



"مقاله پژوهشی"

ساختار و بیان ژن NFX در مراحل رشدی در گونه‌های جو، ذرت و گندم

زهره حاجی‌برات^۱ و عباس سعیدی^۲

۱- گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، (نویسنده مسئول: abbas.saidi@gmail.com)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۸ صفحه: ۹۷ تا ۱۰۵

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: پروتئین‌های NFXL1 و NFXL2 دارای موتیف‌های انگشت روی شامل (موتیف اتصال DNA و انگشت PHD) هستند که به‌طور بالقوه برهم کنش پروتئین را واسطه‌گری می‌کنند. ژن‌های NF-X نقش مهمی در پاسخ به سیگنالینگ دفاعی با استفاده از هورمون‌های گیاهی دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۲ ژن NF-X در جو، ذرت و گندم انتخاب شدند. ساختار ژن، الگوهای دوبرابردگی و درخت فیلوژنتیک برای ۱۲ فاکتور رونویسی NF-X در سه گونه مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین، تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای برای شناسایی ارتولوگ‌ها و پارالوگ‌های NF-X در ژنوم ذرت، جو و گندم انجام شد.

یافته‌ها: درخت فیلوژنتیک NF-X از جو و ذرت و گندم به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. آنالیز ساختار ژنی نشان داد که تعداد اگزون ژن‌های NF-X بین ۱ تا ۱۳ متغیر است. آنالیز سینتزی ژن‌های NF-X در جو، ذرت و گندم نشان داد که شباهت *TaNFXL1.2* با *HvNFXL1* و *HvNFXL2* با *TaNFXL1.3*، *TaNFXL2* با *TaNFXL2.1* و *ZmNFXL1.1* بیش از ۹۰٪ می‌باشد. آنالیز ژن‌های NF-X نشان داد که دوبرابردگی تاندوم و دوبرابردگی سگمنتال نقش مهمی در گسترش ژنوم جو و ذرت و گندم دارد. با این حال، تعداد دوبرابردگی تاندوم و سگمنتال، نشان داد که این عوامل از عوامل اصلی در تکامل ژن‌های NF-X هستند. این اولین مطالعه برای مقایسه ژن‌های NF-X در سه گونه گیاهی است، پیش‌بینی عناصر تنظیمی نشان داد که NF-YC، NF-YA، NF-YB، SANT، myb، WRKY، Dof، Trihelix و بالاترین فراوانی را در ناحیه آغازگر ژن‌های NF-X داشتند. ژن‌های *HvNF-X2* و *ZmNF-X2* بالاترین تعداد سیس المنت‌ها را به خود اختصاص دادند. آنالیز بیان ژن‌های NF-X نشان داد که این ژن‌ها تقریباً در تمامی مراحل رشدی افزایش بیان نشان دادند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما می‌تواند به عنوان منبع مفیدی برای مطالعات آینده ژن‌های NF-X در مطالعات مقایسه‌ای بین گونه‌های مختلف گیاهی در نظر گرفته شود. هدف از این مطالعه، شناسایی و توصیف ژن‌های NF-X در سه گونه از طریق روش تجزیه و تحلیل ژنوم بود. ژن‌های *HvNF-X2*، *HvNF-X1* و *ZmNFXL1.1* بیان ژن را در تمام مراحل رشدی نشان دادند. ساختار ژن در اکثر پروتئین‌های هر گروه مشابه بود که با طبقه بندی فیلوژنتیک ژن‌های NF-X مطابق بود.

واژه‌های کلیدی: آنالیز سینتزی، دمین روی، ساختار ژنی، فاکتور رونویسی NF-X، مراحل رشدی

مقدمه

پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی با تغییرات اصلی در بیان ژن و متابولیسم همراه است. در شرایط تنش رشد و نمو کاهش می‌یابد (۲) و گیاهان برای زنده ماندن و تولید بذر نیاز به کنترل کارآمد در برابر پاسخ به تنش‌ها دارند (۱). توانایی و بقا، گیاه به توانایی پاسخ سریع به تنش زیستی و غیرزیستی مختلف وابسته است (۴). پروتئین‌های NFX1 گیاهی می‌توانند با استفاده از گونه‌های اکسیژن فعال و سالیلیک اسید به تنش‌های زیستی و آبسزیک اسید (ABA) و همچنین برای رشد و بقای گیاه پاسخ دهند (۷). ژن *AtNFXL1* دارای یک اینترون بوده که می‌تواند در کنترل سطوح رونویسی نقش داشته باشد (۵).

پروتئین NF-X1 و پروتئین‌های همولوگ در یوکاریوت‌ها نمایانگر گروهی از فاکتور رونویسی هستند که با موتیف انگشت روی می‌باشند. ژنوم آراییدوپسیس دو همولوگ NF-X1 به نام‌های *AtNFXL1* و *AtNFXL2* را رمزگذاری می‌کند (۹). پروتئین‌های انگشت روی از نوع NF-X1 احتمالاً بخشی از مکانیسم‌های تنظیمی است و از فرآیندهای اصلی مانند فتوسنتز محافظت می‌کند (۹). احتمالاً فاکتورهای مرتبط با تنش برای اتصال DNA و برهم کنش‌های پروتئین *AtNFXL1* لازم هستند. یک محصول ژن *AtNFXL2* پاسخ‌های تنشی را مهار کرده و ممکن است برای جلوگیری از تنش غیرضروری و سازگاری در شرایط مناسب دخالت داشته

باشد (۱۰). غیرفعال‌سازی *AtNFXL2* می‌تواند برای پاسخ‌های مناسب به تنش مناسب باشد (۹). دو ژن NF-X1 که به‌طور معمول در ژنوم حیوانات و گیاهان عالی وجود دارد به گروه‌های مختلفی تعلق دارند و ممکن است ژن‌های ارتولوگ را نشان دهند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که ژن‌های فاکتور NF-X در ریشه سویا کمتر از برگ‌های سویا بیان شد (۱۳،۸). براساس مطالعه‌ای نشان داده شد که NF-X در رشد گیاه و تنظیم رشد و همچنین در تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش زیادی دارد (۶،۲).

