

## شناسایی خانواده ژنی *ERF* در گیاه شورزیست *Aeluropus littoralis* و بررسی الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری

سیدحمیدرضا هاشمی‌پترویدی<sup>1\*</sup>، سمیرا محمدی<sup>2</sup>

1. استادیار، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

2. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: 1398/7/28 - تاریخ پذیرش: 1399/3/22)

### Identification of the *ERF* gene family in *Aeluropus littoralis* halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress

Seyyed Hamidreza Hashemi-petrooudi<sup>1\*</sup>, Samira Mohammadi<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

2. Ph.D. Candidate in Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

(Received: Oct. 19, 2019 - Accepted: Jun. 11, 2020)

#### Abstract

Salt stress is one of the abiotic stresses limiting plant growth and development. The ethylene response factor (*ERF*) is one of the transcription factor family that involved in plant development and responses to biotic and abiotic stresses. Regarding to importance role of genes belonging to *ERF* gene family in plant responses to salt stress, identification of these genes in the *Aeluropus littoralis*, halophyte plant, was considered in this study. In total, 36 non-redundant *ERF* genes were identified in *A. littoralis* genome. The phylogenetic tree classified the *AIERF* gene family into six distinct groups (B1 to B6) based on homology with the *Arabidopsis thaliana*. Gene structure analysis revealed that *AIERF* genes contained zero to two introns. Domain search and conserved motif analyses in *AIERF* protein sequences determined that 2 motifs (1 and 2) out of the identified 10 motifs participate in the AP2/ERF domain structure. Based on transcriptome data and heatmap diagram, *AIERF6.3* gene was expressed more in root tissue under salinity stress, and the least expression level was observed in *AIERF6.7* gene in leaf tissue under recovery conditions. The different expression patterns of genes in leaf and root tissues under salt stress suggested different regulatory mechanisms in the gene expression. The results of this study, as the first report on the *ERF* gene family in *A. littoralis*, provides basic information for further studies of the functional characteristics of *AIERF* genes.

**Keywords:** *Aeluropus littoralis*, *ERF* transcription factor, gene family, phylogenetic relationships, salt stress.

#### چکیده

تنش شوری یکی از تنش‌های غیرزیستی محدودکننده رشد و نمو گیاهان می‌باشد. عامل پاسخ‌دهنده به اتیلن (*ERF*) خانواده ای از عوامل رونویسی دخیل در رشد و نمو گیاهان و نیز پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بوده و با توجه به اهمیت این خانواده در پاسخ به تنش شوری، در این تحقیق شناسایی ژن‌های این خانواده در گیاه شورزیست چمن شور آوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) مدنظر قرار گرفت. در مجموع، 36 ژن غیر تکراری *ERF* در ژنوم آوروپوس لیتورالیس شناسایی شد. ترسیم درخت فیلوژنتیک بر مبنای همولوژی با گیاه آرابیدوپسیس، خانواده ژنی *AIERF* را به شش گروه مشخص (B1 تا B6) طبقه‌بندی نمود. تجزیه و تحلیل ساختار ژنی نشان داد که تعداد اینترون در ژن‌های *AIERF* بین صفر تا دو متغیر بود. تجزیه و تحلیل موتیف‌های حفاظت‌شده و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی *AIERF* نشان داد از ده موتیف شناسایی شده، تنها موتیف‌های یک و دو در ساختار دمین AP2/ERF مشارکت دارند. بر اساس داده‌های ترانسکریپتوم و نمودار Heatmap، ژن *AIERF6.3* بیشترین بیان را در شرایط تنش شوری در بافت ریشه نشان داد و بیشترین کاهش بیان نیز در ژن *AIERF6.7* در شرایط بازیابی در بافت برگ مشاهده شد. این الگوی متفاوت بیان ژن‌ها در بافت‌های برگ و ریشه در مواجهه با تنش شوری، حاکی از وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در بیان این ژن‌ها می‌باشد. نتایج این مطالعه به‌عنوان اولین گزارش در مورد خانواده ژنی *ERF* در آوروپوس لیتورالیس، اطلاعات پایه‌ای را برای مطالعات بیشتر در مورد خصوصیات کارکردی ژن‌های *AIERF* فراهم می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** آوروپوس لیتورالیس، تنش شوری، خانواده ژنی، روابط فیلوژنتیکی، عوامل رونویسی *ERF*

## مقدمه

در شرایط مختلف محیطی مانند خشکی، دمای پایین، شوری بالا، غرقاب و حمله پاتوژن‌ها، ژن‌ها الگوهای بیان خاصی را مطابق با کارکردهای فیزیولوژیکی و بیولوژیکی خود بروز می‌دهند (Riechmann *et al.*, 2000). این افزایش یا کاهش بیان در سطح ترانسکرپتوم<sup>۱</sup> یا پروتئوم<sup>۲</sup>، به‌طور معمول منجر به سنتز پروتئین‌های ساختاری یا آنزیمی می‌شود که خود تحت تأثیر بیان ژن‌های تنظیمی به‌ویژه عوامل رونویسی<sup>۳</sup> مرتبط با تنش عمل می‌نمایند. تعیین توالی ژنوم بسیاری از موجودات زنده در دهه پیشین، نقش عوامل رونویسی در ساختار پیچیده ژنومی را به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم فرآیندهای سلولی بیش از پیش آشکار نمود (Zhou *et al.*, 2012). عوامل رونویسی AP2/ERF<sup>۴</sup> که با حضور دمین<sup>۵</sup> اتصال به DNA نوع AP2/ERF مشخص می‌شوند، به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های عوامل رونویسی در گیاهان، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌نمایند. این ابرخانواده<sup>۶</sup> بر اساس تعداد دمین‌های AP2/ERF و سایر دمین‌های اتصال به DNA، به 4 خانواده عمده شامل RAV<sup>۷</sup>، AP2، ERF<sup>۸</sup> و DREB<sup>۹</sup> تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های زیرگروه AP2 شامل دو دمین AP2/ERF حفاظت شده، زیرگروه‌های ERF و DREB دارای یک دمین AP2/ERF، و زیرگروه RAV علاوه بر یک دمین AP2/ERF دارای یک دمین اتصال به DNA نوع B3 نیز می‌باشند که در سایر عوامل رونویسی مختص

گیاهان وجود دارد (Sakuma *et al.*, 2002). ژن‌های خانواده ERF تعداد زیادی پروتئین ERF کد می‌کنند که با شناسایی عناصر تنظیمی سیس به‌نام GCC-box با توالی 5'-AGCCGCC-3' در القا یا بازدارندگی بیان ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی فعالیت می‌نمایند (Ohme-Takagi *et al.*, 1995).

