تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۹
۵۸۱-۵۷۱
http://dx.doi.org/ 10.22077/escs.2019.2109.1534

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی بیانی خانواده ژنی فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی (*HSFs*) در گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تنش شوری

سید حمیدرضا هاشمی پطرودی[1*]، قربانعلی نعمت‌زاده[2]، سمیرا محمدی[3]، مارکوس کولمن[4]

۱. استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. استاد گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴. گروه ژنتیک مولکولی، مؤسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی لیبنیز (IPK)، آلمان

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۶

چکیده

فاکتورهای شوک حرارتی (HSFs)، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در یوکاریوت‌ها ایفا می‌نمایند. هدف از اجرای این تحقیق، شناسایی ژن‌های فاکتور رونویسی *AlHSF* در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) است. بدین منظور شناسایی و تعیین مشخصه‌سازی ژن‌ها، ساختار ژنی، آنالیز موتیف‌های پروتئینی و روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی *AlHSF* مدنظر قرار گرفت. آنالیز الگوی بیان این ژن‌ها در دو بافت برگ و ریشه، تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری، با استفاده از داده‌های RNA-seq صورت پذیرفت. بر اساس توالی‌های ژنومی *A. littoralis*، 11 ژن *AlHSF* غیرتکراری و منحصربه‌فرد شناخته شدند. تمام ۱۱ فاکتور رونویسی AlHSF، بر اساس همولوژی با آرابیدوپسیس، به سه دسته (A، B و C) تقسیم شدند. بر اساس داده‌های RNA-seq، الگوی بیان ژن‌های *AlHSF* در بافت‌های برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری، متفاوت بود. سطح بیان متفاوت این ژن‌ها، می‌تواند به عملکردهای مولکولی و مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در کنترل فعالیت این ژن‌ها مرتبط باشد. یافته‌های این تحقیق، ضمن ارائه خصوصیات عملکردی ژن‌های *AlHSF*، پایه‌ای برای تحقیقات کاربردی آینده در مورد نقش بیولوژیکی آن‌ها در تحمل گیاه به تنش‌ها، فراهم می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: **آنالیز ترانسکریپتومیکس، آنالیز موتیف‌های پروتئینی، پروتئین‌های شوک حرارتی، ساختار ژنی**

مقدمه

گیاهان در طول دوره رشد و نمو خود، با تنش‌های غیر زیستی مختلفی، مانند سرما، گرما، خشکی و شوری مواجه می‌شوند که رشد و نمو، عملکرد و کیفیت آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در گیاهان، بسیاری از ژن‌ها می‌توانند تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی القاء شوند (Yokotani et al., 2013). بیان این ژن‌های القایی با فعال‌سازی طیف وسیعی از ژن‌های پایین‌دست مرتبط با تنش، می‌تواند تحمل گیاه را در برابر تنش غیر زیستی افزایش دهد (Hasegawa et al., 2000). یک مورد از این ژن‌های پاسخگو به تنش، ژن‌های شوک حرارتی هستند که پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) را کد می‌نمایند. آن‌ها در تاخوردگی، سرهم‌بندی، تثبیت، فعال‌سازی و تخریب پروتئین، در بسیاری از فرآیندهای طبیعی سلولی یا تحت شرایط تنش، دخیل هستند (Schöffl et al., 1998). اصولاً افزایش تجمع HSPها برای بقای سلول‌هایی که تحت تأثیر تنش‌های مختلف محیطی قرار دارند، ضروری است (Zhang et al., 2013). در سلول‌های یوکاریوتی، بیان ژن‌های شوک حرارتی عمدتاً در سطح رونویسی توسط فاکتورهای شوک حرارتی

* نگارنده پاسخگو: سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی. پست الکترونیک: shr.hashemi@sanru.ac.ir

(HSFs) تنظیم می‌شود (Liu et al., 2013). این فاکتورها از طریق شناسایی عناصر شوک حرارتی (HSEs) موجود در منطقه پروموتر HSPها، بیان آن‌ها را تنظیم می‌کنند (Nover et al., 2001).

همانند دیگر فاکتورهای رونویسی، یک ویژگی معمول در انتهای آمینی HSFها، وجود یک ساختار مارپیچ-پیچ-مارپیچ در دمین متصل‌شونده به DNA (DBD) آن‌هاست که از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار است و می‌تواند برای تشخیص دقیق واحدهای تکراری عناصر سیس HSE (5'-nGAAn-3') مورداستفاده قرار گیرد (Damberger et al., 1994). در کنار آن، یک دمین حفاظت‌شده دیگر بنام دمین الیگومریزاسیون (OD) قرار دارد. این دمین شامل تکرارهای هپتاد آب‌دوست (HR-A و HR-B) بوده که با تشکیل ساختار حلقوی، فرایند اتصال تریمر پروتئین HSF را به نواحی تنظیمی سیس مستقر در پروموتر ژن‌های شوک حرارتی تسهیل می‌نماید. علاوه بر دمین‌های DBD و OD، سیگنال ورود هسته‌ای (NLS) و سیگنال خروج هسته‌ای (NES) با درجه حفاظت‌شدگی کمتر در انتهای کربوکسیلی و در مجاورت دمین فعال‌کننده مستقر می‌باشند (Scharf et al., 2012). لازم به ذکر است HSFها بر اساس ساختار و ترکیب دمین‌هایشان در پلی‌پپتید، به سه دسته A، B و C طبقه‌بندی می‌شوند (Nover et al., 2001).

