ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۹۴- ۸۵

شناسایی و جداسازی ژن *VvDREB* و ارتولوگ ژن *SbDREB2A*، از انگور عسکری تحت تنش شوری

Identification and isolation of *VvDREB* and orthologous *SbDREB2A* genes from grapevine (*Vitis vinifera* cv. Askari) under salt stress

الهام محولاتی[۱]، سیروس قبادی[*۱]، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی[۱]، غزاله خاکسار[۱]، محمدعلی تقدس[۱]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استادیار، استاد، دانشجوی دکتری و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان

Mahvelati E[1], Ghobadi C[*1], Seyed Tabatabaei BE[1], Khaksar G[1], Taghaddos MA[1]

1. Graduate MSc Student, Assistant Professor, Professor, PhD Student, Graduate MSc Student, Isfahan University of Technology, Isfahan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: cyrus@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۲- تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

عامل نسخه‌برداری DREB (پروتئین متصل‌شونده به عنصر پاسخ‌دهنده به کم آبی) یکی از چهار سیستم تنظیمی مستقل در گیاهان است که در فعال شدن ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی نقش دارد. به‌منظور شناسایی و جداسازی برخی از ژن‌های *DREB* در انگور، گیاهان تحت تنش ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl قرار گرفته و سپس RNA کل استخراج شد. آغازگرهای اختصاصی براساس ژن فرضی *DREB* و همولوگ ژن *SbDREB2A* گیاه نمک دوست *Salicornia brachiata* با انگور طراحی و ژن‌های *VvDREB* و *DREB like 2C* (ارتولوگ SbDREB) از انگور جدا شد. نتایج نشان داد که ژن *VvDREB* با ژن‌های *DREB* گروه دو خانواده سویا در حدود ۸۵ درصد و دو ژن *SbDREB2A* و *DREB like 2C* درحدود ۸۰ درصد شباهت دارد. رسم ساختار ثانویه پروتیین VvDREB و پروتیین‌های DREB2 سویا نشان داد که در ناحیه حفاظت شده AP2 آن‌ها ساختار Helix مشابه وجود دارد. مطالعه و مقایسه موتیف‌های پروتئین VvsDREB و SbDREB2A در سایت ELM حاکی از عدم وجود پنج موتیف متفاوت (BRCT, MAPK, PKB, NES, NLS) در پروتئین VvsDREB بود که احتمال می‌رود دلیل بر ناکارایی مؤثر عملکرد آن باشد.

واژه‌های کلیدی

انگور
تنش اسمزی
زیست رایانه
DREB
Salicornia brachiata

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تنش‌های محیطی نظیر خشکی، شوری و سرما دارای آثار زیان‌باری بر رشد و عملکرد گیاهان می‌باشند (Hirt and Shinzoki 2003). علیرغم بروز متفاوت این تنش‌ها، پایین بودن پتانسیل آب در گیاهان را می‌توان وجه مشترک آنها دانست به‌طوری که منجر به تنش اسمزی می‌شود. گیاهان جهت بقا، در سطوح فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به تنش‌های اسمزی پاسخ داده و سازش می‌یابند. سازوکارهایی که سلول برای تحمل تنش اسمزی به کار می‌گیرد، در سطح مولکولی قابل بررسی بوده و منجر به شناسایی تعداد زیادی از ژن‌های القا شونده در اثرتنش شوری و خشکی و سرما شده است. محصولات این ژن‌ها با توجه به خصوصیات آنها در دو گروه قرار می‌گیرد:

۱- پروتئین‌هایی که به‌طور مستقیم در حفاظت از غشا و ماکرومولکول‌ها نقش دارند و شامل پروتئین‌های محافظ اسمزی، تنظیم‌کننده‌های اسمزی، پروتئین‌های ضدیخ‌زدگی، چاپرون‌های مولکولی، پروتئین‌های کانال‌های آب، حمل‌کننده‌های یون‌ها، پروتئینازها، بازدارنده‌های پروتئینازها و آنزیم‌های سم‌زدا هستند (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2005; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2006).

۲- پروتئین‌هایی که در انتقال پیام تنش و کنترل بیان ژن‌های موثر در تحمل خشکی، شوری و سرما دخالت دارند. این پروتئین‌ها شامل عوامل نسخه‌برداری (bZIP[1]، MYC[2]، MYB[3] و DREB[4]) و پروتئین‌های‌کیناز (MAP[5] کیناز، CDP[6] کیناز، پروتئین کیناز پذیرنده) می‌باشند (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2005; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2006).