AtNFXL1 توسط تنش شوری و تنش اسمزی القا می‌شود و گیاهان جهش یافته *atnfxl1* نسبت به گیاهان نوع وحشی میزان بقا را پس از تنش شوری کاهش می‌دهند (۱۵،۵). ABA نقش تنظیمی منفی در مسیرهای سیگنالینگ دفاعی، از جمله مسیرهای سیگنالینگ وابسته به سالیلیک، جاسمونیک و اتیلن دارد (۹،۱۱،۱۵). بنابراین، سیگنالینگ تنش کنترل شده توسط NFXL1 ممکن است به عناصر دفاعی و مسیر سیگنالینگ ABA بستگی داشته باشد. در این مطالعه، آنالیزهای بیوانفورماتیکی مرتبط با فیلوژنی پروتئین‌ها، موتیف‌های محافظت شده، آنالیز بیان در مراحل مختلف رشدی، آنالیز سینتزی و ساختار ژنی و همچنین پیش‌بینی سیس المنت‌های موجود در ناحیه آغازگری ژن‌های NF-X مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آنالیز فیلوژنتیک، موتیف‌های محافظت شده و آنالیز تکاملی

توالی‌های پروتئینی NF-X از پایگاه داده EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) دانلود شد. هم‌ردیفی توالی‌های پروتئین با استفاده از روش ClustalW انجام شد. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0 و با الگوریتم NJ صورت گرفت. صحت درخت فیلوژنتیکی با بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد (۱۶).

موتیف‌های محافظت شده و مشخصات بیوشیمیایی ژن‌های NF-X

موتیف حفاظت شده توسط برنامه MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) با استفاده از توالی‌های پروتئینی طول تمام توالی‌های پروتئینی NF-X با پارامترهای زیر مشخص شد: حداکثر تعداد موتیف (۱۰ موتیف) است. برای پیش‌بینی نقطه ایزوالکتریکی نظری (pI) و وزن مولکولی (کیلو دالتون) هر پروتئین NF-X از سرور ExPASy (<http://web.expasy.org/compute-pi/>) استفاده شد. تمام ژن‌های NF-X همراه با نام ژن، جزئیات ژن‌ها و طول آمینو اسید، اسید آمینه و ایزوالکتریک نقطه در جدول ۱ ذکر شده است.

ساختارهای ژنی NF-X و عناصر تنظیمی سیس در ناحیه آغازگری ژن

ساختار اگزون اینترون ژن‌های NF-X با توالی cDNA به توالی‌های ژنومی مربوطه با استفاده از سرور نمایشگر ساختار (GSDS) تعیین شد. توالی‌های آغازگری همه ژن‌های NF-X در گیاه جو، ذرت و گندم از سایت دانلود شد. آنالیز نواحی آغازگری ژن‌های NF-X با استفاده از سایت (PlantPAN; <http://PlantPAN3.itsps.ncku.edu.tw>) صورت گرفت.

الگوهای بیان ژن‌های NF-X در مراحل رشدی گیاه

به منظور شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی در مراحل رشدی، داده‌های بیان ژن NF-X توسط genevestigator از جو، ذرت و گندم استخراج شد. پایگاه داده‌ها، با استفاده از پلت فرم آرایه Affymatrix Genome و ابزار 'Perturbations' با مقادیر $p < 0.05$ و ژن‌ها با بیان افتراقی برابر ۲ و کمتر از ۲- برای ژن‌ها انتخاب شدند. از تغییرات برابر بیان ژن‌های NF-X در مراحل رشد برای تولید نقشه Heatmap بیان ژن با استفاده از genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>) با رنگی بنفش / سفید به عنوان نشانگرهایی در "بنفش" و "سفید" استفاده شد. رنگ‌ها نمایانگر افزایش بیان (بنفش) و کاهش بیان (سفید) ژن‌های مربوطه هستند.

شناسایی ژن‌های NF-X ارتولوگ و پارالوگ بین سه گونه (جو، ذرت و گندم)

برای ارزیابی روابط سینتیک، ژن‌های ارتولوگ بین جو، ذرت و گندم از سایت Ensemble plants شناسایی شد. زمانی که آن دو ژن میزان شباهت بالاتر از ۷۰ درصد داشته باشند آن ژن‌ها ارتولوگ هستند. برای بررسی ژن‌های پارالوگ در پروتئین‌های NF-X، اگر میزان شباهت بین ژن‌های مورد نظر بیشتر از ۸۵ درصد بود این دو ژن پارالوگ می‌باشد. ژن‌های پارالوگ و ارتولوگ با استفاده از برنامه Circos نمایش داده شدند. برای بررسی پارالوگ و ارتولوگ و الگوی دوبرابردگی از برنامه PLAZA استفاده شد (جدول ۱).

