مجله پژوهش علف‌های هرز
جلد ۱۱، شماره ۱، ۱۳۹۸
صفحات ۵۰-۳۵

شناسائی ژن عامل رونویسی متصل شونده به عناصر پاسخ دهنده به کم‌آبی (DREB2) در علف هرز بروموس ژاپنی (*Bromus japonicus*) تحت شرایط تنش شوری

Identification of Dehydration-responsive Element Binding-factor Gene in *Bromus japonicus* in the Salinity Stress

محبوبه بصیری[1*]، سیدمحسن موسوی نیک[2]، سیدکاظم صباق[3]، داوود نادری[4]، آسیه سیاهمرگوئی[5]، خداداد مصطفوی[6]

چکیده

گونه‌های گیاهی مهاجم که به عنوان علف هرز شناخته می شوند گیاهان مقاوم به شرایط نامساعد محیطی هستند که از این ویژگی می‌توان در جهت دستکاری‌های ژنتیکی و تراریختی جهت مقاوم کردن گیاهان زراعی استفاده نمود. این تحقیق با هدف شناسائی ژن درگیر در تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزنده و محیطی با نام DREB2 در علف هرز بروموس ژاپنی اجرا گردید. بدین منظور ابتدا تنش شوری به گیاه بروموس ژاپنی با بکارگیری نمک کلرید سدیم اعمال گردید و پس از آن با توالی‌یابی و شناسائی ژن موثر در عمل مقاومت به تنش در این گیاه، توالی بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل و مقایسه توالی بدست آمده با توالی این ژن در گیاهان دیگر با نرم افزارهای مختلف ار قبیل BLAST، ExPasy، ELM، ClustalW و Meg Align صورت گرفت. نتایج موید این مطلب بود که قطعه تکثیر شده، مربوط به بخشی از ژن سنتز کننده فاکتور رونویسی متصل شونده به عناصر پاسخ دهنده تحت تنش شوری در این گیاه می‌باشد. مقایسه توالی ژن DREB2 گیاه بروموس ژاپنی با سایر توالی‌های این ژن در گونه‌های گیاهی دیگر، ثابت کرد که *Bromus japonicus* و *Aegilops tauschii* با ۸۹/۹ درصد بیشترین شباهت (کمترین فاصله ژنتیکی) را دارد. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی اسیدآمینه حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن DREB2 در این گیاه از طریق نرم‌افزار CDD search نشان داد که در این توالی، ناحیه Domain AP2 وجود دارد. این توالی با شماره دسترسی KP406596 در بانک جهانی ژن (NCI) به ثبت رسید.

کلمات کلیدی: عامل رونویسی، ناحیه AP2، مقاومت به شوری، توالی ژن.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۲

۱- فارغ التحصیل دکتری زراعت دانشگاه زابل.
۲ - دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زابل.
۳ - دانشیار بیوتکنولوژی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد.
۴ - کارشناس آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه زابل.
۵ - استادیار گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
٦ - گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.
*نویسنده مسئول: E- mail: mahboobehbasiri62@gmail.com

مقدمه

علف هرز بروموس ژاپنی (*Bromus Japonicus*) گیاهی یکساله است که در مزارع سیستان به عنوان علف هرز مهاجم و مسأله ساز شناخته شده است. این گیاه به شرایط مختلف محیطی مقاوم است و در مرحله پرکردن دانه برای کسب مواد غذائی با گندم رقابت می‌کند (Baskin and Baskin, 1981). کنترل رشد و نمو بروموس ژاپنی از طریق تنش‌های مختلف محیطی تهدیدی جدی برای عملکرد و بقاء گیاهان به شمار می‌روند. از این‌رو گیاهان همیشه بواسطه تنش‌های مختلف در معرض تهدید می‌باشند. ساز و کارهائی که گیاهان برای سازگاری و تحمل به تنش‌ها به کار می‌برند، در سطح مولکولی قابل بررسی بوده و منجر به شناسائی ژن‌های القاء شونده در اثر تنش شوری گردیده است (Mahvelati *et al*., 2014). شناسائی و تنظیم مکانیسم‌های مولکولی می‌تواند به افزایش عملکرد گندم کمک کند.

تحقیقات زیادی از نقطه نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی در رابطه با تجزیه پاسخ گیاهان به شرایط تنش و همچنین ایجاد گیاهان متحمل و مقاوم به تنش صورت گرفته است. دستیابی به این امر مستلزم درک عمیق ساز و کارهای سلولی و مولکولی برای مقاوم سازی و تحمل تنش در گیاه است. حفظ بقاء و پایداری گیاهان تحت شرایط تنش، به توانائی گیاهان در درک محرک‌ها، تولید و انتقال سیگنال‌ها و در نهایت تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی آنها بستگی دارد (Hossein and Fujita, 2009). تحقیق در زمینه مکانیسم‌های کنترل گیاهان به محرک‌های زنده و غیرزنده سبب شناسائی مسیرهای کلیدی کنترل شده و آگاهی و دانش ما را در زمینه انتقال پیام و تنظیمات هورمونی در آنها توسعه می‌دهد (Wolters and Jurgens, 2009). صدمات ناشی از تنش‌های محیطی در گیاهان از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن سبب ایجاد خسارت‌های اکسیداتیو فراوان در سطح سلولی می‌شود (Robinson and Bunce, 2000). برهمکنش‌های تنش اکسیداتیو می‌توانند پروتئین‌ها را در سطح رونویسی و یا تغییرات کووالانسی فعال کند. این امر سبب رونویسی پروتئین‌های رمزگذاری شده می‌گردد که حاصل آن فعال شدن متابولیسم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشد (Seong *et al*., 2007). تنش شوری مهمترین تنش محیطی است که با هر دو حالت سمیت یونی و تنش اسمزی منجر به اختلال تغذیه‌ای و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. واکنش گیاهان به شوری، مختلف و پیچیده بوده و تعیین یک معیار برای انتخاب ژنوتیپ برتر برای تحمل به شوری بسیار مشکل است (Ashraf and Haris, 2004). بیان بسیاری از ژنها تحت تنش شوری و سرما تحریک می‌شود. مهمترین محصول این ژن‌ها تحت این شرایط، پروتئین‌های تنظیم کننده و عوامل رونویسی مانند DREB می باشد (Stockinger *et al*., 1997). در گیاهان بیان بسیاری از ژن‌های هدف با اتصال یک عنصر عملگر همسو (Cis element) در قسمت پروموتور ژن از طریق یک عامل رونویسی کنترل می‌شود. این واحد رونویسی رگولون نام دارد که در گیاه آرابیدوپسیس چهار نمونه رگولون گزارش گردیده است. یکی از رگولون‌ها DREB است که مستقل از هورمون ABA عمل می‌کند و با کنترل بیان سیستم این رگولون می‌توان تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها را بهبود بخشید (Stockinger *et al*., 1997). DREB یک توالی حفاظت شده ۹ جفت بازی است که در پاسخ به تنش خشکی و سرما ضروری است (Tang *et al*., 2005). هسته توالی DRE، موتیف CRT (CCGAC) است که در پاسخ گیاه به سرما تاثیر دارد (Thomashow *et al*., 1949; Kizis Pages, 2002). توالی مرکزی DRE بسیار حفاظت شده است که به شکل گسترده‌ای در ژن‌های گیاهی تنش‌های شوری، خشکی و سرما تحریک می‌شوند، وجود دارد (Orval *et al*., 2000). عوامل رونویسی که به DRE/CRT متصل می‌شوند، با اسامی DREB1/CBF و DREB2 نامگذاری شده‌اند (Stockinger *et al*., 1997; Haake *et al*., 2002). تاریخ شناسائی DREB به آزمایشی که بر روی آرابیدوپسیس انجام شد، برمی‌گردد. طی این آزمایش دو cDNA مختلف DREB1A و DREB2A به گیاه کلون گردید. نتایج تحقیق نشان داد که ژن کدکننده پروتئینی DREB2 تحت تنش‌های شوری و خشکی القا می‌شوند

