

تعیین خصوصیات و نقش خانواده پروتئین‌های دهیدرین در تحمل به تنش‌های غیر زیستی در گیاه *Aeluropus littoralis*

بهناز دولت‌آبادی^۱، غلامعلی رنجبر^{۲*}، حمید نجفی زرنی^۱، سید حمیدرضا هاشمی پتروودی^۳

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

۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳. استادیار، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۶)

Characterization and Role of the Dehydrin Proteins Family in Abiotic Stress Tolerance in *Aeluropus littoralis*

Behnaz Dolatabadi¹, Gholam Ali Ranjbar^{2*}, Hamid Najafi Zarrini², Seyyed Hamidreza Hashemi-petroudi³

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

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. 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.

(Received: Aug. 24, 2020 - Accepted: Dec. 6, 2020)

Abstract

Dehydrins (DNHs) belong to group II of LEA (Late Embryogenesis Abundant) protein family which are expressed in late embryogenesis and accumulate in vegetative tissues in response to multiple abiotic stresses such as salt, drought and cold stress. These proteins could be classified to five subgroups (YnSKn, Kn, SKn, KnS, and YnKn) based on the sequence and number of K, S, and Y segments. In this study, 5 genes encoding dehydrin protein (DHN) were identified in *Aeluropus littoralis*, genome as a halophyte grass, belonging to the *Poaceae* family and physicochemical characteristics, cell localization, conserved motifs and gene structure were determined and evolutionary relationships among different species were considered. AIDHN proteins were classified in the YnSKn subgroup based on highly conserved domains. The expression pattern of *AIDHN.5* gene as a homologue of *RAB18* (*AT5G66400*) gene was examined in both leaf and root tissues under salinity, drought, cold stresses and abscisic acid treatment. Analysis of the expression pattern of this gene in both leaf and root tissues showed that this gene is more expressed in leaf tissue compared to root under drought, cold stresses and ABA treatment. Current study lays the foundation for further studies into the regulation of their expression under various environmental conditions.

Keywords: Gene structure, Halophyte, Motif, RT-qPCR analysis, YnSKn subgroup.

چکیده

دهیدرین‌ها (DHNs) متعلق به گروه دوم پروتئین‌های LEA می‌باشند که اعضای آن در اواخر دوره جنین‌زایی در بذر و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی و سرما در بافت رویشی تجمع می‌یابند. این پروتئین‌ها بر اساس توالی و تعداد قطعات K (لیزین)، S (سرین) و Y (تیروزین) به پنج زیرگروه SKn, YnSKn, KnS, Kn و YnKn طبقه‌بندی می‌شوند. در این مطالعه، ۵ ژن کدکننده پروتئین دهیدرین (DHN) در ژنوم آلورپوس لیترالیس (*Aeluropus littoralis*) به‌عنوان یک گیاه هالوفیت متعلق به خانواده گندمیان شناسایی و خصوصیات فیزیوشیمیایی، جایگاه سلولی، موتیف‌های حفاظت‌شده و ساختار ژنی آن‌ها تعیین و روابط تکاملی بین این پروتئین‌ها در سایر گونه‌ها نیز مدنظر قرار گرفت. پروتئین‌های AIDHN بر اساس دامنه‌های بسیار حفاظت‌شده K, S و Y در زیرگروه YnSKn قرار گرفتند. الگوی بیان ژن *AIDHN.5* به‌عنوان همولوگ ژن *RAB18* اراییدوپسیس (*AT5G66400*) در دو بافت برگ و ریشه تحت تنش‌های شوری، خشکی، سرما و تیمار آبسزیک اسید، مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز الگوی بیان این ژن در دو بافت برگ و ریشه نشان داد که این ژن در تنش‌های شوری، خشکی، سرما و هورمون ABA در بافت برگ در مقایسه با ریشه بیشتر بیان می‌شود. این نتایج، نشان‌دهنده نقش مهم دهیدرین‌ها، در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی می‌باشد. این مطالعه پایه و اساس مطالعات بیشتر در مورد تنظیم بیان این ژن‌ها در شرایط مختلف محیطی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز RT-qPCR، زیرگروه YnSKn، ساختار ژنی، موتیف، هالوفیت.

مقدمه

گیاهان برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی، پروتئین‌های آب‌دوست^۱ متنوعی تولید می‌کنند. یک گروه مهم از این پروتئین‌ها که در حفاظت سلول در طول تحمل به تنش‌های محیطی نقش دارند، خانواده ژنی LEA^۲ هست (Hinch et al., 2012). این پروتئین‌ها در اواخر مرحله جنین‌زایی در بذور تجمع می‌یابند و برای اولین بار در بذور پنبه یافت شدند (Galau et al., 1986). پروتئین‌های LEA عمدتاً شامل ترتیبی تکراری از آمینواسیدهای آب‌دوست هستند که ساختاری به‌شدت آب‌دوست با پایداری حرارتی بالا تشکیل می‌دهند (Tunnacliffe et al., 2007). ژن‌های LEA به‌طور عمده در بذر بیان می‌شوند. به دلیل اینکه در اواخر دوره جنینی بیان می‌شوند، به این نام خوانده می‌شوند و ۴ درصد پروتئین‌های سلول را به خود اختصاص می‌دهند (Roberts et al., 1993). پروتئین‌های LEA بر اساس موتیف‌های حفاظت‌شده، به هفت خانواده طبقه‌بندی می‌شوند (Battaglia et al., 2008).

دهیدرین‌ها^۳ (DHNs) متعلق به گروه دوم پروتئین‌های LEA می‌باشند که اعضای آن در اواخر دوره جنین‌زایی در بذر و در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی و سرما در بافت رویشی تجمع می‌یابند (Liu et al., 2019). دهیدرین‌ها شامل چهار قطعه حفاظت‌شده S، K، Y ([V/T]D [E/Q]YGNP) و Φ هستند. آن‌ها بر اساس توالی و تعداد قطعات S، K و Y به پنج زیرگروه SKn، YnSKn، KnS، Kn و YnKn طبقه‌بندی می‌شوند. دهیدرین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های ذاتاً بی‌نظم، فاقد ساختار سه‌بعدی شناخته‌شده‌ای هستند. با این حال پیش‌بینی می‌شود که قطعات K با