نتایج و بحث

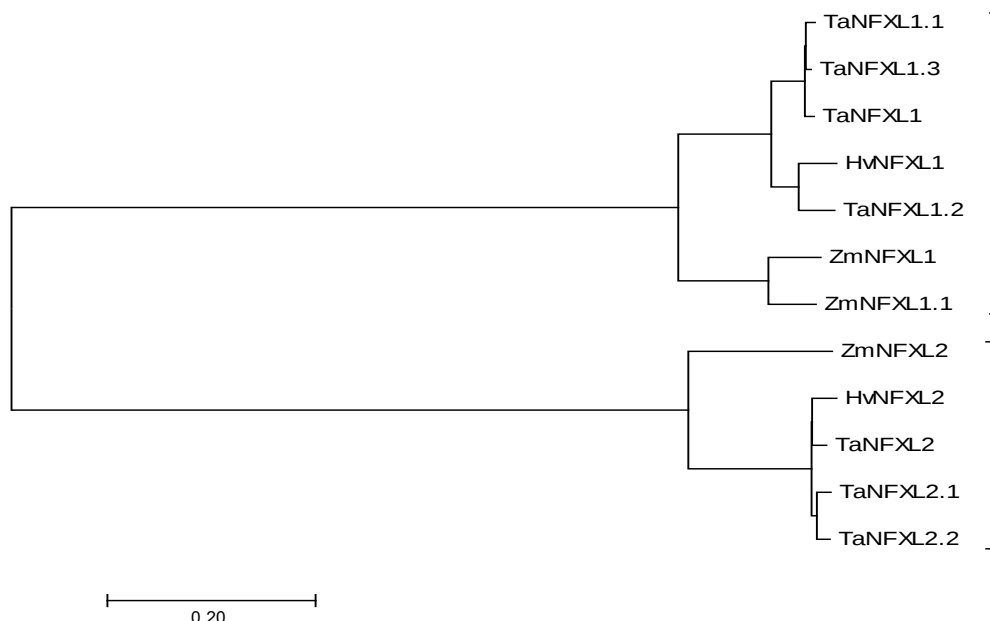
در مطالعه حاضر، بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های NF-X با استفاده از ابزارهای مختلف انجام شد. نام ژن‌های NF-X و مشخصات شیمیایی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج هم‌ردیفی توالی‌های ژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 مشخص شد و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم NJ ترسیم شد و براساس آن ژن‌ها به دو کلاستر تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). در مطالعه حاضر، ما پنج عضو از خانواده ژن NF-X در جو، ذرت و گندم را با توجه به موقعیت آنها بر روی کروموزوم‌ها، نامگذاری کردیم (جدول ۱). آنالیز بیوانفورماتیک مانند روابط فیلوژنتیک، ساختارهای ژنی، ژن‌های پارالوگ و ارتولوگ NF-X انجام شد. مشخصات بیان مورد آنالیز قرار گرفت. ژن‌های NF-Xs در طول اسید آمینه از ۸۶۷ تا ۹۹۶ متغیر بوده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده (pI) از ۸/۳۶ تا ۸/۹۱ و وزن مولکولی از ۹۵/۳۶ تا ۱۰۷/۹۷ کیلو دالتون در بین سه گونه متفاوت هستند.

روابط فیلوژنتیک و ساختارهای ژنی ژن‌های NF-X در جو، ذرت و گندم

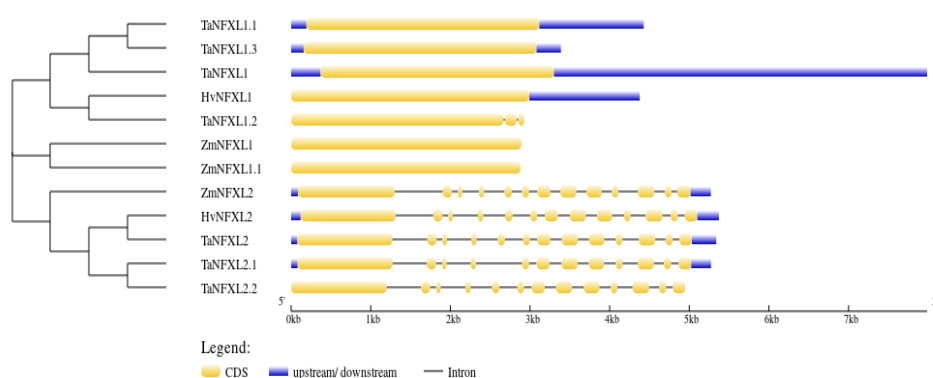
برای تعیین روابط فیلوژنتیکی در بین اعضای مختلف پروتئین‌های NF-X در گونه‌های مختلف، آنالیز فیلوژنتیک بر اساس هم‌ردیفی ۱۲ توالی پروتئین NF-X انجام شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، درخت فیلوژنتیک به روش NJ، ۱۲ ژن NF-X را به دو کلاستر تقسیم‌بندی نمود. در کلاستر I، ۷ ژن NF-X و در کلاستر II، ۵ ژن NF-X گروه‌بندی شدند. ژن‌های NF-X با بالاترین تعداد اگزون‌ها به عنوان مثال ۱-۱۳ متغیر بودند (شکل ۲). تعداد ثابت اینترون‌ها و اگزون‌ها یک ویژگی محافظت شده از NF-X است که این ویژگی توسط ژن‌های NF-X از گونه‌های دیگر مانند جو، ذرت و گندم نشان داده می‌شود (۱۱). مطالعه ساختار پروتئین برای درک نحوه عملکرد آن مهم است.

جدول ۱- مشخصات ژن‌ها و طول آمینواسید و نقطه ایزوالکتریک ژن‌های NF-X
Table 1. The characterization of genes details, amino acid length, amino acid, and point isoelectric of NF-X genes.