نقش HSFها در تنش‌های غیرزیستی مختلفی بررسی‌شده است. به‌طور مثال بیان هترولوگ HSF برنج در گیاه آرابیدوپسیس، منجر به افزایش تحمل آرابیدوپسیس تراریخت در برابر تنش غیر زیستی گردید (Yokotani et al., 2008). تنوع زیادی در عملکرد HSFهای گیاهی در پاسخ به شوک حرارتی وجود دارد. در بررسی برهم‌کنش‌های HSFها با HSPها و دیگر فاکتورهای رونویسی، مشخص‌شده، بیان HSFA1a گوجه‌فرنگی برای پاسخ به شوک حرارتی، ضروری است (Mishra et al., 2002). کارکرد HSFA2 و HSFA3 نیز در فعال‌سازی پروتئین‌های شوک حرارتی در پاسخ گیاه گوجه‌فرنگی به تنش گرمایی مشخص‌شده است (Scharf et al., 1998). در بررسی دیگر مشخص شد که HSFهای گیاهی در آرابیدوپسیس، به‌غیراز تنش گرمایی، تحت تأثیر سایر تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، خشکی و شوری نیز القاء می‌شوند و همپوشانی گسترده‌ای بین مسیرهای پاسخ به تنش گرمایی و سایر تنش‌های غیر زیستی وجود دارد (Swindell et al., 2007).

HSPها، نقش‌های قابل‌توجهی درزمینه تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان زراعی ایفا می‌نمایند (Singh et al., 2016). از این نظر شناسایی فاکتورهای رونویسی کنترل‌کننده این ژن‌ها، بسیار حائز اهمیت است. HSFها و ژن‌های کدکننده آن‌ها به‌طور گسترده‌ای در چندین گونه گیاهی تعیین خصوصیت شده‌اند، اما تاکنون گزارشی در مورد ساختار، سازمان‌دهی، روابط فیلوژنتیکی و الگوی بیان این ژن‌ها در گونه‌های هالوفیت ارائه نگردیده است؛ بنابراین شناسایی ساختار ژنی، بررسی موتیف و دمین‌های پپتیدی و الگوی بیان آن‌ها در یک‌گونه گیاهی متحمل به تنش، می‌تواند در درک کارکرد آن‌ها در مکانیسم مولکولی پاسخگو به تنش، مؤثر باشد.

گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*)، گیاهی هالوفیت و تک‌لپه از خانواده گندمیان با سیستم فتوسنتزی C4 است (Wang, 2004) که می‌تواند سطوح بالای شوری (عمدتاً کلرید سدیم) را تا بیش از ۶۰۰ میلی‌مولار تحمل نماید (Li et al., 1994). این گیاه، علاوه بر مقاومت به شوری، به‌عنوان گیاهی مقاوم به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود؛ بنابراین آلوروپوس لیتورالیس می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنتیکی غنی جهت شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با تحمل به شوری، خشکی و گرما برای اصلاح گیاهان زراعی در نظر گرفته شود (Hashemi et al., 2016; Faraji et al., 2017a; Faraji et al., 2017b). با توجه به تعیین توالی ژنوم گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، شناسایی ژن‌های *HSF* کد شده در ژنوم این گیاه، تعیین خصوصیت آن‌ها با استفاده از ابزارهای *in silico* و آنالیز الگوی بیان آن‌ها در تیمارهای تنش شوری، در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی توالی‌های HSF در آلوروپوس لیتورالیس

در این تحقیق جهت آنالیز گسترده ژنومی، از اطلاعات ژنوم رفرنس گیاه آلوروپوس لیتورالیس ارائه‌شده در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان استفاده گردید. این اطلاعات شامل ۱۵،۹۱۶ مدل ژن پیش‌بینی‌شده بوده که از تعیین‌توالی کامل ژنوم (WGS) آلوروپوس در سیستم HiSeq 2500 Illumina به‌دست‌آمده است (منتشرنشده).

به‌منظور شناسایی اعضای بالقوه خانواده ژنی *HSF* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، آنالیز هم‌ردیفی چندگانه بر مبنای

پروتئین‌های HSF گیاه مدل آرابیدوپسیس با ژنوم آلوروپوس صورت گرفت. بدین منظور، توالی‌های پروتئینی خانواده HSF گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا از پایگاه منابع اطلاعاتی آرابیدوپسیس، Tair (https://www. arabidopsis.org) دریافت شد.

آنالیز جستجوی TblastN با استفاده از توالی‌های پروتئینی HSF آرابیدوپسیس به‌عنوان query در توالی ژنوم آلوروپوس به‌صورت Local BLAST در نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) با E-value کمتر از 1E-10 انجام شد. توالی انتخابی بر اساس همسانی موردبررسی قرارگرفته و در ادامه توالی‌های تکراری حذف گردید. بررسی کانتیگ‌ها جهت شناسایی ژن با استفاده از نرم‌افزار آنلاین شناسایی و کشف ژن GeneScan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html) بر مبنای مدل ژنی آرابیدوپسیس صورت گرفت. تمام توالی‌ها به‌صورت دستی برای تأیید حضور دمین‌های HSF با استفاده از برنامه InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/ Tools /pfa/iprscan/) مورد آنالیز اولیه قرار گرفتند. پس از حذف پروتئین‌های ناقص و تکراری، درنهایت، توالی‌های CDS، پروتئینی و توالی‌های ژنومی این خانواده شناسایی گردید.

شناسایی ساختار اگزون-اینترون

با استفاده از توالی‌های CDS و توالی‌های ژنومی، ساختار اگزون-اینترون ژن‌های *AlHSF* در برنامه GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn) مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی موتیف‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی

موتیف‌های عملکردی یا دمین‌های توالی‌های پروتئینی AlHSF، با استفاده از پایگاه‌های ScanProsite (http://https://prosite.expasy.org/scanprosite)، Pfam (De Castro et al., 2006) (http://pfam.xfam.org/) (Finn et al., 2015) و InterProScan (https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search) (Jones et al., 2014) بررسی شدند. شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی‌های پروتئینی AlHSF در پایگاه شناسایی خانواده ژنی SALAD (https://salad.dna.affrc.go.jp/salad/) (Mihara et al., 2009) انجام شد. از موتیف‌های شناسایی‌شده، موتیف ۱ تا ۵ ابتدا مورد آزمون هم‌ردیفی قرارگرفته، سپس با استفاده از نرم‌افزار WebLogo3 (Crooks et al., 2004) به نمایش درآمدند. انوتیشن این ۵ موتیف نیز در نرم‌افزار PSSMSearch (http://slim.ucd.ie/pssmsearch/) (Krystkowiak et al., 2018) موردبررسی قرار گرفت. بررسی روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌ها بر مبنای موتیف‌های شناسایی‌شده در پایگاه SALAD انجام شد.

