

«مقاله پژوهشی»

تجزیه و تحلیل جامع خانواده عامل رونویسی ERF و بیان آن‌ها در کنجد تحت تنش‌های غیرزنده

محمدامین باقری^۱، سید کمال کاظمی تبار^{۲*}، علی دهستانی^۳، پویان مهربان‌جوبانی^۴، حمید نجفی زرینی^۲

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

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

۳. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۴. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱)

Comprehensive analysis of ERF transcription factor family and their expression in sesame under abiotic stresses

Mohammad Amin Baghery¹, Seyed Kamal Kazemitabar^{2*}, Ali Dehestani³, Pooyan Mehrabanjoubani⁴,
Hamid Najafi-Zarini²

1. Ph.D. Candidate, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

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

3. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Basic Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

(Received: Jul. 20, 2021 - Accepted: Nov. 20, 2021)

Abstract

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is a nutritionally and medicinally important oilseed crop that environmental stresses limit its yield potential. Ethylene-responsive factor (ERF) is one of the largest transcription factor families that play key roles in regulating plant response to abiotic stress. In the current study, a total of 113 ERF genes were identified from the sesame genome and they were divided into two subfamilies including, 46 dehydration-responsive element-binding (DREB) members, and 67 ERF members. Phylogenetic relationships, physicochemical properties of proteins, structural properties of genes, and conserved amino acid motifs in the sesame ERF family were analyzed. Then, the expression profile of sesame ERF genes in various tissues as well as under environmental stresses was investigated. Overall, several genes of the ERF Family were expressed noticeably in different sesame tissues, especially in roots, capsules, and flowers. Expression profiles also showed that RAP2.2L, PTI6, ERF017L, and ERF096 genes were strongly induced by drought, osmotic, salinity, and waterlogging stresses, respectively. Moreover, the qPCR results showed that the relative expression of the ERF061L gene was higher in the sesame tolerant genotype compared to the susceptible one under drought conditions. This study provides important data for understanding the evolution and functions of the ERF family in sesame that can be used in future breeding programs for abiotic stresses tolerance.

Keywords: Environmental stress, ERF Transcription factors, Gene expression, Phylogenetic relationships, Sesame.

چکیده

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یک گیاه زراعی دانه روغنی مهم از نظر تغذیه‌ای و دارویی می‌باشد که تنش‌های محیطی ظرفیت عملکرد آن را محدود می‌کند. عامل پاسخ دهنده به اتیلن (ERF) یکی از بزرگترین خانواده‌های عوامل رونویسی می‌باشد که در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زنده نقش کلیدی ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر، در مجموع ۱۱۳ ژن ERF از ژنوم کنجد شناسایی شد، که آن‌ها خود به دو زیرخانواده شامل ۴۶ عضو متصل به عناصر پاسخ دهنده به پسابدگی (DREB) و ۶۷ عضو ERF تقسیم شدند. روابط فیلوژنتیکی، خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها، ساختارهای ژنی و موتیف‌های آمینو اسیدی حفاظت شده در خانواده ERF کنجد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در ادامه پروفایل بیانی ژن‌های ERF کنجد در بافت‌های مختلف و همچنین تحت تنش‌های محیطی بررسی گردید. به‌طور کلی ژن‌های متعدد از خانواده ERF در بافت‌های مختلف کنجد به‌ویژه در ریشه، کپسول و گل از بیان قابل ملاحظه‌ای برخوردار بودند. همچنین پروفایل‌های بیانی نشان داد ژن‌های RAP2.2L، PTI6، ERF017L و ERF096 به ترتیب تحت تنش‌های خشکی، اسمزی، شوری و غرقاب بشدت القا شدند. افزون بر این، نتایج qPCR نشان داد که بیان نسبی ژن ERF061L در ژنوتیپ متحمل کنجد در مقایسه با حساس تحت شرایط خشکی بیشتر می‌باشد. این مطالعه داده‌های مهمی را برای درک تکامل و عملکرد خانواده ERF در کنجد فراهم نموده است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آینده برای تحمل تنش‌های غیر زنده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش محیطی، عوامل رونویسی ERF، روابط فیلوژنتیکی، کنجد.

مقدمه

گیاهان در چرخه زندگی خود ناگزیر تحت شرایط نامساعد محیطی مختلفی از جمله تنش سرما، خشکی و شوری قرار می‌گیرند که بر رشد، نمو و عملکرد آن‌ها اثر منفی می‌گذارد (Wang *et al.*, 2003). چگونگی پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی توسط مکانسیم‌های تنظیمی متعددی کنترل و تنظیم می‌شود. تنظیم رونویسی با به‌کارگیری فاکتورهای رونویسی^۱ از مهم‌ترین مکانسیم‌های تنظیمی گیاهان در مواجهه با تنش می‌باشد. فاکتورهای رونویسی پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به عناصر تنظیمی واقع شده در پروموتور ژن هدف بیان آن را تنظیم می‌کنند. در سال‌های اخیر خانواده‌های متعددی از فاکتورهای رونویسی گیاهی از جمله MYB، bZIP، WRKY و ERF شناسایی شده است که در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای حیاتی از جمله پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Hong, 2016).