(Liu *et al*., 1998). ژن DREB در چندین گونه گیاهی از جمله آرابیدوپسیس، گندم، آفتابگردان، گوجه فرنگی، برنج و چندین گونه گیاهی دیگر شناسائی و توالی یابی شده است (Agarwal *et al*., 2006; Xiong *et al*., 2006; Badawi *et al*., 2007). اما در علف هرز بروموس ژاپنی هیچ‌گونه توالی از این ژن موجود نمی‌باشد.

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسائی ژن DREB در علف هرز بروموس ژاپنی تحت تنش شوری و بررسی ساختار فیزیکی توالی آن و تعیین تشابه آن با سایر ژن‌های مشابه در گیاهان دیگر جهت معرفی آغازگر مناسب در ردیابی و بررسی بیان این ژن بود. به این منظور در مطالعه حاضر سعی شده تا با شناسائی این ژن در علف هرز بروموس ژاپنی (به عنوان مهمترین علف هرز مزارع گندم سیستان) که قادر به تحمل محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی می‌باشد، در جهت مقاوم سازی گیاهان زراعی از طریق انتقال این ژن و ژن‌های درگیر در امر مقاومت به تنش، گامی برداشته باشیم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق میزان بیان ژن DREB2 در علف هرز بروموس ژاپنی با روش کمیت‌سنجی بیان ژن در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۳ انجام شد. برای این منظور ابتدا بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی گردید، سپس کشت در گلدان‌هایی به قطر ۱۰ سانتی‌متر صورت گرفت. گلدان‌های کشت شده در شرایط دمائی ثابت ۱۰ درجه سانتی گراد با شرایط طول روز و شب ۱۲ به ۱۲ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در ژرمیناتور قرار گرفتند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله ۲ الی ۳ برگی انتقال آنها به سیستم کشت هیدروپونیک صورت گرفت. در این سیستم تغذیه گیاهان با استفاده از محلول غذائی هوگلند انجام شد و محلول غذائی هر ۳ روز یکبار تعویض شد. تیمار آزمایش شامل سطوح مختلف شوری (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار) حاصل از نمک NaCl بود. پس از ده روز قرار گرفتن گیاهان در محیط کشت هیدروپونیک تنش شوری به صورت تدریجی و به میزان ۲۵ درصد هر سطح (جهت سازگار شدن گیاهان) انجام و بعد از یک هفته کل تیمار شوری به گیاهان اعمال گردید. یک هفته بعد از اعمال تیمارها، از برگ‌های سبز گیاهان نمونه برداری و بلافاصله جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج مولکول‌های RNA توسط کیت Gen all (South Corea) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ساخت رشته اول از مولکول‌های تک رشته‌ای mRNA با استفاده از کیت 2-Step RT-PCR kit شرکت Vivantis انجام گردید.

از جفت آغازگر اختصاصی ژن DREB2 شامل 5´-TATGGATTGCCTTGATGAACA-3´F و 5′-GACTCCGATTCATCCTTCCC-3′R به منظور تکثیر این ژن استفاده شد (Mohsenzadeh, 2001) و از دستگاه ترموسایکلر گرادیان (Eppendorf Germany) برای تکثیر قطعه مورد نظر با ۳۵ چرخه استفاده شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به صورت دمای اولیه واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵ چرخه دمائی شامل ۹۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهائی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های mRNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز یک درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن-دراپ[1] انجام شد. جهت بررسی تکثیر نمونه‌های مورد نظر از طریق PCR، الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. در نهایت نمونه تکثیر یافته از طریق آغازگرهای اختصاصی جهت تعیین توالی ارسال گردید. تعیین توالی بوسیله دستگاه XL ABI3730 (96 capillaries) توسط شرکت ABI[2] انجام شد. آنالیز روابط خویشاوندی، تعیین میزان تشابه و تحلیل مولکولی ژن مورد مطالعه توسط نرم‌افزارهای BLAST، ExPasy، ELM،

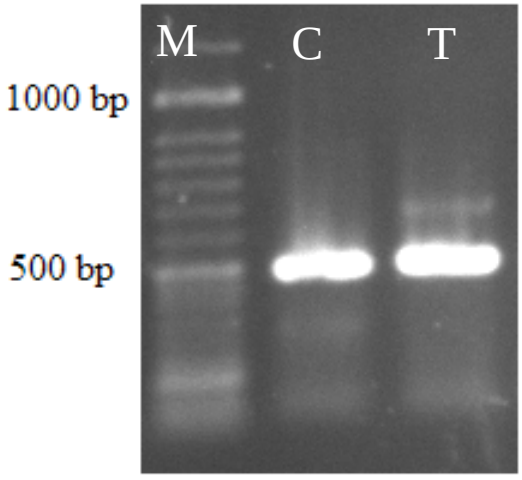
1- Scandrop, Analytika, Germany.

2- Applied bioSystems.

ClustalW و MegAlign، برنامه های وابسته به ExPasy، ORF finder، Search CDD و CLC Main Work bench صورت گرفت.

