

## بررسی بیوانفورماتیکی و بیان خانواده ژنی SnRK2 در گیاه جو

یاسر پناهی فکور<sup>۱</sup>، زهرا سادات شبر<sup>۲\*</sup>، احسان پورعابد<sup>۱</sup>، فرزانه قانع گل محمدی<sup>۱</sup> و سید مرتضی رضوی<sup>۱</sup>

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۲۰)

### *In silico* characterization and expression analysis of SnRK2 family in barley

Yaser Panahi Fakoore<sup>1</sup>, Zahra-Sadat Shobbar<sup>2\*</sup>, Ehsan Pourabed<sup>1</sup>,  
Farzan Ghane Golmohamadi<sup>1</sup> and Seyed Morteza Razavi<sup>1</sup>

1. M.Sc., Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: Dec. 22, 2015 - Accepted: Mar. 10, 2015)

#### Abstract

Abiotic stresses are among major factors limiting crop yields, and SnRK2 protein kinases are one of the key regulators of plant response to abiotic stresses. Due to the economic importance, cultivation area, and tolerance of barley to the abiotic stresses, identification and characterization of SnRK2 family members in barley is performed in present research. SnRK2 conserved sequences were used as a query for tBLASTn analysis in different databases such as NCBI and international barley sequencing consortium against all of the reported barley sequences. As a result, 10 members were identified (*HvSnRK2.1* to *HvSnRK2.10*) which 8 of them were not yet reported. These HvSnRK2 members were aligned with AtSnRK2s and OsSnRK2s and a phylogenetic tree was constructed. Detection of chromosomal localization, promoter analysis and gene structure determination was also performed. Half of the family members were located on chromosome 2 and the rest on chromosomes 1, 4, 5 and 6. Number of introns in the gene family members varied from 0 to 8. Totally, 19 sorts of *cis* elements including abiotic stress responsive elements were found in *HvSnRK2s* promoter sequences. Expression pattern of the family members were evaluated in different tissues, treatments and genotypes, based on the microarray data. Expression of *HvSnRK2.6* was up-regulated by drought, salt and cold stresses implementing its important role in signal transduction of these stresses and tolerance induction to them. It is expected that this gene could be used in plant manipulation and breeding programs aimed for tolerance enhancement to abiotic stresses especially drought.

**Keywords:** Transcription Factors, Abiotic stresses, Barley, SnRK2 family.

#### چکیده

تنش‌های غیرزیستی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی و پروتئین کینازهای SnRK2 از تنظیم‌کننده‌های کلیدی پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی می‌باشند. با توجه به اهمیت اقتصادی، سطح زیر کشت و تحمل گیاه جو به تنش‌های غیرزیستی، در این تحقیق اعضای خانواده‌ی SnRK2 در گیاه جو شناسایی و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به‌همین منظور توالی‌های حفظ شده خانواده SnRK2 در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف همچون NCBI و پروژه ژنوم جو، با ابزار tBLASTn در بین توالی‌های ثبت شده برای گیاه جو جستجو شدند. در نتیجه ۱۰ عضو یافت شدند (*HvSnRK2.1* تا *HvSnRK2.10*) که ۸ عضو آن تاکنون گزارش نشده بودند. اعضای خانواده‌ی SnRK2 جو با اعضای این خانواده در آرالیبدوپسیس و برنج هم‌ردیف و درخت فیلوژنتیک رسم شد. تعیین جایگاه کروموزومی، آنالیز پروموتور و تعریف ساختار ژن‌ها انجام شد و الگوی بیان هر ژن در اندام‌ها، تیمارها و ارقام مختلف بر اساس داده‌های ریزآرایه مورد بررسی قرار گرفت. نیمی از اعضای این خانواده روی کروموزوم ۲ و بقیه روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵ و ۶ قرار داشتند. تعداد ایترون در اعضای این خانواده از صفر تا ۸ متغیر بود. ۱۹ نوع عامل سیس شامل عوامل مؤثر در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، بر روی پروموتور اعضای خانواده ژنی *HvSnRK2* شناخته شد. بیان ژن *HvSnRK2.6* توسط خشکی، شوری و سرما القا شده و به‌نظر می‌رسد در انتقال پیام این تنش‌ها و ایجاد تحمل به آنها نقش مهمی ایفا کند. امید است بتوان از این ژن برای اصلاح و دست‌ورزی گیاهان در جهت تحمل به تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه خشکی بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** عوامل رونویسی، تنش‌های غیرزیستی، جو، خانواده SnRK2

## مقدمه

تنش‌های غیرزیستی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شود (Zhang *et al.*, 2010). جو گیاهی مقاوم در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، سرما، شوری و غیره است. در ایران پس از گندم، جو بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (Ministry-of-Agriculture-Jihad, 2011). خانواده SnRK2<sup>1</sup> یکی از خانواده‌های کینازهای ویژه گیاه است که در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی موثر هستند (Boudsocq *et al.*, 2004). اعضای خانواده SnRK2 ابتدا در مخمرها شناسایی و Snf1<sup>2</sup> نامیده شدند ولی در پستانداران AMP-activated protein kinases و در گیاهان SnRK2 نامیده می‌شوند (Kulik *et al.*, 2011). اعضای خانواده SnRK2 بر اساس پاسخ به آبسزیک اسید (ABA) به سه زیرخانواده تقسیم می‌شوند که شامل کینازهایی که توسط ABA فعال نمی‌شوند (گروه ۱)، کینازهایی که با ABA بسیار ضعیف فعالیت می‌کنند و یا فعال نمی‌شوند (گروه ۲) و کینازهایی که به وسیله ABA (از طریق فسفوریلاسیون) به شدت فعال می‌شوند (گروه ۳) (Kulik *et al.*, 2011). اعضای این خانواده برای تولید سرین/ترئونین کیناز پیچیده‌ی گیاهی توسعه یافته‌اند که در جهت پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و آبسزیک اسید عمل می‌کنند و در واقع کلیدهای تنظیم‌کننده‌ی پاسخ گیاه هستند (Kulik *et al.*, 2011). اعضای این خانواده بر اساس دو ناحیه در توالی آمینواسیدی شناخته می‌شوند: ناحیه بسیار حفظ شده کینازی در انتهای N شامل حدود ۳۰ آمینو اسید که مستقل از آبسزیک اسید عمل می‌کند و در تنش‌های اسمزی موثر است و ناحیه حفظ شده انتهای C با حدود ۴۰ آمینو اسید که در

پاسخ به آبسزیک اسید نقش دارد (Belin, 2006). در سال ۲۰۰۰، SnRK2ها به‌عنوان آنزیم‌های دخیل در تنش‌های غیرزیستی و حرکت سیگنال‌های تنش در گیاهان به رسمیت شناخته شدند. اکنون می‌دانیم که این ژن‌ها بازیگرانی بزرگ در پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی و آبسزیک اسید هستند و در رسیدن دانه و جوانه‌زنی نقش دارند (Holappa & Walker-Simmons, 1995). تا سال ۲۰۱۱، ۱۰ عضو از اعضای این ژن در آرآبیدوپسیس، ۱۰ عضو در ژنوم برنج و ۱۱ عضو از اعضای آنها در ذرت و برخی دیگر در توتون، گندم، سویا، باقلا و جلبک‌ها شناسایی شده‌اند (Kulik *et al.*, 2011). تا به امروز، تعدادی از پروتئین کینازهای متعلق به خانواده SnRK2 در گیاه جو شناسایی شده است (Kobayashi *et al.*, 2004). ولی شناسایی تمامی اعضای این خانواده گامی موثر برای شناخت ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است و البته با شناخت هر چه بیشتر آنها می‌توان به اصلاح و مقاوم‌سازی گیاهان زراعی کمک موثری نمود.