خانواده عامل پاسخ دهنده به اتیلن^۲ (ERF) یک خانواده ژنی بزرگ از عوامل رونویسی می‌باشد که به همراه خانواده‌های AP2^۳ و RAV^۴ فوق خانواده AP2/ERF را تشکیل می‌دهند. فوق خانواده AP2/ERF بر اساس وجود دامنه AP2/ERF ساختار پروتئینی تعریف می‌شود که از حدود ۶۰ تا ۷۰ اسیدآمینو تشکیل شده و در اتصال به DNA نقش دارد (Wessler, 2005). پروتئین‌های خانواده AP2 حاوی دو دامنه تکرار شده AP2 می‌باشند، در حالی که پروتئین‌های ERF تنها حاوی یک دامنه AP2 می‌باشند (Nakano *et al.*, 2006). از سوی دیگر پروتئین‌های خانواده RAV علاوه بر یک دامنه AP2 حاوی یک دامنه B3 نیز می‌باشند. B3 یک دامنه اتصال‌شونده به DNA می‌باشد که در سایر فاکتورهای

رونویسی گیاهی از جمله VP1/ABI3 به صورت حفاظت شده حضور دارد. همیشه خانواده ERF به دو زیرخانواده اصلی شامل زیرخانواده ERF و زیرخانواده DREB^۵ تقسیم بندی می‌شود (Sakuma *et al.*, 2002). پروتئین‌های زیرخانواده DREB به عناصر DRE/CRT حاوی موتیف مرکزی A/GCCGAC متصل می‌شوند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)، در حالی که پروتئین‌های ERF با عناصر ERE شامل توالی مرکزی AGCCGCC اتصال برقرار می‌کنند (Mizoi *et al.*, 2012). از سوی دیگر، بر اساس خصوصیات ساختاری هر یک از زیر خانواده‌های DREB و ERF خود به ۶ گروه به ترتیب تحت عنوان A1-6 و B1-6 طبقه می‌شوند (Nakano *et al.*, 2006).

اعضای زیرخانواده DREB به‌طور وسیعی در پاسخ به تنش‌های غیر زنده از جمله شوری، خشکی، سرما و گرما نقش دارند (Kudo *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2018). در آرآبیدوپسیس نشان داده شده است که ژن ABI4 از گروه A3 در نمو جوانه‌ها از طریق سیگنال‌دهی ABA و قندها نقش دارد (Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2011). ژن RAP2.1 از گروه A5 نیز به‌عنوان تنظیم کننده منفی پاسخ به تنش خشکی و سرما در آرآبیدوپسیس گزارش شده است (Dong and Liu, 2010). همچنین ژن‌های RAP2.4 و RAP2.4B از گروه A6 نیز در پاسخ به تنش‌های خشکی، گرما و شوری نقش دارند (Rao *et al.*, 2015). از سوی دیگر، نشان داده شده که بسیاری از اعضای زیرخانواده ERF نیز با عملکردهای گوناگون در رشد گیاه نقش دارند (Hao *et al.*, 2020). در آرآبیدوپسیس گزارش شده است که فرا بیان ژن ESR1 و LEP از گروه B1 به ترتیب در القای شروع

1. Transcription Factors
2. Ethylene-responsive factor
3. Apetala 2
4. Related to ABI3/VP

شرایط نامطلوب محیطی اطلاعات کمی وجود دارد. از این رو مطالعه حاضر با هدف شناسایی اعضای خانواده ERF در گیاه کنجد و بررسی روابط تکاملی آن‌ها انجام گردید. همچنین در این پژوهش خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها، ساختارهای اگزون-اینترون، موتیف‌های حفاظت شده، الگوی بیانی اعضای این خانواده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این مطالعه پایه و چشم‌انداز مناسبی را برای پژوهش‌های آینده در مورد خصوصیات عملکردی خانواده ERF در کنجد فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای ابر خانواده ERF

ابتدا پروفایل مدل مارکوف پنهان^۱ (HMM) دامنه AP2/ERF از پایگاه داده Pfam (نسخه ۳۳.۰) استخراج شد (El-Gebali et al., 2019). سپس پروفایل به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار HMMER بر روی توالی‌های پروتئینی کنجد که از بخش ژنوم پایگاه داده NCBI گردآوری شده بود (آستانه معنی‌داری $E < 1e-5$) جستجو شد (Eddy, 2011). سپس جهت تایید حضور دامنه AP2/ERF در پروتئین‌های شناسایی شده از ابزار CD-Search (Marchler et al., 2004) استفاده گردید. در ادامه بر اساس آرایش دامنه AP2/ERF در طول توالی پروتئینی ژن‌های شناسایی شده گروه‌بندی شدند.

جایگاه کروموزومی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی

جایگاه فیزیکی ژن‌های ERF شناسایی شده از پایگاه داده NCBI گردآوری شد و با استفاده از نرم‌افزار MapChart بر روی ۱۶ گروه لینکازی (LG) شناخته شده کنجد تطبیق گردید (Voorrips, 2002).

باززایی شاخساره‌ها و تقسیم سلولی در مریستم حاشیه‌ای نقش دارند (Van der Graaff et al., 2001; Banno et al., 2000). همچنین اعضای زیرخانواده ERF در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز نقش حیاتی دارند. نشان داده شده است که فرا بیان ژن ERF1 از گروه B3 در گندم نه تنها باعث تقویت تحمل به خشکی، شوری و سرما شد بلکه در مقاومت به سفیدک سطحی نیز مؤثر بود (Xu et al., 2007). همچنین فرا بیان ژن ERF2.11 جو از گروه B3 موجب افزایش تحمل تنش غرقابی در آرابیدوپسیس شد (Luan et al., 2020).

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی دانه روغنی به شمار می‌رود که در مناطق خشک و نیمه خشک جهان مورد کشت قرار می‌گیرد. برای کنجد مصارف غذایی، دارویی و صنعتی متنوعی گزارش شده است و از این رو دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشد (Morris, 2002). به طور ویژه روغن دانه کنجد غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر سزامین، سزامولین و توکوفرول‌ها می‌باشد که موجب پایداری روغن در برابر اکسیداسیون می‌شود (Bedigian, 2010). یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید کنجد تنش‌های محیطی از جمله خشکی، شوری و غرقابی می‌باشد که به طور قابل توجهی ظرفیت عملکرد آن را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (Islam et al., 2016). بنابراین ضروری است مکانیسم‌های تحمل تنش‌ها در کنجد به‌ویژه از منظر مولکولی مورد مطالعه بیشتری قرار گیرد.