تشکیل ساختارهای آمفی‌پاتیک آلفاهلیکس^۴ می‌توانند از آنزیم‌ها و غشاها محافظت کنند. قطعه K موجود در تمام دهیدرین‌ها یک موتیف غنی از لیزین است که از ۱۵ اسیدآمینو ([E/H]KKGIMDKIKEKLP) تشکیل شده است (Zhang et al., 2018). قطعه K دهیدرین گندم WZY2 به دلیل عملکرد آن در برابر تنش گرما بسیار حائز اهمیت است (Yang et al., 2015). قطعه K دهیدرین ذرت DHN1 برای اتصال به وزیکول‌های فسفو لیپید آنیونی^۵ ضروری است و با اتصال به سدیم دودسیل سولفات یا وزیکول‌های فسفولیپید آنیونی، یک تغییر در آرایش ماریپیج آلفا به وجود می‌آورد (Koag et al., 2009). به نظر می‌رسد که دهیدرین‌ها به‌عنوان چاپرون‌ها عمل می‌کنند و موجب تثبیت غشا و مانع از تجمع یا غیرفعال شدن پروتئین‌ها تحت تنش خشکی می‌شوند (Graether et al., 2014). از آن‌جا که بیان بسیاری از DHN‌ها به‌وسیله فیتوهورمون آبسزیک اسید (ABA) افزایش می‌یابد، آن‌ها همچنین به‌عنوان پروتئین RAB (پاسخگو به ABA) نامیده می‌شوند (Verma et al., 2017). اگرچه نقش عملکردی دهیدرین‌ها به‌خوبی شناخته نشده است، اما بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که دهیدرین‌ها می‌توانند تحمل گیاهان را در برابر بسیاری از تنش‌های غیر زیستی افزایش دهند. بیش‌بیان دهیدرین پرونوس مومه (Prunus mume) و ساوسورا اینولوکراتا (Sucsorea incucrata) موجب افزایش تحمل توتون (Nicotiana tabacum) تراریخت در برابر تنش‌های سرما و خشکی شد (Bao et al., 2017; Guo et al., 2017). بیش‌بیان دهیدرین YSK2

4 Amphipathic α -helical

5 Anionic phospholipid vesicles

6 Responsive to abscisic acid

7 Overexpression

1. Hydrophilic

2. Late embryogenesis abundant

3. Dehydrins

گیاه نمک‌های خاک را جذب کرده و از طریق سیستم میان سلولی خود به سمت بالا انتقال می‌دهد و سرانجام از طریق برگ‌های خود که دارای تارهای نمکی هستند، به بیرون از گیاه ترشح می‌کند (Gulzar et al., 2003). در این مطالعه، ۵ عضو خانواده ژنی *DHN* در آلوروپوس شناسایی و خصوصیات فیزیوشیمیایی، جایگاه سلولی، موتیف‌های حفاظت‌شده و ساختار ژنی آن‌ها تعیین شد و روابط تکاملی بین این پروتئین‌ها در سایر گونه‌ها نیز مدنظر قرار گرفت. در نهایت، الگوی بیان ژن *AIDHN.5* در دو بافت برگ و ریشه در تنش‌های شوری، خشکی، سرما و تحت تیمار آبسزیک‌اسید، مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه اولین گزارش در مورد شناسایی و بررسی روابط تکاملی، ساختاری و بیانی خانواده ژنی دهیدرین آلوروپوس بوده و نتایج آن می‌تواند اطلاعات پایه‌ای جهت درک بهتر کارکرد و روابط تکاملی این خانواده ژنی در آلوروپوس فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

شناسایی ژن‌های *DHN* و تشخیص دامنه برای شناسایی ژن‌های *DHN* در ژنوم گیاه *A. littoralis*، توالی پروتئینی ژن‌های *DHN* برنج و آرابی‌دوپسیس، به ترتیب از پایگاه‌های اطلاعاتی RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) و TAIR (Kawahara et al., 2013) و Lamesch (<https://www.arabidopsis.org/>) (et al., 2012) دریافت و از روش tBLASTn جهت جستجوی ژن‌های *DHN* در توالی ژنوم گیاه *A. littoralis* ارائه شده در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان استفاده گردید. این اطلاعات شامل ۱۵،۹۱۶ مدل ژن پیش‌بینی شده بوده که از تعیین‌توالی کامل ژنوم (WGS) آلوروپوس در سیستم HiSeq 2500 Illumina

سورگوم (*Sorghum bicolor*) باعث افزایش تحمل سورگوم تراریخته در برابر تنش‌های اسمزی و دمای بالا گردید (Halder et al., 2017). کومار و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که بیش‌بیان ژن *OsDHN1* در برنج، تحمل گیاه را در مواجهه با تنش‌های شوری و خشکی افزایش می‌دهد (Kumar et al., 2014). همچنین Liu و همکاران (۲۰۱۵) عنوان نمودند که ارتباط مستقیمی بین بیان ژن *ShDHN* و تحمل به تنش‌های سرما و خشکی در گوجه‌فرنگی وجود دارد. نتایج بررسی Zhang و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که بیش‌بیان ژن *CaDHN4* در آرابی‌دوپسیس می‌تواند این گیاه را در برابر تنش‌های سرما و شوری محافظت نموده و حساسیت آن را در برابر ABA کاهش می‌دهد (Zhang et al., 2019). بیش‌بیان ژن *CuCOR19* مرکبات و ژن *ZmDHN2b* ذرت، تحمل توتون تراریخت را در برابر تنش سرما افزایش داد (Hara et al., 2003; Xing et al., 2011). در بررسی دیگری بیش‌بیان ژن‌های دهیدرین مانند *ERD10*، *LT130*، *RcDhn5* و *DHN-5* در آرابی‌دوپسیس، تحمل به تنش‌های محیطی مختلفی مانند یخ‌زدگی و شوری را نشان داد (Puhakainen et al., 2004; Brini et al., 2007; Peng et al., 2008). بنابراین، به‌خوبی مشخص شده است که این پروتئین‌ها در طول کم‌آبی سلولی نقش حفاظتی مهمی دارند اما عملکرد دقیق آن‌ها هنوز ناشناخته باقی‌مانده است (Guo et al., 2019; Mota et al., 2019; Tiwari et al., 2019).

گیاه آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) یک هالوفیت چندساله از خانواده گندمیان می‌باشد (Zouari et al., 2007). این گیاه یکی از گونه‌های شورزی بومی ایران می‌باشد که می‌تواند در خاک‌هایی با هدایت الکتریکی (EC) ۱۷/۵ تا ۶۲ میلی‌موس بر سانتی‌متر رشد کند. این

نسبت به DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از سرور GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) ترسیم گردید (Hu *et al.*, 2014).

تجزیه و تحلیل موتیف‌های پروتئین‌ها

ابزار تشخیص موتیف MEME (<http://meme->) جهت یافتن موتیف‌های حفاظت‌شده در پروتئین‌های DHN با پارامترهای تعیین‌شده (شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف، و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمین) استفاده شد (Bailey *et al.*, 2009).

مواد گیاهی و اعمال تنش

در این مطالعه از ۴۵ نمونه کلون *A. littoralis* استفاده گردید (Hashemi *et al.*, 2016; Younesi-Melerdi *et al.*, 2020). کشت نمونه‌های کلون در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری صورت پذیرفت. سپس نمونه‌های کلون‌شده در دسته‌های ۳ تایی به ظروف پلاستیکی که هر کدام حاوی ۵ لیتر محلول غذایی هوگلند بودند تحت کشت هیدروپونیک منتقل (Hoagland *et al.*, 1933) و اعمال تنش روی کلون‌های دو ماهه با اندازه یکنواخت بدین صورت انجام گردید: برای تنش شوری، گیاهان به صورت تدریجی (اضافه نمودن ۱۰۰ میلی‌مولار نمک (NaCl) به ازای هر ۴۸ ساعت تا غلظت نهایی ۶۰۰ میلی‌مولار NaCl تیمار شدند (رفرنس). به‌منظور تنش خشکی، گیاهان با PEG 6000 ۲۰ درصد (با میزان تنش اسمزی -0.8 MPa) تیمار شدند و برای تنش سرما، گیاهان در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌برداری در سری‌های زمانی ۶، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از اعمال تنش در دو بافت ریشه و برگ در سه تکرار بیولوژیک انجام شد. تیمار هورمون

به‌دست آمده است (منتشر نشده). تمامی ژن‌های کاندید به‌منظور تأیید دمین حفاظت‌شده DHN (PF00257) در پایگاه اطلاعاتی Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) مورد بررسی قرار گرفته (Finn *et al.*, 2015).