## مواد و روش‌ها

### شناسایی اعضای خانواده SnRK2

توالی پروتئینی اعضای خانواده SnRK2 در آرآبیدوپسیس و برنج از پایگاه عوامل رونویسی آرآبیدوپسیس (DATF)<sup>۳</sup> و پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی نسخه دوم (Plant TFDB Version 2.0)<sup>۴</sup> دریافت شد. به منظور یافتن اعضای خانواده SnRK2 در گیاه جو از این توالی‌ها به‌عنوان الگو در tBLASTn بر علیه پایگاه داده‌های nr و EST جو در NCBI مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از توالی حفظ شده این خانواده به عنوان الگو در tBLASTn بر علیه پایگاه داده‌های Full

3. <http://datf.cbi.pku.edu.cn/>

4. <http://plantfdb.cbi.edu.cn/>

1. Sucrose non-fermenting 1 related protein kinase 2

2. Sucrose non-fermenting 1

Ensemble و IBSC (Barke و Bowman) پایگاه و Plants<sup>۷</sup> بارگذاری شد. بدین ترتیب، Contig حاوی توالی آن عضو و ناحیه کروموزومی مربوطه پیدا و ثبت گردید. ساختار ژنی به منظور تعیین الگوی اگزون-اینترون هر یک از اعضا، از طریق بارگذاری توالی‌های cDNA و ژنومی بدست آمده در gene structure display server<sup>۸</sup> تعیین شد.

#### تجزیه و تحلیل پروموتور

پس از تعیین توالی ژنومی هر یک از اعضا خانواده HvSnRK2، ۱۰۰۰ جفت باز بالادست ناحیه آغاز رونویسی و یا تمامی توالی بالادست هر ژن تا ابتدای توالی Contig به عنوان توالی پروموتور در نظر گرفته شد. بررسی عوامل سیس<sup>۹</sup> شامل نواحی اتصال فاکتورهای رونویسی با استفاده از پایگاه داده PlantPAN<sup>۱۰</sup> انجام شد (Chang *et al.*, 2008).

#### تجزیه و تحلیل توالی‌های UTR و توالی‌های هدف MircoRNA

برای بدست آوردن بلندترین توالی برای هر ژن، ابتدا کل توالی‌های موجود در UniGene با استفاده از پایگاه EGAssembler، همگذاری<sup>۱۱</sup> شدند (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006) ولی تنها توالی‌هایی به عنوان توالی کامل تر مورد استفاده قرار گرفتند که در بیش از ۹۷٪ از توالی نوکلئوتیدی با توالی FL-cDNA یکسان بودند. طول، محتوای نوکلئوتیدی، تعداد کدون آغاز بالادست (uATG) و ناحیه کدکننده بالادست (uORF) با حداقل ۱۲ نوکلئوتید (تری‌پیتید) (فقط در قاب مثبت) با استفاده از جعبه ابزار بیوانفورماتیک در محیط MATLAB 2012 استخراج شد. وجود توالی‌های پروتئینی مشابه با uORF با BLASTx در

length cDNA پروژه بین‌المللی ژنوم جو (IBSC)<sup>۱</sup> استفاده شد. توالی‌های تکراری و ناقص به صورت دستی حذف شدند. برای اعضای یافت شده، ناحیه رمزده<sup>۲</sup> و توالی پروتئینی مشخص گردید و آنهایی که توالی پروتئینی ثبت شده نداشتند با استفاده از ابزار ORF finder ترجمه شدند. به منظور تایید وجود دو قطعه حفظ شده خانواده SnRK2 در توالی‌های پروتئینی یافت شده از پایگاه‌های Pfam<sup>۳</sup>، SMART<sup>۴</sup> و Prosite استفاده شد. در نهایت فقط توالی‌هایی با E-Value کمتر از ۱ انتخاب شدند. برای سایر قسمت‌های حفظ شده که مختص SnRK2ها بود و در این پایگاه‌ها شناخته نمی‌شد از پایگاه MEME استفاده شد.

#### تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

به منظور بررسی روابط فیلوژنتیک بین اعضای شناسایی شده خانواده ژنی HvSnRK2 با یکدیگر و دیگر گیاهان، هم‌ردیف‌سازی چندگانه با استفاده از نرم‌افزار ClustalX انجام شد (Larkin *et al.*, 2007). درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش اتصال همسایه ۵ (NJ) و نرم‌افزار MEGA6 رسم شد (Tamura *et al.*, 2013). همچنین جهت بررسی و صحت تکرارپذیری درخت ترسیم شده، از آزمون بوت‌استرپ<sup>۶</sup> با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

#### تعیین محدوده کروموزومی، استخراج توالی ژنومی و ساختار ژنومی

برای یافتن توالی ژنومی، توالی cDNA هر یک از اعضای HvSnRK2 به عنوان الگو برای BLASTn بر علیه ژنوم جو (در بین توالی‌های Morex،

7. <http://plants.ensembl.org/index.html>  
8. <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>  
9. cis-elements  
10. <http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/>  
11. assemble

1. <http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley/>  
2. CDS, Coding region  
3. <http://pfam.sanger.ac.uk/>  
4. <http://smart.embl-heidelberg.de/>  
5. Neighbor Joining (NJ)  
6. Bootstrap test

## نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی **SnRK2** در جو با در نظر گرفتن دو عضو پیشین **HvSnRK2** (Kobayashi *et al.*, 2004)، در مجموع ۱۰ توالی پروتئینی به عنوان اعضای خانواده **HvSnRK2** شناسایی شدند که به ترتیب از **HvSnRK2.1** تا **HvSnRK2.10** نامگذاری شدند (جدول ۲).