همانطور که پیشتر بیان شد در بسیاری گیاهان نقش کلیدی خانواده ERF در تنظیم فرآیندهای زیستی از جمله پاسخ به تنش‌ها بخوبی آشکار شده است. به رغم این اما درباره خصوصیات و ویژگی‌های خانواده ERF و عملکرد آن‌ها در گیاه کنجد به‌ویژه تحت

1. Hidden Markov Model

همچنین خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های خانواده ERF به همراه سایر اعضای ابر خانواده AP2/ERF از جمله تعداد اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک (pI)، وزن مولکولی و متوسط کل هیدروپاتی (GRAVY) با استفاده از بسته Peptides تحت پلنفرم R تعیین شد (Osorio et al., 2015).

هم‌ترازی و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی از توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های خانواده ERF به همراه سایر اعضای ابر خانواده AP2/ERF در کنجد و آرکیدوپسیس استفاده گردید. به همین منظور توالی‌های پروتئینی ژن‌های ابر خانواده AP2/ERF در آرکیدوپسیس از طریق پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی (PlantTFDB) استخراج گردید (Jin et al., 2017). در ادامه تجزیه هم‌ترازی توالی چندگانه (MSA) بر روی توالی پروتئینی ژن‌های گردآوری شده با استفاده از الگوریتم ClustalW و از طریق برنامه MEGA X انجام گرفت (Kumar et al., 2018). سپس درخت فیلوژنتیکی از توالی‌های هم‌تراز شده به روش حداکثر درست‌نمایی (ML) با ارزش بوت استرپ ۱۰۰۰ با استفاده از برنامه MEGA X ساخته شد. درخت ساخته شده با استفاده از برنامه iTOL ترسیم و حاشیه‌نویسی گردید (Letunic and Bork, 2021).

همچنین خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های خانواده ERF به همراه سایر اعضای ابر خانواده AP2/ERF از جمله تعداد اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک (pI)، وزن مولکولی و متوسط کل هیدروپاتی (GRAVY) با استفاده از بسته Peptides تحت پلنفرم R تعیین شد (Osorio et al., 2015).

هم‌ترازی و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی

همچنین خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های خانواده ERF به همراه سایر اعضای ابر خانواده AP2/ERF در کنجد و آرکیدوپسیس استفاده گردید. به همین منظور توالی‌های پروتئینی ژن‌های ابر خانواده AP2/ERF در آرکیدوپسیس از طریق پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی (PlantTFDB) استخراج گردید (Jin et al., 2017). در ادامه تجزیه هم‌ترازی توالی چندگانه (MSA) بر روی توالی پروتئینی ژن‌های گردآوری شده با استفاده از الگوریتم ClustalW و از طریق برنامه MEGA X انجام گرفت (Kumar et al., 2018). سپس درخت فیلوژنتیکی از توالی‌های هم‌تراز شده به روش حداکثر درست‌نمایی (ML) با ارزش بوت استرپ ۱۰۰۰ با استفاده از برنامه MEGA X ساخته شد. درخت ساخته شده با استفاده از برنامه iTOL ترسیم و حاشیه‌نویسی گردید (Letunic and Bork, 2021).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و ساختارهای ژنی

موتیف‌های حفاظت‌شده در میان ژن‌های AP2/ERF کنجد با استفاده از مجموعه نرم‌افزاری MEME شناسایی گردید (Bailey et al., 2009). بدین منظور طول مناسب موتیف‌ها ۱۲-۶ و حداکثر تعداد موتیف ۱۲ در نظر گرفته شد. حاشیه‌نویسی موتیف‌های شناسایی شده بر پایه توالی مورد توافق^۱ آن‌ها از طریق ابزار Motif Scan پایگاه داده ExPasy انجام شد

پروفایل‌های بیانی ژن‌های ERF

داده‌های خام RNA-Seq بافت‌های مختلف کنجد شامل برگ (مرحله ۲۰ برگ)، ریشه (مرحله گلدهی)، گل و غنچه گل، پرچم، کپسول (۲۵ روز پس از گرده‌افشانی)، دانه رسیده و دانه در حال جوانه‌زنی به‌ترتیب با شناسه PRJNA649357، PRJNA356988، PRJNA324750، PRJNA74261، PRJNA400575 و PRJNA350858 از بخش BioProject پایگاه داده NCBI دریافت شدند. به همین ترتیب داده‌های خام برای تنش‌های مختلف محیطی شامل خشکی، شوری، غرقابی و اسمزی به‌ترتیب با شناسه‌های PRJNA478474، PRJNA524278، PRJNA516309 و PRJNA552167 از بخش BioProject پایگاه داده NCBI گردآوری گردید. برای تنش خشکی نمونه‌های برگ در مرحله گیاهچه‌ای تحت تیمارهای شاهد و ۱۳، ۱۰ و ۸ درصد محتوی حجمی آب (VWC) خاک بودند (You et al., 2019). برای تنش شوری نیز نمونه‌های بخش هوایی در مرحله گیاهچه‌ای به‌مدت صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت تحت تیمار NaCl قرار گرفته بودند (Zhang et al., 2019). همچنین تیمارهای تنش غرقابی نیز برای نمونه‌های ریشه و در مرحله گلدهی شامل ۰، ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت شرایط غرقابی بود (Dossa et al., 2015).