شناسایی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها

اطلاعات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های DHN گیاه آلوروپوس مانند تعداد اسیدآمین، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلفاتیک، شاخص پایداری و GRAVY با استفاده از ابزار Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) محاسبه شد (Gasteiger *et al.*, 2005). جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از سرور WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) پیش‌بینی گردید (Horton *et al.*, 2007).

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی و تجزیه و تحلیل

فیلولژنتیک

به‌منظور بررسی روابط تکاملی ژن‌های DHN در بین گونه‌های مختلف گیاهی، هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های آمینواسیدی شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار Clustal X version 2.0 با تنظیمات پیش‌فرض انجام شد (Larkin *et al.*, 2007). سپس از نرم‌افزار MEGA7.0 (<http://www.megasoftware.net>) برای ساخت درخت فیلولژنتیک بر اساس روش اتصال همسایه (Neighbor-Joining) با مقدار بوت‌استرپ ۱۰۰۰ استفاده گردید (Kumar *et al.*, 2016).

تجزیه و تحلیل ساختار اگزون-اینترون‌ی

ساختار ژنی ژن‌های DHN که نشان‌دهنده مرزهای اگزون-اینترونی می‌باشد، از طریق مقایسه توالی CDS

طراحی آغازگرها اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3->) (0.4.0) انجام شد (Untergasser *et al.*, 2012) (جدول ۱). اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های هدف در دستگاه Applied Biosystems و با استفاده از کیت The Maxima (Thermo Scientific) SYBR Green/ROX qPCR Master Mix در سه تکرار تکنیکی صورت گرفت. چرخه دمایی و زمانی به صورت زیر در نظر گرفته شد: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشته‌سازی اولیه، سپس مرحله واسرشته‌سازی در ۹۵ دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال/توسعه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه در ۴۰ چرخه تکرار شد و سه کنترل منفی (NTC) برای هر آغازگر در نظر گرفته شد. در این مطالعه با توجه به تحقیقات پیشین، از دو ژن مرجع برای هر بافت استفاده گردید. برای نرمال‌سازی بیان ژن، از میانگین ژنومتریک ژن‌های مرجع *GTF* و *U2SnRNP* برای بافت برگ و از میانگین ژنومتریک ژن‌های مرجع *EF1a* و *UBQ* برای بافت ریشه استفاده شد (Hashemi *et al.*, 2016). آنالیز کمی داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گرفت (Livak *et al.*, 2001).

آبسزیک‌اسید نیز با اسپری هورمون ۱۰۰ میکرومولار روی برگ‌ها انجام و نمونه‌برداری در سری‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار در دو بافت برگ و ریشه در سه تکرار بیولوژیک انجام گردید. ۳ گلدان هم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و همزمان در سری‌های زمانی مختلف نمونه‌برداری از آنها نیز صورت گرفت. تجزیه واریانس مقادیر بیان ژن‌ها با استفاده از روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار در ۳ تکرار بیولوژیک با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام گرفت. و مقایسه میانگین با آزمون t-test در اکسل انجام شد.

آنالیز بیان ژن *AIDHN.5*

استخراج RNA کل از بافت برگ و ریشه (۳ تکرار بیولوژیک) با استفاده از کیت شرکت کیاژن (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و نانودراپ (Thermo Scientific, USA) مورد بررسی قرار گرفت. جهت حذف DNA ژنومی از *DNaseI* (Invitrogen™ Ambion™ DNaseI) استفاده شد. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA کل و آغازگرهای oligo (dT) توسط کیت شرکت ترمو (Thermo Scientific) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه قطعه تکثیرشده

Amplicon size	Sequence(5'-3')	Primer name
87	CCTCCCTACCAACCGTCCA GCAGGGTCCAATGATAGTTTCTCT	AIDHN.5
97	TGCTGTCGGTIGTCATCAA CTTCCATCAAACGCCTCATT	EF1A
199	CGTGGATGAGATTGAGAGGAA TGGAGGACTACGGCTTCTA	U2SURP
200	CTTGGTCTGCTGTTGTCTTG CACGGTTCACCTATCCATCAC	UBQ
108	TTCCAAGTGGCCATCAGGTT	GTF

AAAGGGCTTCCTGCCTCTTG

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین خصوصیات خانواده ژنی *DHN*

در ژنوم *A. littoralis*

در مجموع، بر مبنای همولوژی با ژن‌های *DHN* برنج و آراییدوپسیس، ۵ ژن *DHN* در ژنوم *A. littoralis* شناسایی گردید (جدول ۲). جهت اطمینان از وجود دمین حفاظت‌شده *DHN* (PF00257)، توالی‌های شناسایی‌شده از طریق پایگاه Pfam ارزیابی شده و مشخص شد که تمام توالی‌ها دارای دمین *DHN* هستند. در مطالعات قبلی گزارش شده، تعداد ژن‌های *DHN* شناسایی‌شده در آراییدوپسیس، برنج، جو و ارزن ایتالیایی، به ترتیب ۱۰، ۸، ۱۳ و ۷ می‌باشد (Rodriguez et al., 2005; Wang et al., 2007; Hundertmark et al., 2008; Nagaraju et al., 2018).

تجزیه و تحلیل ترکیبات آمینواسیدی ۵ پروتئین *AIDHN* نشان داد که آن‌ها ویژگی‌های مشترکی را به اشتراک می‌گذارند (جدول ۲). طول پروتئین‌های این خانواده از ۹۳ (AIDHN.4) تا ۱۹۸ اسیدآمینو (AIDHN.1) و وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۱۰/۰۹ تا ۱۹/۹۰ کیلودالتون متغیر بود. مقدار پارامتر GRAVY محاسبه شده برای تمام پروتئین‌های *AIDHN* در محدوده -۱/۰۴۵ تا -۱/۳۶۸ بود، که نشان‌دهنده خاصیت آبدوستی این پروتئین‌ها می‌باشد. در واقع، *DHN*‌ها به دلیل ماهیت بسیار آبدوستی و بدون ساختار بودن از تنش فرار نموده و از سایر پروتئین‌ها نیز حفاظت می‌کنند (Nagaraju et al., 2018). در بررسی Jing و همکاران (۲۰۱۶) نیز وزن مولکولی پروتئین‌های *DHN* در فلفل بین ۱۳/۸۲ تا ۲۳/۰۴ کیلودالتون پیش‌بینی شده و مشخص شد که تمام اعضای خانواده *CaDHN* بسیار آبدوست با مقادیر GRAVY -۰/۸۸۵ تا -۱/۶۰۲ می‌باشند.

