

شناسایی، طبقه‌بندی و آنالیز بیان خانواده ژنی عوامل رونویسی *DREB* در گیاه آلورپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) تحت تنش شوری

سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی* و سمیرا محمدی

ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۱۷

چکیده

خانواده ژنی *DREB* یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی است که نقش‌های مهمی در تنظیم رشد گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی خارجی ایفا می‌کنند. با توجه به تعیین توالی ژنوم گیاه هالوفیت آلورپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) فرصتی برای آنالیز گسترده ژنومی ژن‌های خانواده ژنی *DREB* فراهم شد. در مجموع، ۱۶ ژن غیرتکراری رمزکننده *DREB* در ژنوم آلورپوس شناسایی شد. در این پژوهش، ساختارهای ژنی، روابط فیلوژنتیکی، ترکیب موتیف‌ها و الگوهای بیان ژن‌های *DREB* تحت تنش شوری و بازیابی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ساختار فیلوژنی نشان داد که ژن‌های خانواده ژنی *DREB* آلورپوس بر مبنای همولوژی با گیاه مدل آراییدوپسیس تالیانا به ۵ گروه A1، A2، A4، A5 و A6 تقسیم‌بندی شدند. آنالیز ساختارهای ژنی و ترکیب موتیف‌ها نشان داد که این ژن‌ها در هر گروه از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار بوده که احتمالاً حاکی از کارکردهای مشابه اعضای هر گروه می‌باشد. براساس داده‌های تعیین‌توالی RNA، ژن‌های *AIDREB6.2* و *AIDREB6.3* بیشترین بیان را در شرایط تنش شوری در بافت ریشه به نمایش گذاشتند. بیشترین کاهش بیان نیز در ژن‌های *AIDREB6.4* و *AIDREB6.3* در شرایط بازیابی در بافت برگ مشاهده شد. نتایج این تحقیق می‌تواند پایه‌ای برای تجزیه و تحلیل کارکردی ژن‌های *DREB* آلورپوس برای درک نقش‌های زیست‌شناختی آن‌ها فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: آلورپوس لیتورالیس، بیان ژن، تنش شوری، روابط فیلوژنتیکی، عوامل رونویسی *DREB*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۳۶۸۷۷۴۷، پست الکترونیکی: shr.hashemi@sanru.ac.ir

مقدمه

راه‌انداز ژن‌های هدف، تنظیم کنند. محصولات این ژن‌ها بعنوان پروتئین‌های تنظیم‌کننده عمل می‌کنند و در نتیجه باعث افزایش تحمل گیاه در برابر تنش می‌شوند. عوامل رونویسی پاسخ‌دهنده به دهیدراسیون (DREB = Dehydration-responsive element-binding protein)، نقش حیاتی در تنظیم رشد گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی خارجی ایفا می‌کنند (۵).

خانواده AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor)، یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های عوامل رونویسی در

تنش‌های محیطی مانند شوری اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاهان دارند. گیاهان در طول تکامل، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی متنوعی را جهت دفاع در برابر شرایط نامطلوب محیطی، توسعه داده‌اند. بطور کلی، تنش‌ها موجب القای بیان ژن‌های خاصی می‌شوند که محصولات این ژن‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در مکانیسم دفاعی در برابر تنش‌های گیاهی برعهده دارند (۱). عوامل رونویسی می‌توانند مجموعه‌ای از ژن‌های تحت کنترل خود را از طریق اتصال اختصاصی به عناصر تنظیمی سیس موجود در

خانواده بدلیل نقش آنها در تنش هیدراسیون بوده ولی تاکنون کارکردهای متنوع دیگری نیز برای اعضای این خانواده ژنی شناسایی شده است. بعنوان مثال، ژن *DREB1D/CBF4* در تحمل گیاه به تنش خشکی نقش دارد، در حالی که همولوگ آن ژن *DREB1A/CBF3* در پاسخ به تنش سرما عمل می‌کند (۱۸). مشخص شده است که ژن *DREB1C/CBF2* بعنوان تنظیم‌کننده منفی، با کنترل بیان ژن‌های *DREB1A/CBF3* و *DREB1B/CBF1*، پاسخ گیاه به تنش سرما را بشدت کنترل می‌کند. گزارش شده است که *DREB2C* در تحمل به گرما به جای تحمل به خشکی نقش دارد (۳۶). تنوع عملکردی ژن‌های مختلف *DREB* علی‌رغم همولوژی بالای توالی آنها، بررسی عملکردی و مولکولی اعضای این خانواده ژنی را جهت درک مکانیسم‌های تنظیمی حاکم در بیان این ژن‌ها اجتناب‌ناپذیر می‌نماید.

در ذرت، بررسی دو ژن *DREB* (*ZmDREB1A* و *ZmDREB2A*) بترتیب متعلق به زیرگروه‌های *DREB1* و *DREB2* نشان داد که این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی بیشتر بیان می‌شوند (۴۸ و ۴۹). مشخص شد که به غیر از ژن *DREB2A* آراییدوپسیس، بیان ژن *ZmDREB2A* در پاسخ به تنش غیرزیستی از طریق یک مکانیسم پیرایش متناوب (Alternative splicing) تنظیم شده، که پروتئین بیان شده بطور مستقیم بیان ژن پایین‌دست را فعال می‌نماید (۴۸). یافته‌های مشابه در برنج، گندم و جو، حاکی از وجود مکانیسمی است که به‌دقت فعالیت ژن‌های فاکتور رونویسی القاء‌شونده تحت تنش را تنظیم می‌کند و نشان می‌دهد که این مکانیسم مولکولی در گیاهان تک‌لپه و دولپه متفاوت است (۸، ۴۵ و ۶۲). این مشاهدات تأکیدی بر اهمیت شناسایی ژن‌های خانواده *DREB* برای درک مکانیسم‌های انتقال سیگنال برای بهبود به تنش در گیاهان است.

گیاهان می‌باشد که با حضور دمین اتصال به DNA نوع AP2/ERF مشخص می‌شوند. این دمین متشکل از ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینو می‌باشد که از درجه حفاظت‌شدگی بالایی برخوردارند (۶۱). عوامل رونویسی *DREB*، یک زیرگروه بزرگ متعلق به خانواده AP2/ERF است که نقش مهمی در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در مسیر مستقل از ABA ایفا می‌کنند (۵۶). در ناحیه راه‌انداز بسیاری از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش غیرزیستی (مانند خشکی، شوری، سرما و گرما)، عناصر تنظیمی سیس به نام *DRE/CRT* قرار دارند. موتیف 5'-A/GCCGAC-3' هسته توالی *DRE* می‌باشد که در ناحیه راه‌انداز این ژن‌ها از درجه حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار است. عوامل رونویسی *DREB* با اتصال به ناحیه *DRE/CRT*، بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش غیرزیستی را تنظیم می‌کنند (۵۲ و ۶۳). عوامل رونویسی *DREB* در آراییدوپسیس، بر اساس مشخصات ساختاری به ۶ زیرگروه A-1 تا A-6 تقسیم شدند (۵۲).

این عوامل رونویسی بطور کلی در تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند انجماد (۲۸)، خشکی (۲۵)، گرما (۴۸)، شوری (۲۵) و اسمری (۱۳) نقش دارند. بعنوان مثال می‌توان به بیش‌بیان (Overexpression) ژن *DREB1A/CBF3* در گیاه آراییدوپسیس اشاره نمود که به افزایش قابل توجه تحمل گیاه در برابر تنش‌های خشکی، انجماد و شوری بالا منجر شد (۳۱ و ۴۰). بیش‌بیان ژن *DREB2A* در گیاه آراییدوپسیس تالیانا نیز موجب القاء بیان ژن‌های پاسخگو به تنش خشکی و گرما شده که با افزایش تحمل به تنش‌های خشکی، گرما و شوری بالا همراه بود (۵۳). لازم بذکر است فعالیت و میزان بیان ژن *DREB2A* تحت تنش‌های خشکی و گرما، بشدت تحت تأثیر تغییرات بعد از رونویسی (۵۰) و عناصر تنظیمی سیس موجود در ناحیه پروموتری (۳۲) کنترل می‌شود.

