Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Identification, bioinformatics evaluation and gene expression of DREB2 in local wheat of Kalak Afghani under salinity stress

Naderi Davoud
*Corresponding author. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zabol. Zabol, Iran. E-Mail: naderi.davoud02@gmail.com.

Basiri Mahboubeh
Agronomy Ph. D. graduated, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Zabol. Zabol, Iran. E-Mail: mahboobehbasiri62@gmail.com.

Mousavi-Nik Seyed Mohsen
Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zabol. Zabol, Iran.

Fakheri BaratAli
Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: ba_fakheri@yahoo.com

Sabbagh Seyed Kazem
Associate Professor, Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran. E-mail: sksabbagh@yazd.ac.ir

Abstract

Objective

DREB gene family is one of the effective transcription factors in plant tolerance to environmental stresses, including salinity stress. The aim of this study is to identify and evaluate the expression of DREB2 gene in different salinity concentrations in local wheat of Kalak Afghan.

Materials and methods

Salinity stress treatment was applied to wheat using NaCl salt. Experimental treatments included different salinity levels (0, 100, 150, 200, 250 and 300 mM). Then RNA extraction and cDNA synthesis were performed and the specific fragment of DREB2 gene was amplified with specific primers. The obtained transcript was then sent for sequencing and the sequence was analyzed to identify the DREB2 gene.

Results

Partial sequence of DREB2 gene of local wheat of Kalak Afghani was registered in NCBI database with access number KR106189. The results of sequencing showed that the obtained sequence is more than 95% similar to the sequence of this gene in Triticum dicoccoides and

Agropyrum elongatum. Examination of the second structure of DREB2 protein sequence through PSIpred and SOPMA programs showed that this sequence has 46 alpha helices (32.86%), 11 beta helices (7.86%), 9 long strands (6.43%) and 74 is a random helix (52.86%). The results of evaluation of DREB2 gene expression showed that the concentration of 100 mM salinity treatment, has a significant effect on increasing gene expression. In general, the highest effect on DREB2 gene expression was 100 mM salinity treatment and the lowest value was 300 mM.

Conclusions

In general, the DREB2 gene increases plant tolerance compared to other stress-induced genes, which makes them a desirable target for genetic engineering and crop performance. It seems that the reason that the expression of DREB2 gene does not increase at high concentrations is that the salt load is greater than the cells' ability to transmit it. Under these conditions, salt is transferred to the cytoplasm and inhibits enzymatic activities. Also, a common consequence of the accumulation of high concentrations of salt is the accumulation of large amounts of Reactive oxygen species (ROS), which can cause protein oxidation, damage to cellular DNA, lipid peroxidation, and interaction with other vital cell components. Leads to cell toxicity.

Keywords: Bioinformatics, Partial CDS, Abiotic Stresses, Transcription factors, Motif, qPCR

Paper Type: Research Paper.

Citation: Naderi Davoud, Basiri Mahboubeh, Mousavi-nik Seyed-Mohsen, Fakheri Barat-Ali, Sabbagh Seyed-Kazem (2021) Identification, bioinformatics evaluation and expression of DREB2 gene expression in local wheat of Kalak Afghani under salinity stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 103-124.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 103-124. DOI: 10.22103/jab.2021.16853.1279

Received: May 19, 2021. Accepted: June 24, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

شناسائی، ارزیابی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن DREB2 در گندم محلی کلک افغانی تحت شرایط تنش شوری

داود نادری

*نویسنده مسئول: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: naderi.davoud02@gmail.com

محبوبه بصیری

فارغ التحصیل دکتری زراعت، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: mahboobehbasiri62@gmail.com

سید محسن موسوی نیک

استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

براتعلی فاخری

استاد، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: ba_fakheri@yahoo.com

سیدکاظم صباغ

دانشیار، گروه زیست‌شناسی دانشگاه یزد، یزد، ایران. رایانامه: sksabbagh@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۳

چکیده

هدف: خانواده ژنی DREB، از فاکتورهای رونویسی موثر در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری هستند. پژوهش حاضر با هدف شناسائی و ارزیابی بیان ژن DREB2 در غلظت‌های مختلف شوری در گندم محلی کلک افغانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: تیمار تنش شوری با بکارگیری نمک NaCl به گندم اعمال شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف شوری (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و۳۰۰ میلی‌مولار) بود. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد و تکثیر قطعه اختصاصی

ژن DREB2 با پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. در ادامه ترانسکریپت بدست آمده، برای توالی‌یابی ارسال شد و به منظور شناسائی ژن DREB2، توالی مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج: توالی جزئی ژن DREB2 گندم محلی کلک افغانی در پایگاه NCBI با شماره دستیابی KR106189 ثبت گردید. نتایج حاصل از همردیفی، نشان داد که توالی بدست آمده، بیش از ۹۵ درصد با توالی این ژن در گیاهان *Triticum dicoccoides* و *Agropyrum elongatum* مشابهت دارد. بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی DREB2 از طریق برنامه‌های PSIpred و SOPMA نشان داد که این توالی دارای ۴۶ مارپیچ آلفا (۳۲/۸۶ ٪)، ۱۱ پیچ بتا (۷/۸۶ ٪)، ۹ رشته بلند (۶/۴۳ ٪) و ۷۴ مارپیچ تصادفی (۵۲/۸۶ ٪) می‌باشد. نتایج ارزیابی بیان ژن DREB2 نشان داد که غلظت ۱۰۰ mM تنش شوری، تاثیر بسزایی در افزایش بیان ژن دارد. به طورکلی بیشترین تاثیر در بیان ژن DREB2 را غلظت ۱۰۰ mM تنش شوری داشت و کمترین مقدار مربوط به غلظت ۳۰۰ mM تنش شوری بود.

نتیجه‌گیری: بطور کلی، ژن DREB2 در مقایسه با سایر ژن‌های القاشونده توسط تنش، تحمل گیاه را افزایش می‌دهد و همین امر موجب شده این ژنها جهت مهندسی ژنتیک و بهبود عملکرد محصولات، هدف مطلوب و مناسبی باشند. به نظر می رسد دلیل اینکه میزان بیان ژن DREB2 در غلظت‌های بالا افزایش نمی یابد، بارگیری نمک بیشتر از توان سلول ها برای انتقال آن باشد. در این شرایط نمک به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند و مانع از فعالیت‌های آنزیمی می‌گردد. همچنین پیامد رایج ناشی از تجمع غلظت‌های بالای نمک، تجمع مقادیر زیادی از اکسیژن فعال آزاد (ROS) باشد که می‌تواند سبب اکسیداسیون پروتئین ها، آسیب به DNA سلولی، پراکسیداسیون لیپیدها و ایجاد اثر متقابل با دیگر اجزای حیاتی سلول گردد که منجر به سمیت سلول می‌گردد.