نتایج و بحث

توالی ژن DREB2 علف‌هرز بروموس ژاپنی یا GjDREB2 که در این پژوهش از منبع cDNA در گیاه بروموس ژاپنی بدست آمد، بخشی از ژن است که دارای طولی در حدود ۴۸۰ جفت نوکلئوتید است. به منظور کسب اطمینان از استخراج RNA و سنتز مناسب cDNA، ابتدا با ژن بتااکتین PCR نمونه‌ها انجام شد و در نهایت محصول PCR با ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید نتایج سنتز مناسب cDNA، محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای ژن DREB2، روی ژل انتقال یافت. محصول PCR با تشکیل باندی به طول ۴۸۰ نوکلئوتید مربوط به این گیاه تحت تنش شوری بر روی ژل الکتروفورز مشخص گردید (شکل ۱). وجود باند ۴۸۰ جفت باز در نمونه‌های تحت تنش ثابت کرد که میزان بیان ژن تحت تنش شوری افزایش چشمگیری داشته است. نتایج تعیین توالی محصول PCR علف‌هرز بروموس ژاپنی با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک تایید کرد که توالی بدست آمده از این گیاه با توالی‌های این ژن در گونه‌های گیاهی دیگر، درصد شباهت بالائی (۹۳ درصد) دارد. این نتایج موید این مطلب بود که قطعه تکثیر شده، مربوط به بخشی از ژن سنتز کننده فاکتور رونویسی متصل‌شونده به عناصر پاسخ دهنده تحت تنش شوری در علف هرز بروموس ژاپنی بود.



شکل ۱- تکثیر ژن *DREB2* در علف هرز *Bromus japonicus*، به ترتیب از سمت چپ؛ M: Ladder 500bp؛ C: نمونه شاهد بروموس؛ T: نمونه تیمار شده با تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار.

Figure 1- Gen amplification of DREB2 in the *bromus japonicus*. M :Ladder 500bp ؛C. sampled control of Bromus. Treatmented sample under salt (150 mM NaCl)

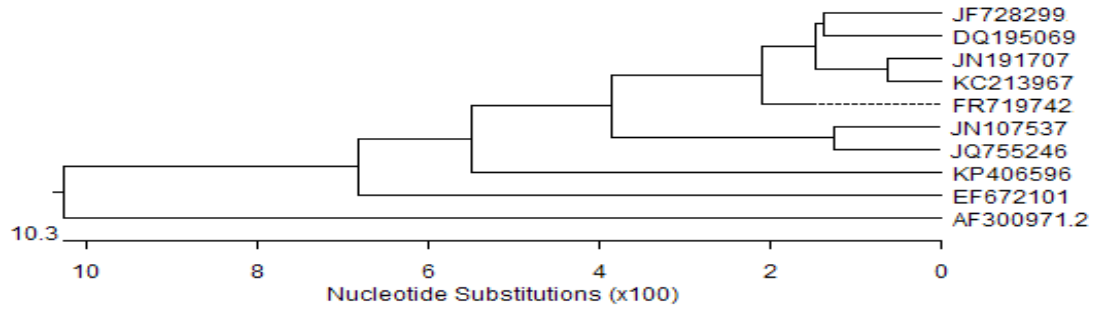
به منظور بررسی فیلوژنتیکی توالی بدست آمده با ژن DREB2 در علف هرز بروموس ژاپنی، ۹ توالی دیگر از گیاهان مختلف انتخاب گردید. همه گیاهان مورد مطالعه از خانواده غلات انتخاب و اندازه مورد مطالعه برای توالی‌ها در محدوده ۴۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز انتخاب گردید (جدول ۱). مطابق این جدول طول cDNA سه توالی مورد مطالعه *Aegilops biuncialis*، *Hordeum Brevisubulatum* و *Oryza sativa* کاملاً برابر و هم اندازه بود (۴۹۰ جفت باز). این ویژگی نشان داد که توالی cDNA در این گونه‌ها در زمان انشعاب و جداسازی از اجدادشان، بطور کامل و حفاظت شده باقی مانده‌اند. بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن DREB2 و مقایسه آن با سایر توالی‌های مشابه در گونه‌های مختلف، ثابت کرد که میزان شباهت در میان توالی‌های مورد مطالعه بالاست و گیاهان از

نظر فاصله ژنتیکی با یکدیگر اختلاف ناچیزی دارند. رسم درخت فیلوژنی برای توالی ثابت کرد ارتباط نزدیکی بین نوکلئوتیدی و پروتئینی برای ژن DREB2 وجود دارد. در این تحقیق مشاهده گردید که همردیفی توالی‌ها با استفاده از روش Cluster W و رسم درخت فیلوژنی، توالی‌های مورد مطالعه در سه گروه اصلی قرار دارند که توالی ژن BjDREB2 در گروه اول و در شاخه‌ای منشعب از سایر توالی‌ها مشاهده شد (شکل ۲). طی مطالعات انجام شده ثابت گردیده است که آنالیز فیلوژنتیکی ابزار قدرتمندی برای نشان‌یابی بسیاری از ابهامات و مسائل مختلف مرحله تکامل است (Elliott *et al*., 2006). شناسائی ژن و همولوگ‌های آن در گونه‌های گیاهی مختلف، ثابت می‌کند که این ژن‌ها از اجداد مشترکی منشعب گشته‌اند. این امر می‌تواند در درک بهتر سیر تحول گونه‌ها کمک کند و به منظور مطالعه بهتر ژنها در آینده، سیستم‌های نوین و پیشرفته تری ایجاد گردد (Mansuri *et al*., 2013). وجود شاخه‌ها و دسته‌های مختلف در تجزیه خوشه‌ای نشان‌دهنده وجود شباهت در میان گونه‌ها می‌باشد. رسم درخت فیلوژنی برای توالی نشان داد که ارتباط نزدیکی بین توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی برای ژن DREB2 وجود دارد.

جدول ۱- توصیف توالی‌های ژن *DREB2* از گونه‌های گیاهی مختلف در خانواده غلات

Table 1. describes gene sequency of DREB2 from different plant species in the family of cereals

No. Sequences	Species	cDNA length (bp)	Accession number
1	*Bromus japonicus*	435	KP406596
2	*Triticum aestivum* cultivar NI-5439	433	JF728299
3	*Hordeum brevisubulatum*	490	JN107537
4	*Triticum aestivum* cultivar HD 2733	475	JN191707
5	*Leymus qinghaicus*	560	JQ755246
6	*Aegilops tauschii*	458	KC213967
7	*Oryza sativa*	490	AF300971.2
8	*Triticum aestivum*	480	DQ195069
9	*Aegilops biuncialis*	490	FR719742
10	*Avena sativa*	420	EF672101

