

The investigation of CBF1 gene under cold and drought stress in potato

A. Saidi*, Z. Hajibarat

Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received 21 June 2022; Accepted 20 August 2022

Extended abstract

Introduction

Potato is the one of the important crop in the world. This plant in terms of consumption rate in the world levels is after rice and wheat. Thus, this crop is considered the maintain food security. However, potato influences the abiotic stress particularly drought and cold. The C-repeat binding factors (CBFs), also termed dehydration-responsive element-binding protein 1 (DREB1) family members, play crucial roles in the acquisition of stress tolerance, but in potato, the underlying mechanisms of stress tolerance remain elusive. The cold and drought stresses are the most abiotic stresses across the world causing to decrease of the crop yield. To gain insight into these mechanisms, CBF1 gene was selected from four potato and was assessed their expression under drought and cold stress conditions.

Materials and methods

In order to investigate the effect of cold and drought on growth and development on potato, a experiment was conducted at the the Seed and Plant Improvement Institute located at Karaj, Iran. The experimental design used was randomized complete block design with three replications under drought and cold stress (normal and stressed). Gene expression of CBF1 gene was performed in different tissues (root, stem, leaves, and tuber) under control condiotin. Further, analysis of expression in root and leaves under stress condition. After 3 weeks after cultivated in Karaj, the water stress was induced by irrigation suppression in 2 weeks. sampling was performed 5 weeks after sprouting under drought. Under cold stress, analysis of expression in root and leaves was performed at the 24h and 48h after 3 weeks of sprouting. CBF1 gene was selected as one of important gene in the investigation of molecular mechanism under cold and heat stress in potato.

Results and discussion

Average induced expression in response to cold suggested a correlation between potato CBF1 expression and the acquisition of cold tolerance in root. Whereas, the expression of this gene was decreased in leaves. Under drought stress, the expression of CBF1 gene was up-regulated in root. However, the expression rate of CBF1 decreased under stress. Responses that varied between sections may reflect tissue-specific stress tolerance mechanisms, suggesting an effect of ecological context on the development of CBF1 mediated stress tolerance in potato. In this study, the investigation of transcription factor binding sites, co-expressed genes, and gene ontology of CBF1 in potato was performed. This gene is involved in multiple biological processes and pathways. The analysis of promoter showed that CBF1

* Corresponding author: Abbas Saidi; E-Mail: abbas.saidi@gmail.com



gene had the highest and the lowest number of the TFBS in MYB and WRKY, respectively. The present study revealed that the CBF1 gene expression in root was the higher than leaves.

Conclusion

Overall, it can be concluded that CBF1 gene can contribute to cold and drought tolerance in potato and can be used for genetic and breeding manipulation to improve tolerance to stress.

Keywords: Leaf, Ontology, Promoter, Root, Transcription factor

بررسی بیان ژن CBF1 تحت تنش سرما و خشکی در سیب زمینی

عباس سعیدی*، زهرا حاجی برات

گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: انتولوژی برگ پروموتور ریشه فاکتورهای رونویسی	سیب زمینی یکی از گیاهان مهم زراعی در جهان است؛ اما سیب زمینی تحت تنش‌های غیرزیستی مخصوصاً خشکی و سرما قرار می‌گیرد. تنش‌های سرما و خشکی از جمله مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در سراسر جهان هستند که منجر به کاهش عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند. فاکتورهای اتصال C-تکرار (CBF) همچنین به عنوان اعضای خانواده پروتئین متصل به عناصر پاسخگو به کم‌آبی (DREB1) در نظر گرفته می‌شوند؛ اما در سیب زمینی، سازوکار پایه‌ای از تحمل به تنش میهم باقی مانده است. آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار تحت تنش خشکی و سرما در گلخانه کرج انجام شد. در این مطالعه، بررسی بیان ژن CBF1 از برگ و ریشه تحت تنش سرما و خشکی در ژنوتیپ ۸۷۰۷/۲۹ سیب زمینی انجام شد. متوسط میزان بیان ژن CBF1 ممکن همبستگی بالایی با کسب تحمل به استرس سرما و خشکی در ریشه داشت. در حالی که بیان این ژن در برگ کاهش داشته است. تحت تنش خشکی بیان ژن CBF1 در ریشه افزایش داشته است اما در برگ میزان بیان CBF1 تحت تنش کاهش بیان را نشان داد. پاسخ‌هایی که بین بخش‌های مختلف متفاوت هستند ممکن است بازتاب‌کننده مکانیسم‌های تحمل در تنش مخصوص بافت باشند که نشان‌دهنده اثر بافت اکولوژیکی در گسترش تحمل به استرس در سیب زمینی است. در این مطالعه بررسی جایگاه اتصالاتی فاکتورهای رونویسی، ژن‌های هم بیان و انتولوژی ژن‌ها در CBF1 در سیب زمینی انجام شد. آنالیز پروموتور نشان داد که ژن CBF1 شامل بالاترین و پایین‌ترین تعداد MYB و WRKY است. با توجه به آنالیز شبکه هم‌بیان، این ژن بیشتر در تحمل به سرما و خشکی دخالت داشت که سایر ژن‌های هم‌بیان احتمالاً در بالادست مسیر بیوسنتز CBF1 عمل می‌کنند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن CBF1 در ریشه تحت تنش سرما و خشکی بیشتر از برگ بود. در مجموع ژن CBF1 می‌تواند در القای تحمل به تنش سرما و خشکی نقش داشته باشد و برای دست‌ورزی ژنتیکی و اصلاح سیب زمینی تحت تنش‌های فوق‌الذکر مورد استفاده قرار گیرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۹	
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳ ۱۷-۷۲: ۶۱(۱)	