کلمات کلیدی: بیوانفورماتیک، توالی جزئی، تنش‌های غیرزنده، فاکتورهای رونویسی، موتیف، qPCR

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نادری داود، بصیری محبوبه، موسوی‌نیک سید محسن، فاخری براتعلی، صباغ سیدکاظم (۱۴۰۰) شناسائی، ارزیابی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن DREB2 در گندم محلی کلک افغانی تحت شرایط تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۱۲۴-۱۰۳.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

تنش شوری در اکثر مناطق جهان، از تنش‌های غیرزنده مهم است که بر عملکرد گیاه و کیفیت محصول، اثرات زیان‌باری دارد و سبب سمی‌شدن خاک و انباشت سولفات سدیم در خاک و محدودشدن رشد گیاه می‌گردد و اثر آن به صورت تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نمایان می‌گردد (Agarwal et al. 2006). تنش شوری، یک عامل محدودکننده است که از طریق ایجاد محدودیت تغذیه‌ای در جذب آب، فسفر، نیترات و کلسیم، موجب اختلال در رشد و نمو طبیعی گیاه می‌شود (Munns 2002; McNielly and Ashraf 2004). بر اساس تحقیقات سازمان فائو، وسعت اراضی شور ایران بین ۱۹ الی ۹۳ میلیون هکتار برآورد شده است بطوریکه آمار، حکایت از آن دارد که ۲۵/۵ میلیون هکتار از اراضی ایران، شور و ۸/۵ میلیون هکتار از این اراضی، بسیار شور هستند (Fao 2010). گندم نان، یکی از گیاهانی است که در این خاک‌ها کشت می‌شود و به عنوان یک گیاه نیمه متحمل به شوری شناخته می شود.

گندم یک گیاه زراعی مهم است و با توجه به پتانسیل ژنتیکی این گیاه، افزایش تولید آن می‌تواند نقش عمده‌ای در کاهش گرسنگی و افزایش تولید غذا در سطح جهانی داشته باشد. با توجه به ماهیت پیچیده تحمل گیاه به شوری، گیاهی متحمل به شوری گفته می‌شود که در محیط شور بتواند رشد کند و عملکرد اقتصادی داشته باشد (Ravari et al. 2016). یکی از انواع گندم بومی سیستان گندم کلک افغانی، می‌باشد که در شرایط قرارگیری در تنش‌های مختلف محیطی از جمله شوری و خشکی، قادر است رشد و عملکرد مطلوبی داشته باشد و تا حدودی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت ایجاد مقاومت به شرایط تنش، به کار گرفته شود (Basiri et al. 2019). در دهه گذشته، مطالعات مولکولی در پاسخ به تنش‌های محیطی و چگونگی تحمل گیاهان به این تنش‌ها، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از مکانیسم‌های تحمل به شوری، ژنتیکی بوده که به نتاج هم انتقال می‌یابد. از جمله این موارد، تغییر الگوی ترنسکریپتوم و تغییر الگوی بیان ژن‌های مرتبط ست. این تغییر حاصل برهمکنش سیگنال‌های مختلفی است که از محیط بیرون سلول به داخل سلول انتقال و القا می‌شوند (Wang *et al*. 2010). سرنوشت گیاه در برابر تنش‌ها، توسط ژن‌ها تعیین می‌شود که با تغییر الگوی بیان، نقش خود را در مکانیسم تحمل به تنش ایفا می‌کنند. در پاسخ به یک تنش، الگوی بیان تعداد بی شماری از ژن‌ها تغییر می‌کند که تعدادی از آنها در ایجاد گیاه مقاوم یا حساس نقش کلیدی‌تری دارند. پیدا کردن این ژن‌ها، می‌تواند به درک محققان از مکانیسم‌های تحمل کمک شایانی کند تا در انتقال آنها به گیاهان حساس و ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم بهره گیرند (Li *et al*. 2014).

عناصر پاسخ به کم آبی (DRE)[1]، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های محیطی دارند. DRE شامل یک توالی مرکزی محافظت شده ۵ جفت بازی به صورت CCGAC است که آن را توالی تکراری C می‌نامند. پروتئین‌های کدشده توسط ژن‌های DREB به این توالی متصل و منجر به تنظیم بیان ژن‌ها می‌شود (Kasuga *et al*. 1999). عنصر پاسخ

[1] Dehydration-Response Element

به کم آبی (DRE) با توالی هسته‌ای A/GCCGAC به عنوان یک عنصر پروموتور فعال کننده Cis در تنظیم بیان ژن در هنگام پاسخ به تنش خشکی، شوری و سرما در گیاه آرابیدوپسیس شناخته می‌شود (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994). فاکتور رونویسی DREB1A به طور خاص با DRE اثر متقابل دارد و بیان ژن‌های متحمل به تنش را القا می‌کند. همچنین بیان بالای ژن DREB در گیاهان تراریخته، بیان برخی از ژن‌های مقاومت به تنشها را فعال می‌کند. از اینرو بالابودن بیان ژن DREB ، میزان تحمل گیاه در شرایط تنش خشکی، شوری و سرما را بهبود می‌دهد (Kasuga *et al.* 1999).

ژنهای هدف DREB1A حاوی موتیف‌های هسته‌ای وابسته به DRE در مناطق پروموتور هستند. Fowler and Thomasow (2002)، تعداد ۴۱ ژن هدف از DREB/CBFs را با استفاده از روش Affymetrix Gene Chipp Array گزارش دادند. محققان گزارش کردند که میزان بیان ژن‌های DREB/CBFs در شرایط تنش‌های غیرزنده از قبیل شوری، خشکی، سرما و ... نسبت به شرایط غیر استرس در گیاه ترنس ژنیک آرابیدوپسیس بالاتر بود (Fowler and Thomashow., 2002). ژنهای DREB بیان ژن‌های چندگانه هدف در ناحیه پائین‌دست را در شرایط تنش تنظیم می‌کنند. در مطالعه Arabbeigi et al. (2019) که بیان ژن DREB2 و P5CS را در شرایط تنش شوری در گیاه *Aegilops cylindrical* بررسی کردند، گزارش شد که تنش شوری، بطور معنی‌داری در تنظیم مجدد بیان ژن DREB2 تاثیر دارد و به نقش محوری این ژن در تحمل به شرایط تنش اشاره نمودند.

در مطالعه‌ای دیگر، عوامل رونویسی MdDREB2 در سیب (*Malus domestica*) از طریق روش بیوانفورماتیک شناسایی شد و سطح رونوشت MdFREB2 در بافت‌های مختلف و شرایط استرس غیر زنده نیز با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنها نتیجه گرفتند که عوامل رونویسی MdDREB2 ساختار پروتئینی بسیار محافظت شده‌ای دارند و به تنش های غیرزیستی پاسخ می دهند، که نقش مهمی را در برابر شرایط مختلف محیطی نشان می‌دهند. نتایج کمی RT-PCR نشان داد که فاکتورهای رونویسیMdDREB2 دارای الگوی بیان مشابه بوده و دارای سطح بیان بالاتر در ریشه و برگ نسبت به سایر بافت‌ها هستند (Li et al. 2017). زیرخانواده فاکتورهای رونویسی DREB/ERF با توجه به نقش شان در پاسخ گیاه به استرس، به صورت ویژه مورد توجه قرار دارند و نقش آنها در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده اثبات شده است (Agarwal et al. 2010; Xu et al. 2011). آنالیز گیاهان مقاوم به تنش، منابع ژنی جدیدی مرتبط با تحمل به تنش پیشنهاد می‌کنند که ممکن است دانش ما را نسبت به بیان ژن و عملکرد خانواده DREB گسترش دهد (Li et al. 2014). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Masoudzadeh et al. 2020). ماده ژنتیکی سلول (تعداد زیادی ژن) هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شود و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از این ژن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد

نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Jafari Darehdor et al. 2016). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند، کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Ahsani et al. 2019). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد، درحالی‌که بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت عوامل و عناصر مختلفی کنترل می‌شود (Mohammadabadi 2021). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Tohidi nezhad et al. 2015). یکی از اقدامات اساسی در موجودات مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). لذا، هدف از این مطالعه، شناسائی توالی جزئی ژن DREB2 از روی cDNA (ترنسکریپت) به کمک روش PCR است و در ادامه توالی بدست آمده از طریق نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و پس از آن، بیان این ژن در شرایط مختلف تنش شوری با تکنیک qPCR، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش: این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۳ انجام شد و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و ۶ تیمار اجرا گردید که تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف شوری (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و۳۰۰ میلی‌مولار) حاصل از نمک NaCl بودند. بذر گندم رقم کلک افغانی از بخش تهیه و اصلاح نهال و بذر مرکز تحقیقات زهک واقع در شهرستان زابل استان سیستان و بلوچستان تهیه گردید. پس از رسیدن گیاهان به مرحله ۲-۳ برگی انتقال آنها به سیستم کشت هیدروپونیک صورت گرفت. جهت جلوگیری از پوسیدگی ریشه و رسانده اکسیژن مناسب به گیاه، از پمپ مخصوص استفاده شد. پس از ده روز قرار گرفتن گیاهان در محیط کشت هیدورپونیک، سطوح مختلف شوری به محیط رشد گیاه اضافه گردید. این کار به مدت سه روز برای سازگار شدن گیاه انجام شد و پس از گذشت ۳ روز از اعمال تنش شوری، از برگ‌های گیاهان نمونه‌برداری صورت گرفت و جهت استخراج RNA ، درون فریزر ۸۰ – نگهداری گردید.

