University of Birjand

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6359.2207

*Original article*

# Expression analysis of candidate genes related to winter wheat vernalization

**M. Lotfi Sarabi[1], R. Fotovat[2], E. MohseniFard[2*]**

1. *M.Sc. Graduate of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran*
2. *Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran*

Received 10 June 2023; Accepted 3 July 2023

نسخه پیش از انتشار

## *Extended abstract*

### Introduction

The yield of wheat (*Triticum aestivum* L.), is greatly reduced under environmental stress and decreased temperatures. Therefore, adaptation mechanisms and cold resistance are crucial in this plant. Vernalization is known as one of the essential mechanisms for grain adaptation to environmental conditions, whereby the plant can accelerate the flowering process or flower after a long cold period. Vernalization also plays a significant role in the acquisition of cold resistance in wheat plants. When exposed to low temperatures, certain genes related to vernalization are activated, leading to changes in the plant's physiology and allowing it to a better cold stress tolerance. This process involves complex regulatory mechanisms depending on the cultivar and environmental conditions. Understanding the molecular basis of vernalization and the genes involved in cold resistance could assist in developing new strategies to improve wheat productivity in adverse environments.

### Materials and methods

In this research, we investigated the expression of three genes, *NAC*, *ERF*, and *TCP*, related to vernalization in two wheat cultivars named Baz and NorthStar, which known as spring and winter cultivars, respectively. The plant samples were preserved in growth racks and applied for vernalization treatment after the tillering stage. RNA extraction was performed at this stage. Real-Time PCR technique was then utilized to analyze the gene expression. To better understanding the function of these genes in response to cold stress, the promoter of the three studied genes was analyzed by screening 500 nucleotides upstream of the wheat TSS. The vernalization treatment was applied at two levels of 14 and 21 days and compared to the control plants under 4°C.

### Results and discussion

The results showed that the expression of all three genes (*TCP*, *NAC*, and *ERF*) decreased under the vernalization treatment. However, the expression of the *TCP* and *NAC* genes increased after 14 and 21 days of treatment in the NorthStar and Baz varieties, respectively. In general, the decreased level of expression was shown by increasing in the number of vernalization days. Notably, the expression of the

* Corresponding author: Ehsan Mohseni Fard; E-Mail: mohsenifard.ehsan@znu.ac.ir

© 2024, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

*ERF* gene reduced in both tested varieties with the increased number of vernalization days. This trend was also observed in the expression of the *NAC* gene. However, the vice versa was observed for *NAC* gene in the Baz variety by an increased expression. In the Baz variety, the expression rate of the *TCP* gene decreased with an increase in the number of vernalization days, whereas in the NorthStar variety, the gene expression increased and then decreased after 14 and 21 days of treatment. Based on the abundance and diversity of the identified elements resulting from the analysis of the promoters of the studied genes, 28 types of regulatory elements were identified, many of which are binding sites for transcription factors responding to biotic and abiotic stresses Top of Form.

**Conclusion**

Despite the similarity of the pattern of expression changes of all three genes in the two investigated cultivars, the intensity of the changes in the two cultivars was not same, which could be due to different reactions to cold stress. The results show the complexity of gene expression regulation in wheat vernalization. Additionally, the multiplicity of stress-responsive transcription factor binding sites in the promoter region of these genes could be a justification for the complexity of regulating their expression during vernalization and response to cold stress.

**Keywords:** Gene Expression, Promoters, Transcription Factors, Vernalization

نسخه پیش از انتشار

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences

https://doi.org/10.22077/ESCS.2024.6359.2207

*مقاله پژوهشی*

# بررسی بیان برخی ژن‌های کاندید مرتبط با بهاره‌سازی در گندم زمستانه

**مریم لطفی‌سرابی[1]، رضا فتوت[2]، احسان محسنی‌فرد[2*]**

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

**مشخصات مقاله**

*واژه‌های کلیدی:*
بهاره‌سازی
بیان ژن
پروموتور
فاکتورهای رونویسی

تاریخ دریافت:
۱۴۰۲/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۲/۰۴/۱۲

**چکیده**

**مقدمه: عملکرد گندم نان (*Triticum aestivum* L.)، تحت تنش‌های محیطی و همچنین با کاهش دما به‌شدت کاهش می‌یابد. از سازوکارهای منجر به سازگاری غلات پاییزه به شرایط محیطی، بهاره‌سازی است که طی آن، گیاه پس از گذراندن یک دوره سرمای طولانی‌مدت، قادر به گلدهی و یا تسریع فرآیند گلدهی می‌شود که سازوکارهای مولکولی مربوط به آن همچنان تا حد زیادی ناشناخته هستند. آزمایشی در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار و دو فاکتور شامل دو رقم نورستار و باز و تعداد روزهای بهاره‌سازی ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همراه با گیاهان شاهد انجام شد. تغییرات بیان ژن‌های *NAC*، *ERF* و *TCP* مرتبط با بهاره‌سازی با استفاده از روش Real-Time PCR موردبررسی قرار گرفت. همچنین برای درک بهتر پاسخ ژن‌ها به سرما، پروموتور این سه ژن مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. بیان هر سه ژن تحت تیمار بهاره‌سازی رفتار کاهشی نشان داده و فقط بیان ژن *TCP* تحت ۱۴ روز تیمار بهاره‌سازی در رقم نورستار و نیز ژن *NAC* تحت ۲۱ روز تیمار در رقم باز افزایش بیان را نشان دادند. به‌طورکلی با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی میزان بیان ژن‌ها کاهش یافت. همچنین با تجزیه‌وتحلیل پروموتورهای ژن‌های موردمطالعه، ۲۸ نوع عنصر تنظیمی شناسایی شد که تعداد زیادی از آن‌ها محل اتصال فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند. علی‌رغم تشابه الگوی تغییرات بیانی هر سه ژن در دو رقم موردبررسی، شدت تغییرات در دو رقم یکسان نبوده که می‌تواند ناشی از عکس‌العمل متفاوت به تنش سرمایی باشد. نتایج نشان‌دهنده پیچیده بودن تنظیم بیان ژن‌ها در بهاره‌سازی گندم بوده که تعدد محل اتصال فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش‌ها در ناحیه پروموتوری این ژن‌ها می‌توانند توجیهی بر پیچیدگی تنظیم بیان آن‌ها در طول دوره بهاره‌سازی و پاسخ به تنش سرمایی باشند.**

