



Investigation of *NAD(P)H oxidase* genes regulatory elements in wheat

Fatemeh Sohrabi¹ & Armin Saed-Moucheshi²

¹ Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

² Crop and Horticulture Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Kermanshah, Iran.

Corresponding author. E-mail: saedmoucheshi@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Climate changes and increase in severity and duration of abiotic stresses have considerably affected the crops', e.g. wheat's, productivity. Accordingly, evaluating the influences of environmental stresses at cellular and molecular level to distinguish regulatory and tolerance mechanisms in plants has become a priority in the world. In response to stress conditions plants employ altered mechanism including a rapid induction in production of reactive oxygen species (ROS) known as oxidative burst. ROS are helpful in a small amount and they are mostly used in cell signaling and as secondary messengers, but excessive accumulation of ROS under environmental stress disturbs the oxidation-reduction balance in the plant and causes oxidative stress. ROSs are normally produced in chloroplasts, mitochondria, peroxisomes in the cytoplasm, peroxidase and amine-oxidase in the plants' cell walls along with *NADP(H) oxidase* (NOX) family enzymes available in plants' cell membrane. *NADP(H) oxidase* genes play a very important role in plant response to environmental changes by regulating the transportation of electrons from NAD(P)H molecules to molecular oxygen and producing superoxide ion which further leads to create various types of ROS. This research was conducted aiming to investigate the promoter region of the gene encoding *NADP(H) oxidase* enzyme in wheat genome in order to find the effect of important regulatory elements on expression.

Materials and methods: The promoter region of genes and regulatory elements that are located within this region play an important role in the regulation of gene expression in plants under different conditions. In order to recognize the regulation of gene expression for *NAD(P)H oxidase* gene, the promoter region of the gene was investigated by using online tools. First, the sequence of the gene encoding this enzyme in wheat was downloaded using the NCBI site. Then, 1500 base pairs upstream from the transcription start point were assessed by using online tools in PlantEnsemble site. The promoter sequence was finally analyzed by PlantCare website to identify important regulatory elements with specific roles in gene expression.

Results: The results showed that a diverse set of regulatory elements involved in different biochemical pathways can affect the expression level of *NAD(P)H oxidase* gene in wheat. the most effective elements that were identified by promoter analysis were ABRE, TCA motif, TGACG motif, ARE, CCAAT-Box, skn-1-motif, circadian which their activities are regulated by some specific hormones and transcription factors.

Conclusion: The analysis showed that changes in environmental conditions have the ability to change *NAD(P)H oxidase* gene expression. Hormones and transcription factors each target specific regulatory elements in the gene promoter leading to change the level of enzyme expression. NADPH oxidase enzyme manages the production of superoxide ion leading to production of other types of ROSs in the plant. ABRE, TCA motif, TGACG motif, ARE, CCAAT-Box, skn-1-motif, circadian can be mentioned among the regulatory elements that were identified by promoter analysis and they are involved in the response pathways to abscisic acid, salicylic acid, and jasmonic acid hormones, anaerobic reaction pathways, response to drought through MYB transcription factors, plant endosperm pathway, and light reactions, respectively. According to scientific contexts, the expression of these elements can improve the response of the plant to harsh conditions and environmental stresses in different growth stages and are playing an important role in plants adaptation to changed environments.

Keywords: Gene expression, malondialdehyde, Plant stress, Zn application.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 23 Jul 2023, Revised: 09 Aug 2023, Accepted: 29 Aug 2023, Published online: 23 Sept 2023

Cite this article: Sohrabi, F. & Saed-Moucheshi, A. (2023). Investigation of *NAD(P)H oxidase* genes regulatory elements in wheat. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2(3), 288-300. DOI: [10.22126/cbb.2023.9631.1054](https://doi.org/10.22126/cbb.2023.9631.1054)



© The Author(s).

Publisher: Razi University

[10.22126/cbb.2023.9631.1054](https://doi.org/10.22126/cbb.2023.9631.1054)



بررسی عناصر تنظیم کننده ژن های *NAD(P)H oxidase* در گندم

فاطمه سهرابی^۱ و آرمین ساعدموچشی^۲✉

^۱ بخش بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

^۲ بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

✉ نویسنده مسئول. رایانامه: saedmoocheshi@gmail.com

چکیده

مقدمه: تغییرات آب و هوایی و افزایش شدت و مدت تنش های محیطی بر عملکرد و تولید جهانی اکثر گیاهان زراعی از جمله گندم تأثیر گذاشته است. بر این اساس بررسی اثر تنش های محیطی بر تغییرات سلولی در سطح ملکولی جهت تشخیص مکانیسم های تنظیمی و استفاده از آنها برای افزایش تحمل و مقاومت در گیاهان اهمیت ویژه ای پیدا کرده است. گیاهان برای مقابله با تنش های محیطی راه کارهای مختلفی از جمله تولید سریع گونه های فعال اکسیژن (ROS) که به عنوان انفجار اکسیدی معروف است، بهره می گیرند. گونه های فعال در مقدار اندک به عنوان پیام رسان های ثانویه در جریان فرایندهای دفاعی گیاه و سازگاری در مقابل استرس های مختلف نقش اساسی را بر عهده دارند اما تداوم تنش و تجمع بیش از حد گونه های فعال، تعادل اکسایش-کاهش در گیاه را بر هم زده و موجب تنش اکسیدی می شود. گونه های فعال اکسیژن در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسیزوم در سیتوپلاسم، پراکسیداز و آمین اکسیداز موجود در دیواره سلولی و آنزیم های خانواده *NAD(P)H oxidase* (NOX) غشای سلولی تولید می شوند. در این میان ژن های *NAD(P)H oxidase* با تحریک ژن های مرتبط با ایجاد گونه های فعال اکسیژن نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاه به تغییرات محیطی ایفا می کنند. این خانواده ژنی همچنین با انتقال الکترون از *NAD(P)H* به اکسیژن مولکولی یون سوپراکسید را تولید کرده و در ادامه قادر به تولید انواع گونه های فعال اکسیژن هستند. این پژوهش با هدف بررسی ناحیه راه انداز ژن رمزکننده *NAD(P)H oxidase* در ژنوم گندم جهت شناسایی عناصر تنظیمی تأثیرگذار بر بیان آن در گندم انجام گردید.

