Archive of SID

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره سوم، پائیز ۱۳۹۹
۹۱۵-۹۲۴
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2225.1571

مقاله پژوهشی

بررسی نقش احتمالی BAX Inhibitor 1 در تحمل به شوری با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی

زهرا زینتی[۱]، عباس عالم‌زاده[۲*]، علی نیازی[۳]، اسماعیل ابراهیمی[۳]
۱. استادیار بخش اگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب
۲. دانشیار بخش زراعت و اصلاح نبات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۳. استاد مرکز بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۱

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد گیاهان زراعی در سراسر جهان است. مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده نقش مهمی در سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. درک مبانی مولکولی مکانیسم این فرآیند، امکان دستورزی ژنتیکی هدفمند گیاهان در جهت تحمل به تنش‌های محیطی را فراهم می‌کند. یک تنظیم‌کننده کاندید برای چنین مکانیسمی BAX Inhibitor 1 است. در این پژوهش، نقش احتمالی ژن رمز کننده BAX Inhibitor 1-like protein در تحمل به تنش شوری با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی از قبیل آنالیز پروموتر و شبکه تنظیمی ژنی و همچنین بررسی بیان نسبی ژن در شاخساره رقم مقاوم ارگ، رقم حساس الموت و خویشاوند وحشی *Aegilops crassa* با استفاده از Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفته است. با توجه به آنالیز شبکه تنظیمی، احتمالاً این ژن در بالادست مسیر پیام‌رسانی SOS عمل می‌کند. بر اساس آنالیز پروموتر وجود موتیف‌های پاسخ به تنش ازجمله موتیف‌های ABRE (پاسخ‌دهنده به آبسیزیک اسید)، LTR (پاسخ‌دهنده به دمای پایین)، MBS (پاسخ‌دهنده به خشکی)، CGTCA-motif (پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات)، TGACG-motif (پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات)، ERE (پاسخ‌دهنده به اتیلن) و GT-1 motif (عنصر پاسخ به شوری) تائیدی بر نقش این ژن در تنش‌های مختلف محیطی ازجمله شوری است. همچنین الگوی بیان ژن موردمطالعه تحت تنش شوری بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس اختلاف معنی‌داری داشت. درمجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ژن رمز کننده این پروتئین می‌تواند در القای تحمل به شوری در گندم نقش داشته باشد و جهت دستورزی ژنتیکی با هدف بهبود تحمل به تنش مورداستفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: **پروموتر، تنش شوری، شبکه تنظیمی، گندم، BAX Inhibitor 1-like protein.**

مقدمه

مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده[۱]، فرایند خودکشی حفاظت‌شده سلولی است که به‌صورت ژنتیکی کنترل می‌شود و نقش مهمی در بقا، نمو و سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند (Huckelhoven, 2004; Duan et al., 2010). تنش‌های متنوع محیطی مانند تنش شوری، خشکی و مواد مغذی قادرند مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده را در سلول‌های مریستم انتهایی ریشه القا کنند (Huh et al., 2002; Liu et al., 2009). مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در مرگ نوک ریشه در ذرت و نخودفرنگی که در معرض تنش غرقابی قرار دارند مؤثر است (Subbaiah and Sachs, 2003). درک مبانی مولکولی چگونگی القای PCD امکان دستورزی مکانیسم مرگ سلولی جهت بهبود تحمل به تنش زیستی و غیر زیستی را فراهم

[1] Programmed cell death (PCD)

* نگارنده پاسخگو: عباس عالم‌زاده. پست الکترونیک: alemzadeh@shirazu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

می‌سازد (Watanabe and Lam, 2009). یک تنظیم‌کننده کاندید برای چنین مکانیسمی BAX Inhibitor 1(BI-1) است (Watanabe and Lam, 2006; Xu et al., 2017). این پروتئین یک پروتئین حفاظت‌شده ازنظر تکاملی است که در غشای شبکه آندوپلاسمی (ER) قرار دارد و PCD را در یوکاریوت‌ها کنترل می‌کند. پروتئین BI-1 نقش مهمی در مسیر حفاظت‌شده پاسخ به تنش ER دارد و مرگ سلولی که توسط سیگنال‌های مرگ القا شده است را تغییر می‌دهد. شبکه آندوپلاسمی یک مکان حفاظت‌شده است که سیگنال-های مرگ سلولی در آن به شکل ROS تشکیل می‌شوند (Watanabe and Lam, 2009). ROSها به‌عنوان پیام‌رسان در پاسخ به تنش‌ها عمل می‌کنند. همچنین ROSها در عملکردهای سلولی مانند مرگ سلولی نقش دارند (Jin and Reed, 2002; Greenberg and Yao, 2004; Frohlich et al., 2007; Lam, 2008).

