نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد ششم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۷
شماره صفحه: ۲۶۷-۲۵۱
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.857.1037

استخراج و جداسازی سه ژن AREB، DREB و MPK در گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) به منظور بررسی مقاومت به خشکی

ایمان یوسفی جوان[1*] و فائزه قراری[2]

۱- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه
(ORCID ID: 0000-0001-6906-8626; phone: +98-51-51240177)
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی و کارشناس پژوهش دانشگاه تربت حیدریه
* نویسنده مسئول: Email: I.javan@torbath.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۱

چکیده

تنش‌های محیطی مهم‌ترین عامل کاهش‌دهنده عملکرد محصولات کشاورزی در سطح جهان هستند. تنش خشکی یکی از عوامل محدودکننده تولید گیاهان زراعی در سراسر جهان است. برای کاهش اثر تنش‌های محیطی، یافتن ژنوتیپ‌هایی که دارای ژن‌ها و صفات مطلوبی در این زمینه باشند، مهم است. بدین منظور یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیقاتی، درک مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با مقاومت به خشکی در گیاهان می‌باشد. با پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک مولکولی، صدها ژن که بوسیله تنش القاء می‌شوند، شناسایی شده و به‌عنوان ژن‌های کاندید برای مهندسی ژنتیک مورداستفاده قرارگرفته‌اند. زعفران گیاهی است که در مناطق خشک و نیمه‌خشک رشد می‌کند و برخلاف بسیاری از گیاهان، قهرمان خشکی و دارای رژیم حرارتی متفاوتی بوده است. حضور ژن‌های بی‌شماری برای مقابله با محدودیت تنش خشکی در این گیاه قابل بررسی است. با شناخت ژن‌های درگیر، در ایجاد مقاومت به تنش خشکی و انتخاب ارقام بومی مناسب، می‌توان از زعفران در اکثر مناطق با شرایط آب و هوایی متفاوت، میزان محصول نسبتاً مشابهی تولید نمود. در این مطالعه حضور ژن‌های AREB، DREB و MPK در گیاه زعفران برای اولین بار با استفاده از تکنیک Real Time-PCR در اندام‌های متفاوت گیاه زعفران اثبات و مورد بررسی قرار گرفت. تنش‌های خشکی سبب افزایش بیان معنی‌داری از ژن‌های فوق گردید. این افزایش بیان در اندام‌های رویشی و زایشی متفاوت بود که احتمالاً باعث افزایش فرآورده نهایی این ژن‌ها و مقاومت این اندام در برابر خشکی می‌گردد. همچنین بیان آن‌ها دارای همبستگی و اثری متقابل نسبت به یکدیگر است. ساختار پروتئینی این ژن‌ها به ترتیب دارای ۳۶۶، ۱۶۶ و ۳۱۵ اسیدآمینه، که با بررسی این ساختار، حضور منطقه‌ای از اسیدآمینه‌های مشترک در آن‌ها، نشان از هم‌خانواده بودن این سه ژن را می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، **AREB**، **DREB**، **MPK**، **Real Time-PCR**

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. گیاهی از خانواده Iridaceae است که ارزش اقتصادی و جهانی آن به خاطر کلاله‌های قرمز رنگ است. کلاله یکی از اجزای اصلی گل در گیاهان گلدار و قسمتی از اندام تولید مثلی است. این گیاه از نظر رده‌بندی گیاهشناسی از خانواده زنبقیان و تریپلوئید عقیم می‌باشد (Dhar et al., 1998).

زعفران گیاهی پاییزه است که در مناطق خشک و نیمه-خشک رشد می‌کند. بدون تردید درجه حرارت یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی کنترل‌کننده بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان که اصلی‌ترین مرحله آن گل‌دهی می‌باشد نیز توسط درجه حرارت محیط تنظیم می‌شود. به این ترتیب افزایش درجه حرارت الگوهای گل‌دهی را بشدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Menzel, 2000). مهم‌ترین عامل در تنظیم رشد گل‌ها، اندازه بنه‌های زعفران می باشد، در نتیجه، خاک اطراف بنه‌ها باید دارای حرارت مطلوبی باشد تا گل‌ها بتوانند با رشد و نمو بافت جنینی مریستم اختصاصی که روی جوانه‌ها بر روی بنه‌های مادری وجود دارد، تکوین یابند (Rohi et al., 2014)، دما عامل اصلی و تعیین-کننده‌ای در سرعت تشکیل اندام‌های هوایی و ظهور گل در زعفران می‌باشد (Molina et al., 2003).

این گیاه به لحاظ مصرف آب، گیاه کم‌مصرفی بوده و معمولاَ می‌تواند به بهترین نحو تنش‌های خشکی را تحمل نماید. گرچه زعفران در شرایط گرم و خشک رشد می‌کند، ولی اعمال تنش آبی به این گیاه سبب کاهش عملکرد آن (Khashei Siuki et al., 2015) خواهد شد (Pazoki et al., 2013). با شناخت ژن‌های درگیر، در ایجاد مقاومت به تنش خشکی و انتخاب ارقام بومی مناسب، می‌توان از زعفران در اکثر مناطق با شرایط آب و هوایی متفاوت، میزان محصول نسبتاً مشابهی تولید نمود. از دیگر ویژگی‌های مثبت این گیاه در مقابله با تنش‌های خشکی این است که حرارت‌های بالا در رشد و شکوفایی گل‌ها آسیبی وارد نمی‌نماید، سازش‌پذیری گیاه به گرما حاصل تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متنوعی است که اساساً از تغییر در بیان تعدادی از ژن‌های مسئول در تحمل‌پذیری به تنش خشکی ناشی می‌شود (Thomashow, 1999). گیاهان زراعی از نظر ظرفیت جذب آب، تعرق و واکنش نسبت به تنش خشکی عکس‌العمل متفاوتی دارند. فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان عمدتاً تابع وضع آب در گیاه هستند و تنها به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر تنش آب در خاک و هوا قرار می‌گیرند (Bayoumil et al., 2008).

معمولاً پیش‌بینی وضع آب در گیاه، به تنهایی از روی شرایط خاک یا هوا امکان‌پذیر نیست، بلکه با توجه به ژن‌های درگیر در مقاومت به خشکی، ممکن است یک گیاه با وجود رطوبت زیاد در خاک پژمرده شود و یا با وجود خشکی نسبی خاک شاداب بماند (Bery, 2007). بر این اساس اتکاء به پتانسیل ژنتیکی ارقام و تلاش در جهت بهبود و اصلاح ژنتیکی آن‌ها نقش اساسی در القای تحمل به خشکی ایجاد می‌نماید. از آن ا که اصول بنیادی هر برنامه به نژادی از طریق مطالعه پارامترهای ژنتیکی تعیین می‌شود، لذا آگاهی از نحوه و اثر ژن‌ها در حصول موفقیت برنامه‌های به‌نژادی ضروری می‌باشد (Navabpor, 2013). شناسایی سازوکارهای مولکولی در تحمل‌پذیری گیاهان به تنش‌های خشکی برای گیاهان زراعی دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد. تنش خشکی زیاد باعث کاهش فتوسنتز، اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و سرانجام خشک شدن و مرگ گیاه می‌شود (Shao et al., 2005; Amiri Oghan et al., 2002).

علاوه بر تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، تغییرات بیوشیمیایی نیز از جمله القای بیوسنتز مواد محلول سازگار روشی برای بیان وقوع تنش خشکی می‌باشد. در شرایط تنش خشکی، گیاهان سعی می‌کنند محتوای آب خود را با انباشته کردن مواد محلول متعدد که غیرسمی بوده و خللی در فرآیندهای گیاه ایجاد نمی‌کنند، حفظ نمایند. به این خاطر این مواد را مواد محلول سازگار می‌نامند. بعضی از آنها عبارتند از فروکتان، ترهالوز، پلیول‌ها، گلایسین بتایین، پرولین و پلی‌آمین‌ها. ژن‌های مختلفی که مسئول آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز این مواد محلول هستند، شناسایی شده و طبق گزارشات، از موجودات مختلف از جمله باکتری‌ها، مخمر، انسان و گیاه همسانه‌سازی شده‌اند. از طرفی تنظیم اسمزی به عنوان جزیی مهم از مکانیسم‌های تحمل به خشکی در گیاهان مطرح است (Pagter et al., 2005). گیاه زعفران در شرایط متفاوت محیطی، مواد محلول سازگار از قبیل اسیدهای‌آمینه، قندها و یون‌ها را سنتز می‌نماید. تجمع این مواد سبب کاهش پتانسیل آب در اندام‌های

گیاهی شده و جذب آب توسط گیاه را امکان‌پذیر می‌سازد (Pagter et al., 2005). حفظ تورژسانس توسط تنظیم اسمزی موجب بهبود عملکرد و زنده‌مانی در شرایط تنش خشکی می‌شود. گیاهان از طریق تغییر در فرایندهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیسمی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. ژن‌های گوناگونی در پاسخ به فقدان آب در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Bray 1997; Campalans et al., 1999).