در تنش‌های اسمزی، پیام تنش توسط عامل نسخه‌برداری پاسخ-دهنده به خشکی (DREB) دریافت شده و متعاقبا تعداد زیادی از ژن‌های مسئول در کنترل و نگهداری فشار اسمزی و متابولیسم را فعال می‌کند (Sharoni et al. 2011) . مطالعات مولکولی نشان داده که در ناحیه راه‌انداز ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی (سرما، خشکی و شوری) عناصر تنظیمی سیس[7] به نام DRE[8] قرار دارند که شامل ۹ جفت باز با توالی حفاظت شده -'5 TACCGACAT-3' می‌باشد. همچنین عناصر تنظیمی مشابهی به‌نام CRT[9] (CCGAC، که هسته توالی DRE است) در راه‌انداز ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما گزارش شده‌اند (Sakuma et al. 2002). پروتئین‌های متصل شونده به ناحیه DRE/CRT که بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های اسمزی را تنظیم می‌کنند، DREB/CBF[10] نامیده می‌شوند. پروتئین‌های DREB به خانواده عوامل نسخه‌برداری AP2/ERE[11] تعلق دارند و به شش گروه A-1 تا A-6 تقسیم می‌شوند (Charu and Manjo 2011; Sharoni et al. 2011). این پروتئین‌ها دارای دُمین کاملا حفاظت شده AP_2 با ۵۸ اسید آمینه می‌باشند که به DNA متصل شده و حضور دو اسید آمینه والین و اسیدگلوتامیک در موقعیت ۱۴و ۱۹ حائز اهمیت است (Charu and Manjo 2011; Sharoni et al. 2011). علاوه بر این، وجود ناحیه بازی انتهای N و ناحیه‌ی حفاظت شده غنی از اسیدآمینه‌های سرین و ترئونین در مجاور دُمین AP_2 که به‌ترتیب در انتقال پیام تنش به هسته (NLS[12]) و فعال شدن پروتئین‌های DREB نقش دارد؛ در بیشتر آنها گزارش شده است. همچنین به‌نظر می‌رسد ناحیه اسیدی انتهای C این پروتئین‌ها، فعالیت ترانس[13] داشته باشد (Yamaguchi-Shinozaki et al. 2002; Charu and Manjo 2011). پروتئین‌های DREB نقش مهمی در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در مسیر مستقل از ABA دارند و تعداد زیادی از ژن‌های *DREB* در گیاهان مختلف جدا شده‌اند (Stockinger et al. 1997) که از آن جمله می‌توان به دو ژن *DREB1* و *DREB2* آرابیدوپسیس اشاره کرد که در چندین گیاه علفی نظیر برنج، گندم، جو، ذرت، سورگوم، چاودار، یونجه، یولاف و چمن چند ساله شناسایی شده است (Nakashima et al. 2009). مطالعات انجام شده روی ژن‌های *DREB1* در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده که تشدید تظاهر این ژن‌ها با راه‌انداز

[1] Basic leucine zipper
[2] Myelocytomatosis oncogene
[3] Myeloblastosis oncogene
[4] Dehydration responsive element binding
[5] Mitogen activated protein
[6] Calcium-dependent protein
[7] *Cis*-element
[8] Dehydration responsive element
[9] C-repeat
[10] C-repeat binding factor
[11] APETALA2/ethylene-responsive element
[12] Nuclear localization signal
[13] Trans-activation

Archive of SID
www.SID.ir

CaMv35s، سبب افزایش تحمل سرما و خشکی در گیاهان تراریخت شد (Liu et al. 2000; Kapil et al. 2010). در گوجه‌فرنگی تراریخت با *DREB1B/CBF1*، مقاومت به کم‌آبی افزایش یافت، ولی گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان وحشی دچار کاهش میوه، تعداد دانه و وزن تر شدند، البته کاربرد اسید جیبرلیک بدون تاثیر منفی بر تحمل به تنش کم‌آبی، کاهش رشد را جبران کرد (Hsieh et al. 2002). در بررسی نتایج ریزآرایه‌ای برنج، ژن‌های مشابه با *DREB1* آرابیدوپسیس به نام‌های *OsDREB1A*، *OsDREB1B*، *OsDREB1C*، *OsDREB1D*، *OsDREB1E*، *OsDREB1G*، *OsDREB1F*، *OsDREB2A* و *OsDREB2B* شناسایی شده و تشدید بیان آنها در آرابیدوپسیس و برنج نشان داد که این ژن‌ها عمل مشابهی در پاسخ به تنش و بیان ژن‌های درگیر با آن ایفا می‌کنند (Chen et al. 2008). با شناسایی دُمین حفاظت شده AP2/ERF در گیاه *Caragana korshinski*، ژن *CkDREB* جداسازی شد. که این ژن تحت تاثیر سیگنال‌های شوری و دمای پایین القا شده و پروتئینی شامل ۳۴۵ اسیدآمینه را بیان می‌کند (Xuemin et al. 2011). انتقال ژن *HvDREB1* تحت راه‌انداز rd29A به آرابیدوپسیس، سبب افزایش تحمل به شوری در گیاهان تراریخت شد (Chen et al. 2009). اخیرا ژن جدید DREB2-like (*SiDREB2*) از گیاه *Setaria italic* شناسایی شده که در تحمل به تنش کم‌آبی نقش مهمی ایفا می‌کند (Lata et al. 2011). شناسایی ژن‌های جدید در گیاهان می‌تواند دریچه جدیدی به چگونگی عملکرد گیاهان و افزایش محصول آن‌ها در تنش‌های اسمزی بگشاید.