مقدمه

شرایط سرما افزایش می‌یابد و بیان ژن‌های پاسخگو به سرما القا می‌شود. گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که ژن CBF1 پاسخگو به سرما است که عملکرد آن بین آرابیدوپسیس و درختان چوبی چندساله مانند صنوبر و توس حفظ شده است (Benedict et al., 2006; Welling and Palva, 2008). محققان ۱۶ ژن از میان ۶۳ ژن تنظیم‌کننده به سرما شناسایی کردند که دارای موتیف DRE هستند. این ژن‌ها در نمونه‌های برگ و ساقه از گیاه صنوبر بعد از ۷ روز انباشت سرما در ۲ درجه سانتی‌گراد شناسایی شدند (Benedict et al., 2006).

فاکتورهای رونویسی عملکردهای مهمی در پاسخ به استرس و تحمل دارند. آن‌ها به عناصر تنظیمی cis در ناحیه پروموتوری از ژن‌های هدف متصل می‌شوند و بیان ژن را تنظیم می‌کنند (Nakashima et al., 2009). در آرابیدوپسیس فاکتورهای اتصالاتی تکراری c-CRT) همچنین به عنوان عناصر پاسخ‌دهنده به کم‌آبی (DRE) اعضای خانواده پروتئین ۱ اتصال‌دهنده (DREB1) شناخته می‌شوند (Shinozaki et al., 2003). سه عضو CBF مانند CBF1، CBF2 و CBF3 ابتدا از آرابیدوپسیس جدا شدند. بیان آن‌ها تحت

بررسی‌های فیزیولوژیکی و آنالیز بیان نشان می‌دهد که نقش CBFها به‌عنوان یکپارچه‌سازی انباشت سرما و فرآیندهای مثل فتوسنتز و سیگنالینگ هورمون است (Maestrini et al., 2009)؛ اما مکانیسم مولکولی آن هنوز ناشناخته است. تشریح روابط بین فاکتورهای پاسخگو به استرس و صفات فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل و درک مکانیسم مولکولی به این تنش‌ها، زیربنای تحمل به استرس خواهند شد (González-Martínez et al., 2007).

بر اساس مطالعه‌ای که بر روی گندم تحت تنش خشکی صورت گرفت این نتیجه به دست آمد که CBF بعد از اعمال تنش خشکی بعد از یک ساعت افزایش بیان داشته است همچنین بیان پنج ژن CBF و سه ژن COR تحت این تنش بعد از ۶ ساعت افزایش یافته است (Guo et al., 2019). بر اساس بررسی که بر روی انگور تحت تنش خشکی و سرما انجام شد ژن CBF4 اغلب با تیمار سرما القا می‌شود درحالی‌که ژن‌های CBF1، CBF2 و CBF3 تحت تنش خشکی پاسخگو هستند (Xiao et al., 2008). پژوهشی دیگر نشان داد که CBF و ژن‌های COR پایین‌دست آن می‌تواند نه تنها به تنش سرما بلکه به تنش خشکی نیز پاسخ دهند (Jin et al., 2018). به‌تازگی ۴۱۴ ژن با استفاده از کریسپر مبتنی بر موتانت CBF شناسایی شدند (Zhao et al., 2016). بعد از شناسایی CBF در آرآبیدوپسیس، تعداد زیادی از ژن‌های همولوگ CBF در گونه‌های گیاهی مختلف شناسایی شد که شامل تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها شدند. این همولوگ‌ها نیز یک نقش کلیدی در پاسخ و تحمل به استرس‌های چندگانه از طریق تنظیم به کمک CBF را نشان دادند (Chen et al., 2008). این نتایج نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن CBF رویکرد احتمالی در بهبود تحمل به استرس در محصولات زراعی را نوید می‌دهد (Mickelbart et al., 2015).

مسیرهای پاسخ به فاکتور اتصال-تکراری-C در طول سازگاری به هوای سرد در گیاهان معتدل فعال می‌شوند اما نه تنها باعث تغییرات متابولیکی شامل تجمع مواد محلول شکر و پرولین می‌شود بلکه مانع رشد سلول‌های گیاهی از طریق تنظیمات مختلف می‌شوند (Park et al., 2015). علاوه بر تحمل به تنش، بیان مداوم CBFها در آرآبیدوپسیس تراریخته، گوجه‌فرنگی، گندم و جو تأثیر نامطلوبی بر فنوتیپ-های گیاهی از جمله تأخیر در رشد و کاهش عملکرد داشت

مواد و روش‌ها

آنالیز شبکه برهم‌کنشی پروتئین-پروتئین و آنالیز جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی (TFBS)

برای شناسایی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین از نرم‌افزار STRING، 5.10 استفاده شد. پایگاه داده STRING، version یک منبع معتبر برای دریافت اطلاعات شبکه تعامل پروتئینی است که از طریق سایت <https://string-db.org> قابل دسترسی است. برای بررسی تعداد جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی، ۱۵۰۰ جفت باز بالادست ناحیه پرموتری از ژن CBF1 با استفاده از PlantPAN انجام شد.