جاسمونیک[1] (JA) باعث بیان مستقیم ژن‌های MPK_1, MPK_2 و MPK_7 از زیر خانواده MAPK می‌شود. این ژن‌ها باعث پاسخ مستقیم گیاه به تنش‌های غیرزیستی و دفاع می‌شوند (Takahashi et al., 2009). با توجه به حضور ژن‌های مذکور، در این پژوهش حضور ژن MPK_1 نیز به‌عنوان ژن تنظیم‌کننده اسمزی و مؤثر در پاسخ به تنش خشکی که توسط اتیلن، جاسمونیک اسید، خشکی، شوری و آبسزیک اسید القاء می‌شوند از گیاه مورد نظر، *Crocus sativus* جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت. هورمون گیاهی آبسیزیک اسید بر طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های مهم در رشد و توسعه گیاه از قبیل خواب بذر، رشد و توسعه ریشه و ساقه، تعرق و تحمل به تنش موثر می‌باشد (De Smet et al., 2003). دستاورد و محصول بیان شدن این دسته از ژن‌های مؤثر مورد مطالعه در این پژوهش (MPK)، پروتئین کیناز می‌باشد. پروتئین‌های کیناز آنزیم‌هایی هستند که کنترل‌کننده فرآیندهای مختلف سلولی از جمله پاسخ به محرک‌های محیطی بوده است. در راه‌کارهایی که گیاهان برای مقابله با تنش استفاده می‌کنند ژن‌های متعددی دخالت دارند که بر اساس فرآورده‌های پروتئینی به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند ۱) ژن‌های کارکرد، که فرآورده‌های این ژن‌ها به‌طور مستقیم، مقاومت به تنش در گیاه را بر عهده دارند و شامل ژن‌هایی جهت بیان شدن پروتئین‌های LEA، پروتئین‌های تنظیم‌کننده فشار اسمزی، بتائین، پرولین و آنزیم‌های مؤثر در سم‌زدایی سلولی و غیره می‌باشند (Wilkinson & Davies, 2002). ۲) گروه دیگر ژن‌های تنظیمی هستند که فرآورده آن‌ها نقش مهمی در دریافت علامت تنش، انتقال علامت‌های تنش و تنظیم بیان ژن‌ها، نظیر کنترل بیان ژن‌های کارکردی بر عهده دارند. از این گروه می‌توان به ژن‌هایی که جهت بیان پروتئین کینازها وهمچنین عوامل رونویسی اشاره نمود (Shao et al., 2005).

تنش خشکی در گیاه زعفران به وسیله ژن‌های تنظیمی متعددی کنترل می‌شوند. رونویسی اولین مرحله تظاهر یک ژن است. تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ‌گر به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان گزارش شده‌اند. این ژن‌ها در شرایط تنش القاء شده و نه تنها در حفاظت از سلول‌ها در برابر تنش به وسیله تولید پروتئین‌های متابولیکی نقش دارند، بلکه در تنظیم ژن‌ها برای ترارسانی علامتی، در واکنش به تنش‌ها نیز مؤثر هستند. ژن‌ها و پروتئین‌هایی را که در مقاومت به خشکی در گیاهان دخیل هستند، به چهار دسته پروتئین‌های کارکردی، ترکیبات فعال اسمزی، عوامل رونویسی و عوامل سیگنالی تقسیم می‌شوند. عوامل رونویسی[2] تنظیم بیان اکثر ژن‌ها را کنترل کرده و موجب افزایش یا کاهش بیان ژن‌های هدف می‌شوند. در نتیجه بیان فاکتورهای رونویسی، می‌تواند بیان ژن‌های هدف را در پاسخ به تنش خشکی تنظیم کند.

فاکتورهای رونویسی بر اساس ویژگی‌های دمین‌های متصل شونده به DNA و مکانیسم‌های اثر متقابل با عناصر تنظیمی سیس در پروموتور ژن‌های هدف، به خانواده‌های مختلف همچون WRKY، AREB/ABF/bZIP، MYB/C ، ERF، ZFP، NAC، AP_2 و DREB /CBF دسته‌بندی شده‌اند. این فاکتورهای رونویسی بیان ژن‌های چندگانه هدف در ناحیه پایین دست را در شرایط تنش تنظیم نموده است. این سیستم‌های تنظیمی از طریق عناصر سیس خاص در ناحیه پروموتور ژن‌های هدف، فعالیت می‌کنند که معمولاً تعدادی از رگیولون‌های درگیر در واکنش به تنش‌های محیطی را در گیاه را فعال می‌نمایند. این عوامل رونویسی با توالی تنظیمی سیس موجود در ناحیه پیشبر ژن‌هایی که در پاسخ به تنش‌ها مؤثرند، برهم‌کنش نشان داده و منجر به تنظیم بیان آن‌ها می‌گردد و در نهایت از طریق مسیرهای انتقال پیام منجر به تحمل نسبت به تنش‌ها می‌شوند (Shao et al., 2005).

پیش‌بر در نواحی بالادست ژن‌ها، نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف رشدی و پاسخ به محیط دارند و این اعمال توسط عوامل رونویسی که به مکان‌های اتصال این عوامل یا همان توالی تنظیم سیس s متصل می‌شوند، تنظیم

1- Jasmonic Acid

2- Transcription factors

می‌شود. این موتیف‌های تنظیمی سبب اختصاصی شدن زمان و مکان بیان ژن بوده و برای الگوهای بیانی خاص هم-چون پاسخ به تنش‌ها در گیاهان ضروری می‌باشند. بررسی‌های مولکولی دو مسیر تنظیمی وابسته به اسید آبسیزیک و مستقل از اسید آبسیزیک را نیز در شبکه تنظیمی رونویسی نشان می‌دهد (Gray, 2004) حالت دهیدراسیون در گیاه زعفران به عنوان یک واکنش حفاظتی جهت جلوگیری یا جبران خسارت‌های وارده به سلول‌ها عمل می‌نماید. بررسی مسیر سیگنال‌دهی آبسیزیک اسید و مسیرهای القاءشونده در این گیاه سهم بسزایی در شناخت مولکولی واکنش گیاهان در مقابل دهیدراسیون داشته است. رشد و نمو در گیاهان با سیگنال‌های داخلی و محیطی همراه است که گیاه از طریق تنظیم‌کننده‌های رشد یا همان هورمون به آن‌ها پاسخ می‌دهد. از جمله این هورمون‌ها می‌توان به آبسیزیک اسید، جیبرلین و اکسین اشاره نمود (Gray, 2004; Wilkinson & Davies, 2002).

دهیدراسیون در گیاهان، منجر به افزایش میزان آبسیزیک اسید (ABA)، که در اثر اعمال تنش‌هایی مانند خشکی بوده، سنتز می‌شود، و همچنین سبب القای بیان ژن‌های چندگانه، مسئول دفاع، در مقابل اثرات سوء کم‌آبی می‌گردد. ABA سبب بسته شدن روزنه‌ها و بنابراین، تلفات آب در جریان تنفس را کاهش می‌دهد. مسیر بیوسنتزی ABA یک شاخه فرعی از مسیر کاروتنوئیدی بوده و بسیاری از آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی ABA، بر اثر وقوع دهیدراسیون تنظیم می‌شوند (Agarwal et al., 2006).

افزایش ABA منجر به فعال شدن یک سری عوامل رونویسی می‌گردد که از جمله آن‌ها عوامل رونویسی ژن AREB می‌باشند. این عوامل رونویسی به نوبه خود ژن‌های پایین‌دستی که در ناحیه پیشبری خود دارای مناطق ویژه‌ای به نام ABA-responsive elements (ABRE) بوده را، فعال می‌نمایند (Agarwal et al., 2006) عوامل رونویسی در انتقال پیام تنش‌هایی مانند شوری، خشکی و نور UV نقش دارند (Uno et al., 2000) و همچنین مطالعات مولکولی در گیاه زعفران نشان داده است که تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و سرما، ژن‌هایی را تحریک می‌کنند که اعمال گوناگونی بر عهده دارند.

در مسیر وابسته به ABA دو خانواده از عوامل رونویسی نقش مهمی در سازگاری و تحمل گیاه با تنش را دارند که عبارتند از: ABA-responsive element-binding (AREB/ABF) و MYC (myelocytomatosis oncogene)/MYB. در مقابل، در مسیر مستقل از ABA عوامل رونویسی خانواده DREB/CBF و عوامل رونویسی خانواده MPK نقش اصلی را بر عهده داشته است. چنانچه گفته شد، در شرایط تنش اسمزی مانند خشکی و شوری بالا، هورمون گیاهی ABA، به کمک یکی از دو مسیر فوق و یا هر دو مسیر فوق، و همچنین به کمک عوامل رونویسی در بیان ژن‌های مرتبط با تنش، مسئولیت از بین بردن تنش‌ها را بر عهده دارند.