در سال‌های اخیر ژن‌های *DREB* به جهت دستیابی به مقاومت چندگانه و مطلوب به تنش‌های اسمزی، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. تنظیم کننده‌های DREB در بسیاری از خانواده‌های گیاهی نظیر توتون، کلزا، گوجه‌فرنگی، گندم، برنج، جو، ذرت و یونجه، شناسایی، جداسازی و نقش عملکردی آن‌ها بررسی شده است (Sharoni et al. 2011; Charu and Manjo 2011). این پدیده نشان می‌دهد که احتمالا سیستم تنظیمی DREB/CBF در همه گیاهان وجود دارد و انتظار می‌رود که این ژن‌ها با کنترل بیان سیستم تنظیمی موجب افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی در گیاهان شوند. بر این اساس در پژوهش‌های اخیر، ردیابی و جداسازی این ژن‌ها در سایر گیاهان و شناسایی نقش عملکردی آنها در افزایش تحمل به تنش‌های خشکی، شوری و سرما مورد توجه قرار گرفته است (Charu and Manjo 2011). این تحقیق نیز به‌منظور شناسایی و جداسازی ژن *VvDREB* از ژن‌های خانواده *DREB* در گیاه انگور (*Vitis vinifera*) که دارای اهمیت ویژه‌ای از نظر سطح زیر کشت، ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای در بین محصولات باغی می‌باشد (Walker et al. 2007) انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

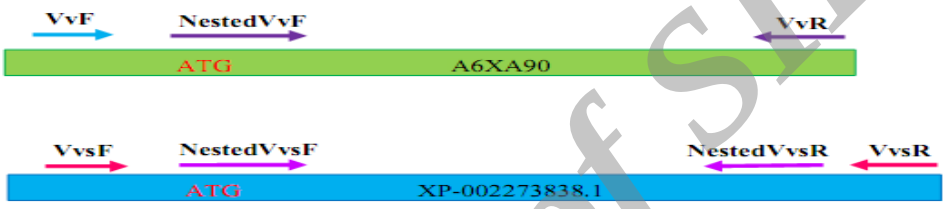
گیاه انگور رقم عسکری از انگورستان تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و در شرایط آزمایشگاهی[1] از طریق کشت جوانه انتهایی در محیط کشت MS[2] MS[2] (فاقد هورمون) تکثیر شد. به‌منظور اعمال تنش شوری، انگور انگور در شرایط درون شیشه‌ای در کلرید سدیم با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شد (Pérez- et al. 2008 Clemente) سپس استخراج RNA کل از گیاهان تحت تنش توسط بافر Biozol (شرکت Bioflux Japan) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. تهیه cDNA اختصاصی توسط آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها و با استفاده از کیت سنتز cDNA(شرکت Poromega) طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. به‌منظور تکثیر ژن‌های *DREB* انگور، براساس پروتئین فرضی DREB در انگور به شماره شناسایی A6XA90 در پایگاه اطلاعاتی ExPASY و همچنین با توجه به نتایج شباهت‌سنجی پروتئین SbDREB2A به شماره شناسایی GU809211.1 در پایگاه اطلاعاتی NCBI با انگور و وجود دُمین حفاظت شده AP_2، توالی شبیه با پروتئین مورد نظر در انگور به شماره XP_002273838.1 شناسایی شده و توسط نرم‌افزار Oligo Analyser آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱).

[1] *In vitro*
[2] Murashing and Skoog medium

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده

آغازگر	توالی آغازگر (′۳-′۵)	دمای اتصال (°C)
VvF	5′-GTG ATT TGC AGT CGA TGA ATT GTG CTG GA-3′	۵۶
VvR	5′- CAG AGA TGA TAG TGG TGG TCA TCG TC- 3′	۵۸
NestedVvF	5′- ATG GAG GGA GGA CAG GAG TGT- 3′	۵۸
VVsF'	5′- CGT TTT CTG AAA TCA CCG GGA GAG ACA G- 3′	۶۰
VvsR	5′-GAG GCA AAC CAG GAG GAG AAA CGA ATG TAT G- 3′	۶۰
NestedVvsF	5′- ATG TCG TCC GGA GTC ATT GAA AG- 3′	۵۴
NestedVvsR	5′- CAG AAT CTT CTT AGA ACC CCA TAT CTG- 3′	۵۴



شکل۱- مکان آغازگرها بر روی ژن‌های *A6XA90* و *XP-002273838.1*. آغازگرهای NestedVvF و NestedVvsF از ناحیه ابتدای ژن (کدون آغاز)، آغازگرهای VvR و NestedVvsR از ناحیه انتهای ژن (کدون پایان) و آغازگرهای VvF و VvSF و VvsR از نواحی مجاور ژن طراحی شدند.