استخراج RNA از نمونه‌ها و ساخت cDNA: مراحل استخراج RNA از طریق کیت Ribospin Plant, Genall, Seoul, Korea Kit مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، به ترتیب بر روی ژل آگارز ۲ درصد و دستگاه بیوفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از ماده DNase محصول شرکت سیناژن جهت از بین بردن DNA ژنومی استفاده گردید. پس از آن تیوب‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی

گراد نگهداری و جهت مراحل بعدی سنتز cDNA بکار گرفته شد. همچنین سنتز cDNA از مولکول‌های تک رشته‌ای mRNA از طریق کیت 2-Steps RT-PCR kit شرکتVivantis انجام شد.

انجام روش PCR جهت شناسایی ژن DREB2: از جفت آغازگر اختصاصی ژن *DREB2* شامل-´5 TATGGATTGCCTTGATGAACA-3´F: و 5′-GACTCCGATTCATCCTTCCC-3′R: به منظور تکثیر این ژن در گندم رقم محلی کلک افغانی بکارگرفته شد (Mohsenzadeh, 2011). همچنین به منظور تکثیر قطعه موردنظر از دستگاه ترموسایکر گرادیان (Eppendrof, Germany) با ۳۵ چرخه استفاده گردید. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به صورت دمای اولیه واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵ چرخه دمایی شامل ۹۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. کیفیت و کمیت مولکول‌های mRNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و روش طیف‌سنجی با دستگاه اسکن‌دراپ (Scandrop, Analytika, ermany) انجام شد. جهت بررسی تکثیر نمونه‌های مورد نظر از طریق PCR، الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. در نهایت نمونه تکثیریافته از طریق آغازگرهای اختصاصی جهت تعیین توالی ارسال گردید. تعیین توالی بوسیله دستگاه ABI3730 (96 capillaries) XL توسط شرکت Applied bioSyestems (ABI) کشورآمریکا انجام شد.

بررسی بیان ژن با روش Real Time PCR: برای تعیین مقدار بهینه cDNA، ابتدا شیب غلظت تهیه شد و عمل تکثیر نمونه‌ها با استفاده از روش Real time PCR صورت گرفت. در این آزمایش از Hot Taq Eva Green qPCR Mix(no ROX)(شرکت سیناژن) استفاده شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن DREB2، واکنش PCR به تعداد ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ثانیه / ۵۶ درجه ۳۰ ثانیه/ ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه با حجم ۲۰ میکرولیتر و یک میکرولیتر نمونه cDNA صورت گرفت. به منظور بررسی کمّی بیان ژن، از طریق به کارگیری دستگاه Real Time PCR (شرکت Corbett research RG 3000 –). جهت تجزیه و تحلیل نسبت بیان ژن DREB2 در مقایسه با ژن کنترل بتا اکتین برای تمام تیمارها از نرم افزار آماری SAS استفاده شد.

آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز روابط خویشاوندی، تعیین میزان تشابه و تحلیل مولکولی ژن مورد مطالعه به منظور شناسائی و مقایسه ژن مورد مطالعه در گندم توسط نرم‌افزارهایی همچون Motif Scan، Mega 6، Clustal x2.1 و ProtParam ، CDD search ، BLAST ، PSIpred ، SOPMA صورت گرفت. محاسبات آماری جهت اندازه گیری میزان بیان ژن با استفاده از نرم افزارهای SAS و Excel و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل میانگین مربعات (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد بررسی گردید.

نتایج و بحث

بررسی توالی نوکلئوتید و اسید آمینه‌ای ژن DREB2: نتایج توالی یابی و بررسی با برنامه nBLAST نشان داد که قطعه شناسائی شده در جهت معمولی، ژن DREB2 می‌باشد (شکل ۲). cDNA کدکننده این ژن ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI Gen Bank با شماره دستیابی **KR106189** به طول ۴۲۳ جفت باز بوده و یک پروتئین با ۱۴۰ اسید آمینه را رمز می‌نماید (شکل ۱- الف). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به دست آمده از طریق بکارگیری برنامه ProtParam نشان داد که این ژن کد کننده پروتئینی با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۹/۵۴ با فرمول مولکولی $C_{641}H_{1016}N_{202}O_{204}S_6$ می‌باشد. شاخص آلیفاتیک این توالی، به عنوان عاملی مهم جهت برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت، ۴۴/۱۴ محاسبه گردید که نشان دهنده مقاوم بودن ژن DREB2 رقم گندم کلک افغانی در برابر حرارت می‌باشد (Kim et al. 2008).

توالی‌های گیاهان مختلف خانواده غلات از جمله جو، یولاف، چمن و تعدادی دیگر به منظور بررسی و مقایسه توالی بدست آمده از گندم کلک افغانی از بانک ژن NCBI انتخاب گردید. در ابتدا از طریق برنامه BLAST تشابه توالی مورد نظر در بین سایر توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه ترادف توالی رقم گندم محلی کلک افغانی با ترادفهای مشابه موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از برنامه BLAST نشان داد که این ژن تشابه زیاد (حدود ۹۹٪) با ژن DREB2 در *Aegilops tauschii* موجود در بانک جهانی ژن(NCBI (Squence ID: AGL08026 دارد (شکل ۱- ب).

بررسی موتیف‌های ساختاری پروتئین DREB2: به منظور تعیین ناحیه متصل شونده به DNA حفاظت شده، توالی نوکلئوتیدی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار CDD search و آنالیز بیوانفورماتیکی توالی مشخص گردید که در این توالی، ناحیه AP2 Domain وجود دارد (شکل ۲، الف). همچنین مشخص شد که پروتئین DREB2، دارای ناحیه متصل شونده به DNA حفاظت شده ای از ۷۰ اسید آمینه (۲۱۰ نوکلئوتید) است. در مطالعه‌ای Basiri et al. (2019)، گزارش گردید که پروتئین DREB2 بررسی شده در علف هرز بروموس ژاپنی، دارای ناحیه متصل شونده به DNA حفاظت شده ای از ۶۰ اسید آمینه است. طی بررسی‌های انجام شده بر روی خانواده AP2/ERF، مشخص گردید که تعداد ۱۴۵ ژن از این خانواده، در زیر خانواده DREB قرار دارند (Nakano et al. 2006; Sakuma et al. 2002). در همه ژن‌های این زیرخانواده، یک ناحیه بسیار حفاظت شده به نام ناحیه AP2 (Apetala2) وجود دارد که دارای تعداد ۶۰ الی ۷۰ اسید می‌باشد (Shen et al. 2003). عامل رونویسی DREB توالی‌های خاصی را روی پروموتور ژن‌های القا شونده توسط تنش اسمزی شناسائی می‌کند. این توالی عناصر واکنش‌دهنده به کم‌آبی (Dehydration Response Elements) نام دارد که توالی هسته حفاظت شده ۹ جفت بازی (5'-TACCGACAT-3') را شامل می‌شود (Yamaguchi and Shinozaki 1993). نتایج حاصل از نرم افزار آنلاین

MotifScan نشان داد که این ژن در گندم نان رقم محلی کلک افغانی دارای دامنه AP2/ERF با E-value برابر با 3.4e - 15 است (شکل ۲، ب).