در گیاهان، گروه ژنی *DREB* بصورت خانواده ژنی و از چندین عضو برخوردار می‌باشد. گرچه وجه تسمیه این

باتوجه به تعیین‌توالی ژنوم گیاه هالوفیت آلروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) در پژوهش‌شکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان (منتشر نشده)، فرصتی برای تجزیه و تحلیل و شناخت ژن‌های خانواده *DREB* در یک گونه متحمل به تنش از خانواده گندمیان، فراهم شد. گیاه آلروپوس لیتورالیس گیاهی است تک‌لپه و ۴C که می‌تواند سطوح بالای شوری (بطور معمول کلرید سدیم) را تا بیش از ۶۰۰ میلی‌مولار تحمل کند و بیشتر در سواحل دریاها و دریاچه‌های شور، کنار جاده و چمنزارهای رودخانه‌ای می‌رویند (۲). این گیاه، علاوه بر مقاومت به شوری، بعنوان گیاهی مقاوم به خشکی و گرما نیز محسوب می‌شود (۱۶)، ۲۴، ۳۰ و ۶۵). با اشاره به اهمیت آلروپوس لیتورالیس بعنوان یک منبع ژنتیکی غنی جهت شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با تحمل به شوری، خشکی و گرما برای اصلاح گیاهان زراعی (۹، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳) و همچنین نقش ژن‌های *DREB* در مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها، این بررسی بعنوان اولین مطالعه کارکردی ژن‌های *DREB* در این گیاه صورت گرفت. در این مطالعه، برای تعیین رابطه ساختار-عملکرد ژن‌های خانواده *DREB* در این گیاه، بررسی گسترده ژنومی این ژن‌ها انجام شد و روابط فیلوژنتیکی ژن‌های *DREB1* و *DREB2* در آلروپوس، آراییدوپسیس، برنج و ذرت نیز مدنظر قرار گرفت. در نهایت، برای درک بیشتر کارکرد این ژن‌ها، الگوی بیان آن‌ها در دو بافت برگ و ریشه و پاسخ‌های آن‌ها در شرایط تنش شوری و بازیابی، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

شناسایی اعضای خانواده ژنی *DREB* در آلروپوس لیتورالیس: در این مطالعه جهت شناسایی اعضای خانواده ژنی *DREB* در آلروپوس لیتورالیس، ابتدا توالی‌های پروتئینی ژن‌های خانواده *AP2/ERF* برنج و آراییدوپسیس، برتیب از پایگاه‌های داده RGAP (http://rice.plantbiology.msu.edu/) و TAIR

InterProScan (https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-) و Pfam (http://pfam.xfam.org/) (۲۹)، SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) (۳۴) انجام شد. در نهایت، توالی دمن‌های *AP2* پروتئین‌های *AP2/ERF* شناسایی شده در آلروپوس لیتورالیس با استفاده از پایگاه SMART به‌دست آمد و این توالی‌ها برای شناسایی ژن‌های *DREB* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های *DREB* با استفاده از ابزار ProtParam از پایگاه اطلاعاتی ExPASy (https://web.expasy.org/protparam/) برآورد شد (۱۴). بمنظور شناسایی جایگاه سلولی پروتئین‌ها از برنامه WoLF PSORT (https://wolfsort.hgc.jp/) استفاده شد (۲۶).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و هم‌ردیف‌سازی خانواده ژنی *DREB* در آلروپوس لیتورالیس: جهت بررسی روابط تکاملی میان اعضای یک خانواده ژنی ابتدا بایستی تجزیه و تحلیل هم‌ردیف‌سازی صحیح صورت گیرد، سپس درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم مناسب ترسیم شود. ابتدا هم‌ردیف‌سازی توالی‌های پروتئینی *DREB* به‌دست آمده از آلروپوس با استفاده از نرم‌افزار ClustalW صورت گرفت (۵۸). با استفاده از نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی، درخت فیلوژنتیکی این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 (۵۷) بر مبنای روش اتصال همسایه

سطح بیان آن‌ها بود، بیان ژن‌های کاندید، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج به‌دست آمده در نمودار Heatmap ترسیم شده توسط نرم‌افزار CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do/>) ارائه شد (۵۴).

نتایج

شناسایی اعضای خانواده ژنی DREB در آلوروپوس لیتورالیس: جهت شناسایی ژن‌های DREB بالقوه در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، از الگوریتم tBLASTn توالی‌های پروتئینی خانواده AP2/ERF آرابیدوپسیس و برنج با ژنوم آلوروپوس استفاده شد. بر این اساس پس از حذف توالی‌های تکراری، ۶۷ توالی پروتئینی شناسایی شد. نتایج بررسی پروتئین‌ها در پایگاه‌های InterProScan، Pfam و SMART مشخص کرد که تمام توالی‌های شناسایی شده دارای دمین AP2 هستند. سپس توالی دمین‌های AP2 پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه SMART به‌دست آمد. با بررسی توالی دمین‌های AP2 و همولوژی با ژن‌های آرابیدوپسیس، ۱۶ توالی کدکننده DREB بعنوان اعضای خانواده DREB در گیاه آلوروپوس لیتورالیس شناسایی شدند. جهت نام‌گذاری ژن‌های DREB آلوروپوس، ابتدا پیشوند Al برگرفته از گیاه *A. littoralis* و سپس DREB و در نهایت شماره‌گذاری براساس گروه‌بندی ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی انجام گرفت. این شیوه‌نام‌گذاری بیشتر در مورد ژن‌های DREB ذرت و جو نیز استفاده شده است (۱۷ و ۴۱). طول پروتئین‌های این خانواده از ۱۵۹ (AIDREB5.3) تا ۴۴۸ اسیدآمینه (AIDREB6.1) متغیر بود. وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۱۷/۴۰ تا ۴۸/۴۸ کیلودالتون بود. شاخص ایزوالکتریک پروتئین‌های مورد مطالعه متغیر و در محدوده ۴/۹۱ در AIDREB5.2 تا ۹/۹۰ در AIDREB5.3 بود (جدول ۱).

یکی از ویژگی‌های کلیدی در بررسی کارکرد پروتئین‌ها، مکان‌یابی سلولی است که می‌تواند در فعالیت سلولی

(NJ) با آزمون بوت‌استرپ (۱۱) با تکرار ۱۰۰۰ ترسیم شد. همچنین درخت فیلوژنتیکی توالی‌های DREB1 و DREB2 آلوروپوس، آرابیدوپسیس، برنج و ذرت براساس هم‌ردیف‌سازی دمین کارکردی رسم شد.

تجزیه و تحلیل ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده: از طریق مقایسه توالی‌های کدکننده CDS و ژنومی مربوط به هر ژن، ساختار اگزون-اینترن ژن‌های DREB در آلوروپوس با استفاده از برنامه GSDB (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) ترسیم شد (۲۷). بمنظور شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی‌های پروتئینی DREB آلوروپوس، از برنامه MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) استفاده شد (۴). پارامترهای مورد استفاده شامل شناسایی حداکثر ۱۵ موتیف، و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها بترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمینه بود. علاوه بر این، تمامی موتیف‌های شناسایی شده براساس پایگاه اطلاعاتی InterProScan مستندسازی شدند.

تنش شوری و بررسی الگوی بیان ژن‌های DREB در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس: برای بررسی بیان ژن‌های DREB در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس تحت تنش شوری، از داده‌های RNA-seq استفاده شد. ابتدا بر روی گیاهان دو ماهه، تنش شوری در غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار اعمال شد. سپس یک هفته پس از اعمال تنش شوری، نمونه‌برداری از دو بافت برگ و ریشه صورت گرفت. در ادامه، گیاهان باقیمانده به محیط هیدروپونیک فاقد نمک منتقل و یک هفته پس از انتقال به شرایط بازیابی، از بافت‌های برگ و ریشه نمونه‌برداری صورت پذیرفت. سپس، فرایند توالی‌یابی در دستگاه HiSeq 2500 شرکت Illumina انجام گرفت. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به‌صورت Log2FC در شرایط تنش شوری و بازیابی با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench Version 6.5 (www.clcbio.com) بررسی شد. بدین ترتیب که پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و

مشارکت داشته باشد و بطور کارآمدی در انتخاب جایگاه
درست سلولی عمل کند (۶۴). مکان‌یابی پروتئین‌ها
مشخص نمود که ۱۴ پروتئین از ۱۶ پروتئین DREB
شناسایی شده در هسته و پروتئین‌های AIDREB5.1 و
AIDREB6.4 بترتیب در سیتوپلاسم و کلروپلاست، فعال
هستند (جدول ۱).