با توجه به شباهت تقریبی ۲۲ نوکلئوتید اول بسیاری از ژن‌هایی که در تنش اسمزی بیان می‌شوند، آغازگر VvF از ناحیه مجاور ژن فرضی *A6XA90* (قبل از ATG) همراه با آغازگر VvR در انتهای ژن تهیه، و در ادامه به منظور تکثیر اختصاصی، آغازگر آشیانه‌ای NestedVvF از ابتدای ژن طراحی شد (جدول ۱ و شکل۱). همچنین به دلیل شباهت ناحیه ابتدا و انتهای ژن فرضی *XP_002273838.1* با ژن‌های دیگر، جفت آغازگر VvsF و VvsR از نواحی مجاور بخش ژنی تهیه و سپس جهت تکثیر اختصاصی، جفت آغازگر آشیانه‌ای NestedVvsF و NestedVvsR طراحی شد (جدول۱ و شکل۱). آغازگرهای اختصاصی VvR و VvsR به منظور تهیه cDNA اختصاصی (به ترتیب برای ژن‌های *A6XA90* و *XP_002273838.1*) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش RT-PCR در مورد ژن فرضی *A6XA90* توسط جفت آغازگر اختصاصی VvR و VvF و در مورد ژن *XP_002273838.1* توسط جفت آغازگر VvsR و VvsF انجام شد. در تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه، محصول واکنش اول به عنوان الگو برای PCR آشیانه‌ای در نظر گرفته شد و واکنش PCR آشیانه‌ای[1] توسط جفت آغازگر VvR و NestedVvF و همچنین جفت آغازگر Nested VvF و Nested VvR (به ترتیب برای ژن‌های فرضی *A6XA90* و *XP_002273838.1*) انجام شد. سپس ژن‌های *DREB* جداسازی شده در پلاسمید pTG-19_T همسانه‌سازی (شرکت Fermentas) و پس از انتقال به باکتری *E. coli* سویه MC1061 (شرکت Fermentas.) توالی‌یابی شدند (شرکت Bioneer). براساس توالی‌های به‌دست آمده و داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI درخت فیلوژنی ژن‌های خانواده DREB در برخی گیاهان رسم شد. به‌منظور بررسی شباهت و ساختار ژن‌های فوق تجزیه و تحلیل زیست‌رایانه‌ای در پایگاه اطلاعاتی www.ExPASY.org، www.elm.eu.org و www.ncbi.nlm.nih.gov انجام شد.

[1] Nested PCR

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و بحث

از واکنش PCR نمونه cDNA با آغازگرهای VvF و VvR قطعه ۵۰۰ جفت بازی حاصل شد (شکل۲-الف). واکنش PCR آشیانه‌ای محصول PCR اول توسط آغازگرهای NestedVvF و VvR سبب تکثیر ژن فرضی مورد مطالعه با نام جدید *VvDREB* به طول ۴۵۶ جفت باز شد (شکل۲-ب). که بیان این ژن را در تنش شوری تایید می‌کند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی ژن مورد مطالعه با احتمال ۹۹ درصد با ژن فرضی به شماره شناسایی A6XA90 شباهت داشته و دُمین حفاظت شده AP_2 در هر دو ژن ۱۰۰ درصد شبیه می‌باشند. همچنین بر اساس نتایج درخت فیلوژنی حاصل از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5، ژن فوق با ژن‌های خانواده *DREB*2 سویا در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل۳). علاوه بر این، تجزیه ژن‌های *DREB* و همردیف‌سازی در خانواده‌های انگور و سویا با استفاده از نرم‌افزار Multialign در ExPASY نشان می‌دهد که ژن فوق به‌طور تقریبی ۸۵ درصد با ژن‌های خانواده *DREB2* سویا شباهت دارد (شکل۴). با توجه به این‌که تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که ژن‌های خانواده *DREB*2 در سویا تحت تنش‌های اسمزی بیان می‌شوند (Chen et al. 2007)، لذا این احتمال تقویت می‌شود که ژن *A6XA90* در شرایط کم آبی موجب افزایش تحمل به تنش در گیاه انگور می‌شود.

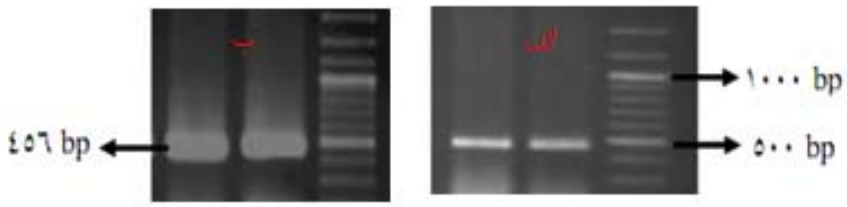
رسم ساختار ثانویه پروتئین‌های DREB آرابیدوپسیس، سویا، کلزا و پروتئین فرضی به شماره شناسایی A6XA90 با نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 نیز نشان می‌دهد که در ناحیه IRMRKWGKWVAEI در این پروتئین و خانواده DREB2 در سویا، ساختار ثانویه مارپیچ تشکیل می‌شود و این منطقه در دُمین AP2 قرار دارد. همچنین شباهت در اسیدهای آمینه PVAAARAYDTAVFHL و ناحیه ۱۵۰-۱۲۷ منجر به یکسان بودن ساختار مارپیچ آنها می‌شود (شکل ۵). به نظر می‌رسد همولوژی بسیار زیاد توالی آنها می‌تواند در ارتباط با ساختار و عملکرد مشابه این پروتئین‌ها باشد. بنابراین انتظار می‌رود که ژن مورد مطالعه (*VvDREB*) بتواند در دست‌ورزی‌های ژنتیکی به‌منظور افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی نظیر خشکی، شوری و سرما در گیاهان تراریخت به‌کار رود.

