

## ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه جهش یافته *dreb2a* در مقایسه با *dreb1a* در شرایط طبیعی

سمیه کهساری<sup>۱</sup>، محمدباقر باقریه نجار<sup>۱\*</sup>، حمیدرضا صادقی پور<sup>۱</sup> و عیسی کهن باغخیراتی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، <sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۲۸)

### چکیده

فاکتورهای رونویسی DREB یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان هستند که تصور می‌شود عملکردهای تنظیمی مهمی در تحمل به تنش محیطی ایفا می‌کنند، ولی اطلاعات کاملی در مورد نقش آنها در کنترل ویژگی‌های مورفولوژیکی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان رشد یافته تحت شرایط طبیعی وجود ندارد. در این مطالعه، برخی ویژگی‌های فنوتیپی گیاهان آراییدوپسیس جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* در مقایسه با گیاه وحشی، تحت شرایط رشدی طبیعی مقایسه شد. بیشتر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در گیاهان جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* مشابه هم و متفاوت با گیاه وحشی بود. ظهور ریشه‌چه و لپه‌ها در هر دو لاین جهش یافته سریع‌تر از لاین وحشی مشاهده شد، اما جوانه گلزا (bolting) با تأخیر تشکیل شد. شاخه‌های جانبی تشکیل شده روی گل‌آذین در لاین‌های جهش یافته ۲۵٪ کمتر از لاین وحشی ولی شاخه‌های جانبی کنار گل‌آذین ۲۰٪ بیشتر از گیاه وحشی بود. هر دو لاین جهش یافته در مقایسه با لاین وحشی در تعداد کل خورجین در گیاه (حدود ۱۰٪)، تعداد کل بذر به‌ازای هر گیاه (حدود ۴۰٪) و وزن کل بذر در گیاه (حدود ۱۳٪) افزایش نشان دادند، درحالی‌که محتوای پروتئین محلول بذر و نسبت کروسیفین / ناپین در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی کمتر بود. قابل توجه اینکه، در دانهال ۱۴ روزه و برگ‌های گیاه در مرحله زایشی، در دو لاین جهش یافته در مقایسه با لاین وحشی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز به‌طور متوسط ۳۵٪ و هیدروژن پراکسید به‌طور متوسط ۷۰٪ بیشتر بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه، در کنترل ویژگی‌های مورفولوژیکی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان رشد یافته تحت شرایط طبیعی نقش اساسی ایفا می‌کنند و مطالعه مراحل آبخاری انتقال سیگنال مدیریت شده توسط فاکتورهای رونویسی خانواده DREB می‌تواند راه‌گشای درک عمیق‌تری از مکانیسم پاسخ این گیاهان به تنش‌های متنوع محیطی باشد.

کلمات کلیدی: آراییدوپسیس تالیانا، تنش‌های محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فاکتورهای رونویسی، جهش یافته‌های *dreb*

### مقدمه

تولید بسیاری از محصولات زراعی می‌شوند، مطالعه پاسخ گیاهان به آنها برای پژوهشگران حائز اهمیت است. با توجه به آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم، ژن‌های دخیل در پاسخ گیاهان به تنش خشکی پروتئین‌های مختلفی را کد می‌کنند (Seki et al.,

گیاهان طی چرخه زندگی طبیعی خود همواره با طیف وسیعی از تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری و تغییرات دمایی مواجه می‌شوند. از آنجایی‌که این تنش‌ها منجر به کاهش شدید

(Dubouzet *et al.*, 2003)، گندم (Jaglo *et al.*, 2001) و سیبزمینی (Bouaziz *et al.*, 2015) شناسایی شده و به نظر می‌رسد در گیاهان عالی حفاظت شده هستند. این خانواده در آراییدوپسیس شامل دو گروه *DREB1* و *DREB2* می‌شود. گروه ژنی *DREB1* در آراییدوپسیس شش عضو دارد که در این میان ژنهای (At4g25480) *DREB1A/CBF3* و (At4g25490) *DREB1B/CBF1* و (At4g25470) *DREB1C/CBF2* در ژنوم آراییدوپسیس به صورت پشت سر هم روی کروموزوم شماره چهار قرار گرفته‌اند (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994) و نقش حیاتی آنها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نظیر سرما، شوری و خشکی به اثبات رسیده است (Agarwal *et al.*, 2006). بیش‌بینی اعضای خانواده *DREB1/CBF*، منجر به تأخیر رشد (Sakuma *et al.*, 2006a) و بهبود تحمل یخ‌زدگی، خشکی و شوری بالا در لاین تراریخت آراییدوپسیس می‌گردد (Kasuga *et al.*, 1999). جهش در ژن *drebl1a* باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود (Kohan *et al.*, 2018). گروه ژنی *DREB2* در آراییدوپسیس هشت عضو دارد که مسیرهای سیگنالینگ پاسخ‌دهنده به گرما، خشکی و شوری را تنظیم می‌کنند و در این میان، (At3g11020) *DREB2B* و (At5g05410) *DREB2A* بسیار به هم شبیه‌اند. بیش‌بینی *DREB2A*، منجر به تأخیر رشد (Sakuma *et al.*, 2006a) و افزایش بیان ژن‌های القاپذیر با شوک گرمایی یا دهیدراتاسیون شده و تحمل گیاه به خشکی، شوری و شوک گرمایی را در آراییدوپسیس بهبود می‌بخشد (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2006b). نتایج مطالعات Sakuma و همکاران (2006b) بر روی لاین جهش‌یافته *drebl2a* نشان داد جهش‌یافته‌های فوق تحت تنش گرما از قدرت زنده‌مانی کمتری برخوردارند. لیکن در خصوص ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از اثرات نقصان ژن *DREB2A* در گیاهان رشدیافته تحت شرایط طبیعی اطلاع جامعی در دست نیست. لذا در این پژوهش خصوصیات دقیق فنوتیپی از قبیل جوانه‌زنی، طول ریشه و مراحل رشدی بذر تا بذر و همچنین وضعیت ROS و

برخی از آنها پروتئین‌هایی هستند که سلول‌ها را از اثرات تنش آب محافظت می‌کنند. از این گروه می‌توان به محافظت‌کننده‌های اسمزی، پروتئین‌های کانال آبی و ناقل‌های غشایی، پروتئین‌های محافظت‌کننده و پایدارکننده ساختارهای سلولی و پروتئین‌های برطرف‌کننده آسیب‌های ناشی از فرم‌های فعال اکسیژن (ROS) و پروتئین‌های محافظت‌کننده ماکرومولکول‌ها از جمله پروتئین‌های (Late embryogenesis) LEA (abundant)، چپرون‌ها و غیره اشاره کرد (Cushman and Bohnert, 2000). گروه دیگر پروتئین‌های تنظیمی هستند که در تنظیم ترانس‌اسیون علامت تنش و تعدیل بیان ژن‌های دیگر نقش دارند و شامل فاکتورهای رونویسی متنوعی از قبیل myeloblastosis, myelocytomatosis oncogene (MYC) و basic leucine zipper (bZIP), oncogene (MYB) و dehydration responsive element binding (DREB) می‌شوند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). در ژنوم گیاه مدل آراییدوپسیس تالیانا نزدیک به ۱۵۰۰ فاکتور رونویسی گزارش شده است که تصور می‌شود در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش دخیل هستند (Riechmann *et al.*, 2000)، که حدود ۶ درصد پروتئوم گیاه را به خود اختصاص داده است (Joshi *et al.*, 2016). از جمله این فاکتورهای رونویسی، اعضای ابرخانواده AP2 (APETALA2) هستند که براساس تعداد تکرار و توالی دمین ۵۰-۷۰ آمینواسیدی AP2/ERF موجود در توالی آنها توصیف می‌شوند. این ابرخانواده در آراییدوپسیس ۱۴۵ عضو دارد که در خانواده‌های DREB, ERF, AP2 و RAV طبقه‌بندی می‌شوند (Nakano *et al.*, 2006). فاکتورهای رونویسی خانواده DREB پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که به‌طور اختصاصی به توالی (A/GCCGAC) DRE/CRT موجود در پروموتور برخی ژن‌های دخیل در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی از جمله گرما، سرما، خشکی و شوری متصل شده و بیان آنها را از طریق مسیرهای وابسته به ABA و مستقل از آن فعال می‌کنند (Lata and Prasad, 2011). ژن‌های خانواده *DREB* در آراییدوپسیس (Sakuma *et al.*, 2002)، جو (Choi *et al.*, 2002)، برنج

Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *DREB1A* و پرایمرهای T-DNA شرح داده شده است.