دامنه نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های *AIDHN*

از ۷/۲۸ در AIDHN.3 تا ۹/۵۶ در AIDHN.4 و شاخص آلیفاتیک از ۲۳/۷۰ تا ۴۵/۱۶ متغیر بود. پروتئین‌های AIDHN.4 و AIDHN.5 دارای شاخص پایداری بیشتر از ۴۰ بوده و ناپایدار می‌باشند. نتایج مکان‌یابی سلولی پروتئین‌های *AIDHN* نشان داد که جایگاه عمده این پروتئین‌ها هسته می‌باشد (جدول ۲). دامنه نقطه ایزوالکتریک *DHN*‌های جو در محدوده ۵/۲۱ تا ۹/۵۲ گزارش شده است (Kosová et al., 2007). مقدار pI یکی از ویژگی‌های بیوشیمیایی مهم برای تقسیم‌بندی *DHN*‌های گیاهی در نظر گرفته می‌شود، زیرا *DHN*‌های دارای خصوصیات اسیدی یا بازی مختلف در یک زیرگروه قادرند رفتارهای مختلفی در برابر فاکتورهای محیطی به نمایش بگذارند (Liu et al., 2012).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن‌های *AIDHN*

به‌منظور تجزیه و تحلیل جامع روابط تکاملی بین ژن‌های *AIDHN* و ژن‌های *DHN* آراییدوپسیس، برنج، ذرت، سورگوم و ارزن ایتالیایی، یک درخت فیلوژنتیک از توالی‌های پروتئینی *DHN* ترسیم شد. بر اساس نتایج فیلوژنتیک، *DHN*‌ها به پنج گروه شدند: *SKn*، *YnSKn*، *KnS*، *Kn* و *YnKn* طبقه‌بندی شدند. تمام پروتئین‌های *AIDHN* در گروه *YnSKn* قرار گرفتند (شکل ۱). علاوه بر این، *DHN*‌های گروه *YnSKn* (تعداد ۵ در آلوروپوس، ۳ در آراییدوپسیس، ۶ در برنج، ۳ در ذرت، ۳ در سورگوم و ۶ در ارزن ایتالیایی) بیش از ۵۰ درصد از کل اعضای *DHN* در درخت فیلوژنتیک را به خود اختصاص داده است و آن را به بزرگ‌ترین گروه تبدیل نموده است که با نتیجه که پروتئین‌های *DHN* نوع *YnSK2* یکی از فراوان‌ترین

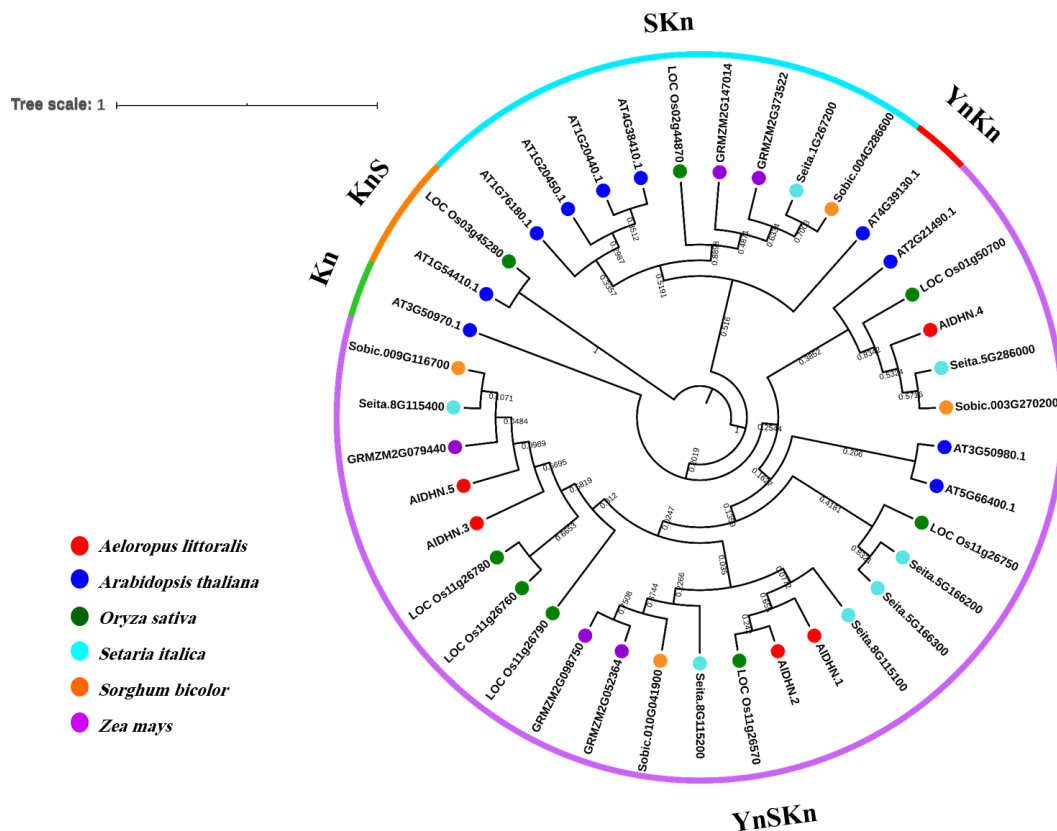
احتمالاً در طول مرحله‌ای از تکامل از دست رفته باشند (Nagaraju *et al.*, 2018). مطالعات نشان داده‌اند که دهیدرین‌های گروه YnSKn در طول تنش‌های خشکی و شوری بیان می‌شوند، درحالی‌که گروه‌های SKn، KnS و Kn به‌طور عمده در مواجهه با تنش سرما بیان شده‌و، برخی از آن‌ها در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری نیز بیان می‌شوند (Liang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

پروتئین‌های خنثی یا قلیایی در طبیعت هستند، تطابق دارد (Rorat, 2006).

YnSKn رایج‌ترین گروه در میان گروه‌های خانواده DHN می‌باشد، درحالی‌که اعضای SKn در تکلیف‌ها در مقایسه با دولپه‌ها دارای تعداد اعضای کمتری می‌باشند. گروه‌های KnS و Kn تنها در گونه‌های محدودی مشاهده شده‌اند که بیانگر این امر است که آن‌ها در ژنوم خاصی تکامل یافته‌اند یا

جدول ۲. خصوصیات پروتئین‌های دهیدرین در *A. littoralis*

نام ژن Gene name	شماره ژن Gene ID	طول پروتئین Protein length (aa)	وزن مولکولی Molecular weight (kDa)	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	شاخص پایداری Instability index	جایگاه سلولی Subcellular localization
1.AIDHN	Alg295	198	19.90	9.48	29.65	30.33(stable)	Nuclear
2.AIDHN	Alg1109	135	13.64	9.27	29.70	39.49(stable)	Nuclear
3.AIDHN	Alg4627	173	17.61	7.28	23.70	14.71(stable)	Nuclear
4.AIDHN	Alg11679	93	10.09	9.56	45.16	45.40 (unstable)	Nuclear
AIDHN.5	Alg14042	135	14.57	9.49	40.44	51.82(unstable)	Nuclear