جدول ۱- تعیین مشخصه ژن‌های DREB در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس

نام ژن	شماره ژن	طول پروتئین	طول ژن	طول CDS	تعداد اگزون	تعداد اینترون	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	جایگاه سلولی
AIDREB 1.1	Alg12355	222	669	669	1	0	24.38	4.94	nucl: 10, mito: 2, chlo: 1, cysk: 1
AIDREB 2.1	Alg655	253	762	762	1	0	28.03	6.45	nucl: 11, cyto: 2, vacu: 1
AIDREB 2.2	Alg6392	390	2747	1173	4	3	43.07	4.96	nucl: 9, cyto: 4, chlo: 1
AIDREB 2.3	Alg13463	253	1462	762	2	1	28.29	6.21	nucl: 13, plas: 1
AIDREB 4.1	Alg2745	210	633	633	1	0	22.62	5.30	nucl: 14
AIDREB 4.2	Alg9994	233	702	702	1	0	24.78	5.43	nucl: 13, cyto: 1
AIDREB 4.3	Alg14808	259	780	780	1	0	27.33	5.00	nucl: 13, cyto: 1
AIDREB 5.1	Alg1100	212	639	639	1	0	22.85	5.26	cyto: 10, nucl: 2, chlo: 1, mito: 1
AIDREB 5.2	Alg2574	228	687	687	1	0	24.10	4.91	nucl: 7, mito: 5, chlo: 1, extr: 1
AIDREB 5.3	Alg10270	159	480	480	1	0	17.40	9.90	nucl: 11, mito: 2, cyto: 1
AIDREB 5.4	Alg14923	237	714	714	1	0	24.38	5.20	nucl: 8, chlo: 3, extr: 3
AIDREB 6.1	Alg3883	448	1347	1347	1	0	48.48	7.91	nucl: 14
AIDREB 6.2	Alg6105	296	891	891	1	0	31.50	6.75	nucl: 9.5, nucl_plas: 5.5, mito: 2, chlo: 1, cyto: 1
AIDREB 6.3	Alg8903	286	861	861	1	0	30.54	6.45	nucl: 13, cyto: 1
AIDREB 6.4	Alg9431	279	840	840	1	0	30.53	9.05	chlo: 12, nucl: 2
AIDREB 6.5	Alg12885	436	1311	1311	1	0	46.81	8.73	nucl: 14

اعداد نمایش داده شده در جایگاه سلولی؛ بر مبنای جایگاه‌های پیش‌بینی شده بر اساس مشابهت با جایگاه ژنی ۱۴ ژن همولوگ بر مبنای الگوریتم Nearest Neighbors (نزدیکترین همسایه) می‌باشد.

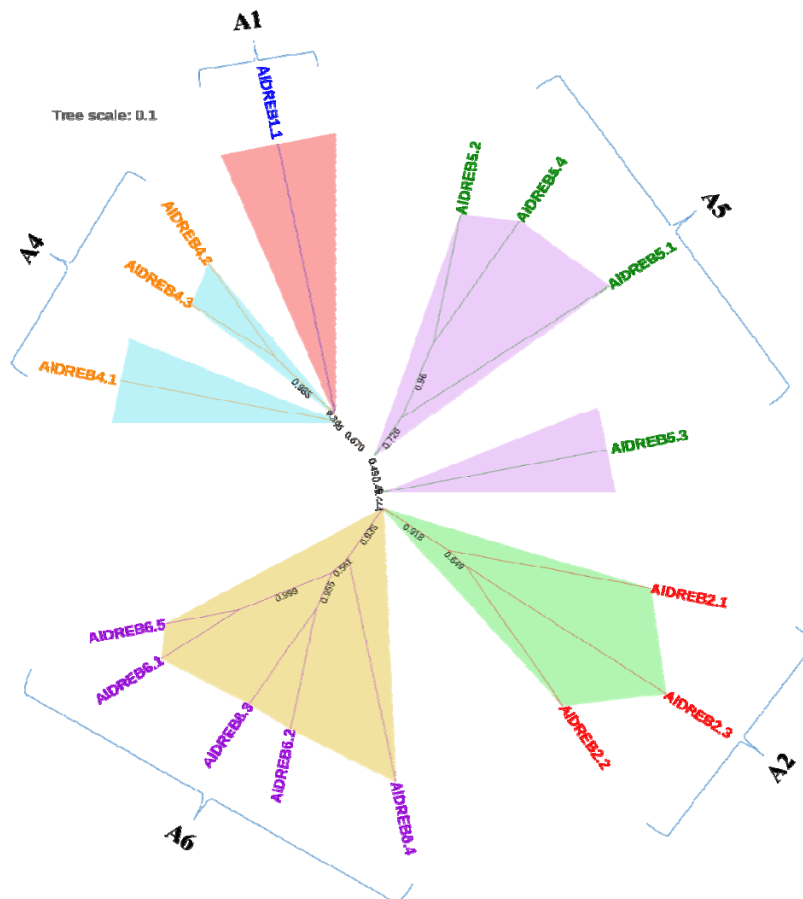
یک ژن در گروه A1، ۳ ژن در گروه A2، ۳ ژن در گروه A4، ۴ ژن در گروه A5، و ۵ ژن در گروه A6 قرار گرفت (شکل ۱) نام‌گذاری این گروه‌ها براساس همولوژی با آرابیدوپسیس، صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل هم‌ردیف‌سازی نشان داد که پروتئین‌های DREB دارای همولوژی بالایی در دمین AP2/ERF و حاوی یک موتیف WLG حفاظت شده در دمین AP2/ERF آلوروپوس هستند (شکل ۲). در پروتئین‌های

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و هم‌ردیف‌سازی خانواده ژنی DREB در آلوروپوس لیتورالیس؛ بمنظور دسته‌بندی ژن‌های DREB شناسایی شده در آلوروپوس لیتورالیس، ابتدا هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های پروتئینی ژن‌های DREB صورت گرفت، سپس درخت فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئینی مربوطه بر مبنای روش اتصال همسایه (NJ) ترسیم شد. ۱۶ ژن DREB آلوروپوس به ۵ گروه A1، A2، A4، A5 و A6، تقسیم‌بندی شدند. به این ترتیب که

علاوه‌براین، ژن‌های *DREB1* A1 و *DREB2* A2 در آرابیدوپسیس (۵۲)، برنج (۴۴ و ۴۵) و ذرت (۴۱) شناسایی و دانلود شدند. سپس، درخت فیلوژنتیکی براساس هم‌ردیف‌سازی ۵۵ توالی پروتئینی *DREB1* و *DREB2* آلوروپوس، آرابیدوپسیس، برنج و ذرت ترسیم شد (شکل ۳). در نهایت، توپولوژی درخت، ژن‌های گروه *DREB1* و *DREB2* را در دو خوشه جداگانه قرار داد. گروه *DREB1* در مجموع شامل ۲۷ ژن بوده، که ۱۰، ۶ و ۱ ژن بترتیب به ذرت، برنج، آرابیدوپسیس و آلوروپوس تعلق داشت. گروه *DREB2* نیز در مجموع شامل ۲۸ ژن بوده، که تعداد ۱۰، ۶، ۹ و ۳ ژن بترتیب در ذرت، برنج، آرابیدوپسیس و آلوروپوس مشاهده شد (شکل ۳).