در مورد ژن AREB، پروتئین‌های اتصالی به عوامل رونویسی این ژن، بیان ژن وابسته به ABA را فعال می-نمایند (Zhu, 2002; Kang et al., 2002) که عمدتاً از طریق سه عامل رونویسی bZIP، این سازگاری شکل می‌گیرد. این سه عامل عبارتند از: $AREB_1/ABF_2$ $AREB_2/ABF_4$ و ABF_3 و چنانچه این سه عامل توسط SNF_1، مرتبط با کیناز 2s ($SnRK_2s$) فعال می‌شوند.

سیگنال تنش وابسته به آبسیزیک اسید، بوسیله فاکتور رونویسی AREB که به عناصر تنظیمی ABRE در ناحیه پروموتری متصل می‌شود، باعث القای برخی ژن‌های پاسخگو به تنش می‌شود (Tuteja, 2007). در بسیاری از گیاهان، از جمله زعفران فاکتور رونویسی ژن‌های DREB و CBF نیز تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های هدف القاء شونده با تنش را کنترل کرده که موجب افزایش مقاومت به خشکی در این گیاه شده است. افزایش مقاومت در گیاه مقاوم به دلیل حضور عوامل رونویسی ژن AREB و در نهایت، به دلیل کاهش فعالیت سیگنالینگ‌ها می‌باشد. با توجه به نقش فاکتورهای رونویسی AREB در تنظیم بیان ژن‌های القاء شده توسط آبسیزیک اسید و تعدادی از ژن‌های درگیر در تنش خشکی، احتمالاً افزایش بیان این سیگنالینگ‌ها در رقم مقاوم، در مقاومت این رقم، تحت شرایط تنش نقش دارد. از نقش‌های عمده فاکتورهای رونویسی جهت سنتز پروتئین‌ها مقاوم به تنش‌های خشکی، بیان و فعال کردن، ژن‌های هدف مانند ژن‌های لازم برای سنتز مولکول‌های حفاظتی می‌باشد. به‌طور معمول، برای بررسی نحوه بیان ژن‌های القاء شونده توسط تنش خشکی نواحی پروموتر اهمیت زیادی دارد. بیان ژن AREB کدکننده یک نوع پروتئین با نام LEAREB و تنظیم این ژن مرتبط با

یکسری ژن‌های تنظیمی دیگر بوده که بدین ترتیب نقش مهمی را در هنگام تنش خشکی بازی می‌کند.

به‌طور کلی، صفت مقاومت به خشکی صفتی پیچیده بوده که علاوه بر صفات مرفولوژیک گیاه، ژن‌ها و پروتئین‌های متعددی در آن نقش دارد. و همچنین تنش ایجاد شده در محیط، پیامی را ایجاد می‌کند که این پیام توسط گیرنده‌هایی که عمدتاً در سلول‌های ریشه قرار دارند دریافت شده و به سلول‌های اندام‌های هوایی فرستاده می‌شود. این پیام‌ها فاکتورهای رونویسی را فعال کرده که منجر به رونویسی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های فانکشنال و ترکیبات اسمزی می‌شوند و نهایتاً با تولید این ترکیبات گیاه شرایط کم آبی را تحمل می‌کند. به دلیل هدف‌مندکردن تحقیقات آزمایشگاهی، در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی و میزان بیان ژن‌های AREB، MPK_2 و MPK بررسی گردید و همچنین با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی و ساختار پروتئینی آن‌ها نیز طراحی گردید. به‌علاوه با هدف مطالعه کارآیی پروتئین‌های فوق، ابتدا با روش تشابه، ساختار آن مدل‌سازی شد و در ادامه، تأثیر متیف‌ها و اسیدآمینه‌هایی که منجر به افزایش کارآمدی این پروتئین می‌شوند، نیز پیش‌بینی گردید. دستاوردهای پژوهش حاضر احتمالاً می‌تواند به‌منظور دستورزی ژن این پروتئین و در راستای ارتقا کارآمدی آن، بسیار مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده

ابتدا توده بومی از بنه‌های زعفران بومی منطقه تربت حیدریه تهیه گردیده و طی فرآیندهای سالانه در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربت‌حیدریه، در کرت‌هایی حاوی مخلوط ۱:۱ از خاک و ماسه کشت شدند. برای مطالعات مولکولی از اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ، برگ و بنه گیاه زعفران استفاده شد. بافت‌های این اندام‌ها از زعفران دوساله و بافت اندام‌های گل در مرحله جوانی گل‌ها استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی از بافت گیاه به علت ویژگی‌هایی مانند، بالا بودن سن گیاه و یا حضور کربوهیدرات‌ها، ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئین‌ها که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد مناسب نبوده (Alaey et al., 2007)، لذا DNA از برگ‌های تازه گیاه استخراج گردید چراکه کمیت و کیفیت DNA استخراج شده و حضور درصد قابل ملاحظه‌ای از ژن مورد مطالعه (افزایش احتمال حضور ژن‌های مسیر مقاومت به تنش، در اصلی‌ترین بخش‌های گیاه که همان برگ‌های گیاه بوده) افزایش می‌یابد. برگ‌های تازه گیاه، درون ورقه‌های آلومینیومی پیچیده شدند، سپس نمونه‌ها سریعاً درون نیتروژن مایع تثبیت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA بر اساس کیت تجاری DNeasy Mini شرکت Qiagene انجام گرفت. برای ارزیابی کمی و کیفی DNA از روش اسپکتروفتومتری (Eppendorf AG, Germany) و الکتروفورز افقی (BIO-RAD powerpac, USA) روی ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده گردید (Sambrook & Russell, 2001).

استخراج RNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت Vivantis شرکت سیگما مجدداً از اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ، برگ و بنه انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA ی استخراج شده نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری نور مرئی (700-400 nm) (Jenway6315UV/Visible) صورت پذیرفت.

شناسایی دقیق غلظت RNA کل برای اندازه‌گیری تعداد کپی mRNA بسیار مهم بوده است و هرگونه آلودگی DNA می‌تواند منجر به کمی کردن غیردقیق میزان RNA شود. بنابراین، هر نوسانی در تعداد کپی mRNA بسیار مهم می‌باشد و تفاوت در نتایج میزان بیان ژن می‌تواند ناشی از سطوح متفاوت آلودگی با DNA میان نمونه‌ها باشد. به دلیل اطمینان از عدم حضور هرگونه آلودگی و تأثیر آن بر نتایج RT-PCR کمی، از آنزیم DNase استفاده گردید (Mohammad Hashem et al., 2011).

واکنش نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA)

سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت Sigma و آغازگرهای طراحی‌شده به کمک آنزیم ترانسکریپتاز معکوس، صورت پذیرفت.

سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA کل با استفاده از Oligo dT به‌عنوان آغازگر عمومی توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس با نام تجاری M-MuLV Reverse Transcriptase Rnase H صورت گرفت. برای انجام روش

PCR نیمه کمی، غلظت cDNA نمونه‌های حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس با اسپکتروفتومتری تعیین شد و سپس جهت انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز از هر یک از نمونه‌ها استوک کاری با غلظت ۱ µg/µl تهیه شد. غلظت و کیفیت cDNA نمونه‌های حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس با اسپکتروفتومتری تعیین شد.

طراحی آغازگر

برای شناسایی و تکثیر ژن‌های AREB، DREB و MPK، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آن‌ها در واکنش PCR لازم بود. اولین مرحله در یافتن توالی ژن‌های ABA-responsive element-binding، jasmonic acid and ethylene responsive factor و protein kinase mitogen-activated، در گیاهان هم‌جنس و یا هم‌خانواده می‌باشد، از آنجا که توالی ژن مورد نظر در گیاه زعفران نامشخص بوده و تاکنون در هیچ گیاه هم‌جنس یا هم‌خانواده گیاه زعفران شناسایی نشده بود، آغازگرها بر اساس توالی-های ژن موجود از سایر گیاهان که به لحاظ همولوژی به گیاه زعفران نزدیک بودند، طراحی شدند. ژن‌های فوق و ژن‌های ثبت‌شده در پایگاه GenBank برای ژن AREB با شماره‌های دسترسی (A.no: AB017160) در *Arabidopsis thaliana*، (A.no: $AY5_{30758}$) در *Solanum lycopersicum esculentum*، (A.no: $AEKE_{02013223}$) در *Solanum lycopersicum cultivar* 1706 *Heinz*، (A.no: HE_{805209}) در *Solanum lycopersicum cultivar Ferum GSS*، (A.no: $HE_{805171.1}$) در *Solanum lycopersicum Heinz* 1706، برای ژن DREB با شماره دسترسی (A.no: $AY_{244760.1}$) در *Gliycine max*، (A.no: $AY_{196209.1}$) در *Oryza sativa* و برای ژن MPK با شماره دسترسی (A.no: $KF_{169944.1}$) در Capsicum chinense از بانک ژن NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) گرفته شد و پس از آن هم‌ردیف‌سازی برای پیدا کردن نقاط حفاظت‌شده صورت پذیرفت.