مواد و روش ها: راه انداز ژن ها و عناصر تنظیمی مهمی که در آن قرار دارد نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در شرایط مختلف و در در نتیجه در ایجاد سازگاری گیاهان با تغییرات محیطی را بر عهده دارد. جهت بررسی چگونگی تنظیم بیان ژن *NAD(P)H oxidase* ناحیه راه انداز ژن با استفاده از پایگاه داده های بیوانفورماتیک و نرم افزارهای تحلیلی، مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا با استفاده از سایت NCBI توالی مربوط به ژن رمزکننده این آنزیم در گندم شناسایی شد. جهت شناسایی عناصر تنظیمی در بالادست این ژن در ناحیه راه انداز ژنی ۱۵۰۰ جفت باز از ناحیه آغاز رونویسی جدا گردید و سپس این توالی ها با استفاده از سایت PlantEnsemble مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی عناصر تنظیمی مهم در بیان ژن که هر کدام نقش مشخصی در تنش های مختلف ایفا می کنند، توالی راه انداز توسط سایت PlantCare بررسی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که عناصر تنظیمی مختلفی که در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف دخالت دارند می توانند بر میزان بیان ژن های *NAD(P)H oxidase* در گندم تأثیر گذار باشند. از جمله عناصر تنظیمی که به وسیله آنالیز راه انداز شناسایی شدند می توان ABRE, TCA motif, TGACG motif, ARE, CCAAT-Box, skn-1-motif, circadian را نام برد که هر کدام به وسیله هورمون ها و فاکتورهای رونویسی مختلف شناسایی می شوند.

نتیجه گیری: تحلیل ها نشان داد تغییرات شرایط محیطی توانایی ایجاد تغییر بیان ژن آنزیم *NAD(P)H oxidase* را دارند. هورمون ها و فاکتورهای رونویسی هر کدام عناصر تنظیمی خاصی را در راه انداز ژن مورد هدف قرار می دهند و از این طریق موجب تغییر میزان بیان آنزیم می شوند. آنزیم در ابتدا با ایجاد یون سوپراکسید و در ادامه تولید انواع گونه های فعال اکسیژن که نقش پیام رسان ثانویه در گیاه را دارند موجب سازگاری گیاه با شرایط محیطی می شود. از جمله عناصر تنظیمی که به وسیله آنالیز راه انداز شناسایی شدند می توان ABRE, TCA motif, TGACG motif, ARE, CCAAT-Box, skn-1-motif, circadian را نام برد. این عناصر به ترتیب در مسیرهای پاسخ به هورمون های آپسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید، مسیرهای واکنش های غیر هوازی، پاسخ به خشکی از طریق فاکتورهای رونویسی MYB، مسیر آندوسپرم گیاه و واکنش های نوری نقش دارند که همگی موجب پاسخ بهتر گیاه در مراحل مختلف رشدی و سازگاری با شرایط متغیر محیطی می شوند.

واژه های کلیدی: آنزیم *NAD(P)H oxidase*، گونه های فعال اکسیژن، راه انداز، فاکتورهای رونویسی.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۶/۰۷ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۵/۱۸ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

استناد: سهرابی، ف. و ساعدموچشی، آ. (۱۴۰۲). بررسی عناصر تنظیم کننده ژن های *NAD(P)H oxidase* در گندم. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۲(۳)، ۲۸۸-۳۰۰.

DOI: [10.22126/cbb.2023.9328.1050](https://doi.org/10.22126/cbb.2023.9328.1050)



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

مقدمه

می‌شوند (Saed-Moucheshi et al., 2010; Demidchik,

2021). *al.*، خطر نشان می‌گردد که گونه‌های فعال اکسیژن به صورت طبیعی جهت انتقال پیام و همچنین تجزیه و نابود کردن عناصر و ملکول‌های ناخواسته استفاده می‌گردد. با این حال، در صورتی که در اثر تغییر شرایط محیطی مانند شرایط تنش مقدار تولید این گونه‌ها افزایش یابد می‌تواند به صورت غیرقابل کنترل باعث به آسیب به ملکول‌های مورد نیاز گیاه شود.

مطالعات فراوانی آنزیم‌های خانواده NOX واقع در غشای پلاسمایی را بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط نرمال و تنش می‌دانند که از این طریق نقش اساسی را در پاسخ‌های ایمنی گیاه بازی می‌کنند. آن‌ها با انتقال الکترون از NAD(P)H به اکسیژن مولکولی یون سوپراکسید را تولید می‌کنند (Pirasteh-Anosheh et al., 2016; Riasat et al., 2019; Sagi and Fluhr, 2006). در ادامه آنیون سوپراکسید یا به صورت خود به خودی در (pH) پایین و یا توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. با شروع تنش، این ترکیبات با تاثیر بر هورمون‌ها و فاکتورهای رونویسی مختلف، موجب راه-اندازی آبشارهای پیام‌رسان سلولی و تغییر الگوی بیان ژن‌های مقاومت می‌شوند (Ogasawara et al., 2008; Saed-Moucheshi and Mozafari, 2022; Saed-Moucheshi et al., 2019; Shakeri et al., 2019; Zhang et al., 2010). آنزیم‌های NOX در گیاهان به