**آنالیز فنوتیپی گیاه جهش‌یافته:** آنالیزهای فنوتیپی در محیط‌کشت درون شیشه و گلدان جی‌فی در اطاقک رشد در دانشگاه گلستان در طول سال ۱۳۹۶ انجام شد. در هر پلیت ۴۰ بذر در سه تکرار و در هر گلدان ۵ بذر در ۱۰ تکرار استفاده شد (بذرهای مورد استفاده از کشت سه لاین در شرایط زمانی و مکانی یکسان به دست آمدند). در کشت گلدان، بعد از حدود یک هفته، در هر گلدان نهایتاً یک گیاه نگهداری شد. شاخص‌های نموی و مراحل رشد سه لاین آراییدوپسیس در محیط‌کشت درون شیشه و گلدان جی‌فی براساس استاندارد تعریف‌شده توسط (Boyes et al., 2001) (جدول ۲) آنالیز شد. برای گیاهان رشدیافته در محیط درون شیشه (محیط‌کشت MS) مراحل نموی تا مرحله ۱/۰۴ و برای گیاهان رشدیافته در گلدان مراحل نموی ۱/۰۲ تا مرحله ۸/۰۰ ثبت شد.

جهت بررسی طول ریشه در روز سوم بعد از جوانه‌زنی نوک ریشه‌ها را علامت زده و بعد از گذشت ۱۰ روز محل نوک ریشه دوباره علامت‌گذاری شد. تصویر پلیت‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال تهیه گردید. نهایتاً حد فاصل بین دو علامت‌گذاری روی پلیت با نرم‌افزار *image j* (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) اندازه‌گیری شده و به‌عنوان میزان رشد طولی نسبی ریشه در ۱۰ روز گزارش شد.

**سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول:** مقدار ۰/۰۵ گرم بافت تر (دانها و برگ در مرحله زایشی) در هاون چینی سرد با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک ۱۰۰ میلی‌مولار با  $\text{pH}=7/8$  مطابق روش (Kar and Mishra, 1976) هموژن گردید. هموژن حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۳۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از روش‌ها برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز براساس میزان مهار احیای نوری نیتروبلوترازولیوم توسط ریپوفلاوین در طول موج

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لاین‌های جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* در شرایط طبیعی با گیاه وحشی مقایسه گردید.

#### مواد و روش‌ها

**شرایط رشد گیاه:** بذرهای آراییدوپسیس تالیانا واریته کلمبیا (Col-0) شامل لاین وحشی و لاین جهش‌یافته حاوی T-DNA وارد شده در تنها آگرون ژن *DREB2A* (شماره دسترسی N436350) و لاین جهش‌یافته حاوی T-DNA وارد شده در جایگاه پروموتوری ژن *DREB1A* (شماره دسترسی N413033) از مجموعه ذخیره بذر ناتینگهام (NASC) در کشور انگلستان خریداری شد. از آنجایی که استوک‌های بذری خریداری‌شده مخلوطی از لاین‌های وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت بودند، لاین هموزیگوت با استفاده از غربالگری با نشانگرهای مولکولی جداسازی شد. بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۷ دقیقه و سپس با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. پس از ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل، و پس از مدت ۳ روز سرمادهی مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی پتری‌دیش‌های حاوی آگار و محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) و یا گلدان جی‌فی (The Jiffy company-Nederlands) کشت شده و به اطاقک رشد با تناوب نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۰-۵۰ درصد منتقل شدند.

**استخراج DNA و جداسازی لاین جهش‌یافته:** استخراج DNA گیاهچه‌های ۴ تا ۵ هفته‌ای با استفاده از پروتکل (Kasajima et al., 2004) به شرح زیر انجام شد. در این روش از بافر استخراج حاوی NaCl ۲۵۰ میلی‌مولار، Tris ۲۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۲۵ میلی‌مولار با  $\text{pH}=5/7$  و استات پتاسیم ۳ مولار استفاده شد. غربالگری لاین‌های جهش‌یافته از طریق واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن *DREB2A* (با نرم‌افزار پرایمر 3 [WWW.PRIMER3.COM](http://WWW.PRIMER3.COM)) و پرایمرهای معرفی‌شده برای T-DNA (جدول ۱) انجام گردید. مراحل جداسازی لاین جهش‌یافته *dreb1a* قبلاً توسط Kohan-

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده

نام	توالی پرایمرها (5'-3')
(At5g05410) <i>DREB2A</i>	F: GCTTCTTGAGCAGTAGGGAAAGTA R: CGAAAAAGCTACACACAAGAAGA
(At4g25480) <i>DREB1A</i>	F: TTTCCGCCAAAACACTACTTG R: CAAAAGAAAAGGCGAAGACG
T-DNA	F: ATATTGACCATCATACTCATTGC R: GTGGATTGATGTGATATCTCC

جدول ۲- شاخص‌های نموی و مراحل رشد در گیاهان رشد یافته در محیط کشت درون شیشه و گلدان

مراحل رشد درون شیشه	توصیف	مراحل رشد در گلدان	توصیف
۰/۱	آبنوشی بذر	۱/۰۲	۲ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی متر
۰/۵	خروج ریشه چه	۱/۱۴	۱۴ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی متر
۰/۷	خروج هیپوکوتیل	۵/۱۰	ظهور اولین جوانه ساقه گل‌زا
۱/۰۰	بازشدن کامل لپه‌ها	۶/۰۰	بازشدن اولین گل
۱/۰۲	۲ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی متر	۶/۰۹	پایان گلدهی
۱/۰۴	۴ برگ روزت بزرگتر از ۱ میلی متر	۸/۰۰	بازشدن اولین خورجین

تیوکلوو استیک اسید ۰/۱ درصد مطابق روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷)، کاملاً به صورت هموزن در آمده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. روشناور حاصل برای سنجش هیدروژن پراکسید استفاده شد.

برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید طبق روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷)، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از روشناور به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) اضافه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از مخلوط یدید پتاسیم ۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار که به صورت تازه تهیه شد، به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۱ ساعت شدت رنگ تشکیل شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج پروتئین از بذر: ۰/۱ گرم بذر گیاهان در ازت مایع با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) پودر شده و بعد از هموزن شدن، ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول و ۱۰ میکرولیتر phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) اضافه شد. مخلوط حاصله به میکروتیوب منتقل شده و در

۵۶۰ نانومتر در حالت فتومتریک دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) اندازه‌گیری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر حاوی ۲۵۰/۲ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=۷/۸)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (۰/۶۶ میلی‌مولار)، ۳۰۰ میکرولیتر متینین (۱۰ میلی‌مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر NBT (۶۶ میکرومولار)، ۵۰ میکرولیتر ریبوفلاوین (۳/۳۵ میکرومولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول طبق روش (Chance and Maehly, 1955) در طول موج ۴۷۰ نانومتر در حالت کینتیک اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800) و ضریب خاموشی  $26/6 \text{ L.mmol.cm}^{-1}$  اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل ۲۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH=۷/۸ و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید: ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه (دانها و برگ در مرحله زایشی) با ۶۰۰ میکرولیتر محلول

در ژن *DREB* بر روی قدرت جوانه‌زنی در محیط MS انجام شد. درصد جوانه‌زنی نهایی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل A-۲)، لیکن T50 که نشان‌دهنده مدت زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی است، در دو لاین جهش‌یافته به‌طور متوسط ۵۲ درصد کمتر از لاین وحشی بود. این نتایج بیانگر زنده‌مانی مشابه بین سه لاین مورد آزمایش، ولی بالاتر بودن قدرت بذر در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی است (شکل B-۲). Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند لاین جهش‌یافته‌های یگانه و دوگانه در ژن‌های *DREB1* تفاوت معنی‌داری با لاین وحشی در درصد جوانه‌زنی نداشتند، لیکن درصد جوانه‌زنی در جهش سه‌گانه ژن‌های *DREB1* به‌طور معنی‌داری کمتر از لاین وحشی بود که نتیجه این مطالعه در رابطه با جهش‌یافته *dreb1a* را تأیید می‌کند، هر چند نتیجه مربوط به جهش‌یافته *dreb2a* برای اولین بار گزارش می‌شود. از طرفی مطالعات Kohan-Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) حاکی از این است که جوانه‌زنی *dreb1a* کاهش یافته است که این تفاوت می‌تواند با قدرت بذر و شرایط نگهداری بذر مرتبط باشد. این نتایج نشان می‌دهد احتمالاً همولوگ‌های دیگر این دو ژن (*DREB1A* و *DREB2A*) می‌تواند نقش این دو ژن در کنترل درصد نهایی جوانه‌زنی را پوشش دهند.