گروه بندی و بررسی روابط فیلوژنتیکی در بین خانواده ژنی **SnRK2** در گیاه جو به همراه دو گونه دیگر صورت گرفت (شکل ۱). گونه های دیگر مورد استفاده در بررسی روند فیلوژنتیک خانواده ژنی **SnRK2** در کنار جو (۱۰ عضو)، برنج و آراییدوپسیس هر یک با ۱۰ عضو بودند. براساس دو روش می توان اعضای خانواده ژنی **SnRK2** را در گیاهان متفاوت از یکدیگر تفکیک نمود. در روش قدیمی، اعضای این خانواده ژنی براساس ترکیب دُمین های اسید آمینه پایانه C<sup>5</sup>، و در روش نوین، بر اساس نوع واکنش نسبت به ABA از یکدیگر تفکیک می شوند (Kulik *et al.*, 2011). گروه یک شامل کینازهایی از اعضای این خانواده هستند که مستقل از ABA عمل می کنند. گروه دو، مستقل از ABA بوده یا وابستگی بسیار ضعیفی نسبت به این هورمون دارند. گروه سه نیز شامل اعضای وابسته به ABA این خانواده می باشند. با توجه به نتایج به دست آمده و تفکیک اعضا براساس سه گروه عنوان شده (شکل ۱)، سه عضو از گیاه جو شامل **HvSnRk2.1**، **HvSnRK2.4** و **HvSnRK2.7** در گروه یک و مستقل از ABA قرار گرفتند. چهار عضو دیگر شامل **HvSnRK2.2**، **HvSnRK2.6**، **HvSnRK2.8** و **HvSnRK2.10** در گروه دو و مستقل یا وابستگی بسیار ضعیف نسبت به ABA قرار گرفتند. همچنین، سه عضو دیگر شامل **HvSnRK2.3**، **HvSnRK2.5** و

پایگاه nr در NCBI بررسی شد. همچنین وجود نواحی داخلی برای اتصال ریبوزوم (IRES) با استفاده از ابزار UTRScan<sup>۱</sup> در پایگاه (Grillo *et al.*, 2010) و توالی های هدف miRNA با استفاده از پایگاه psRNATarget<sup>۲</sup> مورد بررسی قرار گرفتند (Dai & Zhao, 2011).

## بررسی بیان ژن

از طریق سایت NCBI<sup>۳</sup>، کتابخانه های ریزآرایه<sup>۴</sup> که مربوط به بررسی اثر تنش های غیرزیستی (خشکی، شوری، سرما، گرما و تیمار ABA) بر گیاه جو (*Hordeum vulgare*) بودند (با کد شناسایی GSE10332، GSE27821، GSE10328، GSE15970، GSE23896، GSE17669 و GSE6325) دانلود شدند (جدول ۱).

داده های غیرنرمال توسط نرم افزار Experssion Console (version 1.1) به روش (Robust Multi -array Average - RMA) بر مبنای Log<sub>2</sub> نرمال شدند. آنگاه تیمارهای مورد آزمایش بر اساس دستورالعمل موجود در مقاله هایشان توسط نرم افزار Flex Array 1.6.1 طراحی شدند. به علت اینکه داده های آماری مورد مطالعه ما بیش از دو جامعه آماری بود از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) برای مقایسه تغییرات بیان در تمام اعضای خانواده **SnRK2** در تیمارهای مختلف استفاده شد. پس از مشخص شدن بیان تک تک اعضای خانواده برای تمام کتابخانه ها به وسیله ی نرم افزار MeV (Multi Experiment Viewer) نقشه حرارتی (heatmap) به صورت مجزا ترسیم شد.

1. <http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>
2. <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>
4. Microarray

مورد نظر قرار گرفتند. درخت ترسیم شده براساس روش مذکور در این تحقیق کاملاً با درختان ترسیم شده در دیگر بررسی‌هایی که از این روش جهت تفکیک استفاده کرده بودند تطابق داشت ( Kobayashi *et al.*, 2004; Kulik *et al.*, 2011).

*HvSnRK2.9* در گروه سه و وابسته به ABA قرار گرفتند. از همین رو، با بررسی درخت ترسیم شده در این پژوهش و براساس تفکیک گیاهان الگو (برنج و آراییدوپسیس) اعضای خانواده ژنی SnRK2 در جو به خوبی از یکدیگر تفکیک و هرکدام در زیرگروه‌های

جدول ۱. مشخصات سری داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در این پژوهش

منبع Reference	دوره نمو Developmental stage	بافت Tissue	ژنوتیپ Genotype	تنش / تیمار Stress / Treatment	شماره نمونه Accession No.
Guo <i>et al.</i> , 2009	زایشی Reproductive stage	برگ Leaf	Martin (drought-tolerant), HS41-1 (drought-tolerant, Hordeum spontaneum), Moroc9-75 (drought-sensitive)	خشکی Drought (۱، ۳، ۵ روز در ۱۰٪ AWC خاک)	GSE15970
Abebe <i>et al.</i> , 2010	زایشی Reproductive stage	سنبله (ریشک، لَم، پالتا)، دانه Spike (lemma, palea and awn), seed	Morex	خشکی Drought (چهار روز قطع آبیاری، RWC برگ پرچی = ۵۰٪)	GSE17669
Walia <i>et al.</i> , 2007	رویشی Vegetative stage	ریشه (نوک) ساقه (رأس) Roots (tips) and shoot (crown and growing point)	Golden Promise (salt-tolerant), Maythorpe (salt-sensitive)	شوری Salinity (۵ روز در 17 dS m <sup>-1</sup> )	GSE6325
	رویشی Vegetative stage	گیاهچه هفت روزه Seven-days-old seedlings	Morex	ABA	GSE10328
Svensson <i>et al.</i> , 2006	رویشی Vegetative stage	گیاه کامل (برگ اول کاملاً گسترش یافته) Whole plant (the first leaf fully expanded)	Bonus and four nonallelic albina and xantha	سرما Cold (۶ روز در ۳ °C)	GSE10332
Greenup <i>et al.</i> , 2006	رویشی Vegetative stage	دانه رست Seedling	Sonja (winter barley)	سرما Cold (۲۴ ساعت در ۴ °C)	GSE27821
Mangelsen <i>et al.</i> , 2011	زایشی Reproductive stage	گندمه Caryopses	Golden Promise	گرما Heat (نیم، سه و شش ساعت مواجهه با تنش گرما)	GSE23896

### تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

شده در این پژوهش برابر همان گروه SnRK2a و گروه یک درخت فیلوژنتیک این پژوهش همان گروه SnRK2b می‌باشند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده درخت فیلوژنتیک ترسیم شده در این تحقیق بر اساس روش دوم نیز با دیگر تحقیقات دیگر که از این روش جهت تفکیک اعضای این خانواده در دیگر گیاهان استفاده نموده‌اند کاملاً منطبق می‌باشد (Boudsocq *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011).

