

شناسایی و جداسازی ژن *VvDREB* و ارتولوگ ژن *SbDREB2A*، از انگور عسگری 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^۲، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی^۱، غزاله خاکسار^۱، محمدعلی تقدس^۱

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، دانشجوی دکتری و دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان

Mahvelati E¹, Ghobadi C^{*1}, Seyed Tabatabaei BE¹, Khaksar G¹, Taghaddos MA¹

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 نسخه برداری DREB (پروتئین متصل شونده به عنصر پاسخ دهنده به کم آبی) یکی از چهار سیستم تنظیمی مستقل در گیاهان است که در فعال شدن ژن های پاسخ دهنده به تنش های محیطی نقش دارد. به منظور شناسایی و جداسازی برخی از ژن های DREB در انگور، گیاهان تحت تنش ۱۵۰ میلی مولار 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 ژن های *VvDREB* و *DREB like 2C* (ارتولوگ *SbDREB*) از انگور جدا شد. نتایج نشان داد که ژن *VvDREB* با ژن های *DREB* گروه دو خانواده سویا در حدود ۸۵ درصد و دو ژن *SbDREB2A* و *DREB like 2C* در حدود ۸۰ درصد شباهت دارد. رسم ساختار ثانویه پروتئین *VvDREB* و پروتئین های *DREB2* سویا نشان داد که در ناحیه حفاظت شده AP2 آن ها ساختار Helix مشابه وجود دارد. مطالعه و مقایسه موتیف های پروتئین *VvDREB* و *SbDREB2A* در سایت ELM حاکی از عدم وجود پنج موتیف متفاوت (BRCT, MAPK, PKB, NES, NLS) در پروتئین *VvDREB* بود که احتمال می رود دلیل بر ناکارایی مؤثر عملکرد آن باشد.

واژه های کلیدی

انگور

تنش اسمزی

زیست رایانه

DREB

Salicornia brachiata

مقدمه

تنش‌های محیطی نظیر خشکی، شوری و سرما دارای آثار زیان‌باری بر رشد و عملکرد گیاهان می‌باشند (Hirt and Shinzaki 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 اثر تنش 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 (¹MYB، ²MYC، ³bZIP و ⁴DREB) و پروتئین‌های کیناز (⁵MAP کیناز، ⁶CDP کیناز، پروتئین کیناز پذیرنده) می‌باشند (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2005; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2006).

در تنش‌های اسمزی، پیام تنش توسط عامل نسخه‌برداری پاسخ‌دهنده به خشکی (DREB) دریافت شده و متعاقباً 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 سیس⁷ به نام DRE⁸ قرار دارند که شامل ۹ جفت باز با توالی حفاظت شده -5' TACCGACAT-3' می‌باشد. همچنین عناصر تنظیمی مشابهی به نام CRT⁹ (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/CBF¹⁰ نامیده می‌شوند. پروتئین‌های DREB به خانواده عوامل نسخه‌برداری AP2/ERE¹¹ 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 کاملاً حفاظت شده AP₂ با ۵۸ اسید آمینه می‌باشند که به DNA متصل شده و حضور دو اسید آمینه والین و اسیدگلوتامیک در موقعیت ۱۴ و 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 AP₂ 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 ترانس¹³ 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

⁷ Cis-element⁸ Dehydration responsive element⁹ C-repeat¹⁰ C-repeat binding factor¹¹ APETALA2/ethylene-responsive element¹² Nuclear localization signal¹³ Trans-activation¹ Basic leucine zipper² Myelocytomatosis oncogene³ Myeloblastosis oncogene⁴ Dehydration responsive element binding⁵ Mitogen activated protein⁶ Calcium-dependent protein

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 به منظور 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^۱ از طریق کشت جوانه انتهایی در محیط کشت MS^۲ (فاقد هورمون) تکثیر شد. به منظور اعمال تنش شوری، انگور انگور در شرایط درون شیشه‌ای در کلرید سدیم با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شد (Pérez- et al. 2008). 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. به منظور 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 ژمین حفاظت شده AP₂، 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).