کارکرد BI-1 با فعالیت سلولی مرتبط با ER مانند کنترل هموستازی در ارتباط است (Chae et al., 2004). بررسی توپولوژی BI-1 نشان می‌دهد که احتمالاً این پروتئین به‌عنوان یک ترانسپورتر یونی یا ترانسپورتر دیگر مولکول‌ها عمل می‌کند (Watanabe and Lam, 2009). گزارش شده است که BI-1 نوترکیب انسانی در pH 5 تا ۶/۵، مانند آنتی-پورتر Ca^{2+}/H^{+}، عمل می‌کند (Ahn et al., 2009). در مطالعه دیگر نشان داده شد که BI-1 از طریق اتصال غیرمستقیم به NPR[1] فعالیت cytochrome P450 2E1 را تنظیم می‌کند و بدین طریق تجمع ROS که در اثر تنش ER القا می‌شود، تعدیل می‌کند (Kim et al., 2009). قطع جریان الکترون بین cytochrome p450 و NPR منبع اصلی ROS در ER است؛ بنابراین تعدیل جریان الکترون از NPR به P4502E1 توسط BI-1 باعث کاهش ROS و درنتیجه کاهش پروتئین‌های تا نخورده و پروتئین‌های با تاخوردگی ناصحیح و درنهایت کاهش مرگ سلولی می‌شود (Watanabe and Lam, 2009). ازآنجاکه بیان AtBI-1 از طریق مسیر پاسخ پروتئین‌های تانخورده (UPR[2]) قبل از القای مرگ سلولی توسط القاکننده‌های تنش ER، القا می-شود میزان BI-1 می‌تواند یک عامل تعیین‌کننده مهم برای بقای گیاه در شرایط تنش ER در گیاهان آرابیدوپسیس باشد (Watanabe and Lam, 2009). تحت شرایط تنش اختلالاتی در شبکه آندوپلاسمی رخ می‌دهد و سبب تجمع پروتئین‌های تانخورده در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. این وضعیت (تنش شبکه آندوپلاسمی) منجر به راه‌اندازی مسیری کاملاً حفاظت‌شده تحت عنوان پاسخ پروتئین‌های تانخورده می‌شود. در صورت تشدید تنش شبکه آندوپلاسمی، مسیر PCD فعال می‌گردد (Ozgur et al., 2018; Cai et al., 2014). در حقیقت PCD ناشی از ER می‌تواند توسط تخریب AtBI-1 و افزایش بیان AtBI-1 به ترتیب تسریع و جلوگیری شود (Watanabe and Lam, 2008). بیان بالای BI-1 از مرگ سلولی میانجی شده توسط BAX، در توتون (Lacomme and Santa Cruz, 1999) و آرابیدوپسیس (Kawai-Yamada et al., 2004) جلوگیری کرده است.

در گیاهان، BI-1 نقش اصلی در تنظیم هموستازی Ca^{2+} در ER در طول PCD ناشی از BAX دارد (Watanabe and Lam, 2009). Ca^{2+} یک پیام‌رسان عمومی درون‌سلولی است که طیف وسیعی از فرایندهای سلولی در گیاهان را کنترل می‌کند ولی تعداد کمی از ژن‌ها که مستقیماً عامل کنترل مرگ سلولی گیاه هستند با کلسیم مرتبط هستند (Ma and Berkowitz, 2007).

گزارش‌های متعددی در رابطه با نقش این پروتئین در جلوگیری از مرگ سلولی توسط تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارد. در پژوهشی که توسط ونگ و همکاران (Wang et al., 2012) انجام شد به‌منظور بررسی تأثیر تنش‌های غیر زیستی بر بیان ژن TaBI-1، گیاهچه‌ها توسط پلی‌اتیلن گلایکول (تنش کم‌آبی)، NaCl (تنش اسمزی) و زخم تیمار شدند. سطح رونوشت TaBI-1 در تیمارهای پلی‌اتیلن گلایکول و NaCl به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ولی این افزایش در تیمار زخم معنی‌دار نبود. بررسی الگوی بیان ژن BI_85 در ارقام متحمل و حساس گندم نان و خویشاوند وحشی *Aegilops crassa* تحت تنش شوری نشان داد که بیان ژن BI_85 در بافت ریشه *Ae. crassa* نسبت به ارقام زراعی متحمل و حساس به شوری به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (Zinati et al., 2014).