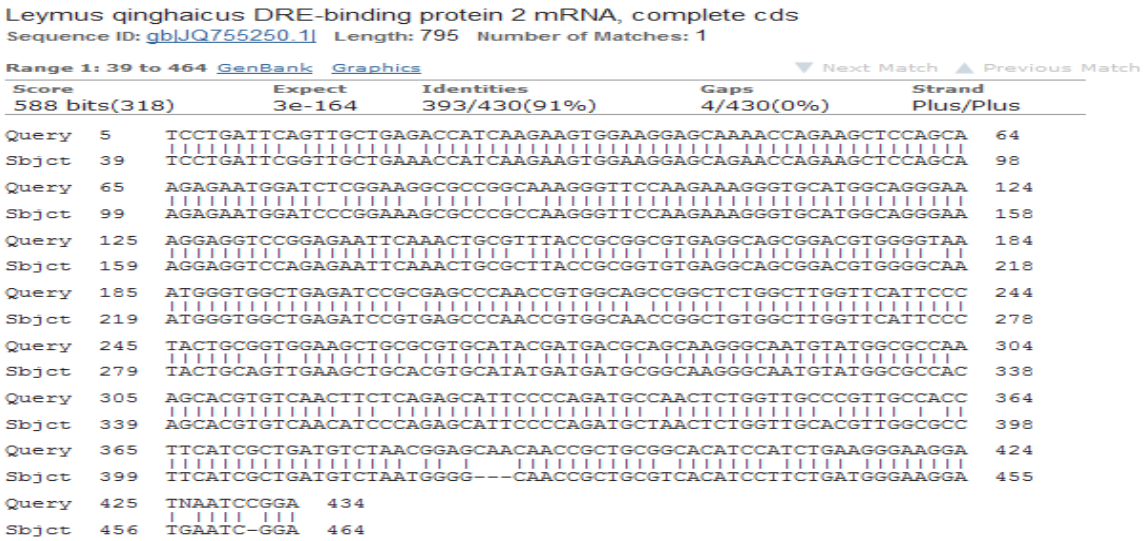


شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن *DREB2* گندم، جو، برنج، یولاف، برموس و توالی‌های مرجع زیر خانواده گندم (HD2733;NI-543)

Figure 2- Phylogenetic tree of nucleotide sequence ofthe gene DREB2 wheat, barley, rice, oats, Bromus and reference sequences of subfamilies in wheat (HD2733; NI-543)

بررسی میزان شباهت ژن BjDREB2 از طریق نرم‌افزار BLAST نشان داد که جنس Leymus qiinghaicus بیشترین میزان شباهت را با ژن مورد نظر در گیاه برموس ژاپنی دارد (شکل ۳). به دلیل اینکه برموس ژاپنی نوعی علف هرز بوده و بصورت وحشی رشد می‌کند، شباهت بیش از ۹۰ درصد مطلوب به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه توالی ژن DREB2 در این گیاه و وجود درصد شباهت بسیار زیاد آن با سایر توالی‌های مورد مطالعه، انتظار می‌رود جهت دست‌ورزی و انتقال ژنتیکی به منظور افزایش تحمل گیاه به تنش‌های اسمزی مانند شوری بتوان از ژن مورد مطالعه در گیاهان تراریخت استفاده کرد. در مطالعه قبادی و همکاران نتایج درخت فیلوژنی رسم شده از طریق نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 و alignexpasy Multi ثابت کرد که درصد شباهت ژن مورد مطالعه DREB2 در انگور به طور تقریبی به میزان ۸۵ درصد با همین ژن در سویا مشابهت دارد (Ghobadi et al., 2014). ثابت شده است که ژن‌های خانواده DREB2 در سویا تحت تنش اسمزی قرار می‌گیرند (Chen *et al.*, 2007). از اینرو این احتمال وجود دارد که در شرایط القاء تنش شوری در گیاه، میزان بیان ژن‌های خانواده DREB2 در گیاه برموس ژاپنی بیشتر شده و سبب تحمل گیاه در برابر تنش می‌گردد. به نظر می‌رسد هر پروتئین DREB قدرت انجام مکان‌یابی هسته را از طریق منطقه انتهائی N [1] و قدرت فعال‌سازی ناحیه رونویسی را اط طریق وجود ناحیه اسیدی C-Terminal داراست. از اینرو اطلاعات فوق پیشنهاد می‌دهد که هر cDNA مربوط به ژن DREB نوع خاصی از پروتئین متصل شونده به DNA را فعال می‌کند که نقش تنظیم کنندگی مکانیسم‌های رونویسی را انجام می‌دهد (Liu *et al.*, 1998). به نظر می‌رسد دلیل اختلاف درصد شباهت توالی‌ها، عوامل مختلف محیطی از قبیل شرایط محیطی و درصد اهلی شدن گونه ها نسبت به سایرین باشد. در گونه گیاهی مورد مطالعه و هدف یعنی برموس ژاپنی به دلیل اینکه گیاهی خودرو و علف‌هرز به شمار می‌رود وجود این اختلاف نوکلوتیدی و درصد شباهت پائین‌تر منطقی به نظر می‌رسد. از طرف دیگر از احتمال بروز جهش‌های تک نوکلئوتیدی و سایر جهش‌ها نمی‌توان چشم پوشید که احتمال بروز اشتباهات در توالی می‌تواند در ایجاد اختلاف توالی در برخی گونه‌ها نقش داشته باشد.

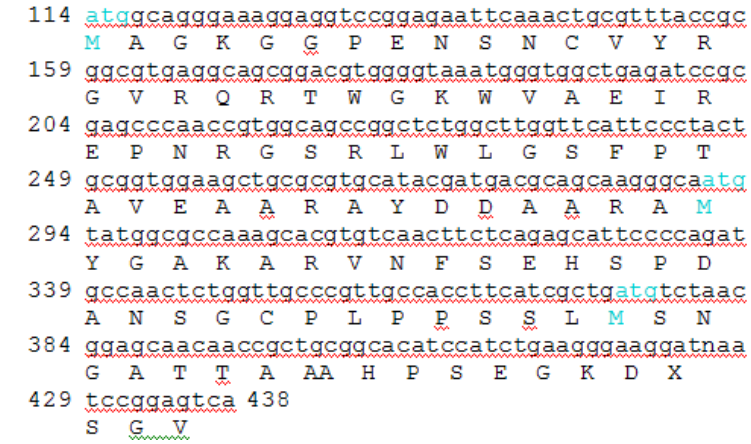
1- N-terminal Region



شکل ۳- بررسی میزان شباهت ژن *BjDREB2* از طریق نرم‌افزار BLAST

Figure 3. evaluate the similarity of gene BjDREB2 by BLAST software

به منظور ارزیابی ساختمان cDNA ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی، محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای مربوطه، تعیین توالی گردید. توالی ژن DREB2 حاوی قالب خواندن باز[1] از طریق برنامه ORF Finder-NCBI به صورت توالی ۱۰۸ اسید آمینه‌ای بدست آمد که پیش‌بینی می‌شود پروتئینی با جرم مولکولی پیشنهادی ۱۹/۵ کیلودالتون را کد می‌کند (شکل ۴).