آنالیز هستی‌شناسی (GO)

آنالیز هستی‌شناسی ژن CBF1 به تنش خشکی و سرما با استفاده از نرم‌افزار STRING تحت وب انجام شد. گروه‌ها بر اساس فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی طبقه‌بندی و تجزیه و تحلیل شدند.

کشت گیاه و اعمال تنش

آزمایشی در گلخانه با ۳ تکرار تحت شرایط نرمال، تنش سرما و خشکی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی برای ژنوتیپ ۸۷۰۷/۲۹ انجام شد. گیاهان در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر کشت شدند. خاک به کاررفته مخلوطی از خاک

¹ Gene Ontology (GO)

جدول ۱. توالی پرایمر CBF1 استفاده شده برای qRT-PCR در این مطالعه.

Table 1. The CBF1 primer sequence used for qRT-PCR in this study

شماره No.	نام ژن Gene name	توالی پرایمر Primer sequence
1	F:EF1 α R:EF1 α	AGATGGTCAGACCCGTGAAC CCTTGGAGTACTTCGGGGTG
2	F: CBF1 R: CBF1	GATTCTGCTTGGAGGTTGCC AGAGCGCTTCCTCATCCATG

الگوی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR (ABI, SYBER Green Master StepOne) با استفاده از کیت Mix مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان ژن‌ها با روش تصحیح کارایی محاسبه گردید. میزان بیان ژن‌های داوطلب بر اساس ژن StEF-1 α با بیان ثابت، نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در شرایط تنش سرما و خشکی نسبت به شاهد سنجیده شد. میزان بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) با استفاده از نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید؛ اما برای بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش نرمال در چهار اندام با استفاده از فرمول $2^{-\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

نتایج و بحث

شبکه هم‌بیانی

با توجه به شبکه هم‌بیان مربوط به CBF1 مشخص شد ژن CBF1 با ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی اعم از LEA, U-Box, Calmodulin, AP2, DREB, bZIP, Kinase, MYB like protein و COR413-PM2 مختلف ارتباط دارد (شکل ۱). بررسی شبکه‌های هم‌بیانی ژنی در کنار مطالعه شبکه‌های برهمکنش پروتئینی می‌تواند دید بازتری در جهت پی بردن به تصویری واضح‌تر نسبت به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان را به محققان ارائه دهد. با بررسی این شبکه‌ها می‌توان به تعداد بسیار بیشتری از ژن‌هایی که با ژن‌های هدف مورد مطالعه این گونه تحقیقات، هم‌بیان و در مسیرهای بیولوژیکی مشابه قرار دارند پی برد. به دلیل چند ژنی بودن مکانیسم عمل تنش‌های غیر زیستی، هر چه میزان ژن‌های مورد بررسی به صورت هدفمند بیشتر باشد شناخت از مسیرها و فرآیندهای مولکولی، متابولیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این ژن‌ها در مکانیسم تحمل به تنش‌های غیر زیستی همچون تنش خشکی بهتر و مؤثرتر خواهد بود. بر اساس مطالعه‌ای،

پرلیت، کوکوپیت و خاک حاصلخیز مزرعه به نسبت ۱:۲:۱ بود. دمای گلخانه در طی آزمایش ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۰ درصد و شرایط نوری ۱۶:۸ ساعت تنظیم شد. پس از گذشت سه هفته از کشت سیب‌زمینی، تنش سرما و خشکی بر روی نمونه‌ها اعمال شد (Hajibarat et al., 2020). مراحل کار به شرح ذیل است.

بررسی تأثیر سرما بر روی CBF1

نمونه‌ها بعد از گذشت سه هفته از شروع رشد جوانه‌های سیب‌زمینی، به مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تحت تنش دمای کم (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند (Hajibarat et al., 2022b).

بررسی تأثیر خشکی بر روی CBF1

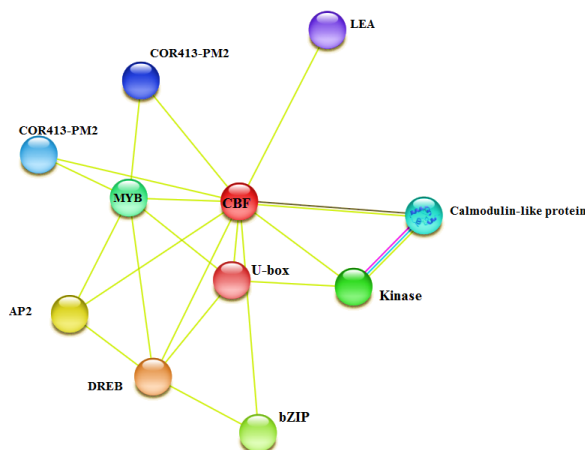
بعد از گذشت ۳ هفته از رشد جوانه‌ها، آبیاری به مدت ۲ هفته قطع شد و نمونه‌برداری از برگ و ریشه برای بررسی تأثیرات خشکی بر روی الگوی بیان ژن CBF1 بعد از ۵ هفته از رشد جوانه‌ها انجام شد. همچنین برای بررسی میزان بیان این ژن در بافت‌های مختلف، نمونه‌برداری از چهار بافت ریشه، ساقه، برگ و غده تحت شرایط نرمال انجام شد. برای هر نمونه سه تکرار بیولوژیکی و تکنیکی استفاده شد و ژن کنترل داخلی StEF-1 α بود. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان استخراج RNA در فریزر -۸۰ نگهداری شدند.