تحقیقات نشان داده است که بسیاری از عوامل رونویسی ERF نقش‌های مهمی در بهبود تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، سرما، شوری و بعضی از تنش‌های زیستی ایفا می‌نمایند. ژن‌های ERF سویا مانند *GmERF057* و *GmERF089* تحت تنش‌های شوری، خشکی و ویروس موزایک سویا (SMV) القاء شدند. توتون‌های تراریخت بیش‌بیا شده<sup>۱۰</sup> با ژن‌های *GmERF057* و *GmERF089* نسبت به توتون‌های غیر تراریخت، تحمل بالاتری در برابر تنش شوری و پاتوژن‌ها به نمایش گذاشتند (Zhang *et al.*, 2008). توتون‌های تراریخت بیش‌بیا شده با ژن *GmERF3* تحت شرایط تنش خشکی حاوی کربوهیدرات محلول و پرولین‌های بیشتری در مقایسه با توتون‌های غیر تراریخت بودند (Zhang *et al.*, 2009). تحت تنش شوری، گیاهان توتون و صنوبر تراریخت بیش‌بیا شده با ژن *ERF76* در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت در ارتفاع بوته، طول ریشه و وزن تر، برتری نشان دادند (Yao *et al.*, 2016a; Yao *et al.*, 2016b). در تحقیق دیگر درخصوص بررسی عملکردی این خانواده ژنی، ژن *PsnERF75* جداسازی شده از *Populus simonii* × *P. nigra* قابلیت تحمل آرابیدوپسیس تراریخته را در برابر تنش شوری افزایش داد. علاوه بر این، میزان جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس تراریخته نیز به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Wang *et al.*, 2018). همچنین بیش‌بیا *ERF96* باعث افزایش

1. Transcriptome
2. Proteome
3. Transcription factor
4. APETALA2/ethylene response factor
5. Domain
6. Superfamily
7. Related to ABI3/VP
8. Ethylene response factors
9. Dehydration-responsive element-binding protein

گیاه می‌باشد. در مطالعه حاضر، خانواده ژنی *ERF* از نظر فیلوژنی، تجزیه و تحلیل دمین و موتیف حفاظت‌شده مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، برای درک بیشتر کارکرد این ژن‌ها، الگوی بیان آن‌ها در دو بافت برگ و ریشه و پاسخ‌های آن‌ها در شرایط تنش شوری و بازیابی مطالعه شد.

### مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده عوامل رونویسی *ERF*

در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

برای شناسایی پروتئین‌های *ERF* ابتدا توالی‌های پروتئینی ابرخانواده *AP2/ERF* برنج و آراییدوپسیس، به ترتیب از پایگاه‌های داده RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)

(Kawahara *et al.*, 2013) و TAIR

(<https://www.arabidopsis.org/>) (Lamesch *et al.*, 2012)

دریافت شد. سپس توالی‌های دریافت شده

به‌عنوان query برای جستجوهای tBLASTn

Local با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999)

در توالی ژنوم گیاه آلوروپوس لیتورالیس شامل 15916

مدل ژن پیش‌بینی شده از تعیین توالی کامل ژنوم<sup>۲</sup>

(WGS) مورد استفاده قرار گرفت. پس از حذف

پروتئین‌های ناقص و تکراری، توالی‌های پروتئینی این

خانواده شناسایی شد. حضور دمین AP2/ERF، با

استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی InterProScan

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/>)

(sequence-search) (Jones *et al.*, 2014)، Pfam

(<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2015) و

SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

(Letunic *et al.*, 2014) تأیید شد و توالی

دمین AP2/ERF پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده

از پایگاه SMART به دست آمد. پروتئین‌های *ERF* در

تحمل گیاه آراییدوپسیس در برابر تنش شوری شد. این امر حاکی از این است که *ERF96* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت تحمل به شوری عمل می‌کند (Wang *et al.*, 2017). گیاهچه‌های گندم بیش‌بیا شده با *TaERF3* در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت، به‌طور قابل توجهی افزایش تحمل در برابر تنش شوری و خشکی را نشان دادند. در برگ‌های گیاهان تراریخت، سطوح تجمع پرولین و کلروفیل، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که محتوای  $H_2O_2$  و هدایت روزنه‌ای به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. سنجش تحرک الکتروفورتیک<sup>۱</sup> (EMSA) نشان داد که پروتئین *TaERF3* می‌تواند با عناصر سیس GCC-box موجود در پروموتور هفت ژن مرتبط با تنش فعال شده توسط *TaERF3* برهم‌کنش داشته باشد. این نتایج نشان داد که *TaERF3* از طریق فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با تنش، پاسخ گندم در برابر تنش‌های شوری و خشکی را به‌طور مثبت تنظیم می‌کند (Rong *et al.*, 2014).

با توجه به اهمیت خانواده ژنی *ERF* در تحمل گیاه به شوری و تعیین توالی ژنوم گیاه شورزیست آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان (منتشر نشده)، فرصت مناسبی برای تجزیه و تحلیل و شناخت ژن‌های این خانواده ژنی در یک گونه متحمل به تنش از خانواده گندمیان، فراهم شد. گیاه تک‌لپه آلوروپوس لیتورالیس علاوه بر تحمل به شوری، به‌عنوان گیاهی متحمل به خشکی و گرما نیز شناخته شده است. با اشاره به اهمیت آلوروپوس لیتورالیس به‌عنوان یک منبع ژنتیکی غنی برای شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با تحمل به شوری، خشکی و گرما برای اصلاح گیاهان زراعی (Zouari *et al.*, 2007) و همچنین کارکرد ژن‌های *ERF* در تحمل گیاهان نسبت به تنش‌ها، این بررسی به‌عنوان اولین مطالعه در ارتباط با کارکرد ژن‌های *ERF* در این

2. Whole-genome sequencing

1. Electrophoretic mobility shift assay

6.0 MEGA ترسیم شد (Tamura et al., 2013).

#### تجزیه و تحلیل دمین و موتیف حفاظت شده

حضور دمین AP2/ERF با استفاده از Expasy-Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و ساختار دمین ترسیم شد (Sigrist et al., 2012). هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی برای تعیین موقعیت دمین با استفاده از ابزار Expasy-ClustalW (<https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) انجام شد (Thompson et al., 2003). موتیف‌های حفاظت شده توسط برنامه MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) با پارامترهای تعیین شده (شناسایی حداکثر 10 موتیف، و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب 6 و 50 اسیدآمین) شناسایی شد (Bailey et al., 2009).

#### بررسی بیان ژن‌های ERF در آلوروپوس لیتورالیس

بررسی پروفایل بیانی خانواده ژنی ERF آلوروپوس با استفاده از داده‌های RNA-seq انجام شد. به این ترتیب که پس از تکثیر و کلون گیاهان آلوروپوس لیتورالیس به روش قلمه‌زنی گیاهان 60 روزه به محیط کشت هوگلند منتقل شد و اعمال تنش شوری در غلظت 600 میلی‌مولار به صورت تدریجی (اضافه‌نمودن 100 میلی‌مولار نمک کلرید سدیم در هر سه روز) صورت گرفت. یک هفته پس از اعمال تنش شوری از دو بافت برگ و ریشه نمونه‌برداری شده و در ادامه، گیاهان باقیمانده به محیط هیدروپونیک فاقد نمک منتقل و یک هفته پس از انتقال به شرایط بازیابی، نمونه‌برداری از بافت‌های برگ و ریشه انجام شد. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به صورت Log2FC در شرایط تنش شوری و بازیابی بررسی، و پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها بود، بیان ژن‌های ERF مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق نتایج به‌دست‌آمده در قالب نمودار

آلوروپوس لیتورالیس بر مبنای حضور دو آمینواسید آلانین و آسپارتیک اسید به ترتیب در موقعیت‌های 14 و 19 دمین AP2/ERF و همچنین همولوژی این پروتئین‌ها با پروتئین‌های آراییدوپسیس، مشخص شدند. برای نام‌گذاری ژن‌ها، روشی مورد استفاده قرار گرفت که پیش‌تر در مورد ژن‌های ERF ذرت و جو استفاده شده است (Liu et al., 2013; Guo et al., 2016). بدین صورت که ابتدا پیشوند Al از گیاه *A. littoralis* اخذ و سپس واژه ERF و در نهایت شماره‌گذاری بر اساس گروه‌بندی ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی انجام شد.