#### تأثیر نقصان بیان ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر مراحل

دانهال ۱۴ روزه: بررسی دقیق‌تر فرآیند رشد دانهال این سه لاین در محیط MS نشان داد هر چند رشد دانهال‌ها از روز سوم به بعد روند مشابهی داشت و طول ریشه در گیاهان جهش‌یافته با طول ریشه در گیاهان وحشی تفاوت معنی‌داری نداشت، سرعت ظهور ریشه‌چه (مرحله ۰/۵) و بازشدن لپه‌ها (مرحله ۱/۰۰) در دو لاین جهش‌یافته نسبت به لاین وحشی بیشتر بود (شکل ۳).

تا آنجا که نویسندگان اطلاع دارند تاکنون مطلبی در رابطه با بررسی فنوتیپی در مرحله دانهال لاین *dreb2a* چاپ نشده است. نتایج مربوط به کار ما نشان داد که دو لاین جهش‌یافته در مقایسه با لاین وحشی فنوتیپ تسریع در ظهور ریشه‌چه و

شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از روش‌های سنجش پروتئین محلول با روش (Bradford, 1976) استفاده گردید.

#### جداسازی پروتئین‌ها توسط الکتروفورز ژل پلی‌آکریل

آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیائی در یک سیستم ژل ناپیوسته با غلظت آکریل آمید ۱۲/۵٪ مطابق روش (Fling and Gregerson, 1986) انجام شد و تصویر با کمک دستگاه Gel Doc تهیه شد.

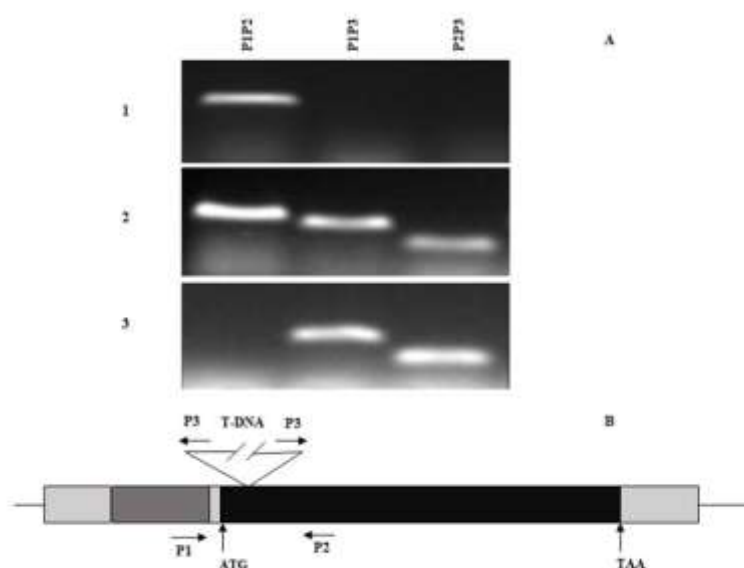
#### آنالیزهای آماری: به‌منظور آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از Excel استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ استفاده گردید.

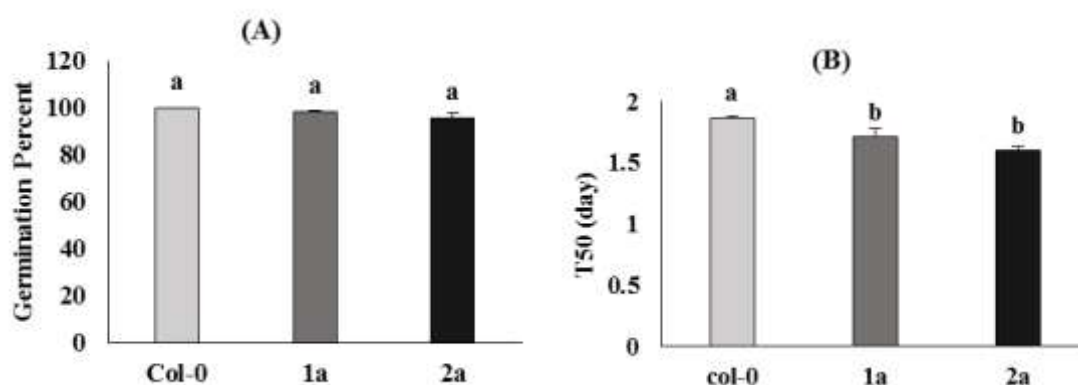
#### نتایج و بحث

جداسازی جهش‌یافته *dreb2a*: T-DNA وارد شده در لوکوس ژن *DREB2A* از طریق واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *DREB2A* و T-DNA ردیابی شد (شکل A-۱). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، گیاهی که در آن قطعه مورد نظر با پرایمرهای P1P2 تکثیر شد ولی با پرایمرهای P1P3 و P2P3 تکثیر نشد، به‌عنوان لاین وحشی در نظر گرفته شد (لاین شماره یک در شکل A-۱)، گیاهی که در آن قطعه مربوط به ژن *DREB2A* با پرایمرهای P1P2 تکثیر نشد ولی با پرایمرهای P1P3 و P2P3 تکثیر شد، به‌عنوان لاین جهش‌یافته هموزیگوت در نظر گرفته شد (لاین شماره سه در شکل A-۱) و گیاهی که قطعه مورد نظر با پرایمرهای ژن *DREB2A* و T-DNA تکثیر شد، به‌عنوان لاین جهش‌یافته هتروزیگوت در نظر گرفته شد (لاین شماره دو در شکل A-۱). محل دقیق ورود T-DNA در این لاین در محل ۴۶۸ جفت باز در ناحیه شروع رونویسی ژن و در ناحیه آگزون ژن *DREB2A* است (شکل B-۱).

با توجه به اینکه اطلاعات کمی در رابطه با نقش پروتئین‌های DREB در جوانه‌زنی دانه وجود دارد، اثر جهش