استخراج RNA و PCR کمی در زمان واقعی (qRT-PCR)

استخراج RNA از بافت‌های ریشه و برگ با استفاده از کیت استخراج سیناکلون صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از نانودراپ و مشاهده باندهای مربوطه در ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. RNA های استخراج شده با آنزیم DNase I تیمار و پس از همسان‌سازی غلظت RNA های مختلف اولین رشته cDNA (با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis) ساخته شد. توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر (StCBF1) و ژن StEF-1 α به‌عنوان کنترل داخلی از بانک ژن NCBI تهیه و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI طراحی شدند (جدول ۱).

(DRE/CRT/LTRE) متصل می‌شوند که شامل توالی مرکز CCGA محافظت‌شده است. ژن CBF الفاشده در دمای پایین با تعداد زیادی از ژن‌های COR تنظیم می‌شوند که تحمل به سرما ایجاد می‌شود.

فاکتورهای رونویسی CBF با دمین AP2 برهم‌کنش دارد که بیان ژن در پاسخ به سرما را تنظیم می‌کنند (Artlip et al., 2013). پروتئین‌های CBF متعلق به زیرخانواده DREB1 از ابرخانواده فاکتورهای رونویسی AP2/ERF است (Sakuma et al., 2002). آن‌ها به یک عنصر cis



شکل ۱. برهم‌کنش پروتئین با پروتئین‌های دیگر هم‌بیان در سیب‌زمینی.

Fig. 1. Interaction of proteins with other identical proteins in potatoes.

رگولون CBF می‌شود. کینازها یک نقش ضروری در فسفریلاسیون ژن‌های ICE دارد که ICE1 فسفریله شده Ser403 برای پایداری و CBF تنظیم فعال‌سازی در آبشار MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) می‌شود. گیاهان از طریق آبشار MAPK استرس سرمایی را از طریق نقش‌های اتصال کالمودولین‌ها تنظیم می‌کنند. ژن AtCOR413pm شامل دمین‌های محافظت‌شده در ناحیه پروموتری است. ژن‌های COR413pm استرس سرمایی را از طریق افزایش جذب Ca^{2+} و بیان ژن‌های COR (COR6.6, COR15B, COR47, COR15A, KIN2 و COR78/RD29) مرتبط با استرس و CBF (CBF2 و CBF3) را در آرآبیدوپسیس تنظیم می‌کنند.

آنالیز TFBS در ناحیه پروموتری از ژن CBF1

جایگاه اتصال فاکتور رونویسی (TFBS)، ناحیه اتصال DNA در پروموتری است که ناحیه شروع رونویسی از ژن‌های هدف هستند. از پایگاه داده PlantPAN برای شناسایی TFBS که در ناحیه پروموتری که ۱۵۰۰ جفت باز توالی بالادست از ژن CBF هستند استفاده شد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، ۲۵ تا TFBS احتمالی در ناحیه پروموتری شناسایی شد. این TFBS دارای پتانسیل تنظیم بیان ژن در

بر اساس مطالعه‌ای فاکتورهای رونویسی MYB، CBF و WRKY در میان فاکتورهای رونویسی موجود به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم‌کننده در پاسخ به استرس سرما در سطح مولکولی شناخته شدند (Abdullah et al., 2022). مطالعه دیگر نیز نشان داد که MYB در پاسخ به استرس سرما وابسته به مسیر CBF/DREB است (Mehrotra et al., 2020). بیان بیش‌ازاندازه ژن SlICE1a یک عضو از MYC در تنباکو، بیان ژن CBF3/DREB1A را فعال کرده و ژن‌های هدف آن‌ها در نتیجه باعث افزایش سطح پرولین و محتوای قند و LEA تحت تنش سرمایی می‌شوند (Feng et al., 2013). فعالیت‌های تنظیم‌شده توسط یوبی‌کوئیتیناسیون پروتئین‌های ICE-CBF باعث بهبود تحمل به تنش سرما در گیاهان می‌شود. در انگور ژن VpPUB25/26 که یک ژن یوبی‌کوئیتیناسیون است باعث تجمع ژن VpICE1 شده است که بیان ژن VpHOS1 را سرکوب می‌کند (Yao et al., 2017). ژن‌های PUB25/26 تخریب MYB15 را انجام می‌دهد و مهارکننده مسیرهای ICE-CBF در طول تنش سرما است که منجر به افزایش بیان ICE1 می‌شود. علاوه بر این SINA یک لیگاز یوبی‌کوئیتین‌شدن در موز می‌شود که باعث افزایش پایداری MaICE1 می‌شود و بهبود فعال‌سازی رونویسی

پاسخ به استرس‌های زیستی و غیرزیستی و پاسخ به نور و بافت خاص و پاسخ به فیتوهورمون‌ها هستند. تعداد این عناصر در هر ژن متفاوت است. در میان این عناصر موجود در ناحیه پروموتری، عناصر MYB و bZIP بیشترین تعداد را به ترتیب

جدول ۲. برخی جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی در ژن CBF1.

Table 2. Some binding sites of transcription factors in CBF1 gene.