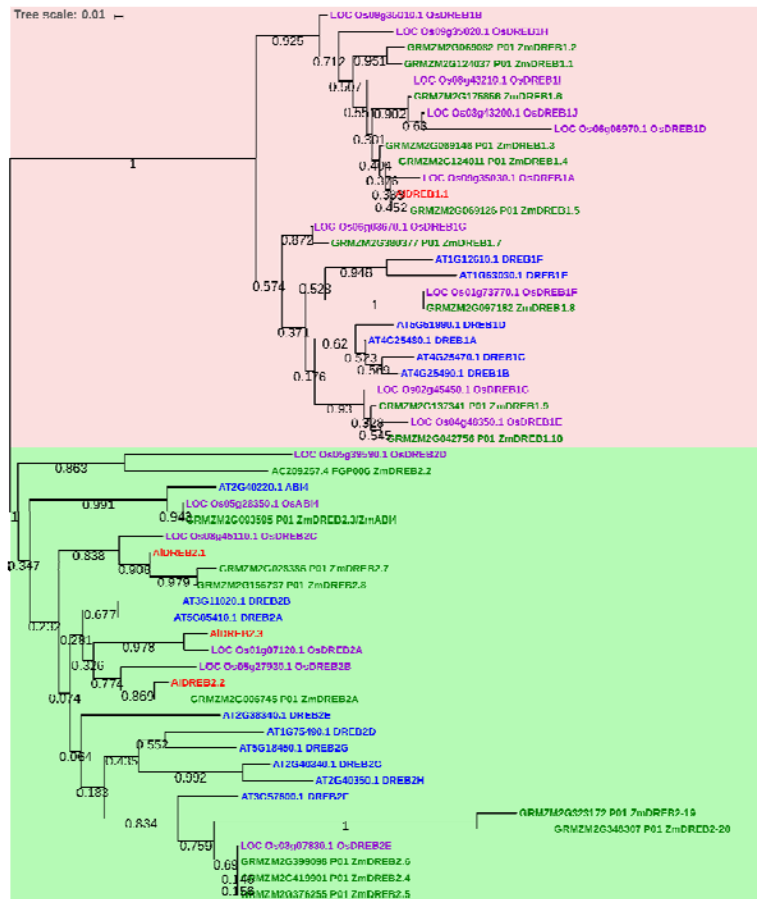
کد شده توسط ژن‌های *DREB* اسیدآمینو والین در موقعیت ۱۴ دمین AP2/ERF حفاظت‌شده است ولی گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۹ حفاظت‌شده نیست و در گروه A1، A5 و A6 بترتیب با والین، آلانین و لوسین جایگزین شده است. گروه A1، حاوی توالی آمینو اسیدی CEVR حفاظت‌شده بین V14 و V19 بود و این منطقه به یک توالی آمینو اسیدی AEIR در گروه A2 و A6 تبدیل شد. در گروه A4، سرین در موقعیت ۱۵ دمین AP2/ERF برای اتصال اختصاصی عنصر ERE بسیار حیاتی است و آلانین یا سرین در موقعیت ۱۵ دمین در گروه A5 بسیار مهم است (شکل ۲).



شکل ۱- آنالیز فیلوژنتیکی اعضای خانواده *DREB* در آلوروپوس لیتورالیس. هم‌ردیفی چندگانه پروتئین‌های *DREB* به‌دست آمده از آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 6.0 بر مبنای روش اتصال همسایه با آزمون بوت‌استرپ با تکرار ۱۰۰۰ ترسیم شد.

Gene name	Strand 1		Strand 2		Strand 3		Helix					
	10	20	30	40	50	60	70					
A1 AldREB1.1	VFRSVRR	SNRGRWVCS	VFGRRG	CRWLGTF	FDTA	EAAAR	RFDA	AAMLAIAG	---AGACLNFD	DSAWLL		
A1 AldREB2.1	PFRSVRC	TFWGWVAF	IFEP	NRGARR	WLGTF	FATALE	AAAR	YD	AAARALYG	---DCARINLQ	GAASAA	
A2 AldREB2.2	GFRSVRC	TFWGWVAF	IFEP	NRVNR	WLGTF	FPTA	EDAA	REYD	AAARAMYG	---ALARTNF	PSKHMPT	
A2 AldREB2.3	AYRSVRC	TFWGWVAF	IFEP	NRGRR	WLGSE	FPTALE	AAAR	YD	AAAKAMYG	---PTARVNE	SESSADA	
A4 AldREB4.1	VYRSVRR	TFWGWVAF	IFEL	RKFR	WLGTY	FTE	EMAA	AAAL	DAALALRG	---AGTVLNF	FDAAARS	
A4 AldREB4.2	TYRSVRR	TFWGWVAF	IFEP	RKRSR	WLGTF	FATA	EMAA	RAFD	VAAALAIK	---RAAHLNF	FDIAGVL	
A4 AldREB4.3	LYRSVRR	TFWGWVAF	IFEP	PKS	WLGTF	FATA	EMAA	RAFD	VAAALAIK	---RAAHLNF	FDIAGVL	
A5 AldREB5.1	KYRSVRR	TFWGWVAF	IFLP	NSRFR	WLGSD	YDAPE	KAAAR	RFDA	AAVCLIR	GRGAAG	ADLNF	FDSPPC
A5 AldREB5.2	QYRSVRR	TFWGWVAF	IFAP	NQKIR	WLGSD	YSTA	EAAAR	RFDA	DALLCLK	---SAADLN	FFVHLPH	
A5 AldREB5.3	QYRSVRR	TFWGWVAF	IFEP	NKRFR	WLGSD	YSTA	VAAAR	RFDA	TAVFYLR	---RSARLN	FFDQLDGA	
A5 AldREB5.4	QYRSVRR	TFWGWVAF	IFAP	NQKIR	WLGSD	YSTA	VAAAR	RFDA	DALLCLK	---SAADLN	FFVHLPH	
A6 AldREB6.1	LYRSVRC	TFWGWVAF	IFLP	RNRTR	WLGTF	FDTA	EDAA	RAFD	AAAFKLR	---ENARLN	FFDIFLGL	
A6 AldREB6.2	LYRSVRC	TFWGWVAF	IFLP	RNRTR	WLGTF	FDTA	EDAA	RAFD	AAAFKLR	---ENARLN	FFDIFLGL	
A6 AldREB6.3	LYRSVRC	TFWGWVAF	IFLP	RNRTR	WLGTF	FDTA	EDAA	RAFD	AAAFKLR	---ENARLN	FFDIFLGL	
A6 AldREB6.4	LYRSVRC	TFWGWVAF	IFLP	RNRTR	WLGTF	FDTA	EDAA	RAFD	AAAFKLR	---ENARLN	FFDIFLGL	
A6 AldREB6.5	LYRSVRC	TFWGWVAF	IFLP	RNRTR	WLGTF	FDTA	EDAA	RAFD	AAAFKLR	---ENARLN	FFDIFLGL	
Clustal Cons	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	:::***	

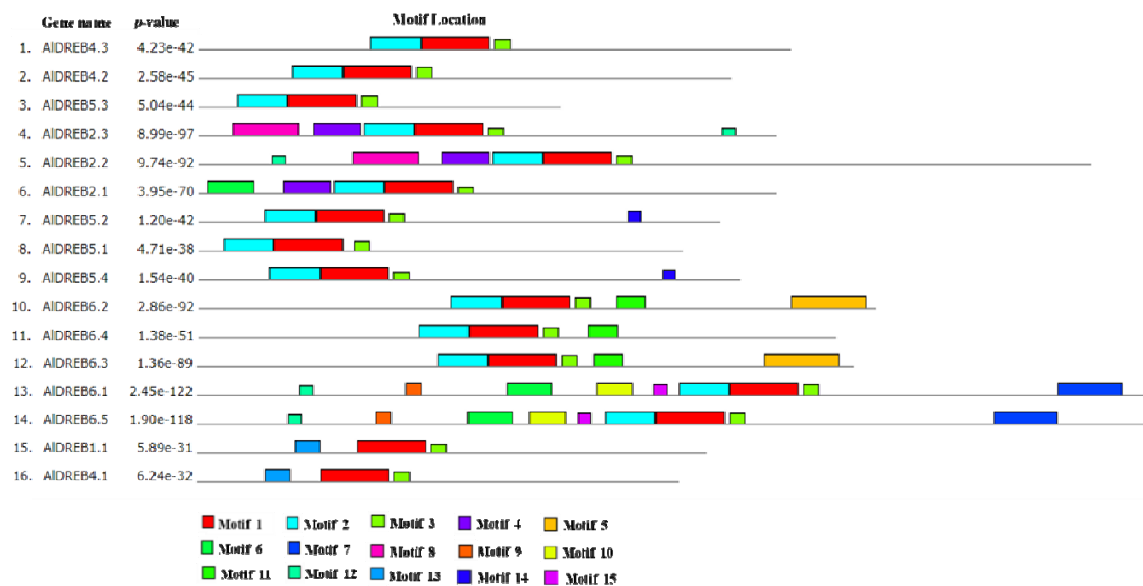
شکل ۲- هم‌ردیف‌سازی دمین‌های AP2 پروتئین‌های DREB در آلورپوس لیئورالیس. هم‌ردیفی چندگانه دمین‌های AP2 پروتئین‌های DREB به‌دست آمده از آلورپوس لیئورالیس با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد. ردیف‌هایی که به‌صورت کادر مشخص شده‌اند، اعضای هر گروه را نشان می‌دهند و ستون‌هایی مشخص شده به‌صورت کادر، نشان‌دهنده آمینواسیدهای حفاظت‌شده می‌باشند.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ژن‌های *DREB2* و *DREB1* در آلورپوس، آرابیدوپسیس، ذرت و برنج. درخت فیلوژنتیکی بر اساس هم‌ردیف‌سازی ۵۵ توالی پروتئینی کامل *DREB1* و *DREB2* در چهار گونه، ساخته شد. اسامی و شناسه ژن‌ها برای آلورپوس به رنگ قرمز؛ برنج به رنگ بنفش؛ آرابیدوپسیس به رنگ آبی؛ و برای ذرت به رنگ سبز نشان داده شد. اسامی ژن‌ها برگرفته از اطلاعات منتشر شده در مطالعات قبلی است (۴۱، ۴۴، ۴۵ و ۵۲). مقادیر بوت‌استرپ با تکرار ۱۰۰۰ روی هر گره نشان داده شد.