#### شناسایی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

خواص فیزیکوشیمیایی مانند تعداد اسیدآمین، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های ERF با استفاده از ابزار Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) محاسبه شد (Gasteiger et al., 2005). جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) پیش‌بینی شد (Horton et al., 2007).

#### شناسایی ساختار ژنی

توالی‌های CDS و DNA ژنومی خانواده ERF در توالی ژنوم مرجع گیاه آلوروپوس لیتورالیس بازیابی شد. الگوی توزیع اینترون‌ها از طریق مقایسه توالی CDS نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن، با استفاده از برنامه GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) انجام گرفت (Hu et al., 2014).

#### ترسیم درخت فیلوژنتیک

هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی ERF به‌دست‌آمده در آلوروپوس با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه (Neighbor-Joining) و با انجام آزمون بوت‌استرپ (Felsenstein, 1985) با 1000 تکرار توسط نرم‌افزار

(AIERF3.2 و AIERF3.6) تا 383 اسیدآمینو (AIERF6.8) و وزن مولکولی آن‌ها نیز از 13/59 تا 41/49 کیلودالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از 4/68 در AIERF2.1 تا 10/57 در AIERF1.4 متغیر بود. در بررسی Guo و همکاران (2016) نیز طول پروتئین‌های خانواده ژنی ERF در جو از 123 تا 385 اسیدآمینو و وزن مولکولی آن‌ها نیز از 13/38 تا 41/37 کیلودالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک آنها نیز از 4/21 تا 11/90 متغیر بود. نتایج مکان‌یابی سلولی پروتئین‌های AIERF نشان داد که جایگاه عمده این پروتئین‌ها هسته می‌باشد، به طوری که جایگاه 23 پروتئین در هسته، 11 پروتئین در کلروپلاست و تنها دو پروتئین در میتوکندری پیش‌بینی شد که با نتایج حاصله از بررسی سایر محققان همخوانی دارد (Cui *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019). وجود تنوع مکانی برای پروتئین‌های AIERF احتمالاً نشان‌دهنده نقش‌های کارکردی متنوع این ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی می‌باشد (جدول 1).

#### شناسایی ساختار ژنی

بررسی ساختار آگرون- اینترونی خانواده ژنی ERF نشان داد که 66/6 درصد ژن‌های ERF آلوروپوس، فاقد اینترون، حدود 30/5 درصد ژن‌ها دارای یک اینترون و فقط 2/7 درصد ژن‌ها دارای 2 اینترون هستند. طول‌ترین طول ژن در DNA با 2584 جفت‌باز مربوط به ژن AIERF2.1 بود (جدول 1). برای ایجاد ژن‌های فاقد اینترون در یوکاریوت‌ها، سه فرضیه شامل انتقال افقی ژن از پروکاریوت‌ها، مضاعف شدن ژن فاقد اینترون و رتروترانسپوزون وجود دارد (Huang *et al.*, 2015). فقدان اینترون در بیشتر ژن‌های عوامل رونویسی AP2/ERF گیاهی از فرضیه انتقال جانبی ژن از مبدأ باکتری‌ها یا ویروس‌ها حمایت می‌کند (Magnani *et al.*, 2004).

Heatmap ترسیم‌شده با استفاده از نرم‌افزار CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/>) ارائه شد (Scherf *et al.*, 2000).

#### نتایج و بحث

##### شناسایی اعضای خانواده عوامل رونویسی ERF در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

در این مطالعه از الگوریتم tBLASTn توالی‌های پروتئینی خانواده AP2/ERF آراییدوپسیس و برنج با ژنوم آلوروپوس برای شناسایی اعضای خانواده ژنی ERF استفاده شد. در نهایت، با حذف توالی‌های تکراری، 67 جایگاه ژنی AP2/ERF در ژنوم آلوروپوس شناسایی شد. برای اطمینان از وجود دمین AP2/ERF، توالی‌های شناسایی‌شده از طریق پایگاه‌های InterProScan، Pfam، SMART و ارزیابی شده و مشخص شد که تمام توالی‌ها دارای دمین AP2/ERF هستند. سپس برای دسته‌بندی پروتئین‌های ابرخانواده AP2/ERF شناسایی دمین‌های AP2 با استفاده از پایگاه SMART صورت گرفت. در نهایت، با بررسی این توالی‌ها و همولوژی با ژن‌های آراییدوپسیس، 36 توالی به‌عنوان اعضای خانواده ERF در گیاه آلوروپوس شناسایی شد. تعداد ژن‌های ERF در آراییدوپسیس، برنج، سورگوم و *Brachypodium distachyon* به ترتیب 65، 77، 53 و 57 می‌باشد (Nakano *et al.*, 2006; Sharoni *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

##### شناسایی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین نقش کارکردی آن‌ها تأثیرگذار باشد. مطالعات فیزیکی شیمیایی این خانواده ژنی با استفاده از ابزار آنالیز Expasy-ProtParam نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد آمینواسید، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک با هم تفاوت دارند. طول پروتئین‌های این خانواده از 123