گندم در دنیای امروز نقش مهمی در تامین مواد غذایی بشر ایفا می‌کند. این گیاهان در طول زندگی خود به طور مداوم تحت تاثیر تنش‌های زنده و غیرزنده قرار دارند. آن‌ها جهت مقابله با این تنش‌ها به صورت تخصصی از راه‌کارهای مختلفی از جمله تولید سریع گونه‌های فعال اکسیژن^۱ که به عنوان انفجار اکسیدی^۲ معروف است، بهره می‌گیرند (Hao et al., 2006). گونه‌های فعال شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن تنها و پراکسید هیدروژن هستند (ساعدموچشی و صفری، ۱۴۰۲) که از مهم‌ترین عوامل جهت فعال سازی مکانیسم‌های ایمنی گیاه در زمان تنش محسوب می‌شوند (Leshem et al., 2007; Saed-Moucheshi and Mirghaed, 2023; Saed-Moucheshi and Safari, 2023a). گونه‌های فعال در مقدار اندک به عنوان پیام رسان‌های ثانویه در جریان فرایندهای دفاعی گیاه و سازگاری در مقابل استرس‌های مختلف نقش اساسی بر عهده دارند اما تداوم تنش و تجمع بیش از حد گونه‌های فعال، تعادل اکسایش-کاهش در گیاه را بر هم زده و موجب تنش اکسیدی^۳ می‌شود (Gill and Tuteja, 2010; Saed-Moucheshi and Safari, 2023b). در گیاهان گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم در سیتوپلاسم، پراکسیداز و آمین‌اکسیداز موجود در دیواره سلولی و آنزیم‌های خانواده *NADP(H) oxidase* (NOX) غشای سلولی تولید

¹ Reactive Oxygen Species (ROS)

² Oxidative burst

³ Oxidative stress

PlantCare⁶، PlantEnsemble⁷ و NCBI⁸ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آنالیز راه‌انداز ژن‌های رمزکننده *NAD(P)H oxidase*

جهت مطالعه چگونگی تاثیر عوامل مختلف در تنظیم بیان ژن NOX با استفاده از ابزارهای آنالین، ناحیه راه‌انداز این ژن‌ها بررسی شد. ابتدا با استفاده از سایت NCBI توالی مربوط به ژن رمزکننده این آنزیم با شماره دسترسی (AY561153) دانلود گردید. توالی این ژن در شکل ۱ قابل مشاهده است. پس از دریافت توالی‌ها با استفاده از سایت PlantEnsemble، ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید بالادست^۹ جایگاه آغاز رونویسی به عنوان راه‌انداز در نظر گرفته شد. توالی راه‌انداز به دست آمده جهت بررسی عناصر تنظیمی در سایت PlantCare مورد بررسی قرار گرفت. خاطر نشان می‌گردد که مطالعه مشابه در ارتباط با گندم در حال حاضر در پایگاه‌های علمی موجود نمی‌باشد.

همولوگ اکسیداز تنفسی^۴ معروف هستند (Sagi and Fluhr, 2006). مطالعات نشان دادند که فعالیت آنزیم NOX و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان تحت شرایط خشکی تغییرات فراوانی را نشان دادند (Duan et al., 2009). شوری عامل دیگری برای تغییر بیان آنزیم‌های خانواده NOX در گیاهان و تولید پراکسید هیدروژن محسوب می‌شود (Sagi and Fluhr, 2006). در بررسی انجام شده توسط Jiang and Zhang (۲۰۰۳) تیمار ABA و سالیسیلیک اسید موجب تغییر بیان ژن NOX در گیاه برنج شد. در یک بررسی دیگر نیز تیمارهای کلسیم به صورت Ca^{2+} و نیکل در بیان این آنزیم موثر بودند (Hao et al., 2008). به نظر می‌رسد که این تیمارها به صورت غیر مستقیم مقدار تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاهان را در کاهش می‌دهند. نکته قابل توجه در مورد ژن‌های NOX این است که بیان اعضای مختلف این خانواده چند ژنی در بافت‌ها، اندام‌ها و شرایط مختلف بسیار متفاوت است (Suzuki et al., 2011). با توجه به اهمیت آنزیم‌های NOX بررسی راه‌انداز و چگونگی تنظیم بیان آن‌ها در شرایط مختلف مهم به نظر می‌رسد.

در این تحقیق ساختار راه‌انداز ژن رمزکننده آنزیم NOX در گندم جهت یافتن عناصر تنظیمی^۵ مهم بر بیان ژن در شرایط مختلف (تنش و انواع هورمون‌ها) با استفاده از تحلیل داده‌های ژنتیکی و ابزارهای آنالین

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>

⁷ <http://plants.ensembl.org/index.html>

⁸ <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>

⁹ Upstream

⁴ Respiratory homologs burst (Rboh)

⁵ Cis-acting regulatory elements

```

1  tatatgtttg ttcaatgtcc agcagtgtcg ccccttgaat ggcacccctt ctcaattact
61  tcagcacctg gggatgaata tctcagcatc catgttcggc aacttggtga ctggacacga
121 gagctcaaga gagtattttc cgcggcctgc gagcccccag tgagtggaaa aagtgggtctt
181 cttagagcag acgagacaac taagaaaacc ttaccaagc ttctgatcga tggcccttat
241 gggtctcctg ctccaggatta cggcaagtat gatgttttac tacttggttg attaggaatt
301 gggtgctacac cctttatcag ctttttgaaa gatctcctct acaacatcat taagatggag
361 gaagaggagg atacttctac ggatctctat ccaccaattg gtcggaataa gccacatgtt
421 gatctgggta cgcttatgag ggttacctca agaccaagga aggttttaaa gactacaaat
481 gcttactttt attgggtgac acgtgagcaa ggctcttttg attggttcaa aggagtcatg
541 aatgagattg cgcacatgga tcaaaggaat atcattgaga tgcacaacta cctcacaagc
601 gtttacgagg aaggggatgc tcggtcagcg ctcatcacta tgcttcaagc tctgaacat
661 gccaagaatg gtgtcgatgt tgtctctgga actaaagttc ggacacattt tgcaagacca
721 aattggaaaa aggtcctagc caaaattgcc tcaaagcacc cgtatgcgaa gatagggtga
781 ttctactgtg gagc

```

شکل ۱. توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن NADPH Oxidase در گندم بر گرفته از سایت NCBI