الف

```
  1 ATGGCAGGGAAAGGAGGTCCAGAGAATTCAAACTGCGCTTACCGC
    M  A  G  K  G  G  P  E  N  S  N  C  A  Y  R

 46 GGTGTGAGGCAGAGGACGTGGGGGAAATGGGTTGCTGAGATCCGT
    G  V  R  Q  R  T  W  G  K  W  V  A  E  I  R

 91 GAGCCCAACCGTGGCAATCGGCTGTGGCTTGGTTCATTCCCTACC
    E  P  N  R  G  N  R  L  W  L  G  S  F  P  T

136 GCAGTCGAAGCTGCACGTGCATATGATGATGCGGCAAGGGCAATG
    A  V  E  A  A  R  A  Y  D  D  A  A  R  A  M

181 TATGGCGCCAAAGCACGTGTCAACTTCTCAGAGCAGTCCCCGGAT
    Y  G  A  K  A  R  V  N  F  S  E  Q  S  P  D

226 GCCAACTCTGGTTGCACGCTGGCACCTCCATTGCCGACGTCTAAT
    A  N  S  G  C  T  L  A  P  P  L  P  T  S  N

271 GGGGCAACCGCTGCGTCACATCCTTCTGATGGGAAG
    G  A  T  A  A  S  H  P  S  D  G  K  *
```

ب

dehydration-responsive element-binding protein, partial [Aegilops tauschii]
Sequence ID: AGL08026.1 Length: 153 Number of Matches: 1

Range 1: 47 to 148 GenPept Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
211 bits(536)	2e-74()	Compositional matrix adjust.	101/102(99%)	101/102(99%)	0/102(0%)	

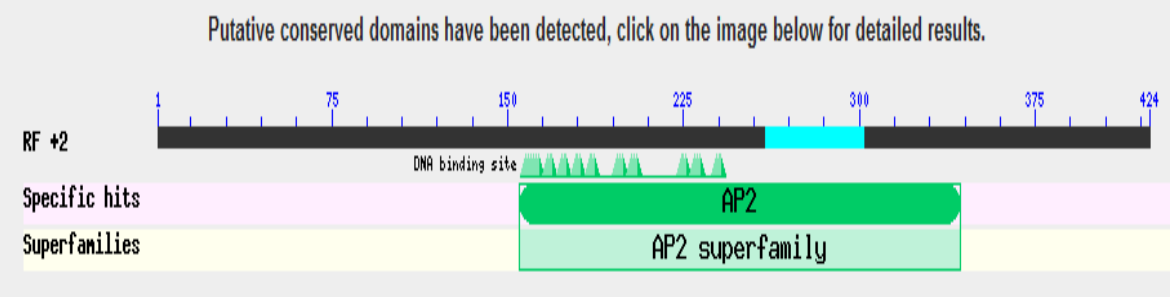
```
Query  1    MAGKGGPENSNCAYRGVRQRTWGKWVAEIREPNRGNRLWLGSFPTAVEAARAYDDAARAM  60
            MAGKGGPENSNCAYRGVRQRTWGKWVAEIREPNRGNRLWLGSFPTAVEAARAYDDAARAM
Sbjct  47   MAGKGGPENSNCAYRGVRQRTWGKWVAEIREPNRGNRLWLGSFPTAVEAARAYDDAARAM  106

Query  61   YGAKARVNFSEQSPDANSGCTLAPPLPTSNGATAASHPSDGK  102
            YGAKARVNFSEQSPDANSGCTLAPPLP SNGATAASHPSDGK
Sbjct  107  YGAKARVNFSEQSPDANSGCTLAPPLPMSNGATAASHPSDGK  148
```

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن DREB2. الف) توالی cDNA و توالی اسید آمینه بدست آمده (NCBI accession number: KR106189) DREB2 در کلک افغانی. ب) بررسی میزان شباهت توالی اسید آمینه‌ای از طریق برنامه BLAST

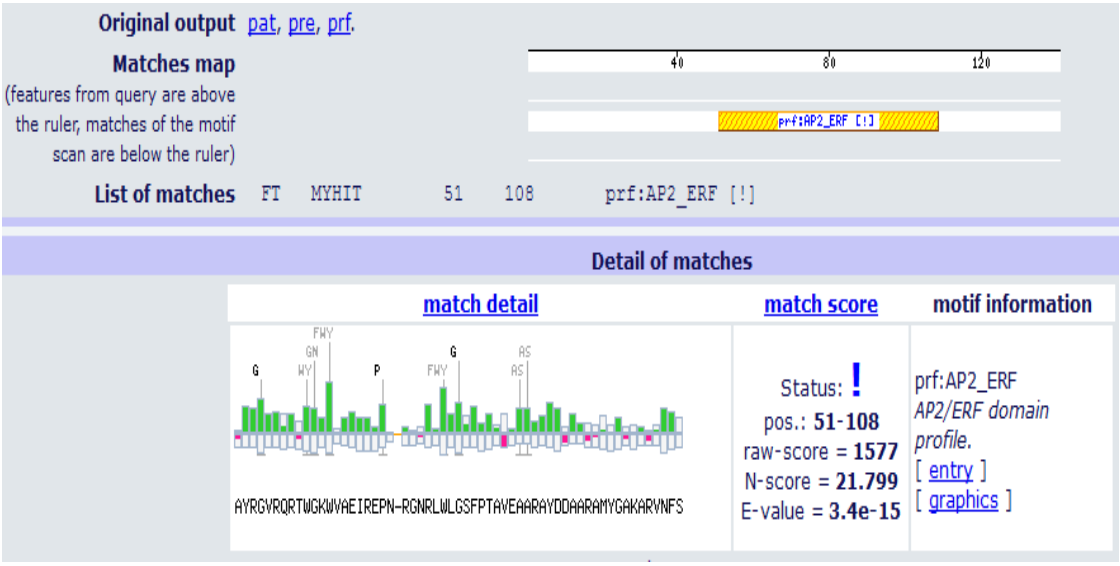
Figure 1. Nucleotide and protein sequence of DREB2. A) The cDNA sequence and inferred amino acid. DREB2 sequence (NCBI accession number: KR106189) in kalak afghani. B) Similarity evaluation of DREB2 protein sequence using BLAST program

جهت بررسی میزان شباهت و همردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن DREB2 بدست آمده از گندم رقم محلی کلک افغانی، توالی‌های همولوگ این ژن از گیاهان دیگر، از بانک ژن دریافت گردید و با استفاده از نرم افزار Clustal x2 و Mega6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل، نشان داد که توالی بدست آمده در رقم کلک افغانی، بیش از ۹۵ درصد با توالی این ژن در گیاه *Triticum dicoccoides* و *Agropyrum elongatum* مشابهت دارد. همردیفی چندگانه برای این ژن، بیانگر میزان بالای درصد شباهت در بین توالی‌های استفاده شده از گیاهان مختلف بود (شکل ۳).