آنالیز ترانسکریپتومیکس

این بررسی در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان اجرا گردید. جهت بررسی بیان ژن‌های اورتولوگ شناسایی‌شده، از داده‌های RNA-seq گیاه آلوروپوس لیتورالیس استفاده شد. برای به دست آوردن داده‌های RNA-seq این گیاه، اعمال تنش شوری در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار بر روی گیاهان دوماهه صورت گرفت. نمونه‌برداری در زمان یک هفته پس از اعمال تنش شوری انجام شد. در ادامه، گیاهان باقیمانده به محیط هیدروپونیک فاقد نمک منتقل و نمونه‌برداری از گیاهان ریکاوری شده در مدت‌زمان یک هفته پس از انتقال به شرایط ریکاوری، صورت پذیرفت. فرآیند توالی‌یابی در دستگاه HiSeq 2500 شرکت Illumina به‌صورت دوطرفه (Paired-end) صورت پذیرفت. توالی جفت شده پس از تبدیل به فرمت FASTQ در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench Version 6.5 (CLC Bio, www.clcbio.com) با توجه به ژنوم رفرنس آلوروپوس آنالیز و سرهم‌بندی گردید. پس از سرهم‌بندی، شناسایی DEGها به‌صورت Log2FC در شرایط تنش شوری و ریکاوری صورت پذیرفت. بدین ترتیب که پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها است، بیان ژن‌های کاندید، موردبررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین‌مشخصه AlHSFها در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس

در بررسی گسترده ژنومی خانواده فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی (*AlHSFs*) در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، آنالیز همولوژی بر مبنای پروتئین‌های خانواده HSF گیاه آرابیدوپسیس با ژنوم آلوروپوس صورت گرفت که درنهایت، ۱۱ ژن شناسایی گردید. این ژن‌ها در ۱۱ کانتیگ مختلف

قرار داشتند (جدول ۱). جهت تأیید تعلق این پروتئین‌ها به خانواده فاکتورهای شوک حرارتی، توالی پروتئین‌های شناسایی‌شده، در سایت InterProScan موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد همه پروتئین‌ها با شناسه IPR027725 به خانواده پروتئینی HSF تعلق دارند. همین نتیجه در آنالیز BlastP نیز مورد تأیید مجدد قرار گرفت. با بررسی این پروتئین‌ها در پایگاه‌های بررسی دمین پروتئین، دمین‌های اختصاصی HSF نیز مشاهده گردید. در بررسی در پایگاه Pfam، همه پروتئین‌ها به‌جز دو مورد (Alg5238) AlHSFB1 و (Alg10245) AlHSFA6B.2 دارای دمین اختصاصی خانواده HSF با شناسه PF00447 بودند. بررسی در سایت InterProScan نشان داد که همه پروتئین‌ها به‌جز AlHSFA6B.2 دارای دمین HSF به شناسه IPR000232 بودند. در بررسی این پروتئین‌ها در سایت ScanProsite، هیچ Intra-domain features مشاهده نگردید. علاوه‌بر دمین متصل‌شونده HSF، همه پروتئین‌ها به‌جز AlHSFA6B.2 دارای دمین متصل شونده به DNA دیگری بنام winged-helix like به شناسه IPR036388 و IPR036390 بودند. اندازه توالی کدکننده این ژن‌ها، از ۵۰۴ جفت باز در ژن *AlHSFA6B.2* تا ۱۴۸۵ جفت باز در ژن *AlHSFA3* متغیر بود. طول پروتئین‌ها نیز از ۱۶۷ تا ۴۹۴ آمینواسید متغیر بود (جدول ۱).

HSFها در تمام موجودات زنده، پروتئین‌های حفاظت‌شده‌ای هستند؛ بااین‌حال، برخلاف حیوانات، گیاهان دارای تعداد بسیار بیشتری از ژن‌های کدکننده *HSF* می‌باشند. درحالی‌که برای دروزوفیلا و مخمر، تنها یک ژن و انسان، چهار ژن *HSF* گزارش‌شده، بیشتر گیاهان از چندین *HSF* برخوردارند. برای مثال این خانواده در آرابیدوپسیس ۲۱ و در برنج ۲۵ عضو دارد (Guo et al., 2008).

بر اساس بررسی‌های ساختاری، HSFهای گیاهی به ۳ دسته (A، B و C) و ۱۴ گروه تقسیم شدند. HSFهای دسته A، حاوی موتیف‌های پپتیدی کوتاه سرشار از اسیدآمینه‌های اسیدی (AHA)، آروماتیک و آب‌دوست، در دمین فعال‌سازی می‌باشند که برای عملکرد فعال‌کننده رونویسی ضروری هستند. HSFهای دسته B و C فاقد موتیف AHA بوده و هیچ‌گونه عملکرد فعال‌کننده‌ای ندارند (Doring et al., 2000). HSFهای دسته B نسبت به دسته A و C، بیشتر شبیه به HSFهای غیر گیاهی هستند، زیرا HSFهای دسته A و C، به دلیل اضافه شدن به‌ترتیب ۲۱ و ۷ اسیدآمینه، دارای منطقه HR-A/B بلندتری هستند (Chauhan et al., 2011). HSFهای دسته A، در فعال‌سازی رونویسی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (Shim et al., 2009)، درحالی‌که HSFهای دسته B، به‌عنوان بازدارنده‌های بیان ژن عمل می‌کنند. تحقیقات نشان داده است که HSFB1 در آرابیدوپسیس به‌عنوان یک بازدارنده عمل نموده، درحالی‌که در گوجه‌فرنگی، به‌عنوان فعال‌کننده رونویسی در کنار HSFهای دسته A عمل می‌کند (Ikeda et al., 2011).