در این تحقیق ۱۵ موتیف حفاظت‌شده با استفاده از نرم افزار MEME برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در میان پروتئین‌های خانواده DREB مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل موتیف نشان داد که بسیاری از ژن‌های *DREB* آلوروپوس حاوی موتیف‌های ۱، ۲ و ۳ بودند (شکل ۴). با مستندسازی موتیف‌های شناسایی شده با استفاده از InterPro، موتیف‌های ۱ و ۲ بعنوان دمین AP2/ERF پیش‌بینی شدند. دمین CMIV (موتیف ۴) بطور اختصاصی در گروه DREB A2 یافت شد (جدول ۲). این نتایج نشان داد که بیشتر اعضای مرتبط به هم در درخت فیلوژنتیکی، ترکیب موتیف مشترکی را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های عملکردی در میان پروتئین‌های DREB در همان زیرشاخه باشد.

تجزیه و تحلیل ساختار ژنی و شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده: بررسی ساختار ژنی می‌تواند شواهد ارزشمندی جهت تأیید درخت فیلوژنتیکی و روابط تکاملی درون خانواده‌های ژنی ارائه کند. زیرا این نوع تنوع ساختاری فرایند مهمی در تکامل خانواده‌های ژنی به‌شمار می‌رود. در این تحقیق، با مقایسه ساختار آگرون-ایترون در توالی‌های کدکننده ژن‌های *DREB* آلوروپوس لیتورالیس، مشخص شد که بیشتر ژن‌ها (۱۴ مورد از ۱۶ ژن) هیچ ایترونی در نواحی کدکننده آن‌ها وجود نداشته و فقط ژن‌های *AIDREB2.2* و *AIDREB2.3* بترتیب دارای ۳ و یک ایترون هستند (جدول ۱). مشاهده شد که تنها ژن‌های گروه A2 دارای ایترون می‌باشند که نشان‌دهنده مسیر تکاملی متفاوت این ژن‌ها نسبت به سایر ژن‌ها است. در سطح DNA، بیشترین طول ژن (۲۷۴۷) متعلق به ژن *AIDREB2.2* و کمترین طول ژن (۶۳۳) متعلق به ژن *AIDREB4.1* بود (جدول ۱).



شکل ۴- موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های DREB در آلوروپوس. موتیف‌های شناسایی شده با شماره‌های ۱ تا ۱۵ با رنگ‌های مختلف در پایین شکل، p -value و اسامی اعضای DREB در سمت چپ شکل نشان داده شده است.

جدول ۲- توالی موتیف‌های شناسایی شده در ژن‌های *DREB* آلوروپوس توسط برنامه MEME.

توالی موتیف	طول موتیف	موتیف
1	30	RNRTRJWLGTFTDAEDAARAYDAAALALRG
2	22	QKLYRGVQRQSWGKWWAEIREP
3	7	ARLNFPD
4	21	RKAPAKGSKKGCMMKGGKGGPEN
5	33	VPEMQQLDFSEAPWDEAEGFALRKYPSEIDWD
6	20	QQRQQMISFGGPPQQQQQQQF
7	28	DEAWFSAWGPSSSLWDYDMDNARWLFLN
8	29	WKKRPRRKRDPDSIAEVIKRWKZINQKL
9	7	HIFPFAY
10	16	QLLRYWSEALNLSPRG
11	13	LHAAVDAKLQAIC
12	6	RPLKKI
13	11	ETRHPVFRGVR
14	6	PKCMEL
15	6	LYQHLL

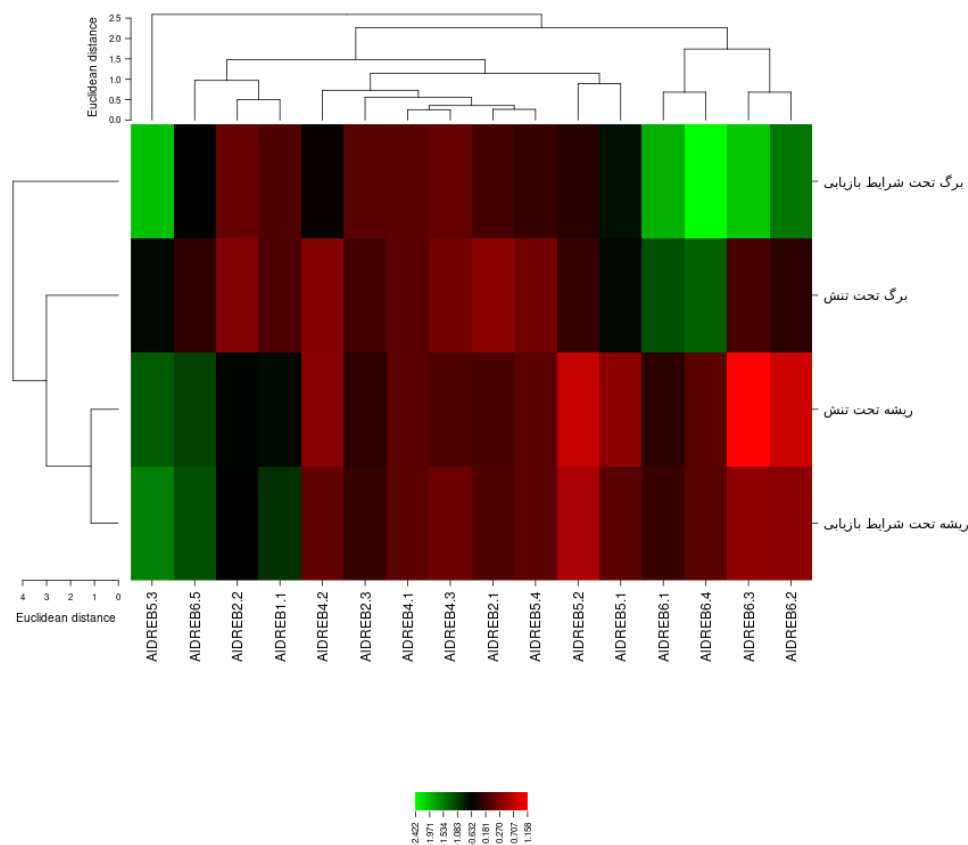
بیشترین کاهش بیان نیز در ژن *AIDREB6.4* (با مقدار بیان $2/43$ -)، در شرایط بازیابی در بافت برگ (۵/۴ کاهش بیان نسبت به شاهد) مشاهده شد و بعد از آن بیشترین کاهش بیان به ژن *AIDREB6.3* ($2/03$ -) نیز در شرایط بازیابی در بافت برگ تعلق داشت. بنابراین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عوامل رونویسی *AIDREB* بعنوان فعال‌کننده‌های مهم رونویسی عمل می‌کنند و می‌توانند در بهبود تحمل گیاه در برابر تنش شوری مفید باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی منابع نشان می‌دهد که خانواده ژنی *DREB* در گونه‌هایی مانند برنج، گوجه‌فرنگی، سویا، گندم، جو و ذرت نقش مهمی در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های محیطی ایفا می‌نمایند (۳ و ۴۶). بنابراین، در این بررسی برای اولین بار، یک تجزیه و تحلیل جامع از طبقه‌بندی، ساختار ژنی، ترکیب موتیف‌ها و بیان خانواده *DREB* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس بعنوان یک گیاه تک‌لپه از خانواده گندمیان ارائه شد. در مجموع ۱۶ ژن *AIDREB* شناسایی شد که در ۵ گروه *A1*، *A2*، *A4*، *A5* و *A6* طبقه‌بندی شدند. ژن‌های *DREB* در جو نیز در ۵ گروه *A1*، *A2*، *A4*، *A5* و *A6* طبقه‌بندی شده‌اند (۱۷).