الف



ب



شکل ۲- ناحیه حفاظت شده دامنه AP2 در ژن DREB2 در کلک افغانی

Figure 2. Conserved region of AP2 domain in DREB2 gene in Kalak Afghan

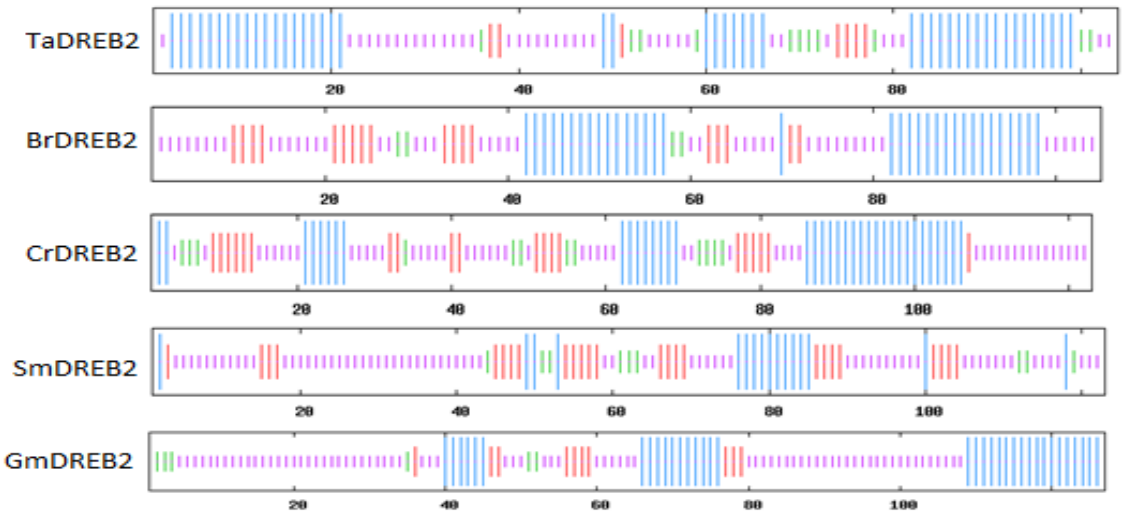
بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی DREB2: بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی DREB2 با استفاده از برنامه PSIpred نشان داد که این پروتئین حاوی صفحات کوچک بتا و مارپیچ آلفا می‌باشد. ساختار دوم توالی پروتئینی DREB2 توسط برنامه SOPMA مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که این توالی دارای ۴۶ مارپیچ آلفا (۳۲/۸۶ ٪)، ۱۱ پیچ بتا (۷/۸۶ ٪)، ۹ رشته بلند (۶/۴۳ ٪) و ۷۴ مارپیچ تصادفی (۵۲/۸۶ ٪) می‌باشد. مقایسه ساختار دوبعدی TaDREB2 با سایر توالی‌ها در گیاهان، نشان داد که TaDREB2 با گیاه *Brassica rapa subsp. Chinensis* شباهت نزدیک‌تری دارد اما در مقایسه با سایر توالی‌ها، مارپیچ پیچیده کمتری دارد (شکل ۴). همچنین ساختارهای ثانویه CLV, LIG SH3, DOC-NRD 1 و MOD برای این توالی بدست آمد که مشخص شده هر یک از این پروتئین‌ها، در نقاط تنظیمی چرخه سلولی نقش اساسی دارند. در مطالعه‌ای، Basiri et al. (2019) گزارش دادند که این ساختارهای ثانویه در تحمل گیاه به شرایط تنش‌های محیطی از طریق انتقال پیام‌های ایجاد

شده، موثر هستند. به نظر می‌رسد پروتئین‌های ذکر شده از این طریق در تعمیر آسیب‌های DNA نقش دارند و سبب فعال شدن پروتئین‌های DREB2 در گیاه از طریق انتقال پیام از سیتوپلاسم به هسته می‌شوند.

شکل ۳- بررسی توالی نوکلئوتیدی DREB2 در گندم محلی کلک افغانی با توالی‌های دیگر

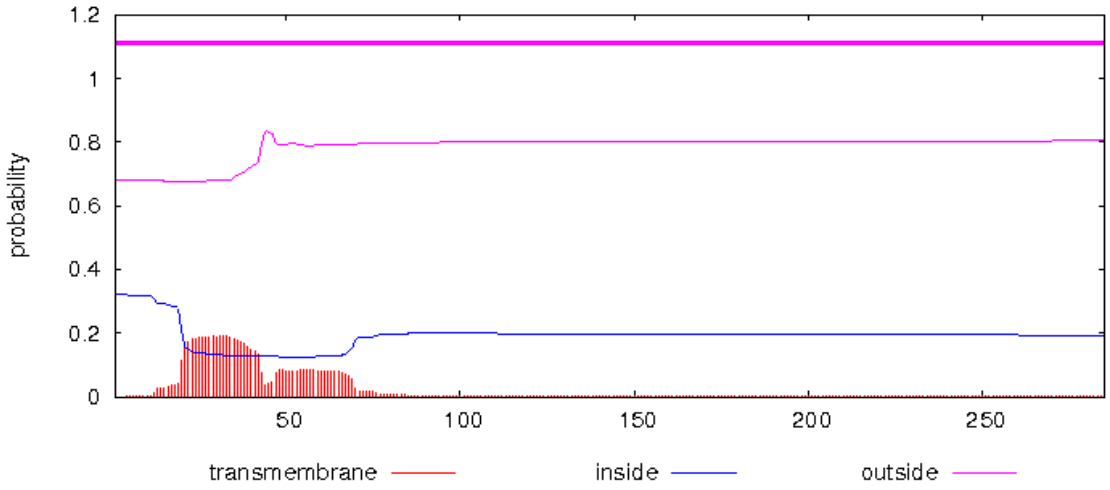
Figure 3. Analysis of nucleotide sequence DREB2 in kalak afghani with other sequences

در پژوهشی Glover et al. (2004) گزارش دادند که موتیف LIG به دومین BRCT متصل می‌شوند و در تنظیم چرخه سلولی نقش اساسی ایفا می‌کنند و ژن‌های پاسخ دهنده به آسیب‌های DNA را فعال کرده و از این طریق به تعمیر DNA می‌پردازند. به نظر می‌رسد مسیرهای القای مقاومت در تنش‌های محیطی مختلف، برهمکنش‌های زیادی با هم دارند و سبب می‌شود تا افزایش مقاومت به یک تنش، سبب القای مقاومت به تنش‌های دیگر شود (Fowler and Thomashow 2002). بررسی دومین‌های غشایی توالی DREB2 با استفاده از شاخص TMHMM ، دو مورد دومین غشایی برای این توالی بدست آورد (شکل ۵). به نظر می‌رسد وجود این نواحی دلیلی بر افزایش مقاومت به تنش در گیاهان باشد و به پایداری و یا عدم پایداری دیواره سلولی منجر می‌شود



شکل ٤- بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی DREB2 با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با سایر توالی‌ها از گیاهان دیگر. مارپیچ‌های α ، صفحات β ، پیچ‌های β و مارپیچ‌های تصادفی به ترتیب با خطوط آبی، قرمز، سبز و بنفش نشان داده شده‌اند

Figure 4. Analysis of secondary structure of DREB2 deduced protein sequence by SOPMA program and its comparison with DREB2 sequences from other plants. The α helix, β sheet, β turn, and coiled coil are indicated by blue, red, green, and purple lines, respectively



شکل ٥- بررسی دومین‌های غشایی توالی DREB2 با استفاده از شاخص TMHMM. توالی بدست آمده با داشتن دو دومین غشایی می‌تواند به غشای پلاسمایی متصل شود. وجود این نواحی می‌تواند به پایداری و یا عدم پایداری دیواره سلولی می‌شود