در این مطالعه، ۱۱ ژن *AlHSF* شناسایی‌شده بر اساس همولوژی با آرابیدوپسیس، به ۳ دسته تقسیم‌بندی گردید. ۷ ژن متعلق به دسته A (*AlHSFAs*) و ۳ ژن متعلق به دسته B (*AlHSFBs*) بود و دسته C همانند آرابیدوپسیس دارای یک ژن بود که این ژن *AlHSFC1* (Alg11212) با ژن *ATHSFC1* (AT3G24520) آرابیدوپسیس، همولوگ بود. در ژن‌های دسته *AlHSFA*، زیردسته *AlHSFA6B* دارای ۴ عضو شامل: *AlHSFA6B.3*، *AlHSFA6B.4*، *AlHSFA6B.2* و *AlHSFA6B.1* بود و بقیه زیر دسته‌ها تک عضوی بودند (جدول ۱).

دسته A در آرابیدوپسیس، برنج و ذرت به‌ترتیب دارای ۱۵، ۱۳ و ۱۶ ژن بودند، درحالی‌که در دسته B در آرابیدوپسیس، برنج و ذرت به‌ترتیب ۵، ۸ و ۹ ژن مشاهده شد. دسته C، به‌عنوان تک ژن در آرابیدوپسیس حضور داشت، درحالی‌که در برنج و ذرت، چندین ژن در این دسته مشاهده شد.

در این بررسی، بر مبنای روابط پارالوژی و اورتولوژی، ژن‌های همولوگ آرابیدوپسیس که از پتانسیل افزایش تحمل به تنش برخوردار بودند در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس شناسایی شدند. برای مثال: ژن *AlHSFA1b* (Alg8767) آلوروپوس لیتورالیس با ژن *AtHSFA1b* (AT5G16820) آرابیدوپسیس، از اورتولوژی بالایی برخوردار بود. محققان بیان داشته‌اند که با بیش‌بیان ژن *AtHSFA1b* در آرابیدوپسیس، میزان تحمل به خشکی در گیاه بهبود می‌یابد (Bechtold et al., 2013). از سوی دیگر بیش‌بیان این ژن در گوجه‌فرنگی نیز، سبب افزایش تحمل به تنش سرما در گیاهان تراریخته گردید (Li et al., 2003).

شناسایی ساختار اگزون-اینترون

در این تحقیق، ساختار اگزون-اینترون ژن‌های *AlHSF* با استفاده از پایگاه GSDS، مورد آنالیز قرار گرفت. بلندترین طول ژن شناسایی‌شده با اندازه ۳۳۱۸ نوکلئوتید متعلق به ژن *AlHSFB1* بود (جدول ۱) که شامل دو اگزون کوتاه و یک اینترون بسیار بلند است. کوتاه‌ترین طول ژن نیز به *AlHSFA6B.2* تعلق داشت که فاقد اینترون بوده و تنها از یک اگزون، برخوردار بود. در کنجد نیز دو ژن *HSF* فاقد اینترون (*HSF5* و *HSF9*) شناسایی‌شده است (Dossa et al., 2016). بیشترین تعداد اگزون به ژن *AlHSFA6B.3* با تعداد ۶ اگزون، تعلق دارد. اکثر ژن‌ها دارای دو اگزون و یک اینترون بودند.

دمین متصل‌شونده به HSF DNA گیاهی، در دو اگزون مختلف کد می‌شود که توسط یک اینترون جدا می‌شوند. موقعیت این اینترون در تمام HSFها یکسان؛ ولی اندازه آن متغیر است (Nover et al., 2001). نتایج نشان داد که آلوروپوس لیتورالیس نیز از این امر مستثنی نبوده و اکثر ژن‌های *AlHSF* آن نیز از یک اینترون در دمین DBD برخوردارند (جدول ۱).

جدول ۱. تعیین‌مشخصه ژن‌های *AlHSF* در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس

Table 1. Genomic characteristics of *AlHSF* genes in *A. littoralis*

شماره ژن Gene ID	نام ژن Gene Name	ژن هومولوگ در آرابیدوپسیس Homologous gene in Arabidopsis	اندازه ژن Gene Size (bp)	اندازه پروتئین Protein Size (aa)	تعداد اگزون No. Exon	تعداد اینترون No. Intron	InterPr: IPR000232	Pfam: PF00447
Alg7835	*AlHSFA6B.4*	AT3G22830	2159	334	2	1	■	■
Alg3944	*AlHSFA6B.1*	AT3G22830	1625	352	3	2	■	■
Alg14568	*AlHSFA6B.3*	AT3G22830	2756	483	6	5	■	■
Alg8780	*AlHSFA3*	AT5G03720	2671	494	2	1	■	■
Alg11212	*AlHSFC1*	AT3G24520	1119	308	2	1	■	■
Alg11487	*AlHSFB4*	AT1G46264	2150	242	2	1	■	■
Alg10245	*AlHSFA6B.2*	AT3G22830	504	167	1	-	-	-
Alg8767	*AlHSFA1B*	AT5G16820	2460	410	3	2	■	■
Alg9626	*AlHSFB2A*	AT5G62020	1246	379	2	1	■	■
Alg5238	*AlHSFB1*	AT4G36990	3318	296	2	1	■	-
Alg1867	*AlHSFA4C*	AT5G45710	1839	434	2	1	■	■