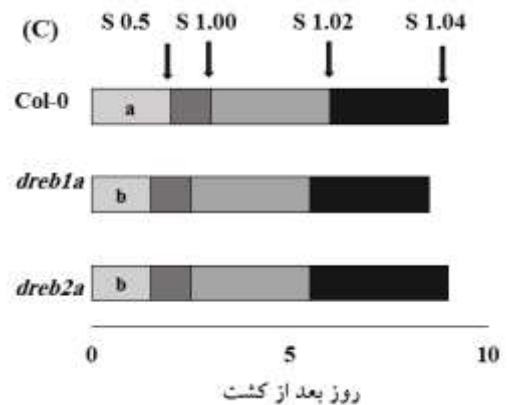
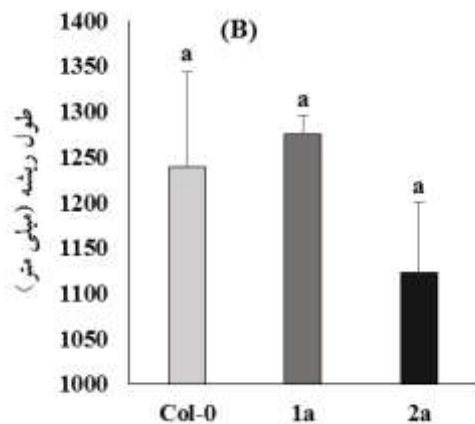
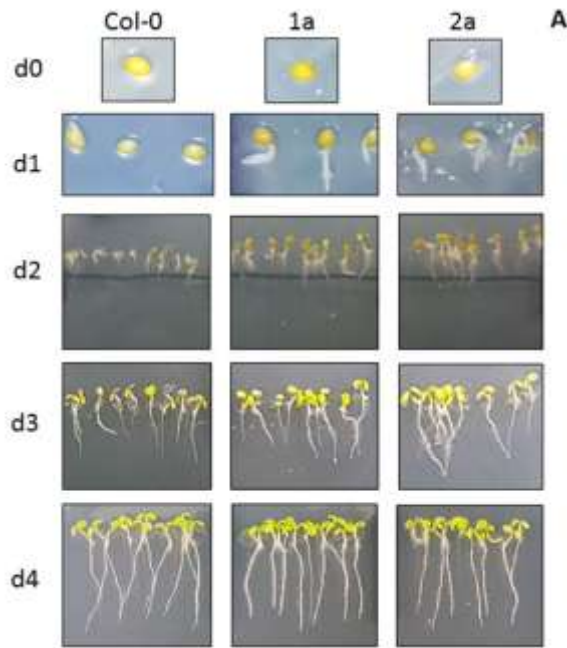
شکل ۱- A) شناسایی لاین هموزیگوت جهش یافته *dreb2a* نتایج واکنش PCR با ترکیب پرایمرهای اختصاصی ژن و T-DNA. B) طرح شماتیک از محل ورود T-DNA در ناحیه آگزون ژن *DREB2A* در این شکل جعبه مشکی رنگ ناحیه کدکننده ژن، جعبه خاکستری ناحیه غیرترجمه‌ای، P پرایمر، ATG کدون آغاز و UAA کدون پایان را نشان می‌دهند.



شکل ۲- مقایسه (A) درصد جوانه‌زنی نهایی، (B) سرعت جوانه‌زنی (T50) بین دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* و لاین وحشی در غلظت ساکارز یک درصد (Col-0) نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به ترتیب نمایانگر دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

افزایش یافته نشان می‌دهد. هر چند در رابطه با ارتباط پروتئین‌های DREB و مسیر وابسته به ABA اطلاعات کمی وجود دارد با توجه به افزایش محتوای ABA در لاین بیش‌بیان *DREB2C* و پاسخ جهش یافته *arag1* نسبت به ABA می‌توان احتمال داد تسریع در جوانه‌زنی و باز شدن کامل لپه‌ها در دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* نسبت به لاین وحشی مرتبط با کاهش در سطح هورمون ABA و عملکرد DREB از

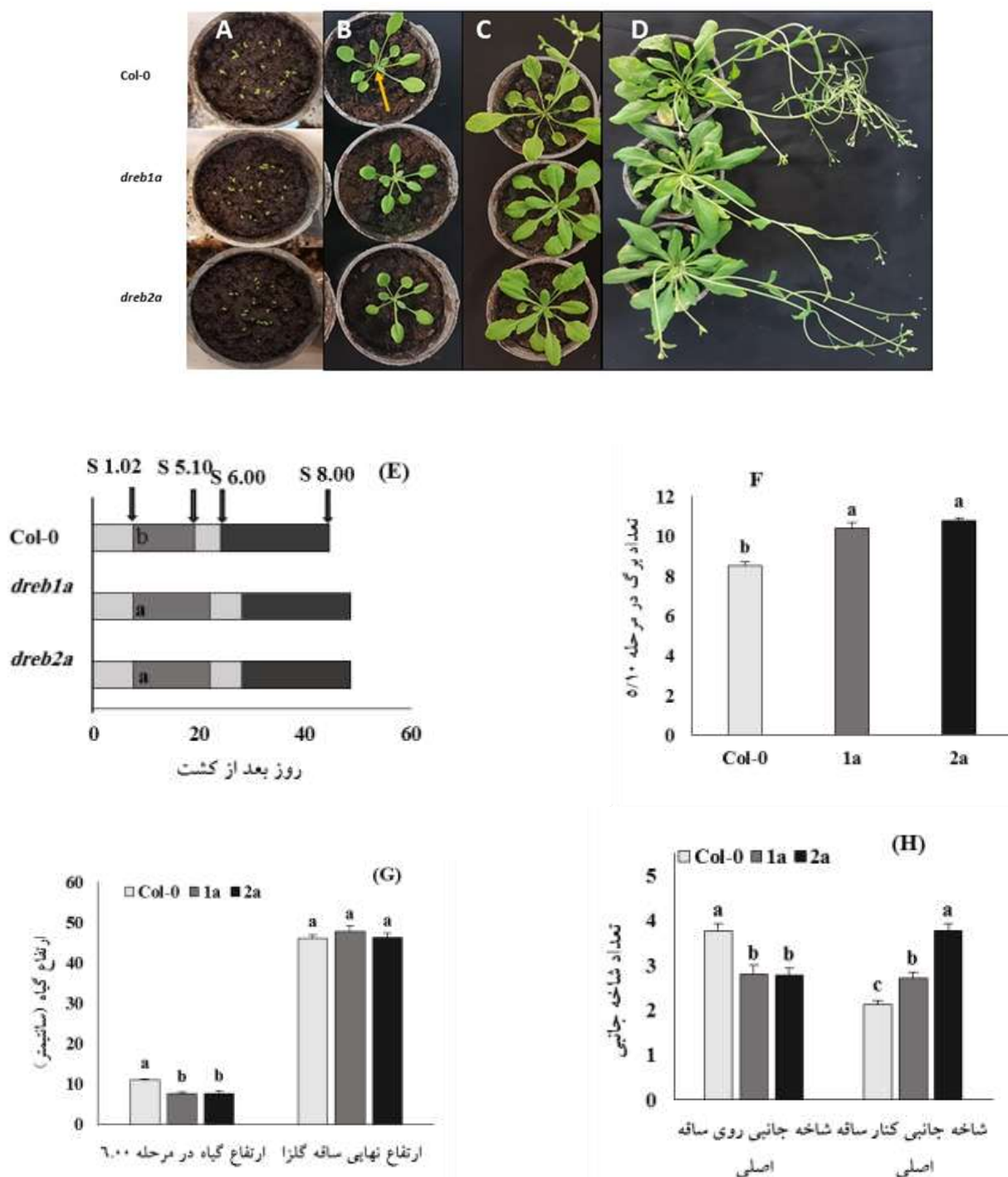
تسریع در باز شدن کامل کوتیلدون‌ها را نشان می‌دهند. از طرفی نتایج (Je et al., 2014) نشان داد که بیش‌بیان *DREB2C* (یک همولوگ *DREB2A*) باعث تأخیر در رشد دانه‌ها و باز شدن کامل لپه‌ها و افزایش در محتوای ABA در مقایسه با لاین وحشی می‌شود. نتایج Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد جهش یافته ARAG1 (یک ژن *DREB* در گیاه برنج) طی جوانه‌زنی و رشد دانه‌ها نسبت به کاربرد ABA حساسیت



شکل ۳- مقایسه (A) مراحل پس از جوانه‌زنی، (B) طول ریشه و (C) بررسی مراحل رشدی بین ۳ لاین آراییدوپسیس در محیط MS. در دو لاین جهش یافته. مرحله بازشدن کامل لپه‌ها نسبت به لاین وحشی کوتاه‌تر است. (Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به ترتیب نمایانگر دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند و d0 تا d4 نمایانگر روز صفر تا روز چهارم است). داده‌ها براساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده‌اند و ستاره نمایانگر تفاوت معنی دار ۰/۰۵ است (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

طریق مسیر وابسته به ABA باشد. به‌علاوه این آزمایش نشان داد طول ریشه در محیط MS تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مورد آزمایش وجود ندارد. این نتیجه در مورد *dreb2a* اولین بار گزارش می‌شود و از طرفی نتایج آزمایش Zhou و همکاران (۲۰۱۵) بر روی جهش یافته *dreb1* در مورد گیاهان جهش یافته *dreb1* را تأیید می‌کند. لیکن نتایج Zhou و همکاران (۲۰۱۵) بر روی جهش یافته سه‌گانه *dreb1* فنوتیپ کاهش معنی‌دار طول ریشه را نشان داد. بنابراین نتایج پیشنهاد می‌کند احتمالاً همولوگ‌های دیگر ژن *DREB1A* می‌تواند جایگزین این ژن‌ها در دو لاین جهش یافته شده و نقش احتمالی این ژن‌ها بر طول ریشه را هم‌پوشانی کنند. در رابطه با فنوتیپ طول ریشه در جهش یافته *dreb2a* این احتمال وجود دارد که ژن *DREB2A* نقشی در طول ریشه ندارند و یا همولوگ‌های دیگر آن (*DREB2B*, *DREB2C*) نقش این ژن را