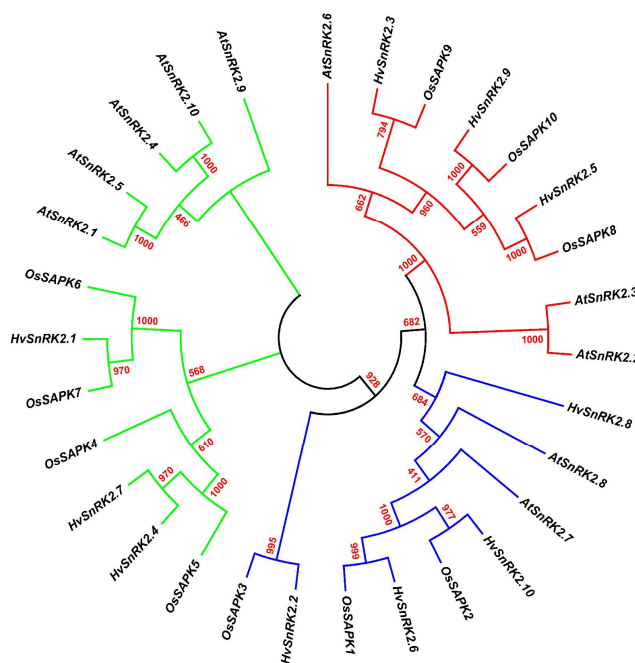
در روشی دیگر جهت تفکیک اعضای این خانواده ژنی که روشی قدیمی‌تر می‌باشد، اعضا براساس ترکیب دُمین‌های اسیدآمینو پایانه C شان از یکدیگر تفکیک می‌شوند. بر اساس این روش، اعضا (توالی‌ها) دارای Poly-Asp در گروه SnRK2a و اعضا (توالی‌ها) دارای Poly-Glu در گروه SnRK2b قرار می‌گیرند (Halford & Hardie, 1998). گروه دو و سه ارائه

جدول ۲. مشخصات اعضای خانواده ژنی HvSnRK2

طول پروتئین Protein length	شماره دستیابی پروتئین Protein accession No.	محدوده کروموزومی Chromosomal region	شماره دستیابی MIPS MIPS accession No.	شماره دستیابی cDNA cDNA accession No.	Unigene ID	نام قبلی Previous name	اسم ژن Gene name
362	۲-	2HL	-	AK250358.1	Hv.11385	۱-	<i>HvSnRK2.1</i>
189	-	1H	-	AK251684.1	Hv.17120	-	<i>HvSnRK2.2</i>
357	BAJ98961.1	5HS: 70,598,529- 70,601,179 (-)	MLOC_3013	AK367758.1	Hv.1875	-	<i>HvSnRK2.3</i>
393	BAJ93234.1	2HL: 623,986,361- 623,987,964 (+)	MLOC_13479	AK362030.1	Hv.2008	-	<i>HvSnRK2.4</i>
427	BAK05495.1	5HL: 503,350,285- 503,356,581 (+)	MLOC_22271	AK374298.1	Hv.2096	-	<i>HvSnRK2.5</i>
342	BAK04077.1	2HL: 590,665,619- 590,668,554 (+)	MLOC_11726	AK372880.1	Hv.21359	<i>HvPKABA1</i>	<i>HvSnRK2.6</i>
1344	BAK01400.1	2HL	-	AK370199.1	Hv.34453	-	<i>HvSnRK2.7</i>
449	BAJ95613.1	6HS: 43,495,080- 43,497,167 (-)	MLOC_10715	AK364410.1	Hv.36191	-	<i>HvSnRK2.8</i>
361	BAJ94902.1	4HS: 75,416,755- 75,419,619 (-)	MLOC_22145	AK363699.1	Hv.5014	-	<i>HvSnRK2.9</i>
341	BAK05446.1	2HS: 95,697,899- 95,702,512 (-)	MLOC_69212	AK374249.1	Hv.6253	<i>HvSAPK2</i>	<i>HvSnRK2.10</i>

1. No previous name; 2. Protein accession no. not found

۱. فاقد نام قبلی؛ ۲. شماره دستیابی پروتئینی پیدا نشد.



شکل ۱. روابط فیلوژنتیک براساس توالی‌های پروتئینی اعضای خانواده SnRK2 در بین گیاهان جو، برنج و آرایدوپسیس با استفاده از روش Neighbor Joining (NJ) به‌وسیله نرم‌افزار MEGA6. گروه یک (گروه سبز رنگ) شامل کینازهای مستقل نسبت به ABA، گروه دو (گروه آبی رنگ) شامل کینازهای مستقل یا با وابستگی بسیار ضعیف نسبت به ABA و گروه سه (گروه قرمز رنگ) شامل کینازهای وابسته به ABA می‌باشند. آزمون صحت تکرارپذیری با ۱۰۰۰ تکرار بر روی هر گره انجام شد.

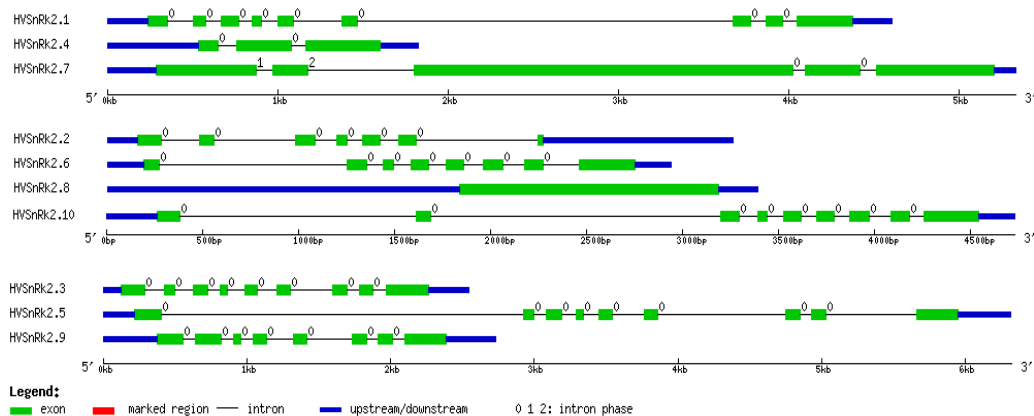
### تعیین جایگاه کروموزومی و ساختار ژن‌ها

محدوده کروموزومی برای تمامی اعضاء به‌جز *HvSnRK2.1*، *HvSnRK2.2* و *HvSnRK2.7* بدست آمد. اعضاء این خانواده روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۶ قرار دارند که در این میان نیمی از اعضا روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارند (جدول ۲). تنها *HvSnRK2.8* در گروه سوم فاقد اینترون بود. با این وجود تعداد اینترون در اعضای این خانواده از ۲ (*HvSnRK2.4*) تا ۸ عدد (*HvSnRK2.1*)، *HvSnRK2.3*، *HvSnRK2.5* و *HvSnRK2.10* متغیر بود. اینترون‌ها در تمامی اعضا به استثنای *HvSnRK2.7* در حدفاصل بین دو کدون متوالی قرار داشت (Intron Phase=0) (شکل ۲).