دمای گلخانه ۲۶/۳۵ درجه سانتی‌گراد روز/ شب بود. در طول آزمایش رطوبت خاک هر یک از گلدان‌ها به‌وسیله دستگاه ProCheck مجهز به سنسور رطوبتی 10HS و تحت واحد محتوی حجمی آب (VWC) اندازه‌گیری می‌شد. گیاهان تا ۳۵ روز پس از کاشت بخوبی آبیاری شدند به طوری که رطوبت خاک آن‌ها در شرایط مطلوب حفظ شود. گیاهان در ۱۴ و ۲۱ روز پس از کاشت تنک شدند و در انتها پنج گیاه تقریباً یکنواخت در هر گلدان برای انجام آزمایش نگه‌داشته شد. تیمارهای تنش خشکی از روز ۳۵ ام پس از کاشت با قطع آبیاری آغاز شد. نمونه‌برداری از برگ‌های فوقانی در پنج نقطه نمونه‌گیری شامل کنترل (C0) قبل از اعمال تنش با رطوبت خاک حدود ۳۰٪ VWC (مطابق با روز ۳۵ ام پس از کاشت)؛ تنش خشکی کم (D1) پس از ۴ روز عدم آبیاری با رسیدن رطوبت به حدود ۱۵٪ VWC (مطابق با روز ۳۹ ام پس از کاشت)؛ تنش خشکی متوسط (D2) پس از ۸ روز عدم آبیاری زمانی که رطوبت خاک حدود ۹٪ VWC بود (مطابق با روز ۴۳ ام پس از کاشت)؛ تنش شدید خشکی (D3) پس از ۱۲ روز عدم آبیاری با رطوبت خاک حدود ۶٪ VWC (مطابق با ۴۷ روز پس از کاشت) و بازیابی با آبیاری مجدد پس از ۲ روز و رطوبت خاک حدود ۳۰٪ VWC (مطابق با روز ۴۹ پس از کاشت) انجام شد. ضمناً در هر نقطه زمانی تیمار خشکی یک نمونه شاهد نیز گرفته شد.

استخراج RNA و اندازه‌گیری بیان ژن ERF061L
 کلیه آزمایش‌های مربوط به استخراج RNA و اندازه‌گیری بیان ژن در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انجام گردید. RNA کل نمونه‌های برگ‌گی با استفاده از محلول تریزول (ریراژن) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. DNA باقی‌مانده در عصاره با به‌کارگیری DNase I (Thermo Fisher)

(2019b). برای تنش اسمزی نیز نمونه‌های ریشه در مرحله گلدهی به‌مدت ۷ روز با پلی‌اتیلن‌گلیکول -۶۰۰۰ ۲ درصد تیمار شده بودند (Dossa et al., 2019a). داده‌های خام پس از طی کردن مراحل پیش پردازش و حذف آداپتورها، با به‌کارگیری برنامه Salmon با ژنوم مرجع کنجد در دسترس در پایگاه داده NCBI تطبیق داده شده و کمیت‌سنجی شدند (Patro et al., 2017). ماتریکس شمارش رونوشت‌های به‌دست آمده با استفاده از بسته tximport تحت پلتفرم R به ماتریکس شمارش ژن‌ها تبدیل شد (Soneson et al., 2015). فراوانی ژن‌ها در بافت‌ها به روش TPM نرمال‌سازی شده و گزارش شدند. داده‌های بیانی تنش‌ها نیز با به‌کارگیری بسته Edger تحت پلتفرم R به روش TMM نرمال‌سازی شده و سپس تفاوت بیان ژن‌ها (Fold Change) محاسبه گردید. در نهایت داده‌های بیانی به‌دست آمده به‌صورت هیتمپ تصویرسازی شدند (Robinson et al., 2015).

مواد گیاهی و اعمال تنش خشکی

بذر دو ژنوتیپ به نام‌های داراب ۱ (ژنوتیپ متحمل به خشکی) و مغان ۱۴ (ژنوتیپ حساس به خشکی) بر اساس آزمایش‌های غربال‌گری پیشین برای تحمل به خشکی (منتشر نشده) از میان مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های کنجد انتخاب شده و برای کمیت‌سنجی مقایسه‌ای بیان ژن ERF061 تحت تنش خشکی مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان در گلخانه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری و در سال ۱۳۹۹ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور (دو ژنوتیپ و پنج تیمار آبی) و سه تکرار در گلدان‌های ۳۰×۳۰ کشت شدند. میانگین

خانواده AP2 داشتند و بنابراین به این خانواده نسبت داده شدند. به‌طور مشابه در مطالعات اخیر اعضای تک دامنه‌ای از خانواده AP2 در بسیاری از گیاهان از جمله آرآیدوپسیس (۴ ژن)، گوجه‌فرنگی (۵ ژن)، چمن‌ترکه (۳ ژن) و عناب چینی (۲ ژن) گزارش شده است (Nakano *et al.*, 2006; Charfeddine *et al.*, 2015; Wuddineh *et al.*, 2015; Zhang and Li, 2018). علاوه بر این، دو ژن دیگر با تک دامنه AP2/ERF نیز بودند که به هیچ‌یک از دو خانواده AP2 و ERF شباهت نداشتند. با توجه به همولوژی بالا با توالی پروتئینی AT4G13040 آرآیدوپسیس این دو ژن نیز به‌طور متناظر در دسته منفرد (Soloist) قرار گرفتند. ۱۱۳ ژن تک AP2/ERF باقی‌مانده نیز اعضای خانواده ERF در نظر گرفته شدند. همچنین اعضای ERF بر اساس روابط فیلوژنتیکی و خصوصیات دامنه AP2 به دو زیرخانواده DREB و ERF به‌ترتیب با ۴۶ و ۶۷ عضو تقسیم‌بندی شدند. پیش‌تر Dossa و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای ۱۳۲ ژن AP2/ERF شامل به‌ترتیب ۴۱ و ۶۱ ژن DREB و ERF را در کنجد شناسایی نمودند که در پژوهش حاضر ۱۲ AP2/ERF بیشتر (به‌ترتیب ۵ و ۶ DREB و ERF بیشتر) نسبت به آن شناسایی گردید. از سوی دیگر تعداد و شناسه ژن‌های AP2/ERF شناسایی شده در این پژوهش با ژن‌های گزارش شده در پایگاه داده تخصصی PlantTF مطابقت داشت (Jin *et al.*, 2017). با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه داده PlantTF تعداد اعضای AP2/ERF کنجد نسبت به گونه‌های آرآیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) (به‌ترتیب تعداد ۱۴۶، ۱۹۴، ۱۶۷ ژن) کمتر می‌باشد (Jin *et al.*, 2017). این تفاوت به‌عنوان نتیجه رویدادهای تکامل ژن شامل از دست دادن و دو برابر شدن ژن‌ها در گیاهان توضیح داده شده است (Zhao *et al.*, 2014; Zhang and Li, 2018).

