنوان پروتئین درگیر در سیستم‌های اتصال به هیستون متیله شده H3 عمل می‌نماید. با جستجو در پایگاه اطلاعاتی همچون NCBI و مقالات گزارش شده در ارتباط با پروتئین ARID، توالی‌های متعددی در گیاهان مختلف مانند آراییدوپسیس (۲۲)، برنج (۳۷)، یونجه (۴۳)، ارزن دم‌رواهی، جو، آلوروپوس و دیگر گیاهان شناسایی شده است. در این مطالعه با استفاده از جستجو در BlastP پایگاه NCBI و بررسی نواحی دُمین آنها، ۱۰ ژن کد کننده پروتئین ARID حاوی دُمین PHD در



شکل ۱- نواحی حفاظت شده پروتئین ARID حاوی دُمین PHD در گیاه آلوروپوس. (A) پایگاه InterPro (B) پایگاه NCBI
Figure 1. ARID protein Conserved domain contained PHD domain in *Aeluropus littoralis*. (A) InterPro site (B) NCBI site



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی مورد مطالعه. رسم درخت به روش نزدیکترین همسایه با آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (۳) انجام شد. دو گروه درخت فیلوژنتیکی بر اساس خط برش و مقادیر آزمون بوت استرپ مشخص شده اند

Figure 2. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Two groups was identified based on cutting line and bootstrap value

در گیاه آرابیدوپسیس تا ۸/۴۴ در گیاه براکیپودیوم بوده که بیانگر ماهیت خنثی برای این پروتئین گیاهی از لحاظ درجه pH می‌باشد (۲۵). آنالیز مکان‌یابی نشان داد که جایگاه عمده این پروتئین‌ها هسته سلول برای تمامی گیاهان و همچنین علاوه بر هسته، برای گیاه برنج در سیتوپلاسم پیش‌بینی شد (جدول ۲).

مطالعات فیزیکی- شیمیایی این پروتئین‌ها با استفاده از ابزار آنالیز پروتئین ExpASY (۱) نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد اسید آمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک با هم تفاوت دارند. طول پروتئین این خانواده از ۶۸۹ تا ۷۷۷ اسید آمینه و وزن مولکولی آنها از ۷۶/۲۳ تا ۸۷/۱۸ کیلودالتن متغیر است. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۶/۳۲

جدول ۲- مشخصات فیزیکی- شیمیایی پروتئین‌های مورد مطالعه

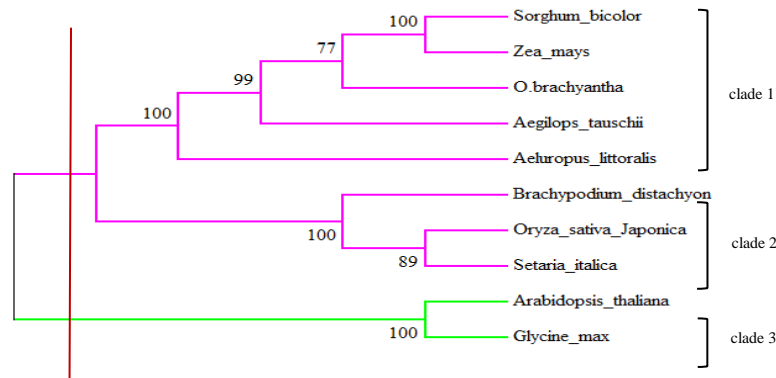
Table 2. Predicted physicochemical properties of proteins