تنش شوری و بررسی الگوی بیان ژن‌های *DREB* در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس: بمنظور درک بهتر کارکرد ژن‌های *DREB* در گیاه آلوروپوس، الگوی بیان آن‌ها در دو بافت برگ و ریشه، در شرایط تنش شوری و بازیابی با استفاده از داده‌های RNA-seq مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از داده‌های ترانسکریپتوم آلوروپوس، یک نمودار Heatmap در مقیاس \log_2FC ترسیم شد. همان‌گونه که در نمودار Heatmap (شکل ۵) نشان داده شده است، الگوی متفاوتی از بیان ژن در ژن‌های *DREB* مشاهده شد. این الگوی بیان متفاوت با توجه به وجود زمین‌های مشابه، می‌تواند بدلیل وجود عملکردهای مولکولی متفاوت و نیز مکانیسم‌های تنظیمی مختلف در کنترل فعالیت این ژن‌ها باشد.

باتوجه به نتایج به‌دست آمده از آنالیز ترانسکریپتوم، ژن‌های *AIDREB6.4* و *AIDREB5.4* فاقد بیان در بافت ریشه بودند که حاکی از بیان اختصاصی این ژن‌ها در بافت برگ می‌باشد. ژن *AIDREB6.3* با مقدار بیان $1/16$ ، در شرایط تنش شوری در بافت ریشه (بیان $2/2$ برابری نسبت به شاهد)، بیشترین بیان را داشت. بعد از آن ژن *AIDREB6.2* دارای بیشترین مقدار بیان ($0/83$)، در شرایط تنش شوری در بافت ریشه بود.



شکل ۵- پروفایل بیانی ژن‌های *DREB* آلورپوس لیتورالیس بر اساس داده‌های RNA-seq. نمایش Heatmap، میزان تغییر بیان ژن‌های *DREB* آلورپوس را در دو بافت برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و ریکاوری نشان می‌دهد. ارزش نسبی سیگنال به صورت نوار رنگی در انتهای Heatmap ارائه شده است که در آن رنگ سبز نشان‌دهنده کاهش بیان، رنگ سیاه نشان‌دهنده عدم تغییر بیان و رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان است.

حفاظت‌شده است ولی گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۹ حفاظت شده نیست و در گروه A1، A5 و A6 بترتیب با والین، آلانین و لوسین جایگزین شده است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که دو آمینواسید کارکردی حفاظت شده (والین و گلوتامیک اسید) بترتیب در موقعیت‌های ۱۴ و ۱۹ در دمین اتصال به DNA وجود دارند و بنظر می‌رسد که جایگاه‌های مهمی برای اتصال پروتئین‌های *DREB* به توالی‌های سیس DRE هستند. پروتئین‌های *DREB1A* برای اختصاصیت اتصال به DNA، دارای والین در موقعیت ۱۴ و *DREB2A* نیز دارای والین و گلوتامیک اسید در موقعیت‌های ۱۴ و ۱۹ می‌باشند (۵۲). با این حال، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که گلوتامیک اسید ۱۹ در پروتئین

لازم بذکر است تعداد ژن‌های *DREB* در گیاهان آراییدوپسیس، جو، ذرت و ارزن ایتالیایی بترتیب ۵۶، ۴۱، ۶۵ و ۴۸ گزارش شده است (۱۷، ۳۳، ۴۱ و ۵۲).

پروتئین‌های *DREB* اعضای مهم خانواده عوامل رونویسی AP2/ERF هستند. ناحیه اتصال به DNA این پروتئین‌ها بطور خاص عنصر DRE در منطقه پرموتور ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را تشخیص می‌دهد و منطقه ترانس‌اکتیویسیون (Transactivation) (فعال‌سازی ترانس) با فعال‌سازی بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش، مسیرهای سیگنالینگ را در پاسخ به تنش گیاهان فعال می‌کند (۴۰). مطالعه حاضر نشان داد که در پروتئین‌های *DREB*، اسیدآمینو والین در موقعیت ۱۴ دمین AP2/ERF

هم‌ردیف‌سازی توالی‌های آمینواسیدی گروه DREB A2 آراییدوپسیس در ناحیه انتهای آمینی شامل موتیف حفاظت شده CMIV-1 و دمین اتصال به DNA بود (۴۷). این نتایج نشان داد که بیشتر اعضای مرتبط به هم در درخت فیلوژنتیکی، ترکیب موتیف مشترکی را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند، که این امر می‌تواند بیانگر شباهت‌های عملکردی در میان پروتئین‌های DREB در همان زیرشاخه باشد.

تجزیه و تحلیل پروفایل بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد عملکرد آن‌ها فراهم آورد (۴۴). علی‌رغم حساسیت بالا و توالی اختصاصی (Sequence specific) بودن تکنیک qPCR در کنار اعتبار بالای نتایج حاصله؛ تکنیک RNA-seq ضمن ارائه همزمان توالی و کمیت ژن هدف از اختصاصیت و حساسیت بالایی در شناسایی ایزوفرم‌های مختلف یک ژن برخوردار است. ضمن اینکه امکان ارائه اطلاعات بیانی تمام ژن‌ها را در قالب یک آزمایش فراهم می‌نماید (۱۰ و ۵۹). با توجه به عدم تحقیقات پیشین در بررسی بیان خانواده ژنی DREB در گیاه آلوروپوس و همچنین همسانی (Identity) بالای اعضای این خانواده ژنی، در این تحقیق از مزیت روش RNA-seq جهت شناسایی ژن‌های فعال و غیرفعال این خانواده استفاده گردید. اطلاعات حاصله در این بخش جهت غربال تمام اعضای این خانواده ژنی در سطح ترانسکریپتوم بمنظور شناسایی ژن‌هایی با بیشترین و کمترین بیان و ژن‌هایی با بیان بافت-اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. الگوی بیان ژن‌های AIDREB نشان‌دهنده اهمیت نقش آن‌ها در پاسخ گیاه به تنش شوری است. ژن‌های AIDREB6.3 و AIDREB6.2 بیشترین بیان را در شرایط تنش شوری در بافت ریشه به نمایش گذاشتند. ژن AIDREB6.2 با ژن RAP2.4 (At1g78080) در آراییدوپسیس همولوگ است. در مطالعه دیگری مشخص شده است که ژن RAP2.4 در پاسخ به خشکی، شوری بالا و گرما بیان می‌شود (۳۷ و ۵۱). بیش‌بیان یا

DREB1 در برنج و جو حفاظت‌شده نبوده و به جای آن، والین جایگزین شده است (۷). در بیشتر پروتئین‌های نوع OsDREB1، به استثنای OsDREB1C، والین در هر دو موقعیت ۱۴ و ۱۹، یافت می‌شود. سایر پروتئین‌های نوع DREB1 در گیاهان تک‌لپه (مانند جو، گندم و چاودار) نیز دارای والین در موقعیت ۱۹ هستند (۳). این مشاهدات نشان می‌دهند که عملکرد آمینواسید ۱۴ برای فعالیت اختصاصی اتصال به DNA می‌تواند مهمتر از آمینواسید ۱۹ باشد. علاوه بر این دو اسید آمینه، وجود آلانین حفاظت‌شده در موقعیت ۳۷ دمین AP2/ERF نیز در اتصال به عناصر DRE ضروری است (۴۲).