به‌علاوه این آزمایش نشان داد طول ریشه در محیط MS تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مورد آزمایش وجود ندارد. این نتیجه در مورد *dreb2a* اولین بار گزارش می‌شود و از طرفی نتایج آزمایش Zhou و همکاران (۲۰۱۵) بر روی جهش یافته *dreb1* در مورد گیاهان جهش یافته *dreb1* را تأیید می‌کند. لیکن نتایج Zhou و همکاران (۲۰۱۵) بر روی جهش یافته سه‌گانه *dreb1* فنوتیپ کاهش معنی‌دار طول ریشه را نشان داد. بنابراین نتایج پیشنهاد می‌کند احتمالاً همولوگ‌های دیگر ژن *DREB1A* می‌تواند جایگزین این ژن‌ها در دو لاین جهش یافته شده و نقش احتمالی این ژن‌ها بر طول ریشه را هم‌پوشانی کنند. در رابطه با فنوتیپ طول ریشه در جهش یافته *dreb2a* این احتمال وجود دارد که ژن *DREB2A* نقشی در طول ریشه ندارند و یا همولوگ‌های دیگر آن (*DREB2B*, *DREB2C*) نقش این ژن را



شکل ۴- مقایسه ویژگی‌های بذری بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. (A) تعداد خورجین، (B) تعداد بذر در خورجین، (C) تعداد بذر، (D) وزن هزار دانه، (E) وزن کل بذر به‌ازای هر گیاه. Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند. میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

زایشی: مطالعه مقایسه‌ای ویژگی‌های مورفولوژیک از جمله تعداد برگ در زمان ظهور جوانه گلزا (مرحله ۵/۰۱)، ارتفاع گل‌دین (۶/۰۰)، ارتفاع گیاه کامل و تعداد شاخه جانبی بین سه

هم‌پوشانی می‌کنند که برای فهم این مطلب نیاز به جهش‌یافته‌های دوگانه و سه‌گانه این گروه ژنی است. تأثیر نقصان بیان ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر مراحل



مرحله زایشی در لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی می‌تواند به برهم‌کنش فاکتور DREB1A و یا DREB2A با GA مربوط باشد. اندازه‌گیری میزان جیبرلین در دو لاین جهش یافته می‌تواند صحت این فرضیه را آزمون کند.

#### تأثیر نقصان ژن *DREB 1A* و *DREB2A* ویژگی‌های

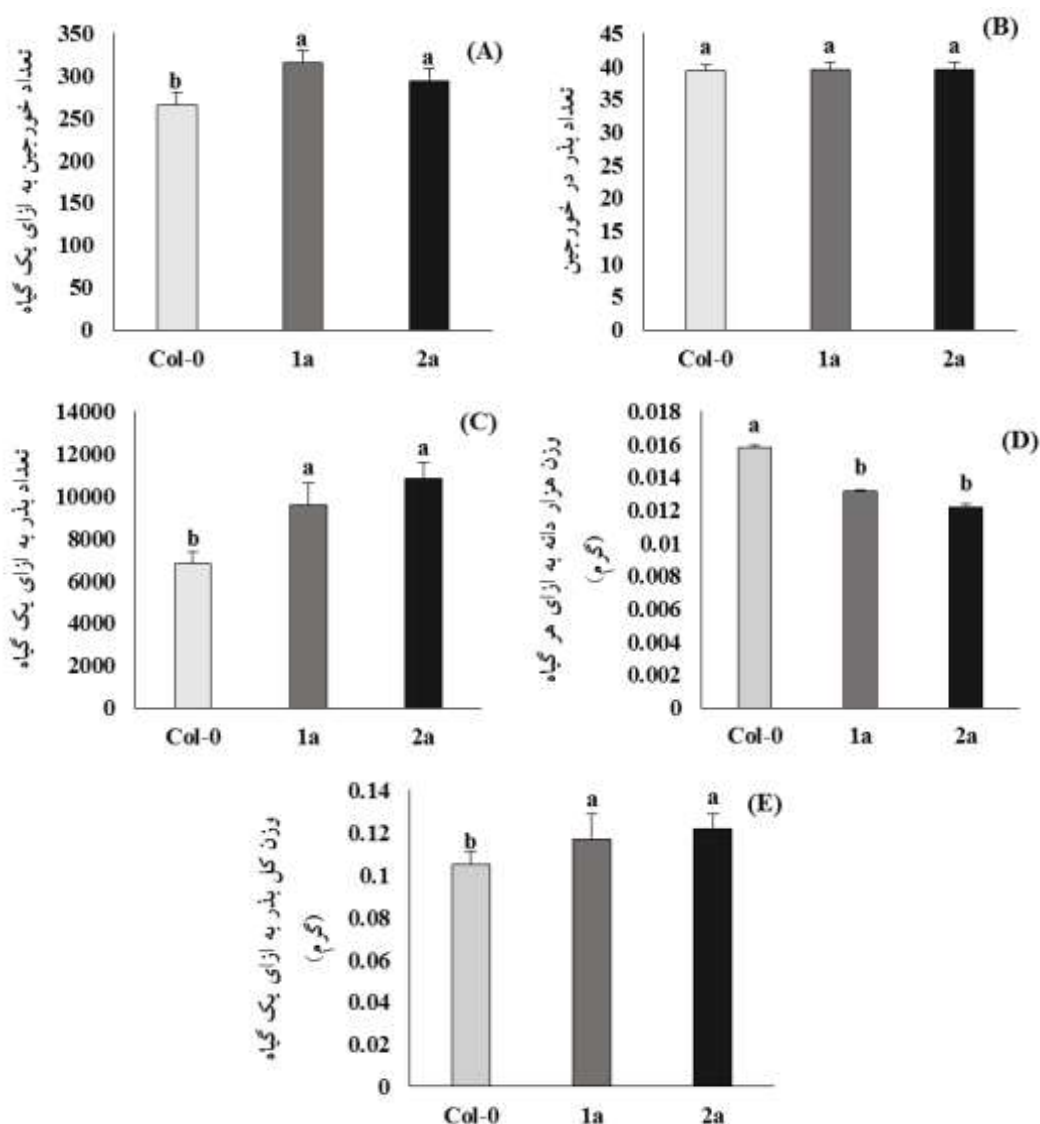
مورفولوژیک و محتوای پروتئین محلول بذر: به منظور شناسایی اثر بالقوه جهش در ژن *DREB1A* و *DREB2A* بر تولید محصول در آراییدوپسیس، وزن کل، وزن هزار دانه و تعداد بذر به ازای هر گیاه بررسی شد. نتایج نشان داد که هر چند در تعداد بذرها در هر خورجین بین سه لاین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، تعداد خورجین (متوسط ۱۰ درصد)، تعداد بذر در هر گیاه (متوسط ۴۰ درصد)، و وزن کل بذر (متوسط ۱۳ درصد) در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۵ A الی E).

یکی از فاکتورهایی که می‌تواند میزان محصول بذری در گیاه را تحت تأثیر قرار دهد تعداد شاخه‌های جانبی است. نتایج ما حاکی از این است که جهش در ژن *DREB1A* و *DREB2A* توانست تعداد شاخه‌های جانبی محور اصلی (MB) را کاهش داده و در عوض تعداد شاخه‌های جانبی محور فرعی (LB) را افزایش دهد. با توجه به اینکه شاخه‌زایی به تعادل در سطح اکسین، سیتوکینین و تولید و انتقال استریگولاکتون‌ها از ریشه به ساقه وابسته است (Su et al., 2009; Hayward et al., 2011). داده‌های ما پیشنهاد می‌کند که ژن‌های خانواده *DREB* احتمالاً به نوعی در برقراری تعادل هورمونی بین اکسین و سیتوکینین و یا در فرایند تولید و انتقال استریگولاکتون‌ها موثرند. همچنین تأخیر در گلدهی، مدت زمان لازم برای آسمیلاسیون کربن طی نمو رویشی را طولانی کرده و بنابراین منجر به افزایش نهایی محصول می‌شود (Cookson et al., 2007). این گفته شاید بتواند نتایج مشاهده شده مربوط به افزایش تعداد خورجین و تعداد بذر در دو لاین جهش یافته در مقایسه با گیاه وحشی را توجیح کند.