شاخص ناپایداری	جایگاه سلولی	وزن مولکولی (KDa)	نقطه ایزوالکتریک	طول پروتئین (aa)	شماره دسترسی	طول توالی (bp)	ORF	گیاه
ناپایدار	هسته	۷۶/۲۳	۶/۳۲	۶۸۹	NM_114192	۲۰۶۷		Arabidopsis thaliana
ناپایدار	هسته	۸۵/۱۱	۷/۷۸	۷۷۳	XM_020317627	۲۳۱۹		Aegilops tauschii
ناپایدار	هسته	۸۴/۵۸	۸/۴۴	۷۶۶	XM_014901548	۲۲۹۸		Brachypodium distachyon
ناپایدار	هسته	۸۳/۰۷	۷/۷۲	۷۵۲	XM_003533757	۲۲۵۶		Glycine max
ناپایدار	هسته	۸۵/۱۰	۸/۲۱	۷۶۸	XM_006661204	۲۳۰۴		Oryza brachyantha
ناپایدار	هسته و سیتوپلاسم	۸۳/۹۰	۸/۳۲	۷۶۱	XM_015795079	۲۲۸۳		Oryza sativa Japonica
ناپایدار	هسته	۸۴/۳۴	۷/۳۰	۷۶۶	XM_004973536	۲۲۹۸		Setaria italica
ناپایدار	هسته	۸۴/۸۶	۸/۲۱	۷۶۹	XM_021453462	۲۳۰۷		Sorghum bicolor
ناپایدار	هسته	۸۴/۸۵	۷/۹۳	۷۶۸	XM_008671989	۲۳۰۴		Zea mays
ناپایدار	هسته	۸۷/۱۸	۸/۰۲	۷۷۷	MF544039	۲۳۲۳		Aeluropus littoralis

هم‌ردیفی توالی پروتئین‌ها در گیاهان مختلف ترسیم شد. بر اساس امتیاز بوت استرپ (۳)، پروتئین‌ها در ۳ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۳).

آنالیز فیلوژنتیکی پروتئین‌های ARID

هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی نشان‌دهنده وجود درجه بالایی از مشابهت این توالی‌ها در گیاهان مورد مطالعه بود (شکل ۴). برای درک بهتر روابط تکاملی و فیلوژنتیکی پروتئین‌های مورد مطالعه، درخت فیلوژنتیکی بر اساس



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های مورد مطالعه. رسم درخت به روش نزدیکترین همسایه با آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (۳) انجام شد. سه گروه درخت فیلوژنتیکی بر اساس خط برش و مقادیر آزمون بوت استرپ مشخص شده‌اند

Figure 3. Phylogenetic analysis of proteins. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Three groups were identified based on cutting line and bootstrap value



شکل ۴- هم‌ردیف‌سازی توالی‌های پروتئینی مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار BioEdit. کادر مستطیل نشان‌دهنده ناحیه محافظت شده دامین ARID می‌باشد. گیاهان مورد مطالعه شامل: *Sorghum bicolor* (XM_021453462), *Brachypodium distachyon* (XM_014901548), *Oryza sativa Japonica* (XM_015795079), *Setaria italica* (XM_004973536), *Aegilops tauschii* (XM_020317627), *Oryza brachyantha* (XM_006661204), *Zea mays* (XM_008671989), *Aeluropus littoralis* (MF544039) می‌باشند.

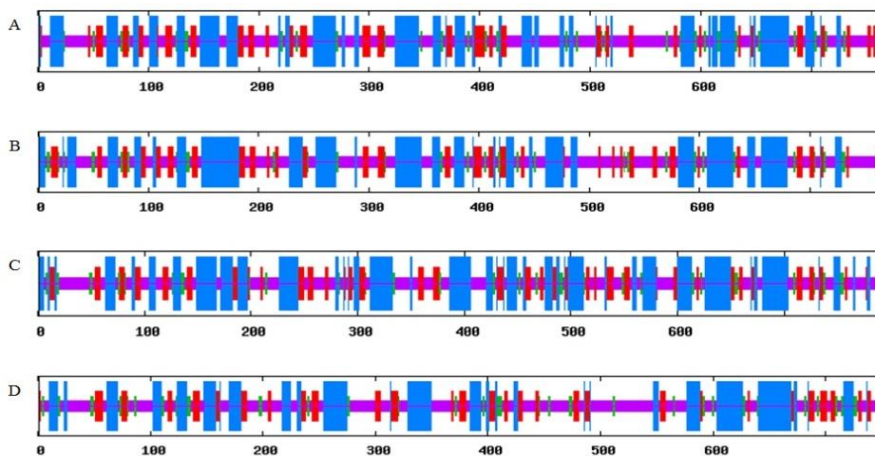
Figure 4. Multiple alignments of ARID proteins using BioEdit. The box represents the conserved ARID domain. Studied plants were involved: *Sorghum bicolor* (XM_021453462), *Brachypodium distachyon* (XM_014901548), *Oryza sativa Japonica* (XM_015795079), *Setaria italica* (XM_004973536), *Aegilops tauschii* (XM_020317627), *Oryza brachyantha* (XM_006661204), *Zea mays* (XM_008671989), *Aeluropus littoralis* (MF544039)