شماره No.	نام TFBS TFBS Name	فراوانی Frequency	عملکرد Function
1	AT-Hook	4	Vasculature-specific expression
2	MADS box	5	Flower-specific expression
3	MADF	3	Flower organ-specific expression
4	SBP	23	Fruit and flower-specific expression
5	LOB	1	Root-specific expression
6	WOX	1	Organ and embryo organ-specific
7	TCR	5	Reproductive tissue-specific
8	HD-ZIP	15	Embryological control-specific
9	AP2	20	Involved in ethylene responsiveness
10	BES1	1	Involved in strigolactone and Brassinosteroids responsiveness
11	EIN3	1	Involved in ethylene and Jasmonat responsiveness
12	Dof	11	Responsive to light
13	GATA	10	Responsive to light
14	bHLH	7	Responsive to light
15	SRS	1	For growth and development
16	NAC	6	For growth and development
17	Homeodomain	28	Growth specific and responsive to stress
18	bZIP	84	For leaf and seed development
19	Trihelix	4	responsive to growth and biotic and abiotic
20	B3	2	For growth and development
21	ZF-HD	1	For growth and response to stress
22	C2H2	3	Responsive to biotic and abiotic stress
23	MYB	99	Responsive to biotic and abiotic stress
24	HSF	2	Responsive to cold and heat stress
25	WRKY	1	Drought responsive

(Wang et al., 2017). این نتایج نشان می‌دهد که بیشتر این ژن‌ها در استرس‌های زیستی و غیر زیستی فعالیت دارند. مطالعه ژن CBF1 بر روی گوجه‌فرنگی نشان داد که این ژن با عناصر SIMYB14 برهم‌کنش دارد و در پاسخ به تنش‌های محیطی دخالت دارد (Heidari et al., 2019). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن CBF1 در فرآیندهای چندگانه هستند (جدول ۲). ژن SIDREB3 در گوجه‌فرنگی باعث

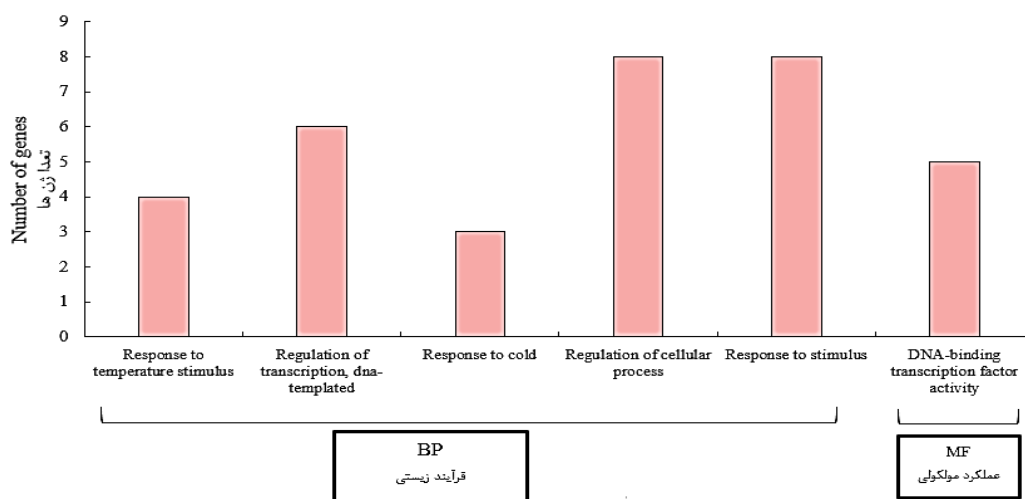
عناصر مربوط به bZIP به صورت قابل توجهی در بیشتر ژن‌های CBF فعالیت دارند. فاکتورهای رونویسی bZIP نقش حیاتی در استرس‌های غیرزیستی در گیاهان دارند. در مطالعه‌ای که بر روی گیاه کاملیا سیننسیس انجام شد بیان بیش از حد ژن CsbZIP6 باعث سرکوب ژن‌های در سرما و خشکی در این گیاه شد. بر اساس این مطالعه ژن CsbZIP6 یک تنظیم‌کننده منفی در پاسخ به استرس‌های سرما بود

به سرما برای تحمل به تنش سرما فعالیت دارد (Shi et al., 2017). پژوهشی دیگری بر روی ژن‌های CBF1 و CBF3 نشان داد که این دو ژن برای پاسخ به تنش سرما در گیاهان ضروری هستند (Zhao et al., 2022). در صنوبر، دو ژن PtCBF1 و PtCBF3 القای قابل توجهی در ساقه تحت تنش دمایی پایین داشته است (Benedict et al., 2006). بیان بیش‌ازحد ژن CBF در تحمل به یخ‌زدگی در سیب، جو، سیب‌زمینی و صنوبر مشاهده شده است (Benedict et al., 2006; Pino et al. 2008; Wisniewski et al. 2011; Jeknić et al. 2014; Soltész et al. 2013; Park et al. 2015)

افزایش تحمل به سرما از طریق افزایش بیان SILEAs می‌شوند (Wang et al., 2019).