نتایج همردیف‌سازی پروتئین SbDREB2A گیاه نمک دوست *Salicornia brachiata* که قادر به تحمل غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم است (Kapil et al. 2010) با ژنوم انگور در پایگاه اطلاعاتی NCBI (بر مبنای وجود ناحیه حفاظت شده AP_2)، نشان داد که پروتئین DREB like2C در انگور (شماره شناسایی XP_002273838.1) با بالاترین اطمینان دارای بیشترین شباهت است. نتایج شباهت‌سنجی توالی پروتئین شناسایی شده با توالی پروتئین SbDREB2A با استفاده از نرم‌افزار Multialign در ExPASY نشان می‌دهد که شباهت زیادی (حدود ۸۸ درصد) بین دو پروتئین وجود دارد (شکل۶). همچنین رسم درخت فیلوژنی ارتباط نزدیک (bootstrap=93%) این دو پروتئین را نشان می‌دهد (شکل۳).

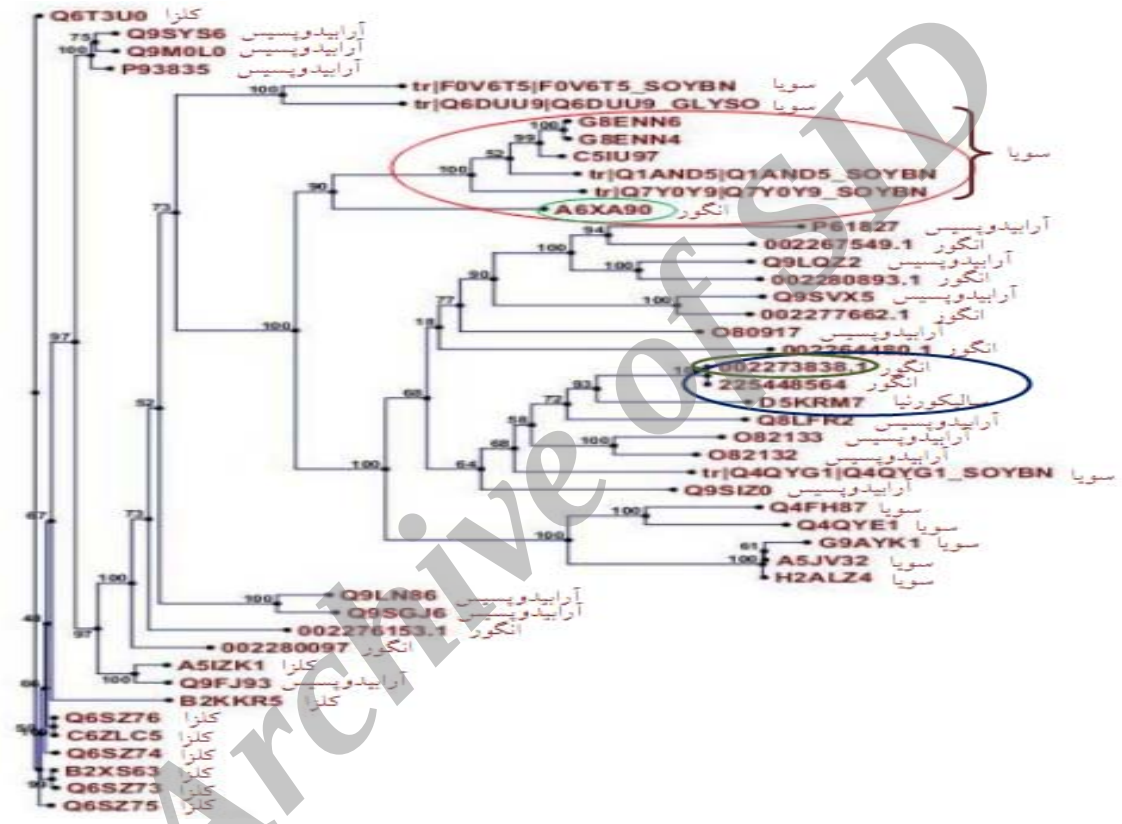
نتایج واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی VvsF و VvsR سبب تکثیر قطعه مورد نظر شد (شکل۷-الف). واکنش PCR آشیانه‌ای ژن پیش‌بینی شده *DREB* like 2C توسط جفت آغازگر Nested VvsF و Nested VvsR موجب تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۶۵ جفت باز شد که موید بیان ژن فوق در شرایط تنش شوری است (شکل۷-ب). پس از مطالعه موتیف‌های دو پروتئین SbDREB2A و DREB like 2C در سایت Elm (www.elm.eu.org)، علیرغم وجود چندین موتیف (مناطق تنظیمی) یکسان، پنج موتیف متفاوت در پروتئین SbDREB2A مشاهده شد (شکل ۸). پروتئین‌های دارای دُمین BRCT به موتیف اول (LIG-BRCT-BRCA1-1) متصل می‌شوند. این پروتئین‌ها در نقاط تنظیمی چرخه سلولی[1]، نقش اساسی دارند و هنگام آسیب DNA، پیام آسیب توسط فسفوریله شدن اسیدآمینه سرین موجود در این موتیف، به پروتئین SbDREB2A منتقل می‌شود که در نهایت فعال شدن ژن‌های پاسخ دهنده به تعمیر DNA را به دنبال دارد (Glover et al. 2004). موتیف دوم (LTG-MAPK-1)، پیام تنش را از کینازها دریافت می‌کند و پروتئین SbDREB2A را فسفوریله می‌کند. خانواده MAPK[2] از خانواده پروتئین‌های سرین/ ترئونین هستند که در بسیاری از مسیرهای انتقال پیام تنش دخالت دارند.