جدول 1. خصوصیات خانواده ژنی *ERF* در آلوروپوس لیتورالیس

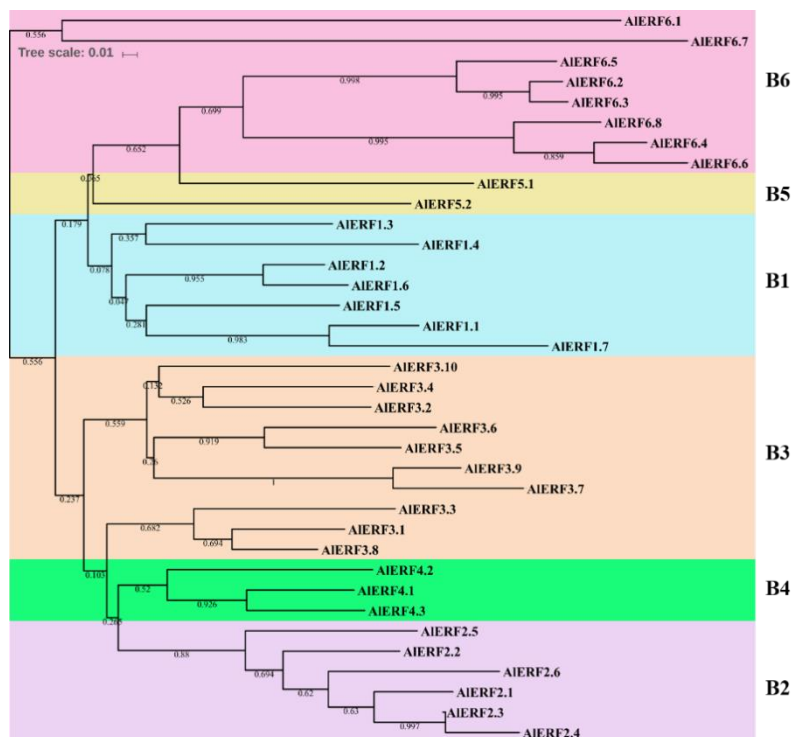
نام ژن Gene Name	شماره ژن Gene ID	شماره دسترسی ژن Accession number	طول پروتئین Protein length (aa)	طول ژن Gene length (bp)	طول CDS CDS length (bp)	تعداد اکزون Exon number	تعداد اینترون Intron number	وزن مولکولی Molecular weight (kDa)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	جایگاه سلولی Subcellular localization
<i>AIERF1.1</i>	Alg1511	MT605972	270	813	813	1	0	28.13	4.76	chlo: 11, nucl: 3
<i>AIERF1.2</i>	Alg2133	MT605973	231	696	696	1	0	23.89	8.79	chlo: 13, nucl: 1
<i>AIERF1.3</i>	Alg2569	MT605974	171	516	516	1	0	17.90	4.91	chlo: 12, nucl: 1, mito: 1
<i>AIERF1.4</i>	Alg4658	MT605975	216	651	651	1	0	22.19	10.57	chlo: 9, mito: 5
<i>AIERF1.5</i>	Alg9166	MT605976	169	510	510	1	0	18.16	10.37	nucl: 7, cyto: 3, chlo: 2, mito: 2
<i>AIERF1.6</i>	Alg9167	MT605977	229	690	690	1	0	23.79	9.10	chlo: 12, cyto: 2
<i>AIERF1.7</i>	Alg13466	MT605978	182	549	549	1	0	19.42	4.98	nucl: 12.5, nucl_plas: 7, cyto: 1
<i>AIERF2.1</i>	Alg2383	MT605979	373	2584	1122	2	1	40.73	4.68	nucl: 11, mito: 2, cyto: 1
<i>AIERF2.2</i>	Alg3060	MT605980	310	1217	933	2	1	34.68	5.53	nucl: 9, cyto: 5
<i>AIERF2.3</i>	Alg14890	MT605981	262	789	789	1	0	29.08	5.97	nucl: 8, chlo: 3, mito: 2, cysk: 1
<i>AIERF2.4</i>	Alg14892	MT605982	339	2094	1020	3	2	37.95	5.59	nucl: 6, cyto: 5, chlo: 2, plas: 1
<i>AIERF2.5</i>	Alg14946	MT605983	335	1139	1008	2	1	36.25	5.23	nucl: 6, chlo: 5, mito: 3
<i>AIERF2.6</i>	Alg15517	MT605984	349	1975	1050	2	1	39.43	7.03	chlo: 8, nucl: 3, mito: 3
<i>AIERF3.1</i>	Alg1058	MT605985	263	792	792	1	0	28.46	5.68	mito: 6, nucl: 5, chlo: 2, cyto: 1
<i>AIERF3.2</i>	Alg5281	MT605986	123	372	372	1	0	13.61	6.62	nucl: 11, mito: 3
<i>AIERF3.3</i>	Alg5508	MT605987	251	756	756	1	0	26.71	6.00	chlo: 12, nucl: 2
<i>AIERF3.4</i>	Alg5871	MT605988	331	996	996	1	0	35.48	6.00	nucl: 14
<i>AIERF3.5</i>	Alg7181	MT605989	124	375	375	1	0	14.00	6.92	nucl: 14
<i>AIERF3.6</i>	Alg7897	MT605990	123	372	372	1	0	13.59	8.60	mito: 7, nucl: 6, chlo: 1
<i>AIERF3.7</i>	Alg11159	MT605991	249	750	750	1	0	26.85	5.69	nucl: 14
<i>AIERF3.8</i>	Alg13072	MT605992	262	789	789	1	0	28.53	5.54	nucl: 7, extr: 3, cyto: 2, chlo: 1, mito: 1
<i>AIERF3.9</i>	Alg13240	MT605993	207	624	624	1	0	22.76	6.98	nucl: 11, chlo: 2, plas: 1
<i>AIERF3.10</i>	Alg14689	MT605994	283	852	852	1	0	30.02	6.23	nucl: 14
<i>AIERF4.1</i>	Alg1658	MT605995	232	903	699	2	1	24.73	10.06	nucl: 11, chlo: 2, cyto: 1
<i>AIERF4.2</i>	Alg4649	MT605996	212	684	639	2	1	22.45	9.98	nucl: 13, cyto: 1
<i>AIERF4.3</i>	Alg10249	MT605997	261	1107	786	2	1	27.85	10.41	chlo: 7, nucl: 7
<i>AIERF5.1</i>	Alg3254	MT605998	247	744	744	1	0	26.35	9.82	nucl: 9, cyto: 4, chlo: 1
<i>AIERF5.2</i>	Alg5821	MT605999	326	981	981	1	0	undefined	undefined	nucl: 11, cyto: 2, mito: 1
<i>AIERF6.1</i>	Alg5224	MT606000	290	873	873	1	0	32.38	4.85	nucl: 7, chlo: 5, plas: 2
<i>AIERF6.2</i>	Alg7780	MT606001	204	716	615	2	1	22.18	9.00	chlo: 7, nucl: 4, mito: 3
<i>AIERF6.3</i>	Alg8738	MT606002	226	843	681	2	1	24.22	9.07	nucl: 6, chlo: 5, mito: 2, cysk: 1
<i>AIERF6.4</i>	Alg11140	MT606003	301	906	906	1	0	32.48	8.48	chlo: 10, nucl: 3, extr: 1
<i>AIERF6.5</i>	Alg12468	MT606004	156	621	471	2	1	16.99	5.67	nucl: 6, chlo: 4, mito: 4
<i>AIERF6.6</i>	Alg13266	MT606005	350	1157	1053	2	1	38.11	8.75	nucl: 13, cyto: 1
<i>AIERF6.7</i>	Alg13396	MT606006	331	996	996	1	0	35.85	4.83	chlo: 12, nucl: 2
<i>AIERF6.8</i>	Alg14687	MT606007	383	1152	1152	1	0	41.49	4.72	nucl: 6, cyto: 3, chlo: 2, mito: 2, cysk: 1