حذف گردید. سپس، رشته‌های cDNA از عصاره RNA با به‌کارگیری کیت رونوشت‌بردار معکوس (Thermo Fisher Scientific) سنتز گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی^۱ (qPCR) جهت کمیت‌سنجی بیان ژن ERF061L با استفاده از مخلوط سایبر گیرین^۲ (Thermo Fisher Scientific) و در دستگاه Bio-Rad CFX96 انجام شد. در انتها بیان نسبی (Fold Change) ژن مورد نظر در هر نمونه با استفاده از دو ژن مرجع Act97 و EF1A (Wei *et al.*, 2013) و بر اساس تفاوت چرخه کمی‌سازی^۳ (Cq) به روش توصیف شده توسط Vandesompele و همکاران (۲۰۰۲) محاسبه گردید. آغازگرهای به کار رفته در این آزمایش با به‌کارگیری نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند (Untergasser *et al.*, 2012) که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین خصوصیات خانواده ژنی ERF در ژنوم کنجد

پس از بررسی ژنوم کنجد تعداد ۱۴۴ ژن دارای دامنه پروتئینی AP2/ERF با طول ۴۷۳-۱۰۷۷۸ جفت بازشناسایی و تایید شد. بر اساس ماهیت و تعداد دامنه‌های AP2/ERF ژن‌ها به خانواده‌های AP2، RAV و ERF تقسیم‌بندی شدند (جدول ۲). از این بین ۲۲ ژن حاوی دو دامنه AP2/ERF در توالی آمینواسیدی خود بودند که در خانواده AP2 قرار داده شدند. ۴ ژن که توالی پروتئینی آن‌ها علاوه بر دامنه AP2/ERF حاوی دامنه B3 نیز بودند به خانواده RAV تعلق گرفتند. همچنین ۳ ژن از ژن‌های باقی‌مانده علی‌رغم اینکه دارای تک دامنه AP2/ERF بودند اما از نظر ساختاری شباهت زیادی به اعضای

1. Quantitative Polymerase Chain Reaction
2. SYBR Green Master Mix
3 Quantification cycle

جدول ۱. مشخصات عمومی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

شماره ژن	نام	توالی آغازگر	سایز محصول
NCBI Gene ID	Name	Primer Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)
105158636	ERF061L	F CGGTGGTGAATGCTGAGAGT	90
		R CCGGACACCACTCGTTTGAA	
105159681	Act97	F CTCAACCCCAAGGCTAACAG	169
		R GTACGCCCACTAGCATAACAG	
105170695	EF1A	F CCCAGGACGTGTGTTTGACAT	137
		R CAGGTGGCATAGTAGCAGAG	

ERF کنگد شامل طول توالی پپتیدی (PL)، وزن مولکولی برحسب کیلو دالتون (MW)، نقطه ایزوالکتریک (pI)، بار خالص (NC)، متوسط آب‌گرایی (HP)، شاخص ناپایداری (II) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). طول توالی پپتیدی ERF‌های کنگد به‌طور متوسط ۲۵۵ اسیدآمیننه (aa) بود و در بازه ۱۲۱-۵۳۱ قرار داشت. وزن مولکولی این پروتئین‌ها نیز ۱۳/۴-۵۹/۳ کیلو دالتون بود. همچنین نقطه ایزوالکتریک برای پروتئین‌های ERF از ۴/۵ تا ۱۰/۲ گسترده بود. بار خالص ERF‌ها در بازه ۲۷/۹- تا ۱۴/۷ قرار داشت. نقطه ایزوالکتریک نشان‌دهنده pH می‌باشد که در آن کل پروتئین از نظر بار خنثی می‌شود. متوسط کل هیدروپاتی نیز بر این پروتئین‌ها در محدوده ۰/۹۸- تا ۰/۲۸- پیش‌بینی شد. مقدار منفی میانگین کل هیدروپاتی در کلیه ژن‌های خانواده ERF نشانگر ماهیت آب دوست گوی‌مانند این پروتئین‌ها می‌باشد (Kabir et al., 2021). همچنین شاخص ناپایداری اعضای خانواده ERF در بازه ۳۴/۹ تا ۸۵/۲ تعیین گردید. پروتئین‌های دارای شاخص ناپایداری بالاتر از ۴۰ احتمالاً در لوله‌آزمایش ناپایدار باشند.