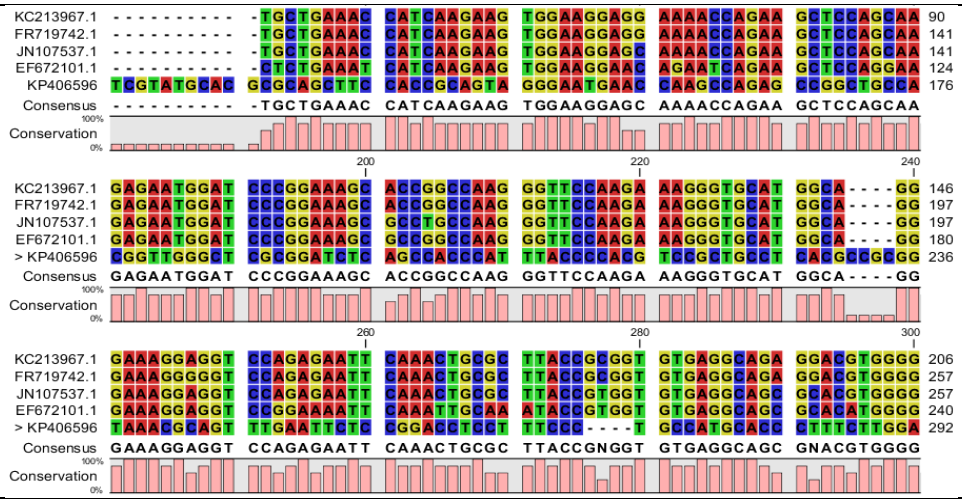


شکل ۴- توالی cDNA و توالی اسید آمینه استنباط شده *BjDREB2* (NCBI accession number: KP406596) در علف‌هرز بروموس ژاپنی

Figure 4. The cDNA sequence and inferred amino acidse quence BjDREB2 (NCBI accession number: KP406596) in *Bromus japonicus*

1- Open Reading Frame

به منظور یافتن توالی‌های همولوگ ژن DREB2، از پایگاه‌های داده ژن و پروتئین و از نرم‌افزار CLC Main work bench و Clustal W به منظور یافتن توالی حفاظت شده و صف‌بندی توالی‌های مورد بررسی استفاده شد. نتایج حاصل با نرم‌افزار CLC نشان داد که توالی بدست آمده از ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی با شماره شناسائی KP406595 در بانک ژن NCBI بیش از ۸۵ درصد با توالی این ژن در Hordeum brevisubulatum و Aegilop sbiuncialis مشابهت دارد (شکل ۵).



شکل ۵- دستیابی به منطقه حفاظت شده از طریق همردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی با نرم افزار CLC Main workbench. توالی ژن *DREB2* در *Bromusjaponicus* با شماره دسترسی (KP406596).

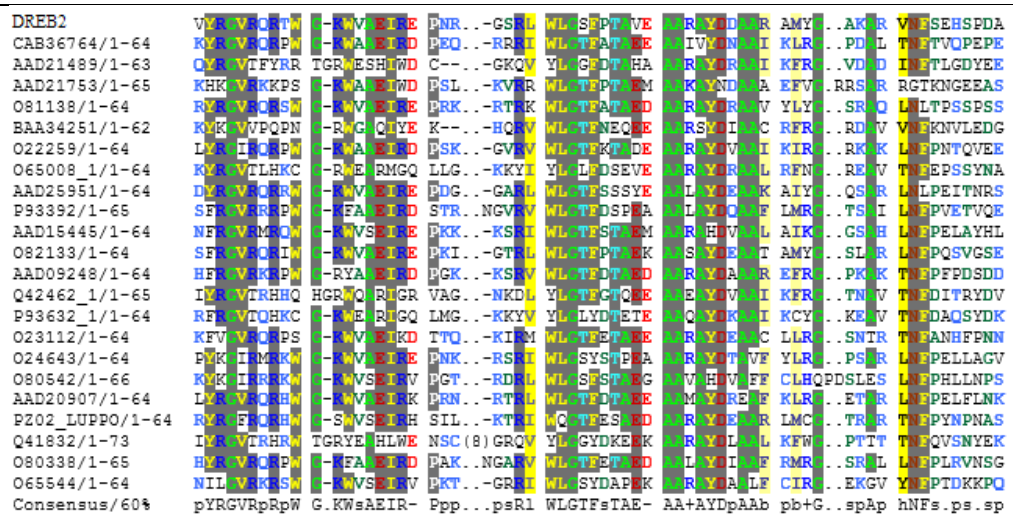
Figure 5. Access to protected areas through alignment of nucleotide sequences white CLC Main work bench software. DREB2 gene sequence in *Bromus japonicas* white available number (KP406596).

بررسی توالی آمینواسیدی DREB2 با پروتئین وابسته به EREBP/AP2 از طریق SMART و روش همردیفی hmmalign صورت گرفت. نتایج ثابت کرد که درصد شباهت قابل قبول و معنی‌داری میان توالی مورد بررسی ژن DREB2 و ناحیه حفاظت‌شده متصل‌شونده به DNA وجود دارد (شکل ۶).

توالی‌های مورد مطالعه ابتدا از طریق نرم‌افزار Megalign بررسی و از طریق روش Clustal W میزان شباهت توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همردیفی توالی چندگانه[1] برای ژن DREB2 بیانگر وجود درصد بالای شباهت در میان توالی‌های بکاررفته از گونه‌های مختلف بود. به منظور ایجاد ماتریس همگانی برای بررسی فاصله دو به دو بین توالی هدف و هر یک از توالی‌های مورد مطالعه، از روش توالی فاصله[2] استفاده شد. این روش تجزیه فیلوژنتیکی توالی‌ها، به طور کامل به ارزیابی فاصله ژنتیکی بین توالی‌های دسته‌بندی شده‌ای که مورد مطالعه قرار می‌گیرند، وابسته است. نتایج حاصل از بررسی فاصله توالی‌ها به ایجاد درخت فیلوژنتیکی مناسب کمک کرد و مقادیر شباهت توالی بروموس ژاپنی را با هریک از توالی‌های دیگر به صورت دو به دو به صورت درصد همردیفی مناسب نشان داد.

1- MSA

2- Distance Sequence



شکل ۶- بررسی توالی آمینو اسیدی *DREB2* در *Bromusjaponicus* با پروتئین‌های وابسته به *EREBP/AP2* از طریق برنامه SMART و روش همردیفی hmmalign

Figure 6. analysis of the amino acid sequence DREB2in *Bromus japonicas* affiliated proetins white *EREBP / AP2* via SMART program and alignment hmmalign.

مقایسه توالی ژن DREB2 گیاه بروموس ژاپنی با سایر توالی‌های این ژن در گونه‌های گیاهی دیگر، ثابت کرد که بروموس ژاپنی و آژیلوپس تاووشی با ۸۹/۹ درصد شباهت، بیشترین درصد شباهت را با هم دارند. کمترین میزان شباهت توالی هدف بروموس ژاپنی با یولاف[1] مشاهده گردید. نتیجه مقایسه بین توالی ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی و توالی‌های گونه‌های دیگر از طریق ماتریس فاصله نشان دهنده این بود که توالی بدست آمده برای این گیاه از شباهت قابل قبولی برخوردار بود. ماتریس شباهت که بر اساس الگوریتم UPGMA بدست آمد تأیید کرد که نتایج BLAST و آنالیزهای فیلوژنتیکی با هم مطابقت دارند (جدول ۲).