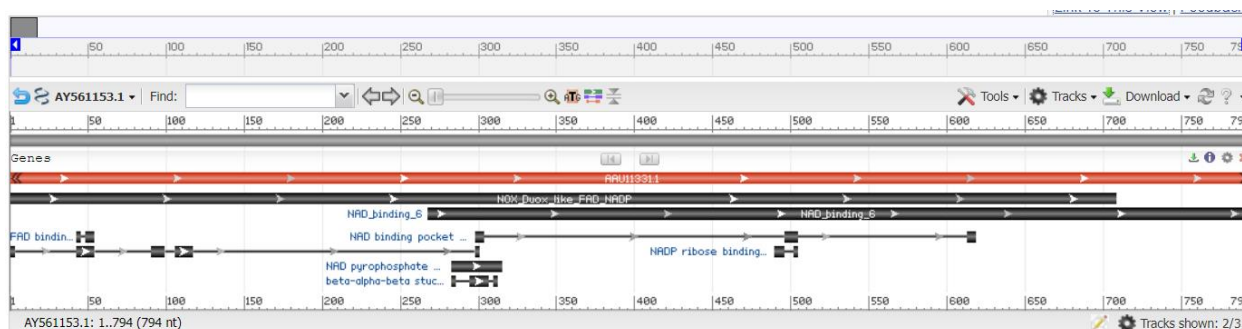
Figure 1. Nucleotide sequence of NADPH Oxidase in bread wheat (from NCBI repository)

نتایج و بحث

مشاهده است. بررسی میزان و چگونگی تنظیم بیان ژن-

های رمزکننده این آنزیم‌ها در سلول در زمان تنش‌های مختلف و البته در بافت‌های گوناگون می‌تواند ما را در بهبود گیاهان یاری بخشد. راه‌انداز ژن و عناصر تنظیمی آن‌ها مهم‌ترین عامل در تنظیم بیان ژن در پاسخ به تغییرات درونی و بیرونی سلول محسوب می‌شوند. اغلب عناصر تنظیمی بیان ژن‌های گیاهی در ناحیه راه‌انداز که ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید بالادست جایگاه آغاز رونویسی است، قراردارند. این عناصر حاوی توالی‌های پاسخ دهنده به انواع هورمون‌ها و فاکتورهای رونویسی بوده و به این صورت امکان تنظیم بیان ژن را در زمان، بافت و مراحل مختلف زیستی فراهم می‌سازند (Wang *et al.*, 2016).

یکی از پاسخ‌های با اهمیت گیاهان در شرایط تنش فعال یا غیرفعال کردن رونویسی از آنزیم‌هایی است که در زمینه مقابله با تنش نقش دارند. خانواده ژنی NOX یکی از آنزیم‌های است که در پاسخ به تنش در گیاهان نقش ایفا می‌کند و نیازمند بررسی بیشتری است زیرا این خانواده ژنی در تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش‌های محیطی بسیار فعال بوده و از اهمیت بالایی برخوردار هستند ولی بررسی‌های کاملی راجع به آن‌ها در گیاهان متفاوت انجام نگرفته است. توزیع گرافیکی این ژن که در آن جهت و مسیر رونویسی از آن مشخص گردیده است در شکل آورده شده است. همچنین شکل ۳ نشان دهنده پروتئین تولید شده توپیت این ژن می‌باشد که در سایت NCBI با شماره دسترسی "AAU11331.1" قابل



شکل ۲. توزیع گرافیکی مربوط به ژن NOX در گندم برگرفته از سایت NCBI

Figure 2. Graphical structure of NOX gene in bread wheat (from NCBI repository)

```

1 ymfvqcpavs pfewhpfst sapgdeylsi hvrqlgdwtr elkrvfssaac eppvsgksgl
61 lrادتتکت lpkllidgpy gspaadygky dvlllvglgi gatpfisilk dllyniikme
121 eeedtstdly ppigrnkphv dlgtlmrvts rprkvlttn ayfywvtreq gsfdwfkvgm
181 neiadmdqrn iiemhnylts vyeegdarsa litmlqalnh akngvdvvs tkvrthfarp
241 nwkkvlakia skhpyakigv fycga

```

شکل ۳. توالی مربوط به پروتئین نهایی تولید شده توسط ژن NOX برگرفته از سایت NCBI

Figure 3. Protein sequence produced by NOX gene (from NCBI repository)

داده شده است. بر این اساس تنظیم ناحیه پروموتوری این ژن می تواند بر اساس هر دو رشته و با اتصال عناصر تنظیمی صورت گیرد. همان طور که مشاهده می گردد بیشترین تعداد تکرار مربوط به عناصر تنظیمی حفاظت شده عمومی CAAT-Box و TATA-Box است. این نواحی محل اتصال فاکتورهای رونویسی^{۱۲} عمومی هستند (Shamloo-Dashtpaderdi *et al.*, 2015). از طرفی راه انداز ژن NOX حاوی تعداد زیادی از عناصر پاسخ دهنده به استرس های مختلف زنده و غیر زنده مانند کاهش دما، گرما، خشکی (محل اتصال فاکتورهای رونویسی MYB) وضعیت غیر هوایی (ARE)، پاتوژن ها

توالی ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به بالادست ژن مورد بررسی جهت یافتن موتیف های موجود در پروموتور ژن در شکل ۴ آورده شده است. جهت بررسی و اطمینان از درست بودن توالی پروموتوری، این توالی در سایت NCBI بلاست گردید و نتایج این بلاست در شکل ۵ آورده شده است. در این ناحیه پروموتوری پرتکرارترین عناصر تنظیمی که در ناحیه راه انداز این ژن ها وجود دارند در **Error!** **Reference source not found.** آورده شده است. در این جدول + و - نشان دهنده رشته معنی^{۱۰} و ضد معنی^{۱۱} است که بر اساس آن عناصر تنظیمی در رشته تشخیص