ردیف	نام ژن	طول آمینواسید	وزن مولکولی (KD)	نقطه ایزوالکتریک	ردیف	نام ژن	طول آمینواسید	وزن مولکولی (KD)	نقطه ایزوالکتریک
۱	HvNFXL1	۹۹۶	۱۰۷/۹۷	۸/۳۳	۷	TaNFXL2	۸۹۹	۹۹/۱۲۵	۸/۸۷
۲	HvNFXL2	۸۹۹	۹۹/۱۰	۸/۹۱	۸	TaNFXL2.1	۸۶۷	۹۵/۳۶	۸/۸۶
۳	TaNFXL1	۹۷۶	۱۰۵/۶۵	۸/۴۶	۹	TaNFXL2.2	۹۰۲	۹۹/۴۱	۸/۸۹
۴	TaNFXL1.1	۹۷۴	۱۰۵/۴۰	۸/۴۸	۱۰	ZmNFXL1	۹۶۳	۱۰۴/۱۹	۸/۴۲
۵	TaNFXL1.2	۹۶۰	۱۰۳/۹۹	۸/۳۶	۱۱	ZmNFXL1.1	۹۶۰	۱۰۳/۳۶	۸/۴۱
۶	TaNFXL1.3	۹۷۴	۱۰۵/۵۲	۸/۴۳	۱۲	ZmNFXL2	۹۰۸	۹۹/۳۷	۸/۸۲



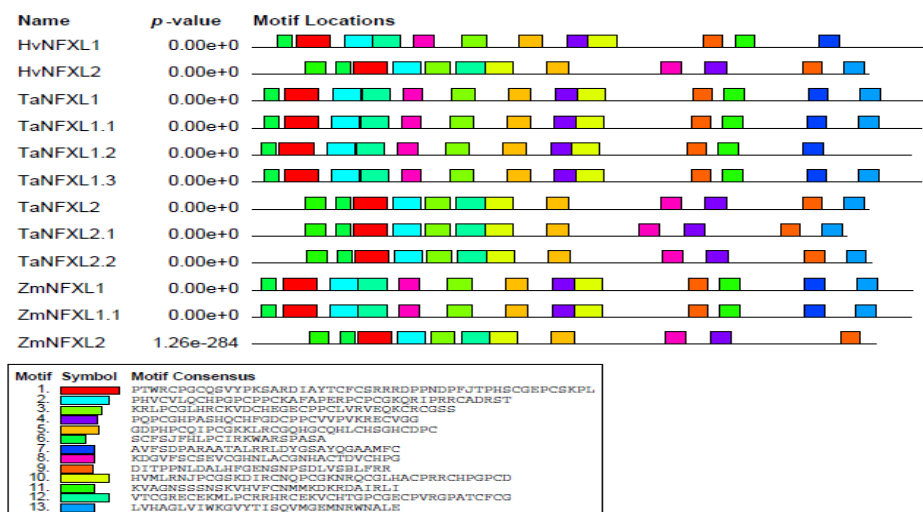
شکل ۱- درخت فیلوژنتیک ژن‌های NF-X که با استفاده از روش همسایه پیوستن (NJ) با استفاده از نرم‌افزار MEGA7.0 بدست آمده است
Figure 1. Phylogenetic tree of NF-X genes created by the neighbor-joining (NJ) method in MEGA7.0 software



شکل ۲- ساختار اگزون-اینترونی سه گونه با توجه به رابطه فیلوژنتیکی آنها. رنگ‌های زرد و آبی به ترتیب نمایانگر ژن اگزون و اینترون
Figure 2. The exon-intronic structure of nine species genes according to their phylogenetic relationship. Yellow and blue colors represent gene exon and intron, respectively

موتیف‌های محافظت شده ژن‌های NF-X در اکثر پروتئین‌های هر گروه مشابه بود و طبقه‌بندی فیلوژنتیک فاکتورهای رونویسی NF-X را تأیید کرد. داده‌های آزمایشگاهی نقش محوری ژن *AtNFXL1* را در پاسخ‌های مختلف تنش تأیید کردند (۵). در کلاسترهای I و II، به ترتیب ۷ و ۵ فاکتور رونویسی NF-X قرار گرفتند. آنالیز موتیف‌ها نشان داد که پروتئین‌های NF-X1 و NF-X2 در اندازه اسیدهای آمینه متفاوت هستند.

موتیف‌های محافظت شده ژن‌های NF-X
با استفاده از ابزار MEME، در مجموع ۱۲ موتیف محافظت شده و با طول ۶ تا ۵۰ اسید آمینه در ژن‌های NF-X شناسایی شد. در میان آنها، موتیف‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸ به طور گسترده‌ای در تمام NF-X‌ها شناسایی شد (شکل ۳). به طور کلی، فاکتور رونویسی NF-X در یک کلاستری که ژن‌ها با عملکردهای مشابهی داشتند، قرار گرفتند. ترکیب

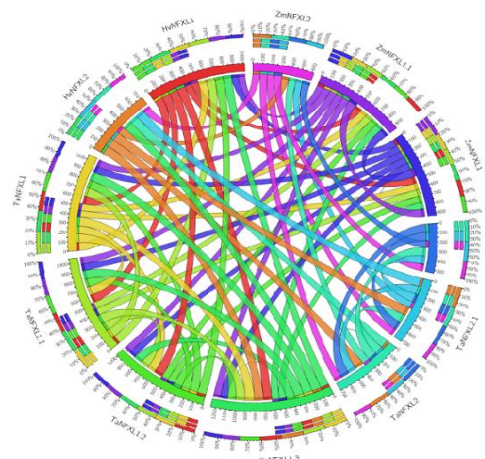


شکل ۳- موتیف‌های فاکتورهای NF-X در جو و ذرت توسط پایگاه داده MEME شناخته شده است. موتیف‌های ۱ تا ۱۲ با رنگ‌های مختلف مشخص شده‌اند

Figure 3. Conserved NF-X protein motifs in maize, as recognized by MEME database. Motifs 1-12 are identified by different colors

می‌تواند عملکرد ژن را میسر سازد. آنالیز ژن‌های NF-X نشان داد که تاندوم دوبرابری و سگمنتال دوبرابری نقش مهمی در گسترش ژنوم ذرت و گندم دارد. با این حال، تعداد دوبرابری تاندوم و سگمنتال، نشان داد که این عوامل از عوامل اصلی در تکامل ژن‌های NF-X هستند. با توجه به نقش اصلی گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به عنوان گیاهان نمونه، ژنوم سه گونه منبع جدیدی را برای استفاده در اصلاح محصولات زراعی فراهم می‌کند. *ZmNFXL1*، *ZmNFXL1.1* و *HvNFXL1* با *TaNFXL1.2*، *TaNFXL1.3* و *HvNFXL2* با *TaNFXL1.1*، *TaNFXL1.2*، *TaNFXL2.1* و *TaNFXL1* شباهت بالای ۸۵ درصد داشتند.