اکثر آمینواسیدها در دمین انتهای آمینی، حفاظت شده هستند. سیگنال متمرکزکننده هسته‌ای (NLS) "PKRPAGRTKFKRETRHP"، با عنوان موتیف DSAW بلافاصله در کنار دمین AP2/ERF قرار داشته و یک موتیف LWSY محافظت شده در انتهای کربوکسیلی بیشتر پروتئین‌های DREB1 موجود است (۶) که این امر در مورد توالی AIDREB1.1 آلوروپوس نیز صدق می‌کند.

بررسی ساختار ژنی خانواده DREB نشان داد که ۸۷/۵ درصد از ژن‌های AIDREB فاقد اینترون می‌باشند. همچنین مشخص شده است که ۸۸ درصد از ژن‌های DREB در *Populus trichocarpa* فاقد اینترون در نواحی کدکننده خود می‌باشند (۵). فقدان اینترون در بیشتر ژن‌های عوامل رونویسی AP2/ERF گیاهی از فرضیه انتقال جانبی ژن از مبدأ باکتری‌ها یا ویروس‌ها حمایت می‌کند (۴۳).

دمین‌ها و موتیف‌های عوامل رونویسی اغلب با برهم‌کنش پروتئین، فعالیت رونویسی و اتصال به DNA پروتئین مرتبط می‌باشند (۳۸ و ۳۹). تجزیه و تحلیل موتیف‌ها نشان داد که موتیف‌های ۱ و ۲ بعنوان دمین AP2/ERF پیش‌بینی شدند. دمین AP2/ERF دارای سه صفحه بتا و یک مارپیچ آلفا در انتهای آمینی خود هستند (۶۰). دمین CMIV (موتیف ۴) بطور اختصاصی در گروه A2 یافت شد.

مقاومت به خشکی در برنج شد. این ژن *HRD* همولوگ ژن *AIDREB4.1* در این مطالعه است. در بررسی چن و همکاران (۵)، ژن‌های *PtrDREB4* و *PtrDREB28* متعلق به زیرگروه A2 توسط تنش‌های ABA، شوری و خشکی القاء شدند. علاوه بر این، ژن‌های *PtrDREB51*، *PtrDREB55* و *PtrDREB68* متعلق به زیرگروه A4 در تنش‌های شوری و خشکی بیان شدند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عوامل رونویسی *AIDREB* احتمالاً بعنوان فعال‌کننده‌های مهم رونویسی عمل می‌کنند و می‌توانند در بهبود تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی، مفید باشند. این مشاهدات می‌توانند پایه‌ای برای تجزیه و تحلیل کارکردی ژن‌های *DREB* آلوروپوس برای درک نقش‌های زیستی آن‌ها فراهم آورد.

سپاسگزاری

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

جهش در ژن‌های *RAP2.4* و *RAP2.4B* در آرابیدوپسیس مشخص کرد که این ژن‌ها در پایین‌دست یک نقطه مشترک برای مسیرهای پیام‌رسان نور و اتیلن عمل می‌کنند که بطور هماهنگ چندین فرایند تکاملی و پاسخ به تنش را تنظیم می‌کنند (۳۷). قابل توجه است که در لاین‌های با بیش‌بیان *RAP2.4* و *RAP2.4B*، بیان چندین ژن دیگر مرتبط با انتقال لیپید نیز تغییر یافته است که بیانگر ارتباط بین عوامل رونویسی *DREB* و تغییرات سازگاری در متابولیسم لیپید است (۵۱).

در این بررسی بیشترین کاهش بیان نیز در ژن‌های *AIDREB6.3* و *AIDREB6.4* در شرایط بازیابی در بافت برگ‌ها مشاهده شد. در بررسی دیگری، بیان ژن‌های *AtDREB2A* و *AhDREB1* در ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ‌ها در شرایط رشد طبیعی مشاهده شد. در شرایط تنش شوری، *AhDREB1* در ریشه‌ها بیشتر بیان شد، اما در ساقه‌ها و برگ‌ها با سطوح پایین‌تری بیان شد (۵۵). رونویسی ژن *GmDREBa/b* در برگ‌های سویا در تنش‌های سرما، شوری و خشکی القاء شد. در ریشه‌ها، بیان ژن *GmDREBc* در تیمارهای شوری، خشکی و ABA به‌صورت افزایش بیان مشاهده شد، اما تحت تأثیر تیمار سرما نبود (۳۵). برخی مطالعات نشان داده‌اند که ژن *HARDY (At2g36450)* متعلق به زیرگروه A4 است. بیش‌بیان این ژن با بهبود کارایی استفاده از آب، موجب

منابع

- ۱- بنده حق، ع.، علیپور قربانی، ش.، تورچی، م.، و شکری قره‌لو، و. ر.، ۱۳۹۷. تجزیه پروتئوم بذر کلزا تحت تنش شوری، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۱، شماره ۲، صفحات ۴۲۳-۴۲۲.
- ۲- دشتبانی، ف.، حاجی بلند، ر.، و علی اصغرزاد، و. ن.، ۱۳۹۶. جوانه‌زنی، فتوسنتز و رشد دو گونه هالوفیت پوکسنلیا دیستانس
- ۳- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M., and Sopory, S. K., 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25(12), PP: 1263-1274.
- ۴- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., and Noble, W. S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching, *Nucleic Acids Research*, 37, PP: 202-208.

- 5- Chen, Y., Yang, J., Wang, Z., Zhang, H., Mao, X., and Li, C., 2013. Gene structures, classification, and expression models of the DREB transcription factor subfamily in *Populus trichocarpa*, The Scientific World Journal, 2013, PP: 1-13.
- 6- Cong, L., Chai, T. Y., and Zhang, Y. X., 2008. Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from *Brassica juncea* L. Biochemical and Biophysical Research Communications, 371(4), PP: 702-706.
- 7- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression, The Plant Journal, 33(4), PP: 751-763.
- 8- Egawa, C., Kobayashi, F., Ishibashi, M., Nakamura, T., Nakamura, C., and Takumi, S., 2006. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. Genes & Genetic Systems, 81(2), PP: 77-91.
- 9- Faraji, S., Najafi-Zarrini, H., Hashemi-Petroudi, S., and Ranjbar, G., 2017. *AIGLYI* gene implicated in salt stress response from halophyte *Aeluropus litoralis*, Russian Journal of Plant Physiology, 64(6), PP: 850-860.
- 10- Fassbinder-Orth, C. A., 2014. Methods for quantifying gene expression in ecoimmunology: from Qpcr to RNA-Seq. Integrative and Comparative Biology, 54(3), PP: 396-406.
- 11- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. Evolution, 39(4), PP: 783-791.
- 12- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., and Sangrador-Vegas, A., 2015. The Pfam protein Families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Research, 44, PP: 279-285.
- 13- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants, Journal of plant research, 124(4), PP: 509-525.
- 14- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: J. M., Walker (ed.) The proteomics protocols handbook, PP: 571-607. Humana Press, New York City, New York, United States.
- 15- Ghorbani, H. R., Samizadeh Lahiji, H., and Nematzadeh, G. A., 2017. Expression pattern analysis of transcription factors from *Aeluropus litoralis* in response to salt stress and recovery condition, Journal of Plant Molecular Breeding, 5(1), PP: 19-30.
- 16- Ghorbani, H. R., Samizadeh Lahiji, H., and Nematzadeh, G. A., 2019. In silico characterization of proteins containing ARID-PHD domain and its expression in *Aeluropus litoralis* halophyte, Journal of Crop Breeding, 11(29), PP: 143-152.
- 17- Guo, B., Wei, Y., Xu, R., Lin, S., Luan, H., Lv, C., Zhang, X., Song, X., and Xu, R., 2016. Genome-wide analysis of *APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF)* gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.), Plos One, 11(9), e0161322 p.
- 18- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J., Pineda, O., Thomashow, M. F., and Zhang, J. Z., 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis, Plant physiology, 130(2), PP: 639-648.
- 19- 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, PP: 95-98.
- 20- Hashemi-Petroudi, S. H., Ghorbani, H., and Kuhlmann, M., 2018. Isolation Phosphoglycerate Dehydrogenase gene from *Aeluropus litoralis* halophyte plant and functional analysis of T-DNA mutant in *Arabidopsis thaliana*, Crop biotechnology, 8(23), PP: 79-92.
- 21- Hashemi-Petroudi, S. H., Nematzadeh, G. A., Askari, H., and Ghahary, S., 2014. Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus litoralis*. Journal of Plant Molecular Breeding, 2(2), PP: 56-67.
- 22- Hashemi-Petroudi, S. H., Nematzadeh, G. A., Askari, H., and Ghasemi, Y., 2012. Pattern of