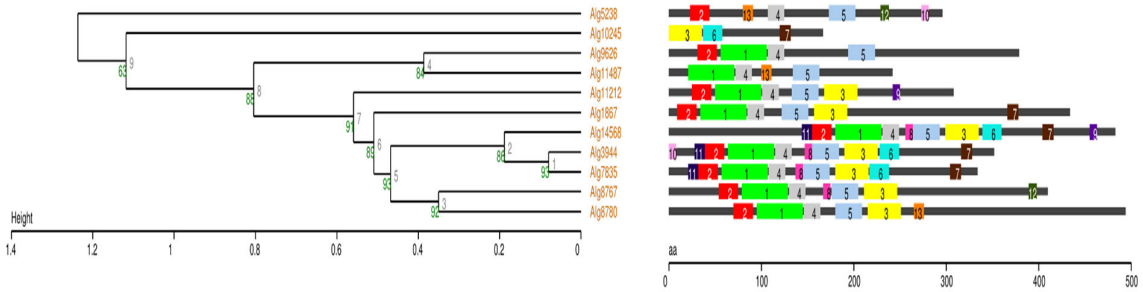
شناسایی موتیف‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی

با استفاده از توالی‌های آمینواسیدی ۱۱ AlHSF شناسایی‌شده، ۱۳ موتیف مختلف توسط پایگاه SALAD (شکل ۱) تشخیص داده شد. به‌جز AlHSFA6B.2 که فاقد موتیف‌های ۲، ۴ و ۵ و AlHSFB4 که فاقد موتیف ۵ می‌باشند، در اکثر AlHSFها، موتیف‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ وجود داشتند. حذف این موتیف‌ها می‌تواند در فرآیند تکاملی این خانواده در زمان تکثیر ژن صورت گرفته و منجر به کوتاه شدن منطقه کدکننده آن شده است. همچنین برخی از موتیف‌ها، تنها در پروتئین AlHSF خاصی حضور دارند. برای مثال، موتیف ۱۰ تنها در AlHSFA6B.1 و AlHSFB1 و موتیف ۱۲ فقط در AlHSFA6B.1 و AlHSFA1B وجود دارد.

درخت فیلوژنتیک، پروتئین‌ها را بر اساس وجود و توزیع موتیف‌های مختلف، به سه گروه تقسیم‌بندی نمود (شکل ۱). پروتئین‌های AlHSFA6B.2 و AlHSFB1 که از لحاظ حضور و توزیع موتیف با بقیه پروتئین‌ها متفاوت بودند، در دو گروه جداگانه و بقیه پروتئین‌ها که تقریباً دارای موتیف‌های مشابهی بودند در گروه دیگری قرار گرفتند. شناسایی ۱۳ موتیف مختلف در ۱۱ پروتئین مورد بررسی، با توجه به ویژگی‌ها و وظایف هر دمین، مبین کارکردهای چندگانه این پروتئین‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی مختلف است. بدیهی است پروتئین‌های دارای دمین مشابه که در یک گروه طبقه‌بندی گردیدند، احتمالاً از کارکرد مشابهی نیز برخوردار می‌باشند. تعداد، پراکنش و حفاظت‌شدگی برخی دمین‌ها، دلالت بر نقش حیاتی آن‌ها در کارکردشان دارد. لیائو و همکاران (Liao et al., 2017) بیان داشتند که جایگاه

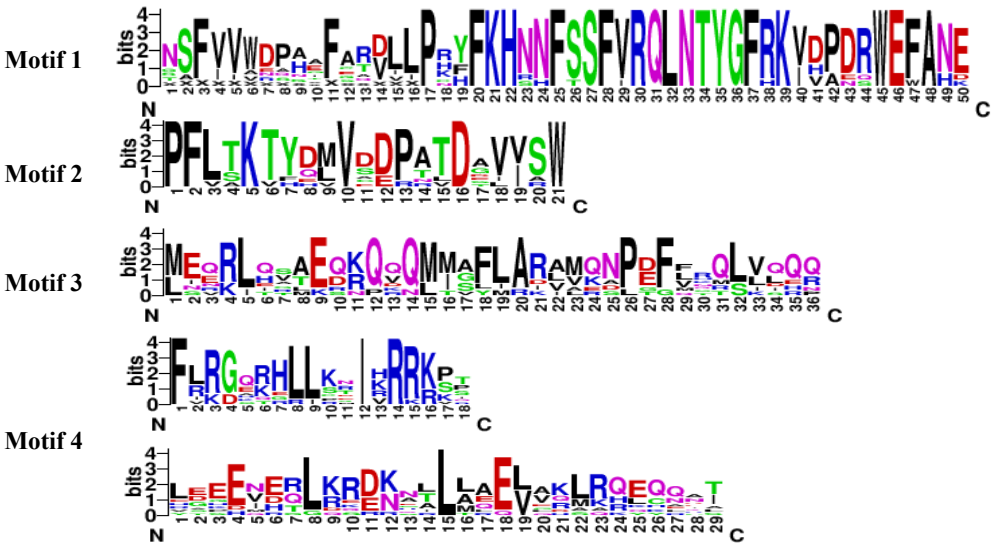
موتیف‌های مختلف در توالی پروتئینی مربوطه احتمالاً با بروز عملکرد متفاوت ژن‌ها مرتبط بوده که در زیرخانواده‌های مختلف وظایف متفاوتی دارند.

موتیف لوگوی موتیف‌های ۱ تا ۵ در شکل ۲ ارائه شده است. در بررسی انوتیشن این ۵ موتیف مشخص شد که موتیف ۱ دارای کارکرد Ubiquitin-associated protein2 با P-value (1.9e-07)، موتیف ۲ دارای کارکرد F-box only protein 34 با P-value (2.1e-06)، موتیف ۳ دارای کارکرد Dystrobrevin beta با P-value (1.5e-06)، موتیف ۴ دارای کارکرد Heat shock factor protein 2 با P-value (9.3e-08) و موتیف ۵ دارای کارکرد Protein SOGA3 با P-value (2.2e-06) است.