ژن‌های ارتولوگ و پارالوگ برای ژن‌های NF-X
در مطالعه حاضر، آنالیز مقایسه‌ای برای شناسایی ارتولوگ‌ها و پارالوگ‌های NF-X در ژنوم‌های ذرت، جو و گندم انجام شد (شکل ۴). بر اساس نتایج *ZmNFXL2* با *HvNFXL2* و *ZmNFXL1.1* با *HvNFXL1* و *ZmNFXL1* شباهت (بالای ۸۵٪) زیادی نشان داد و در مجموع منجر به شناسایی چندین جفت ژن ارتولوگ شد. در ژنوم سه گونه، ژن‌های NF-X اورتولوگی مشاهده نشد. بر اساس یافته‌های ما، ژن‌های ارتولوگ بین جو، گندم و ذرت پیشنهاد می‌شود. تکثیر ژنوم کامل (پلی پلوئیدی) نقش مهمی در گسترش ژن‌های NF-X داشته باشد. تکثیر ژن شامل تاندوم/سگمنتال دوبرابری در گونه‌های مختلف تشخیص داده شد. غالباً ژن‌های ارتولوگ در بین گونه‌های مختلف عملکردهای مشابهی دارند. بنابراین، مطالعه ژنومیک تکاملی



شکل ۴- رابطه ارتولوگ و پارالوگ ژن‌های NF-X با ژنوم‌های جو، ذرت و گندم توسط پایگاه داده Circos. Figure 4. Orthologous and paralogous relationship of NF-X genes with barley, maize and wheat genomes visualized by Circos database

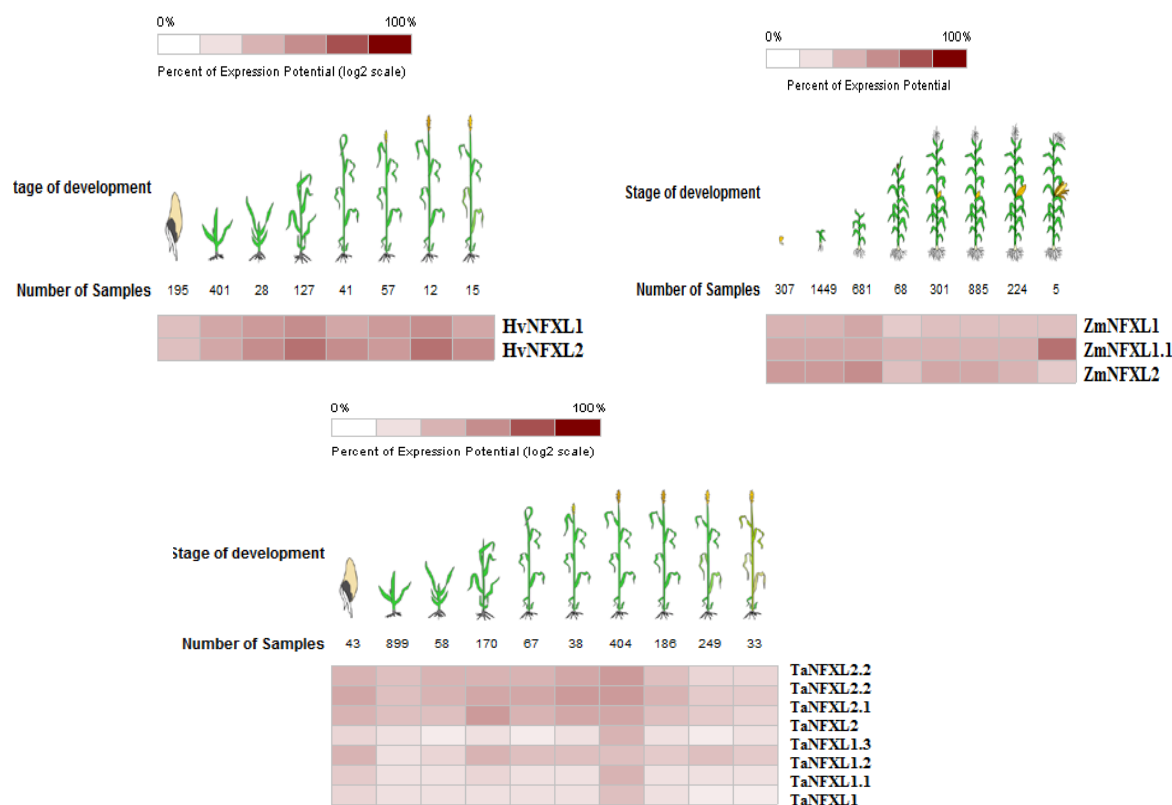
رشد و شرایط تنش می‌باشد (۱۱). نتایج ما نشان داد که بیان *NFXL1* و *NFXL2* تنظیم کننده های منفی با هم هستند، و اینکه این نتایج با مطالعه دیگر محققین مطابقت داشت. در مراحل انتهایی رشد گیاه، سطح رونویسی بالایی *NFXL1* وجود داشت و اکثر ژن های *NFXL1* در مراحل مختلف در تمام مراحل رشد جو، ذرت و گندم بیان می‌شوند. بیان ژن های *NFXL1* در تمام مراحل می‌تواند نقشی اساسی در تکوین گیاه داشته باشد. سطح رونویسی *AtNFXL1* فقط در شرایط تنش غیرزیستی و زیستی به طور متوسط تغییر می‌کند و سطح مناسبی از بیان در پایان رشد گیاه *NFXL1* نشان داده شد.