## ترسیم درخت فیلوژنتیک

به‌منظور تجزیه و تحلیل تکامل خانواده *ERF* آلوروپوس، یک درخت فیلوژنتیک از توالی‌های پروتئینی کامل *ERF* آلوروپوس با استفاده از برنامه MEGA 6.0 به روش اتصال همسایه ترسیم شد (شکل 1). درخت فیلوژنتیک نشان داد که 36 پروتئین *AIERF* در شش گروه B1 تا B6 طبقه‌بندی می‌شوند. به این ترتیب که 7 ژن در گروه B1، 6 ژن در گروه B2، 10 ژن در گروه B3، 3 ژن در گروه B4، 2 ژن در گروه B5 و 8 ژن در گروه B6 قرار گرفت (شکل 1). نام‌گذاری این گروه‌ها بر مبنای میزان همولوژی دمین‌های *AP2/ERF* این پروتئین‌ها با پروتئین‌های *ERF* در آراییدوپسیس بود. این نحوه گروه‌بندی بر اساس طبقه‌بندی فیلوژنتیک خانواده ژنی *ERF* در

آراییدوپسیس در سایر گونه‌ها مانند گندم، جو و سورگوم نیز مشاهده شده است (Zhuang et al., 2011; Yan et al., 2013; Guo et al., 2016).

تجزیه و تحلیل دمین‌ها و موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های *ERF* آلوروپوس آنالیزهای هم‌ردیفی چندگانه با استفاده از توالی‌های آمینواسیدی دمین‌های *AP2/ERF* انجام شد. هم‌ردیفی توالی‌ها نشان داد که تمام زیرگروه‌های B1، B2، B3، B4 و B5 خانواده *ERF* آلوروپوس، شامل اسیدآمینینه G4، R6، W10، A15، E16، R18، W27، G29، A37، Y41، D42 و G50 می‌باشند. درحالی‌که بین فاکتورهای زیرگروه B6 با دیگر زیرگروه‌ها (B1 تا B5) در این مورد تفاوت وجود دارد (شکل 2).



شکل 1. آنالیز فیلوژنتیکی اعضای خانواده *ERF* در آلورپوس لیتورالیس. هم‌ردیفی چندگانه پروتئین‌های *ERF* با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیکی بر مبنای روش اتصال همسایه با آزمون بوت‌استرپ با 1000 تکرار ترسیم شد.

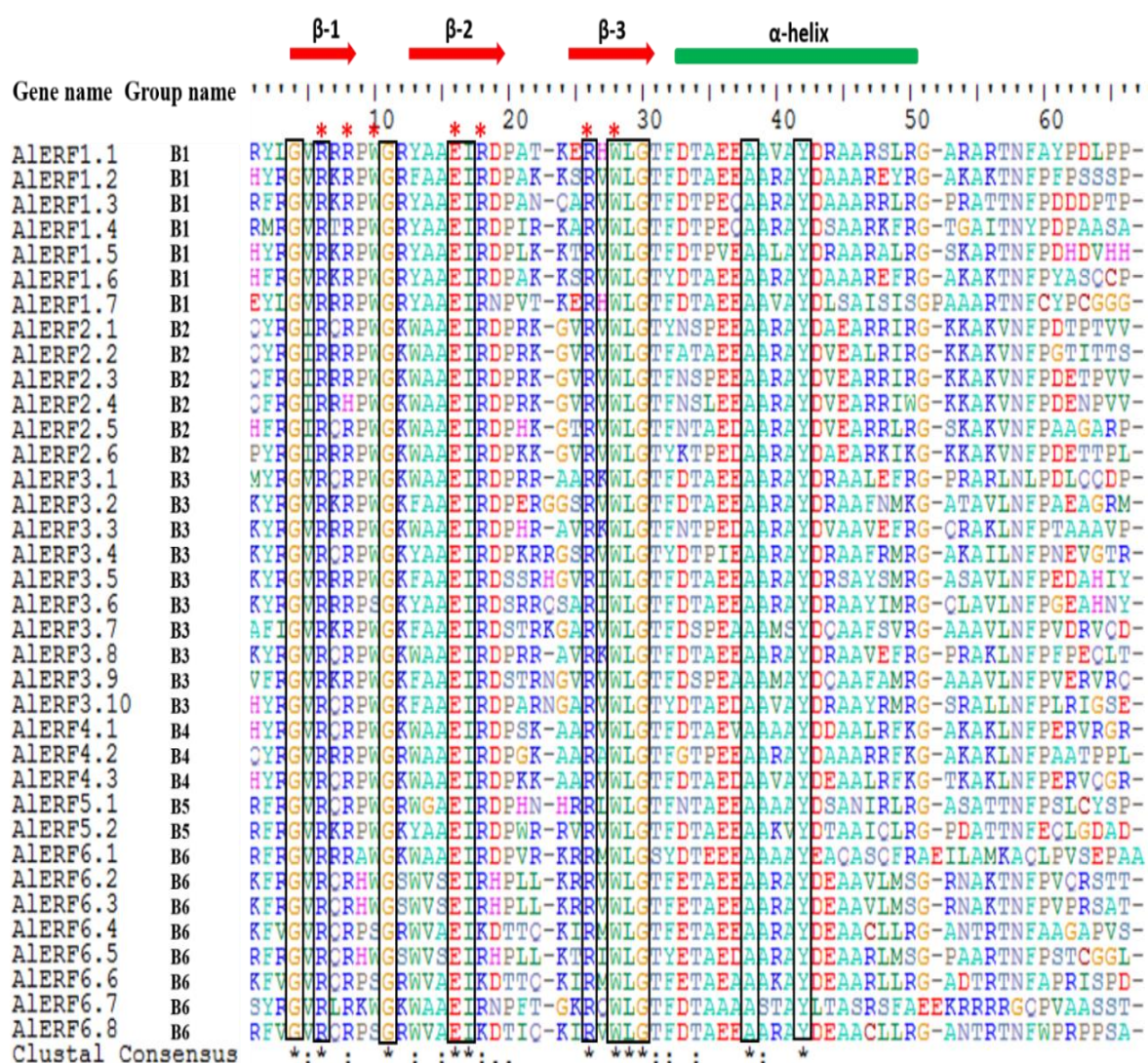
پروتئین‌های *ERF* آلورپوس وجود زنجیره‌های  $\beta$ -sheet و  $\alpha$ -helix را در دمین AP2/ERF تأیید نمود (شکل 2). Allen و همکاران (1998) نشان دادند که اسیدآمینه‌های آرژینین و تریپتوفان در زنجیره  $\beta$ -sheet با نواحی شیار بزرگ DNA قابلیت اتصال داشته که نشان می‌دهد  $\beta$ -sheet دمین AP2/ERF در تشکیل دمین اتصال به جعبه GCC فعالیت دارند. در این تحقیق حضور دمین AP2 با استفاده از نرم‌افزار آنالیز Prosite مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و ساختار دمین ترسیم شد (شکل 3-الف). برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در میان پروتئین‌های هر گروه، تمام پروتئین‌های *ERF* آلورپوس با استفاده از نرم‌افزار MEME مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل 3-ب). موتیف‌های حفاظت‌شده می‌توانند شواهدی در خصوص دلایل طبقه‌بندی در زیرگروه‌های مختلف ارائه دهند؛ چون پروتئین‌های موجود در یک زیرگروه، که ترکیب موتیف مشترکی

هم‌ردیفی توالی‌ها همچنین نشان داد که تمام پروتئین‌های خانواده *ERF* حاوی یک موتیف WLG (W27، L28 و G29) در دمین AP2/ERF هستند (شکل 2). برخی مطالعات نشان داده‌اند که دو آمینواسید آلانین و اسپارتیک اسید به ترتیب در موقعیت‌های 14 و 19 دمین AP2/ERF پروتئین‌های *ERF* حفاظت‌شده می‌باشند (Sakuma *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2006). همان‌طور که در شکل 2 نشان داده شده است A14 و D19 در زیر گروه‌های B1 تا B4 کاملاً حفاظت‌شده می‌باشد، درحالی‌که در B5 و B6 تا حدودی تفاوت وجود دارد. لازم به ذکر است این نتایج در تطابق با تحقیقات پیشین در گیاهان دیگر می‌باشد (Sakuma *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2006).