مورد خانواده ژنی HDZ IV نیز مشاهده می‌شود (۱۷). نتایج حاصل از بررسی ساختار ثانویه توالی اسید آمینه‌ها با استفاده از نرم افزار SOPMA نشان داد که به‌طور کلی پروتئین‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری مشابهی با هم بوده و تعداد پیچش آلفا، پیچش بتا، پیچیدگی تصادفی^۳ و رشته طویل^۴ برابر با هم را دارند (جدول ۳). هیچ‌یک از پروتئین‌های مورد مطالعه دارای پل بتا^۵ نبوده و گیاه آلروپوس تعداد پیچش آلفا و رشته طویل بالایی (۲۹۴ و ۱۴۰) داشت. مدرسی و همکاران (۱۶) با مطالعه روی نقش و ویژگی‌های آنزیم کاتالاز در گیاهان مختلف، از جمله گیاه آلروپوس در شرایط تنش شوری، بیان داشتند که تعداد بالاتر رشته طویل می‌تواند در میزان تحمل گیاهان به شرایط نامطلوب زیستی مؤثر باشد (شکل ۵).

گروه یک با ۵ عضو، از ژن‌های گیاهان سورگوم، ذرت، برنج، آژیلوپس و آلروپوس تشکیل شده است. گروه دو شامل ژن‌های گیاهان براکیپودیوم، برنج ژاپونیکا و ارزن دم‌روبه‌می می‌باشد. گروه ۳ شامل ژن‌های گیاهان آرابیدوپسیس و سویا می‌باشد. جدا شدن ژن‌های ARID در گروه ۳ و ایجاد یک گروه مجزا می‌تواند به علت رابطه تکاملی بین گیاهان مورد مطالعه باشد، زیرا آرابیدوپسیس و سویا دولپه‌ای هستند و رابطه تکاملی نزدیکی دارند. وجود رابطه تکاملی نزدیک در گیاهان دولپه نسبت به گیاهان تک لپه در سایر خانواده‌های ژنی نیز مشاهده شده است. به‌عنوان مثال خانواده ژنی TIFY آرابیدوپسیس و انگور در مقایسه با این خانواده در برنج دارای رابطه تکاملی نزدیک‌تری هستند (۴۱). وجود رابطه تکاملی نزدیک در تک لپه‌ای‌ها نسبت به دولپه‌ای‌ها (و برعکس) در

جدول ۳- خصوصیات ساختار ثانویه پروتئین‌های مورد مطالعه

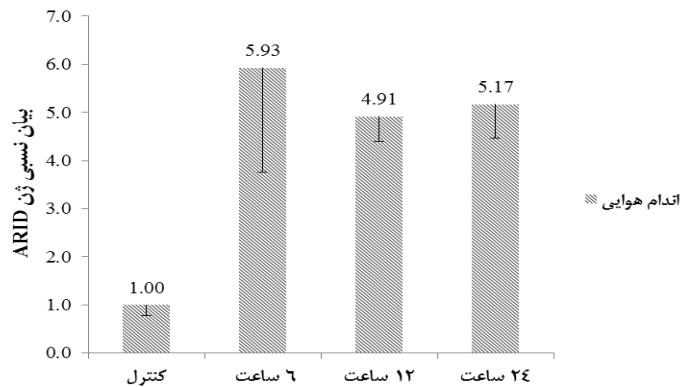
گیاه	پیچش آلفا	پیچش بتا	پیچیدگی تصادفی	رشته طویل	پل بتا
<i>Arabidopsis thaliana</i>	۱۹۱	۴۵	۳۰۷	۱۴۶	.
<i>Aegilops tauschii</i>	۲۴۱	۴۹	۳۵۲	۱۳۱	.
<i>Brachypodium distachyon</i>	۲۵۰	۵۱	۳۳۵	۱۲۸	.
<i>Glycine max</i>	۲۲۶	۶۲	۳۴۲	۱۲۲	.
<i>Oryza brachyantha</i>	۲۳۷	۴۶	۳۴۳	۱۴۲	.
<i>Oryza sativa Japonica</i>	۲۴۱	۵۸	۳۳۲	۱۳۰	.
<i>Setaria italica</i>	۲۵۷	۵۵	۳۲۴	۱۳۰	.
<i>Sorghum bicolor</i>	۲۷۱	۵۹	۳۲۵	۱۱۴	.
<i>Zea mays</i>	۲۶۴	۵۴	۳۱۳	۱۲۷	.
<i>Aeluropus littoralis</i>	۲۹۴	۵۴	۳۰۴	۱۴۰	.