## مقدمه

غلات یک منبع غذایی اصلی برای مردم جهان هستند. در میان آن‌ها گندم *Triticum aestivum* L. بیشترین سطح زیر کشت میان غلات را به خود اختصاص داده و یکی از ارکان اصلی امنیت غذایی به‌شمار می‌رود که ۲۰ درصد از کالری و بخشی از پروتئین جمعیت جهان را تأمین می‌کند (Dowla et al., 2018). گندم نان به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های ژنتیکی متفاوت، انعطاف‌پذیری فنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌ها و داشتن ارقامی با تیپ‌های رشدی مختلف، در تمام دنیا کشت می‌شود اما توسط عوامل مختلف محیطی به‌شدت محدود می‌شود. ازجمله این عوامل را می‌توان به خشکی، شوری و دمای پایین (سرما و یخزدگی) اشاره کرد که نقش بسزایی در کاهش تولید محصولات کشاورزی در جهان دارند (Mishra et al., 2011). دمای پایین عامل اصلی محدودکننده بهره‌وری کشاورزی و توزیع جغرافیایی بسیاری از گونه‌ها، ازجمله محصولات مهم کشاورزی ازجمله گندم است (Ait Barka and Audran, 1997). بیشتر غلات معتدل چه ارقام

* نگارنده پاسخگو: احسان محسنی‌فرد. پست الکترونیک: mohsenifard.ehsan@znu.ac.ir

بهاره چه زمستانه، نوعی مقاومت نسبت به دماهای مختلف سرما نشان می‌دهند که این موضوع یا ناشی از ویژگی و خصوصیات آن‌ها است یا به‌دلیل قرار گرفتن در معرض سرما و یخزدگی حاصل شده است (Jan and Andrabi, 2009). گیاهان برای پاسخ مناسب به کاهش دما، بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش‌های سرمایی را فعال می‌کنند (Seki et al., 2003). تصور می‌شود این ژن‌ها یا در اثر سرما یا در شرایط کم‌آبی ناشی از تنش سرما القا می‌شوند (Griffith and Yaish, 2004). بسیاری از این ژن‌ها توسط تجزیه‌وتحلیل ترنسکریپتوم شناسایی شده‌اند (Winfield et al., 2010).

یکی از فرآیندهای منجر به سازگاری غلات زمستانه به شرایط محیطی، بهاره‌سازی است. بهاره‌سازی فرآیندی است که به‌واسطه‌ی قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض سرما، گلدهی را ارتقا می‌دهد و مانع گلدهی زودرس یا در دوره‌ی گرمایی زمستان می‌شود که این امر گیاهان را از خسارت ناشی از تنش سرما مصون نگاه می‌دارد (Amasino, 2005). درواقع بهاره‌سازی ابزاری برای جلوگیری از تولیدمثل زودهنگام در اواخر فصل رشد است و در عوض اطمینان حاصل می‌کند که تولید بذر تا آغاز فصل رشد بعدی شروع نمی‌شود، بنابراین بذر زمان کافی برای رسیدن به بلوغ را دارد. در گونه‌های گیاهی خاص، نقش بهاره‌سازی، سرکوب بیان ژن‌هایی است که مهارکننده‌های گلدهی را کد می‌کنند (Amasino, 2005). ارقام زمستانه گندم مقاوم هستند و برخلاف گونه‌های حساس و بهاره (که نیاز بهاره‌سازی آن‌ها بسیار اندک است)، به بهاره‌سازی نیاز دارند (Winfield et al., 2010).

دامنه درجه حرارت‌های مؤثر بر تأمین نیاز بهاره‌سازی گندم بین صفر تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد است. این فرآیند در جوانه‌ها صورت گرفته و عوامل مؤثر بر آن شامل شدت و مدت سرما، روش سرمادهی، ژنوتیپ و هورمون‌های رشد می‌باشند. (Rawson et al., 1998; Rosenzweig and Tubiello, 1996). بسیاری از فرآیندهای سازگاری توسط بیان ژن‌های پاسخگو به تنش، تنظیم می‌شوند (Lawlor and Paul, 2014). فاکتورهای رونویسی که خانواده متنوعی از پروتئین‌های تنظیم‌کننده حاوی دامنه اتصال به DNA هستند، با تنظیم بیان ژن از طریق برهم‌کنش با عناصر سیس (cis-elements) در نواحی پروموتور ژن‌های پایین‌دست مختلف، نقش مهمی در جنبه‌های مختلف فرآیندهای سلولی ایفا می‌کنند (Agrawal and Jha, 2010). مطالعات قبلی گروهی از فاکتورهای رونویسی که در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی ناشی از تنش و شبکه‌های تنظیمی در گیاهان عالی نقش دارند را کشف کردند که در میان آن‌ها می‌توان به ژن‌های *AP2/ERF*، *MYB*، *bZIP*، *TCP* و *NAC* اشاره کرد (Gahlaut et al., 2016; Wang et al., 2016).

فاکتورهای رونویسی TCP (Teosinte Branched1, Cycloidea, Proliferating Cell Factor) خانواده‌ای از پروتئین‌های اختصاصی گیاهان هستند که نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش ایفا می‌کنند (Feng et al., 2018). این فاکتورها در تنظیم ریتم‌های شبانه‌روزی، بیوسنتز و مسیرهای پیام‌رسانی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و پاسخ به محرک‌های محیطی نقش دارند (Giraud et al., 2010; Lei et al., 2017). معمولاً انتهای آمین این دسته از فاکتورهای رونویسی دارای یک دامنه بسیار حفاظت‌شده TCP می‌باشند که حاوی ساختار پایه مارپیچ-حلقه-مارپیچ (bHLH) است که در اتصال به DNA، برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و جایابی هسته‌ای پروتئین نقش دارند (Kosugi and Ohashi, 2002). فاکتورهای رونویسی TCP در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاهان ازجمله شاخه‌دهی، رشد گل، رشد گامت نر و ماده، رشد و پیری برگ نقش دارند (Fang et al., 2021). فاکتورهای رونویسی TCP در تنظیم ریتم‌های شبانه‌روزی، بیوسنتز و مسیرهای پیام‌رسانی اسید جاسمونیک، اکسین، جیبرلین و سایر هورمون‌ها و پاسخ به محرک‌های محیطی گونه‌های مختلف نیز نقش دارند (Giraud et al., 2010; Lei et al., 2017). به‌طور مثال بیش بیان ژن *TCP* در آرابیدوپسیس به‌طور قابل‌توجهی مقاومت به خشکی و گرما در طول استقرار گیاهچه را افزایش می‌دهد (Mukhopadhyay and Tyagi, 2015). در برنج نیز بیش بیان ژن *TCP* منجر به ناهنجاری‌های رشدی مانند تشکیل کمتر ریشه‌های جانبی و همچنین افزایش مقاومت به تنش شده‌است (Mukhopadhyay and Tyagi, 2015).