با توجه به نقش *DREB*‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی از جمله خشکی این فرضیه مطرح شد که ممکن است

لاین، نشان داد که دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* در زمان بروز جوانه گلزا دارای تعداد برگ بیشتری (به‌طور متوسط ۱۰ برگ) نسبت به لاین وحشی (به‌طور متوسط ۸ برگ) بودند که نشان می‌دهد گیاهان جهش یافته با تأخیر وارد فاز زایشی شدند (شکل F-۴). همچنین ارتفاع گلاذین در مرحله ۶/۰۰ در دو لاین جهش یافته حدود ۳۰ درصد کمتر از لاین وحشی بود، ولی ارتفاع گیاه کامل در پایان رشد زایشی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل G-۴). تعداد انشعاب جانبی تشکیل شده بر روی گلاذین (Lateral Branches on Main Flower Bolt, MB) در هر لاین جهش یافته کمتر از تعداد آنها در گیاه وحشی بود. از طرف دیگر تعداد انشعابات جانبی کنار گلاذین (Lateral flowering Bolt, LB) در گیاه جهش یافته بیشتر از گیاه وحشی بود (شکل H-۴).

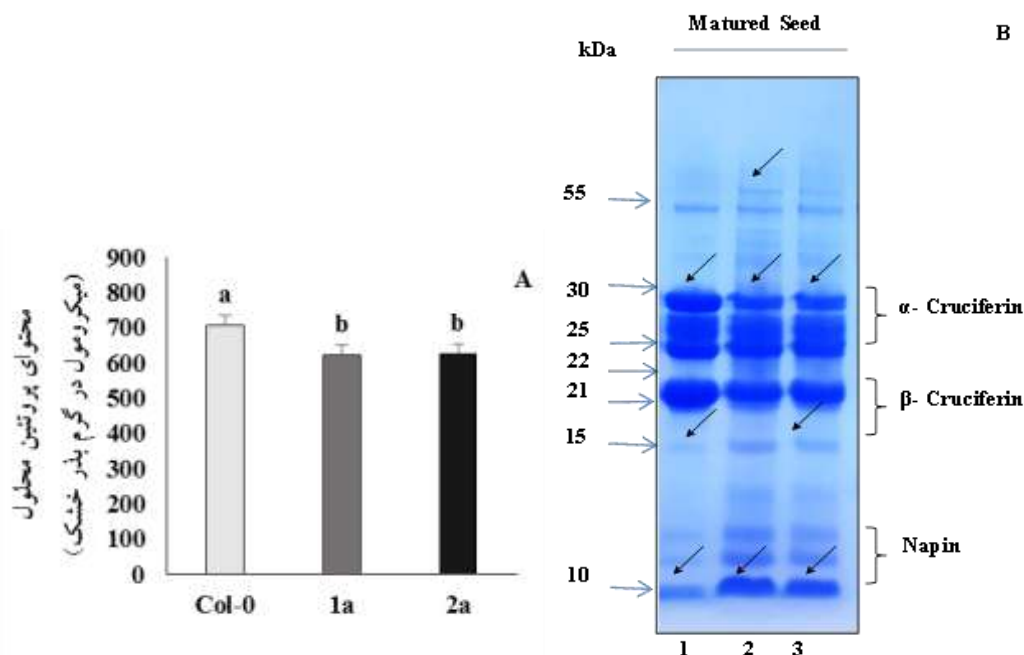
زمان گلدهی یک سوئیچ اولیه از مرحله رویشی به مرحله زایشی است که گیاه را قادر می‌سازد تا قبل از شروع شرایط سخت تکثیر شود (Schmalenbach et al., 2014). این پدیده به برنامه‌ریزی مجدد ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و تخصیص مجدد منابع متابولیکی و بیوشیمیایی در سراسر گیاه نیاز دارد (Kazan, 2015). Cookson و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تأخیر گلدهی منجر به کاهش نهایی سطح برگ و سرعت گسترش برگ می‌شود، اما دوره گسترش برگی در آن افزایش می‌یابد. جالب اینکه بیش‌بینانی ژن‌های *DREB1* و همچنین بیش‌بینانی در ژن *DREB2A* (35S:DREB2A)، رشد و گلدهی را به تأخیر انداخته و از طرفی سطح برگ را نیز کاهش داده‌اند (Gilmour et al., 2004; Sakuma et al., 2006a; Park et al., 2015). برگشت این فنوتیپ با به‌کاربردن GA3 در لاین بیش‌بینان *DREB1* پیشنهاد می‌کند که مهار بیوستز GA می‌تواند یک عملکرد عمومی این ژن‌ها باشد (Magome et al., 2004). نتایج نشان می‌دهد که سطح بیان دقیق ژن *DREB1A* و *DREB2A* در فرآیندهای تنظیمی هورمون‌هایی از قبیل GA حائز اهمیت است و کاهش و افزایش این هورمون منجر به این پدیده می‌شود. در مجموع به نظر می‌رسد که تأخیر در ورود به



شکل ۵- مقایسه ویژگی‌های بذرهای بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. (A) تعداد خورجین، (B) تعداد بذر در خورجین، (C) تعداد بذر، (D) وزن هزار دانه، (E) وزن کل بذر، به‌ازای هر گیاه. Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به‌ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

بوده که از گروه 12S گلوبولین‌ها هستند و توسط چهار ژن پارالوگ کد می‌شوند. دومین پروتئین فراوان بذر آرکیدوپسیس، ناپین‌ها هستند که از گروه 2S آلومین‌ها هستند و توسط یک خانواده پنج عضوی کد می‌شوند (Nguyen *et al.*, 2015). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد میزان پروتئین محلول در بذور دو لاین جهش‌یافته به‌طور معنی‌داری (متوسط ۱۳ درصد) کمتر از لاین وحشی بود (شکل A-۶). همچنین از نظر الگوی باندهای پروتئینی جداشده در الکتروفورز نسبت پروتئین‌های

پروتئین‌های DREB در مرحله خشکیدگی بذر مؤثر باشند. از طرفی یکی از فاکتورهایی که در مراحل نمو بذر تحت تأثیر قرار می‌گیرد مقدار و نوع پروتئین‌های محلول است در نتیجه مقدار کمی و کیفی پروتئین‌های محلول بذرا بین سه لاین مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌های روغنی خانواده شب‌بو حاوی ۲۲-۲۸ درصد پروتئین هستند که عمدتاً شامل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر هستند (Withana-Gamage *et al.*, 2013). در آرکیدوپسیس، فراوان‌ترین پروتئین ذخیره‌ای، کروسیفین‌ها



شکل ۶- مقایسه (A) محتوای پروتئین محلول و (B) الگوی SDS-PAGE پروتئین‌ها در بذر خشک در لاین وحشی و دو لاین جهش یافته. در شکل (B) شماره ۱-۳ به ترتیب نمایانگر پروتئین بذر وحشی، بذر *dreb1a* بذر *dreb2a* هستند. Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به ترتیب نمایانگر دو لاین جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* هستند. میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