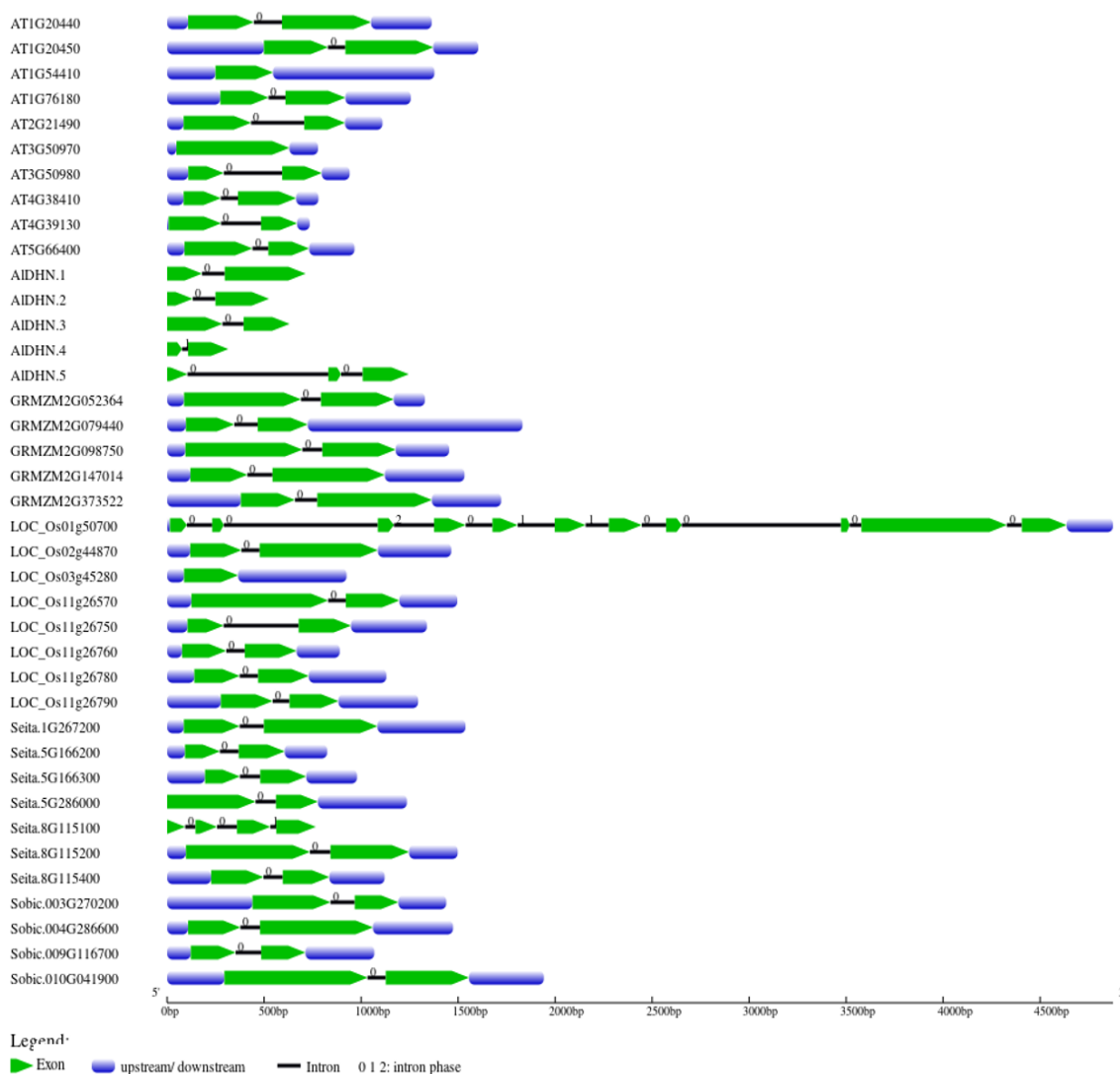
شکل ۱. روابط فیلوژنتیکی اعضای خانواده DHN در ۶ گونه گیاهی. هم‌ردیفی چندگانه پروتئین‌های DHN در *A. littoralis* (Al)

آرابیدوپسیس تالیانا (At)، برنج (Os)، ذرت (Zm) سورگوم (Sb) و ارزن ایتالیایی (Si) انجام و درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید.

تجزیه و تحلیل ساختار اگزون-اینترونی ژن‌های *AIDHN*

مقایسه ساختار توزیع اگزون-اینترونی ژن‌های *DHN* آلورپوس با سایر گونه‌های گیاهی نشان داد که ژن‌های آلورپوس به جز *AIDHN.5* نیز مانند سایرگونه‌ها ساختارهای اگزون-اینترونی بسیار حفاظت‌شده با یک اینترون و فاز اینترون صفر به نمایش گذاشتند. در مجموع، فقط ۳ ژن دارای اگزون‌های بیشتر از یک بودند (شکل ۲). پایداری ساختار ژنی، مهم‌ترین شرط حفاظت کارکرد ژن

است، درحالی‌که تنوع ساختار ژنی برای تکامل خانواده‌های چندژنی ضروری می‌باشد (Cao *et al.*, 2012). اگزون‌ها و اینترون‌ها به‌عنوان مؤلفه‌های مهم ژن‌ها در تمام ژن‌های یوکاریوتی وجود دارند. برخی شواهد نشان می‌دهد که اینترون‌ها در بازآرایی و تنظیم بیان ژن‌ها دخیل می‌باشند (Li *et al.*, 2016). علاوه بر این، به دلیل جهش‌های مداوم، اینترون‌ها به‌طور نابرابر در خانواده ژنی در طول تکامل گیاهان توزیع شده‌اند (Cao *et al.*, 2012).



شکل ۲. ساختار ژنی ژن‌های *DHN* در آلورپوس، آرابیدوپسیس، برنج، ذرت، سورگوم و ارزن ایتالیایی. جعبه‌های سبز و آبی به‌ترتیب

معرف ناحیه‌های 5' UTR و 3' UTR، و خطوط نشان‌دهنده اینترون‌ها می‌باشد. طول جعبه‌ها و نقطه‌چین‌ها بر اساس طول ژن‌ها مقیاس شده‌اند.

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نشان داد که دمین‌های بسیار حفاظت‌شده قطعه‌های غنی از K (لیزین)، S (سرین) و Y (تیروزین) در تمام DHN‌های گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد. جستجوی موتیف با استفاده از نرم‌افزار MEME نشان داد که قطعه K در تمام DHN‌ها بسیار حفاظت‌شده بوده، درحالی‌که قطعه‌های S و Y در بین این گونه‌ها متفاوت می‌باشند. موتیف‌های ۱، ۳ و ۶، قطعه K، موتیف ۲، قطعه S و موتیف ۴، قطعه Y را نشان می‌دهند (شکل ۳).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های DHN

شناخته‌شده‌ترین موتیف در میان موتیف‌های DHN‌ها، قطعه حفاظت‌شده K می‌باشد، همچنین سایر موتیف‌های قطعه‌های S و Y نیز به‌عنوان موتیف‌های مهمی شناخته شده‌اند (Liu *et al.*, 2012). بنابراین، موتیف‌های موجود در پروتئین‌های DHN آلورپوس آراییدوپسیس، برنج، ذرت، سورگوم و ارزن ایتالیایی شناسایی شدند (شکل ۳).