¹² transcription Factor

¹⁰ Sense strand

¹¹ Anti-sense strand

وجود موتیف ABRE در راه‌انداز ژن NOX که محل اتصال آبسیزیک اسید است از تاثیر این هورمون در تغییر بیان ژن در شرایط گوناگون خبر می‌دهد. هورمون ABA نقش مهمی در سازگاری به تنش‌های مختلف ایفا کرده و بقا گیاه را با تغییرات فیزیولوژی و رشدی تضمین می‌کند. اعتقاد بر این است که هورمون ABA تنظیم‌کننده اصلی فرایند پیری و انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به دانه است (ساعدموچشی و همکاران، ۱۴۰۲). همچنین تنش خشکی، تجمع ABA را در دانه افزایش می‌دهد (Ashraf and Harris, 2013). در آرابیدوپسیس تالیانا، ژن‌های AtRBOHF و AtRBOHD در پاسخ‌های گیاهی به حمله پاتوژن که به وسیله ROSها انجام می‌شود همچنین در تنظیم بسته شدن روزنه‌ها به وسیله آبسیزیک اسید شرکت می‌کنند (Kwak et al., 2003; Saed-Moucheshi et al., 2014). طبق گزارشات، در برنج ارتباط میان اعضای خانواده NOX (OsNOX1 و OsNOX3)، H₂O₂ و MAPK در مسیر پیام‌رسانی آبسیزیک اسید، نقش مهمی در تحمل به استرس خشکی در گیاه برنج بر عهده دارد. گونه‌های فعال در تحریک ساخت آبسیزیک اسید ABA در زمان تنش بسیار موثر هستند. این هورمون در زمان تنش نقش مهمی از جمله بسته شدن روزنه را بر عهده دارد. در نتیجه این عمل از یک سو مانع نفوذ پاتوژن‌ها شده و از سوی دیگر از هدر رفتن آب در زمان خشکی جلوگیری می‌کنند (Zhang et al., 2014).

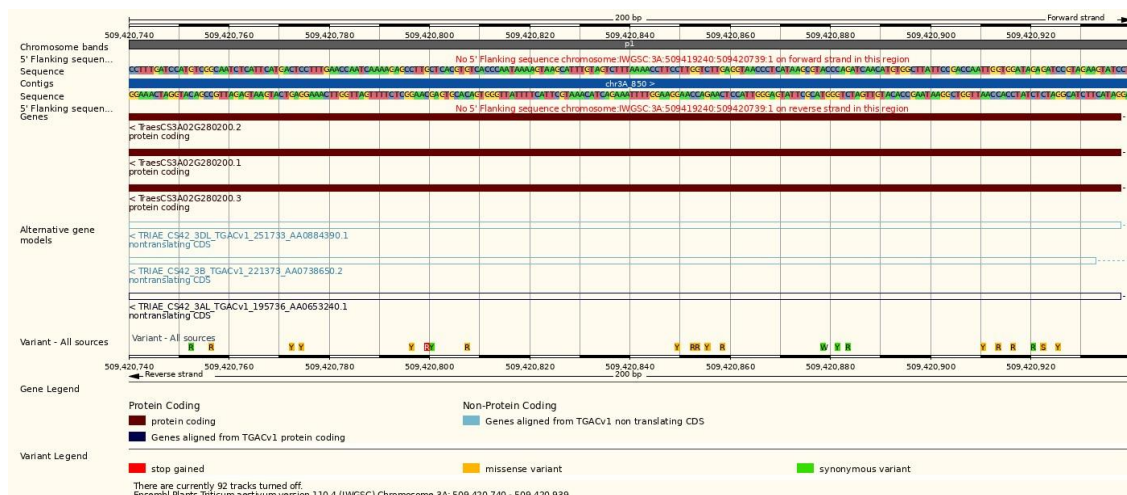
(تکرارهای غنی از TC)، عناصر دخیل در بیان آندوسپرم^{۱۳} (SKn1- motif) و عناصر واکنش دهنده به نور (G-Box, ATCT motif, BOX1, BOX4) و MNF1 است. علاوه بر این در گندم راه‌انداز ژن حاوی توالی‌های زیادی جهت پاسخ به هورمون‌های مختلف مانند آبسیزیک اسید (ABA)، جیبرلین، سالسیلیک اسید (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) است. از سوی دیگر گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده خود در ایجاد ارتباط میان هورمون‌های SA و MeJA در زمان تنش نقش مهمی را بر عهده دارند (Atkinson and Urwin, 2012; Hewedy et al., 2023; Mukherjee et al., 2023). MYBها فاکتورهای رونویسی در مسیر پاسخ سلولی به تنش‌های آبی (خشکی) هستند. عناصر تنظیمی CCAAT-box (محل اتصال MYBها) نشان دهنده تغییر بیان ژن آنزیم خانواده NOX در پاسخ به تنش‌های خشکی است. با توجه به تعداد تکرار فراوان موتیف SKn-1 که در مسیر بیان ژن‌های مربوط به آندوسپرم دخالت دارد، می‌توان نتیجه گرفت که این آنزیم می‌تواند در زمان جوانه زنی بذر گیاه مؤثر باشد. واکنش‌های نوری^{۱۴} نیز با توجه به عناصر تنظیمی مربوطه مانند (ATCT, BOX4, motif, BOX1 و MNF1) می‌توانند بر میزان بیان این ژن تاثیرگذار باشند که همگی در جهت بهبود سازگاری گیاه برای تحمل به تنش‌های مختلف موثر هستند (Saed-Moucheshi and Safari, 2023a; Shamloo-Dashtpajardi et al., 2015).