- DNA cytosine methylation in *Aeluropus littoralis* during temperature stress, *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(1), PP: 16-24.
- 23- Hashemi-Petroudi, S. H., Nematzadeh, G. A., and M., Kuhlmann., 2019. Identification and analysis of a *DEVIL* paralog gene cluster in *Aeluropus littoralis* by comparative genomic approach *Crop Biotechnology*, 9(25), PP: 79-92.
- 24- Hashemipetroudi, S., Nematzadeh, G., Ahmadian, G., Yamchi, A., and Kuhlmann, M., 2016. Expression analysis of salt stress related expressed sequence tags (ESTs) from *Aeluropus littoralis* by quantitative real-time PCR. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 9(3), PP: 445-456.
- 25- Hong, J. P., and Kim, W. T., 2005. Isolation and functional characterization of the *Ca-DREBLP1* gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang), *Planta*, 220(6), PP: 875-888.
- 26- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., and Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35, PP: 585-587.
- 27- Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J., and Gao, G., 2014. GSDS 2.0, an upgraded gene feature visualization server, *Bioinformatics*, 31(8), PP: 1296-1297.
- 28- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 47(1), PP: 141-153.
- 29- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., and Nuka, G., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), PP: 1236-1240.
- 30- Kaleybar Shahin, B., Nematzadeh, G., Hashemi, S. H. R., Askari, H., and Kabirmataj, S., 2013. Physiological and Genetic Responses of Halophyte *Aeluropus Littoralis* to Salinity. *Journal of Crop Breeding*, 5(12), PP: 15-29.
- 31- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, 17(3), PP: 287-291.
- 32- Kim, J. S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ogori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., and Shinozaki, K., 2011. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 52, (12), PP: 2136-2146.
- 33- Lata, C., Mishra, A. K., Muthamilarasan, M., Bonthala, V. S., Khan, Y., and Prasad, M., 2014. Genome-wide investigation and expression profiling of AP2/ERF transcription factor superfamily in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS One*, 9(11), e113092 p.
- 34- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P., 2014. SMART, recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research*, 43(D1), PP: D257-D260.
- 35- Li, X. P., Tian, A. G., Luo, G. Z., Gong, Z. Z., Zhang, J. S., and Chen, S. Y., 2005. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(8), PP: 1355-1362.
- 36- Lim, C. J., Hwang, J. E., Chen, H., Hong, J. K., Yang, K. A., Choi, M. S., Lee, K. O., Chung, W. S., Lee S. Y., and Lim, C. O., 2007. Over-expression of the Arabidopsis DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance. *Biochemical and biophysical research communications*, 362(2), PP: 431-436.
- 37- Lin, R. C., Park, H. J., and Wang, H. Y., 2008. Role of Arabidopsis RAP2, 4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance, *Molecular plant*, 1(1), PP: 42-57.
- 38- Liu, L., White, M. J., and MacRae, T. H., 1999. Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation, *European Journal of Biochemistry*, 262(2), PP: 247-257.
- 39- Liu, M., Sun, W., Ma, Z., Zheng, T., Huang, L., Wu, Q., Zhao, G., Tang, Z., Bu, T., and Li, C., 2019. Genome-wide investigation of the

- AP2/ERF gene family in tartary buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*), *BMC plant biology*, 19(1), 84 p.
- 40- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(8), PP: 1391-1406.
- 41- Liu, S., Wang, X., Wang, H., Xin, H., Yang, X., Yan, J., Li, J., Tran, L. S. P., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2013. Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS genetics*, 9(9), e1003790 p.
- 42- Liu, Y., Zhao, T. J., Liu, J. M., Liu, W. Q., Liu, Q., Yan, Y. B., and Zhou, H. M., 2006. The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. *FEBS letters*, 580(5), PP: 1303-1308.
- 43- Magnani, E., Sjölander, K., and Hake, S., 2004. From endonucleases to transcription factors, evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *The Plant Cell*, 16(9), PP: 2265-2277.
- 44- Mao, D., and Chen, C., 2012. Colinearity and similar expression pattern of rice DREB1s reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. *PLoS one*, 7(10), e47275 p.
- 45- Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2010. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes, *Molecular Genetics and Genomics*, 283(2), PP: 185-196.
- 46- Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), PP: 86-96.
- 47- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H., 2006. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology*, 140(2), PP: 411-432.
- 48- Qin, F., Kakimoto, M., Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Tran, L. S. P., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L., *The Plant Journal*, 50(1), PP: 54-69.
- 49- Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y. Q., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L., *Plant and Cell Physiology*, 45(8), PP: 1042-1052.
- 50- Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L. S. P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., and Miyazono, K. i., 2008. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression, *The plant cell*, 20(6), PP: 1693-1707.
- 51- Rae, L., Lao, N. T., and Kavanagh, T. A., 2011. Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors, *Planta*, 234(3), PP: 429-444.
- 52- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), PP: 998-1009.
- 53- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18(5), PP: 1292-1309.
- 54- Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., and Andrews, D. T., 2000. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer, *Nature genetics*, 24(3), 236 p.
- 55- Shen, Y. G., Zhang, W. K., He, S. J., Zhang, J. S., Liu, Q., and Chen, S. Y., 2003. An

- EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress, *Theoretical and Applied Genetics*, 106(5), PP: 923-930.
- 56- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., and Thomashow, M. F., 1997. *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), PP: 1035-1040.
- 57- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. MEGA6, molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), PP: 2725-2729.
- 58- Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G., 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX, *Current protocols in bioinformatics*, 1, PP: 2-3.
- 59- VanGuilder, H. D., Vrana K. E., and Freeman, W. M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*, 44(5), PP: 619-626.
- 60- Wang, X., Chen, X., Liu, Y., Gao, H., Wang, Z., and Sun, G., 2011. *CkDREB* gene in *Caragana korshinskii* is involved in the regulation of stress response to multiple abiotic stresses as an AP2/EREBP transcription factor, *Molecular biology reports*, 38(4), PP: 2801-2811.
- 61- Wessler, S. R., 2005. Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain, *Trends in plant science*, 10(2), PP: 54-56.
- 62- Xue, G. P., and Loveridge, C. W., 2004. HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *The Plant Journal*, 37(3), PP: 326-339.
- 63- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6(2), PP: 251-264.
- 64- Zhang, S., Xia, X., Shen, J., Zhou, Y., and Sun, Z., 2008. DBMLoc, a Database of proteins with multiple subcellular localizations, *BMC bioinformatics*, 9(1), 127 p.
- 65- Zouari, N., Saad, R. B., Legavre, T., Azaza, J., Sabau, X., Jaoua, M., Masmoudi, K., and Hassairi, A., 2007. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*, *Gene*, 404(1), PP: 61-69.

Identification, classification and expression analysis of *DREB* transcription factor gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress

Hashemi-petroudi S.H. and Mohammadi S.

Dept., of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R of Iran.

Abstract

DREB gene family is one large family of transcription factors that plays an important role in regulating plant growth and the response to external environmental stresses. Due to the sequencing of the *Aeluropus littoralis* halophyte plant genome has provided an excellent opportunity for genome-wide analysis of genes belonging to *DREB* gene family. In total, 16 non-redundant *DREB*-encoding genes were identified from the genomic sequences of *A. littoralis*. In this research, gene structures, phylogenetic relationships, motif compositions and expression profiles of *DREB* genes under salt stress and recovery conditions were analyzed. The phylogenetic construction suggests that the *AIDREB* gene family was classified into five groups (A1, A2, A4, A5 and A6) in *A. littoralis*. Gene structure and motif composition revealed that these genes were conservative in each group, suggesting that members of the same group may also have conserved functions. Based on RNA-seq data, *AIDREB6.3* and *AIDREB6.2* genes were expressed more in root tissue under salinity stress. The least expression level was observed in *AIDREB6.4* and *AIDREB6.3* genes in leaf tissue under recovery conditions. Result of this study can be applied as a foundation for functional analyses to unravel the biological roles of *Aeluropus*' *DREB* genes.

Key words: *Aeluropus littoralis*, *DREB* transcription factor, Gene Expression, Phylogenetic relationships, salinity stress