روابط فیلوژنتیکی، ساختارهای ژنی و موتیف‌های حفاظت شده در خانواده ERF

در بررسی روابط فیلوژنتیکی به‌منظور تفکیک بهتر گروه‌ها و نشان دادن تمایز بین ERF‌ها و دیگر خانواده‌های AP2/ERF از تمامی اعضای این ابر

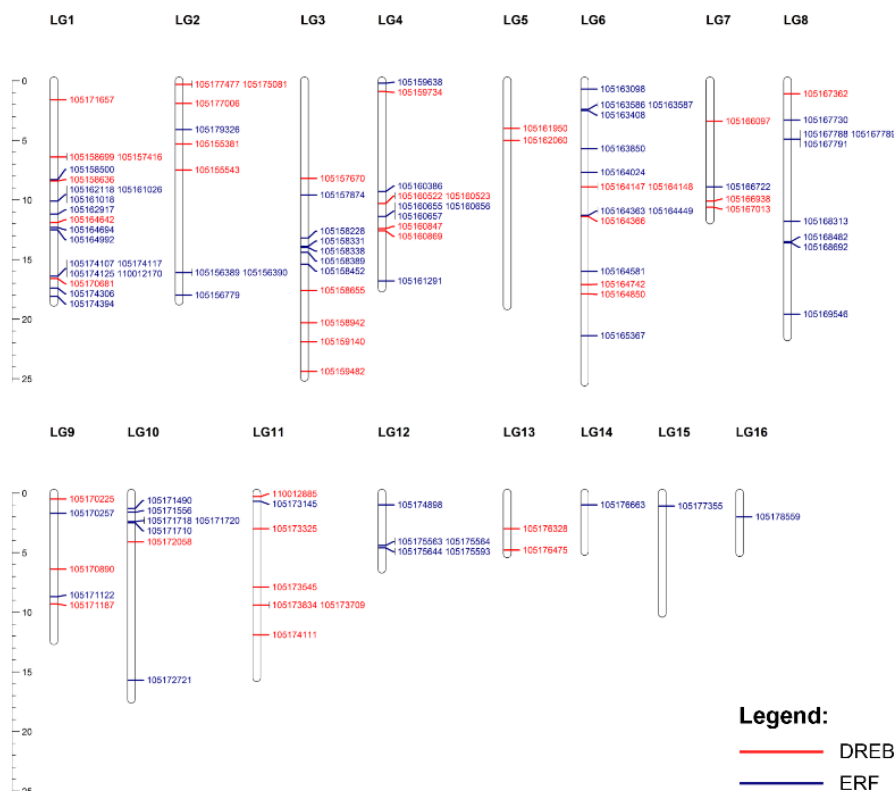
جدول ۲. طبقه‌بندی اعضای ابر خانواده AP2/ERF در کنگد

خانواده	زیرخانواده	تعداد	
Family	Sub-Family	Number	
AP2	Double AP2	22	
	Single AP2	3	
	ERF	DREB	46
		A1	6
		A2	5
		A3	1
		A4	15
		A5	10
	A6	9	
	ERF	ERF	67
B1		11	
B2		4	
B3		26	
B4		4	
B5		8	
RAV			
	Soloist	2	
Total		144	

جایگاه فیزیکی ژن‌های ERF کنگد بر روی ۱۶ گروه لینکاژی در شکل ۱ نشان داده شده است. از ۱۱۳ ژن شناسایی شده ۱۰۹ ژن بر روی گروه‌های لینکاژی منطبق بودند در حالی که جایگاه ۴ ژن دیگر شامل ۲ ERF و ۲ DREB مشخص نبود. بیشترین تعداد ERF بر روی LG1 و LG6 (به‌ترتیب حاوی ۱۹ و ۱۵ ژن ERF) قرار داشت. از سوی دیگر کمترین تعداد ERF در LG14، LG15 و LG16 (هر یک ۱ ژن ERF) مشاهده گردید. در مجموع جانمایی ژن‌های ERF نشان داد که این خانواده به‌صورت نامنظم در سراسر گروه‌های لینکاژی پراکنده شده‌اند.

در ادامه خصوصیات فیزیکیوشیمیایی پروتئین‌های

خانواده در کنجد و آرابیدوپسیس استفاده گردید.



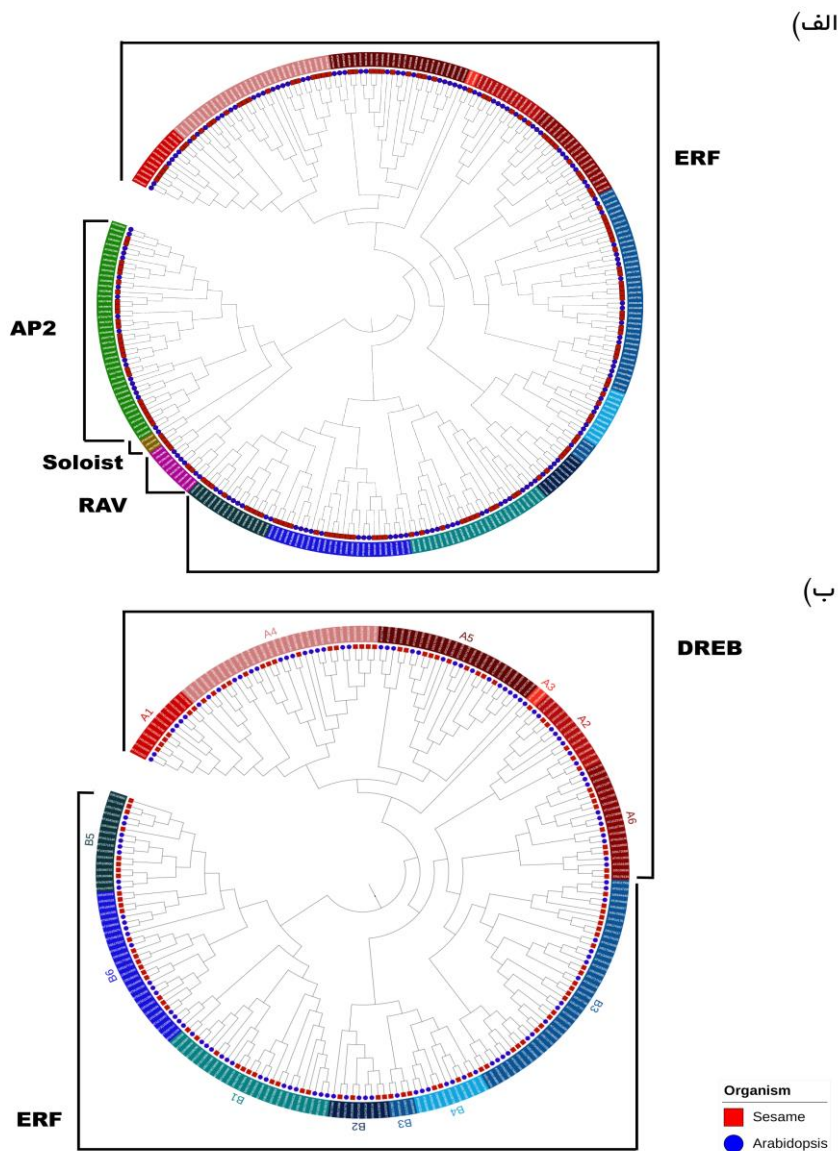
شکل ۱. جایگاه فیزیکی ژن‌های خانواده ERF بر روی ۱۶ گروه لینکژی کنجد (در مقیاس مگاباز).