خانواده AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-responsive factors) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان است که تقریباً ۹ درصد از کل ژن‌های فاکتورهای رونویسی گیاهی شناخته‌شده را تشکیل می‌دهد (Mizoi et al., 2012). طبق گزارش‌ها فاکتورهای رونویسی ERF در تنظیم رشد گل، تخمک و بذر

و همچنین توانایی حفظ مریستم نقش دارند (Trupiano et al., 2013). در چند دهه گذشته، فاکتورهای رونویسی خانواده ERF توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند، زیرا بیان بیش‌ازحد آن‌ها در گیاهان تراریخته، می‌تواند مقاومت به تنش غیرزیستی را بهبود بخشد (Li et al., 2014). همچنین گزارش شده‌است فاکتورهای رونویسی ERF می‌توانند باعث تجمع پرولین شوند. به‌عنوان مثال، در برنج بیش بیان ژن *osERF71*، سنتز پرولین را در شرایط تنش خشکی، تنظیم و منجر به تجمع پرولین می‌شود (Lee et al., 2016). ازطرفی بیش بیان ژن *VaERF3* در آرابیدوپسیس سطح تجمع پرولین و مقاومت به شوری را افزایش داد (Li et al., 2020). گزارش شده‌است بیش بیان ژن *ERF* مقاومت به یخزدگی، خشکی و شوری بالا در آرابیدوپسیس را بهبود می‌بخشد (Mizoi et al., 2012).

فاکتورهای رونویسی ERF بسیاری از عملکردهای کلیدی مانند رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را تنظیم می‌کنند؛ بنابراین روشن کردن سازوکارهای انتقال پیام‌های (سیگنال) تنش به‌منظور دست‌کاری تنظیم ژن *ERF* برای بهبود مقاومت به تنش گیاهان، بسیار مهم است (Xu et al., 2008).

خانواده NAC (NAM, ATAF1/2, and CUC2) نیز از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی اختصاصی گیاهان است (Sablowski and Meyerowitz, 1998). فاکتورهای رونویسی NAC فرآیندهای رشد و نمو گیاه ازجمله تشکیل دیواره ثانویه سلول‌های گیاه و آوند چوبی، رشد ریشه، رسیدن میوه و پیری برگ را تنظیم می‌کنند (Marques et al., 2017). بسیاری از مطالعات نشان دادند فاکتورهای رونویسی NAC نه‌تنها در رشد و نمو گیاهان نقش دارند بلکه می‌توانند به تنش‌های غیرزیستی متعددی پاسخ دهند (Marques et al., 2017). فاکتورهای رونویسی NAC با فعال کردن ژن‌های پایین‌دست پاسخگو به تنش خشکی، مقاومت به خشکی و همچنین عملکرد در شرایط خشکی را افزایش می‌دهند (He et al., 2022). بیش بیان ژن *NAC* در آرابیدوپسیس و گوجه‌فرنگی از طریق مسیر پیام‌رسانی آبسیزیک اسید، مقاومت به خشکی را افزایش می‌دهد (Tran et al., 2004; Wang et al., 2016). همچنین بیش بیان ژن *NAC* در گندم منجر به افزایش مقاومت به خشکی و فعال‌سازی ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش می‌شود (Mao et al., 2022). در سیب نیز ژن *NAC* در پاسخ به سرما از طریق تنظیم ژن‌های *CBF* نقش دارد (An et al., 2018).

شناسایی ژن‌های تأثیرگذار در پاسخ گیاهان به تنش به‌تنهایی گویای تمامی زوایای پیچیده این پاسخ نیست و نحوه تنظیم بیان و چگونگی این تنظیم از مهم‌ترین چالش‌ها در این رابطه است. لذا بررسی ناحیه پروموتوری ژن‌های پاسخگو به تنش ازنظر وجود عناصر تنظیمی مختلف برای درک چگونگی تنظیم پاسخ اهمیت زیادی دارد (Kidokoro et al., 2022). عناصر تنظیمی که به‌عنوان محل اتصال فاکتورهای رونویسی در مناطق پروموتور ژن عمل می‌کنند، نقش کلیدی در میزان بیان ژن‌ها از طریق ایجاد ارتباط هم‌زمانی بیان در ژن‌های مختلف ایفا می‌کنند (Biłas et al., 2016). فاکتورهای رونویسی سرکوب یا فعال شدن ژن هدف را در شرایط متفاوت با تعامل با سایر عناصر تنظیمی و ماشین‌های رونویسی پایه واسطه‌گری می‌کنند. ازاین‌رو، شناسایی مناطق تنظیمی در بالادست هر ژن، گامی مهم در جهت درک منطق رونویسی بیان آن ژن است (Kakei et al., 2021).

در این پژوهش به بررسی اثر سرما و طول دوره بهاره‌سازی بر میزان بیان سه ژن *AP2/ERF*، *NAC-Domain Protein* و *TCP* در دو رقم بهاره (باز) و زمستانه (نورستار) گندم نان با استفاده از روش Real-Time PCR و همچنین تجزیه‌وتحلیل پروموتور ژن‌های موردبررسی برای درک بهتر عملکرد آن‌ها در پاسخ به تنش، پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ گندم شامل رقم بهاره باز با تیپ رشدی زودرس و رقم زمستانه گندم با تیپ رشدی دیررس و نیاز طولانی‌مدت به بهاره‌سازی (۴۲ روز)، استفاده شده است (جدول ۱).

آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار و دو فاکتور شامل رقم در دو سطح (نورستار و باز) و تعداد روزهای بهاره‌سازی در دو سطح (۱۴ و ۲۱ روز) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همراه با گیاهان شاهد در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شد.