### تجزیه و تحلیل پروموتور

در مجموع ۱۹ نوع عامل سیس بر روی پروموتور اعضای خانواده ژنی SnRK2 در گیاه جو با استفاده از تارنمای PlantPAN شناخته شد (شکل ۳). تمامی این ۱۹ نوع عامل سیس را می‌توان در چهار گروه عمده دسته‌بندی نمود. این چهار گروه عمده عبارت‌اند از: عوامل سیس شناسایی شده مؤثر در جوانه‌زنی، توسعه بذر و رشد همچون عوامل سیس GAMYB و PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A عوامل

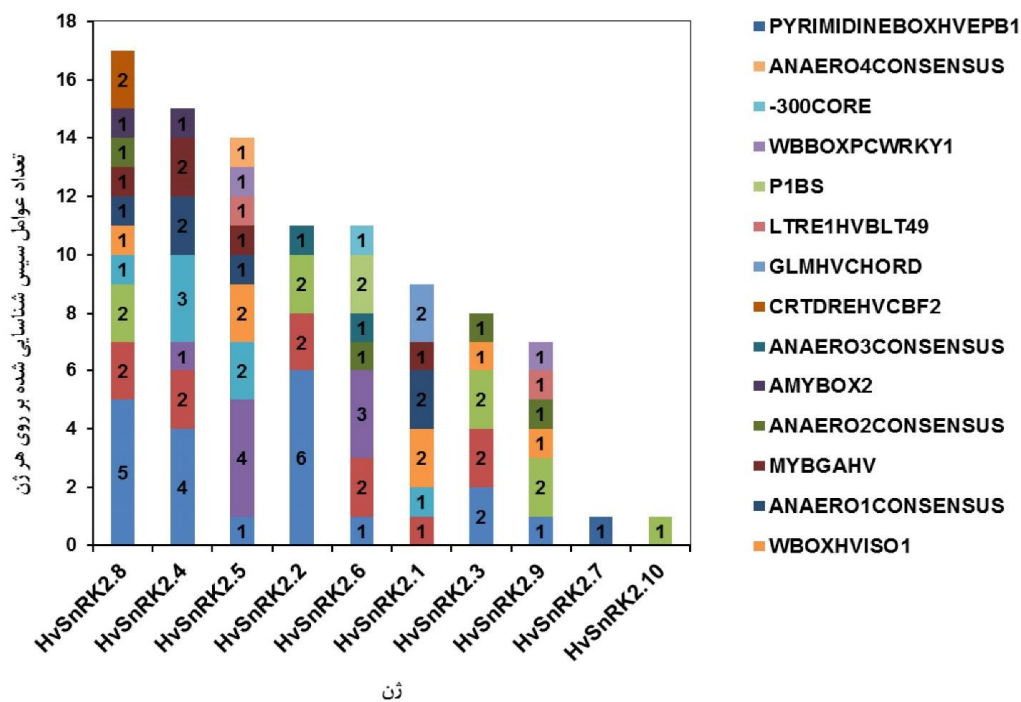
سیس مؤثر در بی‌هوازی همچون عامل سیس ANAERO1CONSENSUS، عوامل سیس مؤثر در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و محیطی همچون عوامل سیس CBFHV، LTRE1HVBLT49 و 10PEHVPSBD و عامل سیس PIBS به‌عنوان عامل سیس مؤثر در پاسخ به کمبود فسفات، که در ادامه به شرح آنها خواهیم پرداخت. فراوان‌ترین عوامل سیس که در پروموتور اعضای خانواده SnRK2 مشاهده شد، مربوط به عوامل سیس GAMYB، PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A و CBFHV (به ترتیب در ۷، ۶ و ۵ عضو) بود (شکل ۳). عامل سیس GAMYB بیش از سایر عوامل سیس در پروموتور اعضای خانواده *HvSnRK2* مشاهده شد که به‌ترتیب از زیاد به کم در *HvSnRK2.2*، *HvSnRK2.8*، *HvSnRK2.4* و *HvSnRK2.3*، *HvSnRK2.5*، *HvSnRK2.6* و *HvSnRK2.9* یعنی در ۷ عضو از ۱۰ عضو دیده شد. این عامل سیس در تنظیم میزان بیان ژن‌های دخیل در نمو آندوسپرم و جوانه زنی نقش دارد (Gubler *et al.*, 1999). عامل سیس PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A در گیاه جو و در ژن آلفا آمیلاز دیده شده و در تنظیم پاسخ به جیبرلین مؤثر است (Morita *et al.*, 1998).



شکل ۲. ساختار اگزون و اینترون ژن‌های خانواده SnRK2 در گیاه جو

عامل سیس CBFHV یکی دیگر از عوامل سیس شناخته شده می باشد که در پروموتور ۵ عضو ( $HvSnRK2.3, 4, 7, 8, 9$ ) پیدا شد و تنظیم کننده در پاسخ به تنش سرما و کم آبی می باشد (Xue, 2002). عامل سیس 10PEHVPSBD- در سه عضو از خانواده ژنی  $HvSnRK2$  یافت شد ( $HvSnRK2.5, 6, 10$ ) که در کلروپلاست گیاه جو وجود دارد و در تنظیم پاسخ به نور مؤثر است (Thum *et al.*, 2001). عامل سیس WBOXPCWRKY1 در دو عضو  $HvSnRK2$  یافت شده ( $HvSnRK2.5, 9$ ) و یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در سنتز نشاسته است (Ishiguro & Nakamura, 1994). عامل سیس CRTDREHVCF2 که تنها در  $HvSnRK2.8$  مشاهده شد مؤثر در تنظیم بیان ژن در پاسخ سرما از یک مسیر مستقل از ABA می باشد (Xue, 2003). عامل سیس LTRE1HVBLT49 که در  $HvSnRK2.5$  موجود بود به عنوان یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در پاسخ به دمای پایین عمل می نماید (Dunn *et al.*, 1998). عامل سیس P1BS که در  $HvSnRK2.6$  حضور داشت به عنوان یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در پاسخ به کمبود فسفات ایفای نقش می نماید (Rubio *et al.*, 2001).

عامل سیس CBFHV یکی دیگر از عوامل سیس شناخته شده می باشد که در پروموتور ۵ عضو ( $HvSnRK2.3, 4, 7, 8, 9$ ) پیدا شد و تنظیم کننده در پاسخ به تنش سرما و کم آبی می باشد (Xue, 2002). عامل سیس 10PEHVPSBD- در سه عضو از خانواده ژنی  $HvSnRK2$  یافت شد ( $HvSnRK2.5, 6, 10$ ) که در کلروپلاست گیاه جو وجود دارد و در تنظیم پاسخ به نور مؤثر است (Thum *et al.*, 2001). عامل سیس WBOXPCWRKY1 در دو عضو  $HvSnRK2$  یافت شده ( $HvSnRK2.5, 9$ ) و یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در سنتز نشاسته است (Ishiguro & Nakamura, 1994). عامل سیس CRTDREHVCF2 که تنها در  $HvSnRK2.8$  مشاهده شد مؤثر در تنظیم بیان ژن در پاسخ سرما از یک مسیر مستقل از ABA می باشد (Xue, 2003). عامل سیس LTRE1HVBLT49 که در  $HvSnRK2.5$  موجود بود به عنوان یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در پاسخ به دمای پایین عمل می نماید (Dunn *et al.*, 1998). عامل سیس P1BS که در  $HvSnRK2.6$  حضور داشت به عنوان یک فاکتور برای تنظیم رونویسی در پاسخ به کمبود فسفات ایفای نقش می نماید (Rubio *et al.*, 2001).