به‌طورکلی دمین‌های AP2/ERF دارای سه زنجیره  $\beta$ -sheet و یک زنجیره  $\alpha$ -helix می‌باشند (Allen *et al.*, 1998). هم‌ردیفی چندگانه توالی

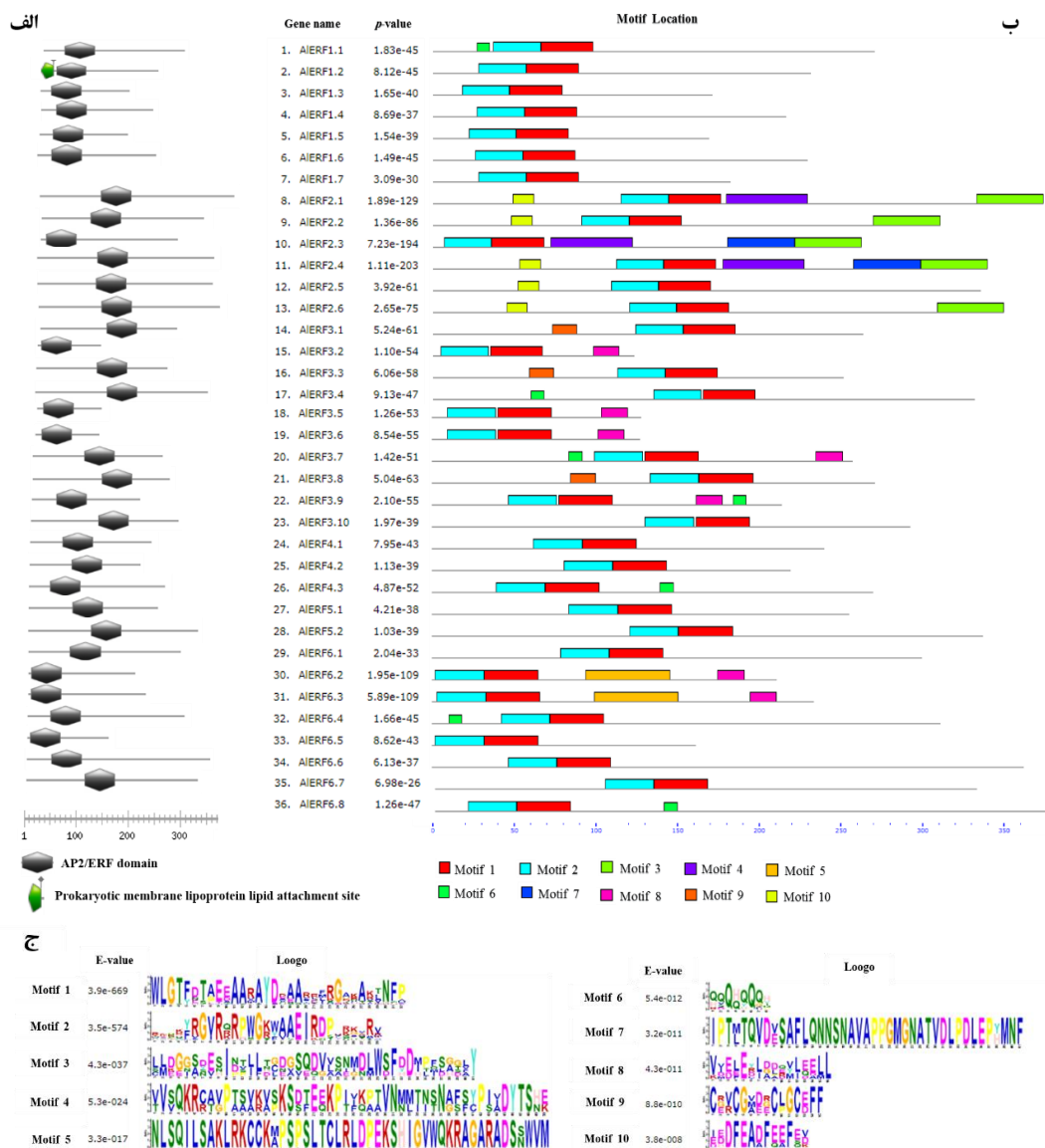
کربوکسیلی در مجاورت دمین AP2/ERF یافت شد (شکل 4-ج)، و این جایگاه اسیدی ممکن است به‌عنوان دمین فعال‌کننده رونویسی عمل کند (Yan *et al.*, 2013). علاوه بر این، سطوح همولوژی بالایی در ناحیه انتهایی آمینی در خارج از دمین AP2/ERF گروه B2 وجود داشت که این امر در گروه B2 پروتئین‌های ERF سورگوم نیز مشاهده شده است (Yan *et al.*, 2013).

را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند، احتمالاً کارکردهای مشابهی را نشان می‌دهند. با مقایسه شکل 3-الف و ب مشخص شد که موتیف‌های یک و دو نشان‌دهنده دمین AP2/ERF هستند. این نتیجه بیانگر این امر است که این موتیف‌های اصلی می‌توانند نقش مهمی در تنظیم بیان پروتئین‌های ERF داشته باشند. در بیشتر پروتئین‌های گروه B2، موتیف LWSY (موتیف 3) در ناحیه انتهایی



شکل 2. هم‌ردیفی دمین‌های AP2/ERF پروتئین‌های ERF آوروپوس لیتورالیس. هم‌ردیفی با ابزار آنلاین ExPasy-ClustalW انجام شد. اسیدآمینه‌های حفاظت‌شده با قاب‌های مشکی مشخص شده‌اند. خطوط سبز و فلش‌های قرمز به ترتیب نشان‌دهنده مناطق پیش‌بینی شده مارپیچ  $\alpha$  و صفحات  $\beta$  در دمین AP2/ERF می‌باشند. ستاره‌های قرمز، آمینواسیدهایی را نشان می‌دهند که به‌طور مستقیم با DNA اتصال برقرار می‌کنند.