¹³ Endosperm¹⁴ circadian

جدول ۱- عناصر تنظیمی مهم موجود در راه انداز ژن *NAD(P)H oxidase*Table 1- Important regulatory elements present in *NAD(P)H oxidase* gene

نام مکان Action Site Name	مکان Site	رشته Strand	توالی Sequence	عملکرد Function
ARE	895-901	+	TGGTTT	تنفس غیرهوازی Non-Aerial Respiration
ATCT motif	117-127	-	AATCTAATCC	واکنش به نور Photo Responsive
BOX1	704-711	+	TTTCAAA	واکنش به نور Photo Responsive
BOX4	124-130	+	ATTAAT	واکنش به نور Photo Responsive
G-BOX	1138-1144	+	CACGTT	واکنش به نور Photo Responsive
MNF1	995-1003	+	GTGCCC(A/T) (A/T)	واکنش به نور Photo Responsive
MRE	249-255	+	AACCTAA	محل اتصال MYB MYB Connecting Site
SKn1-motif	203-208	-	GTCAT	بیان آندوسپرم Endosperm Expression
TATA Box	1227-1235	-	TATAAATA	بیان ژن Endosperm Expression
TATC Box	53-60	-	TATCCCA	پاسخ به جیبرلین Gibberellin Responsive
TCA motif	678-688	-	CCATCTTTTT	پاسخ به سالیسیلیک اسید Salicylic Acid Responsive
TGACG motif	946-951	-	TGACG	پاسخ به جاسمونیک اسید Jasmonic Acid Responsive
ABRE	1396-1402	-	CACGTG	پاسخ به آبسیزیک اسید Absciscic Acid Responsive
TC-rich repeats	674-684	+	ATTTTCTTCA	پاسخ به پاتوژن Pathogen Responsive

+ و - در این جدول نشان دهنده رشته معنی (sense) و ضد معنی (anti-sense) است که بر اساس آن عناصر تنظیمی در رشته تشخیص داده شده است.

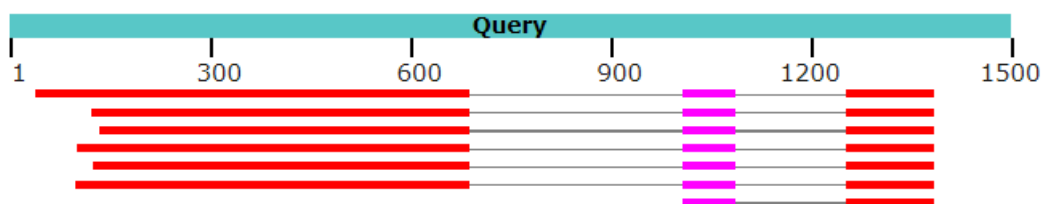


TCACGTGTCACAACCTCACAGCAATGACGCCACACCCAGCCTTGAACCAATCAGCACCGATG
CACTGAATATACTTGTACAAGTTACAAACACCCGAATCGAGTATACATTTTTCTTTTTTTC
TTTCACTTTTCTTTCTGTTTCATTTTTTGTATGTAAAAATTACAGACACAAACGTACTTTTT
TTGCCTTGGTCAGACACTCAGCTGCATGATAAAAAATATACAGTTAATTAGCCTTGTGGC
TCGTGGTTCCCTTCCTATGTCCTACATATCATCATCTATACTCCCAACTATATTCAGGA
GAAGCTCAAGGTCTTCTTCTTCAGGTGGTCTCTGTACATTCGAGGCCTACCGGGAGGAAT
CCCCCTCGCAGGTCCATGTTGTAAAAGCCATCACGGACGCCACATGTAGTTCTACATCCTT
CTTGTTGGCGCATTTGGGATTCTGAAGTCTGGGGCGATGGCTATGGTTGCTTCTTCCCCT
TGGCCTCTCCTGTCCTTTATAAAGAATATACCAGGACAAAAATGCTGTACAAGTAGCGTA
GTCTCTATTCTCGTTTCCTGTCAAGTGTCTACTTGGAATTCAGAAATACTCCTTGTGGAA
CTCGAATTTTGTGGTGCATTTCCCATTTGAAGTCTGGGCAAGCTTGGCAAGTTCTTGTGC
CAGGACTGGAGCTCCACAGTAGAAGACACCTGTATGCAACATAAATAATTATGGACTTGG
CTTATCGACATAGGATTTGATATTTACTAATACTAACTCAACCCAAGATGAAATAAAAAA
ATCATGATTACTAATACTAACACACCATTTATAATTTTAAAAATTTGCCTAGCAATCTTA
CTTGTTGTAGTACATCCAACCTGAACGTTTTGCATATCAACATACTAGTGCGTGCACATAAT
AACTCTAGCATGGATATACAAAAATAACTTTGATAACAGTAGATAATCCATGGGTCAATG
ACTTCAACAAATCAAATCACGTTTGATTAGGCTGTGATACGTATACTAACCTATCTTCGC
ATACGGGTGCTTTGAGGCAATTTTGGCTAGGACCTTTTCCAATTTGGTCTTGCAAAATG
TGTCGGAACCTGCAACATGAGTTCAGTGTAGTCAAATGCAAGTGGTAGCAGTACAAGGC
AAGTGTGAACCTCTTTTAAACATTTATGCCAATAAATAGGGAGAAATGGCTTAATATTTT
GATGCATTCACTTTACAGACTATGCAAAGCTACTAATAGCTTTATATCACTGCTTACTTT
AGTTCCAGAGACAACATCGACACCATTTCTTGGCATGGTTCAGAGCTTGAAGCATAGTGAT
GAGCGCTGACCGAGCATCCCCTTCCTCGTAAACGCTTGTGAGGTAGTTGTGCATCTCAAT
GATATTCTACATGGATCAAAGGTAAGTTTAACTACAACCTTCGCAAGGGGAACCTATTGTG
AATTTCTGAAGATAACAACTGCACCGCAAACAAAAGTAACAGTCACTTGATGTACTTAC

شکل ۴. شکل گرافیکی توالی روی کروموزوم و توالی پروموتوری مربوط به ژن NOX برگرفته از سایت Ensemble

Figure 4. Graphical structure of NOX promotor sequence (From NCBI repository)