شکل ۵- مقایسه ساختار ثانویه پروتئین‌های ARID با استفاده از نرم افزار SOPMA. مقادیر بیانگر طول پروتئین می‌باشند. (A) *Setaria italica*, (B) *Zea mays*, (C) *Aeluropus littoralis*, (D) *Glycine max*

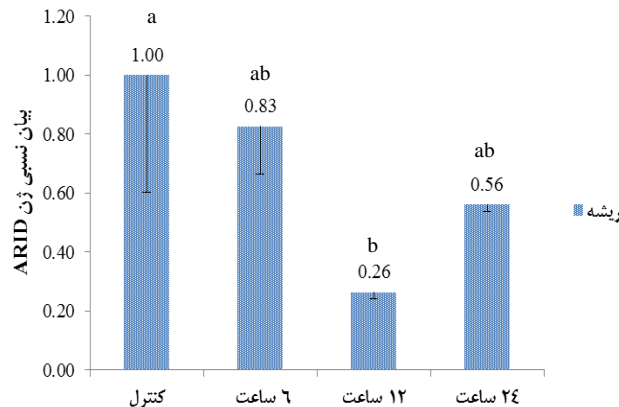
اندام هوایی در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش ۵۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، به ترتیب ۵/۹۳، ۵/۹۱ و ۴/۹۱ و ۵/۱۷ برابر بیشتر نسبت به تیمار شاهد (شکل ۶) و در ریشه به ترتیب ۰/۸۳، ۰/۲۶ و ۰/۵۶ برابر کمتر نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۷).

الگوی بیانی ژن ARID تحت تنش شوری در گیاه *Aeluropus littoralis*
نتایج بررسی تغییرات بیان ژن با استفاده از واکنش Real Time PCR نشان داد که بیان ژن ARID تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفته و میزان بیان آن در اندام هوایی به طور معنی‌داری از لحاظ آماری افزایش یافت. سطح بیان ژن در



شکل ۶- الگوی بیان رونوشت ژن ARID در اندام هوایی گیاه *Aeluropus littoralis* با استفاده از تکنیک Real-time PCR تحت تنش ۵۰۰ mM کلرید سدیم در بافت‌های مختلف نسبت به تیمار کنترل. تیمارها شامل: شاهد، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از شوری. حروف مشترک بیانگر عدم معنی‌داری اختلاف می باشد

Figure 6. Expression pattern of ARID using Real-time PCR under salt stress (500 mM NaCl) in shoot tissue of *Aeluropus littoralis*. Treatments involved: Control, 6, 12 and 24 hours after stress, respectively



شکل ۷- الگوی بیان رونوشت ژن ARID در ریشه گیاه *Aeluropus littoralis* با استفاده از تکنیک Real-time PCR تحت تنش ۵۰۰ mM کلرید سدیم در بافت‌های مختلف نسبت به تیمار کنترل. تیمارها شامل: شاهد، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از شوری. حروف مشترک بیانگر عدم معنی‌داری اختلاف می باشد

Figure 7. Expression pattern of ARID using Real-time PCR under salt stress (500 mM NaCl) in root tissue of *Aeluropus littoralis*. Treatments involved: Control, 6, 12 and 24 hours after stress, respectively