^۱ In vitro

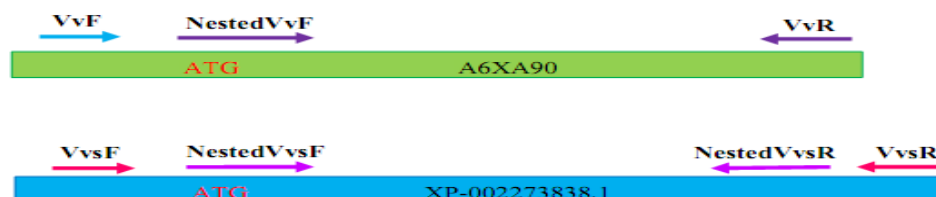
^۲ Murashing and Skoog medium

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* و *OsDREB1E*، *OsDREB1F*، *OsDREB1G* و *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 ژمین حفاظت شده AP2/ERF در گیاه *Caragana korshinski*، *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). اخیراً 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. تنظیم‌کننده‌های *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 احتمالاً سیستم تنظیمی DREB/CBF در همه گیاهان وجود دارد و انتظار می‌رود که این ژن‌ها با کنترل بیان سیستم تنظیمی موجب افزایش تحمل به

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده

آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	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



شکل ۱- 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* از نواحی مجاور ژن طراحی شدند.

شد. در تکثیر اختصاصی ژنهای مورد مطالعه، محصول واکنش اول به عنوان الگو برای PCR آشیانه‌ای در نظر گرفته شد و واکنش PCR آشیانه‌ای^۱ توسط جفت آغازگر *VvR* و *NestedVvF* و همچنین جفت آغازگر *NestedVvF* و *NestedVvR* (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 و www.ncbi.nlm.nih.gov انجام شد.

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 شکل ۱). 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 (جدول ۱ و شکل ۱). 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 *VvF* و *VvR* و در مورد ژن *XP_002273838.1* توسط جفت آغازگر *VvsF* و *VvsR* انجام

^۱ Nested PCR

نتایج و بحث

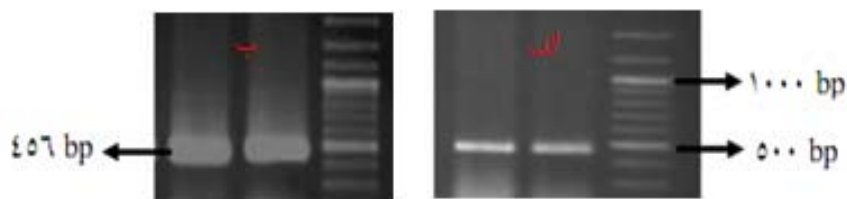
از واکنش PCR نمونه cDNA با آغازگرهای VvF و VvR قطعه ۵۰۰ جفت بازی حاصل شد (شکل ۲-الف). واکنش PCR آشیانه‌ای محصول PCR اول توسط آغازگرهای NestedVvF و VvR سبب تکثیر ژن فرضی مورد مطالعه با نام جدید *VvDREB* به طول ۴۵۶ جفت باز شد (شکل ۲-ب). که بیان این ژن را در تنش شوری تایید می‌کند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی ژن مورد مطالعه با احتمال ۹۹ درصد با ژن فرضی به شماره شناسایی A6XA90 شباهت داشته و دُمین حفاظت شده AP₂ 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 *DREB2* سویا در یک گروه قرار می‌گیرد (شکل ۳). علاوه بر این، تجزیه ژن‌های *DREB* و هم‌دیف‌سازی 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 (شکل ۴). با توجه به این‌که تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که ژن‌های خانواده *DREB2* 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* آرآبیدوپسیس، 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.