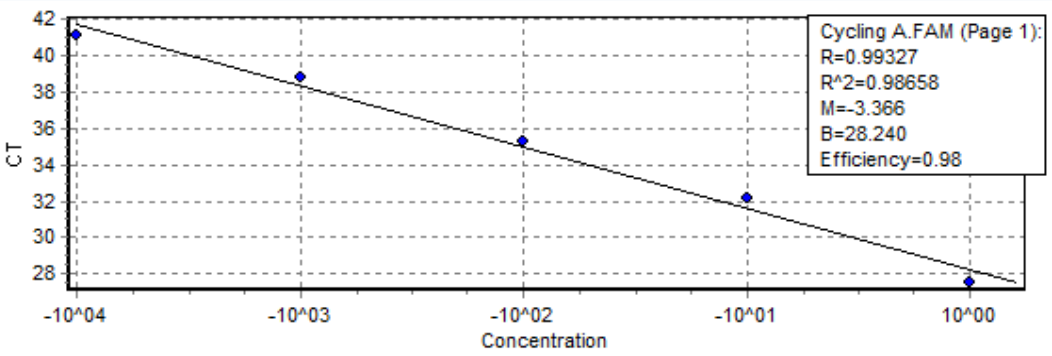
Figure 5. Analysis of membrane domains of DREB2 deduced protein sequence by TMHMM program. The DREB2 deduced protein sequence contains a membrane domain, binding to plasma membrane and modifying cell wall

بررسی میزان بیان ژن DREB2 در کلک افغانی: نتایج حاصل از جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A280/A260 ، بین ۱/۹ – ۲/۱ بود که نشان دهنده استخراج مناسب RNA بود. جهت اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. تشکیل باند RNA ریبوزومی ۲۸ اس و ۱۸ اس نشان دهنده کیفیت بالای RNA استخراج شده بود (شکل ۶). جهت محاسبه کارایی PCR در آنالیز داده‌های رییل تایم و همچنین کارایی پرایمرها، رقت سریالی تهیه گردید و از طریق دستگاه qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از کنترل منفی (No Rt control) استفاده شد تا عدم وجود آلودگی ژنومی نیز بررسی و تایید شود. نتایج صحت آزمایشات و بازده واکنش برای هر دو ژن DREB2 و ژن استاندارد بتا اکتین در حد استاندارد قرار داشت. بررسی منحنی استاندارد ترسیم شده برای ژن هدف، مشاهده شد که شیب خط هر یک از رقت‌های سریالی، مناسب است (شکل ۷). بیان نسبی ژن بر اساس نسبت تکثیر ژن هدف به ژن استاندارد و رسیدگی به تغییرات فیزیولوژیکی در سطوح بیان ژن پایه ریزی شده است. برخی از مدل‌های آماری مطالعه بیان ژن جهت محاسبه نسبت بیان نسبی نمونه های منفرد با بررسی کارایی یا بدون آن گسترش یافته است (soong et al. 2000; Pfaffl 2001). ثابت شده است که تفاوت‌های جزئی در تنظیم بیان برخی ژن‌ها از طریق راهکارهای تحمل به تنش، سبب ایجاد تنوع در رفتار به سازگاری به این شرایط از تحمل بالا تا کاملا حساس شده است. از اینرو بروز چنین تفاوت‌هایی در میزان بیان ژن‌ها منشا ایجاد واریته‌های متحمل و حساس می‌شود (Huang et al. 2008). به نظر می‌رسد در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس ژن‌های موثر در تحمل به تنش، بیان می‌شوند ولی از نظر زمان و میزان بیان این ژن‌ها تفاوت وجود دارد (Rodrigues et al. 2009). برخی محققین جهت تایید نتایج Real Time PCR از روش بررسی کارایی و رسم منحنی استاندارد استفاد کرده و گزارش دادند که این روش قادر به تعیین تکثیر کارایی هر چرخه می‌باشد. صحت روش بکار رفته وجود ارتباط حقیقی Intrinsic relationship بین مقادیر اصلی Initial رونوشت‌های ژن و پارامترهای جنبشی Kinetic را تایید کردند (Liu and Saint 2002). همچنین Stuart et al. (2003) نیز از روش تعیین کارایی جهت صحت آزمایشات و مطالعه کمی سنجی استفاده کردند و گزارش دادند که اختلاف نتایج در کمی سنجی نسبی و دقیق، از طریق اختلاف بازده محاسبه شده واکنش ارتباط دارد. از طریق محاسبه بازده تکثیر برای نمونه‌های مورد آنالیز، مقایسه نتایج ممکن است بدون نیاز به رسم منحنی استاندارد بدست آید.

پروفایل بیانی ژن DREB2 در پاسخ به شرایط مختلف شوری در گندم محلی کلک افغانی: آنالیز داده‌های qPCR مشخص کرد که تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن DREB2 از طریق Real Time PCR بین تیمارهای به کاررفته وجود دارد. در نتیجه آنالیز مرحله ذوب ژن مورد بررسی، فقط یک نمودار با دمای ذوب مشخص بدست آمد. این نتیجه، بیانگر اختصاصی بودن و یک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده می‌باشد. در واقع برای ژن هدف مورد بررسی، تکثیر غیر اختصاصی رخ نداد چرا که هیچ گونه پیک و نمودار اضافی که بیان کننده این نوع تکثیر است، مشاهده نگردید (شکل ۸– الف).

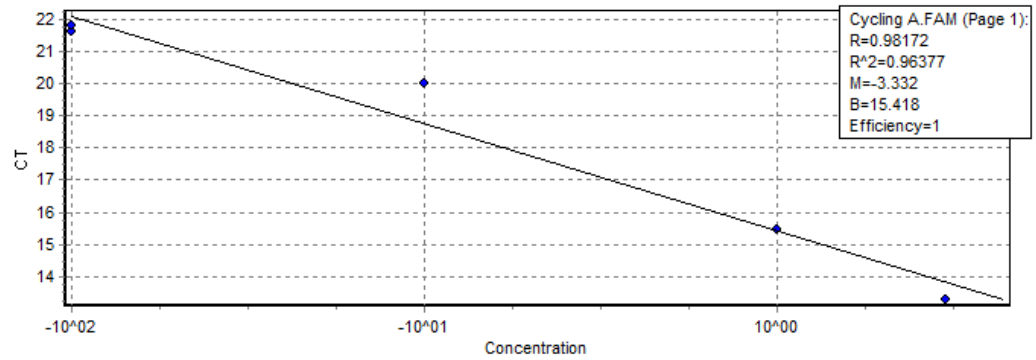
شکل ٦ . بررسی کیفیت RNA استخراج شده از کلک افغانی بر روی ژل آگارز

Figure 6. Quality of RNA extracted from Kalak afghani on agarose gel



Target= DREB2 Slope: -3.366 R^2= 0.98 Eff= 0.98

تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت های مختلف cDNA (۱، ۰,۱، ۰,۰۱، ۰,۰۰۱، ۰,۰۰۰۱)