شکل ۱. موتیف‌های حفاظت‌شده فاکتورهای رونویسی AlHSF در آلوروپوس لیتورالیس. موتیف‌های شناسایی‌شده با شماره‌های ۱ تا ۱۳ با رنگ‌های مختلف و اندازه موتیف در پایین شکل، درخت فیلوژنتیک و اسامی اعضای AlHSF در سمت چپ شکل نشان داده‌شده است.

Fig. 1. Conserved motifs of AlHSF transcription factors in *A. littoralis*. The identified motifs were numbered from 1 to 13 with different colures, the motif sizes were indicated at the bottom of the figure, and the phylogenetic tree and names of the AlHSF members were shown on the left side of the figure

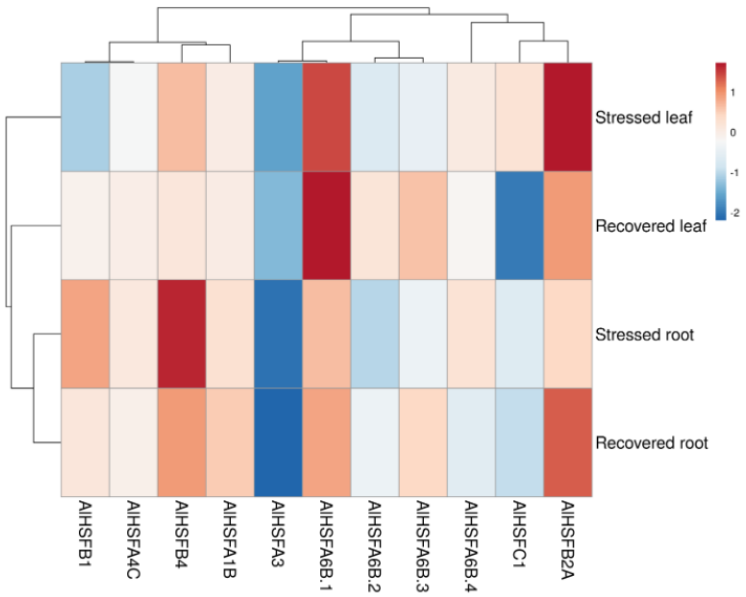


شکل ۲. موتیف لوگو توالی‌های فاکتور رونویسی AlHSF در آلوروپوس لیتورالیس، اندازه هر اسیدآمینه، بیانگر فراوانی آن در دمین مربوطه است

Fig. 2. Motif logos of AlHSF transcription factor sequences in *A. littoralis*, the height of the residue shows the relative frequency of each residue at that position

آنالیز ترانسکریپتومیکس

به‌منظور بررسی الگوی بیان این خانواده ژنی، آنالیز ترانسکریپتوم گیاه آلوروپوس لیتورالیس در دو بافت برگ و ریشه، در شرایط تنش شوری و ریکاوری، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله در مقیاس log2FC در نمودار Heatmap ارائه شد (شکل ۳). آنالیز بیان خانواده *AlHSF* نشان داد که ژن *AlHSFA6B.3*، فاقد بیان رونوشت در بافت‌های برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری بوده که حاکی از خاموش بودن این ژن در بافت‌ها و تنش مذکور است. لیو و همکاران (Liu et al., 2013) اظهار داشتند که بیان ناچیز و یا عدم‌تغییر بیان ژن‌های *HSF*، می‌تواند به این دلیل باشد که این ژن‌ها احتمالاً در پایین‌دست آبشار ژنی درگیر در شوک حرارتی قرار داشته و یا توسط سایر اعضای خانواده و نیز عوامل برهم‌کنشی و تنظیم‌کننده مسیر، خاموش می‌شوند. در سایر ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق، بیان ژن به‌صورت افزایش بیان یا کاهش بیان مشاهده شد. ژن *AlHSFB2A* دارای بیشترین میزان بیان (۱/۱۱) در بافت برگی و در شرایط تنش شوری (بیان بیش از دو برابری نسبت به شاهد) بود و بعد از آن، ژن *AlHSFA6B.1* با مقدار بیان ۰/۹۶ و ۰/۸۷، به‌ترتیب در شرایط تنش شوری و ریکاوری در بافت برگی، بیشترین بیان را داشت. بیشترین کاهش بیان در ژن‌های *AlHSFC1* و *AlHSFA3* به‌ترتیب با مقادیر ۲/۱۲- و ۲/۰۶- مشاهده گردید که این کاهش، ۴ برابر کمتر از بیان تیمار شاهد بود. ژن *AlHSFC1* پس از افزایش بیان مختصر در بافت برگی در تنش شوری، در شرایط ریکاوری، کاهش بیان شدید نسبت به شاهد نشان داد. بررسی بیان ژن به روش qPCR نشان داده است که ژن *OsHsfC1a* نیز در مراحل ابتدایی اعمال تنش شوک حرارتی، از بیان نسبتاً کمتری برخوردار بوده است (Liu et al., 2013). کاهش بیان شدید ژن *AlHSFA3* در بافت ریشه نشان از نقش آن به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در پاسخ به تنش شوری دارد. در بررسی لی و همکاران (Li et al., 2003) با بیش‌بیان هترولوگ *SlHSFA3* گوجه‌فرنگی در گیاه آرابیدوپسیس، میزان تحمل گیاه تراریخت آرابیدوپسیس به گرما افزایش یافت درحالی‌که با کاهش تحمل گیاه به شوری در مرحله جوانه‌زنی همراه بود؛ بنابراین عنوان شد که HSFA3 همولوگ می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در پاسخ به تنش شوری عمل نماید.