شکل ۳. موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های DHN در آلورپوس، آرابیدوپسیس، برنج، ذرت، سورگوم و ارزن ایتالیایی

تنش ۶۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، به ترتیب ۶/۸۸ و ۴/۴۶ و ۰/۸۷ و در بافت ریشه ۵/۷۱، ۴۷/۹۴ و ۴/۲۸ می‌باشد. میزان بیان در بافت برگ، در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری (۶/۸۸ برابر تیمار شاهد) و در بافت ریشه در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری (۴۷/۹۴ برابر تیمار شاهد)، افزایش و یک هفته بعد از اعمال تنش، بیان آن کاهش یافت (شکل ۴).

سطح بیان ژن در تنش PEG در هر دو بافت ریشه و برگ، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. سطح بیان ژن در هر دو بافت برگ و ریشه در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش حداکثر مقدار (در برگ

تجزیه و تحلیل بیان ژن *AIDHN.5* تحت تنش‌های غیر زیستی

بررسی الگوی بیان ژن کاندید *AIDHN.5* به‌عنوان همولوگ ژن *AT5G66400* در آرابیدوپسیس، تحت تنش‌های شوری، خشکی، سرما و هورمون آبسزیزیک‌لسید، نشان‌دهنده نقش آن در تحمل به تنش و همچنین رشد و نمو گیاه می‌باشد. الگوی بیان افتراقی در دو بافت ریشه و برگ تحت تنش‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است.

سطح بیان این ژن در تنش شوری در بافت برگ در زمان‌های ۶، ۴۸ ساعت و یک هفته بعد از اعمال

می‌شود که احتمالاً تجمع DHN‌ها را در این بافت‌ها تقویت می‌کند. پتانسیل اسمزی بالا در سیتوپلاسم سلول‌های محافظ باز باعث ایجاد تنش آبی در هسته می‌شود. بنابراین، DHN‌ها ممکن است نقشی در محافظت از این محفظه در برابر تنش کم آبی داشته باشند. این با عملکرد حفاظت فرضی این پروتئین‌ها در طی تنش‌های اسمزی ناشی از خشکی، شوری یا یخ‌زدگی مطابقت دارد (Nylander *et al.*, 2001). بررسی الگوی بیان ژن‌های دهیدرین در بافت‌های مختلف برنج در مواجهه با PEG ۱۰ و ۲۰ درصد، افزایش بیان را در حداقل یکی از بافت‌های مورد مطالعه نشان داد (Verma *et al.*, 2017).

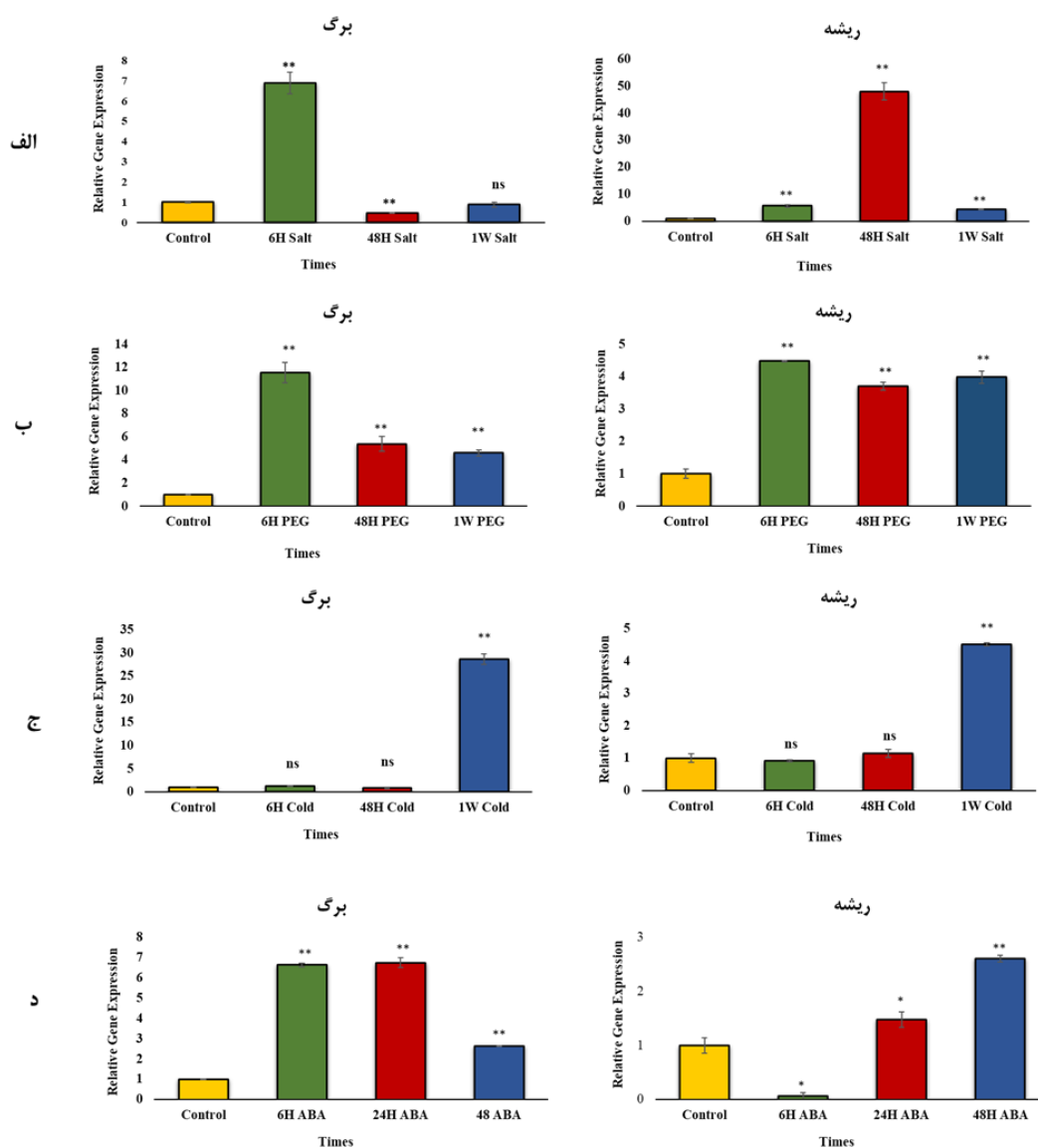
پیش‌ازاین گزارش شده بود که دهیدرین‌ها نه تنها در گیاهان هالوفیت یا گیاهان مقاوم به خشکی، بلکه به‌طور گسترده‌ای در تمام گیاهان وجود دارند، بنابراین، علاوه بر جنبه‌های شناخته شده بیوشیمیایی پروتئین‌های دهیدرین، الگوی تنظیم بیان این ژن‌ها می‌تواند به‌اندازه پروتئین‌های حیاتی برای گیاه حائز اهمیت باشد. هالوفیت‌ها به‌عنوان گیاهان دارای مقاومت بیشتر به تنش‌های محیطی، الگوی بیان متفاوت و بیشتری را در مجموعه ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش که در تمامی گیاهان وجود دارد، نشان می‌دهند (Zhang *et al.*, 2018).