درک مبانی مولکولی مکانیسم PCD امکان دستورزی ژنتیکی هدفمند در جهت تحمل به تنش زیستی و غیر زیستی را فراهم می‌کند. در این پژوهش با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی از قبیل آنالیز پروموتر و شبکه ژنی و همچنین

[1] NADPH-dependent cytochrome c P450 oxidoreductase

[2] Unfolded Protein Response

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی بیان نسبی ژن BI_85 (رمز کننده BAX Inhibitor 1-like protein) با شماره دستیابی ADK66978 در شاخساره رقم مقاوم ارگ، رقم حساس الموت و خویشاوند وحشی *Ae. crassa* با استفاده از Real-time PCR، نقش احتمالی ژن BI_85 در تحمل به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی عناصر تنظیم‌کننده سیس[1] در پروموتر ژن BI_85

ازآنجاکه بانک اطلاعاتی برای شناسایی پروموتر در گندم وجود ندارد جهت بررسی پروموتر این ژن در گندم از همولوگ آن در برنج (LOC_Os02g03280) استفاده شد. با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Phytozome (http://www.phytozome.net)، توالی مربوط به ۲۰۰۰ bp بالادست ناحیه UTR'۵ به‌عنوان پروموتر دریافت شد. سپس به‌منظور شناسایی عناصر تنظیم‌کننده سیس در پروموتر این ژن، از سایت PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) (Higo et al., 1999) و PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html) (Lescot et al., 2002) استفاده شد. بدین منظور توالی پروموتر ژن موردنظر در پایگاه‌های اطلاعاتی PLACE و PlantCARE وارد شد و عناصر تنظیمی موجود در پروموتر و عملکرد آن‌ها شناسایی گردید. در حال حاضر پایگاه اطلاعاتی PLACE و PlantCARE به ترتیب دارای ۴۴۹ و ۴۳۵ عنصر تنظیمی می‌باشند.

شبکه تنظیمی ژنی

شبکه تنظیمی با استفاده از پایگاه داده‌ی گیاهی RESNET نرم‌افزار pathway studio V.7 ساخته شد. بدین منظور نام ژن موردنظر وارد نرم‌افزار pathway studio V.7 شده و پایگاه داده گیاهی RESNET موجود در این نرم‌افزار برای ترسیم شبکه انتخاب گردید. سپس ژن‌های دارای P-value کمتر از ۰/۰۵ برای ترسیم شبکه در نظر گرفته شدند. این نرم‌افزار تصویر روشنی از ارتباطات عملکردی بین ژن‌ها، تنش‌ها و مکانیسم‌های سلولی را فراهم می‌سازد (Hosseinpour et al., 2012).

اعمال تنش شوری، نمونه‌برداری و تهیه cDNA

به‌منظور ارزیابی بیان ژن BI_85 تحت شرایط تنش شوری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل شوری (بدون تنش و تنش ۱۵۰ mM کلرید سدیم)، ژنوتیپ (رقم الموت (حساس به شوری)، ارگ (متحمل به شوری) و یک خویشاوند وحشی (*Ae. crassa*) و سه زمان تنش (زمان تنش، ۱۲ ساعت پس از تنش و ۳ هفته پس از تنش) بودند. بر اساس پژوهش‌های پیشین (Liu et al., 2002; Asadi et al., 2012, Niazi et al., 2014)، رقم ارگ و *Ae. crassa* به‌عنوان مقاوم به شوری و رقم الموت حساس به شوری در نظر گرفته شد. در این پژوهش از محیط کشت مایع هوگلند با غلظت عناصر غذایی نصف شده (Kerepesi and Galiba, 2000) استفاده شد. نمونه‌برداری از بافت شاخساره گیاهچه‌های ۲۱ روزه تحت تنش شوری انجام گرفت. در مرحله بعد، استخراج RNA و سنتز cDNA و واکنش Real-time PCR به ترتیب توسط کیت RNA column isolation kit (دنازیست، S-1020-1)، First Strand cDNA Synthesis Kit (فرمنتاز، EP0441) و SYBR PCR kit PrimeScript RT- (تاکارا، RR820W) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

طراحی آغازگر و واکنش Real-time PCR

به‌منظور انجام واکنش Real time PCR، آغازگرهای ژن BI_85 و ژن اکتین به‌عنوان کنترل داخلی با استفاده از نرم‌افزار AlleleID نسخه ۶ طراحی شدند (جدول ۱). برای بررسی بیان ژن موردنظر با روش Real-time PCR عمل تکثیر با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مواد مورداستفاده در واکنش Real-time PCR شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط SYBR Green PCR Master Mix، ۰/۵ µM از هر آغازگر، یک میکرولیتر از cDNA به‌عنوان رشته الگو و ۸ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه واکنش شامل ۹۴ °C به مدت ۲ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه با ۹۴ °C برای ۱۰ ثانیه، ۵۱/۳ °C برای ۱۵ ثانیه و ۷۲ °C برای ۳۰ ثانیه بود. پس از پایان واکنش جهت بررسی اختصاصی بودن واکنش از منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵

[1] Cis regulatory elements

www.SID.ir

Archive of SID

درجه برای هر چرخه و دمای ۹۵ °C-۵۰ استفاده شد. واکنش Real-time PCR با دستگاه Bioer ساخت کشور چین انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی عناصر تنظیم‌کننده سیس در پروموتر ژن BI_85