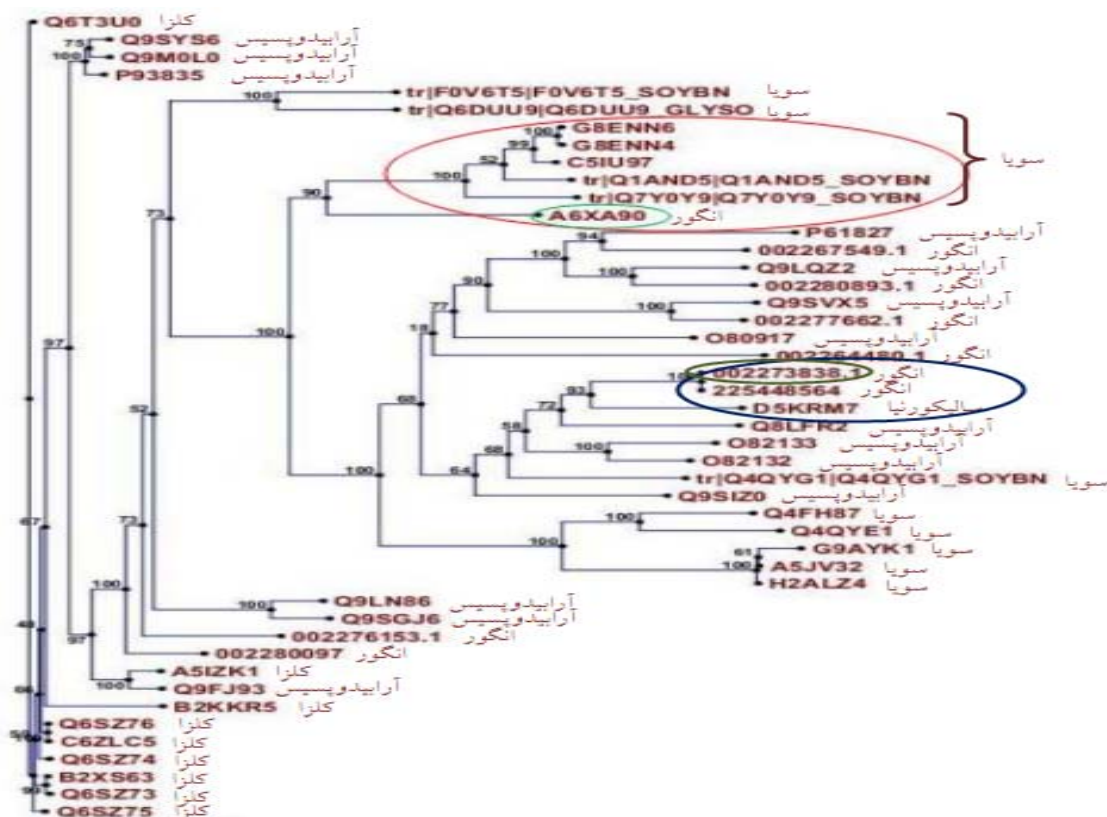
نتایج هم‌دیف‌سازی پروتئین SbDREB2A گیاه نمک دوست *Salicornia brachiata* که قادر به تحمل غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم است (Kapil et al. 2010) با ژنوم انگور در پایگاه اطلاعاتی NCBI (بر مبنای وجود ناحیه حفاظت شده AP₂)، نشان داد که پروتئین DREB like2C در انگور (شماره شناسایی XP_002273838.1) با بالاترین 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 (شکل ۶). همچنین رسم درخت فیلوژنی ارتباط نزدیک (bootstrap=93%) این دو پروتئین را نشان می‌دهد (شکل ۳).

نتایج واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی VvsF و VvsR سبب تکثیر قطعه مورد نظر شد (شکل ۷-الف). واکنش PCR آشیانه‌ای ژن پیش‌بینی شده DREB like 2C توسط جفت آغازگر Nested VvsR و Nested VvsF موجب تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۶۵ جفت باز شد که موید بیان ژن فوق در شرایط تنش شوری است (شکل ۷-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^۱، 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^۲ از خانواده پروتئین‌های سرین/ ترئونین هستند که در بسیاری از مسیرهای انتقال پیام تنش دخالت دارند.