۱۱/۲۵ و در ریشه ۴/۴۷ برابر) را نشان داد و سپس با شیب ملایم کاهش یافت (شکل ۴).

سطح رونوشتی این ژن در هر دو بافت تا ۴۸ ساعت پس از تنش سرما ثابت و بدون اختلاف معنی‌دار بود، ولی به‌طور ناگهانی و چشمگیر در زمان یک هفته پس از اعمال تنش سرما، میزان رونوشت‌های ژن در برگ ۲۸/۶۸ و در ریشه ۴/۵ برابر تیمار شاهد افزایش یافت که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۴).

در بافت برگ در پاسخ به هورمون ABA، افزایش معنی‌داری در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. در بافت ریشه در ابتدا میزان بیان ژن در پاسخ به هورمون ABA کاهش یافت درحالی‌که در ساعات بعدی تنش، روند افزایشی بیان ژن مشهود بود. ژن *AIDHN.5* یک پروتئین همولوگ با RAB 18 (*At5g66400.1*) کد می‌کند که به‌طور تجربی به‌عنوان یک پروتئین القایی با ABA شناخته شده است (Ghelis *et al.*, 2000).

آنالیز الگوی بیان ژن *AIDHN.5* در دو بافت ریشه و برگ نشان داد که این ژن در تنش‌های خشکی، سرما و هورمون ABA در بافت برگ در مقایسه با ریشه بیشتر بیان می‌شود. یک احتمال این است که پتانسیل اسمزی بالا در سیتوپلاسم سلول‌های محافظ برگ هنگام باز شدن روزنه ایجاد



شکل ۴. الگوی بیان ژن *AldHN.5* تحت تیمارهای شوری، خشکی، سرما و آبسیزیک اسید در گیاه *A. littoralis*. مقایسه میانگین با آزمون t-test برای هر تیمار انجام شده است. ($p < 0.01$ **، $p < 0.05$ *)

نوع DHN های (Tommasini *et al.*, 2008). DHN های نوع YnSKn با بار مثبت که دارای PI بالاتری هستند، در طول تنش به غشاهای سلولی متصل می‌شوند و از این طریق از سلول‌ها محافظت نموده و تحمل به تنش را افزایش می‌دهند (Nagaraju *et al.*, 2018). فسفوریلاسیون DHN های گروه YnSKn توسط PKC ها و DHN های گروه SKn توسط CK2ها، موجب افزایش فعالیت DHN ها در

پروتئین‌های DHN که خصوصیات فیزیکوشیمیایی مشابهی دارند، الگوی بیان مشابهی را نیز نشان می‌دهند. برای مثال ژن‌های کدکننده DHN های قلبی نوع YnSKn مانند *HvDhn4*، *HvDhn2*، *HvDhn1*، *At5g66400*، *HvDhn7* و *HvDhn9* به‌طور کلی علاوه بر مرحله جنین‌زایی، در تنش‌های مختلف محیطی نیز بیان می‌شوند (Hundertmark *et al.*, 2008;)

ژن دهیدرین در این گیاه شناسایی شد. حفاظت‌شدگی بالای ساختار ژنی و موتیف‌های این ژن‌ها نشان‌دهنده نقش‌های عملکردی حفاظت‌شده‌ی آن‌ها در طول تکامل است. از آنجایی‌که دهیدرین‌ها نقش‌های کلیدی مهمی در دفاع در برابر تنش‌ها ایفا نموده و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت درگیر در پیام‌دهی تنش به‌واسطه ABA عمل می‌کنند، آنالیز الگوی بیان گروه ژنی دهیدرین در تنش‌های مختلف غیرزیستی از جمله شوری، خشکی، سرما و تیمار با هورمون آبسزیک اسید در گیاه *A. littoralis* به‌عنوان یک گیاه هالوفیت تک لپه می‌تواند به ارائه درک بهتری از پاسخ‌های گیاه به تنش کمک نماید. میزان سطح رونوشت این ژن پس از اعمال تنش‌های شوری، خشکی و سرما و تیمار با هورمون آبسزیک اسید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان اظهار نمود که این ژن‌ها علاوه بر این‌که در زمان‌های مختلف، واکنش‌های متفاوتی را از خود بروز دادند، در بافت‌های مختلف نیز می‌توانند رفتارهای اختصاصی ارائه دهند.

REFERENCES

- 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.
- Bao F, Du D, An Y, Yang W, Wang J, Cheng T, Zhang Q (2017) Overexpression of *Prunus mume dehydrin* genes in tobacco enhances tolerance to cold and drought. *Front. Plant Sci.* 8: 151.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148(1): 6-24.
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K (2007) Overexpression of wheat dehydrin *DHN-5* enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 26(11): 2017-2026.
- Cao J, Shi F (2012) Evolution of the *RALF* gene family in plants: gene duplication and selection patterns. *Evol. Bioinform.* 8: 271-292.
- 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.
- Galau GA, Hughes DW, Dure L (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7(3): 155-170.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A

رابطه با تحمل به تنش می‌شود (Nagaraju *et al.*, 2018).

دهیدرین‌ها نقش‌های کلیدی مهمی در دفاع در برابر تنش‌ها ایفا می‌نمایند. با این حال، این موضوع که آن‌ها به روش مستقل از هورمون یا وابسته به هورمون عمل می‌کنند، هنوز نامشخص می‌باشد. به‌عنوان مثال، ژن *Atlg54410* آرابیدوپسیس تحت تیمار سرما القا شد اما تحت تیمار آبسزیک اسید بیان نشد (Hundertmark *et al.*, 2008). در بررسی Verma و همکاران (۲۰۱۷)، تمام ژن‌های *DHN* توسط هورمون ABA افزایش بیان نشان دادند که نشانگر مشارکت احتمالی آن‌ها در مسیرهای وابسته به ABA می‌باشد. علاوه بر این، Tiwari و همکاران (۲۰۱۸) اخیراً پیشنهاد کرده‌اند که *DHN*‌ها جدا از نقش آن‌ها به‌عنوان پروتئین‌های محافظ، با برهم‌کنش با سایر پروتئین‌ها، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت درگیر در پیام‌دهی تنش خشکی به‌واسطه ABA عمل می‌کنند. با بررسی داده‌های ژنومی گیاه *A. littoralis* پنج