با بلاست کردن و بررسی توالی‌های هر یک از ژن‌های حاضر در گیاهان آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و فلفل‌دلمه‌ای، توالی مشابهی یافته شد که پس از آن، از روی توالی‌های فوق، آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی پیش برنده و برگرداننده توسط نرم‌افزار Primer 3 طراحی گردید. همچنین بررسی مناسب بودن آغازگر از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر با ابزاری مثل Primer Blast ارزیابی گردید، که به‌صورت زیر هستند:

جدول ۱. بررسی آغازگر از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر

Table 1. Investigation of the primer in the absence of non-specific connection and PCR condition (the Annealing temperature of primer)

ژن Gene	آغازگرهای رفتی **Forward primer**	آغازگر برگشتی **Reverse primer**	درجه حرارت ^oC **Temperature ^oC**
AREB gene	TGGATGGTAGTATGAATTTGGGG	TCACCAAGGTCCCGACTCT	59°
DREB gene	CCAAGGCCCATAACAAAGGG	TGAGGAAGAAGGAGGGGATG	58°
MPK gene	CGACTCCTGTTGATCCACCT	TGTTGTTTATGGTAGCAGCTTCT	59°

شناسایی ژن‌های AREB، DREB و MPK با استفاده از PCR

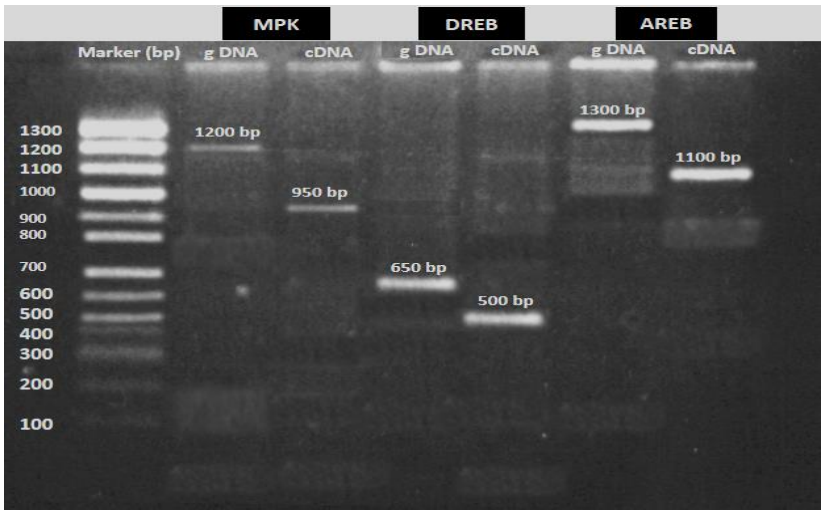
به این منظور، از DNA ژنومی و cDNA استخراج شده به همراه آغازگرهای طراحی شده در PCR استفاده شدند. برای PCR مقدار ۲۰۰ نانوگرم از DNA و یک میکرولیتر از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده هر یک از ژن‌ها با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار، درون لوله استریل PCR ریخته و با آب دوبار تقطیر استریل و با استفاده از Master Mix PCR، به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به‌طور کامل مخلوط می‌شود.

انجام PCR توسط ترموسایکلر مدل Biorad (Personal Termal Cycler BioRad 1148MJ USA Mini) و با مرحله واسرشتگی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید. بهینه‌سازی دمای اتصال جهت تکثیر اختصاصی و تک باند شدن محصول PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از PCR

Master Mix سیناژن، ایران) صورت پذیرفت. دمای لازم جهت اتصال آغازگرهای اختصاصی با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد.

معادله (۱) ۳/۶۹ + [۰/۴۱ X (%GC)- ۶۵۰/L]

در ادامه، انجام ۳۰ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال، بسته به آغازگرها متغیر، به مدت یک دقیقه و دمای طویل شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه صورت پذیرفت و در نهایت با مرحله طویل شدن به مدت هشت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و درون ژل داک قابل مشاهده بوده است. طبق تصویر شکل ۱، پس از آنکه پرایمرهای لازم از روی بلاست توالی ژن ها ترسیم گردید، باندهای روشن متفاوتی، حاکی از حضور ژن‌های مذکور را در گیاه فوق نشان داده و همچنین اثباتی در جهت طراحی مناسب آغازگرها مذکور بوده. قسمتی از ژل که حاوی قطعه DNA مورد نظر ژن‌ها را دارد، و توسط کیت استخراج DNA از ژل شرکت دنا زیست، جهت توالی یابی، جدا و استخراج گردید.



شکل ۱. ژل الکتروفورز پس از PCR، قطعه ۱۳۰۰ و ۱۱۰۰، برای ژن AREB، قطعه ۶۵۰ و ۵۰۰، برای ژن DREB و قطعه ۱۲۰۰ و ۹۵۰، برای ژن MPK جفت بازی تکثیر شده به ترتیب از DNA ژنومی و cDNA

Fig. 1. Electrophoresis gel of PCR reaction, part of 1300 and 1100 amplified for AREB gene, 650 and 500 amplified for DREB gene bp of genomic DNA and cDNA

بررسی بیان ژن‌های AREB، DREB و MPK

بیان ژن‌های مورد مطالعه با همان شرایط تکثیر gDNA بوده است. در بررسی بیان این ژن، واکنش Real-Time PCR (96 well: Thermo Fisher Scientific RT-PCR, با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq II شرکت تاکارا صورت گرفت. میزان مواد به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای بیان این ژن‌ها در اندام‌های ذکرشده مورد آزمایش، یکسان بود. چرخه دمایی استفاده شده شامل دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها متغیر به مدت ۶۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، برای ۳۰ ثانیه و توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

برای اطمینان از میزان بیان شدن ژن مورد نظر، این بخش از تحقیق، به کمک واکنش PCR بر روی cDNA صورت پذیرفت. مقدار پنج میکرولیتر محصول PCR را روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز نموده و سپس به وسیله نرم‌افزار Image J v 1.42 q (www.rsb.info.nih.gov/ij/index.html) شدت باند موجود روی ژل آنالیز شد (شدت باند از بین ۰ تا ۱۰۰ درجه‌بندی شد). این نرم‌افزار قادر است شدت نسبی باند موجود روی ژل را اندازه‌گیری کند و به صورت عدد نمایش دهد. در نهایت، داده‌های حاصل و رسم نمودارها با نرم‌افزارهای SPSS Ver. 15 (www.spss.com) و Excel انجام شد.

مطالعه ساختار، انطباق و بررسی توالی پروتئینی ژن‌های AREB، DREB و MPK

پس از بررسی و ترجمه هر یک از توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین به‌وسیله پایگاه داده مولکولی (www.expasy.ch) Expassy، آنالیز می‌شود (Varjonen et al., 2002). در این بخش از پژوهش، جهت مطالعه ساختار پروتئین، لازم است که توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین بیان‌شده از ژن‌های AREB، DREB و MPK با توالی اسیدآمینه‌ای دیگر توالی‌های پروتئینی در بانک‌های ژنی، بلاست گردد. با این هم‌ردیف سازی می‌توان به ساختار احتمالی پروتئین مورد مطالعه دست یافت. مطالعات همردیف سازی چندتایی پروتئینی (Multiple sequence alignments) با استفاده از BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov.blast) و CLUSTAL W موجود در پایگاه اطلاعاتی Expassy http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ صورت پذیرفت (Johnson et al., 2008).

مطالعات مدلینگ توالی پروتئینی، ژن‌های AREB، DREB و MPK گونه بومی تربت‌حیدریه و پروتئین‌های مشابه با استفاده از پایگاه GeneBee (www.genebee.msu.su) به اجرا درآمد (Edstam; et al., 2011 Emamzadeh et al., 2006; Goff et al., 2002). محاسبه تئوری نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه داده Expassy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) انجام شد. موتیف‌ها و اسیدآمینه‌های موجود بر روی ساختار پروتئینی این ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (www.expasy.ch/ motif scan). همچنین با استفاده از روش کولاسکار و تونگائونکار (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) و بر اساس نتایج تجربی، اپی‌توپ‌های موجود این پروتئین نیز شناخته شد (Hartzet al., 2010; Kolaskar & Tongaonkar, 1990 Van & van, 1999).