شکل ۳. نمایش Heatmap و خوشه‌بندی سلسله مراتبی ژن‌های *AlHSF* آلوروپوس لیتورالیس در دو بافت برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری

Fig. 3. Heat map representation and hierarchical clustering of *A. littoralis AlHSF* genes in leaf and root tissues under salinity stress and recovery conditions

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های *AlHSFB2A* و *AlHSFA6B.1* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت در پاسخ به تنش شوری عمل می‌کنند. دیگر تحقیقات نیز نقش مثبت این ژن‌ها را در شرایط تنش غیرزیستی تأیید نموده است. به‌طوری‌که بیان ژن‌های *AtHSFA6a* و *AtHSFA6b* در آرابیدوپسیس در شرایط تنش شوری و خشکی افزایش یافت (Hwang et al., 2014). در بررسی دیگری، بیان *AtHSFB2a* و *AtHSFB2b* آرابیدوپسیس با تنش گرما القاء شد، هرچند سطح بیان آن‌ها کمتر از *AtHSFB1* بود (Schramm et al., 2008). آنالیز بیان ژن‌های *OsHSF* در برنج نشان داد که برخی از *HSF* های دسته B به‌ویژه *OsHSFB2a*، *OsHSFB2b* و *OsHSFB2c* توسط تنش گرما در بافت‌های بذری بیان شدند. همان‌گونه که در نمودار Heatmap (شکل ۳) نشان داده‌شده است، الگوی متفاوتی از بیان ژن در خانواده ژنی *AlHSF* مشاهده گردید. این الگوی بیان متفاوت با توجه به وجود دمین‌های مشابه، می‌تواند به دلیل وجود عملکردهای مولکولی متفاوت و نیز مکانیسم‌های تنظیمی مختلف در کنترل فعالیت این ژن‌ها باشد. الگوی بیان ژن‌های *DcHSFs* در بافت‌های دو رقم هویج تحت تنش‌های غیرزیستی، نیز متفاوت بود. سطح بیان متفاوت این ژن‌ها به ظرفیت ترکیب متفاوت آن‌ها با عناصر تنظیمی سیس یا توالی فاکتورهای مختلف، نسبت داده شد (Huang et al., 2015). در آرابیدوپسیس، بیان HSFها بسته به مرحله رشدی و تنوع بافتی، از الگوی متفاوتی برخوردار بودند و بیان آن‌ها به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی مانند گرما، سرما، شوری و اسمزی القاء گردید (Swindell et al., 2007).

نتیجه‌گیری نهایی

بین پیام‌های صادرشده در تنش غیر زیستی و رشد و نمو گیاه رابطه متقابلی وجود دارد و بیان فاکتورهای رونویسی مختلف نقش مهمی در این رابطه متقابل ایفا می‌کند. فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی (*HSFs*) خانواده ژنی مهمی بوده که در رشد و نمو گیاه و همچنین در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی نقش دارند. درمجموع، ۱۱ ژن *AlHSF* در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس شناسایی و بر اساس همولوژی با آرابیدوپسیس، به سه دسته (A، B و C) تقسیم شدند. بر اساس داده‌های RNA-seq، در الگوی بیان ژن‌های *AlHSF* در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس لیتورالیس، تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری، برخی ژن‌ها افزایش و برخی نیز کاهش بیان داشتند که حاکی از تنظیمات مثبت و منفی در فرآیند بیان این ژن‌هاست. نتایج تحقیق نشان داد که الگوهای بیان متفاوت ژن‌های فاکتور رونویسی خانواده *AlHSF*، با توجه به وجود دمین‌های مشابه، می‌تواند مرتبط با عملکردهای مولکولی و یا مکانیسم‌های تنظیمی مختلف در کنترل فعالیت ژن‌ها باشد. نتایج این تحقیق، اطلاعات مفیدی را جهت کاوش در مکانیسم فاکتورهای رونویسی *AlHSF* ارائه می‌دهد، ضمن اینکه اطلاعات مفیدی در خصوص فاکتورهای رونویسی فعال در گیاه آلوروپوس لیتورالیس در مواجهه با تنش شوری فراهم می‌نماید.

قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره T234/96 و با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس و قدردانی خود را اعلام نمایند.

منابع

Chauhan, H., Khurana, N., Agarwal, P., Khurana, P., 2011. Heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics. 286(2), 171.

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence

Bechtold, U., Albihlal, W.S., Lawson, T., Fryer, M.J., Sparrow, P.A., Richard, F., Persad, R., Bowden, L., Hickman, R., Martin, C., 2013. Arabidopsis HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTORA1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. Journal of Experimental Botany. 64(11), 3467-3481.

logo generator. Genome Research. 14(6), 1188-1190.

Damberger, F.F., Pelton, J.G., Harrison, C.J., Nelson, H.C., Wemmer, D.E., 1994. Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. Protein Science. 3(10), 1806-1821.

De Castro, E., Sigrist, C.J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. Nucleic Acids Research. 34, 362-365.

Döring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A., Nover, L., 2000. The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. The Plant Cell. 12(2), 265-278.

Dossa, K., Diouf, D., Cissé, N., 2016. Genome-wide investigation of Hsf genes in sesame reveals their segmental duplication expansion and their active role in drought stress response. Frontiers in Plant Science. 7, 15-22.

Faraji, S., Najafi-Zarrini, H., Hashemi-Petroudi, S., Ranjbar, G., 2017a. AlGLY I gene implicated in salt stress response from halophyte Aeluropus littoralis. Russian Journal of Plant Physiology. 64(6), 850-860.

Faraji, S., Najafi-Zarrini, H., Hashemi-Petroudi, S.H., Ranjbar, G.A., 2017b. Comparative expression profiling of four salt-inducible genes from Aeluropus littoralis. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. 6(1), 1-7.

Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., 2015. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Research. 44, 279-285.

Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, Y., Wang, J., 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. Journal of Genetics and Genomics. 35(2), 105-118.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41, 95-98.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Biology. 51(1), 463-499.

Hashemi, S.H., Nematzadeh, G., Ahmadian, G., Yamchi, A., Kuhlmann, M., 2016. Identification and validation of Aeluropus littoralis reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. Journal of Biological Research-Thessaloniki. 23, 18.