Target= B - Actin Slope: -3.33 R^2= 0.96 Eff= 1

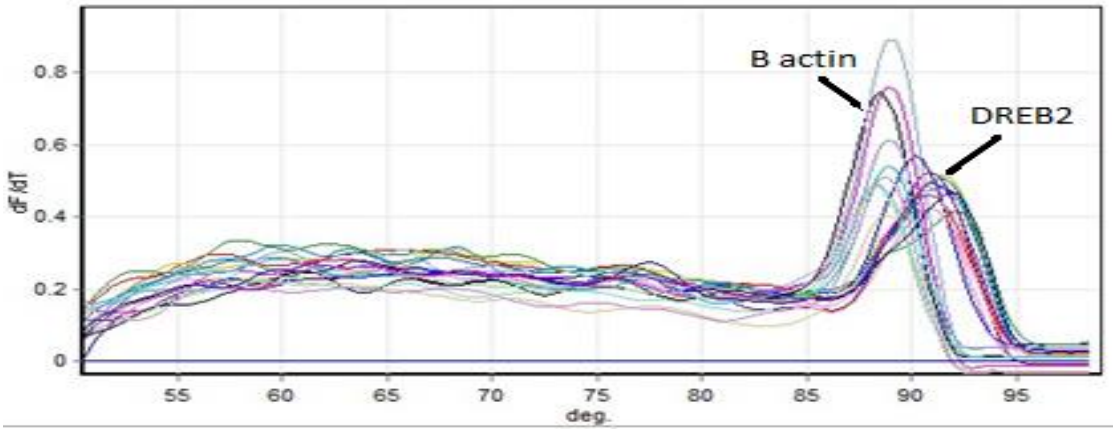
تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت های مختلف cDNA (۱، ۰,۱، ۰,۰۱، ۰,۰۱)

شکل ۷. منحنی استاندارد ژن برای DREB2 و B-Actin در گندم محلی کلک افغانی. محور افقی: لگاریتم غلظت cDNA. محور عمودی: سیکل آستانه (Ct)

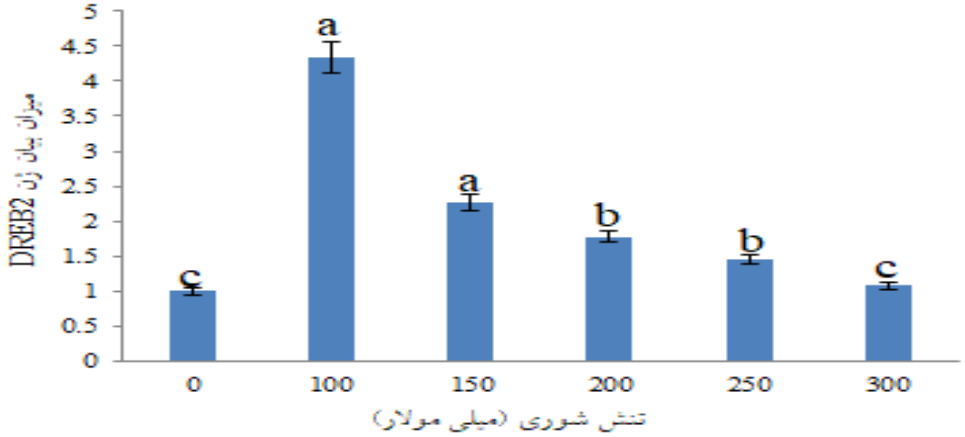
Figure 7. Standard curve for DREB2 and B-actin genes in Kalak afghani, horizontal axis: logarithm cDNA concentration- vertical axis: Cycle Threshold (Ct)

اندازه گیری میزان بیان ژن برای همه نمونه‌ها، نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میلی مولار تنش شوری، میزان بیان ژن DREB2 به میزان ۴ برابر نمونه شاهد رسید. برای سایر غلظت‌های مورد استفاده میزان بیان ژن در مقایسه با نمونه کنترل، روند کاهشی را نشان داد به طوریکه برای غلظت ۱۵۰ میلی مولار تنش شوری، به ۲,۵ برابر رسید (شکل ۸- ب). در این تحقیق ثابت شد که غلظت ۱۰۰ mM تنش شوری از نظر کمی تاثیر بسزایی در افزایش بیان این ژن را از خود نشان داد. از بررسی نتایج چنین برمی‌آید که غلظت ۱۰۰ mM تنش شوری بطور معنی داری سبب افزایش بیان ژن DREB2 در گندم کلک افغانی گردید. همچنین مشخص شد که بیشترین تاثیر در بیان ژن DREB2 را تیمار دوم و کمترین مقدار مربوط به تیمار غلظت ۳۰۰ mM تنش شوری است (شکل ۸- ب).

الف



ب



شکل ۸- (الف): نتیجه آنالیز مرحله ذوب ژن DREB2. وجود یک پیک، عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی را نشان داد. (ب): بیان ژن DREB2 در گندم محلی کلک افغانی تحت شرایط تنش شوری

Figure 8. (A): Melt curve of DREB2 gene. Presence of one peak indicated the absence of nonspecific reproduction. B) Gene expression of Kalak afghani DREB2 under treated with salt stress

نتیجه‌گیری: توانایی گیاهان برای رشـــد و تکمیل چرخه زندگی در محیطی که غلظت‌های بالایی از نمک‌های محلول دارد، صـــفتی پیچیده اســـت. مطالعات زیادی در جهت اســـتفاده از ابزارهای مولکولی از قبیل ژنویکس، پروتئومیکس و غیره برای شنا سائی و درک اجزای تحمل به شوری و فرآیندهای پا سخ به آن در سطح مولکولی وجود دارد (Inan et al. 2004). برر سی ژن‌های القاپذیر به وســـیله تنش در گیاهان به دو دســـته پروتئین‌های فعال در تحمل به تنش‌های غیر زیســـتی (چاپرون‌ها) و پروتئین‌هایی که در تنظیم بیان ژن فعالیت دارند (فاکتورهای رونویسی همچون DREB)، تقسیم می شوند (Sahrawat et al. 2003). بیان تعدادی از ژن‌های DREB در گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته، موجب تحریک بیان بالای ژن‌های هدف القاکننده در تنش و در نتیجه افزایش مقاومت به شوری بالا شده است (Kuan et al. 2010). ژن‌های DREB2 ، با تنظیم بیان تعداد زیادی از ژن‌های القا شونده تو سط تنش‌های غیرزنده، سازگاری بیو شیمیایی و فیزیولوژیک در گیاه ایجاد می‌کند و گیاه را قادر می سازد تا خود را با تنش‌های غیرزنده سازگار کند. بطور کلی، ژن DREB2 در مقایسه با سایر ژن‌های القاشونده توسط تنش، تحمل گیاه را افزایش می‌دهد و همین امر موجب شـده این ژن‌ها جهت مهندسـی ژنتیک و بهبود عملکرد محصـولات، هدف مطلوب و مناسـبی باشـند (Lata and Prasad 2011). در مطالعه .Cui et al (2011)، گزارش گردید که فنوتیپ گیاهان تراریخته در زمانی که رشـــد گیاه تحت تاثیر تنش قرار می‌گیرد، از طریق پروموتورهای القایی بهبود می‌یابد. بیان بالای ژن DREB3 در جو و گندم تراریخته با ا ستفاده از پروموتور القا شونده از طریق تنش، سبب می شود که گیاه به از د ست دادن آب مقاومت ک سب کند و بطور قابل توجهی فنوتیپ گیاه حفظ شود (Kovalchuk et al. 2013).