جدول ۱. خصوصیات گیاهی ارقام گندم مورد آزمایش

**Table 1. Plant characteristics of tested wheat cultivars**

| ارقام گندم<br>Wheat cultivars | منشأ<br>Origin | سال معرفی<br>Introduction year | عملکرد دانه<br>Grain yield<br>kg.ha$^{-1}$ | ارتفاع بوته<br>Plant height<br>cm | رسیدگی<br>Maturity | رفتار رشدی<br>Growth type |
|---|---|---|---|---|---|---|
| باز<br>**Baz** | هندوستان<br>**India** | 1985 | 4500 | 95 | زودرس<br>Early | بهاره<br>S |
| نورستار<br>**Norstar** | کانادا<br>**Canada** | 1977 | 3700 | 52.9 | دیررس<br>Late | زمستانه<br>W |

انتخاب سطوح تیمار سرما بر اساس مطالعه انجام‌شده توسط چینکوانکو و همکاران صورت گرفت (Laudencia-Chingcuanco et al., 2011). بذرهای هر دو رقم گندم پس از کشت در گلدان‌ها به مدت ۱۴ روز در قفسه‌های رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. آبیاری در اوایل رشد با آب مقطر به‌صورت روزانه و پس از پنجه‌زنی با فواصل یک روز در میان با محلول هوگلند صورت گرفت. گیاهان شاهد تا ظهور برگ پرچم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در قفسه‌های رشد قرار داده شدند. سایر نمونه‌های گیاهی برای اعمال تیمار بهاره‌سازی به مدت ۱۴ و ۲۱ روز به انکوباتور با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در هر سطح از تیمار بهاره‌سازی و گیاهان شاهد از اندام هوایی هر تیمار، سه تکرار و در هر تکرار سه بوته نمونه‌برداری شد و بلافاصله در ازت مایع قرار داده شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA کل در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA مطابق دستورالعمل و با استفاده از روش مجیدی و همکاران (۱۳۹۲) انجام گرفت. سپس به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA کل استخراج شده از آنزیم DNase، RNase free شرکت ندای فن طبق دستورالعمل ارائه‌شده شرکت استفاده شد. همچنین سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer مدل NANODROP 200 (شرکت Thermo Scientific) انجام شد. توالی نوکلئوتیدی سه ژن *AP2/ERF*، *NAC* و *TCP* از پایگاه داده NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) اخذ شد و آغازگرهای رفت‌وبرگشت اختصاصی هر سه ژن توسط نرم‌افزار Primer Primer 5 مطابق جدول ۲ طراحی شدند. همچنین مطابق با مقاله پاولاسی و همکاران (Paolacci et al., 2009) ژن *RLI* به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب شد.

جدول ۲. آغازگرهای مورداستفاده برای ژن‌های موردبررسی

**Table 2. Primers used for the investigated genes**

| نام ژن<br>Gene name | شماره دسترسی<br>Accession number | | توالی آغازگر<br>Primer sequence<br>5′ ⇒ 3′ | دمای اتصال<br>Annealing Temperature<br>°C | طول فراورده حاصل از تکثیر<br>Length of product |
|---|---|---|---|---|---|
| ***NAC*** | XM_044508468.1 | Forward<br>Reverse | GACGAGGAGCTGGTGATGT<br>TCCACGGCTCGAACTTGTA | 60 | 103 |
| ***ERF*** | XM_044506181.1 | Forward<br>Reverse | CAACGCCAGGCTCAACTTC<br>GTCAATAACAACGAACGGTGTC | 60 | 88 |
| ***TCP*** | XM_044494245.1 | Forward<br>Reverse | CGCACGTCGATGACAAGTT<br>TGTATGGCATCCCGCTGTT | 60 | 180 |
| ***RLI*** | AY059462.1 | Forward<br>Reverse | GATGAGCCAAGTGCATATCTCG<br>CTTGTCCGCTAAGTAGGTTGC | 60 | 138 |

به‌منظور انجام واکنش رونویسی معکوس و ساخت cDNA (Complementary DNA) از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز آزما و دستورالعمل ارائه‌شده، استفاده شد. تکثیر cDNA به روش Real-Time PCR در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان انجام شد. برای این کار از دستگاه BIONEER و MasterMix شرکت یکتا تجهیز آزما با نام SYBER Green qPCR Mix 2X طبق پروتکل مربوطه استفاده شد. اجزای واکنش شامل ۱۰

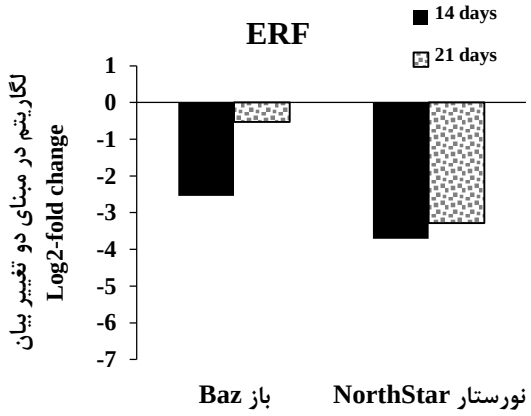
میکرولیتر SYBER Green qPCR Mix 2X، ۰/۸ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای رفت‌وبرگشت و ۳ میکرولیتر از محلول cDNA (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. سپس نمونه‌های تهیه‌شده که شامل سه تکرار زیستی همراه دو تکرار تکنیکی برای هر تیمار بود، در دستگاه Real-Time PCR قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی واکنش PCR شامل یک چرخه دمای C95° درجه به مدت ۳ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و سپس ۱۵ ثانیه دمای ۹۵، ۳۵ ثانیه دمای ۶۰ و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۴۰ سیکل بودند. درنهایت داده‌های حاصل از qRT-PCR به روش تجزیه‌وتحلیل و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند. جهت آزمون معنی‌داری بیان ژن‌ها از روش Bootstrapping و نرم‌افزار REST 2009 استفاده شده‌است. به دلیل تغییر بیان بسیار زیاد برخی ژن‌ها، برای سهولت نمایش در نمودارها از لگاریتم در مبنای دو تغییر بیان استفاده شد. با هدف شناسایی عناصر تنظیمی در بالادست ژن‌های موردمطالعه، پس از انجام آزمایش‌های مولکولی، تجزیه‌وتحلیل پروموتور این ژن‌ها با دانلود ۵۰۰ نوکلوتید بالادست TSS (محل شروع رونویسی) ژن‌های *ERF*، *NAC* و *TCP* گندم از پایگاه Gramene (https://www.gramene.org/) انجام شد. شناسایی و توصیف موتیف‌ها با استفاده از ابزارهای تجزیه‌وتحلیل آنلاین پروموتورهای گیاهی PlantPAN (http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/index.html) و PlantCAR (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html) و پایگاه اطلاعاتی فاکتورهای رونویسی گیاهی PlantTFDB (http://planttfdb.gao-lab.org) انجام گرفت.

## نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه به‌طورکلی تیمار بهاره‌سازی منجر به کاهش بیان ژن *ERF* در گیاهچه‌های گندم هر دو رقم باز و نورستار شد (شکل ۱)، به‌طوری‌که در رقم زمستانه نورستار بیان ژن *ERF* کاهش بیشتری نسبت به رقم بهاره باز داشته است. بیان این ژن در رقم باز پس از اعمال تیمار بهاره‌سازی به مدت ۱۴ روز، حدود ۳ برابر کاهش و پس از ۲۱ روز کمتر از ۱ برابر کاهش یافت که البته این کاهش بیان معنی‌دار نبود. این ژن در رقم زمستانه نورستار پس از ۱۴ روز اعمال تیمار سرما نزدیک ۴ برابر و پس از ۲۱ روز ۳ برابر کاهش بیان معنی‌داری را نشان داد. شدت کاهش بیان این ژن در هر دو رقم گندم با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی از ۱۴ به ۲۱ روز کاهش یافت. طبق مطالعات انجام‌شده، مشخص شده‌است که ژن‌های *ERF* هم در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و هم در تنظیم رشد و نمو گیاهان نقش دارند (Nakano et al., 2006). در مطالعه دونگ و همکاران یک ژن *ERF* در گندم شناسایی شد که به‌عنوان سرکوب‌کننده رونویسی در پاسخ به تنش شوری، مستقل از ABA عمل می‌کند (Dong et al., 2012). همچنین گزارش شده‌است ژن *ERF*، بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی را تنظیم می‌کند و با کاهش سطح بیان، در پیام‌رسانی تنش گرما و خشکی نقش دارد (Ohama et al., 2017).

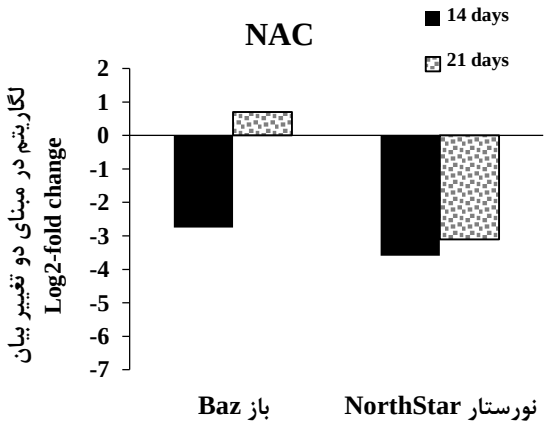
با اعمال تیمار بهاره‌سازی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، بیان ژن *NAC* در گیاهچه‌های گندم دو رقم نورستار و باز با یکدیگر متفاوت بود و در تمام موارد تغییرات بیان معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۲). به‌طوری‌که پس از اعمال تیمار بهاره‌سازی به مدت ۱۴ روز در رقم باز، بیان ژن ۳ برابر کاهش یافت. درصورتی‌که با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی به مدت ۲۱ روز، بیان این ژن کمتر از ۱ برابر افزایش یافت. این نتیجه در رقم نورستار گندم کاملاً متفاوت بوده و بیان ژن *NAC* تحت هر دو تیمار بهاره‌سازی کاهش چشمگیری داشت. بیان ژن *NAC* پس از تیمار بهاره‌سازی به مدت ۱۴ روز ۴ برابر و پس از ۲۱ روز کمتر از ۴ برابر کاهش یافت. با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی بیان ژن کاهش یافت که حتی در رقم باز شاهد افزایش بیان ژن *NAC* بودیم. در مطالعه‌ای میزان بیان ژن *NAC* در اندام‌های زمینی و هوایی گیاه عدس تحت تیمارهای ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش سرما، اندازه‌گیری شد که نشان داد با افزایش مدت تنش روند بیان ژن یکسان نبوده و در اندام زمینی با افزایش ساعات تنش میزان بیان به‌شدت کاهش یافت؛ اما در اندام هوایی در ساعات اولیه تنش ابتدا میزان بیان کاهش‌یافته و با افزایش مدت‌زمان تنش و خوگیری گیاه به سرما، مجدداً میزان بیان افزایش یافت (Farokhpour et al., 2019). در مطالعه‌ای در سویا نیز نشان داده شد که این ژن در پاسخ به دمای پایین نقش دارد و بیش بیان آن مقاومت به دمای پایین را افزایش می‌دهد (Hao et al., 2011). همچنین گزارش شده‌است ژن *NAC* در تنظیم ژن‌های مهارکننده گونه‌های

اکسیژن فعال (ROS) و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در تنش‌های غیرزیستی در گیاه تنباکو و پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی و سرما در گیاه توتون نقش دارد (Jin et al., 2013).




**شکل ۱. نمودار تغییر بیان ژن ERF در دو رقم و تیمار مختلف**

**Fig. 1. Differential expression of ERF gene in two cultivars and different treatments**




**شکل ۲. نمودار تغییر بیان ژن *NAC* در دو رقم و تیمار مختلف**

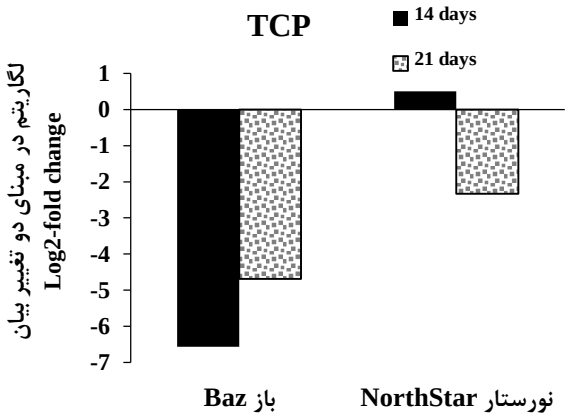
**Fig. 2. Differential expression of *NAC* gene in two cultivars and different treatments**

تغییرات بیان ژن *TCP* در دو رقم باز و نورستار گندم طی تیمارهای بهاره‌سازی، بسیار متفاوت بود و البته تغییرات بیان مشاهده‌شده در مورد این ژن نیز تماماً معنی‌دار بودند. (شکل ۳). به‌طوری‌که پس از اعمال ۱۴ روز تیمار بهاره‌سازی در رقم بهاره باز، کاهش بیان بسیار چشمگیری در حدود ۶/۵ برابر در بیان این ژن مشاهده شد درصورتی‌که در رقم زمستانه نورستار بیان ژن *TCP* پس از ۱۴ روز بهاره‌سازی کمی کمتر از ۱ برابر افزایش یافت. همین‌طور پس از تیمار بهاره‌سازی به مدت ۲۱ روز، ژن *TCP* در رقم باز ۴/۵ برابر کاهش یافت ولی در رقم نورستار ۲/۵ برابر کاهش بیان را نشان داد. این اختلاف می‌تواند ناشی از مقاومت رقم زمستانه نورستار به سرما باشد. در مطالعه‌ای گزارش شد افزایش بیان ژن *TCP* منجر به تغییرات فنوتیپی در گیاهان ازجمله افزایش اندازه گیاه و به‌خصوص اندازه برگ‌ها و افزایش ضخامت آن‌ها می‌شود (Sarvepalli and Nath, 2011). طبق مطالعات انجام‌شده، گزارش شده‌است که ژن‌های *TCP* در مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی، فتوپریود، شروع رونویسی، فرآیندهای تشکیل ریبوزوم، تاخوردگی پروتئین‌ها، تنظیم رشد برگ و ایمنی گیاه نقش دارند (Liu et al., 2019). همچنین طی آزمایش انجام‌شده روی برنج، مشاهده شد که بیان ژن‌های *TCP* تحت تنش سرما به‌شدت القا می‌شوند و از طرفی بیش بیان miR319 موجب کاهش و سرکوب بیان این ژن تحت تنش سرما شد؛ بنابراین نتیجه گرفته شد که این ژن در پاسخ گیاه به تنش سرما نقش دارد. علاوه بر این برنج‌های تراریخته با ژن TCP را به همراه برنج شاهد به مدت ۷ و ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد برنج‌های تراریخته پس از ۱۰ روز از نظر فنوتیپی سبز باقی‌مانده و رشدشان ادامه یافت اما گیاهان شاهد بعد از تنش سرما دچار پژمردگی و تاشدگی برگ‌ها شدند (Wang et al., 2014).