شد. سایر مطالعات نیز افزایش و یا کاهش بیان ژن‌های کد کننده فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی را گزارش کرده و بیان داشته‌اند که این پاسخ در اکثر موارد بسیار سریع و فراگیر بوده است (۱۳، ۳۸). نتایج نشان داد که میزان بیان ژن ARID در اندام هوایی گیاه *Aeluropus littoralis* بسیار بالاتر از اندام ریشه‌ای گیاه بود. مطابق با این یافته، ژو و همکاران (۳۷) بیان داشتند که تمامی ژن‌های خانواده ARID در برنج، بالاترین سطح بیان نسبی را در برگ‌ها (برگ‌های رویشی و پرچمی) داشته و بیان ژن‌های OsARID ۱، ۲ و ۳ در ریشه و ساقه و نیز بیان ژن‌های OsARID ۱ و ۲ در نوک ساقه و خوشه‌های در حال رشد بسیار پایین بود. بررسی اعضای این خانواده ژنی در آرایدوپسیس نشان داد که در سلول‌های رویشی، این پروتئین علاوه بر تنظیم بیان برخی ژن‌ها به عنوان فاکتور رونویسی، بر کنترل بیش بیانی عوامل ترانسکریپشنی به واسطه ارتباط با

اختلاف معنی‌داری در افزایش بیان در اندام هوایی از ساعت ۶ تا ۲۴ ساعت بعد از تنش شوری مشاهده نشد در حالیکه در ریشه، میزان بیان در ساعت ۱۲ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشته و میزان بیان بین ساعات ۶ و ۲۴ معنی‌دار نبود. به‌طور کلی میزان رونوشت بالاتری از ژن ARID در اندام هوایی نسبت به ریشه مشاهده شد که این افزایش در ۶ ساعت بعد از اعمال تنش ایجاد شده و تا انتهای بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری نیز ادامه یافت. با توجه به عملکرد ژن‌های خانواده ARID به‌عنوان فاکتورهای رونویسی و از طرفی، افزایش و پایداری بیان این ژن در طی تنش شوری در اندام هوایی گیاه آلوروپوس که به عنوان یک گیاه شورزی می‌باشد، می‌توان به نقش احتمالی و مؤثر ژن ARID در افزایش تحمل گیاه نسبت تنش شوری اشاره داشت. تأثیر این پروتئین در تحمل گیاه خردل هندی به شرایط تنش سرمایی توسط سینها و همکاران (۲۶) گزارش

ژن ARID را ارائه کرده و به انتخاب ژن‌های کاندید برای مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر کمک نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و پشتیبانی مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مساعدت بخش‌های مختلف این پژوهشکده قدردانی نمایند.

سیستم تغییر هیستونی و نیز اصلاح ساختار کروماتینی تأثیرگذار می‌باشند. همچنین گزارش شد که برخی از اعضای این خانواده در تمام بافت‌های گیاهی بیان شده و برخی دیگر نیز اختصاصیت بالایی نسبت به بیان در بافت‌های مختلف دارند (۴۲). با مطالعه گسترده همه ژن‌های ARID گیاهی در تحقیقات پیش‌رو، امکان درک کامل مکانیسم این خانواده بزرگ فراهم شده و انجام تجزیه و تحلیل‌های بیشتر بیوشیمیایی و مطالعات *in vivo* می‌تواند در تعیین دقیق‌تر نقش این گروه از پروتئین‌ها در گیاه در شرایط تنش مؤثر باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند اطلاعات پایه‌ای در ارتباط با