تعیین هستی‌شناسی ژن CBF1 به تنش خشکی و سرما

آنالیز هستی‌شناسی ژن CBF1 در بخش فرآیندهای زیستی نشان داد که پاسخ به محرک‌های محیطی، پاسخ به سرما و دما و تنظیم فرآیندهای رونویسی و سلولی است (شکل ۲). در بخش عملکرد مولکولی می‌توان به فعالیت فاکتورهای رونویسی اتصال به DNA اشاره نمود. مطالعه دیگری بر روی ژن CBF نشان داد که این ژن با اتصال به ژن‌های پاسخ‌دهنده



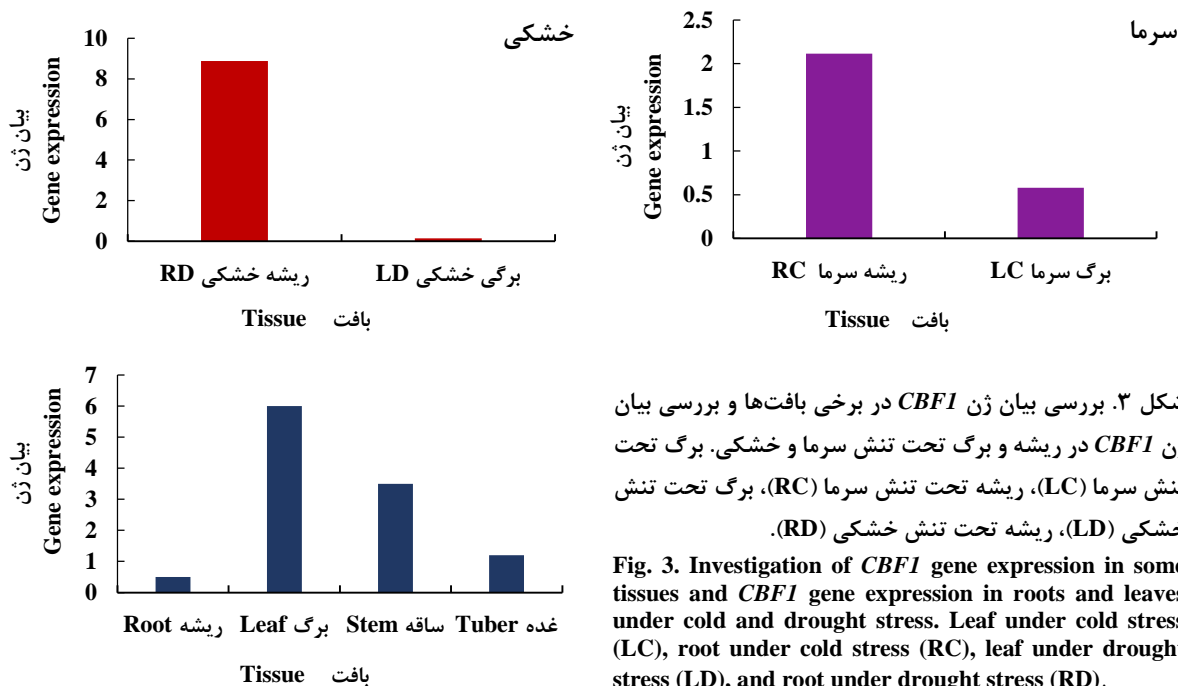
شکل ۲. بررسی هستی‌شناسی فرآیندهای زیستی (BP) و عملکردهای مولکولی (MF) ژن CBF1 توسط نرم‌افزار تحت وب String.

Fig. 2. Ontological analysis (biological processes (BP)) and molecular functions (MF) of the CBF1 gene by String web software

افزایش بیان داشتند (Guo et al., 2019). بر اساس گزارشی که بر روی هلو انجام شد ژن CBF1 در بافت‌های برگ و پوست درخت بیان قابل‌توجهی داشت (Artlip et al., 2013). ژن‌های TaCBF4a, TaICE1d, TaCBF16d و TaICE2b در پنج بافت ریشه، ساقه، برگ، سنبله و دانه افزایش بیان داشتند اما بالاترین سطح بیان مربوط به ژن TaICE2b در بافت ساقه و برگ بوده است (Guo et al., 2019). بر اساس مطالعه‌ای که بر روی انگور انجام شد ژن CBF1 در ریشه، ساقه، برگ و دم برگ افزایش بیان داشت (Dong et al., 2013). سطوح بیان متغیر ژن CBF1 در بافت‌های مختلف نشان‌دهنده آن است که این ژن ممکن است در مورفوژنز و تولید اندام‌زایشی به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم مشارکت داشته باشد.

الگوی بیان ژن CBF1 مخصوص بافت

برای آنالیز بیشتر ویژگی‌ها و عملکرد ژن CBF1، بیان ژن CBF1 در بافت‌های مختلف بررسی شد. الگوی بیان این دو ژن در چهار بافت ریشه، ساقه، برگ و غده با استفاده از qPCR بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده‌شده است، الگوی بیان این ژن متفاوت است. الگوی بیان در بافت برگ و ساقه به میزان ۶ و ۳/۵ برابر افزایش بیشتری نسبت به ریشه و غده داشته است. ژن CBF1 بالاترین بیان را در بافت برگ در بین چهار بافت به خود اختصاص داد، درحالی‌که پایین‌ترین بیان در ریشه و غده به میزان ۰/۵ و ۱/۲ برابر مشاهده شد. مطالعه‌ای که بر روی گندم انجام شد نشان داد که بیشتر ژن‌های CBF1 و CBF2 در برگ، ساقه و گل



شکل ۳. بررسی بیان ژن *CBF1* در برخی بافت‌ها و بررسی بیان ژن *CBF1* در ریشه و برگ تحت تنش سرما و خشکی. برگ تحت تنش سرما (LC)، ریشه تحت تنش سرما (RC)، برگ تحت تنش خشکی (LD)، ریشه تحت تنش خشکی (RD).