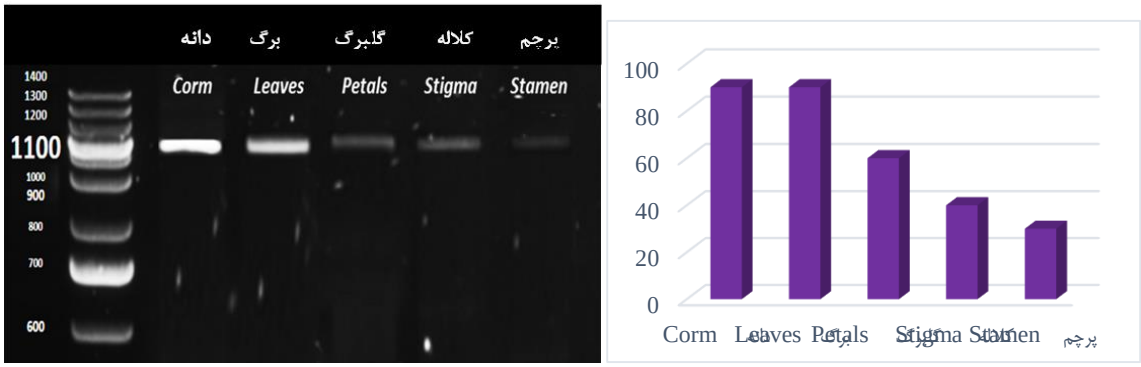
نتایج و بحث

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای بنیادی پژوهش‌های مولکولی بوده است (Alimoradi et al., 2015) حضور شش باند در نیم‌رخ الکتروفورزی، دلیلی بر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده بوده است. کمیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد که شاخص خلوص[1] در تابش دو طول موج مختلف ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نشان می‌دهد که DNA ژنومی از کمیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن‌های AREB، DREB و MPK به ترتیب به طول تقریبی ۱۳۰۰، ۶۵۰ و ۱۲۰۰ جفت باز به‌خوبی تکثیر شده است (شکل ۲). این مطلب نشان‌دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص دمای اتصال) می‌باشد (Murry & Thompson, 1980).

بررسی بیان ژن‌های AREB، DREB و MPK

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های AREB، DREB و MPK، قطعاتی به طول ۱۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۵۰ جفت باز از cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده برگ‌های تازه زعفران طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید. الگوی بیان ژن در اندام‌های مختلف زعفران با استفاده از RT-PCR با روش کمی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز و بررسی مقایسه میانگین بیان ژن‌های AREB، DREB و MPK در اندام‌های بنه، برگ، گلبرگ، کلاله و پرچم گیاه زعفران در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد. این اختلاف به شکلی بوده که ژن AREB بیشترین میزان، ژن MPK کمترین میزان و ژن DREB حدفاصلی را از این دو ژن در اندام‌های گیاه زعفران بیان نموده است. آنالیزهای آماری، شدت باند بیان ژن‌های مذکور را در اندام‌های مختلف زعفران، در چهار سطح کاملاً متفاوت قرار می‌دهد؛ به‌طوری‌که شدت باند در اندام‌های غیرجنسی بنه و برگ در مقایسه با اندام‌های جنسی و یا حتی گلبرگ‌های گل زعفران بیشتر بوده است، مشابه با نتایج به دست آمده از تحقیقات جدیر و دهقان نیری (Jodeir & Dehghan Nayeri, 2016). همچنین به نظر می‌رسد که رونوشت ژن‌های مذکور به ترتیب در بافت‌های بنه به سمت برگ‌ها و اندام‌های جنسی زعفران، سیر نزولی داشته، البته با این تفاوت که در میزان بیان شدن، هر سه ژن، رقابت وجود دارد، که شدت باند موجود بر روی ژل نیز این را اثبات می‌نماید.

1- Purity index



شکل ۲. بیان ژنAREB

Fig. 2. Gene expression of AREB

احتمال می‌رود که پیشبرهای این ژن‌ها، مانند $Rd_{29}A$ که یکی از مهم‌ترین عناصر تنظیمی در سطح رونویسی می‌باشند چرا که راه انداز $rd_{29}A$، یک راه‌انداز القاء شونده[1] با تنش است که استفاده از آن به جای راه‌اندازهای دائمی[2] اثرات منفی بر روی رشد و نمو گیاه را به حداقل می‌رساند، با توجه به اینکه بیان دائمی ژن‌های مقاومت به تنش تحت کنترل راه‌انداز دائمی غالباً مانع از رشد طبیعی گیاهان تراریخت می‌شود، بنابراین، راه انداز القایی $rd_{29}A$ می‌تواند جایگزین مناسبی برای تراریختی گیاهان متحمل به تنش باشد (Shokohi et al., 2015). در بیان شدن بیشتر یا کمتر این ژن‌ها تأثیر داشته باشند و همچنین وجود عناصر فعال سیس حساس به تنش یا تجمع ABA در پیشبرها از نشانه‌های اصلی فعالیت این ژن‌ها می‌باشد. احتمال می‌رود که برهمکنش ژن DREB بر ژن AREB در تظاهر ژن‌هایی که با ABA القاء می‌شوند در بافت‌های رویشی تحت تنش خشکی نقش ایفاء کنند و از بیان شدن یکدیگر جلوگیری نمایند.

اختلاف میانگین بیان ژن AREB در اندام‌های مختلف گیاه زعفران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس آنالیزهای آماری شدت باند ژن AREB به‌دست‌آمده در اندام‌های مختلف گیاه زعفران، در سه سطح متفاوت قرار می‌گیرد، به شکلی که در اندام بنه، و همچنین در اندام برگ‌ها نسبت به اندام‌های گل و اندام‌های جنسی اختلاف معنی‌داری دارد، با وجود این شکل یک نشان می‌دهد که این ژن در تمامی اندام‌های زعفران بیان می‌شود. آنالیز (Zandkarimi et al., 2015) نتایج مشابهی را از بیان ژن‌های خانواده AREB در اندام‌های مختلف گیاه انگور مشاهده کردند. این نتایج به‌گونه‌ای بود که ژن AREB در ریشه و برگ‌های انگور میزان بیان بسیار بالایی را نسبت به دیگر اندام‌ها نشان داده و چنانچه حسین و همکاران (Hossain et al., 2010) بر روی گیاه برنج و همچنین فوجیتا و همکاران (Fujita et al., 2005) بر روی گیاه *آرابیدوپسیس* نیز نتایج مشابهی را مشاهده نمودند که این ژن در تمامی اندام‌های فوق بیان می‌شود و شدت بیان آن با ورود گیاه به مرحله و ساخت اندام گلدهی کاهش‌یافته است.

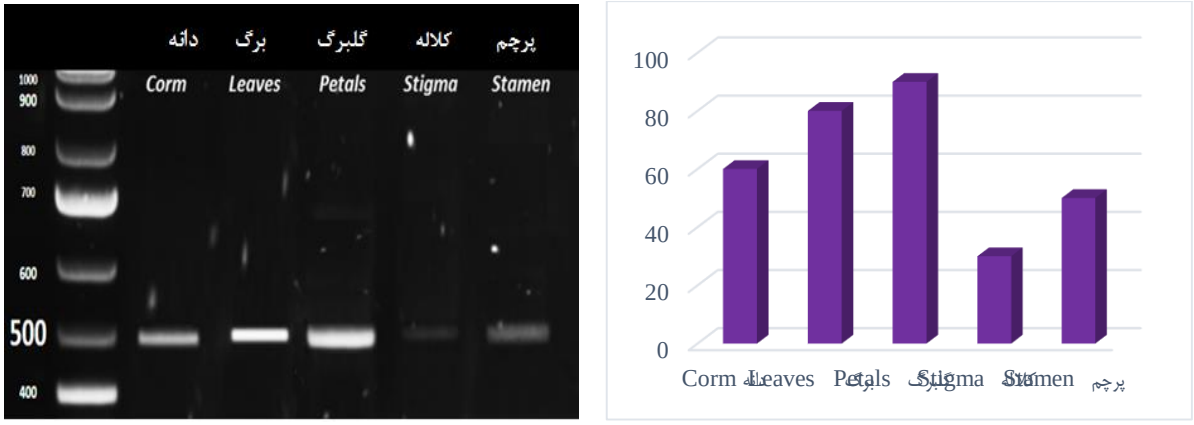
مقایسه میانگین بیان ژن DREB نیز مانند ژن AREB در اندام‌های مختلف گیاه زعفران در شرایط طبیعی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد، ولی برخلاف ژن AREB، آنالیزهای آماری بیشترین میزان شدت باند را، در اندام‌های برگ و گلبرگ گل زعفران نشان دادند و سپس این شدت باند در اندام‌های جنسی یعنی تخمدان، کلاله و پرچم گیاه سیر نزولی را نشان داده است.

شکل ۲ تفاوت در میزان بیان‌ژن DREB را در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان می‌دهد، این ژن در اندام‌های گیاه شامل اندام‌های رویشی برگ، ریشه و پیاز بیان می‌شود، ولی در اندام‌های گل مثل تخمدان، کلاله و پرچم بیان کمتری از این ژن مشاهده می‌گردد.