منابع

- Artimo, P., M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. De Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier and E. Gasteiger. 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40: 597-603.
- Ding, Z., L. Gillespie and G. Pate. 2003. Human MI-ER1 alpha and beta function as transcriptional repressors by recruitment of histone deacetylase 1 to their conserved ELM2 domain. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 250-258.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39 (4): 783-791.
- Fleischer, T.C., U.J. Yun and D.E. Ayer. 2003. Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 3456-3467.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker and S. Duvaud. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASyserver. In: Walker JM. *The proteomics protocols handbook*, Humana Press, New Jersey (USA), 571-607.
- Geourjon, C. and G. Deléage. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*, 11(6): 681-684.
- Ghasemi Omran, V., A.R. Bagheri, GH. Nematzadeh and A. Mirshamsi. 2012. Evaluation of the Expression Pattern of ALSOS1 and AINHX Genes under NaCl Stress in Halophyte Grass *Aeluropus littoralis* Parl. *Crop Biotechnology*, 2(2): 27-37.
- Gregory, S.L., R.D. Kortschak, B. Kalionis and R. Saint. 1996. Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA binding proteins, *Molecular and Cellular Biology*, 16: 792-799.
- Hashemi, S.H., Gh. Nematzadeh, Gh. 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: 18-31.
- Herrscher R.F., M.H. Kaplan, D.L. Lelsz, C. Das, R. Scheuermann and P.W. Tucker 1995. The Immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes and development*, 9: 3067-3082.
- Kim, S., Z. Zhang, S. Upchurch, N. Isern and Y. Chen. 2004. Structure and DNA-binding sites of the SWI1 AT-rich interaction domain (ARID) suggest determinants for sequence-specific DNA recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 16670-16676.
- Kortschak, R.D., P.W. Tucker and R. Saint. 2000. ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochemical Science*, 25: 294-299.
- Liu, K., L. Wang, Y. Xu, N. Chen, Q. Ma, F. Li and K. Chong. 2007. Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta*, 226: 1007-1016.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Marchler-Bauer, A., M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L.Y. Geer, R.C. Geer, J. He, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, C.J. Lanczycki, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng and S.H. Bryant. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43: 222-226.
- Modarresi, M., G.A. Nematzadeh and M. Zarein. 2013. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene from Halophyte *Aeluropus lagopoides*: Identification and Characterization. *Journal of Crop Improvement*, 27: 281-290.
- Pandey, A., P. Misra, A. Alok, N. Kaur, S. Sharma, D. Lakhwani, M.H. Asif, S. Tiwari and P.K. Trivedi. 2016. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Homeodomain Leucine Zipper Subfamily IV (HDZ IV) Gene Family from *Musa accuminata*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 20.
- Pasini, D., P.A. Cloos, J. Walfridsson, L. Olsson, J.P. Bukowski, J.V. Johansen, M. Bak, N. Tommerup, J. Rappsilber and K. Helin. 2010. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature*, 464: 306-310.

19. Peng, J.C., A. Valouev, T. Swigut, J. Zhang, Y. Zhao, A. Sidow and J. Wysocka. 2009. JARID2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*, 139: 1290-1302.
20. Ramon-Maiques, S., A.J. Kuo, D. Carney, A.G. Matthews, M.A. Oettinger, O. Gozani and W. Yang. 2007. The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 104: 18993-18998.
21. Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C.Z. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman and G.L. Yu. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105-2110.
22. Roy, A., A. Dutta, D. Roy, G. Paye, R. Ghosh, R.K. Kar, A. Bhunia, J. Mukhopadhyay, and S. Chaudhuri. 2016. Deciphering the role of the AT-rich interaction domain and the HMG-box domain of ARID-HMG proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 92: 371-388.
23. Saitou, N. and M. Nei. 1978. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
24. Scharf, K.D., M. Siddique and E. Vierling. 2001. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6: 225-237.
25. Sharafi, E., A. Dehestani, J. Farmani and A. Pakdin Parizi. 2017. Bioinformatics evaluation of plant chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation. *Applied Food Biotechnology*, 4(3): 167-178.
26. Sinha, S., V.K. Raxwal, B. Joshi, A. Jagannath, S. Katiyar-Agarwal, S. Goel, A. Kumar and M. Agarwal. 2015. De novo transcriptome profiling of cold-stressed siliques during pod filling stages in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6: 932-949.
27. Stros, M., D. Launholt and K.D. Grasser. 2007. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 2590-2606.
28. Takahashi, M., M. Kojima, K. Nakajima, R. Suzuki-Migishima and T. Takeuchi. 2007. Functions of a jumonji-cyclin D1 pathway in the coordination of cell cycle exit and migration during neurogenesis in the mouse hindbrain. *Developmental Biology*, 303: 549-560.
29. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
30. Tavallaie, A. 2016. Review of Data mining in Genetics (Clustering of Iranian kinfolks by DNA identification). 2nd International and 14th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran, 1-5 pp
31. Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
32. Tu, X., J. Wu, Y. Xu and Y. Shi. 2001. 1H, 13C and 15N resonance assignments and secondary structure of ADR6 DNA-binding domain. *Journal of Biomolecular NMR*, 21: 187-188.
33. Wilsker, D., A. Patsialou, P.B. Dallas and E. Moran. 2002. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth and Differentiation*, 146: 95-106.
34. Wilsker, D., L. Probst, H.M. Wain, L. Maltais, P.W. Tucker and E. Moran, 2005. Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics*, 86: 242-251.
35. Wu, R.C., M. Jiang, A.L. Beaudet and M.Y. Wu. 2013. ARID4A and ARID4B regulate male fertility, a functional link to the AR and RB pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 110: 4616-4621.
36. Xia, C., Y.J. Wang, Y. Liang, Q.K. Niu, X.Y. Tan, L.C. Chu, L.Q. Chen, X.Q. Zhang and D. Ye. 2014. The ARID-HMG DNA-binding protein AtHMGB15 is required for pollen tube growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79: 741-756.
37. Xu, Y., W. Zong, X. Hou, J. Yao, H. Liu, X. Li, Y. Zhao and L. Xiong. 2015. OsARID3, an AT-rich Interaction Domain-containing protein, is required for shoot meristem development in rice. *The Plant Journal*, 83: 806-817.
38. Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki. 2006. Cross-talk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 436-442.
39. Yu, C.S., Y.C. Chen, C.H. Lu and J.K. Hwang. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3): 643-651.
40. Zhang, H., X. Mao, C. Wang and R. Jing. 2010. Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2.8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 5(12): e16041.
41. Zhang, Y., M. Gao, S.D. Singer, Z. Fei, H. Wang and X. Wang. 2012. Genome- Wide Identification and Analysis of the *TIFY* Gene Family in Grape. *PLoS One*, 7(9): e44465.
42. Zheng, B43. Zhu, H., T. Chen, M. Zhu, Q. Fang, H. Kang, Z. Hong and Z. Zhang. 2008. A novel ARID DNA binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 148: 337-347.
43. Zheng, Y., H. He, W. Wu and S. McCormick. 2014. An ARID Domain-Containing Protein within Nuclear Bodies Is Required for Sperm Cell Formation in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, 10(7): e1004421.