Fig. 3. Investigation of *CBF1* gene expression in some tissues and *CBF1* gene expression in roots and leaves under cold and drought stress. Leaf under cold stress (LC), root under cold stress (RC), leaf under drought stress (LD), and root under drought stress (RD).

اساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، ژن *CBF* در تحمل به خشکی و سرما نقش دارد لذا این ژن به‌عنوان فاکتور مهم در تنش خشکی و سرما در سیب‌زمینی به اصلاح‌گران و محققان پیشنهاد می‌شود. این نتایج گویای آن است که عملکرد محافظت‌شده *CBF* در تحمل به خشکی و سرما نقش بسزایی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس تحقیق انجام‌شده مبتنی بر روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی و بیان ژن می‌توان پیشنهاد نمود که ژن *CBF1* به‌عنوان ژن کارآمد در تحمل به تنش خشکی و سرما بوده است. این ژن از طریق تنظیم ژن‌های پایین‌دست و سیس‌المنت‌های موجود در این ژن می‌تواند نقش تأثیرگذاری در تحمل به سرما و خشکی ایفا کند. بر همین اساس این انتظار می‌رود که نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، زمینه انتقال ژن به سیب‌زمینی را فراهم خواهد کرد. مطالعات تکمیلی بیان ژن *CBF1* تحت سایر تنش‌های غیرزیستی در تحقیقات آتی می‌تواند در درک نحوه تعاملات این ژن با سایر ژن‌های مرتبط مفید باشد.

الگوی بیان *CBF1* تحت تنش خشکی و سرما

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان در ریشه تحت تنش خشکی بالاترین بیان نسبی به میزان تقریباً ۹ برابر نسبت به شرایط کنترل داشته است. همچنین همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است. ژن *CBF1* تحت تنش سرما بیان بالاتری به میزان تقریباً ۲ برابر در ریشه نسبت به برگ دارد. تحت تنش خشکی و سرما ۰/۱۵ و ۰/۵۸ برابر نسبت به شرایط نرمال داشته است. میزان بیان در برگ پایین‌تر از ریشه بوده است. مطالعه‌ای که بر روی آرابیدوپسیس انجام شد بیان ژن - های *CBF1-3* در سرما القا شده است و نقش مهمی در تحمل به استرس سرما داشته است (Sakuma et al., 2002)؛ اما در انگور نتایج نشان داد که ژن *CBF1-3* در سرما، تیمار ABA و خشکی افزایش بیان داشتند (Xiao et al., 2006). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی کاساوا انجام شد افزایش بیان *MeCBF1* در تنش سرما وجود دارد (An et al., 2012). ژن‌های *CBF* متعلق به خانواده فاکتور رونویسی AP2/ERF هستند. این ژن‌ها در روز کوتاه و تنش سرمایی در آرابیدوپسیس بیان می‌شوند. ژن *CBF* به عناصر تنظیمی CRT/DRE در ناحیه پروموتری متصل می‌شوند و بیان آن‌ها القا می‌شود (Stockinger et al., 1997). بر

منابع

- Abdullah, S.N.A., Azzeme, A.M., Yousefi, K., 2022. Fine-tuning cold stress response through regulated cellular abundance and mechanistic actions of transcription factors. *Frontiers in Plant Science*. 13, 850216-850216. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850216>
- An, D., Yang, J., Zhang, P., 2012. Transcriptome profiling of low temperature-treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress. *BMC Genomics*. 13, 1-25. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-64>
- Artlip, T.S., Wisniewski, M.E., Bassett, C.L. and Norelli, J.L., 2013. CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. *Tree Physiology*. 33, 866-877. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-64>
- Benedict, C., Skinner, J.S., Meng, R., Chang, Y., Bhalerao, R., Huner, N.P., Finn, C.E., Chen, T.H., Hurry, V., 2006. The CBF1- dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1259-1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01505.x>
- Chen, J.Q., Meng, X.P., Zhang, Y., Xia, M., Wang, X.P., 2008. Over-expression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnology Letters*. 30, 2191-2198. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9811-5>
- Dong, C., Zhang, Z., Ren, J., Qin, Y., Huang, J., Wang, Y., Cai, B., Wang, B., Tao, J., 2013. Stress-responsive gene *ICE1* from *Vitis amurensis* increases cold tolerance in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*. 71, 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.012>
- Feng, H.L., Ma, N.N., Meng, X., Zhang, S., Wang, J.R., Chai, S., Meng, Q.W., 2013. A novel tomato MYC-type *ICE1*-like transcription factor, *SlICE1a*, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*. 73, 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.09.014>
- González-Martínez, S.C., Wheeler, N.C., Ersoz, E., Nelson, C.D., Neale, D.B., 2007. Association genetics in *Pinus taeda* L.I. wood property traits. *Genetics*. 175, 399-409. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061127>
- Guo, J., Ren, Y., Tang, Z., Shi, W., Zhou, M., 2019. Characterization and expression profiling of the *ICE-CBF-COR* genes in wheat. *The Journal of Life and Environment*. 7, 2-19. <https://doi.org/10.7717/peerj.8190>
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Mosuapour, G.A., Ghaffari, M.R., Zienalabedini, M., 2020. Evaluation of drought tolerance of potato (*Solanum Tuberosum* L.) under water deficit. 12, 102-112. <https://doi.org/10.52547/jcb.12.35.102>
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Zeinalabedini, M., Gorji, A.M., Ghaffari, M.R., Shariati, V., Ahmadvand, R., 2022a. Genome-wide identification of StU-box gene family and assessment of their expression in developmental stages of *Solanum tuberosum*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 20, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00306-7>
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat, Z. 2022b. Genome wide identification of 14-3-3 gene family and characterization of their expression in developmental stages of *Solanum tuberosum* under multiple biotic and abiotic stress conditions. *Functional and Integrative Genomics*. 22, 1377-1390. <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00895-z>
- Heidari, P., 2019. Comparative analysis of C-repeat binding factors (CBFs) in tomato and *Arabidopsis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 62, 1-9. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180715>
- Jeknić, Z., Pillman, K.A., Dhillon, T., Skinner, J.S., Veisz, O., Cuesta-Marcos, A., Hayes, P.M., Jacobs, A.K., Chen, T.H., Stockinger, E.J., 2014. Hv-CBF2A overexpression in barley accelerates COR gene transcript accumulation and acquisition of freezing tolerance during cold acclimation. *Plant Molecular Biology*. 84, 67-82. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0119-z>
- Jin, Y.N., Zhai, S., Wang, W., Ding, X., Guo, Z., Bai, L., Wang, S., 2018. Identification of genes from the ICE-CBF-COR pathway under cold stress in *Aegilops-Triticum* composite group and the evolution analysis with those from *Triticeae*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 24, 211-229. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0495-y>