[1] Cell-cycle check point
[2] Mitogen-activated protein kinase

Archive of SID
www.SID.ir



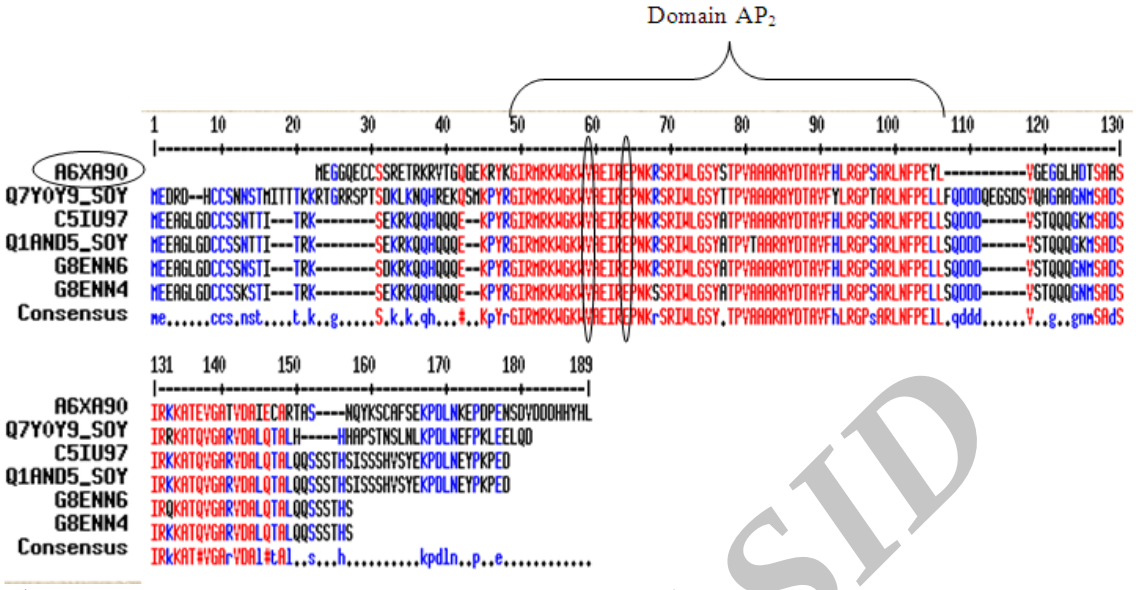
شکل۲- همسانه‌سازی ژن VvDREB. الف)- از راست به چپ- چاهک اول نشانگر اندازه 100 bp و چاهک‌های دوم وسوم تکثیر با آغازگرهای VvF و VvR؛ ب) - از راست به چپ- چاهک اول نشانگر اندازه 100 bp و چاهک‌های دوم و سوم تکثیر با آغازگرهای NestedVvF و VvR.



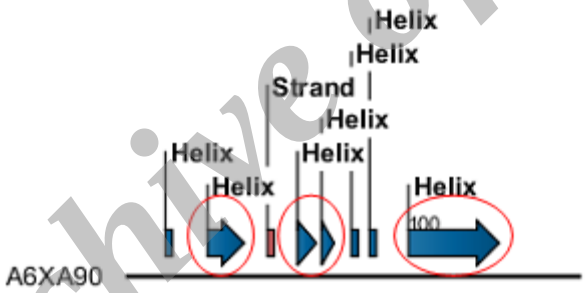
شکل۳- رسم درخت فیلوژنی ژن‌های *DREB* انگور، سویا، کلزا و آرابیدوپسیس (شماره شناسایی پروتئین‌ها در سایت ExPASY (www.ExPASY.org) و NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)) نشان می‌دهد که ژن مورد مطالعه با ژن‌های خانواده *DREB*2 سویا در یک گروه قرار می‌گیرد.

آبشار MAPK کیناز شامل سه گروه: MAP کیناز (MAPK)، MAP کیناز کیناز (MAPKK)، MAP کیناز کیناز کیناز (MAPKKK) می‌باشد. آبشارهای MAP کیناز پیام‌های تنش را تقویت کرده و از طریق یکسری واکنش فسفوریله شدن آنها را از MAPKKK به MAPKK و در نهایت به MAPK انتقال می‌دهند (Bardwell 2006). موتیف MOD-PKB-1 توسط خانواده پروتئینی کیناز AGC که با پیام‌رسان ثانویه فعال شده، فسفوریله می‌شوند. در شرایط تنش اسمزی، پیام تنش در سیتوپلاسم توسط این خانواده پروتئین کیناز دریافت شده و موجب فعال شدن پروتئین SbDREB2A در هسته می‌شود (Fujii et al. 2006) به نظر می‌رسد که پیام‌رسان‌های ثانویه نظیر یون کلسیم در گسترش پیام تنش و در نهایت فعال شدن این پروتئین‌ها نقش دارند و

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴- همردیف سازی پروتئین A6XA90 با خانواده DREB2 سویا، شباهت بیش از ۹۹ درصد در ناحیه AP_2 مشاهده شد و همچنین حضور دو اسیدآمینه والین در موقعیت ۱۴ و گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۹ مشخص شده‌است.