Distribution of the top 20 Blast Hits on 7 subject sequences



	Description	Scientific Name	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> respiratory burst oxidase homolog protein A (LOC543151) .mRNA	<i>Triticum aestivum</i>	57%	0.0	100.00%	3543	XM_044485283.1
✓	TPA: <i>Triticum aestivum</i> respiratory burst oxidase homolog A (RbohA) .mRNA, partial cds	<i>Triticum aestivum</i>	52%	0.0	100.00%	3422	BK010636.1
✓	<i>Triticum aestivum</i> mRNA, clone: tpb0049f15, cultivar Chinese Spring	<i>Triticum aestivum</i>	51%	0.0	100.00%	3415	AK448161.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> respiratory burst oxidase homolog protein A-like (LOC123079098) .mRNA	<i>Triticum aestivum</i>	53%	0.0	93.11%	3631	XM_044501771.1
✓	<i>Triticum aestivum</i> mRNA, clone: tpb0039c21, cultivar Chinese Spring	<i>Triticum aestivum</i>	51%	0.0	93.15%	3616	AK447789.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> respiratory burst oxidase homolog protein A-like (LOC123070685) .mRNA	<i>Triticum aestivum</i>	53%	0.0	90.82%	3557	XM_044493977.1
✓	<i>Triticum aestivum</i> NADPH oxidase mRNA, partial cds	<i>Triticum aestivum</i>	14%	2e-62	100.00%	794	AY561153.1

شکل ۵. نتایج مربوط به مقایسه (blastp) توالی پروموتوری مربوط به ژن NOX در گندم

Figure 5. Results of blastp regarding the promotor sequence of NOX gene in bread wheat

تأثیر قرار داده و تغییراتی را در ریخت شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند. سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات شرایط تنش را در گیاه القا کرده و به عنوان یک سیگنال درونی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده مانند پاتوژن‌ها، اشعه‌های UV، شوری و کم آبی عمل می‌کنند (Hou and Tsuda, 2022). آن‌ها همچنین سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه و در نهایت مقاومت گیاه می‌شوند (Popova et al., 2003). افزایش سطح پراکسید هیدروژن به وسیله کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید یا گرما منجر به تحمل دمایی در نهال‌های خردل شده است (Dat et al., 1998). جاسمونات‌ها (Jas)، شامل جاسمونیک اسید (JA) و متیل جاسمونات (MeJA)، خانواده‌ای از ترکیبات سیکلوپنتانون هستند که از طریق مسیر اکتا دکانوتیک اسید از لینولنیک اسید ساخته می‌شوند (Hewedy et al., 2023). به طور کلی این

راه‌انداز ژن با جعبه TATC می‌تواند به هورمون جیبرلین که بیشترین دخالت را در کنترل و تسهیل جوانه زنی بذر بر عهده دارند، پاسخ دهد. افزایش سنتز و آزادسازی اسید جیبرلیک در بذر موجب تجزیه نشاسته و تبدیل آن به مواد قابل استفاده برای جنین شده در نتیجه جوانه زنی شروع می‌شود. برخی گیاهان برای جوانه‌زنی نیاز به نور دارند. دیده شده که گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تاریکی همان نقش جیبرلین را ایفا کرده و در جوانه زنی موثر هستند (Li et al., 2016).

وجود عناصر پاسخ دهنده به سالیسیلیک اسید (TCA motif) و جاسمونیک اسید (TGACG motif) بیانگر تاثیر این هورمون‌ها بر بیان ژن‌های NOX در زمان مراحل رشدی و انواع تنش‌ها است. سالیسیلیک اسید از ترکیبات فنولی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت

ترکیبات از رشد گیاه جلوگیری کرده، اما به عنوان شاخه‌ای از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، فرایندهای متنوعی از قبیل رسیدن میوه، پیری، تشکیل غده، تشکیل دانه گرده، پاسخ‌های دفاعی علیه آسیب‌های مکانیکی و حمله حشرات و بیماری‌زا را راه‌اندازی می‌کنند. JA در گیاه باعث افزایش واکنش به تحریکات خارجی مانند زخم، نیروی مکانیکی، حمله پاتوژن و تنش اسمزی می‌شود (Hou and Tsuda, 2022). طبق بررسی‌های انجام شده متیل جاسمونات تولید گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کند (Zhang and Xing, 2008). محققان اظهار داشتند که کاربرد MeJA در ریشه آفتابگردان، باعث افزایش بیان ژن NOX و محتوای H_2O_2 شده است. این افزایش، ۵ دقیقه پس از تیماردهی به حداکثر مقدار خود رسیده است اما با ادامه اثر متیل جاسمونات با فعالیت آنزیم‌هایی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز، مقدار H_2O_2 تعدیل می‌شود (Parra-Lobato et al., 2009).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ناحیه تنظیمی خانواده ژنی NOX در گیاه گندم بررسی شد و بر این اساس ۱۵۰۰ جفت باز از قسمت بالادست ژن و در ناحیه راه‌انداز ژنی انتخاب گردید. تا به حال در زمینه بررسی پروموتوری خانواده ژنی

NOX در گیاه گندم پژوهشی انجام نگرفته است. تحلیل‌ها نشان دادند که از جمله عناصر تنظیمی مهم شناسایی شده در راه‌انداز ژن NOX شامل ABRE, TCA motif, TGACG motif, ARE, CCAAT-Box, skn-1-motif, circadian می‌باشد. این عناصر به ترتیب در مسیرهای پاسخ به هورمون‌های آبسزیک اسید، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید، مسیرهای واکنش های غیر هوازی، پاسخ به خشکی از طریق فاکتورهای رونویسی MYB، مسیر آندوسپرم گیاه و واکنش‌های نوری نقش دارند. عناصر تنظیمی موجود در راه انداز آنزیم، بیانگر تاثیر عوامل مختلف محیطی از جمله تنش‌های غیرزیستی بر بیان این خانواده جهت سازگاری با شرایط متغیر است. با توجه به اهمیت این آنزیم می‌توان به وسیله اصلاح نباتات یا مهندسی ژنتیک و ایجاد تغییر در عناصر تنظیمی مهم پاسخ دهنده به عوامل مختلف، بیان این خانواده ژنی را تغییر و گیاهان اصلاح شده را جهت اهداف مختلف به دست آورد. البته این کار نیازمند مطالعات مختلف و بررسی میان‌کنش این آنزیم با آنزیم - های دیگر است.