عناصر تنظیم‌کننده سیس در الگوی بیان ژن‌ها و پاسخ به تنش نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Wittkopp et al., 2011). آنالیز پروموتر به‌منظور شناسایی عناصر تنظیم‌کننده سیس نشان داد که موتیف‌های ABRE (پاسخ‌دهنده به آبسیزیک اسید)، LTR (پاسخ‌دهنده به دمای پایین)، MBS (پاسخ‌دهنده به خشکی)، CGTCA-motif (پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات)، TGACG-motif (پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات)، ERE (پاسخ‌دهنده به اتیلن)، GT-1 motif (عنصر پاسخ به شوری) در پروموتر این ژن وجود دارد (جدول ۲). این موتیف‌ها، موتیف‌های مهمی برای ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیر زیستی به‌حساب می‌آیند. وجود این موتیف‌ها تائیدی بر نقش این ژن در تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی است. آنالیز پروموتر به‌منظور اطمینان از تأثیرپذیری آن‌ها تحت تنش شوری، علاوه بر موتیف پاسخ به شوری (GT-1 motif) چندین موتیف پاسخ‌دهنده به تنش همچون پاسخ‌دهنده به آبسزیک‌اسید، هورمون جاسمونات، دمای کم و خشکی را نشان داد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورداستفاده در Real time PCR، دمای اتصال آغازگرها، طول قطعه تکثیرشده.

Table 1. Sequences of primers used in Real time PCR, Annealing temperatures and amplicon length

نام ژن Gene name	طول قطعه تکثیرشده Amplicon length	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	توالی آغازگر Sequence	نام آغازگر Primer name
Actin	351(bp)	57	TATGCCAGCGGGCGAACAAC	Actin F
			GGAACAGCACCTCAGGGCAC	Actin R
BI_85	111 (bp)	51.3	GAGGAGAGGAAGAGGTTTGG	BAX Inhibitor F
			TGTCACGAGGATGCTTGG	BAX Inhibitor R

بررسی شبکه ژنی BI-1 با استفاده از Pathway studio

با توجه به شبکه مربوط به BI-1 (شکل ۱)، مشخص شد TED4 با BI-1 ارتباط دارد. گزارش شده است که (TED4) heme oxygenase 1 در مسیر انتقال پیام سازگاری به شوری مؤثر است (Xie et al., 2011). افزایش بیان ژن BI-1 منجر به افزایش بیان ژن رمز کننده Thioredoxin می‌شود (Chandran et al., 2009). از طرف دیگر Thioredoxin با پراکسیداز و تیول پراکسیداز برهمکنش دارد (Vignols et al., 2005) و می‌تواند از صدمه تنش اکسیداتیو جلوگیری کند (Finkemeier et al., 2005; Cazalis et al., 2006). افزون بر این، بررسی شبکه نشان داد که ژن BI-1 با یون کلسیم ارتباط دارد. همچنین احتمال دارد که پروتئین BI-1 به‌عنوان منفذ یا کانال یونی در غشای آندوپلاسمی برای کنترل کلسیم استفاده شود. افزایش Ca^{2+} سیتوپلاسمی در شناخته‌شده‌ترین مسیر پیام‌رسانی مختص تنش شوری (مسیر SOS) مؤثر است.

افزون بر این، بررسی شبکه نشان داد که ژن BI-1 با یون کلسیم ارتباط دارد. همچنین این احتمال وجود دارد که پروتئین BI-1 به‌عنوان منفذ یا کانال یونی در غشای آندوپلاسمی برای کنترل کلسیم استفاده شود. افزایش Ca^{2+} سیتوپلاسمی در شناخته‌شده‌ترین مسیر پیام‌رسانی مختص تنش شوری (مسیر SOS) مؤثر است. در این مسیر افزایش Ca^{2+} توسط CBL4[1] (SOS3) درک می‌شود. CBL4 با CIPK24 (SOS2) برهمکنش می‌دهد. کمپلکس CBL4/CIPK24[2] (SOS3/SOS2) از طریق زنجیره اسید چرب myristoyl که به‌صورت کووالانسی به SOS3/SOS2 متصل شده است به‌سوی غشای پلاسمایی هدایت می‌شود و آنتی‌پورتر Na^+/H^+ (SOS1) متصل شده به غشای سلولی را با فسفریله کردن فعال می‌سازد (Ji et al., 2013). با توجه