شکل۵- ساختار ثانویه پروتیین A6XA90، قسمت‌های مشخص شده مشابه خانواده DREB2 سویا

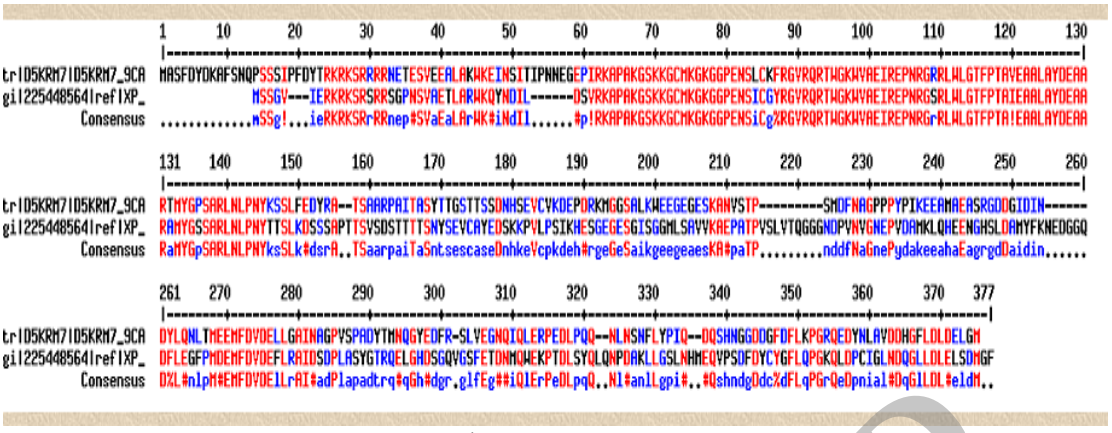
توسط آنها انتقال پیام تنش در سلول تشدید می‌شود. موتیف خطی NES[1] در تنظیم خروج ماکرومولکول‌ها از منافذ هسته دخالت دارند. ورود و خروج ماکرومولکول‌ها عامل مهمی در ایجاد ارتباط بین هسته و سیتوپلاسم می‌باشد، از این رو با وجود این که بسیاری از پروتئین‌ها نیاز به خروج مجدد از هسته ندارند اما تعدادی از پروتئین‌های مهم هسته‌ای بین هسته و سیتوپلاسم رد و بدل می‌شوند (Kutay and Guttinger 2005). به‌نظر می‌رسد که در پروتئین SbDREB2A این موتیف در تنظیم ورود و خروج

این پروتئین نقش اساسی دارد و سازماندهی این پروتئین را در شرایط تنش به عهده دارد. پروتئین DREB like 2C انگور فاقد این موتیف است و احتمالا در ورود به هسته ناتوان باشد. موتیف پنجم NLS[2]است که در بیشتر پروتئین‌های هسته‌ای وجود دارد و بیان ژن و ترجمه آن را تنظیم می‌کند (Sorokin et al. 2007). بر مبنای نتایج حاصل از این مطالعه که ژن *VvDREB* در تنش شوری بیان شده و همولوژی زیاد آن (bootstrap=90%) با ژن‌های *DREB2* در خانواده سویا (با توجه به اینکه شرایط

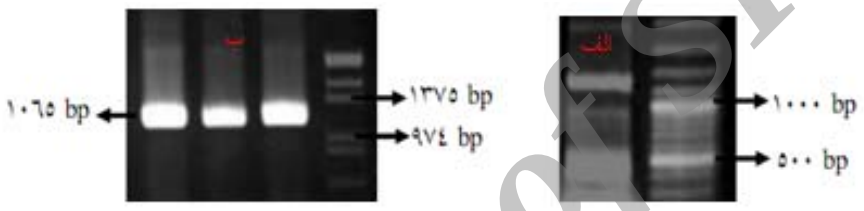
[3] Nuclear export signal

[4] Nuclear localization signals

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶- همردیف‌سازی پروتئین SbDREB2A(D5KRM7) و DREB like2C (225448564) انگور نشان می‌دهد که شباهت زیادی (حدود ۸۸ درصد) بین دو پروتئین وجود دارد.



شکل ۷- همسانه‌سازی CDS ژن *DREB like 2c*. الف) از راست به چپ: چاهک اول نشانگر 100 bp، چاهک دوم تکثیر با آغازگرهای Vvs-F و Vvs-R؛ ب) از راست به چپ: چاهک اول نشانگر III، چاهک‌های دوم تا چهارم تکثیر با آغازگرهای Nested VvF و Nested VvR .

شکل۸- الف) مقایسه موتیف‌های پروتئین SbDREB2A و ب) DREB like2C انگور نشان می‌دهد که پروتئین SbDREB2A دارای پنج موتیف متفاوت می‌باشد.