شکل ۳. عوامل سیس شناسایی شده بر روی نواحی پروموتور اعضای خانواده ژنی  $HvSnRK2$

$HvSnRK2.8$  (۱۸۳۵ نوکلئوتید) و کوتاهترین در  $HvSnRK2.3$  (۱۲۶ نوکلئوتید) مشاهده شد. در حالی است که به طور معمول به طور متوسط طول توالی های 3'-UTR، ۲ تا ۳ برابر بلندتر از توالی های 5'-UTR است (Hong *et al.*, 2006). توالی های

تجزیه و تحلیل توالی UTR میانگین طول توالی های 5'-UTR و محتوای GC آن ها (۳۸۵/۱ نوکلئوتید و ۵۹٪ درصد) بیشتر از توالی های 3'-UTR (۲۸۲/۳ نوکلئوتید و ۴۲/۸۱ درصد) بود. بلندترین توالی 5'-UTR در

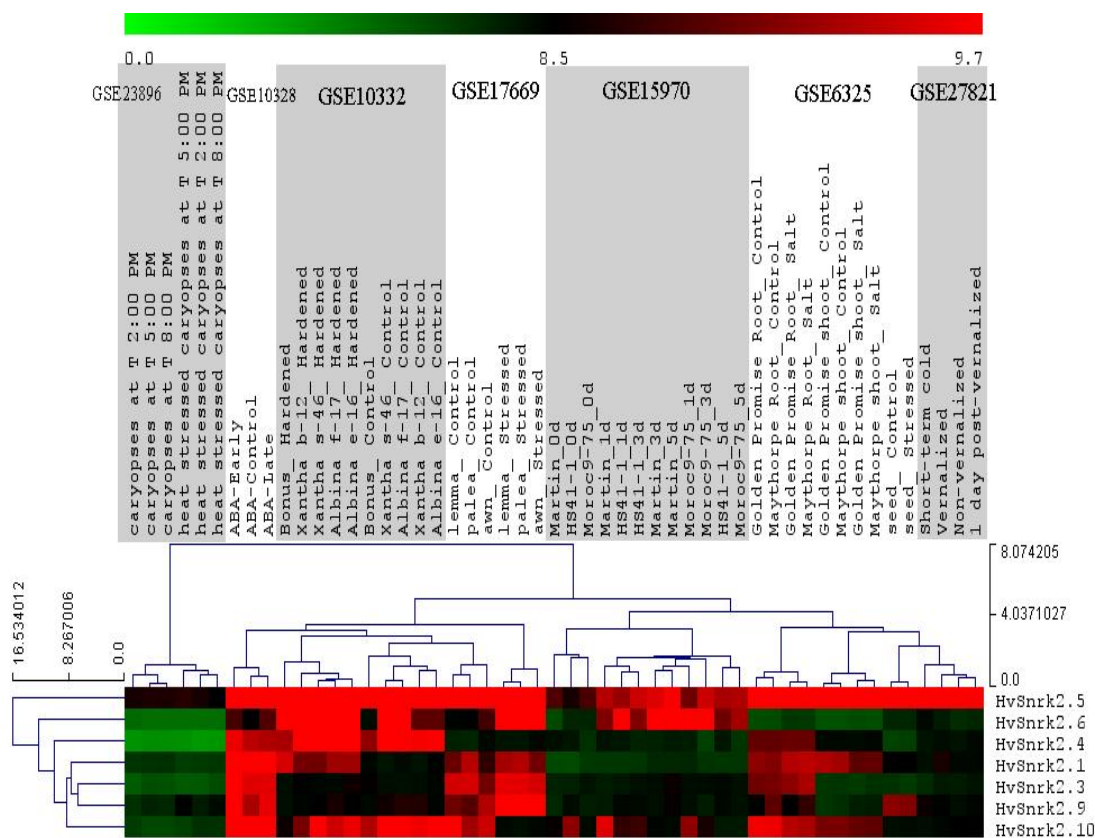


پروتئین‌ها در روش‌های تجربی کاهش می‌یابد (Crowe *et al.*, 2006). توالی‌های *Hv.SnRK2.2*، *Hv.SnRK2.7* و *Hv.SnRK2.10* دارای IRES بودند. ترجمه مولکول‌های mRNA یوکاریوتی وابسته به کلاهک انتهایی 5' است. بنابراین توانایی آغاز ترجمه بر اساس توالی IRES و مستقل از کلاهک انتهایی 5' نوعی مزیت محسوب می‌شود. در این وضعیت زیرواحد کوچک ریبوزومی مستقل از کلاهک انتهایی 5'، به قطعات کوچکی از مولکول mRNA در ناحیه 5'-UTR متصل شود (Chatterjee & Pal, 2009; Dever, 2002; Mihailovich *et al.*, 2007). یک توالی هدف sRNA در توالی‌های 5'-UTR (*Hv.SnRK2.4*) و توالی‌های 3'-UTR (*Hv.SnRK2.2*) مشاهده شد (جدول ۳). مولکول‌های miRNA، یکی از ابزارهای تنظیم بیان ژن در مرحله رونویسی و پس از آن هستند (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Reinhart *et al.*, 2002). این مولکول‌ها در گیاهان به توالی‌های حفاظت شده‌ای در توالی هدف متصل می‌شوند. این امر امکان تشخیص توالی‌های هدف را با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، به صورت قابل اطمینانی افزایش داده است (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). همچنین با توجه به محدودیت‌های روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص توالی‌های هدف، استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، راه حلی مفید و مقرون به صرفه است (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

#### بررسی بیان ژن

خانواده SnRK2 به عنوان یکی از مهمترین خانواده‌های ژنی درگیر در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مطرح می‌باشند. لذا با استفاده از داده‌های ریزآرایه مربوطه در گیاه جو، الگوی بیان ژن‌های *HvSnRK2* در شرایط تنش‌های خشکی، شوری، سرما، گرما و تیمار ABA در سطح رونویسی مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۴).

mRNA با 5'-UTR بلند و غنی از GC سبب تشکیل ساختارهای ثانویه پایدار و در نتیجه کاهش میزان کارایی ترجمه می‌شوند (Wegrzyn *et al.*, 2008). بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتیدی توالی‌های 5'-UTR به ترتیب مربوط به C و T (۳۰/۳۸ و ۱۹/۶۱ درصد) و در توالی‌های 3'-UTR به ترتیب T و C (۳۲/۸۱ و ۱۹/۸۹ نوکلئوتید) بود. عموماً در توالی‌های 3'-UTR فراوانی بالاتری از T و مقادیر کمتری از C در مقایسه با سایر نوکلئوتیدها مشاهده می‌شود (Neafsey & Galagan, 2007). تنها دو توالی *HvSnRK2.7* (۳ عدد) و *HvSnRK2.8* (۲۷ عدد)، حاوی کدون آغاز بالادست (uATG) بودند. کدون uATG سبب درگیر شدن ریبوزوم در نقاط نامناسب شده و مانع از رسیدن ریبوزوم به کدون آغاز اصلی و در نتیجه سبب کاهش کارایی ترجمه در نواحی پایین دست می‌شود (Churbanov *et al.*, 2005). کدون‌های uATG در *HvSnRK2.7* و *HvSnRK2.8*، به ترتیب، سبب ایجاد یک و ۹ عدد قاب باز خواندنی بالادست (uORF) شدند. یک قاب بازخواندنی در بالادست ناحیه کدکننده اصلی است (Mignone *et al.*, 2002). پروتئین حاصل از ترجمه توالی uORF5 (از موقعیت ۵۵۱ تا ۱۳۸۴) در *HvSnRK2.8* شباهت قابل توجهی (۹۱ درصد) را با Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor (EMT8539.1) در *Aegilops tauschii* نشان داد. توالی‌های uORF سبب تولید پروتئین‌های تحت عنوان پروتئین‌های بالادست (uPEP) می‌شوند. هنوز به درستی میزان اثر uPEP بر وضعیت سلولی مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد که پپتیدهای بسیاری از توالی‌های uORF یوکاریوتیک نقش فعالی در سازوکارهای کنترل ترجمه بازی می‌کنند (Hayden & Jorgensen, 2007). البته این نوع پپتیدها عمدتاً کوچک و ناپایدار بوده و به سرعت تجزیه می‌شوند بنابراین امکان شناسایی این نوع