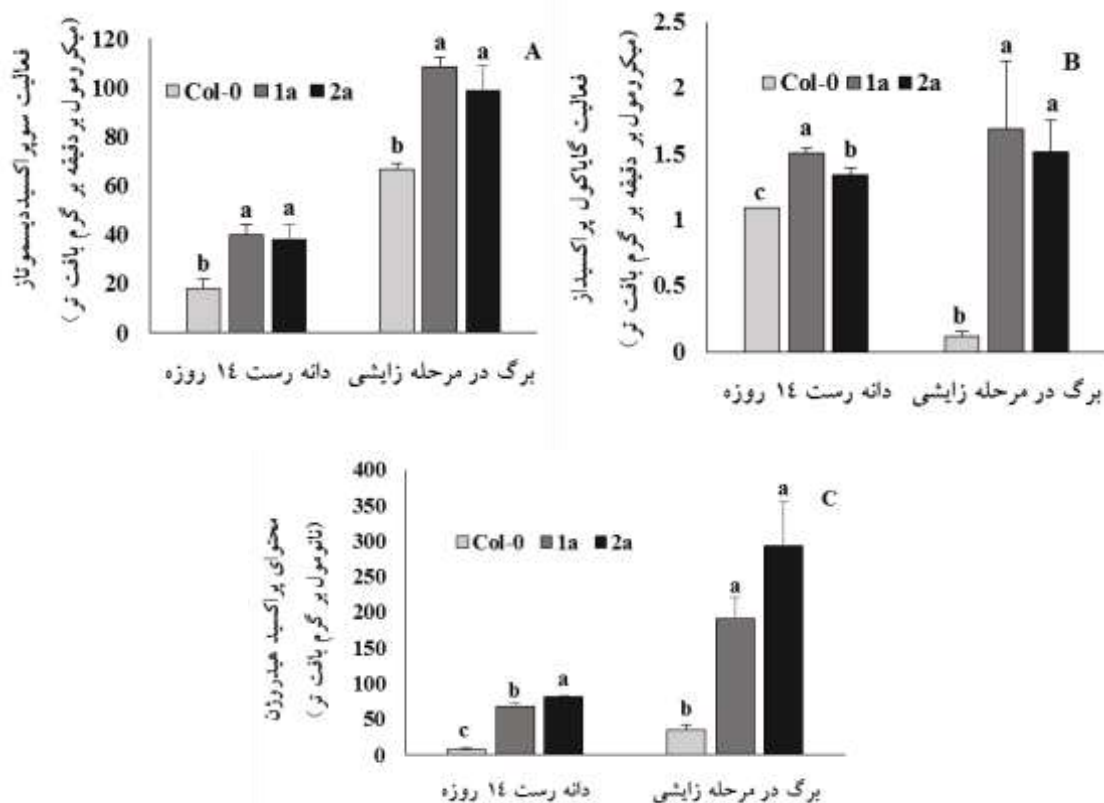
*DREB1A* و *DREB2A* روی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی بررسی شد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی در دانهال ۱۴ روزه (متوسط ۳۰ درصد) و همچنین در برگ گیاهان کشت شده در خاک در مرحله زایشی (متوسط ۵۰ درصد) بیشتر بود (شکل A-B-V). همچنین محتوای هیدروژن پراکسید در دانهال ۱۴ روزه و بافت برگی در مرحله زایشی بین دو لاین جهش یافته و لاین وحشی در شرایط طبیعی بررسی شد (شکل C-V). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد میزان هیدروژن پراکسید در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی به‌طور متوسط ۷۰ درصد بیشتر بود.

گونه‌های کنشگر اکسیژن از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید ( $O_2^-$ )، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^-$ ) و اکسیژن یکتا ( $O_2^{\cdot}$ ) طی متابولیسم طبیعی گیاه تولید می‌شوند (Gupta et al., 2014). گیاهان برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از ROS، از مکانیسم‌های پالایش آنزیمی (سوپراکسید

کروسیفرین به پروتئین‌های ناپین، بین دو لاین جهش یافته و لاین وحشی تفاوت قابل توجهی وجود داشت، به‌طوری‌که این نسبت در لاین‌های جهش یافته در مقایسه با وحشی کمتر بود (شکل B-۶). تفاوت مشاهده شده در نتایج می‌تواند حاکی از این باشد که *DREB* روی تولید این پروتئین‌ها در مرحله نمو دانه مؤثر بوده و شاید بتوان تسریع جوانه‌زنی را به تغییر نسبت این پروتئین‌های ذخیره‌ای ارتباط داد. در مجموع هر چند پیامد اثر جهش در ژن‌های *DREB* بر روی تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مشهود است، درک مکانیسم این اثر نیازمند انجام آزمایش‌های تکمیلی است، خصوصاً اینکه تا آنجا که نویسندگان مقاله اطلاع دارند تحقیق حاضر اولین گزارش در خصوص پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در لاین‌های جهش یافته *DREB* آرآیدوسیسی است.

جهش در ژن‌های *DREB* وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را در شرایط رشد طبیعی تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در ادامه بررسی‌های فنوتیپی اثر جهش در ژن‌های



شکل ۷- مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (A) سوپراکسید دیسموتاز، (B) پراکسیداز محلول، (C) محتوای هیدروژن پراکسید در گیاهان کشت شده در محیط MS و گیاهان کشت شده در خاک بین لاین وحشی و دو لاین جهش‌یافته. Col-0 نمایانگر لاین وحشی و 1a و 2a به ترتیب نمایانگر دو لاین جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* هستند). میانگین‌های دارای حروف مشابه، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (LSD test,  $P \leq 0.05$ ).

مورد لاین جهش‌یافته *dreb2a* اولین بار می‌باشد و تاکنون گزارشی در این زمینه ارائه نشده است. از طرفی مطالعاتی که توسط Li و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پروکسیداز در لاین بیش‌بیان *DREB1A* است. در کل نتایج نشان می‌دهد که افزایش یا کاهش بیان ژن‌های *DREB* می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود و مطالعات انجام‌شده روی آراییدوپسیس پیشنهاد می‌کند که همکاری اجزا مختلف شبکه پالایش ROS در گیاهان بسیار پیچیده است و تنظیم آن به چندین فاکتور مختلف وابسته است (Rizhsky et al., 2003).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات مهم تنش‌های محیطی بر تولیدات گیاهان

دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و غیره) و غیرآنزیمی (کاروتنوئیدها، گزانتوفیل‌ها، گلوکاتینون، توکوفرول، آسکوربات و غیره) کمک می‌گیرند. سامانه آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال‌های آزاد را به هیدروژن پراکسید و آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند (Jagadeeswaran et al., 2009). نتایج ما حاکی از این است که در شرایط کنترل (کشت در محیط MS و یا گلدان جی‌فی) میزان هیدروژن پراکسید و همچنین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز محلول در دو لاین جهش‌یافته *dreb2a* و *dreb1a* در مقایسه با لاین وحشی بالاتر بود. روند مشابهی در مطالعات Kohan-Baghkheirati و همکاران (۲۰۱۸) در رابطه با لاین جهش‌یافته *dreb1a* مشاهده شد. هر چند نتایج گزارش شده در

مقایسه با لاین وحشی کمتر بود. بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی در دانهال ۱۴ روزه و برگ در مرحله زایشی حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و افزایش محتوای هیدروژن پراکسید در دو لاین جهش یافته در مقایسه با لاین وحشی بود. با تکیه بر این نتایج به نظر می‌رسد تغییر بیان ژن‌های *DREB* روی سرعت جوانه‌زنی، فاکتورهای فنوتیپی بذر از قبیل تعداد بذر و فاکتورهای بیوشیمیایی بذر از قبیل نسبت پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و همچنین وضعیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مؤثر باشد. در مجموع به نظر می‌رسد برهمکنش بین فاکتور رونویسی *DREB1A* و *DREB2A* با مسیرهای سیگنالی هورمون‌های گیاهی نظیر آبسزیک اسید، اکسین، سیتوکینین و به‌ویژه جبرلین می‌تواند اغلب فنوتیپ‌های مشاهده شده در این دو لاین جهش یافته را توضیح دهد. این تحقیق اولین گزارش در زمینه خصوصیات دقیق فنوتیپی و بیوشیمیایی گیاهان جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* است. با این حال جهت درک بهتر و کامل‌تر نقش ژن‌های *DREB* روی فاکتورهای مطالعه‌شده، اندازه‌گیری هورمون‌های گیاهی از جمله ABA و GA و همچنین استفاده از لاین‌های جهش یافته نسبت به همه همولوگ‌های مربوط به هر گروه ژنی جهش یافته و بررسی پاسخ این جهش یافته‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی می‌تواند این مطالعه را کامل‌تر کند.