نزدیک‌ترین بودند. همچنین ارتباط بسیار نزدیکی نیز بین گروه‌های B3، B4 و B2 پایدار به نظر می‌رسید. روابط فیلوژنتیکی به دست آمده نشان داد که برخی از ژن‌های AP2/ERF در آرابیدوپسیس (برای نمونه AT3G14230، AT4G25490، AT2G22200) فاقد همولوگ متناظر در کنجد می‌باشند. این موضوع در کنار تعداد پایین‌تر ژن‌های ERF کنجد نسبت به آرابیدوپسیس نشان از رخداد از دست دادن ژن در طی مراحل تکامل دارد. با این حال به‌طور عکس از برخی از ژن‌های آرابیدوپسیس (برای نمونه ژن‌های AT4G13040، AT1G64380 و AT4G34410) بیش از یک کپی با همولوژی بالا در ژنوم کنجد وجود دارد. از این رو به نظر می‌رسد احتمالاً پیرو رویداد از دست دادن ژن رویداد دو برابر شدن نیز در ژنوم کنجد رخ داده باشد. نتایج مشابه با این یافته در مطالعات پیشین بر

از این‌رو، درخت فیلوژنتیکی به روش حداکثر درست‌نمایی (ML) و با استفاده از توالی‌های پروتئینی همتراز شده ابر خانواده AP2/ERF در کنجد و آرابیدوپسیس ترسیم گردید. در درخت ML به دست آمده ژن‌های تمامی خانواده‌ها بخوبی از هم تفکیک شدند و در گروه‌های متناظر خود شامل ERF، RAV، Soloist و AP2 قرار گرفتند (شکل ۲-الف). بر این اساس به نظر می‌رسد خانواده RAV از روابط نزدیک‌تری با ERF‌ها برخوردار باشد. از سوی دیگر AP2 دورترین خانواده نسبت به ERF‌ها بود.

خانواده ERF نیز بخوبی به زیر خانواده‌های DREB و ERF و هر یک به ۶ زیرگروه به ترتیب شامل A1-6 و B1-6 تفکیک شد (شکل ۲-ب). از نظر زیر خانواده‌ها نیز DREB دورترین و ERF نزدیک‌ترین به سایر خانواده‌ها بود. از روابط بین زیر خانواده‌ها نیز A1 و B5 دورترین و A6 و B3 نیز

روی کنگد و کرچک پیشنهاد شده است (Dossa *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2013).



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی از پروتئین‌های الف) ابر خانواده AP2/ERF و ب) خانواده ERF در کنگد و آرابیدوپسیس.

جدول ۳. خصوصیات فیزیکوشیمیایی اعضای خانواده ERF در کنگد

GI	GR	PL	MW	pI	NC	HP	II	GI	GR	PL	MW	pI	NC	HP	II
105164148	A1	209	23.5	8.2	1.9	-0.69	60.4	105161950	A5	219	24.2	4.9	-7.1	-0.53	60.5
105158699	A1	178	19.5	8.6	2.2	-0.73	59.7	105173709	A5	224	24.7	4.5	-14.1	-0.65	58.4
105160523	A1	225	25	5.6	-3.9	-0.57	56.9	105164850	A5	255	28.1	5.1	-13.3	-0.83	57.2
105179256	A1	203	22.9	5.8	-3.8	-0.54	60	105173834	A5	193	20	4.8	-8	-0.28	40.1
105170225	A1	216	23.8	5.8	-4.6	-0.59	54.6	105175081	A5	169	18.6	7.9	1.2	-0.6	66.2
105170890	A1	219	24.5	5.4	-6.7	-0.69	46.8	105155543	A5	149	16.6	9.4	6.2	-0.93	50.7
105160847	A2	375	40.9	5.3	-8.8	-0.68	46	105159140	A5	155	17.4	9.1	4	-0.88	64.4
105167013	A2	359	40.4	6.2	-4.3	-0.83	35.4	105176328	A5	121	13.4	8.1	0.9	-0.74	36.9
105159734	A2	288	32.6	5.8	-4.7	-0.83	61.3	105171187	A6	322	35.7	6.7	-0.7	-0.48	59.9
105166938	A2	199	22.2	8.4	1.8	-0.81	47	105176475	A6	369	40.7	6.2	-3.5	-0.62	68.2
105166097	A2	212	23.4	5.5	-3.1	-0.57	42.7	105177006	A6	343	37.9	5.6	-7.4	-0.63	44.7
105160869	A3	340	36.3	5.7	-4.7	-0.75	67.9	105158942	A6	330	36	6.3	-2.4	-0.59	53.9