- (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.
- Ghelis T, Dellis O, Jeannette E, Bardat F, Miginiac E, Sotta B (2000) Abscisic acid plasmalemma perception triggers a calcium influx essential for *RAB18* gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett.* 483(1): 67-70.
- Graether SP, Boddington KF (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.* 5: 576.
- Gulzar S, Khan MA, Ungar IA (2003) Effects of salinity on growth, ionic content, and plant-water status of *Aeluropus lagopoides*. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34(11-12): 1657-1668.
- Guo X, Zhang L, Wang X, Zhang M, Xi Y, Wang A, Zhu J (2019) Overexpression of *Saussurea involucrata dehydrin* gene *SiDHN* promotes cold and drought tolerance in transgenic tomato plants. *PloS one.* 14(11): e0225090.
- Guo X, Zhang L, Zhu J, Liu H, Wang A (2017) Cloning and characterization of *SiDHN*, a novel dehydrin gene from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. that enhances cold and drought tolerance in tobacco. *Plant Sci.* 256: 160-169.
- Halder T, Upadhyaya G, Ray S (2017) YSK2 type dehydrin (*SbDhn1*) from *Sorghum bicolor* showed improved protection under high temperature and osmotic stress condition. *Front. Plant Sci.* 8: 918.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta.* 217(2): 290-298.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016) Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. *J Biol .Res-Thessalon.* 23(1): 18.
- Hincha DK, Thalhammer A (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem. Soc. Trans.* 40(5): 1000-1003.
- Hoagland D, Snyder W (1933) Nutrition of strawberry plant under controlled conditions:(a) effects of deficiencies of boron and certain other elements:(b) susceptibility to injury from sodium salts. *Proc. Amer Soc. Hort. Sci.* 30: 288-294.
- Horton P, Park KJ, 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.
- Hundertmark M, Hincha DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* 9(1): 118.
- Jing H, Li C, Ma F, Ma JH, Khan A, Wang X, Zhao LY, Gong ZH, Chen RG (2016) Genome-wide identification, expression diversification of *dehydrin* gene family and characterization of *CaDHN3* in pepper (*Capsicum annuum* L.). *PloS one.* 11(8): e0161073.
- 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.
- Koag M-C, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009) The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol.* 150(3): 1503-1514.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil I (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biol. Plant.* 51(4): 601-617.
- Kumar M, Lee SC, Kim JY, Kim SJ, Kim

- SR (2014) Over-expression of dehydrin gene, *OsDhn1*, improves drought and salt stress tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Biol.* 57(6): 383-393.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870-1874.
- 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.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21): 2947-2948.
- Li X, Cao J (2016) Late Embryogenesis Abundant (*LEA*) gene family in maize: identification, evolution, and expression profiles. *Plant Mol. Biol. Rep.* 34(1): 15-28.
- Liang D, Xia H, Wu S, Ma F (2012) Genome-wide identification and expression profiling of *dehydrin* gene family in *Malus domestica*. *Mol. Biol. Rep.* 39(12): 10759-10768.
- Liu CC, Li CM, Liu BG, Ge SJ, Dong XM, Li W, Zhu HY, Wang BC, Yang CP (2012) Genome-wide identification and characterization of a *dehydrin* gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 30(4): 848-859.
- Liu H, Yu C, Li H, Ouyang B, Wang T, Zhang J, Wang X, Ye Z (2015) Overexpression of *ShDHN*, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. *Plant Sci.* 231: 198-211.
- Liu Y, Li D, Song Q, Zhang T, Li D, Yang X (2019) The maize late embryogenesis abundant protein ZmDHN13 positively regulates copper tolerance in transgenic yeast and tobacco. *Crop J.* 7(3): 403-410.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods.* 25(4): 402-408.
- Mota APZ, Oliveira TN, Vinson CC, Williams TCR, Costa MMDC, Araujo ACG, Danchin EG, Grossi-De-Sá MF, Guimaraes PM, Brasileiro ACM (2019) Contrasting effects of wild *Arachis* dehydrin under abiotic and biotic stresses. *Fron. Plant sci.* 10: 497.
- Nagaraju M, Reddy PS, Kumar SA, Kumar A, Suravajhala P, Ali A, Srivastava RK, Kishor PK, Rao DM (2018) Genome-wide in silico analysis of dehydrins in *Sorghum bicolor*, *Setaria italica* and *Zea mays* and quantitative analysis of *dehydrin* gene expressions under abiotic stresses in *Sorghum bicolor*. *Plant Gene.* 13: 64-75.
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45(3): 263-279.
- Peng Y, Reyes JL, Wei H, Yang Y, Karlson D, Covarrubias AA, Krebs SL, Fessehaie A, Arora R (2008) RcDhn5, a cold acclimation-responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme activity from dehydration effects *in vitro* and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants. *Physiol. Plant.* 134(4): 583-597.
- Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004) Overexpression of multiple *dehydrin* genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 54(5): 743-753.
- Roberts JK, Desimone NA, Lingle WL, Dure L (1993) Cellular concentrations

- and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell*. 5(7): 769-780.
- Rodriguez E, Svensson J, Malatrasi M, Choi D-W, Close T (2005) Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor. Appl. Genet.* 110(5): 852-858.
- Rorat T (2006) Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11(4): 536-556.
- Tiwari P, Indoliya Y, Singh PK, Singh PC, Chauhan PS, Pande V, Chakrabarty D (2019) Role of dehydrin-FK506-binding protein complex in enhancing drought tolerance through the ABA-mediated signaling pathway. *Environ. Exp. Bot.* 158: 136-149.
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close TJ (2008) Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Func. Integr. Genomic.* 8(4): 387-405.
- Tunnacliffe A, Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften.* 94(10): 791-812.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15): e115-e115.
- Verma G, Dhar YV, Srivastava D, Kidwai M, Chauhan PS, Bag SK, Asif MH, Chakrabarty D (2017) Genome-wide analysis of rice *dehydrin* gene family: Its evolutionary conservedness and expression pattern in response to PEG induced dehydration stress. *PLoS One*. 12(5): e0176399.
- Wang XS, Zhu HB, Jin GL, Liu HL, Wu WR, Zhu J (2007) Genome-scale identification and analysis of *LEA* genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 172(2): 414-420.
- Wang Y, Xu H, Zhu H, Tao Y, Zhang G, Zhang L, Zhang C, Zhang Z, Ma Z (2014) Classification and expression diversification of wheat *dehydrin* genes. *Plant Sci.* 214: 113-120.
- Xing X, Liu Y, Kong X, Liu Y, Li D (2011) Overexpression of a maize *dehydrin* gene, *ZmDHN2b*, in tobacco enhances tolerance to low temperature. *Plant Growth Regul.* 65(1): 109-118.
- Yang W, Zhang L, Lv H, Li H, Zhang Y, Xu Y, Yu J (2015) The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Fron. Plant Sci.* 6: 406.
- Younesi-Melerdi E, Nematzadeh G, Pakdin-Parizi A, Bakhtiarzadeh MR, Motahari SA (2020) *De novo* RNA sequencing analysis of *Aeluropus littoralis* halophyte plant under salinity stress. *Sci. Rep.* 10(1): 1-14.
- Zhang H-F, Liu S-Y, Ma J-H, Wang X-K, Meng Y-C, Zhang Y-M, Chen R-G (2019) *CaDHN4*, a Salt and Cold Stress-Responsive Dehydrin Gene from Pepper Decreases Abscisic Acid Sensitivity in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* 21(1): 26.
- Zhang H, Zheng J, Su H, Xia K, Jian S, Zhang M (2018) Molecular cloning and functional characterization of the dehydrin (*IpDHN*) gene from *Ipomoea pes-caprae*. *Fron. Plant sci.* 9: 1454.
- 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 littoralis*. *Gene.* 404(1-2): 61-69.