زراعی در جهان و ایران و نقش حیاتی فاکتورهای رونویسی خانواده *DREB* در تنظیم پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی و به‌منظور تفسیر نتایج در شرایط تنش، نیاز به داشتن اطلاعات پایه‌ای از تغییر بیان ژن‌های خانواده *DREB* در شرایط طبیعی وجود دارد. لذا در این تحقیق خصوصیات دقیق فنوتیپی و بیوشیمیایی گیاهان جهش یافته *dreb1a* و *dreb2a* مورد آنالیز قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی دارای تسریع در ظهور ریشه‌چه و ظهور لپه بوده، لیکن در مرحله ورود به فاز زایشی از لحاظ زمانی تأخیر داشته و دارای تعداد برگ بیشتری بودند. همچنین ارتفاع گل‌دین در مرحله ۶/۰۰ در دو لاین جهش یافته کمتر از لاین وحشی بود، ولی ارتفاع گیاه کامل در پایان رشد زایشی بین سه لاین تفاوت معنی‌داری نداشت. تعداد شاخه‌های جانبی تشکیل شده بر روی گل‌دین در لاین‌های جهش یافته نسبت به لاین وحشی کمتر، ولی تعداد محورهای گل‌زا بیشتر بود. نتایج آزمایش همچنین نشان داد از لحاظ تعداد بذر موجود در هر خورجین تفاوت معنی‌داری بین سه لاین مشاهده نشد، ولی تعداد خورجین، تعداد بذر در هر گیاه و وزن کل بذر در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین بررسی محتوای پروتئین محلول بذر نشان داد پروتئین محلول بذر در دو لاین جهش یافته نسبت به لاین وحشی کاهش داشته و نسبت کروسفرین/ناپین در الگوی SDS-PAGE پروتئین محلول بذرهای گیاهان جهش یافته در

## منابع

- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25: 1263-1274.
- Beauchamp, C and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-87.
- Bouaziz, D., Charfeddine, M., Jbir, R., Saidi, M. N., Pirrello, J., Bouzayen, M., Charfeddine, S. and Gargouri-Bouazid, R. (2015) Identification and functional characterization of ten AP2/ERF genes in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 155-72.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R and Gorch, J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell Online* 13: 1499-1510.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-252.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Choi, D.W., Rodriguez, E. M. and Close, T. J. (2002) Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiology* 129: 1781-1787.

- Cookson, S. J., Chenu, K. and Granier, C. (2007) Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Annals of Botany* 99: 703-713.
- Cushman, J. C and Bohnert, H. J. (2000) Genome approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 117-124.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal* 33: 751-763.
- Fling, S. P and Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry* 155: 83-8.
- Fowler, S. and Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* 14: 1675-1690.
- Gilmour, S. J., Fowler, S. G. and Thomashow, M. F. (2004) Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54: 767-781.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C. and Leyser, O. (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology* 151: 400-412.
- Jaglo, K. R., Kleff, S., Amundsen, K. L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J. Z and Thomashow, M. F. (2001) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in brassica napus and other plant species. *Plant Physiology* 127: 910-917.
- Je, J., Chen, H., Song, C. and Lim, C. (2014) Arabidopsis DREB2C modulates ABA biosynthesis during germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452: 91-8.
- Gupta, K., Jha, B. and Agarwal, P. K. (2014) A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Marine Biotechnology* 16: 657-673.
- Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. (2004) A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 49-52.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291.
- Kazan, K. (2015) Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science* 20: 219-229.
- Kohan-Baghkheirati, E., Bagherieh-Najjar, M. B., Abdolzadeh, A. and Geisler-Lee, J. (2018) Altered *DREB1A* gene expression in *Arabidopsis thaliana* affects root growth, antioxidant enzymes activity, and response to salinity but not to cold. *Journal of Genetic Resources* 4: 90-104.
- Lata, C. and Prasad, M. (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 4731-4748.
- Li, X., Cheng, X., Liu, J., Zeng, H., Han, L. and Tang, W. (2011) Heterologous expression of the Arabidopsis *DREB1A/CBF3* gene enhances drought and freezing tolerance in transgenic *Lolium perenne* plants. *Plant Biotechnology Reports* 5: 61-69.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A. and Sunkar, R. (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta* 229: 1009-1014.
- Je, J., Chen, H., Song, C. and Li, C. O. (2014) Arabidopsis DREB2C Modulates ABA Biosynthesis during germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452: 91-98.
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A. (2016) Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science* 7: 1029.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K. (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal* 37: 720-9.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140: 411-432.

- Nguyen, T. P., Cueff, G., Hegedus, D., Rajjou, L. and Bentsink, L. (2015) A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. *Journal of Experimental Botany* 66: 6399-413.
- Park, S., Lee, C. M., Doherty, C. J., Gilmour, S. J., Kim, Y. and Thomashow, M. F. (2015) Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant Journal* 82: 193-207.
- Riechmann, J. L., Heard, J. and Martin, G. (2000) Arabidopsis transcription factor: genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2003) The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *Journal of Biological Chemistry* 278: 38921-5.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 998-1009.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18: 1292-1309.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *PNAS* 103: 18822-18827.
- Schmalenbach, I., Zhang, L., Reymond, M. and Jimenez-Gomez, J. (2014) The relationship between flowering time and growth responses to drought in the Arabidopsis landsberg erecta x antwerp-1 population. *Frontiers in Plant Science* 5: 609.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajim, A. M., Enju, A. and Sakurai, T. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279-292.
- Sergiev, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 51: 121-124.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Gene networks involved in drought stress tolerance and response. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.
- Su, Y. H., Liu, Y. B. and Zhang, X. S. (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4: 616-625.
- Withana-Gamage, T. S., Hegedus, D. D., Qiu, X., Yu, P., May, T., Lydiate, D. J., and Wanasundara, P. K. J. P. D. (2013) Characterization of *Arabidopsis thaliana* lines with altered seed storage protein profiles using synchrotron-powered FT-IR spectromicroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 901-912.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell Online* 6: 251-264.
- Zhao, L., Hu, Y., Chong, K. and Wang, T. (2010) ARAG1, an ABA-responsive *DREB* gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. *Annals of Botany* 105: 401-409.
- Zhau, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y. and Zhu, J. K. (2015) Mutational evidence for the critical role of CBF genes in cold acclimation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 171: 2744-59.

## Morphological and biochemical characteristics of *dreb2a* mutant plant grown under normal conditions

Somayeh Kohsari<sup>1</sup>, Mohammad Bagher Bagherieh Najjar<sup>1\*</sup>, Hamid Reza Sadeghipour<sup>1</sup> and Eisa Kohan baghkheirati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Hakim Sabzevari, Sabzevar, Iran

(Received: 15/01/2019, Accepted: 18/05/2019)

### Abstract

DREB transcription factors are one of the largest families of transcription factors in plants that are believed to play important regulatory functions in tolerance to environmental stress, but there is no complete information on their role in controlling the morphological and antioxidant properties of grown plants under normal conditions. In this study, some phenotypic characteristics of the *dreb2a* and *dreb1a* mutant arabidopsis were compared to the wild plant under normal growth conditions. Most properties of *dreb2a* were similar to those of *dreb1a* mutant, but significantly different from the wild type. Both mutant lines showed accelerated emergence of radicle and cotyledons, but delayed appearance of bolting. Lateral branches formed on the flowering bolt in the mutant lines were 25% less, while the flowering axes were 20% more than that in the wild type plants. Both mutant lines displayed higher total number of siliques per plant (about 10%), total number of seeds per plant (about 40%) and total seed weight per plant (about 13%), while, they had lower seed soluble protein content and the cruciferin/napin ratio, as compared to the wild type. It is noteworthy that in 14-day seedlings and leaves of the plant at the stage of reproduction in two mutant lines compared to the wild line, the activity of antioxidant superoxide dismutase and peroxidase activity was on average 35% and hydrogen peroxide was on average 70% higher. These data indicated that the change in the expression of the studied genes played a key role in controlling the morphological and antioxidant status of the plants grown under normal conditions, and studying the cascade stages of the signal transduction managed by DREB family transcription factors can lead to a deeper understanding of the response mechanism of these plants to various environmental stresses.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Environment stresses, Antioxidant enzymes, Transcription Factors, *dreb* mutants.