خشکی و شوری سبب القای ژن‌های خانواده *DREB*2 گیاه سویا می‌شوند، (Chen et al. 2007) و همچنین بر اساس شباهت توالی و ساختار هر دو ژن، به نظر می‌رسد که عملکرد آن‌ها نیز مشابه باشد.

مقایسه زیست‌رایانه‌ای مناطق تنظیمی موجود در پروتئین‌های SbDREB2A و DREB like 2C نشان داد که برخی از موتیف‌های تنظیمی در پروتئین DREB انگور وجود ندارد. مطالعات مولکولی بر این مطلب دلالت دارند که سیگنال تنش

Archive of SID
www.SID.ir

اسمزی توسط مناطق تنظیمی خاص پروتئین SbDREB2A در گیاه *S. brachiata* دریافت شده و سبب فعال شدن آن می‌شود و به دنبال آن سایر ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش جهت افزایش تحمل تنش در گیاه القا می‌شوند.

مقایسه زیستگاه‌های دو گیاه *S. brachiata* و انگور نشان می‌دهد که *S. brachiata* مناطق شور را برای زندگی ترجیح می‌دهد (Jha et al. 2009). با توجه به نقش موثر پروتئین‌های DREB در افزایش تحمل به تنش شوری در گیاهان، به نظر می‌رسد که پروتئین SbDREB2A در مقایسه با پروتئین VvDREB، حضور مؤثرتر و کارآمدتری داشته و گیاهان را برای بقا در شرایط شوری سازگار می‌کند. این احتمال وجود دارد که تفاوت موتیف‌های تنظیمی در کنترل بیان و ترجمه پروتئین‌های مورد نظر (Diella et al. 2008) در این رابطه نقش ایفا می‌کنند. به‌طور کلی می‌توان چنین بیان کرد که انتقال ژن‌های کلیدی تنظیمی مانند ژن‌های *VvDREB* و *DREB like 2C* به گیاهان حساس و به طور کلی بیوتکنولوژی تنظیمی ممکن است بتواند استراتژی موثری برای ایجاد مقاومت و کاهش خسارت تنش‌های غیرزنده در گیاهان باشد.

منابع

Bardwell L (2006) Mechanisms of MAPK signalling specificity. Biochemical Society Transaction 34: 837-41.

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

Chen JQ, Meng XP, Zhang Y, Xia M, Wang XP (2008) Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. Biotechnology Letter 30: 2191-2198.

Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Xia LQ, Ma YA (2007) GmDREB, a soybean DRE –binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plant. Biochemical Biophysical Research Communication 353: 299-305.

Chen M, Gao D, Liu P, Ma Y (2009) Isolation and functional characterization of HvDREB1-a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. Journal of Plant Research 122:121-130.

Diella F, Haslam N, Budd C, Brown AN, Gibson J (2008) Understanding eukaryotic linear motifs and their role in cell signaling and regulation. Frontiers in Bioscince. 13: 6580-6603.

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

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

Hirt H, Shinzoki K (2003) Plant responses to abiotic stress. Springer Berlin-Verlag Heidelberg.

Hsieh, TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002) Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiology 130: 618-626.

Jha B, Agarwal PK, Reddy PS, Lal S, Sopory SK, Reddy MK (2009) Identification of salt-induced genes from *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte through expressed sequence tags analysis. Genes Genet System 84:111-20.

Kapil G, Pradeep K, Agarwal M, Bhavanath J (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.

Kutay U, Guttinger S (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. 2004. Trends in Cell Biology 15: 121-4.

Lata C, Bhutty S, Bahadur RP, Majee M, Prasad M (2011) Association of a SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stresstolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. Journal of Experimental Botany DOI: 10.1093

Liu Q, Naming Z, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) Regulatory role of DREB transcription factor in plant drought, salt and cold tolerance. Chinese Sience Bulletin 45:970-975.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) Molecular studies on stress-responsive gene expression in Arabidopsis and improvement of stress tolerance in crop plants by regulon biotechnology. Japan Agricultural Research Quarterly 39: 221-229.

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

Nakashima k, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory network in response to abiotic stress in Arabidopsis and grasses. Plant Physiology 149: 88-95.

Pérez-Clemente RM, Montoliu Á, López P, López-Climent MF, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2008) *In vitro* tissue culture approaches for the study of salt stress in citrus. Biosaline Agriculture and High Salinity 37-42.

Sakuma Y, Liu Q, Ovbouzet JO, Abe H (2002) DNA-binding specificity of the ERB/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcriptional factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. Biochemical Biophysical Research Communication 290: 998-1009.

Archive of SID
www.SID.ir

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

Sorokin AV, Kim E, Ovchinnikov LP (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. Biochemistry (Mosc) 72: 1439-57.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (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 Natural Academy Science of USA 94: 1035-1040.

Walker AR, Lee E, Bogs J, McDavid DA, Thomas MR and Robinson SP (2007) "White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes". Plant Journal 49: 772-85

Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M, Liu Q, Nakashima K, Sakuma T, Abe H, Shinwari ZK, Seki M, Shinozaki K (2002) Biological mechanism of drought stress. JICAS Working Reports 1-8.

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

Archive of SID

www.SID.ir