Huang, Y., Li, M.-Y., Wang, F., Xu, Z.-S., Huang, W., Wang, G.-L., Ma, J., Xiong, A.-S., 2015. Heat shock factors in carrot: genome-wide identification, classification, and expression profiles response to abiotic stress. Molecular Biology Reports. 42(5), 893-905.

Hwang, S.M., Kim, D.W., Woo, M.S., Jeong, H.S., Son, Y.S., Akhter, S., Choi, G.J., Bahk, J.D., 2014. Functional characterization of Arabidopsis HsfA6a as a heat-shock transcription factor under high salinity and dehydration conditions. Plant, Cell & Environment. 37(5), 1202-1222.

Ikeda, M., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., 2011. Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b act as repressors for the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. Plant Physiology. 157(3), 1243–1254.

Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., Mcanulla, C., Mcwilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. 30(9), 1236-1240.

Krystkowiak, I., Manguy, J., Davey, N.E., 2018. PSSMSearch: a server for modeling, visualization, proteome-wide discovery and annotation of protein motif specificity determinants. Nucleic Acids Research. 46, 235-241.

Li, H.-Y., Chang, C.-S., Lu, L.-S., Liu, C.-A., Chan, M.-T., Charng, Y.-Y., 2003. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (AtHsfA1b) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 44(2), 129-140.

Li, M., Liu, Y., 1994. Halophytes of yellow river delta in north Shandong province of China. Journal of Qufu Normal University. 125-133.

Liao, Y., Liu, S., Jiang, Y., Hu, C., Zhang, X., Cao, X., Xu, Z., Gao, X., Li, L., Zhu, J., 2017. Genome-wide analysis and environmental

response profiling of dirigent family genes in rice (*Oryza sativa*). Genes & Genomics. 39(1), 47-62.

Liu, Y., Zhang, C., Chen, J., Guo, L., Li, X., Li, W., Yu, Z., Deng, J., Zhang, P., Zhang, K., 2013. Arabidopsis heat shock factor HsfA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. Plant Physiology and Biochemistry. 64, 92-98.

Mihara, M., Itoh, T., Izawa, T., 2009. SALAD database: a motif-based database of protein annotations for plant comparative genomics. Nucleic Acids Research. 38, 835-842.

Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L., Scharf, K.-D., 2002. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. Genes & Development. 16(12), 1555-1567.

Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.-D., 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress & Chaperones. 6(3), 177.

Scharf, K.-D., Berberich, T., Ebersberger, I., Nover, L., 2012. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 1819(2), 104-119.

Scharf, K.-D., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., Nover, L., 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. Molecular and Cellular Biology. 18(4), 2240-2251.

Schöffl, F., Prändl, R., Reindl, A., 1998. Regulation of the heat-shock response. Plant Physiology. 117(4), 1135-1141.

Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., Von Koskull-Döring, P., 2008. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. The Plant Journal. 53(2), 264-274.

Shim, D., Hwang, J.-U., Lee, J., Lee, S., Choi, Y., An, G., Martinoia, E., Lee, Y., 2009. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. The Plant Cell. 21(12), 4031-4043.

Singh, R.K., Jaishankar, J., Muthamilarasan, M., Shweta, S., Dangi, A., Prasad, M., 2016. Genome-wide analysis of heat shock proteins in C4 model, foxtail millet identifies potential candidates for crop improvement under abiotic stress. Scientific Reports. 6, 32641.

Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P., 2007. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. BMC Genomics. 8, 125.

Wang, R., 2004. Plant functional types and their ecological responses to salinization in saline grasslands, Northeastern China. Photosynthetica. 42(2), 511-519.

Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., Hirochika, H., Iwabuchi, M., Oda, K., 2008. Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic Arabidopsis. Planta. 227(5), 957-967.

Zhang, J., Li, J., Liu, B., Zhang, L., Chen, J., Lu, M., 2013. Genome-wide analysis of the Populus Hsp90 gene family reveals differential expression patterns, localization, and heat stress responses. BMC Genomics. 14(1), 532.

.

University of Birjand
Faculty of Agriculture

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences
Vol. 13, No. 2, pp. 571-581
Summer 2020
http://dx.doi.org/ 10.22077/escs.2019.2109.1534

Original article

Expression pattern analysis of heat shock transcription factors (*HSFs*) gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress

S.H.R. Hashemi-Petroudi[1*], Gh.A. Nematzadeh[1], S. Mohammadi[2], M. Kuhlmann[3]

1. Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.
2. PhD candidate in Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.
3. RG Abiotic Stress Genomics/RG Heterosis, Department Molecular Genetics, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK). Germany.

Received 22 December 2018; Accepted 23 January 2019

Abstract

Heat shock factors (HSFs) play key role in the response to abiotic stresses in eukaryotes. The present study aimed to characterize the *AlHSF* transcription factor genes in *Aeluropus littoralis* halophyte plant. For this purpose, identification and characterization of genes, gene structure, protein motifs analysis, and phylogenetic relationships of the *AlHSF* gene family were considered. Expression pattern analysis of these genes in two tissues of leaf and root under salinity stress and recovery conditions was performed using RNA-seq. Based on *A. littoralis* genome sequences, 11 nonredundant and unique *AlHSF* genes were identified. All 11 *AlHSFs* were divided into three classes (A, B, and C), based on homology with Arabidopsis. The expression pattern of *AlHSFs* genes were different in leaf and root tissues under salinity stress and recovery conditions, based on RNA-seq data. The different expression level of these genes may relate to different regulatory mechanisms and molecular functions for controlling the activity of these genes. The findings of this study reveal the functional characteristics of the *AlHSF* genes and provide a foundation for future functional research regarding their biological roles in plant tolerance to stress.

***Keywords*:** Gene structure, Heat shock proteins, Protein motifs analysis, Transcriptomics analysis

*Correspondent author: Seyed Hamid Reza Hashemi-Petroudi; E-Mail: shr.hashemi@sanru.ac.ir.