[1] Cycle threshold

[2] CBL-interacting protein kinase

www.SID.ir

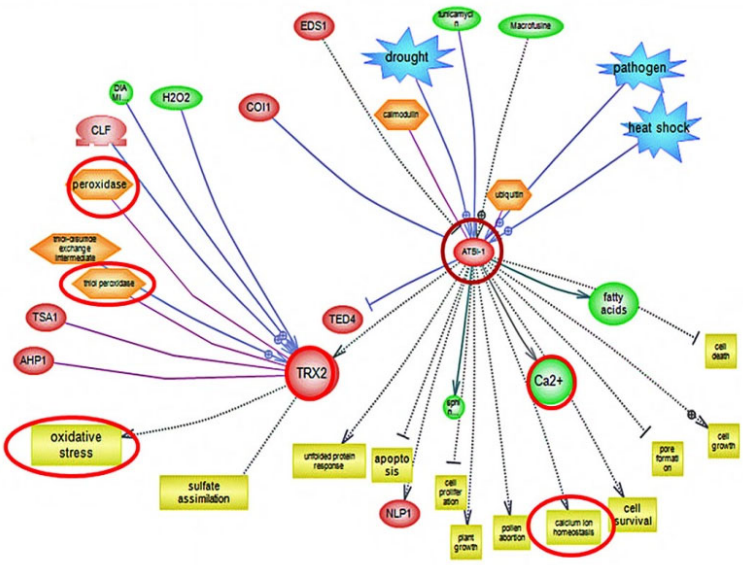
Archive of SID

به گزارش‌های پیشین و نتایج پژوهش حاضر احتمالاً این ژن
در بالادست مسیر سیگنالینگ SOS عمل می‌کند.

جدول ۲. نام، کارکرد و تعداد عناصر تنظیمی سیس موجود در پروموتر ژن رمز کننده BAX Inhibitor 1-like protein

Table 2. The name, function, and number of cis acting elements present at the promoter of the gene encoding BAX Inhibitor 1-like protein

عناصر تنظیمی سیس Cis acting elements	کارکرد function	تعداد number
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	8
AE-box	part of a module for light response	1
Box 4	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	3
Box II	part of a light responsive element	2
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2
G-Box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	2
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	11
GC-motif	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility	1
Gap-box	part of a light responsive element	1
LTR	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness	1
MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility	2
Pc-CMA2c	part of a light responsive element	1
Sp1	light responsive element	1
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2
ERE	ethylene-responsive element	2
GT-1 motif	salt responsive element	1

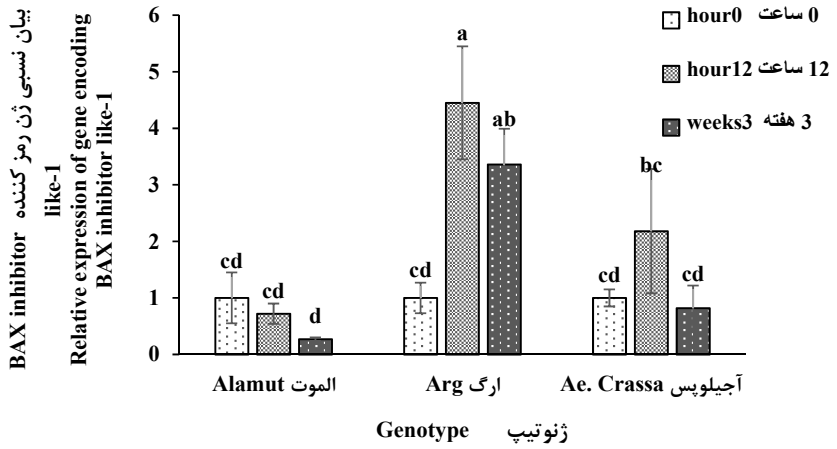


شکل ۱. شبکه تنظیمی BI-1 با استفاده از pathway studio.

Fig. 1. Regulatory network of *BI-1* using pathway studio V.7

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. بیان نسبی ژن BI_85 (ژن رمز کننده BAX Inhibitor 1-like protein) در تنش شوری در شاخساره ژنوتیپ‌های زراعی ارگ و الموت و خویشاوند وحشی *Ae. Crassa* در زمان‌های مختلف صفر، ۱۲ ساعت و ۳ هفته پس از اعمال تنش شوری. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

Fig. 2. Relative expression of BI_85 (gene encoding BAX Inhibitor 1- like protein) at different times (0, 12 hours, and 3 weeks) after applying salinity treatment in Arg (resistant cultivar), Alamout (sensitive cultivar), *Ae. crassa* (wild relative) shoots. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test (P < 0.05)

یون کلسیم درون‌سلولی بسته به میزان غلظتش دو نقش دارد و می‌تواند منجر به بقای سلول یا مرگ سلول شود (Hajnoczky et al., 2003). این احتمال وجود دارد که پروتئین BAX Inhibitor به‌عنوان منفذ یا کانال یونی در غشای آندوپلاسمی برای کنترل میزان کلسیم استفاده شود (Xu and Reed, 1998; Chae et al., 2004). شواهد نشان می‌دهد که شبکه آندوپلاسمی در شروع آپوپتوسیس القایی توسط انتقال پیام ناقص Ca^{2+} و پاسخ پروتئین‌های تا نخورده[1]، نقش دارد (Kaufman, 1999; Patil and Walter, 2001; Demaurex and Distelhorst, 2003). BAX Inhibitor یک پروتئین حفاظت‌شده در شبکه آندوپلاسمی است که از مرگ سلولی در سلول‌های جانوری و گیاهی جلوگیری می‌کند (Chae et al., 2004).