گیاهان برای پاسخ به تنش، به ارتباط تعاملی بین مسیرهای پیام‌رسانی متعدد ازجمله سرما، گرما و همچنین شبکه‌های پیام‌رسانی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) نیاز دارند. ازجمله مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی که نقش مهمی در تنظیم پاسخ به تنش سرما در سطح مولکولی دارند می‌توان به MYB (Myeloblastosis)، bHLH (Basic helix-loop-helix)، NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2)، WRKY و bZIP (Basic leucine zipper) اشاره کرد (Abdullah et al., 2022). در این مطالعه نیز عناصر تنظیمی محل اتصال این فاکتورهای رونویسی در بالادست هر سه ژن *ERF*، *NAC* و *TCP* با فراوانی و پراکنش متفاوت شناسایی شد و نتایج نشان‌دهنده تنوع بسیار زیاد عناصر شناسایی‌شده در بالادست این سه ژن بود. درمجموع ۲۸ نوع عنصر تنظیمی در ناحیه ۵۰۰ نوکلئوتید بالادست این ژن‌ها شناسایی شدند. مقایسه این عناصر تنظیمی نشان داد که بسیاری از آن‌ها در هر سه ژن یکسان هستند و برخی فقط در بالادست یکی از ژن‌ها وجود داشتند. عناصر تنظیمی محل

اتصال فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به شرایط مختلف مانند تنش‌های زیستی و غیرزیستی، پیام‌رسانی، رشد، تنظیم هورمونی و پاسخ به نور هستند. تجزیه‌وتحلیل عناصر تنظیمی شناسایی‌شده نشان داد که تعداد عناصر تنظیمی مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی بیشتر از سایر شرایط است. فراوان‌ترین عنصر تنظیمی در این مطالعه، محل اتصال فاکتورهای رونویسی خانواده TCP بود. خانواده فاکتور رونویسی TCP در انواع گونه‌های گیاهی در فرآیندهای مختلفی ازجمله جوانه‌زنی بذر تا تشکیل گل و میوه به‌عنوان تنظیم‌کننده نقش دارند. این فاکتورهای رونویسی، تنظیم‌کننده‌های حیاتی رشد هستند که سیگنال‌های مختلف درون‌زا و محیطی را به پاسخ‌های رشد ترجمه می‌کنند تا از بهترین نمود گیاه اطمینان حاصل شود (Danisman, 2016). از مهم‌ترین عناصر تنظیمی دیگر می‌توان به عناصر تنظیمی محل اتصال فاکتورهای رونویسی B3، MYB، bHLH، bZIP اشاره کرد. علاوه بر این، برخی دیگر از عناصر تنظیمی مهم که در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند،

در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. فاکتورهای MYB خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که اختصاصی گیاهان نبوده و در طیف وسیعی از موجودات شناسایی شده‌اند. این فاکتورها در انتقال سیگنال هورمونی و مقاومت به تنش غیرزیستی نقش دارند (Zhang et al., 2018).




**شکل ۳. نمودار تغییر بیان ژن *TCP* در دو رقم و تیمار مختلف**

**Fig. 3. Differential expression of *TCP* gene in two cultivars and different treatments**

**جدول ۳. فراوانی حضور عناصر تنظیمی مهم در بالادست ژن‌های *ERF*، *NAC* و *TCP* (شدت رنگ، فراوانی بیشتر عنصر تنظیمی را نشان می‌دهد)**

**Table 3. distribution of frequencies of critical regulatory elements upstream of *ERF*, *NAC*, and *TCP* genes (color intensity indicates a higher frequency of regulatory element).**

| | *TCP* | *B3* | *bHLH* | *bZIP* | *NF-YB* | *TALE* | *AP2* | *Myb* | *SBP* | *TBP* | *CG-1* | *AT-Hook* | *GATA* | *C2H2* | *ERF* | *LEA_5* | *NAC* | *WRKY* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *ERF* | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *NAC* | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *TCP* | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ابرخانواده AP2 توسط دامنه‌ای متشکل از حدود ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینه متمایز می‌شود. نشان داده شده‌است که این فاکتورهای رونویسی عملکردهای مهمی در تنظیم رونویسی انواع فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با رشد و توسعه و همچنین پاسخ‌های مختلف به محرک‌های محیطی دارند (Nakano et al., 2006). فاکتورهای رونویسی WRKY بسیاری از فرآیندهای گیاهان، مانند پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، پیری، خواب و جوانه‌زنی بذر و برخی فرآیندهای رشدی را تنظیم می‌کنند (Rushton et al., 2010). bHLHها ژن‌های هدف خود را با اتصال به مکان‌های اختصاصی روی پروموتور آن‌ها، تنظیم می‌کنند و در نتیجه انواع فرآیندهای رشدی و متابولیکی گیاه مانند فتومورفوژنز، القای گلدهی، اجتناب از سایه و بیوسنتز متابولیت ثانویه را هدایت می‌کنند. این فرآیندها برای ارتقاء مقاومت یا سازگاری گیاه به شرایط نامطلوب مهم هستند (Guo et al., 2021).