اختلاف میانگین بیان ژن MPK در اندام‌های مختلف گیاه زعفران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. آنالیزهای آماری شدت باند در اندام‌های مختلف گیاه زعفران را در دو سطح متفاوت قرار می‌دهد. ژن MPK در اندام‌های مختلف گل شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگ بیان می‌شود، ولی در اندام‌های غیر از گل شامل برگ، پیاز و ریشه بیان نمی‌شود و در صورت فعال شدن به میزان کمی

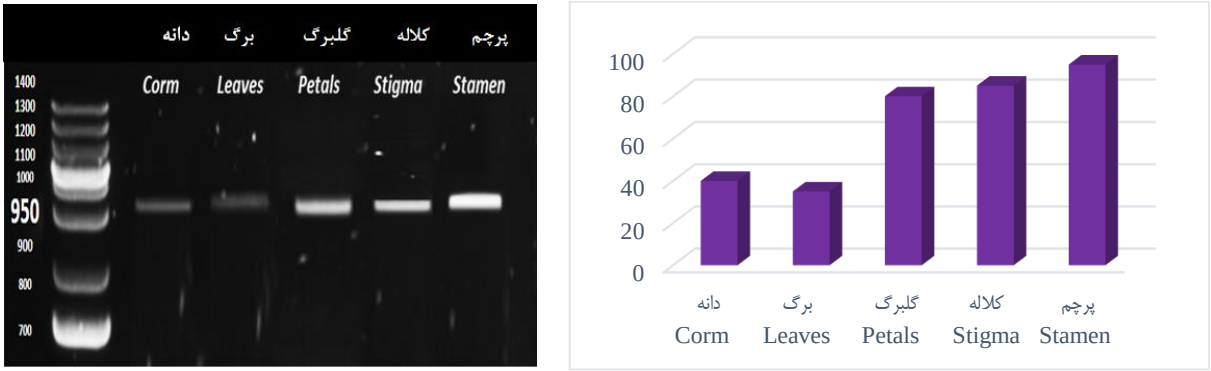
1- Inducible promoter
2- Constitutive promoter

بیان می‌شود (شکل ۲). اختلاف میانگین بیان ژن MPK در اندام‌های مختلف زعفران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد.



شکل ۳. بیان ژن DREB

Fig. 3. Gene expression of DREB



شکل ۴. بیان ژن MPK

Fig. 4. Gene expression of MPK

ژن MPK در اندام‌های مختلف گل شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگ بیان می‌شود. بررسی بیان این ژن در این سه اندام، زعفران ایرانی (تربت‌حیدریه) نشان داد که تفاوت بیان در حلقه‌های گل نیز بارز است. بسیاری از متابولیت‌ها در مرحله نمو گل تولید می‌شوند، و ژن‌های مختلف مرتبط با توسعه گل و تمایزیابی اندام‌های گل که در کلاس‌های A، B، C و E دسته‌بندی می‌شوند، می‌توانند با ژن MPK در ارتباط بوده به شکلی که در آغاز گلدهی و تمایز اندام‌ها دخیل می‌باشند (Jodeir & Dehghan; Yousefi Javan & Gharari, 2017; Nayeri, 2016).

بر اساس نتایج این مطالعه، هر سه ژن فوق در اکثر اندام‌های رویشی زعفران بیان می‌شوند و به نظر می‌رسد که این ژن‌ها دارای اثری متقابل نسبت به یکدیگر دارند. اثر این سه ژن بر روی یکدیگر نشان داد که در شرایط خشکی، بیش‌ترین تحمل به تنش را، اندام برگ این گیاه نشان می‌دهد.

در مطالعات دیگر گیاهان، کاهش بیان ژن‌های مذکور این گیاهان در شرایط تنش خشکی مشاهده شده است (Ren et al., 2012). علت این عدم انطباق در بعضی از گزارش‌ها می‌تواند گونه و اکوتیپ گیاه، طول دوره و شدت

تنش، مرحله، بافت و شرایط رشدی متفاوت و شیوه متفاوت بررسی بیان ژن باشد.

حضور ژن‌های AREB/ABF و DREB/CBF و میزان بیان این ژن‌ها توسط زندکریمی و همکاران (Zandkarimi et al., 2015) بر روی گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) مورد ارزیابی قرار گرفت که طی آن مشخص شد که ژن‌های فوق در تمامی اندام‌های زایشی و رویشی انگور حضور دارند، ولی برای سنتز نمودن پروتئین‌های خود، مستلزم افزایش تنش خشکی بوده، گویا با افزایش میزان تنش خشکی، ژن‌های فوق جهت ایجاد مقاومت بیان می‌شوند.

مطالعات ساختار پروتئینی ژن‌های فوق و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، نشان داد که پروتئین‌های بیان شده، حاصل این ژن‌ها، به ترتیب دارای ۳۶۶، ۱۶۶ و ۳۱۵ اسیدآمینه می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌های فوق با کمک ابزارهای پایگاه Expasy برای پروتئین بیان‌شده از ژن AREB، ۷۷/۷ و kDa ۳۸۳۸۳/۹۳، برای پروتئین بیان‌شده از ژن DREB، ۴/۲۰ و kDa ۱۷۳۳۲/۹۴ و نهایتاً برای پروتئین بیان‌شده از ژن MPK، ۱۱/۳۰ و kDa ۳۶۰۲۸/۲۱ محاسبه شدند.

فرمول اتمی این پروتئین‌ها عبارت است از:

$C_{1653}H_{2643}N_{493}O_{534}S_{13}$ برای LEAREB،

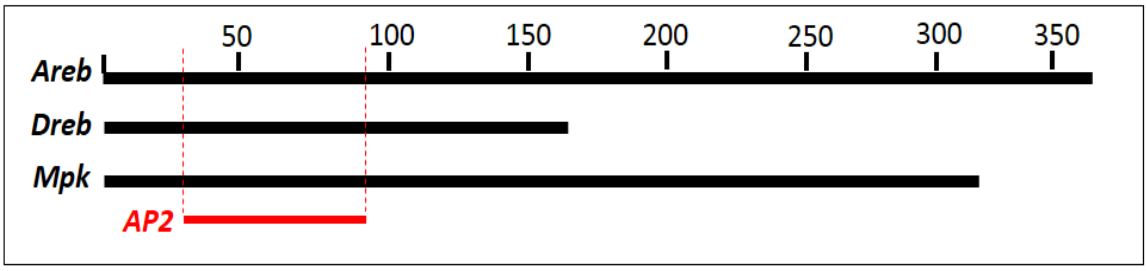
$C_{755}H_{1162}N_{206}O_{257}S_{3}$، برای DREB و

$C_{1620}H_{2667}N_{461}O_{418}S_{23}$ برای MPK.

خواص عملکردی پروتئین‌ها به میزان زیادی، از چگونگی ساختار آن‌ها منشأ می‌گیرد و شکل فضایی بخش‌های متفاوت هر پروتئین، در واقع تعیین‌کنندهٔ کاربرد و عملکرد ویژهٔ همان بخش از پروتئین بوده و هر نوع تغییری در این ساختار می‌تواند موجب اخلال در عملکرد آن شود. حضور ناحیه AP_2 دومین در هر سه ژن اثبات نمود، که ژن‌های مذکور دارای نواحی مشترکی بوده. ناحیه AP_2 در توالی جداسازی شده حاوی سه زنجیره از صفحات بتا و یک زنجیره از آلفا هلیکس می‌باشد و اسیدآمینه والین در موقعیت ۱۴ و اسیدآمینه گلوتامیک در موقعیت ۱۹ آن قرار دارند که نقش مهمی در تشخیص توالی متصل شونده به DNA را ایفاء می‌کند (Karimi Andeani et al., 2011).

توالی آمینواسید به دست آمده از cDNA ژن‌های AREB، DREB و MPK زعفران مورد مطالعه نیز نشان داد که منطقه مشترک فوق تمامی مشخصات منطقه AP_2 را داشته، همچنین در این ساختار رندوم کویل‌هایی نیز مشاهده گردید که به‌عنوان لوپ‌های بینابینی از آن‌ها نام برده می‌شود. با بررسی در بانک ژنی آرابیدوپسیس ۱۴۵ ژن کدکننده پروتئین‌های دارای ناحیه AP_2 یافته شد. بر این اساس ۱۴ ژن دارای دو ناحیه AP_2 و ۱۳۱ ژن دارای یک ناحیه AP_2 بودند که ۵۶ ژن از آن، پروتئین‌های زیر خانواده DREB را کد می‌کنند (Sakuma et al., 2002).

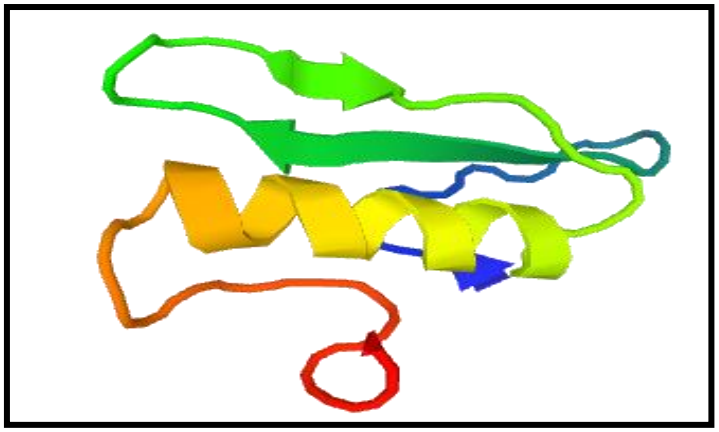
فرض بر این است که انتقال جانبی ژن‌های سیانوباکترها و ویروس‌ها از طریق پدیده همزیستی داخلی به گیاهان صورت گرفته و منشأ تشکیل خانواده بزرگ عوامل رونویسی دارای ناحیه AP_2 شده است. سپس در گیاهان از طریق پدیده‌های مختلفی چون حذف یا اضافه شدن اینترون‌ها و اگزون‌ها و جابجایی و یا طرق دیگر اعضای مختلف و زیر خانواده‌های گوناگون این خانواده بزرگ به وجود آمده‌اند (Magnani et al., 2004).