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maestrini, P., Cavallini, A., Rizzo, M., Giordani, T., Bernardi, R., Durante, M., Natali, L., 2009. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). *Journal of Plant Physiology*. 166, 1544-1556. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.03.014>
- Mehrotra, S., Verma, S., Kumar, S., Kumari, S., Mishra, B.N., 2020. Transcriptional regulation and signalling of cold stress response in plants: an overview of current understanding. *Environmental and Experimental Botany*. 180, 104243. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104243>
- Mickelbart, M.V., Hasegawa, P.M., Bailey-Serres, J., 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. 16, 237-251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Shirley, N., Langridge, P., Lopato, S., 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*. 9, 230-249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>
- Nakashima, K., Ito, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology*. 149, 88-95. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129791>
- Park, S., Lee, C.M., Doherty, C.J., Gilmour, S.J., Kim, Y., Thomashow, M.F., 2015. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *The Plant Journal*. 82, 193-207. <https://doi.org/10.1111/tpj.12796>
- Pino, M.T., Skinner, J.S., Jeknić, Z., Hayes, P.M., Soeldner, A.H., Thomashow, M.F., Chen, T.H., 2008. Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environment*. 31, 393-406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01776.x>
- Saidi, A., Hajibarat, Z., 2020. In-silico analysis of eukaryotic translation initiation factors (eIFs) in response to environmental stresses in rice (*Oryza sativa*). *Biologia*. 75, 1731-1738. <https://doi.org/10.2478/s11756-20-00467-1>
- Saidi, A., Hajibarat, Z., Ahmadikhah, A., 2021. Computational analysis of responsive transcription factors involved in drought and salt stress in rice. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 8, 406-413. <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.243913.1272>
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., 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. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>
- Shi, Y., Huang, J., Sun, T., Wang, X., Zhu, C., Ai, Y., Gu, H., 2017. The precise regulation of different *COR* genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 59, 118-133. <https://doi.org/10.1111/jipb.12515>
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 6, 410-417. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00092-x](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00092-x)
- Soltész, A., Smedley, M., Vashegyi, I., Galiba, G., Harwood, W., Vágújfalvi, A., 2013. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 64, 1849-1862. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert050>
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F., 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 1035-1040. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.1035>
- Wang, G., Xu, X., Wang, H., Liu, Q., Yang, X., Liao, L., Cai, G., 2019. A tomato transcription factor, SIDREB3 enhances the tolerance to

- chilling in transgenic tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 142, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.017>
- Wang, L., Cao, H., Qian, W., Yao, L., Hao, X., Li, N., Yang, Y., Wang, X., 2017. Identification of a novel bZIP transcription factor in *Camellia sinensis* as a negative regulator of freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Annals of Botany*. 119, 1195-1209. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx011>
- Welling, A., Palva, E.T., 2008. Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant Physiology*. 147, 1199-1211. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117812>
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarasin, D., 2011. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*. 233, 971-983. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1358-3>
- Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S., Nassuth, A., 2006. Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1410-1421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01524.x>
- Xiao, H., Tattersall, E.A., Siddiqua, M.K., Cramer, G.R., Nassuth, A., 2008. CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, Cell and Environment*. 31, 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01741.x>
- Yao, W., Wang, L., Wang, J., Ma, F., Yang, Y., Wang, C., Tong, W., Zhang, J., Xu, Y., Wang, X., Zhang, C., 2017. VpPUB24, a novel gene from Chinese grapevine, *Vitis pseudoreticulata*, targets VpICE1 to enhance cold tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 68, 2933-2949. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx136>
- Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y., Zhu, J.K., 2016. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 171, 2744-2759. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00533>
- Zhao, J., Shi, M., Yu, J., Guo, C., 2022. SPL9 mediates freezing tolerance by directly regulating the expression of CBF2 in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 22, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03445-8>
- Zhu, J., Dong, C.H., Zhu, J.K., 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.010>