بررسی بیان نسبی ژن BI_85 در شاخساره رقم مقاوم ارگ، رقم حساس الموت و خویشاوند وحشی

تغییر بیان ژن BI-1 در گیاهان مختلف و شرایط مختلف گزارش شده است. طی تحقیقاتی که روی همولوگ‌های مختلف این ژن در گیاهان مختلف انجام شده است مشخص شده که بیان این ژن در تنش‌های مختلف افزایش می‌یابد (Sanchez et al., 2000; Matsumura et al., 2003; Huckelhoven et al., 2003; Eichmann et al., 2004; Babaeizad et al., 2009; Isbat et al., 2009; Duan et al., 2010). پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن BI_85 در شاخساره ژنوتیپ‌های زراعی و خویشاوند وحشی گندم تحت تنش شوری با استفاده از Real-time PCR انجام شد. بر اساس نتایج آنالیز بیان ژن موردنظر مشخص شد که در ژنوتیپ الموت که حساس به شوری می‌باشد. بیان نسبی ژن BI_85 در شاخساره کمتر از دو ژنوتیپ دیگر بوده است. همچنین در شاخساره رقم حساس الموت تحت تنش شوری یک روند کاهشی در بیان ژن مشاهده شد ولی در شاخساره‌های رقم مقاوم ارگ و خویشاوند وحشی میزان بیان این ژن تحت تنش شوری افزایش یافت. همچنین ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری افزایش بیان ژن BI_85 در شاخساره رقم مقاوم زراعی ارگ بیشتر از شاخساره خویشاوند وحشی بود (شکل ۲).

بیان ژن BI_85، ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری در شاخساره رقم مقاوم ارگ و خویشاوند وحشی *Ae. crassa* افزایش یافت درحالی‌که در رقم حساس (الموت) کاهش یافت. درمجموع، با بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به شوری تحت تنش شوری مشخص شد که تعداد رونوشت‌های

[1] CBL-interacting protein kinase

www.SID.ir

Archive of SID

ژن BI_85 در شاخساره ژنوتیپ‌های مقاوم (ارگ و *Ae. Crassa*) به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از تعداد رونوشت آن در رقم حساس (الموت) بود. به عبارتی الگوی معکوس بیان ژن BI_85 در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس می‌تواند بیانگر درگیری این ژن در تحمل به شوری باشد و منجر به عملکرد بهتر ژنوتیپ‌های مقاوم در مقابله با تنش شوند. با توجه به نقش کلیدی ژن BI-1 در تنظیم تعداد زیادی از ژن‌های مؤثر در تحمل به شوری ازجمله TED4 (Xie et al., 2011)، Thioredoxin (Chandran et al., 2009)، پراکسیداز، تیول پراکسیداز (Vignols et al., 2005) و همچنین برهمکنش با کلسیم (Xu and Reed, 1998; Chae et al., 2004) به نظر می‌رسد که این ژن هدف مناسبی برای مهندسی ژنتیک جهت افزایش تحمل به شوری باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

شوری همه‌ساله خسارات قابل‌توجهی را به چرخه تولید کشور تحمیل می‌کند. گرچه گیاهان توانایی ذاتی برای مقابله با شوری را دارند اما ازنظر تحمل به شوری بسیار متفاوت‌اند و برخی از آن‌ها توانایی بسیار کمی در مبارزه با تنش شوری را دارند. هرچند روش‌های سنتی اصلاح گیاهان برای غلبه بر کاهش محصولات گیاهی در اثر تنش شوری زیاد بوده‌اند، اما شناسایی و معرفی ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش و انتقال آن‌ها از طریق مهندسی ژنتیک، روش سریع و مطلوبی برای بهبود تحمل به تنش است. در این راستا فهم مکانیسم‌ها و مسیرها و ژن‌های مرتبط با PCD می‌تواند به بهبود تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی کمک کند. درمجموع بر اساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی و مولکولی ژن BI_85 چنین نتیجه‌گیری می‌شود که این ژن می‌تواند در القای تحمل به شوری در گندم نقش داشته باشد و جهت دستورزی ژنتیکی با هدف بهبود تحمل به تنش مورداستفاده قرار گیرد.

قدردانی

هزینه‌های این تحقیق توسط دانشگاه شیراز پرداخت شده است که موجب تشکر و قدردانی است.