نتایج حا ضر، افزایش بیان ژن DREB2 را در گندم کلک افغانی در شرایط تنش شوری ن شان داد. آنالیز تغییرات الگوی بیان ژن DREB2 بیانگر افزایش بیان ژن بعد از اعمال تنش بود. در غلظت mM ۱۵۰ بعد از اعمال تنش نسـبت به گیاه شـاهد، میزان بیان ژن ۲/۵ برابر و غلظت mM ۱۰۰ نسـبت به گیاه کنترل، ۴ برابر افزایش داشـت که بیشـترین میزان بیان ژن را در بین تیمارهای بکاررفته، دا شت. میزان بیان ژن پس از آن حالت کاهشی دا شت بطوریکه در غلظت‌های ۲۰۰Mm و ۲۵۰Mm کمتر از دو برابر نسـبت به گیاه شـاهد از خود نشـان داد. غلظت بالای نمک در گیاه باعث بروز دامنه وسـیعی از واکنش‌ها از جمله تغییر در بیان ژن تا تغییر در سرعت ر شد و عملکرد محصول می شود. کاهش میزان بیان ژن DREB2 در غلظت‌های زیاد نمک، نا شی از کاهش فعالیت‌های سنتزی مسیرهای متابولیکی است که تولید ماده خشک را تحت تاثیر قرار می‌دهد و از طریق کاهش سطح برگ تظاهر می‌نماید (Chaitanya et al., 2003). بخشـــی از مکانیزم‌های تحمل به شـــوری ژنتیکی بوده و حاصـــل آن بروز روند خودتنظیمی در گیاه است. فرآیند تغییرات حاصله در نهایت منجر به تغییر تعادل آبی می‌گردد و پتانسیل آبی بافت‌ها را تغییر می‌دهد (Chavez et al., 2003). گزارش شده است غلظت بالای شوری، سبب توقف رشد گیاه و تغییرات متابولیکی خاصی می‌شود که سبب ایجاد سلول‌های اپیدرمی بزرگتر، روزنه‌های کمتر در واحد سطح برگ و سیستم آوند چوبی می شود. نمک جذب شده توسط گیاه در غلظت‌های بالاتر توسط برگ گیاه، در برگ‌های بالغ متمرکز می شود و انتقال به درون برگ‌های در حال تعرق در یک دوره

طولانی ادامه می‌یابد (Tavakkoli et al., 2011). به نظر می‌رسد دلیل اینکه میزان بیان ژن DREB2 با افزایش شوری، افزایش نمی‌یابد بارگیری نمک بیشتر از توان سلول‌ها برای انتقال آن باشد. در این شرایط نمک‌ها به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند و مانع از فعالیت‌های آنزیمی می‌گردد. همچنین پیامد رایج ناشی از تجمع غلظت‌های بالای نمک، تجمع مقادیر زیادی از اکسیژن فعال آزاد (ROS) با شد که می‌تواند سبب اکسیدا سیون پروتئین‌ها، آسیب به DNA سلولی، پراکسیدا سیون لیپیدها و ایجاد اثر متقابل با دیگر اجزای حیاتی سلول گردد که منجر به سمیت سلول می‌گردد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل به خاطر حمایت مالی/ حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حا ضر سپا سگزاری می شود. همچنین نگارندگان بر خود لازم/فرض می‌دانند از جناب آقای دکتر محمدآبادی مدیر محترم مجله بیوتکنولوژی کشاورزی و جناب آقای دکتر جلالی سردبیر محترم و داوران محترم آن مجله، به دلیل بازبینی متن مقاله و ارائه نظرهای ساختاری، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی مسعود و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

بصیری محبوبه، موسوی نیک سید محسن، صباغ سید کاظم، و همکاران (۱۳۹۸) شناسائی ژن عامل رونویسی متصل شونده به عناصر پاسخ دهنده به کم‌آبی (DREB2) در علف هرز بروموس ژاپنی (Bromus japonicus) تحت شرایط تنش شوری. پژوهش علف های هرز . ۱۱(۱)،۵۰ – ۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳). مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

راوری سید ذبیح الله. دهقانی حمید، نقوی هرمزد (۱۳۹۵) ارزیابی تحمل به شوری ارقام گندم نان بر اساس شاخص‌های تحمل مبتنی بر نسبت پتاسیم به سدیم برگ پرچم. فصلنامه تحقیقات غلات ۶(۲). ۱۴۴-۱۳۳.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

References

Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Rep 25, 1263-1274.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, et al. (2019) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci J 166, 3-16.

Chaitanya K, Jutur P, Sundar D, Ramachandra RA (2003) Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. Plant Growth Reg 40, 75-80**.**

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. Function Plant Biol 30, 239-264.

Cui M, Zhang W, Zhang Q, et al. (2011) Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. Plant Physiol Biochem 49, 1384-1391**.**

Farhoudi R (2014) Investigation the salinity tension effect on growth and physiological characteristics of nine wheat cultivars at vegetative growth stage. Crop Physiol J 5, 71-86 (In Persian).

Fowler S, Thomashow MF (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.

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

Huang B, Yi B, Duan Y, et al. (2008) Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from Salvia miltiorrhiza (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. Mol Biol Rep 35(4), 601-12.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Kasuga M, Liu Q, Miura S (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotech Mar 17(3), 287-91.

Kim YJ, Shim JS, Krishna PR, et al. (2008) Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from Panax ginseng C. A. Meyer. Plant Mol Biol Rep 26, 335–349.

Kovalchuk N, Jia W, Eini O, et al. (2013) Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. Plant Biotech J 11, 659-670**.**

Lata C, Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. J Exp Bot 62, 4731-4748**.**

Li H, Zhao Q, Sun X, et al. (2017) Bioinformatic identification and expression analysis of the *Malus domestica* DREB2 transcription factors in different tissues and abiotic stress. J Plant Biochem Biotechnol 26**,** 436–443.

Li X, Zhang D, Li H, et al (2014) EsDREB2B, a novel truncated DREB2-type transcription factor in the desert legume Eremosparton songoricum, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in yeast and transgenic tobacco. BMC Plant Biol 2, 14. 44.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, 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.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) Dlk1 Gene Expression in Different Tissues of Lamb. Iran J Appl Anim Sci 10, 669-677.

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian)

Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. Agric Biotechnol J 12, 191-208 (In Persian).

Mohsenzadeh S, Karimi-Andani K, Mohabatkar H (2011) Study of dehydration-responsive element binding-factor gene in some Iranian bread wheat cultivars. J Plant Biol 3, 69-76.

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ 25, 239-250.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. Plant Physiol 140, 411–432.

Pfaffl MW, (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT– PCR. Nucleic Acids Res 29, 2002–2007.

Ravari SZ, Dehghani H, Naghavi H (2016) Assessing salinity tolerance of bread wheat varieties using tolerance indices based on K+/NA+ ratio of flag leaf. Cereal Res J 6(2), 133 – 144 (In Persian).

Rodrigues FA, de Laia ML, Zingaretti SM, (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. Plant Sci 176(2), 286-302.

Sahrawat AK, Becker D, Lütticke S, Lörz H (2003) Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. Plant Sci 165, 1147-1168.

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J, et al. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. Biochem Biophys Res Commun 290, 998-1009.

Seki M, Narusaka M, Abe H, et al, (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. Plant Cell 13, 61–72.

Shen YG, Zhang W K, Yan DQ, et al. (2003) Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte Atriplex hortensis. Theor Appl Genet 107, 155-161.

Soong R, Ruschoff J, Tabiti K, (2000) Detection of colorectal micrometastasis by quantitative RT–PCR of ytokeratin 20 mRNA. Roche Molecular Biochemicals Internal Publication.

Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P., and McDonald, G.K. (2011). Additive effects of Na+ and Cl–ions on barley growth under salinity stress. Journal of Experimental Botany 62, 2189-2203.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50 (In Persian).

Wang XM, Dong J, Liu Y, Gao HW (2010) A novel dehydration-responsive element-binding protein from Caragana korshinskii is involved in the response to multiple abiotic stresses and enhances stress tolerance in transgenic tobacco. Plant Mol Biol Rep 28, 664–675.

Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ (2011) Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. J Integr Plant Biol 53, 570–585.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. Mol Gen Genet 238, 17–25.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500