In Silico Characterization of Proteins Containing ARID-PHD Domain and Its Expression in *Aeluropus littoralis* Halophyte

Hamidreza Ghorbani¹, Habibollah Samizadeh Lahiji² and Ghorbanali Nematzadeh³

1- Ph.D. Student of Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan,
(Corresponding author: ghorbani.hreza@gmail.com)

2- Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan

3- Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: July 23, 2017

Accepted: September 10, 2017

Abstract

Abiotic stresses are the most important factors that reduce the yield of crops. In this case, Bioinformatics analysis plays an important role to study genes, and their relatedness as well as prediction their function in response to abiotic stresses. Among all domains, ARID-PHD domain has been identified in plants and animals and has a very significant role in growth regulation, cell cycle, and expression of specific genes in each tissue. In this study, we looked for the conserved sequences of the ARID family in various plant species from the NCBI database to evaluate its expression in *Aeluropus littoralis*. Based on the result, 10 plants that had protein containing the ARID-PHD domain were identified. Then, sequences alignment, designing phylogenetic tree, protein characterization and relative expression assessment of ARID gene in *Aeluropus littoralis* were done. The results showed that in addition to the similarity of amino acid sequences, proteins were divided into two groups of monocotyledons and di-cotyledons plants. Protein characteristics and structure investigation indicated a high degree of conserved sequences in proteins from different plant species. Regarding gene expression analysis, the maximum level of transcripts belongs to this gene expressed in plant aerial tissue after 6 hours of salinity stress and did not show a significant decrease until 24 hours, which probably suggested the probable role of this protein in plant tolerance to various stresses. Also, in the root, the gene expression was not significantly different from control treatment. This study was the first report to investigate protein characteristics and changing in ARID gene expression in halophyte plant (*Aeluropus littoralis*) under salt stress conditions and could be used as a useful reference to make plants tolerable specifically to salinity in using this gene family to modify plants to tolerate abiotic stresses especially salinity.

Keywords: Abiotic Stresses, Halophyte, In-silico, Phylogenetic Relation, Protein Structure