شکل ۵. حضور ناحیه AP_2 در توالی اسیدآمینه‌های AREB، DREB و MPK جداسازی شده از گیاه زعفران با استفاده از نرم‌افزار Expasy

Fig. 5. The presence of AP_2 region in the AREB, DREB and MPK amino acids sequence isolated from saffron using Expasy software

ساختار سه‌بعدی پروتئین از ناحیه AP_2 در توالی اسید آمینه AREB، DREB و MPK جداسازی شده از گیاه زعفران با استفاده از نرم‌افزار Protein Model Portal در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶. شکل فضایی و ساختار سه بعدی بخش اعظم پروتئین بیان‌شده از AP_2 برای مکان اسید آمینه‌های AREB، DREB و MPK

Fig. 6. Spatial shape and three-dimensional structure for the major part of expressed protein of AP_2 gene for place of AREB, DREB and MPK amino acids

زعفران از جمله گیاهان زراعی و ارزشمندی است که از جنبه‌های مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. از مهم‌ترین ویژگی‌های این گیاه تحمل بالای این گیاه به خشکی بوده، از طرفی، تنش‌های خشکی از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد گیاهان است.

از آنجا که تحمل به تنش‌های غیرزیستی صفتی کمی است و به‌وسیله تعداد زیادی از عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، انتقال تنها یک ژن عملکردی نمی‌تواند منجر به ایجاد تمامی تغییرات سلولی لازم جهت ایجاد تحمل به تنش شود. درحالی‌که شناسایی و انتقال ژن‌های تنظیمی به گیاهان متفاوت، می‌تواند منجر به القای چندین مسیر مؤثر در تحمل به تنش‌ها شده و تحمل گیاهان به تنش را افزایش می‌دهد.

از جمله تحقیقات صورت گرفته در ایران می‌توان به تکثیر سریع و انبوه بنه‌های سالم زعفران در شرایط آزمایشگاهی اشاره نمود (Vatanpour Azghandi et al., 2010). در تحقیق دیگری که توسط رضوانی و همکاران (Rezvani et al., 2014) صورت گرفت تأثیر هورمون اکسین و عنصر مس روی خصوصیات ظاهری ریشه و برگ زعفران مطالعه شده است. براساس نتایج این مطالعه اثر متقابل اکسین و مس باعث افزایش تعداد ریشه و وزن خشک برگ و ریشه می‌شود. در تحقیق حاضر نیز بیان ژن‌های AREB، DREB و MPK نیز در تشکیل بنه‌ها و برگ‌های زعفران و همچنین در تشکیل گل، به‌خصوص در تشکیل کلاله نقش بسزایی دارند. با روش PCR نیمه‌کمی در زعفران اکوتیت تربت‌حیدریه بررسی شد و میزان بیان این ژن‌ها در اندام‌های رویشی و زایشی مورد مقایسه قرارگرفت. نتایج حاصل از این تحقیق حضور ژن‌های AREB، DREB و MPK را در گیاه زعفران را برای اولین بار ثابت نمود. بیان ژن AREB درگیر در متابولیسم پروتئین AREB، در بنه‌ها و برگ‌های جوان زعفران در مطابقت با نتایج محققان بر روی دیگر گیاهان (Zandkarimi et al., 2015)، مشاهده گردید که این ژن در اندام‌های رویشی بیشتر بیان می‌گردد، و در مقایسه با دو ژن مقایسه‌ای دیگر، نیز از میزان بیان بالایی برخوردار است. نقش حمایتی و حفاظتی اساسی، ژن AREB از سلول‌ها و بافت‌های رویشی گیاه که در تمامی فصول سال در خاک باقی می‌مانند، به کمک پروموتورهای خود سبب تحمل و مقاومت به تنش‌های محیطی این گیاه می‌شود. از طرفی، هر یک از سه ژن فوق معرف بیان در اندامی از گیاه بوده که در هنگام حضور تنش خشکی، ژن AREB اندام‌های رویشی

گیاه را از تنش شکل محافظت می‌نماید و دو ژن DREB و MPK از اندام‌های زایشی گیاه محافظت می‌نماید.

تجمع اسیدآبسیزیک و پروتئین‌های کیناز تحت تنش اسمزی و دیگر فشارهای ناشی از تنش کم‌آبی ایجاد می‌گردد. وقوع تنش در اندام‌های رویشی از دو سطح بیوشیمیایی و ژنتیکی ناشی می‌شود، اگرچه تمامی تنش-های بوجود آمده از تنش خشکی در گیاه، ناشی از تجمع اسیدآبسیزیک نمی‌باشد. بیان شدن ژن‌های فوق در شرایط نرمال و استاندارد گیاه زعفران، این احتمال را رقم می‌زند، که چه در غیاب تنش و چه در حضور تنش همواره این ژن‌ها بیان می‌گردند و با افزایش میزان تنش خشکی (غلظت پلی‌اتیلن گلیکول)، میزان بیان شدن این ژن‌ها، به دلیل حضور فاکتورهای تحریک‌کننده از جمله پیشبرهای دائمی، افزایش می‌یابد. همان گونه که ذکر شد ABA به‌عنوان یک علامت یا سیگنال در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار دارند عمل می‌کند (Rahnama et al., 2014). نقش اصلی ABA در تنظیم بیان ژن‌هایی است که در داخل سلول تحت شرایط تنش اسمزی قرار می‌گیرند و در نهایت، باعث تنظیم شرایط اسمزی و تعادل آبی در سلول‌های محافظ سلول می‌شود (Choi et al., 2000).

پیشبر $Rd_{29}A$ حاوی حداقل دو نوع از عناصر فعال cis می‌باشد، یکی از این عناصر DRE است که در شرایط تنش دمای پایین و خشکی عمل می‌کند. تظاهر ژن DREB به وسیله دمای پایین و تجمع پروتئین‌های DREB را به دنبال دارد. و دیگر عنصر سیس فعال، ABRE می‌باشد، که این عنصر نیز از تجمع ABA تحت شرایط تنش کم‌آبی نقش ایفاء می‌کند و در نهایت؛ باعث فعال شدن ژن AREB می‌شود.

مقاومت به خشکی صفت پیچیده‌ای است که بروز آن بستگی به عمل و عکس‌العمل میان صفات مختلف مورفولوژیکی (زودرسی، کاهش سطح برگ، لوله‌ای شدن برگ، میزان موم، سیستم ریشه‌ای کارآمد، ریشک‌دار بودن، پایداری عملکرد و کاهش پنجه‌زنی)، فیزیولوژیکی (کاهش تعرق، افزایش راندمان مصرف آب، بسته شدن روزنه‌ها و تنظیم اسمزی)، و بیوشیمیایی (تجمع پرولین، پلی‌آمین، ترهالوز و غیره، افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها) دارد. مکانیزم‌های ژنتیکی کنترل‌کننده این صفات چندان شناخته شده نیستند.

شناسایی و انتقال ژن‌های مسئول بیوسنتز متابولیت‌های متعددی همچون پرولین، ترهالوز و پلی‌آمین‌ها از موجودات مختلف به گیاهان زراعی از طریق مهندسی ژنتیک به‌طور موفقیت‌آمیزی صورت گرفته است. فقدان یک رهیافت تلفیقی و روش‌های دقیق غربال کردن، دانش کم درباره اساس ژنتیکی مقاومت به خشکی، همبستگی منفی بین مقاومت به خشکی و عملکرد و نبود ژن‌های مناسب برای تولید گیاهان تراریخت از عوامل اصلی محدودکننده اصلاح ژنتیکی مقاومت به خشکی می‌باشند.

جستجو برای یافتن تنوع ژنتیکی وسیع در صفات مرتبط با مقاومت به خشکی نیز مانند انتقال هم‌زمان چندین ژن از طریق روش‌های اصلاحی متداول یا مهندسی ژنتیک، استفاده از تکنیک RNA ناهمسو، ارزیابی پلی-پپتیدهای القاء شده در شرایط تنش خشکی و استفاده از یک رهیافت تلفیقی، می‌تواند کمک شایانی جهت تسهیل بررسی دقیق‌تر این صفت پلی‌روپی گردد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، پیشرفت در زمینه به‌نژادی گیاهان را برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی متکی به فهم روشن مسیرهای القای تحمل به تنش‌ها و تراریختی پایدار گیاهان با استفاده از ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش‌ها می‌باشد. با توجه به جایگاه مهم این گیاه قهرمان خشکی، استراتژیک بودن این محصول و قرار گرفتن کشور در کمربند خشکی، نتایج این پژوهش می‌تواند به نقشی ارزنده در بهبود گیاهان و تحمل به تنش‌ها مؤثر واقع گردد. اگرچه گزارشات دیگری در این زمینه برای سایر صفات و سایر ژن‌ها وجود دارد، ولی تحقیقات بیشتری لازم است تا کنترل ژنتیکی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مؤثر در مقاومت به خشکی روشن‌تر شود.