^۱ Cell-cycle check point^۲ Mitogen-activated protein kinase



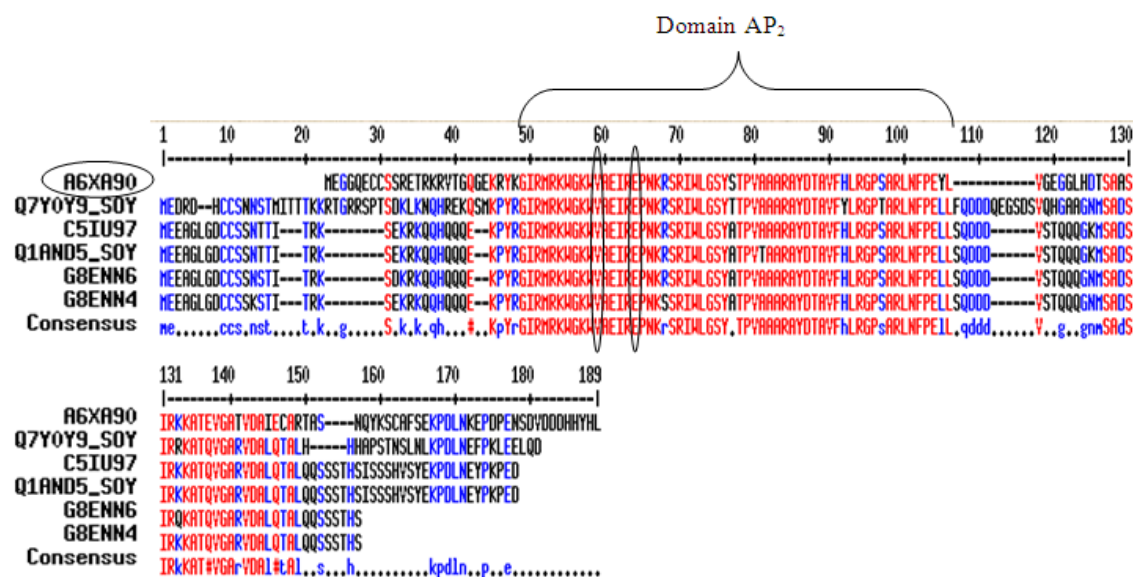
شکل ۲- همسانه‌سازی ژن *VvDREB*. الف- از راست به چپ- چاهک اول نشانگر اندازه 100 bp و چاهک‌های دوم و سوم تکثیر با آغازگرهای *VvR* و *VvF*؛ ب- از راست به چپ- چاهک اول نشانگر اندازه 100 bp و چاهک‌های دوم و سوم تکثیر با آغازگرهای *NestedVvF* و *VvR*.



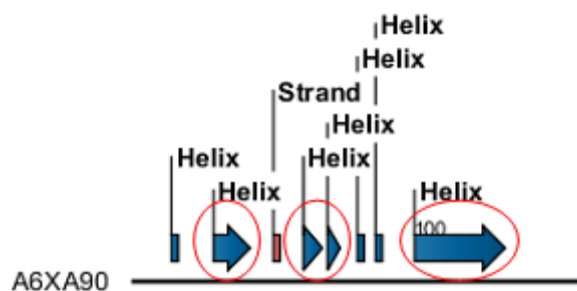
شکل ۳- رسم درخت فیلوژنی ژن‌های *DREB* انگور، سویا، کلزا و آرابیدوپسیس (شماره شناسایی پروتئین‌ها در سایت ExPASy (www.ExPASy.org) و NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)) نشان می‌دهد که ژن مورد مطالعه با ژن‌های خانواده *DREB2* سویا در یک گروه قرار می‌گیرد.

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

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



شکل ۴- هم‌ردیف سازی پروتئین A6XA90 با خانواده DREB2 سویا، شباهت بیش از ۹۹ درصد در ناحیه AP₂ مشاهده شد و همچنین حضور دو اسید آمینه والین در موقعیت ۱۴ و گلو تامیک اسید در موقعیت ۱۹ مشخص شده است.



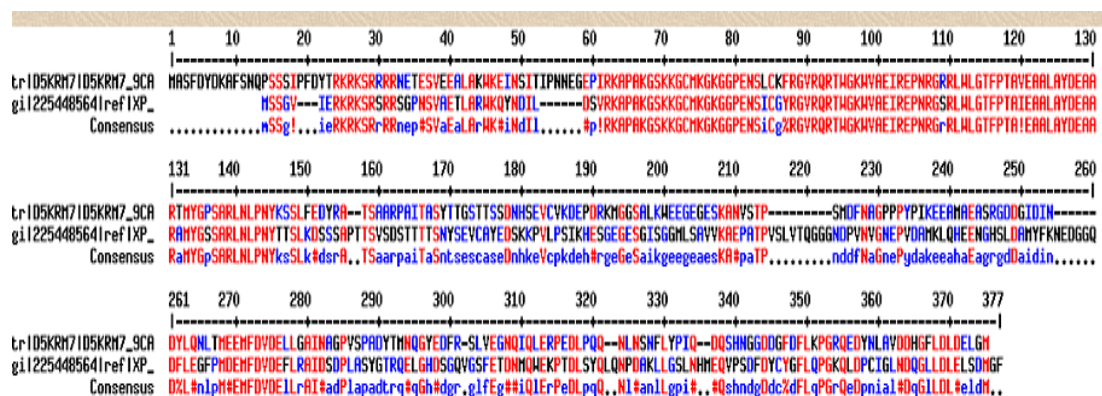
شکل ۵- ساختار ثانویه پروتئین A6XA90، قسمت‌های مشخص شده مشابه خانواده DREB2 سویا