پیش‌بینی TFBS در ژن‌های NF-X

برای پیش‌بینی سایت‌های اتصال‌دهنده فاکتور رونویسی در ۱۰۰۰ bp بالادست آغازگر NF-X برای عوامل تنظیمی، هورمونی و رشدی در پاسخ به تنش، از پایگاه داده PlantPAN استفاده گردید. نتایج نشان داد که سیس المنت‌های مختلف پاسخگو به تنش‌های مختلف مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی، در مناطق آغازگری ۱۲ ژن NF-X وجود دارد. آغازگرهای NF-X دارای عناصر مختلف تنظیم‌کننده سیس هستند که گمان می‌رود در پاسخ به مراحل رشد، عوامل محیطی و هورمونی نقش داشته باشند (شکل ۶). ما بیشتر عناصر پاسخ‌دهنده هورمون را در آغازگرهای NF-X مورد آنالیز قرار دادیم. بیشترین عنصر پاسخ‌دهنده هورمون، (bHLH) برای ژن‌های NF-Xs برای نشان دادن سیگنال ABA است و آنها در ۱۲ NF-X مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه، عناصر شناسایی شده در پاسخ به تنش‌های مختلف شامل bZIP، MYB، NF-YC bHLH، NF-YB؛ NF-YA؛ و AP2/ERF هستند. در طی آنالیز آغازگرها، عناصر پاسخ‌دهنده bZIP و G-box به هورمون‌هایی نظیر ABA پاسخ می‌دهند. همچنین، WRKY در پاسخ به هورمون اکسین بیان شد. در میان NF-Xهای بررسی شده، ژن *AtNF-X2* بیشترین عناصر تنظیمی را در مناطق آغازگر خود دارد و ژن‌های *TaNFXL1* و *HvNFXL* حداکثر تعداد عناصر سیس‌المنت را در مناطق آغازگر خود دارند.

بیان ژن‌های NF-X در مراحل رشد در گونه‌های مختلف

برای تشخیص سطح بیان در بافت‌های مختلف گیاه، آنالیز mRNA ژن NF-X با استفاده از داده‌های بیانی انجام شد. آنالیز الگوی بیان ژن‌های NF-X در جو، ذرت و گندم انجام شد. همانطور که در (شکل ۵ a,b,c) نشان داده شده است، ژن‌های NF-X در بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو گیاه خصوصاً در طی فرآیندهایی مانند گلدهی، بلوغ، رشد و نمو رویان و تمایز و گسترش بیان می‌شوند (۲۰). در ذرت، ژن *ZmNFXL1.1* بخصوص در مرحله رشد دیر هنگام افزایش بیان نشان می‌دهد (۴b). در گندم، *TaNFXL2.2* و *TaNFXL2.3* و *TaNFXL1.3* در کلیه مراحل رشدی کاهش بیان نشان دادند (۴c). این یافته‌ها ممکن است نشان دهد که تغییرات جزئی در سطح پروتئین تأثیر قابل توجهی دارد. این ژن در اندام‌های رویشی مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها (به ویژه نوک ریشه) و در گل‌ها (به ویژه تخمدان‌ها و کاسبرگ‌ها) بیان می‌شوند (۵). ژن‌های NF-X در اندام‌های گیاهی برای عملکرد یا توسعه یک اندام خاص افزایش بیان بالایی را نشان دادند. NF-X در رشد و توسعه گیاه و همچنین در تحمل تنش زیستی و غیرزیستی نقش بسزایی دارد (۳). سطح رونویسی *AtNFXL1* فقط در شرایط تنش غیرزیستی و زیستی به‌طور متوسط تغییر می‌کند و بیان بیش از حد *AtNFXL1* تحت کنترل آغازگر 35S (با افزایش سطح رونویسی در دو تا سه برابر در شاخساره در مقایسه با نوع وحشی نشان داده شده) برای رشد و بقا را تحت شرایط تنش غیرزیستی را فراهم می‌کند (۱۱). این یافته‌ها نشان داد که تغییرات جزئی در سطح پروتئین تأثیر قابل توجهی دارد. ژن *NFXL* در گیاهچه‌ها و گیاهان جوان، در اندام‌های رویشی مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها (به ویژه نوک ریشه) و در گل‌ها (به ویژه تخمدان‌ها و کاسبرگ‌ها) بیان می‌شود (۱۱). تقریباً همه ژن‌های NF-X1 در گونه‌های مختلف در پاسخ به مراحل رشدی مانند مراحل گلدهی و تشکیل بذر، افزایش بیان بالایی نشان می‌دهند. بیان ژن‌های NF-X در تمام مراحل می‌تواند نقشی اساسی در مراحل رشد و توسعه گیاه داشته باشد. گیاهان با کاهش بیان *AtNFXL2*، بیان *AtNFXL1* را افزایش می‌دهند که نشان‌دهنده ی نقش‌های متضاد ژن‌های *AtNFXL1* و *AtNFXL2* در پاسخ به مراحل



شکل ۵- آنالیز Heatmap برای بیان ژن‌های فاکتور رونویسی NF-X در مراحل مختلف رشد جو، ذرت و گندم
Figure 5. Heatmap representation of expression analysis of NF-X transcription factor genes at different developmental stages of barley, maize, and wheat

بین رفته بین ژن‌های متابولیسم اولیه و ثانویه را تحت شرایط تنش تشکیل می‌دهند، نقش دارد (۱۴۸). از نظر فیزیولوژیکی، اتصال فاکتورهای WRKY به W-box فعالیت‌های مختلف رشد و فرایندهای مرتبط با دفاع (تنظیم‌کننده پاسخ به پاتوژن‌ها و سایر تنش‌های غیرزنده) را کنترل می‌کنند (۱۸). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که WRKY نقش مهمی در مناطق آغازگر ژن‌ها در پاسخ به عوامل بیماری‌زا و تنش‌های زیستی دارد. فاکتورهای NF-X در بسیاری از فرایندهای رشدی گیاه به ویژه در طول فرایند وابسته به نور مانند گلدهی، رسیدگی، رشد و تمایز جنین نقش دارند (۳۶). فاکتورهای MYB متصل به عناصر تنظیمی مربوط به نواحی آغازگری، تغییرات را در فرایندهای مختلف مانند سیگنال‌دهی هورمونی، متابولیسم (بیوستز فنیل پروپانویید و آنتوسیانین)، مورفوژن سلولی و تشکیل مریستم کنترل می‌کنند (۴۲).