References

- Ashraf, M., and Harris, P. J. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51, 163-190.
- Atkinson, N. J., and Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany* 63, 3523-3543.
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., and Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* 11, 1351-1357.

- Demidchik, V. (2010). Reactive oxygen species, oxidative stress and plant ion channels. Ion channels and plant stress responses, 207-232.
- Duan, Z. Q., Bai, L., Zhao, Z. G., Zhang, G. P., Cheng, F. M., Jiang, L. X., and Chen, K. M. (2009). Drought-stimulated activity of plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and its catalytic properties in rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 51, 1104-1115.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry* 48, 909-930.
- Hao, F., Wang, X., and Chen, J. (2006). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science* 170, 151-158.
- Hao, F., Zhang, J., Yu, Z., and Chen, J. (2008). Involvement of NADPH oxidase NtrbohD in the rapid production of H₂O₂ induced by ABA in cultured tobacco cell line BY-2. *Progress in Natural Science* 18, 267-271.
- Hewedy, O. A., Elsheery, N. I., Karkour, A. M., Elhamouly, N., Arafa, R. A., Mahmoud, G. A.-E., Dawood, M. F. A., Hussein, W. E., Mansour, A., and Amin, D. H. (2023). Jasmonic acid regulates plant development and orchestrates stress response during tough times. *Environmental and Experimental Botany* 208, 105260.
- Hou, S., and Tsuda, K. (2022). Salicylic acid and jasmonic acid crosstalk in plant immunity. *Essays in Biochemistry* 66, 647-656.
- Jiang, M., and Zhang, J. (2003). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell & Environment* 26, 929-939.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., and Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal* 22, 2623-2633.
- Leshem, Y., Seri, L., and Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant Journal* 51, 185-197.
- Li, W., Yamaguchi, S., Khan, M. A., An, P., Liu, X., and Tran, L.-S. P. (2016). Roles of gibberellins and abscisic acid in regulating germination of Suaeda salsa dimorphic seeds under salt stress. *Frontiers in plant science* 6, 1235.
- Mukherjee, A., Dwivedi, S., Bhagavatula, L., and Datta, S. (2023). Integration of light and ABA signaling pathways to combat drought stress in plants. *Plant Cell Reports* 42, 829-841.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., and Nagata, K. (2008). Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 8885-8892.
- Parra-Lobato, M. C., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E., Alvarez-Tinaut, M. C., and Gómez-Jiménez, M. C. (2009). Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 66, 9-17.
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H., and Pessarakli, M. (2016). Stomatal responses to drought stress. In "Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach", Vol. 1, pp. 24-40. John Wiley & Sons, Ltd.
- Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V., and Stoinova, Z. (2003). Salicylic acid-and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulg J Plant Physiol* 133, 152.
- Riasat, M., Kiani, S., Saed-Moucheshi, A., and Pessarakli, M. (2019). Oxidant related biochemical traits are significant indices in triticale grain yield under drought stress condition. *Journal of Plant Nutrition* 42, 111-126.
- Saed-Moucheshi, A., and Mirghaed, E.-R. (2023). A Review on Selenium Function under Oxidative Stress in Plants Focusing on ROS Production and Detoxification. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 92, 1921--1941.
- Saed-Moucheshi, A., and Mozafari, A. A. (2022). Alternate gene expression profiling of monoterpenes in *Hymenocrater longiflorus* as a novel pharmaceutical plant under water deficit. *Scientific Reports* 12, 4084.

- Saed-Moucheshi, A., Razi, H., Dadkhodaie, A., Ghodsi, M., and Dastfal, M. (2019). Association of biochemical traits with grain yield in triticale genotypes under normal irrigation and drought stress conditions. *Australian Journal of Crop Science* 13, 272.
- Saed-Moucheshi, A., and Safari, H. (2023a). Investigation of regulatory elements related to superoxide dismutase enzyme genes in wheat. *Cereal Biotechnology and Biochemistry* 2, 64-73.
- Saed-Moucheshi, A., and Safari, H. (2023b). Superoxide Dismutase Enzyme Expression in Root and Shoot of Triticale Seedlings under Drought Stress Conditions. *Cereal Biotechnology and Biochemistry* 1, 581-595.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., and Pessarakli, M. (2014). Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. *Journal of Plant Nutrition* 37, 1573-1585.
- Saed-Moucheshi, A., Sohrabi, F., Fasihfar, E., Baniasadi, F., Riasat, M., and Mozafari, A. A. (2021). Superoxide dismutase (SOD) as a selection criterion for triticale grain yield under drought stress: a comprehensive study on genomics and expression profiling, bioinformatics, heritability, and phenotypic variability. *BMC plant biology* 21, 1-19.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology* 141, 336-340.
- Shakeri, E., Mozafari, A. A., Sohrabi, F., and Saed-Moucheshi, A. (2019). Role of proline and other osmoregulatory compounds in plant responses to abiotic stresses. In "Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition", pp. 165-173. CRC Press.
- Shamloo-Dashtpajardi, R., Razi, H., and Ebrahimie, E. (2015). Mining expressed sequence tags of rapeseed (*Brassica napus* L.) to predict the drought responsive regulatory network. *Physiology and molecular biology of plants* 21, 329-340.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., and Mittler, R. (2019). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology* 14, 691-699.
- Wang, X., Zhang, M. M., Wang, Y. J., Gao, Y. T., Li, R., Wang, G. F., Li, W. Q., Liu, W. T., and Chen, K. M. (2016). The plasma membrane NADPH oxidase OsRbohA plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiologia Plantarum* 156, 421-443.
- Zhang, H., Liu, Y., Wen, F., Yao, D., Wang, L., Guo, J., Ni, L., Zhang, A., Tan, M., and Jiang, M. (2014). A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *Journal of experimental botany* 65, 5795-5809.
- Zhang, H., Zhang, F., Xia, Y., Wang, G., and Shen, Z. (2010). Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase. *Journal of Hazardous Materials* 178, 834-843.
- Zhang, L., and Xing, D. (2008). Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant and Cell Physiology* 49, 1092-1111.