منابع

Ahn, T., Yun, C.H., Chae, H.Z., Kim, H.R., Chae, H.J., 2009. Ca^{2+}/H^{+} antiporter-like activity of human recombinant Bax inhibitor-1 reconstituted into liposomes. The FEBS Journal. 276, 2285-2291.

Asadi, M., Mohammadi-Nejad, G., Golkar, P., Naghavi, H., Nakhoda, B. 2012. Assessment of salinity tolerance of different promising lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Advances in Applied Science Research. 3, 1 117-1121.

Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K.H., Eichmann, R., Huckelhoven, R., 2009. Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theoretical and Applied Genetics. 118, 455-463.

Cai, Y.M., Yu, J., Gallois, P., 2014. Endoplasmic reticulum stress-induced PCD and caspase-like activities involved. Frontiers in Plant Science, 5, 41.

Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Perez-Ruiz, J.M., Cejudo, F.J., 2006. Cloning and characterization of three Thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. Journal of Experimental Botany. 57, 2165-2172.

Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton, S.A., Reed, J.C., 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. Mollecular Cell. 15, 355-366.

Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton S.A., Reed J.C., 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. Mollecular Cell. 15, 355-366.

Chandran, D., Tai, Y.C., Hather, G., Dewdney, J., Denoux, C., Burgess, D.G., Ausubel, F.M., Speed, T.P., Wildermuth, M.C., 2009. Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and

www.SID.ir

Archive of SID

regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on Arabidopsis. Plant Physiology. 149, 1435-1451.

Demaurex, N., Distelhorst, C., 2003. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. Science. 300, 65-67.

Duan, Y., Zhang, W., Li, B., Wang, Y., K. Li, Sodmergen, Han, C., Zhang Y., Li, X., 2010. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in Arabidopsis. The New Phytologist. 186, 681-695.

Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.H., Huckelhoven, R., 2004. The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. tritici. Molecular Plant- Microbe Interaction: MPMI. 17, 484-490.

Finkemeier, I., Goodman, M., Lamkemeyer, P., Kandlbinder, A., Sweetlove, L.J., Dietz, K.J., 2005. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of Arabidopsis thaliana under stress. The Journal of Biological Chemistry. 280, 12168-12180.

Frohlich, K.U., Fussi H., Ruckenstuhl, C., 2007. Yeast apoptosis from genes to pathways. Seminars in Cancer Biology. 17, 112-121.

Greenberg, J.T., Yao, N., 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology. 6, 201-211.

Hajnoczky, G., Davies, E., Madesh, M., 2003. Calcium signaling and apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communication. 304, 445-454.

Higo, k., Ugawa, Y., Lwamoto, M., Korenaga, T., 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. Nucleic Acids Research. 27, 297–300.

Hosseinpour, B, Hajihoseini, V., Kashfi, R., Ebrahimi, E., Hemmatzadeh, F., 2012. Protein interaction network of *Arabidopsis thaliana* female gametophyte development identifies novel proteins and relations. Plos One. 7, e49931.

Huckelhoven, R., 2004. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. Apoptosis. 9, 299-307.

Huckelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K.H., 2003. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (US). 100, 5555-5560.

Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology. 29, 649-659.

Isbat, M., Zeba, N., Kim, S.R., Hong, C.B., 2009. A BAX inhibitor-1 gene in Capsicum annuum is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology. 166, 1685-1693.

Ji, H., Pardo, J.M., Batelli, G., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., Li, X., 2013. The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Molecular Plant. 6, 275-86.

Jin, C., Reed, J.C., 2002. Yeast and apoptosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 3, 453-459.

Kawai-Yamada, M., Ohori Y., Uchimiya, H., 2004. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. Plant Cell. 16, 21-32.

Kerepesi I, Galiba, G., 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science. 40, 482-487.

Kim, H.R., Lee, G.H., Cho, E.Y., Chae, S.W., Ahn, T., Chae, H.J., 2009. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. Journal of Cell Science. 122, 1126-1133.

Lacomme, C., Santa Cruz, S., 1999. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (US). 96, 7956-7961.

Lam, E., 2008. Programmed cell death in plants: Orchestrating an intrinsic suicide program within walls. Critical Reviews in Plant Science. 27, 134-423.

www.SID.ir

Archive of SID

Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., et al., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research. 30, 325–327.

Liu, C.G., Wu, Y.W., Hou, H., Zhang, C., Zhang, Y., 2002. Value and utilization of alloplasmic common wheats with *Aegilops crassa* cytoplasm. Plant Breeding. 121, 407–410.

Liu, Y., Xiong Y., Bassham D.C., 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. Autophagy. 5, 954-963.

Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Terauchi, R., 2003. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. The Plant Journal: for cell and molecular biology. 33, 425-434.