توالی آغازگری ژن‌های NFXL تقریباً شامل ۲۱ نوع سیس المنت هستند (شکل ۶). نواحی آغازگری اکثر ژن‌ها توسط سیس المنت زیر AP2/ERF، MYB / SANT، WRKY، Trihelix و bHLH کنترل می‌شوند. مطالعه قبلی نشان داد که سیس المنت WRKY همراه با وجود bZIP در ناحیه آغازگری ژن‌های NFXL مرتبط است (۱۴،۷). چندین AP2 / ERF در پاسخ به القای تنش خشکی و دیگر تنش‌های غیرزیستی در مراحل مختلف رشدی بیان می‌شوند (۱۷،۱۸،۱۹). محققان پیشنهاد کرده‌اند که فاکتورهای AP2/ERF همزمان با bZIP و MYB دخالت دارند تا با کنترل بیان ژن با واسطه ABA در آرابیدوپسیس تحمل تنش سرما را ایجاد نمایند (۱۸،۱۱). بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که شبکه‌ای از فاکتورهای رونویسی در تنظیم همزمان ژن‌های مرتبط با تنش، که به طور بالقوه ارتباط مولکولی از

	HvNFXL1	HvNFXL2	TaNFXL1.1	TaNFXL1.2	TaNFXL1.3	TaNFXL1	TaNFXL2.1	TaNFXL2.2	TaNFXL2	ZmNFXL1.1	ZmNFXL1	ZmNFXL2
AT-HOOK	15	38	11	0	9	67	25	32	39	3	1	62
NAC; NAM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB; ARR-B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Myb/SANT	77	124	70	33	38	130	126	115	107	41	48	128
C2H2	46	85	51	31	39	65	75	75	82	32	26	39
AP2; ERF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Homeodomain;	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB-related	3	18	3	0	0	10	14	14	23	5	3	28
Dof	81	159	77	53	53	170	170	155	170	50	46	148
GATA; tify	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HSF	2	7	4	1	1	5	8	7	5	4	2	4
bHLH	313	287	326	329	291	361	233	240	210	181	185	287
SBP	16	53	11	28	12	39	50	52	44	36	21	77
Sox; YABBY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCP	54	26	34	39	35	38	41	33	53	17	38	49
Storekeeper	0	5	1	2	5	14	7	2	7	0	3	9
WRKY	47	102	68	38	55	99	91	78	101	52	52	91
MADS box; MIKC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VOZ	1	5	2	2	2	4	6	4	5	1	1	3
NF-YB;NF-YA;NF-YC	136	178	134	83	92	249	176	154	168	90	89	158
BBR-BPC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trihelix	109	134	113	50	77	229	149	145	140	49	40	130
MADF; Trihelix	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

شکل ۶- پیش‌بینی سیس المنتها در مناطق آغازگر ژن های NF-X در جو، ذرت و گندم.

Figure 6. Prediction of TFBS in the promoter regions of NF-X genes in barley, maize, wheat

نتیجه‌گیری کلی

سیس‌المنتها، وجود bHLH و WRKY در تمام ژن‌های NF-X به پاسخ بهتر به تنش‌های مختلف غیرزیستی و زیستی کمک می‌کند. ژن‌های NF-X در سه گونه ژنوم نشان داد که NF-X می‌تواند به طور گسترده‌ای در رشد و نمو گیاه دخیل باشد. یافته‌های ما بینشی جدید در مورد خانواده ژن‌های NF-X در سه گونه و همچنین زمینه‌ای برای مطالعات بیشتر در مورد نقش ژن‌های NF-X در رشد و نمو گونه‌های مختلف فراهم می‌کند.

در مطالعه حاضر، ۱۲ ژن NF-X در جو، ذرت و گندم شناسایی شد. آنالیز ساختار ژن، خواص بیوشیمیایی و درخت فیلوژنتیک نشان داد که خانواده ژن NF-X در طول تکامل گیاه بسیار محافظت شده است. آنالیز بیان نشان داد که تمام ۱۲ ژن NF-X در چندین بافت با سطوح مختلف بیان شده‌اند که نشان می‌دهد ژن‌های مختلف NF-X عملکردهای مختلفی را در رشد و نمو حفظ می‌کنند. با استفاده از پیش‌بینی

منابع

- Dietrich, R., K. Ploss and M. Heil. 2005. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant Cell Environment*, 28: 211-222.
- Ghanbari, M.S.R. and M. Tohidfar. 2020. Identification, Isolation and Bioinformatic Analysis of Specific Tuber Promoter in Plants. *Journal of crop breeding*, 11(32): 1-10 (In Persian).
- Ghorbani, H., H. Samizadeh Lahiji and G.A. Nematzadeh. 2019. In Silico Characterization of Proteins Containing ARID-PHD Domain and Its Expression in *Aeluropus littoralis* Halophyte. *Journal of Crop Breeding*, 11(29): 143-152 (In Persian).
- Höll, J., A. Vannozzi, S. Czernmel, C. D'Onofrio, A.R. Walker and T. Rausch. 2013. TheR2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulates tilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell*, 25: 4135-4149.
- Lisso, J., T. Altmann and C.Müssig. 2006. The AtNFXL1 gene encodes a NF-IX1 type zinc finger protein required for growth under salt stress. *FEBS letters*, 580(20): 4851-4856.
- Liu, J.X. and Sh. Howell. 2010. BZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(3): 782-96.
- Llorca, C.M., M. Potschin and U. Zentgraf. 2014. Bzips and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers Plant Science*, 5: 169. doi:10.3389/fpls.2014.00169