ابرخانواده B3 فاکتورهای رونویسی اختصاصی گیاهان هستند که به‌خوبی شناخته‌شده‌اند و از مهم‌ترین خانواده‌های زیرمجموعه آن می‌توان به خانواده فاکتور پاسخ‌دهنده به اکسین (ARF) اشاره کرد که این فاکتورهای رونویسی علاوه بر اینکه برای سازگاری و بقاء گیاه در طول تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی مفید هستند، در جنبه‌های مختلف رشد گیاه نیز نقش مهمی دارند. همچنین مشخص شده‌است که اعضای این خانواده در مسیرهای مختلف انتقال سیگنال مرتبط با هورمون، ازجمله اسید آبسیزیک (ABA)، اتیلن،

سیتوکینین و جاسمونات‌ها (JAs) درگیر هستند (Verma and Bhatia, 2019).

## نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی بهاره‌سازی منجر به کاهش بیان چشم‌گیر ژن‌های موردبررسی در این پژوهش شده‌است. بررسی اثر تیمار بهاره‌سازی بر میزان بیان سه ژن *ERF*، *NAC* و *TCP* در دو رقم باز و نورستار نشان داد که علاوه بر سرما طول مدت‌زمان بهاره‌سازی نیز بر میزان بیان ژن‌های موردمطالعه تأثیرگذار بوده است. اگرچه روند تغییرات بیان ژن‌های موردبررسی در هردو رقم تقریباً مشابه بود و با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی از ۱۴ به ۲۱ از شدت کاهشی بودن الگوی بیان در هردو رقم کاسته می‌شود؛ بااین‌وجود میزان بیان ژن‌ها در دو رقم متفاوت بود که می‌تواند به علت پاسخ متفاوت به تنش سرمایی باشد. از سازوکارهای دخیل در تنظیم بیان ژن‌ها وجود عناصر تنظیمی متنوع در بالادست ژن‌ها است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تعداد زیادی عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در ناحیه پروموتوری این ژن‌ها حضور دارند که می‌تواند تا حدی گویای پیچیدگی تنظیم بیان این ژن‌ها تحت شرایط تنش باشند. در نهایت، می‌توان گفت اگرچه پاسخ این ژن‌ها در این مطالعه و مطالعات قبلی گویای نقش آن‌ها در بهاره‌سازی است بااین‌وجود سازوکارهای مولکولی تنظیم بیان و اثر این ژن‌ها و همچنین فرآیندهایی ازجمله برهم‌کنش این ژن‌ها با سایر ژن‌ها و هورمون‌های دخیل در پاسخ به تنش نیازمند مطالعات بیشتری است.


## *سپاسگزاری*

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان به دلیل یاری در انجام بخشی از مراحل این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.


## 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. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850216

Agrawal, P., Jha, B., 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. Biologia Plantarum. 54, 201–212. https://doi.org/10.1007/s10535-010-0038-7

Ait Barka, E., Audran, J., 1997. Response of champenoise grapevine to low temperatures: changes of shoot and bud proline concentrations in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. Journal of Horticultural Science. 72, 577-582. https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515546

Amasino, R.M., 2005. Vernalization and flowering time. Current opinion in biotechnology. 16, 154-158. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.004

An, J.-P., Li, R., Qu, F.-J., You, C.-X., Wang, X.-F., Hao, Y.-J., 2018. An apple NAC transcription factor negatively regulates cold tolerance via CBF-dependent pathway. Journal of Plant Physiology. 221, 74-80. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.12.009

Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., Kononowicz, A.K., 2016. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 127, 269-287. https://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7

Danisman, S. 2016. TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. Frontiers in Plant Science. 7, 1930. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01930

Dong, W., Ai, X., Xu, F., Quan, T., Liu, S., Xia, G., 2012. Isolation and characterization of a bread wheat salinity responsive ERF transcription factor. Gene. 511, 38-45. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.039

Dowla, M. N. U., Edwards, I., O'Hara, G., Islam, S., Ma, W., 2018. Developing wheat for improved yield and adaptation under a changing climate: optimization of a few key genes. Engineering. 4, 514-522. https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.06.005

Fang, Y., Zheng, Y., Lu, W., Li, J., Duan, Y., Zhang, S., Wang, Y., 2021. Roles of miR319-

regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. The Crop Journal. 9, 17-28. https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.07.007

Farokhpour, B., Ismaili, A., Eisvand, H.R., Sohrabi, S.M., 2019. Analysis of gene expression pattern of some members of *NAC* gene family in lentil (*Lens culinaris* M.) under cold stress. Agricultural Biotechnology Journal. 10, 111-131. [In Persian with English Summary]

Feng, Z.-J., Xu, S.-C., Liu, N., Zhang, G.-W., Hu, Q.-Z., Gong, Y.-M., 2018. Soybean TCP transcription factors: Evolution, classification, protein interaction and stress and hormone responsiveness. Plant Physiology and Biochemistry. 127, 129-142. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.020

Gahlaut, V., Jaiswal, V., Kumar, A., Gupta, P. K., 2016. Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics. 129, 2019-2042. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2794-z

Giraud, E., Ng, S., Carrie, C., Duncan, O., Low, J., Lee, C. P., Van Aken, O., Millar, A. H., Murcha, M., Whelan, J., 2010. TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis thaliana. The Plant Cell. 22, 3921-3934. https://doi.org/10.1105/tpc.110.074518

Griffith, M., Yaish, M. W., 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. Trends in Plant Science. 9, 399-405. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.007

Guo, J., Sun, B., He, H., Zhang, Y., Tian, H., Wang, B., 2021. Current understanding of bHLH transcription factors in plant abiotic stress tolerance. International Journal of Molecular Sciences. 22, 4921. https://doi.org/10.3390/ijms22094921

Hao, Y.J., Wei, W., Song, Q.X., Chen, H.W., Zhang, Y.Q., Wang, F., Zou, H.F., Lei, G., Tian, A.G., Zhang, W.K., 2011. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. The Plant Journal. 68, 302-313. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04687.x

He, F., Zhang, L., Zhao, G., Kang, J., Long, R., Li, M., Yang, Q., Chen, L., 2022. Genome-wide identification and expression analysis of the NAC gene family in Alfalfa revealed its potential roles in response to multiple abiotic stresses. International Journal of Molecular Sciences. 23, 10015. https://doi.org/10.3390/ijms231710015

Jan, N., Andrabi, K. I., 2009. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. Electronic Journal of Biotechnology. 12, 14-15. http://doi.org/10.2225/vol12-issue3-fulltext-3

Jin, H., Huang, F., Cheng, H., Song, H., Yu, D., 2013. Overexpression of the GmNAC2 gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco. Plant Molecular Biology Reporter. 31, 435-442. https://doi.org/10.1007/s11105-012-0514-7