Niazi, A., Ramezani, A., Dinari, A., 2014. GSTF1 gene expression analysis in cultivated wheat plants under salinity and ABA treatments. Molecular cellular Biology Research Communications. 3, 9-19.

Ozgur, R., Uzilday, B., Iwata, Y., Koizumi, N., Turkan, I., 2018. Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: a dynamic duo. Journal of Experimental Botany. 69, 3333–3345.

Patil, C., Walter, P., 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. Current Opinion Cell Biology. 13, 349-355.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 29(9), e45.

Sanchez, P., de Torres Zabala, M., Grant, M., 2000. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology. 21, 393-399.

Subbaiah, C.C., Sachs, M.M., 2003. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. Annals of Botany. 119-127.

Vignols, F., Brehelin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., Meyer, Y., 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (US). 102, 16729-16734.

Wang, X., Tang, C., Huang, X., Li, F., Chen, X., Zhang, G., Sun, Y., Han, D., Kang, Z., 2012. Wheat BAX inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. Journal of Experimental Botany. 63, 4571-4584.

Watanabe, N., Lam, E., 2006. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. The Plant Journal. 45, 884-94.

Watanabe, N., Lam, E., 2008. BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis. The Journal of Biological Chemistry. 283, 3200-3210.

Watanabe, N., Lam, E., 2009. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. International Journal of Molecular of Science. 10, 3149-3167.

Wittkopp, P. J., Kalay, G., 2011. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. Nature Reviews Genetics. 13, 59-69.

Xie, Y.J., Xu, S., Han, B., Wu, M.Z., Yuan, X.X., Han, Y., Gu, Q., Xu, D.K., Yang, Q., Shen, W.B., 2011. Evidence of Arabidopsis salt acclimation induced by up-regulation of HY1 and the regulatory role of RbohD-derived reactive oxygen species synthesis. The Plant Journal: for cell and molecular biology. 66, 280-292.

Xu, G., Wang, S., Han, S., Xie, K., Wang, Y., Li, J., Liu, Y., 2017. Plant Bax Inhibitor-1 interacts with ATG6 to regulate autophagy and programmed cell death. Autophagy. 13, 1161-1175.

Xu, Q., Reed, J.C., 1998. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. Molecular Cell. 1, 337-346.

Zinati, Z., Alemzadeh, A., Ebrahimie, E., Niazi, A., 2014. Study of expression pattern analysis of BI-85 gene in tolerant and sensitive bread wheat cultivars and wild relative *Aegilops crassa* under salt stress. Genetics Novin. 9, 373-379. [In Persian with English Summary].

www.SID.ir

Archive of SID

University of Birjand

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences
Vol. 13, No. 3, p. 915-924
Fall 2020
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2225.1571

Original article

Dissecting the potential role of BAX Inhibitor 1 in salt tolerance using bioinformatics and experimental tools

Z. Zinati[1], A. Alemzadeh[2*], A. Niazi[3], E. Ebrahimi[3]

1. Assistant Professor of Plant Breeding, Agroecology Department, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Darab, Iran
2. Associate Professor of Molecular Biotechnology, Department of Crop Production and Plant Breeding, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Professor of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Center of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received 23 January 2019; Accepted 12 March 2019

Abstract

Salinity stress is one of the most important factors causing yield loss in crop worldwide. Programmed cell death plays an important role in adapting to environmental stress. Understanding the molecular basis of PCD mechanism makes possible genetically manipulation of plants to improve environmental stress tolerance. BAX Inhibitor 1 is a candidate for this purpose. In this study, the potential role of a gene which encodes BAX Inhibitor 1-like protein (BI_85) in salt tolerance was evaluated using bioinformatics tools such as promoter and gene regulatory network analysis, as well as relative expression of BI_85 in susceptible (Alamut) and salt resistant (Arg) cultivars and a wild relative *Aegilops crassa*, by Real-time PCR. According to the regulatory network, this gene may act upstream of the SOS signaling pathway. According to promoter analysis, the presence of stress-responsive regulatory elements such as ABRE (abscisic acid responsive element), LTR (low-temperature responsive element), MBS (MYB binding site involved in drought-inducibility), CGTCA-motif (MeJA-responsive element), TGACG-motif (MeJA- responsive element), ERE (ethylene-responsive element), and GT-1 motif (salt responsive element) in the promoter confirms the role of this gene in environmental stresses tolerance including salinity. It was also figured out that the expression patterns of BI_85 was significantly different between susceptible and salt resistant cultivars in response to salt stress. Overall, it can be concluded that BI_85 can contribute to salt tolerance in wheat and can be used for genetic manipulation to improve tolerance to stress.

***Keywords*:** BAX Inhibitor 1, Promoter, Regulatory network, Salt stress, Wheat

www.SID.ir

*Correspondent author: Abas Alemzadeh; E-Mail: alemzadeh@shirazu.ac.ir.