8. Maruyama, K., D.A.I.S.U.K.E. Todaka, J. Mizoi, T. Yoshida, S.A.T.O.S.H.I. Kidokoro, S.A.T.O.K.O. Matsukura and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2012. Identification of cis-acting promoter elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA research*, 19(1): 37-49.
9. Mauch-Mani, B. and F. Mauch. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion. Plant Biology*, 8: 409-414.
10. Mishra A.K., J. Choi, M.F. Rabbee and K.H. Baek. 2019. In Silico Genome-Wide Analysis of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene Family in Soybean (*Glycine max* L.) and Their Expression Profiling. *BioMed Research International*, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/8150523>.
11. Pandey, G.K., J.J. Grant, Y.H. Cheong, B.G. Kim, L. Li and S. Luan. 2005. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(3): 1185-1193.
12. Rahman, H., Y.P. Xu, X.R. Zhang and X.Z. Cai. 2016. Brassica napus genome possesses extraordinary high number of CAMTA genes and CAMTA3 contributes to PAMP triggered immunity and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in plant science*, 7: 581.
13. Saidi, A. and Z. Hajibarat. 2020. In-silico analysis of eukaryotic translation initiation factors (eIFs) in response to environmental stresses in rice (*Oryza sativa*). *Biologia*, 75: 1731-1738.
14. Saidi, A., Z. Hajibarat and Z. Hajibarat. 2020. Identification of responsive genes and analysis of genes with bacterial-inducible cis-regulatory elements in the promoter regions in *Oryza sativa* L. *Acta agriculturae Slovenica*, 116(1): 115-123.
15. Saidi, A., Z. Hajibarat and Z. Hajibarat. 2021. Phylogeny, gene structure and GATA genes expression in different tissues of Solanaceae species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35: 102015.
16. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, 30: 2725-2729.
17. Van Aken, O., B. Zhang, S. Law, R. Narsai and J. Whelan. 2013. AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant physiology*, 162(1): 254-271.
18. Xie, Z., TM. Nolan, H. Jiang and Y. Yin. 2019. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 28(10): 228.
19. Xu, Z.S., M. Chen, L.C. Li and Y.Z. Ma. 2011. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53: 570-585. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01062.x.
20. Yang, F., F. Dong, Y. Liu, J. Chai, H. Zhao, M. Lv and S. Zhou. 2020. Genome-wide identification and expression analysis of the calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genetics*, 21(1): 1-10.

Structure and Gene Expression of *NFX* Gene Family in Developmental Stages in Barley, Wheat and Maize

Zohreh Hajibarat¹ and Abbas Saidi²

1- Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, (Corresponding author: abbas.saidi@gmail.com)

Received: 21 Jun, 2021 Accepted: 19 December 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: NFXL1 and NFXL2 proteins have NF-X1 type zinc fingers domains, DNA binding, and PHD finger motifs, which potentially mediate its protein interactions. *NF-X* genes play an important role in response to defense signaling using plant hormones.

Material and Methods: In this study, 12 *NF-X* genes were selected in barley, maize and wheat. The gene structures, duplication patterns, phylogenetic tree, developmental of the 12 *NF-X* transcription factors in nine species were analyzed to further investigate the functions of these factors. In the present study, a comparative analysis was performed to identify orthologs and paralogues of *NF-X* in the genomes of maize, barley and wheat.

Results: The phylogenetic tree of *NF-X* from *H.vulgare* and *Z.mays* revealed two groups based on their homology and the exon numbers of *NF-X* genes, ranging from 1 to 13. According to the synteny analysis, *NF-X* genes of barley, maize and wheat revealed high similarity, which *TaNFXL1.2* with *HvNFXL1*; *HvNFXL2* with *TaNFXL1.3*, *TaNFXL2*, *TaNFXL2.1*; *TaNFXL1* with *TaNFXL1.1*, *TaNFXL1.3*; *ZmNFXL1* with *ZmNFXL1.1* genes revealed similarity more than %90. Prediction cis-elements showed that NF-YB; NF-YA; NF-YC, bHLH, myb/SANT, WRKY, Dof, and Trihelix had maximum frequency in the promoter region of *NF-X* genes. The *HvNF-X2*, *ZmNF-X2* and *TaNF-X2* genes had the highest number of cis-elements. Analysis of *NF-X* genes showed that tandem duplication and segmental duplication play an important role in the development of barley, maize and wheat genomes. *NF-X* gene expression analysis showed that these genes were up-regulated in almost all developmental stages. However, the number of tandem and segmental duplication showed that these factors are major factors in the evolution of *NF-X* genes. Since this is the first study to compare *NF-X* genes in three species, our findings could be considered as useful source for future *NF-X* genes studies in comparative studies among different plant species.

Conclusion: The aim of this study was to identify and characterize *NF-X* genes in nine species via *in silico* genome-wide analysis approach. *HvNFX1*, *HvNF-X2*, and *ZmNFXL1.1* genes showed that gene expression in all development stages. The gene structure in most proteins in each group was similar, which validated the *NF-X* transcription factors phylogenetic classification.

Keywords: Developmental stages, Gene structure, *NF-X* transcription factor, Synteny analysis, Zn-domain