Kakei, Y., Masuda, H., Nishizawa, N. K., Hattori, H., Aung, M. S., 2021. Elucidation of novel cis-regulatory elements and promoter structures involved in iron excess response mechanisms in rice using a bioinformatics approach. Frontiers in Plant Science. 12, 660303. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.660303

Kidokoro, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2022. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses. Trends in Plant Science. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.01.008

Kosugi, S., Ohashi, Y., 2002. DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. The Plant Journal. 30, 337-348. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01294.x

Laudencia-Chingcuanco, D., Ganeshan, S., You, F., Fowler, B., Chibbar, R., Anderson, O., 2011. Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC genomics. 12, 1-20. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-299

Lawlor, D. W., Paul, M. J., 2014. Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. Frontiers in Plant Science. 5, 418. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00418

Lee, D.-K., Jung, H., Jang, G., Jeong, J. S., Kim, Y. S., Ha, S.-H., Do Choi, Y., Kim, J.-K., 2016. Overexpression of the OsERF71 transcription factor alters rice root structure and drought resistance. Plant physiology. 172, 575-588. https://doi.org/10.1104/pp.16.00379

Lei, N., Yu, X., Li, S., Zeng, C., Zou, L., Liao, W., Peng, M., 2017. Phylogeny and expression pattern analysis of TCP transcription factors in

cassava seedlings exposed to cold and/or drought stress. Scientific reports. 7, 1-13. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09398-5

Li, W.-y., Wang, C., Shi, H.-h., Wang, B., Wang, J.-x., Liu, Y.-s., Ma, J.-y., Tian, S.-y., Zhang, Y.-w., 2020. Genome-wide analysis of ethylene-response factor family in adzuki bean and functional determination of VaERF3 under saline-alkaline stress. Plant Physiology and Biochemistry. 147, 215-222. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.019

Li, X., Zhang, D., Li, H., Wang, Y., Zhang, Y., Wood, A.J., 2014. EsDREB2B, a novel truncated DREB2-type transcription factor in the desert legume *Eremosparton songoricum*, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in yeast and transgenic tobacco. BMC Plant Biology. 14, 1-16. https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-44

Liu, M.-M., Wang, M.-M., Yang, J., Wen, J., Guo, P.-C., Wu, Y.-W., Ke, Y.-Z., Li, P.-F., Li, J.-N., Du, H., 2019. Evolutionary and comparative expression analyses of TCP transcription factor gene family in land plants. International Journal of Molecular Sciences. 20, 3591. https://doi.org/10.3390/ijms20143591

Mao, H., Li, S., Chen, B., Jian, C., Mei, F., Zhang, Y., Li, F., Chen, N., Li, T., Du, L., 2022. Variation in cis-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat. Molecular Plant. 15, 276-292. https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.11.007

Marques, D. N., dos Reis, S. P., de Souza, C. R., 2017. Plant NAC transcription factors responsive to abiotic stresses. Plant Gene. 11, 170-179. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.06.003

Marques, D. N., Reis, S. P. d., de Souza, C. R. B., 2017. Plant NAC transcription factors responsive to abiotic stresses. Plant Gene. 11, 170-179. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.06.003

Mishra, P.K., Bisht, S.C., Ruwari, P., Selvakumar, G., Joshi, G.K., Bisht, J.K., Bhatt, J.C., Gupta, H.S., 2011. Alleviation of cold stress in inoculated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings with psychrotolerant Pseudomonads from NW Himalayas. Archives of microbiology. 193, 497-513. https://doi.org/10.1007/s00203-011-0693-x

Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms., 1819, 86-96. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.004

Mukhopadhyay, P., Tyagi, A.K., 2015. OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulatingABI4-mediated pathways. Scientific reports. 5, 1-12. https://doi.org/10.1038/srep09998

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H., 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. Plant physiology. 140, 411-432. https://doi.org/10.1104/pp.105.073783

Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2017. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. Trends in Plant Science. 22, 53-65. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015

Paolacci, A.R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., Ciaffi, M., 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC molecular biology. 10, 1-27. https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11

Rawson, H. M., Zajac, M., Penrose, L.D.J., 1998. Effect of seedling temperature and its duration on development of wheat cultivars differing in vernalization response. Field Crops Research. 57, 289-300. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00073-2

Rosenzweig, C., Tubiello, F. N., 1996. Effects of changes in minimum and maximum temperature on wheat yields in the central US A simulation study. Agricultural and Forest Meteorology. 80, 215-230. https://doi.org/10.1016/0168-1923(95)02299-6

Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J., 2010. WRKY transcription factors. Trends in Plant Science. 15, 247-258. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006

Sablowski, R.W., Meyerowitz, E.M., 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. Cell. 92, 93-103. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80902-2

Sarvepalli, K., Nath, U., 2011. Hyper- activation of the TCP4 transcription factor in Arabidopsis thaliana accelerates multiple aspects of plant maturation. The Plant Journal. 67, 595-607.

https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04616.x

Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. Current opinion in biotechnology. 14, 194-199. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00030-2

Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. The Plant Cell. 16, 2481-2498. https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699

Trupiano, D., Yordanov, Y., Regan, S., Meilan, R., Tschaplinski, T., Scippa, G. S., Busov, V. 2013. Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in Populus. Planta. 238, 271-282. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1890-4

Verma, S., Bhatia, S., 2019. A comprehensive analysis of the B3 superfamily identifies tissue-specific and stress-responsive genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.). 3 Biotechnology. 9, 1-17. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1875-5

Wang, G., Zhang, S., Ma, X., Wang, Y., Kong, F., Meng, Q., 2016. A stress-associated NAC transcription factor (SlNAC35) from tomato plays a positive role in biotic and abiotic stresses. Physiologia Plantarum. 158, 45-64. https://doi.org/10.1111/ppl.12444

Wang, H., Wang, H., Shao, H., Tang, X., 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. Frontiers in Plant Science. 7, 67. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00067

Wang, S.-t., Sun, X.-l., Hoshino, Y., Yu, Y., Jia, B., Sun, Z.-w., Sun, M.-z., Duan, X.-b., Zhu, Y.-m., 2014. MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.). PLoS One. 9, e91357. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091357

Winfield, M. O., Lu, C., Wilson, I. D., Coghill, J. A., Edwards, K. J., 2010. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. Plant biotechnology journal. 8, 749-771. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00536.x

Xu, Z.-S., Chen, M., Li, L.-C., Ma, Y.-Z. 2008. Functions of the ERF transcription factor family in plants. Botany. 86, 969-977.

Zhang, T., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, Z., Gao, C., 2018. Comprehensive analysis of MYB gene family and their expressions under abiotic stresses and hormone treatments in *Tamarix hispida*. Frontiers in Plant Science. 9, 1303. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01303