همردیفی همه توالی‌ها از طریق ClustalW نشان داد که منطقه حفاظت شده بزرگی در بین توالی‌ها با دزصد شباهت بالا وجود دارد که این موضوع می‌تواند در طراحی پرایمر برای واکنش PCR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، شناسائی ژن در سایر گونه‌ها، بررسی میزان بیان ژن تحت تیمارهای مختلف و در نهایت کلون و انتقال این ژن به گیاهان دیگر در موارد خاص مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی با ۹ توالی دیگر نشان داد که بروموس ژاپنی و Aegilop stauschii با ۸۹/۹ درصد شباهت، بیشترین شباهت (کمترین فاصله ژنتیکی) و Avena sativa کمترین شباهت (بیشترین فاصله ژنتیکی) را با توالی هدف بروموس ژاپنی دارا بود.

1- Avena sativa

جدول ۲- اندازه‌گیری ماتریس فاصله بین جفت توالی‌های مورد مطالعه

Table2. The measured distance between the pair studied sequences

Percent Identity

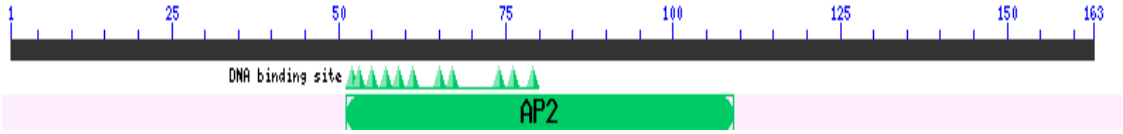
Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		84.5	85.7	88.3	88.7	89.9	76.6	89.0	85.1	74.0	1	KP406596
2	10.1		92.6	97.5	92.4	97.7	72.3	92.1	96.8	79.5	2	JF728299.1
3	9.7	7.5		88.4	89.0	91.0	66.9	81.9	94.5	89.3	3	JN107537.1
4	10.2	2.3	7.6		91.6	98.7	70.1	88.0	92.2	84.8	4	JN191707.1
5	11.3	7.8	2.5	6.3		94.5	80.4	85.4	85.1	82.9	5	JQ755246.1
6	10.6	2.1	5.2	0.4	5.7		74.0	92.6	95.0	81.4	6	KC213967.1
7	21.9	20.8	19.2	21.3	29.0	20.8		71.0	65.7	69.3	7	AF300971.2
8	12.2	2.7	5.8	3.1	12.4	2.6	27.9		84.4	75.7	8	DQ195069.1
9	10.6	3.1	5.7	3.3	7.0	0.9	20.9	2.7		87.6	9	FR719742.1
10	14.4	14.7	11.7	14.5	12.8	12.5	18.3	13.7	13.7		10	EF672101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

همچنین مشخص شد که پروتئین DREB2 دارای ناحیه متصل شونده به DNA حفاظت شده‌ای از ۶۰ اسیدآمینه است که در مجموعه بزرگی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA حضور دارند، از آن جمله می‌توان به AP2 آبیدوپسیس و EREBP تنباکو اشاره کرد. وجود ناحیه بسیار حفاظت شده به طول ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینه بنام AP2 در خانواده DREB به اثبات رسیده است (Shen *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای ناحیه حفاظت شده AP2/ERF در گیاه Caraga nakorshinski شناسائی گردید که تحت تنش شوری و سرما بیان ژن القا گردید (Xuemin *et al.*, 2001). تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی اسیدآمینه حاصل از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی از طریق نرم‌افزار CDD search نشان داد که در این توالی، ناحیه AP2 Domain وجود دارد (شکل ۷).

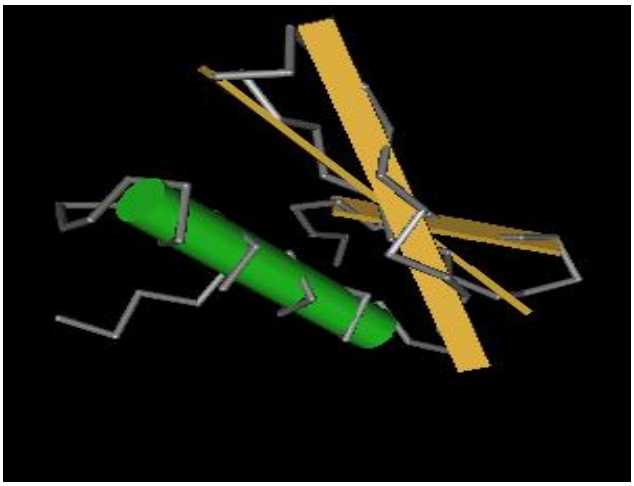
وجود ناحیه AP2 ثابت کرد که ژن مذکور به خانواده بزرگ DREB تعلق داد و در زیرخانواده DREB2 تقسیم‌بندی می‌شود. پس از بررسی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن DREB2 در گیاه بروموس ژاپنی، مشاهده گردید که منطقه AP2 حاوی یک زنجیره α-helix و سه زنجیره β-sheets است (شکل ۸). طی بررسی موتیف توالی پروتئینی DREB2 از طریق سایت ELM[1] وجود چندین منطقه تنظیمی (موتیف) یکسان مشاهده گردید.

1- www.elm.eu.org



شکل ۷- ناحیه AP2 در توالی *DREB2* بدست آمده ازعلف هرز *Bromusjaponicus* با استفاده از نرم‌افزار CDD Search

Figure 7. AP2 region in the sequence obtained DREB2 in *Bromus japonicus* using software CDD Search