منابع

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

Amiri Oghan, H., Moghadam, M., Ahmadi, M.R., Valizadeh, M., and Shakiba, M.R., 2002. Heritability of seed yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus*) under drought stress and normal conditions. Seed Plant. 18, 179-199. [in Persian with English Summary].

Bayoumil, T.Y., Manal, H.E., and Metwali, E.M., 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. African J. Biotech. 7(14), 2341-2352.

Bery, E.A., 2007. Molecular and Physiological Responses to Water Deficit Stress. Department of Genetics and Cell Biology, University of Chicago, USA.

Bray, E., 1997. Plant responses to water deficit. Trend Plant Sci. 2, 48-54.

Campalans, A., Messeguer, R., Goday, A., and Pagès, M., 1999. Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. Plant Physiol. Bioch. 37, 1-14.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. J. Biol. Chem. 275, 1723-1730.

De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H., and Zhang, H., 2003 An abscisic acid- sensitive heckpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. Plant J. 33, 543-555.

Dhar, A.K., Sapru, R., and Rekha, K., 1998. Studies in saffron in Kashmir. J. Crop Improv. 15(1), 48-52.

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., and Seki, M., 2005. *AREB*$_1$ is a transcription activator of novel *ABRE*-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 17, 3470-3488.

Gray W.M., 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. PLOS Biol. 2(9), 3-11.

Hossain, M.A., Cho, J.I., Han, M., Ahn, C.H., Jeon, J.S., and An, G., 2010. The *ABRE* binding *bZIP* transcription factor *OsABF*$_2$ is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. J. Plant Physiol. 167, (15)12-20.

Jodeir, S., and Dehghan Nayeri, F., 2016. Study of expression of the MADS-box transcription factors involved in flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Cell. Mol. Res. 4(28), 488-499.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., Mc Ginnis, S., and Madden, T.L., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res. 36(2), 5-9.

Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., and Kim, S.Y., 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. Plant Cell. 14, 343-357.

Karimi Andeani, J., Mohsenzadeh, S., and Mohabatkar, H., 2011. Study of dehydration-responsive element binding-factor gene in some Iranian bread wheat cultivars. Iran. J. Plant Biol. 69-76. [in Persian with English Summary].

Khashei Siuki, A., Hashemi, S.R., and Ahmadee, M., 2015. The effect of pottasic zeolite and irrigation scheduling on saffron yield. Reserch Project in University of Birjand, Iran. [in Persian with English Summary].

Magnani, E., lander, K., and Hakea, S., 2004. Rom endonucleases to transcription factors: Evolution of the *AP*$_2$ DNA binding domain in plants. Plant Cell. 16, 2265-2277.

Menzel, A., and Fabian, P., 1999. Growing season extended in Europe. Nature. 397, 659.

Mohammad Hashem, F., Nikpour, P., and Emadi-Baygi, M., 2011. Evaluation and optimization of various procedures of RNA extraction from human frozen tissues. J. Isfahan Medical School. 29(133), 327-335. [in Persian with English Summary].

Molina, R. V., Valero, M., Navarro, Y., García-Luis, A., and Guardiola, L., 2003. Low temperature storage of corms extends the

flowering season of saffron (*Crocus sativus* L.). J. Hort. Sci. Biotechnol. 80, 319-326.

Navabpor, S., 2013. Induced genes expression pattern inresponse to drought stress in repeseed (*Brassica napus*). Seed Plant. 29(3), 535-549.

Pagter, M., Bragato, C., and Brix, H., 2005 Tolerance and physiological responses of Phragmites australis to water deficit. Aquat. Bot. 81, 285-299.

Pazoki, A., Kariminejad, M., and Foladi Targhi, A., 2013. Effect of planting patterns on yield and some agronomical traits in saffron (*Crocus sativus* L.) under different irrigation intervals in Shahr-e-Rey region. Intl. J. Farm & Alli. Sci. 2(S2), 1363-1368.

Rahmati, E., 2003. The function of environmental factors in production and function of saffron, Articles collection of the third national congress of saffron, The publishing house of Khorasan Research Organisation for Science & Technology, pp. 146-151. [in Persian with English summary].

Rahnama., H., and Vakilian, H., 2014. Cloning and functional analysis of inducible promoter $Rd_{29}A$ in transgenic tobacco plants. Mol. Cell Res. 26(4), 480-490.

Rohi, M., Amirshekari, H., and Kordenaeej, A., 2014. Effect of corm density and watermelon sowing date as live mulchon quantitative and qualitative yield of saffron (*Crocus sativus* L.). J. Crop Prod. Res. 6(1), 1-17.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002. DNA-binding specificity of the *ERF*/AP_2 domain of *Arabidopsis DREBs*, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 998-1009.

Sambrook, J., and Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1, 6-28.

Shao, H.B., Liang, M.A., Shao, M.A., and Wang, B.C., 2005. Changes of some physiological and biochemical indices for soil water deficits 10 wheat (*Triticum aestivum*) genotypes at seedling stage. Colloids Surf. B. Biointerfaces. 42(2), 107-113.

Rezvani, N., Sorooshzadeh, A., and Sharifi, M., 2014. Effects of auxin and copper on growth of saffron. J. Plant Biol. 6(19), 143-157. [in Persian with English Summary].

Shokohi, M., Ghobadi, S., and Sayed Tabatabai, B.A., 2015. Identification and isolation of induction inductor $rd_{29}A$ from *Arabidopsis thaliana* plants and evaluation of its performance in Transformation Plant. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [in Persian].

Takahashi, F., Ichimura, K., Shinozaki, K.S., and Hirasu, K., 2009. Plant mitogen activated protein kinase cascades in signaling crosstalk. Signal cross talk in plant stress responses. K. Yoshioka and K. Shinozaki. England, Wiley Blackwell, Oxford. 136, 23-42.

Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 571-599.

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involve in abscisic acid dependent signal transduction pathway under drought and high salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 97, 11632-11637.

Varjonen, E., Vainio, E., Kalimo, K., and Juntunen-Backman, K., 2002. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. Biochem. Soc. Trans. 30(6), 910-913.

Vatanpour Azghandi, A., Saboora, A., and Rajabpoor, S., 2010. Changes in exogenous hormone concentration and its effect on somatic embryo maturation and microcorm formation of saffron (*Crocus sativus* L.). Iran. J. Plant Biol. 3(8), 41-58. [in Persian with English Summary].

Wilkinson, S., and Davies, W.J., 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant Cell Environ. 25(2), 195-210.

Yousefi Javan, I., and Gharari, F., 2017. The structure of the protein and gene expression of PIC_2 affecting blooming flowers (*Crocus sativus* L.). J. Saffron Agron. & Technol. 5(1), 73-90. [in Persian with English Summary].

Zandkarimi, H., Ebadi, A., Salami, S.A., Houshang Alizade, H., and Baisakh, N., 2015. Analyzing the expression profile of *AREB*/*ABF* and *DREB*/*CBF* genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.). POLIS ONE. 10(7), 1-16.

Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53, 247-273.

Journal of Saffron Research (semi-annual)
Vol.6, No.2, Fall & Winter, 2018-2019
p. 251-267
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2018.857.1037

University of Birjand

Extraction and Isolation of Three Genes of Saffron (*Crocus sativus* L.) such as AREB, DREB and MPK to Drought Resistance

Iman Yousefi Javan[1*] and Faezeh Gharari[2]
1-Assistant Professor, Plant Production Department, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran.
(ORCID ID: 0000-0001-6906-8626; phone: +98-51-51240177)
2- M.Sc., Agricultural Engineering, and Expert Research at University of Torbat Heydarieh
*Corresponding author E-mail: I.javan@torbath.ac.ir

Received 25 July 2017; Accepted 11 June 2018

Abstract
Among environmental stresses, drought stress is one of the main stresses around the world. To mitigate the effects of environmental stresses, it is important to find genotypes that have genes and desirable traits. To this porpose, one of the most important objectives was to understand the molecular mechanisms associated with drought resistance in plants. With recent advances in molecular genetics, hundreds of genes that were induced by stress had been identified and used as gene candidates for genetic engineering. Saffron is a plant that grows in arid and semi-arid regions, and unlike many plants, it is a heroine with a different heat regime. The presence of numerous genes to deal with drought stress limitations in this plant could be investigated. By recognizing the genes involved in creating drought resistance and selecting suitable native varieties, saffron can produce relatively similar crops in most areas with different climatic conditions. In this study, the presence of AREB, DREB and MPK genes in saffron was proved for the first time. The patterns of expression of these key genes were investigated using Real Time-PCR technique in different tissues of saffron plant. Drought stresses were increased the expression of these genes. This increase in expression in plant and reproductive tissues was different, which may increase the final product of these genes and its resistance to drought. Their expression also had a correlation and mutual influence over each other. The protein structure of these genes had 366, 166, and 315 amino acids, respectively, which by examining this structure, the presence of a region of common acid in them, showed the coexistence of these three genes.

Keywords: AREB, DREB, Gene expression, MPK, Real Time-PCR