شکل ۴. الگوی بیان هفت عضو از ۱۰ عضو خانواده ژنی HvSnRK2 در بافت‌ها، مراحل نمو و تنش‌های متفاوت شامل خشکی (GSE15970 و GSE17669)، شوری (GSE6325)، سرما (GSE10332 و GSE27821)، گرما (GSE23896) و تیمار ABA (GSE10328).

جدول ۳. توالی‌های هدف sRNA در ناحیه UTR اعضای خانواده HvSnRK2

توالی	نام توالی	شماره	هم ردیفی	نوع بازدارندگی
Sequence	Target Name	دستیابی miRNA Accession No.	Alignment	Inhibition
5'-UTR	HvSnRK2.4	hvu-miR6196	miRNA 20 GGAGAGGUAGAGGAGCAGGA 1 Target 32 CCUGUUUAUCUCCUCCUCCU 51	قطعه شدن Cleavage
3'-UTR	HvSnRK2.2	hvu-miR6181	miRNA 23 CCGCGGCGUCAGGUACUUCUCGU 1 Target 203 GCUGCCGUGGUACCUGAAGAGCC 225	ترجمه Translation

1. Expectation (میزان شباهت توالی miRNA به توالی هدف (۵-۰؛ عدد کمتر = شباهت بیشتر))
2. Target accessibility (انرژی لازم برای شکستن توالی ساختار ثانویه اطراف توالی هدف (۱۰۰-۰؛ عدد کمتر = سهولت بیشتر))

### خشکی

روز در ۱۰٪ AWC خاک) نسبت به شرایط عادی (۷۰٪ AWC خاک) القا شد. البته میزان افزایش بیان در رقم متحمل به خشکی مارتین به‌ویژه در روز سوم و پنجم تنش (به ترتیب ۲۲/۷ و ۱۶/۱ برابر) بسیار بیشتر از سایر ارقام (به ترتیب ۳/۶ و ۳/۴ برابر در

بررسی بیان ژن‌های HvSnRK2 در برگ گیاهان جو در دوره زایشی (GSE15970) نشان داد که ژن HvSnRK2.6 در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه به طور قابل توجهی در شرایط تنش خشکی (۱، ۳، ۵

ABA در گیاهچه‌های هفت روزه (GSE10328) نشان داد که ژن‌های *HvSnRK2.9*، *HvSnRK2.3* و *HvSnRK2.1* در مقطع زمانی اول (Early) پس از اعمال تیمار افزایش بیان می‌یابند (به ترتیب ۱/۵۲، ۱/۵۴ و ۱/۵۸ برابر).

#### سرما

گیاهان می‌توانند در پاسخ به مواجهه با دوره‌هایی از دمای پایین توانایی تحمل به سرمای خود را بهبود بخشند، پدیده‌ای که سازگاری (hardening / acclimatization) نامیده می‌شود. جهشی در جو گزارش شده است که از نمو کلروپلاست جلوگیری کرده و گیاهان حاوی آن حساس به سرما هستند. در یک تحقیق (GSE10332) ترانسکریپتوم دو جهش یافته جو (albina and xantha) به همراه گیاه طبیعی (wild type) مربوطه (Bonus) مورد بررسی قرار گرفتند تا اثر کلروپلاست بر بیان ژن‌های تنظیم شونده با سرما مشخص شود (Svensson *et al.*, 2006). جالب است که برخی از ژن‌های *HvSnRK2* الگوی بیان خاصی در این آزمایش نشان دادند. برای مثال بیان ژن *HvSnRK2.6* در گیاه طبیعی در شرایط عادی پایین بوده و با سرما به شدت افزایش یافت (۴,۴۴ برابر) اما در گیاهان جهش یافته (Xanthas-46 و Albina f-17) بیان آن همانند گیاهان تیمار شده با سرما بالا بود و البته در تمامی گیاهان جهش یافته نیز القای بیان در اثر سرما مشاهده شد (از ۲/۲ تا ۴/۴ برابر). همچنین بیان ژن *HvSnRK2.4* و *HvSnRK2.10* در گیاه طبیعی در هر دو شرایط عادی و تیمار شده به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از گیاهان جهش یافته بود. سرما بیان ژن *HvSnRK2.1* را نیز در تمامی گیاهان مذکور افزایش داد (از ۱/۷۸ تا ۲/۴ برابر). غلات مناطق معتدله مثل جو، طی مواجهه با سرما و سازگاری با آن، قادر به گلدهی (vernalization) می‌شوند. در تحقیقی (GSE27821) بیان ژن‌ها طی تیمار کوتاه

ژنوتیپ وحشی HS41-1 و ۶/۱ و ۳/۹ در رقم حساس Moroc9-75) بود. میزان بیان ژن‌های *HvSnrk2.3*، *HvSnrk2.1* و *HvSnrk2.9* نیز در رقم متحمل افزایش یافت و پس از ۵ روز تنش به بیش از دو برابر رسید. سطح رونوشت‌های ژن *HvSnrk2.10* نیز در یک روز پس از تنش در هر دو رقم زراعی حساس و متحمل دو برابر افزایش نشان داد. اندام‌های فتوسنتزکننده سنبله (لما، پالئا و ریشک) متحمل به خشکی فرض می‌شوند. این ویژگی سودمندی است زیرا در صورت وقوع خشکی در دوره زایشی، گیاه را قادر می‌سازد تا به پرکردن دانه ادامه دهد (Abebe *et al.*, 2010). بر اساس نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان در این اندام‌ها (GSE17669)، در شرایط خشکی (چهار روز پس از قطع آبیاری، RWC برگ پرچمی = ۵۰٪) ژن‌های *HvSnRK2.6* و *HvSnRK2.9* در هر سه اندام (لما، پالئا و ریشک) به ترتیب ۳/۴، ۲/۹ و ۴/۳ برابر برای *HvSnRK2.6* و ۲/۸، ۲/۹ و ۲/۶ برابر برای *HvSnRK2.9* افزایش بیان یافتند. *HvSnRK2.5* سطح بیان بالا و ثابتی در هر دو شرایط عادی و خشکی داشت و *HvSnRK2.10* در هر سه اندام دچار کاهش بیان (به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۴ در لما، پالئا و ریشک) شد.