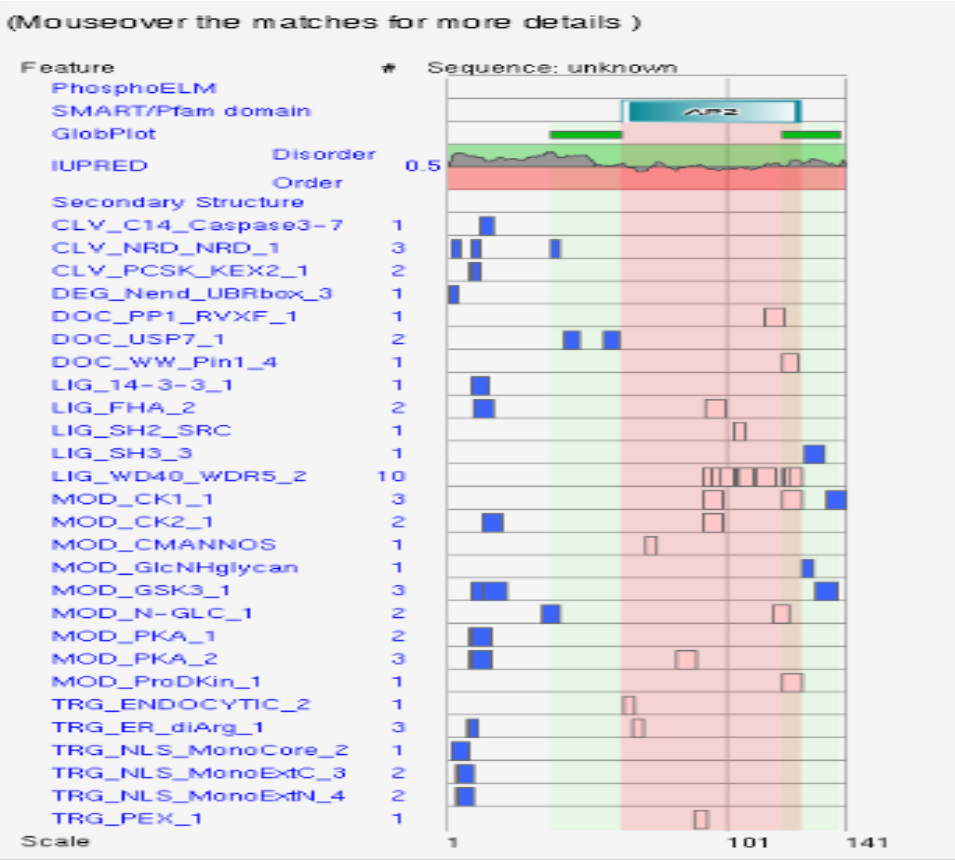


شکل ۸- ساختار سه بعدی پروتئین ناحیه AP2 توالی اسید آمینه‌ای ژن *BjDREB2*

Figure 8. The three-dimensional structure of the protein AP2region of aminoacid sequency in the gen BjDREB2

ساختارهای ثانویه MOD، CLV، DOC، LIG و چندین ساختار دیگر برای موتیف این توالی بدست آمد که هریک از این پروتئین‌ها در نقاط تنظیمی چرخه سلولی نقش اساسی دارند (شکل ۹). هر یک از این ساختارهای ثانویه در تحمل گیاه به شرایط مختلف محیطی از طریق انتقال پیام‌های ایجاد شده اثر می‌گذارند. پروتئین‌های ایجاد شده از این طریق در مناطق تنظیمی چرخه سلولی، تعمیر آسیب‌های DNA نقش دارند و با انتقال پیام از سیتوپلاسم به هسته سبب فعال شدن پروتئین‌های DREB2 درگیاه می‌شوند.

بر اساس تحقیقات انجام شده ثابت شده است که مسیرهای القای مقاومت در تنش‌های مختلف از جمله شوری برهمکنش‌های زیادی با هم دارند و باعث می‌شود تا افزایش مقاومت به یک تنش سبب القای مقاومت به تنش‌های دیگر گردد (Liu *et al.*,2000; Fowler and Thomashow, 2002) ثابت شده است که به موتیف LIG پروتئین‌هایی متصل می‌شوند که به دومین BRCT مربوط می‌شوند. این پروتئین‌ها نقش اساسی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می‌کنند و از طریق انتقال پیام آسیب توسط فسفریله شدن اسید آمینه سرین موجود در موتیف، باعث فعال شدن ژن‌های پاسخ-دهنده به تعمیر DNA، آسیب‌های DNA را برطرف می‌کند (Glover *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد در زمان بروز تنش شوری در علف‌هرز بروموس ژاپنی نیز این مکانیسم سبب فعال شدن پروتئین‌های BJDREB2 در هسته می‌گردد. از اینرو پیام‌رسان ثانویه کلسیم با انتقال پیام و فعالیت پروتئین‌های باند شونده به DNA باعث القاء بیان بیشتر ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش می‌گردد.



شکل ۹- موتیف‌های پروتئین *BjDREB2* از طریق سایت (*www.elm.eu.org*) ELM و مشاهده ساختارهای ثانویه MOD، CLV، DOC، LIG و چندین ساختار دیگر در منطقه AP2

Figure 9. The Mutifs of proteins BjDREB2 by (www.elm.eu.org) and observed secondary structures MOD, CLV, DOC, LIG and several of the structures in AP2 region

نتیجه‌گیری کلی

توصیف و شناسائی ژن *DREB2* در علف‌هرز بروموس ژاپنی، می‌تواند با هدف دستیابی به اطلاعات در رابطه با مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به تنش و کنترل گونه‌های مختلف این علف‌هرز در مزارع گندم با به‌کارگیری فناوری‌های مهندسی ژنتیک مفید باشد. با استفاده از این روش و مطالعات مولکولی و ژنتیکی مرتبط بر روی ژن‌های درگیر در مقاومت این گیاه به شرایط مختلف و سخت محیطی، در آینده‌ای نزدیک، بهتر می‌توان از گسترش بیش از پیش این گیاه در مزارع گندم و سایر گیاهان مهم زراعی جلوگیری کرد. همچنین از طریق شناسائی و انتقال این ژن‌ها به گیاهان زراعی می‌توان از ویژگی‌های مقاومتی این گیاهان به سود گیاهان زراعی استفاده کرد.

References **فهرست منابع**

Agarwal, P.K.A., P. Agarwal, M.K. Reddy and S.K. Sopory. 2006. Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Reports, 25: 1263-1274.

Agarwal, P., PK. Agarwal, S. Nair, SK. Sopory and M.K. Reddy. 2007. Stress inducible *DREB2A* transcription factor from Pennisetum glaucum is aphospho protein and its phosphorylation negatively regulates its DNA binding activity. Mol. Genet. Genomics, 277: 189–198.

Ashraf, M. and PJC, Harris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science,166: 3-16.

Badawi, M., J. Danyluk, B. Boucho, M. Houde and F. Sarhan. 2007. The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. Molecular Genetics and Genomics, 277: 533- 554.

Baskin., J. M. and C.C. Baskin. 1981. Ecology of germination and flowering in the weedy winter annual grass *Bromus japonicus*. J. Range Management, 34: 369-372.

Charu, L. and P. Manjo. 2011. Role of *DREB* in regulation of abiotic stress responses in plant. Journal of Experimental Botany,10: 1- 18.

Egawa, C., F. Kobayashi, M. Ishibashi, T. Nakamura, C. Nakamura and S. Takumi. 2006. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a *DREB2* homolog under abiotic stress conditions in common wheat. Genes Genet Syst, 81: 77–91.

Elliott, M., B. Irwin and EP. Diamandis. 2006. In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families. Genomics, 88: 591-599.

Fowler, S. and M.F. Thomashow. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell,14: 1675- 1690.

Fujii, K., G. Zhu, Y. Liu, J. Hallam, L. Chen, J. Herrero and S. Shaw. 2006. Kinase peptide specificity: improved dete, rumination and relevance to protein phosphorylation. BMC bioinformatics, 7:47-63.