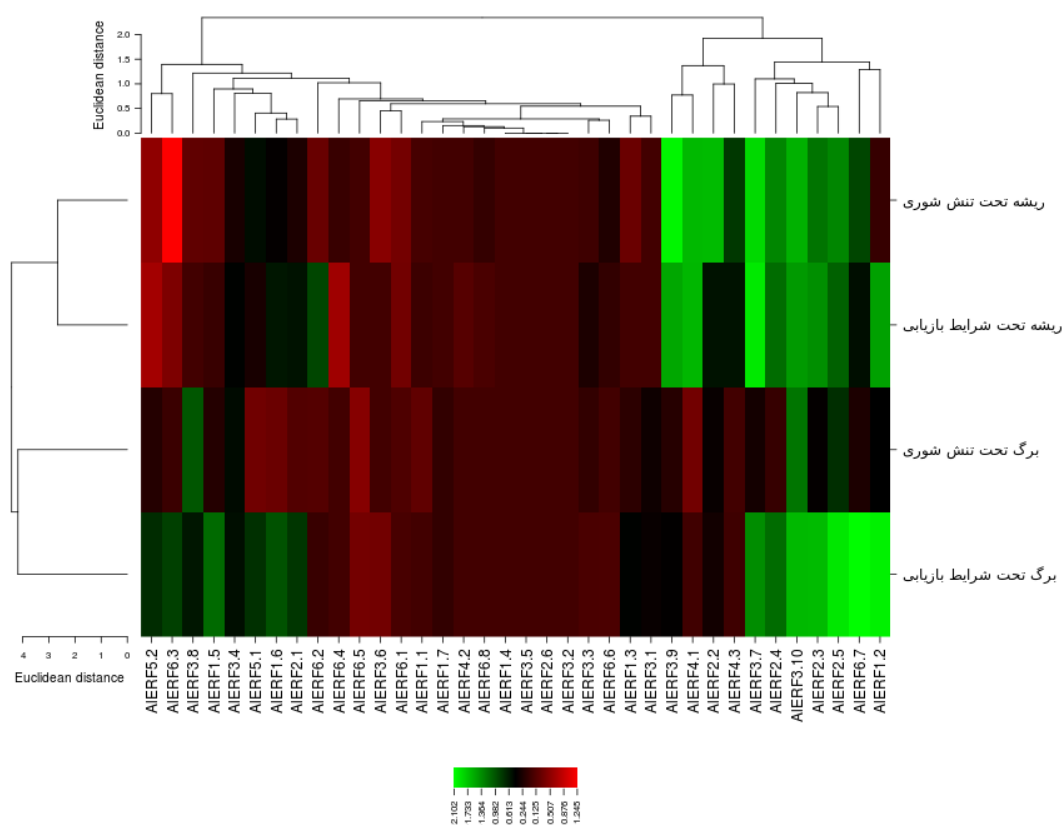




شکل 3. آنالیز موتیف و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی AIERF. (الف) جستجوی دمین با استفاده از برنامه آنالین Prosite انجام شد. (ب) برنامه آنالین MEME برای آنالیز موتیف مورد استفاده قرار گرفت. (ج) نمایش موتیف لوگوی توالی پروتئین‌های AIERF در برنامه MEME. اندازه هر اسیدآمین، بیانگر فراوانی آن در دمین مربوطه می‌باشد.

ترسیم شد (شکل 4). نتایج نشان داد که ژن‌های *AIERF1.7*، *AIERF3.1* و *AIERF6.5* دارای بیان اختصاصی بافت برگ بوده و ژن‌های *AIERF6.4* و *AIERF6.8* دارای بیان اختصاصی بافت ریشه می‌باشند. بیشترین افزایش بیان در ژن *AIERF6.3* تحت شرایط تنش شوری در بافت ریشه با مقدار بیان  $1/25$  (بیان  $2/4$  برابر نسبت به شاهد) مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *ERF* در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس تحت تنش شوری مطالعه پروفایل بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی برای درک کارکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao et al., 2012). برای بررسی بیان ژن‌های *ERF* در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس در شرایط تنش شوری و بازبایی از داده‌های RNA-seq استفاده و نمودار Heatmap در مقیاس  $\log_2FC$



شکل 4. پروفایل بیانی ژن‌های *AIERF* بر اساس داده‌های RNA-seq. Heatmap ارائه شده میزان تغییر بیان ژن‌های *AIERF* را در دو بافت برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و بازیابی نشان می‌دهد. ارزش نسبی سیگنال به صورت نوار رنگی در انتهای Heatmap ارائه شده است که در آن رنگ سبز نشان‌دهنده کاهش بیان، رنگ سیاه نشان‌دهنده عدم تغییر بیان و رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان است.

همچنین مقاومت در برابر پاتوژن باکتریایی *Pseudomonas syringae* را در گیاه آراییدوپسیس تراریخته افزایش داد (Xu et al., 2007).

بیشترین کاهش بیان نیز به ژن *AIERF6.7* (با مقدار بیان  $-2/11$ ) در بافت برگ در شرایط بازیابی (4/3 کاهش بیان نسبت به شاهد) تعلق داشت. بعد از آن بیشترین کاهش بیان به ژن‌های *AIERF3.9* ( $-2/05$ ) و *AIERF1.2* ( $-2/02$ ) به ترتیب در بافت ریشه تحت تنش شوری و در بافت برگ در شرایط بازیابی مشاهده شد (شکل 4). این الگوی بیان متفاوت با توجه به وجود دمین‌های مشابه، می‌تواند به دلیل وجود عملکردهای مولکولی متفاوت و نیز مکانیسم‌های تنظیمی مختلف در کنترل فعالیت این ژن‌ها در بافت‌های مختلف باشد. Dong و همکاران (2012) یک ژن *ERF* پاسخگو به شوری متعلق به

ژن *AIERF6.3* با ژن *WAX INDUCER 1* (AT1G15360) در آراییدوپسیس، همولوگ است. این ژن *WIN1* متعلق به گروه B6 از خانواده ژنی *ERF* می‌باشد. مشخص شده است که این ژن در بیوستنز موم نقش دارد و بیش‌بیا آن در آراییدوپسیس منجر به افزایش تحمل به خشکی و تنظیم نفوذپذیری کوتیکول شد (Kannangara et al., 2007). این ژن همچنین با اتصال به عنصر راه‌انداز GCC-box مرتبط با بیماری‌زایی به‌عنوان یک فعال‌کننده رونویسی عمل کرده و می‌تواند توسط عوامل تنش و اجزای مسیر انتقال پیام تنش در تنظیم بیان ژن دخیل باشد (Broun et al., 2004). مشخص شده است که بیان اکتوپیک یک پروتئین *ERF* گندم به نام TaERF1 متعلق به گروه B-2، تحمل در برابر تنش‌های شوری، خشکی، سرما و

*ERF* با هدف روشن‌سازی تکامل، الگوهای بیان و عملکردهای احتمالی ژن‌های *ERF* در آلوروپوس لیتورالیس در پاسخ به تنش شوری می‌باشد. این یافته‌ها اطلاعاتی برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌های *ERF* در تحمل گیاه به تنش شوری فراهم می‌نماید و تجزیه و تحلیل جامع نتایج به‌دست‌آمده برای غربالگری ژن‌ها برای شناسایی بیشتر کارکرد آن‌ها و همچنین پاسخ آن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف مفید می‌باشد.

#### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (طرح پژوهشی شماره T234/96) انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام نمایند.

گروه B-1 به نام *TaERF4* را از گندم جدا کردند؛ بیان اکتوپیک این ژن در آرابیدوپسیس، حساسیت به تنش شوری را افزایش داد. گزارش شده است که بیش‌بیاں برخی از ژن‌های *ERF* پاسخ به تنش را سرکوب نموده و گیاهان تراریخته را در برابر تنش حساس‌تر می‌کند (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2007). با این حال، بیان یک ژن *ERF* در برنج به نام *Ese1* تحت تنش شوری القاء شد (Zhang et al., 2011). دو ژن *SIERF68* و *SIERF80* در طول تنش شوری بیشتر بیان شدند (Sharma et al., 2010). نتایج تحقیق حاضر و سایر بررسی‌های به‌عمل آمده نشان داده است که ژن‌های خانواده *ERF* در پاسخ به تنش شوری دخیل هستند و می‌توانند نقش‌های مهمی در تحمل گیاه به تنش شوری ایفا نمایند.

این بررسی به‌عنوان اولین مطالعه جامع خانواده

## REFERENCES

- Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M (1998) A novel mode of DNA recognition by a  $\beta$ -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.* 17(18): 5484-5496.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37: 202-208.
- Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang C-Z, Riechmann JL (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13): 4706-4711.
- Chen L, Han J, Deng X, Tan S, Li L, Li L, Zhou J, Peng H, Yang G, He G (2016) Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*. *Sci. Rep.* 6: 21623.
- Cui L, Feng K, Wang M, Wang M, Deng P, Song W, Nie X (2016) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics.* 17(1): 636.
- 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(1): 38-45.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4): 783-791.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A (2015) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44: 279-285.

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. (ed) The proteomics protocols handbook, Humana Press, New York City, New York, United States, pp 571-607.
- Guo B, Wei Y, Xu R, Lin S, Luan H, Lv C, Zhang X, Song X, Xu R (2016) Genome-wide analysis of *APETALA2/ethylene-responsive factor* (*AP2/ERF*) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). PLoS One. 11(9): e0161322.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. 41: 95-98.
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res. 35: 585-587.
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. Bioinformatics. 31(8): 1296-1297.
- Huang W, Xian Z, Kang X, Tang N, Li Z (2015) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *GRAS* gene family in tomato. BMC Plant Biol. 15(1): 209.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, Mcanulla C, Mcwilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. 30(9): 1236-1240.
- Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Höfte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P (2007) The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell. 19(4): 1278-1294.
- Kawahara Y, De La Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. Rice. 6(1): 4.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. Nucleic Acids Res. 40(D1): D1202-D1210.
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2014) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. Nucleic Acids Res. 43(D1): D257-D260.
- Liu M, Sun W, Ma Z, Zheng T, Huang L, Wu Q, Zhao G, Tang Z, Bu T, Li C (2019) Genome-wide investigation of the *AP2/ERF* gene family in tartary buckwheat (*Fagopyum Tataricum*). BMC Plant Biol. 19(1): 84.
- Liu S, Wang X, Wang H, Xin H, Yang X, Yan J, Li J, Tran L-SP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2013) Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. PLoS Genet. 9(9): e1003790.
- Magnani E, Sjölander K, Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. Plant Cell. 16(9): 2265-2277.
- Mao D, Chen C (2012) Colinearity and similar expression pattern of rice *DREB1s* reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. PLoS One. 7(10): e47275.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in Arabidopsis and rice. Plant Physiol. 140(2): 411-432.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell. 7(2):

- 173-182.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O, Samaha R (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Sci.* 290(5499): 2105-2110.
- Rong W, Qi L, Wang A, Ye X, Du L, Liang H, Xin Z, Zhang Z (2014) The ERF transcription factor Ta ERF 3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 12(4): 468-479.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the AP2/ERF domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(3): 998-1009.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.* 24(3): 236.
- Sharma MK, Kumar R, Solanke AU, Sharma R, Tyagi AK, Sharma AK (2010) Identification, phylogeny, and transcript profiling of *ERF* family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Mol. Genet. Genomics.* 284(6): 455-475.
- Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi IR, Omura T, Kikuchi S (2010) Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol.* 52(2): 344-360.
- Sigrist CJ, De Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I (2012) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41(D1): D344-D347.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2003) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics.* 1: 2-3.
- Wang S, Zhou B, Yao W, Jiang T (2018) PsnERF75 Transcription Factor from *Populus simonii* × *P. nigra* Confers Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *J Plant Biol.* 61(2): 61-71.
- Wang X, Hou C, Zheng K, Li Q, Chen S, Wang S (2017) Overexpression of *ERF96*, a small ethylene response factor gene, enhances salt tolerance in Arabidopsis. *Biologia Plantarum.* 61(4): 693-701.
- Xu ZS, Xia LQ, Chen M, Cheng XG, Zhang RY, Li LC, Zhao YX, Lu Y, Ni ZY, Liu L (2007) Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 65(6): 719-732.
- Yan HW, Hong L, Zhou YQ, Jiang HY, Zhu SW, Fan J, Cheng BJ (2013) A genome-wide analysis of the *ERF* gene family in sorghum. *Gen. Mol. Res.* 12(2): 2038-2055.
- Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D, Wu K (2005) Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol. Biol.* 58(4): 585-596.
- Yao W, Wang L, Zhou B, Wang S, Li R, Jiang T (2016a) Over-expression of poplar transcription factor *ERF76* gene confers salt tolerance in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.* 198: 23-31.
- Yao W, Wang S, Zhou B, Jiang T (2016b) Transgenic poplar overexpressing the endogenous transcription factor *ERF76* gene

- improves salinity tolerance. *Tree physiology*. 36(7): 896-908.
- Zhang G, Chen M, Chen X, Xu Z, Guan S, Li LC, Li A, Guo J, Mao L, Ma Y (2008) Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the *ERF* gene family in soybean (*Glycine max* L.). *J. Exp. Bot.* 59(15): 4095-4107.
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y (2009) Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.* 60(13): 3781-3796.
- Zhang H, Li W, Chen J, Yang Y, Zhang Z, Zhang H, Wang XC, Huang R (2007) Transcriptional activator TSRF1 reversely regulates pathogen resistance and osmotic stress tolerance in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 63(1): 63-71.
- Zhang L, Li Z, Quan R, Li G, Wang R, Huang R (2011) An AP2 domain-containing gene, *ESE1*, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157(2): 854-865.
- Zhou ML, Tang YX, Wu YM (2012) Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factor family in *Zea Mays*. *Curr. Bioinform.* 7(3): 324-332.
- Zhuang J, Chen JM, Yao QH, Xiong F, Sun CC, Zhou XR, Zhang J, Xiong AS (2011) Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum*. *Mol. Biol. Rep.* 38(2): 745-753.
- Zouari N, Saad RB, Legavre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene.* 404(1): 61-69.