#### شوری

بررسی بیان ژن‌های *HvSnRK2* طی تنش شوری (۵ روز در  $17 \text{ dSm}^{-1}$ ) در دوره رویشی (GSE6325) نشان داد که این تنش موجب افزایش ملایم بیان ژن *HvSnRK2.6* (۱/۶۷ برابر) در ریشه رقم متحمل به شوری Golden Promise و ژن *HvSnRK2.9* (۱/۵۳ برابر) در ساقه رقم حساس به شوری Maythorpe شد.

#### تیمار ABA

بررسی بیان ژن‌های *HvSnRK2* در پاسخ به تیمار

تحقیق (GSE23896) پاسخ بذور در حال نمو جو (caryopses)، پس از نیم، سه و شش ساعت مواجهه با تنش گرما مورد بررسی قرار گرفت (Mangelsen *et al.*, 2010). بر اساس داده‌های به‌دست آمده، بیان ژن *HvSnRK2.9* (به ترتیب ۱/۶، ۲/۱ و ۱/۹ برابر در ساعت ۲، ۵ و ۸ بعد از ظهر) و ژن *HvSnRK2.10* (۱/۷ برابر در ساعت ۸ بعد از ظهر) در پاسخ به گرما افزایش یافت. اما تغییر قابل توجهی در بیان سایر اعضا مشاهده نشد.

یا بلند مدت سرما در جو مورد بررسی قرار گرفت (Greenup *et al.*, 2011). اما بیشتر ژن‌های *HvSnRK2* الگوی بیان خاصی در این آزمایش نشان ندادند و تنها ژن *HvSnRK2.6* در تیمار کوتاه مدت سرما ۲/۳ برابر افزایش بیان نشان داد.

### گرما

تنش گرما بر فیزیولوژی و نمو گیاه از جمله در مراحل نمو دانه اثر منفی دارد، بنابراین طی یک

## REFERENCES

- Abebe T, Melmaiee K, Berg V, Wise RP (2010) Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. *Functional & Integrative Genomics*. 10(2): 191-205.
- Belin C (2006) Structure et fonctions de la protéine kinase OST1 dans la cellule de garde d'*Arabidopsis thaliana*. Ph.D. Thesis. Université Paris Sud-Paris XI, Paris, France.
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(40): 41758-41766.
- Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL (2008) Plant PAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*. 9(1): 561.
- Chatterjee S, Pal JK (2009) Role of 5'-and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*. 101(5): 251-262.
- Churbanov A, Rogozin I B, Babenko VN, Ali H, Koonin EV (2005) Evolutionary conservation suggests a regulatory function of AUG triplets in 5'-UTRs of eukaryotic genes. *Nucleic Acids Research*. 33(17): 5512-5520.
- Crowe M, Wang XQ, Rothenagel J (2006) Evidence for conservation and selection of upstream open reading frames suggests probable encoding of bioactive peptides. *BMC Genomics*. 7(1): 16.
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*. 39(suppl 2): W155-W159.
- Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 108(4): 545-556.
- Dunn M A, White AJ, Vural S, Hughes MA (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4. 9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*. 38(4): 551-564.
- Greenup AG, Sasani S, Oliver SN, Walford SA, Millar AA, Trevaskis B (2011) Transcriptome analysis of the vernalization response in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *PLoS One*. 6(3): e17900.
- Gubler F, Raventos D, Keys M, Watts R, Mundy J, Jacobsen JV (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *The Plant Journal*. 17(1): 1-9.
- Halford NG, Hardie DG (1998) SNF1-related protein kinases: global

- regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology*. 37(5): 735-748.
- Hayden CA, Jorgensen RA (2007) Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. *BMC Biology*. 5(1): 32.
- Holappa LD, Walker-Simmons M (1995) The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiology*. 108(3): 1203-1210.
- Hong X, Scofield DG, Lynch M (2006) Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes. *Molecular Biology and Evolution*. 23(12): 2392-2404.
- Ishiguro S, Nakamura K (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics MGG*. 244(6): 563-571.
- Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. 57: 19-53.
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant Cell Online*. 16(5): 1163-1177.
- Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G (2011) SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics: A Journal Of Integrative Biology*. 15(12): 859-872.
- Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.
- Mangelsen E, Kilian J, Harter K, Jansson C, Wanke D, Sundberg E (2010) Transcriptome analysis of high-temperature stress in developing barley caryopses: early stress responses and effects on storage compound biosynthesis. *Molecular Plant*: ssq058.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Goto S (2006) EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research*. 34(suppl 2): W459-W462.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 3(3): 1-10.
- Mihailovich M, Thermann R, Grohovaz F, Hentze MW, Zacchetti D (2007) Complex translational regulation of BACE1 involves upstream AUGs and stimulatory elements within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Research*. 35(9): 2975-2985.
- Ministry-of-Agriculture-Jihad (2011) Statistics of crops production. Retrieved July 30, 2014, from <http://www.maj.ir/Portal/Home/Default.aspx?CategoryID=95a8e7d0-e5f0-4f2d-a241-792106c74dcc>.
- Morita A, Umemura T-a, Kuroyanagi M, Futsuhara Y (1998) Functional dissection of a sugar-repressed K-amylase gene (RAmy1A) promoter in rice embryos. *FEBS Letters*. 423(81): 85.
- Neafsey DE, Galagan JE (2007) Dual modes of natural selection on upstream open reading frames. *Molecular Biology And Evolution*. 24(8): 1744-1751.
- Reinhart BJ, Weinstein E G, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002)

- MicroRNAs in plants. *Genes & Development*. 16(13): 1616-1626.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development*. 15(16): 2122-2133.
- Svensson JT, Crosatti C, Campoli C, Bassi R, Stanca AM, Close TJ, Cattivelli L (2006) Transcriptome analysis of cold acclimation in barley Albina and Xantha mutants. *Plant Physiology*. 141(1): 257-270.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology And Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Thum KE, Kim M, Morishige DT, Eibl C, Koop HU, Mullet JE (2001) Analysis of barley chloroplast psbD light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Molecular Biology*. 47(3): 353-366.
- Wegrzyn J, Drudge T, Valafar F, Hook V (2008) Bioinformatic analyses of mammalian 5'-UTR sequence properties of mRNAs predicts alternative translation initiation sites. *BMC Bioinformatics*. 9(1): 232.
- Xue GP (2002) Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research*. 30(15): e77.
- Xue GP (2003) The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *The Plant Journal*. 33(2): 373-383.
- Zhang H, Mao X, Jing R, Chang X, Xie H (2011) Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) TaSnRK2. 7 gene involved in abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*. 62(3): 975-988.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R (2010) Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2. 8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS One*. 5(12): e16041.