Glover, JN., RS. Williams and M. Lee. 2004. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. Trends in Biochemical Science, 29: 579-85.

Haake, V., D. Cook, JL. Riechmann, O. Pineda, MF. Thomashow and JZ. Zhang. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. Plant Physiology,130: 639-48.

Hossain, MA. and A. Fujita. 2009. Purification of Glyoxalase I from onion buls and molecular cloning of its Cdna. Biosci. Biotechnol. Biochem, 73: 2007-2013.

Kapil, G., K. Pradeep, M. Agarwal and J. Bhavanath. 2010. SbDREB2A, an A-2 type *DREB* transcription factor from extreme halophyte Salicornia brachiata confers abiotic stress tolerance in Escherichia coli. Plant Cell Reports, 29:1131-1137.

Kizis, D. and M. Pages. 2002. DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought- responsive element in an ABA-dependent pathway. Plant Journal, 30: 679-89.

Lata, C., S. Bhutty, RP. Bahadur, M. Majee and M. Prasad. 2011. Association of a SNP in a novel DREB2-like gene *SiDREB2* with stress tolerance in foxtail millet (*Setariai talica* L.). Journal of Experimental Botany DOI:10.1093.

Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1998. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB*2, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and lowtemperature- responsive gene expression,respectively, in Arabidopsis. Plant Cell 10:1391–1406.

Liu. Q., N. Zhao, A. K. Yamaguch-Shinozaki and K. Shinozaki. 2000. Regulatory role of *DREB* transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. Chinese Science Bulletin, 45: 970-975.

Mahvelati, E., C. Ghobadi, BE. Seyed Tabatabaei, G. Khaksar and MA. Taghaddos. 2014. Identification and isolation of Vv*DREB* and orthologous Sb*DREB2A* genes from grapevine (*Vitisviniferacv. Askari*) under salt stress. Modern Genetics Journal, 9: 85-94.

Mansouri, S., A.A. Mehrabi, D. Kahrizi. 2013. Phylogenetic Analysis of SOS1 Gene in Different Species Based on Coding Sequences. Middle-East Journal of Scientific Research, 14: 1226-1229.

Mohsenzadeh, S., K. Karimi-Andani and H. Mohabatkar. 2011. Study of dehydration-responsive element binding-factor gene in some Iranian bread wheat cultivars. Journal of Plant Biology, 3: 69-76.

Nakashima, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stressresponsive gene expression in plants. Planta, 126: 62-71.

Neill, SJ. and E.C. Burnett. 1999. Regulation of gene expression during water deficit stress. Plant Growth Reg; 29: 23-33.

Orvar, BL., V. Sangwan, F. Omann and R. Dhindsa. 2000. steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. Plant Journal, 23: 785-94.

Robinson, J.M. and J.A. Bunce. 2000. Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbatelevel and redox status. Int. Journal of. Plant Science, 161:271-279.

Sangwan, V., I. Foulds, J. Singh and R.S. Dhindsa. 2001. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx. Plant Journal, 27: 1-12.

Seong, E.S., H.S. Cho, D. Choi, Y.H. Joung Lim, C.K. Hur and M.H. Ang. 2007. Tomato plants over expressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. Biochem.Biophys.Reas. Commun, 363:983-988.

Sharoni, A., M. Nuruzzaman, K. Satoh, T. Shimizu and H. Kondoh. 2011. Gene structures, Classification and Expression Models of the *AP2/DREBP* Transcription factor family in rice. Plant Cell Physiol, 52: 344-360.

Shen, Y.G., W.K. Zhang, D.Q. Yan, B.X. Du, J.S. Zhang and Q. Liu. 2003. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. Theoretical and Applied Genetics. 107: 155-161.

Stockinger, E.J., S.J. Gilmour and M.F. Thomashow. 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. Proc Natl Acad Sci USA; 94 (3): 1035-40.

Tang, M., S. Lu, Y. Jing, X. Zhou, J. Sun and S. Shen. 2005. Isolation and identification of a cold-inducible gene encoding a putative *DRE*-binding transcription factor from *Festuca arundinacea*. Plant Physiol Biochem, 43: 233-239.

Thomashow, MF. 1994. Arabidopsis thaliana as model for studying mechanisms of plant cold tolerance, in Arabidopsis. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 807-34.

Wolters, H. and G. Jürgens. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. Nature Reviews Genetics, 10. 305-317.

Xiong, Y. and S. Fei, 2006. Functional and phylogenetic analysis of a *DREB/CBF*-like gene in perennial yegrass (*Lolium perenne* L.) Planta, 224: 878-888.

Xuemin, W., C. Xiaofang, L. Yun, G. Hongwen, W. Zan and S. Guizi. 2011. CK*DREB* gene in Caragana korshinskiiis involve a in the regulation of stress response to multiple abiotic stresses as an *AP2/EREBP* transcription factor. Molecular Biology Reports, 38:2801-2811.

Identification of Dehydration-responsive Element Binding-factor Gene in *Bromus japonicus* in the Salinity Stress

M. Basiri[1*], S. M. Mousavi-Nik[2], S. K. Sabbagh[3], D. Naderi[4], A. Siahmarguee[5], K. Mostafavi[6]

Abstract

Invasive plant species that are characterized as weed, plants are resistant to environmental hard conditions that this feature can be used to the genetic alternation and transformation to resistant crops. The aim of this study was identification of gene involved in tolerance to abiotic environmental stresses in the *Bromus japonicus* called *DREB2*. in this subject, salinity stress was applied via sodium chloride, Sequencing and Identification of stress resistance gene in this plant and then sequence obtained was examined. Sequence Analysis and Comparing sequence obtained with sequences this gene in other plants was performed with softwares such as BLAST, ExPasy, ELM, Clustal W, Meg Align. The result was showed that the amplified fragment belonged to part of salinity-responsive element binding-factor gene in this plant. The comparison DREB2 gene sequence with other sequences this gen in the other plant species was confirm the *Bromus japonicus* and *Aegilops tauschii* have the most similarity with 89.9% the highest likeness (the lowest genetic distance). Bioinformatics analysis of the amino acid sequence of the translated nucleotide sequence of the gene *DREB2* in the *Bromus japonicus* through software CDD search showed that AP2 Domain area is in this sequence, these sequences was submitted to GenBank, it is accession code is KP406596.

***Key words*:** Transcription factors, AP2 domain, Resistance of salinity sequence of the gene

Received date: 08 August 2017 Accepted date: 02 Desemebr 2018

1- Agronomy Ph. D. graduated, University of Zabol.
2 - Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Zabol.
3 - Associate Professor, Department of Biology, University of Yazd.
4 - University of Zabol.
5 - Assistant Professor, Department of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.
6 - Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
*Corresponding author E-mail: mahboobehbasiri62@gmail.com