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 احتمالاً در ورود به هسته ناتوان باشد. موتیف پنجم NLS^۴ 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

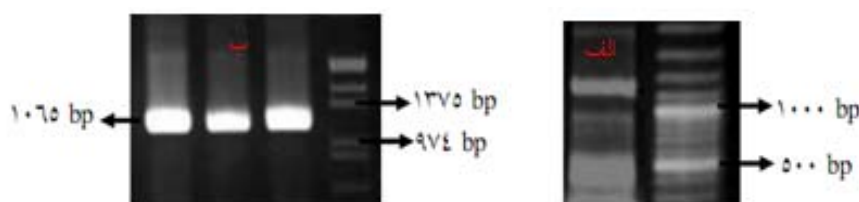
توسط آنها انتقال پیام تنش در سلول تشدید می‌شود. موتیف خطی NES^۵ در تنظیم خروج ماکرومولکول‌ها از منافذ هسته دخالت دارند. ورود و خروج ماکرومولکول‌ها عامل مهمی در ایجاد ارتباط بین هسته و سیتوپلاسم می‌باشد، از این رو با وجود این که بسیاری از پروتئین‌ها نیاز به خروج مجدد از هسته ندارند اما تعدادی از پروتئین‌های مهم هسته‌ای بین هسته و سیتوپلاسم رد و بدل می‌شوند (Kutay and Guttinger 2005). به نظر می‌رسد که در پروتئین SbDREB2A این موتیف در تنظیم ورود و خروج

^۴ Nuclear localization signals

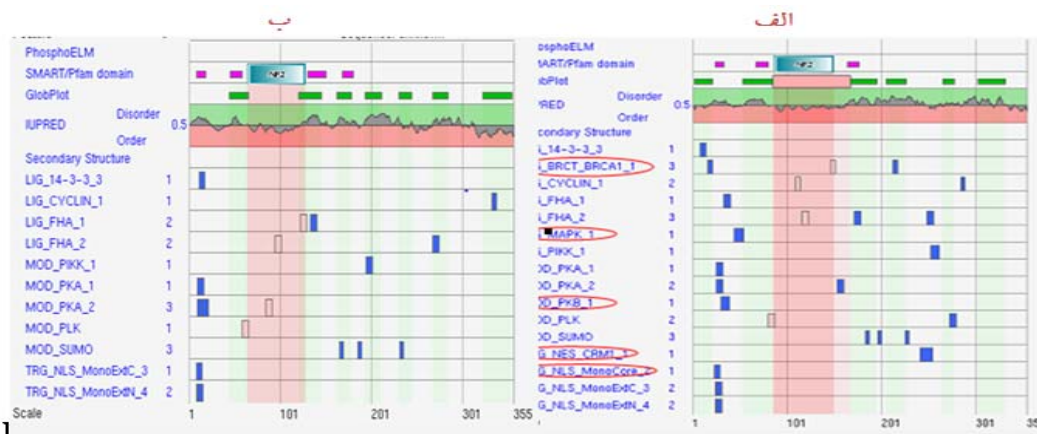
^۵ Nuclear export signal



شکل ۶- هم‌ردیف‌سازی پروتئین (D5KRM7)SbDREB2A 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 VvR و Nested VvF.



شکل ۸- (الف) مقایسه موتیف‌های پروتئین SbDREB2A و (ب) DREB like2C انگور نشان می‌دهد که پروتئین SbDREB2A دارای پنج موتیف متفاوت می‌باشد.

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

خشکی و شوری سبب القای ژن‌های خانواده *DREB2* 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.

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 می‌کند. به‌طور کلی می‌توان چنین بیان کرد که انتقال ژن‌های کلیدی تنظیمی مانند ژن‌های *VvDREB* و *DREB like 2C* به گیاهان حساس و به‌طور کلی بیوتکنولوژی تنظیمی ممکن است بتواند استراتژی موثری برای ایجاد مقاومت و کاهش خسارت تنش‌های غیرزنده در گیاهان باشد.

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

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 Bioscience*. 13: 6580-6603.
- Fujii K, Zhu G, Liu Y, Hallam J, Chen L, Herrero J, Shaw S (2006) Kinase peptide specificity: improved detection, refinement 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, Shinozaki 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 stress tolerance 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 Science 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, Oubouzet 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.

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.