105174111	A4	202	21.9	5.3	-3.1	-0.36	49	105167362	A6	377	41.7	5.3	-6.8	-0.82	70.8
105160522	A4	193	20.7	4.9	-8.9	-0.56	57.9	105158655	A6	347	38.4	9.2	9	-0.59	50.4
105157416	A4	233	25.7	6	-3.6	-0.62	69.3	105172058	A6	419	46.2	7.3	0.6	-0.64	57.9
105164147	A4	252	26.9	5.5	-7.5	-0.78	85.2	105158636	A6	297	32.3	9.1	5.2	-0.49	41.7
105177477	A4	174	19.4	5.7	-3	-0.74	61.8	105179134	A6	284	31.5	8.7	4	-0.6	41
105164366	A4	250	27.5	6.9	-0.4	-0.47	56	105175564	B1	233	25.3	10.2	9.1	-0.6	73.3
105170681	A4	286	30.4	6.1	-2.7	-0.62	44.6	105178559	B1	221	23.6	8.8	2	-0.57	45.9
105173325	A4	252	27.6	5.6	-7.4	-0.69	49	105175563	B1	150	16.3	9.7	5	-0.45	50
110012885	A4	182	20.4	6.6	-1.4	-0.67	59.3	105165367	B1	156	17.8	9.6	6.8	-0.77	53.7
105171657	A4	243	26	5	-7	-0.39	50.4	105174898	B1	235	25.9	7.1	0.1	-0.81	72.4
105164742	A4	244	26.3	5.2	-6.9	-0.45	62.4	105176663	B1	228	25.1	8.3	2	-0.85	69.4
105164642	A4	225	24.2	5.2	-6.9	-0.58	52.8	105156779	B1	390	42.4	5.3	-7.8	-0.56	59.7
105157670	A4	215	23.4	5.9	-2.9	-0.49	55.1	105168313	B1	418	45.5	6	-3.6	-0.49	54.1
105162060	A4	268	29.6	5.2	-10.6	-0.61	61.5	105171490	B1	342	37.7	5.3	-12.2	-0.68	52.7
105173545	A4	243	26.8	5.5	-7.6	-0.6	49.7	105168692	B1	531	59.3	4.9	-25	-0.85	53.2
105155381	A5	242	26.3	5.9	-2.8	-0.54	51.9	105158338	B1	290	31.6	10	14.7	-0.54	55
105159482	A5	237	26	5.5	-2.2	-0.5	65.9	105162917	B2	391	43.2	5	-12	-0.77	34.9

GI: نمایه ژن NCBI، GR: گروه ژن، PL: طول توالی پپتیدی، MW: وزن مولکولی (kD)، pI: نقطه ایزوالکتریک، NC: بار خالص، HP: متوسط آب‌گریزی، II: شاخص ناپایداری.

ادامه جدول ۳. خصوصیات فیزیوشیمیایی اعضای خانواده ERF در کنگد

GI	GR	PL	MW	pI	NC	HP	II	GI	GR	PL	MW	pI	NC	HP	II
105157874	B2	388	43.1	4.8	-14	-0.75	40.1	105171720	B3	134	15.1	9.2	3.9	-0.89	51.2
105163098	B2	251	28.2	7.8	1.1	-0.91	39.9	105171122	B4	377	41	5.2	-15.1	-0.63	50
105171556	B2	225	25.4	6.6	-0.8	-0.93	42.9	105179326	B4	417	45	8	1.5	-0.66	69.1
105164449	B3	239	26.2	8.7	2.1	-0.37	53.5	105158228	B4	263	29	9.2	4.9	-0.85	62.7
105160657	B3	240	26	5.8	-2.9	-0.38	55.8	105168482	B4	229	25.8	9.6	10.1	-0.84	60.2
105175593	B3	159	17.5	7.1	0.1	-0.6	52.3	105160386	B5	401	45.1	4.8	-20.8	-0.68	56.5
110012170	B3	144	15.8	8.1	1	-0.76	50.8	105166722	B5	372	41.4	4.7	-20.8	-0.71	48.7
105174107	B3	211	23.7	6.7	-0.6	-0.65	59	105158500	B5	329	35.9	5	-9.9	-0.52	39.7
105174117	B3	187	21	6.6	-0.2	-0.56	58	105164024	B5	356	39	5.3	-6.9	-0.62	49.4
105174125	B3	191	21.3	6.4	-0.9	-0.55	61.5	105156389	B5	211	23.8	7.8	1	-0.82	48.9
105175644	B3	272	30.8	5.2	-8.8	-0.64	58.1	105174394	B5	321	36	5.3	-12.4	-0.64	37.9
105163586	B3	163	17.9	5.7	-3	-0.65	52.6	105173145	B5	315	35.4	6	-2.9	-0.72	48.4
105171718	B3	130	14.6	6.4	-1	-0.98	43.9	105163850	B5	237	26.9	5.4	-5.9	-0.75	58.4
105163587	B3	151	16.7	8.2	1.1	-0.85	48.5	105158389	B6	189	20.9	9.6	7.1	-0.69	63.6
105167788	B3	146	16.5	8	1	-0.77	72.1	105164694	B6	187	20.4	8.8	3.1	-0.56	65.8
105167789	B3	166	18.6	6	-2.8	-0.86	61.8	105164581	B6	207	23.1	8.9	4.2	-0.63	54
105167791	B3	151	17	7.9	0.9	-0.66	71.9	105164992	B6	178	20.1	8.8	3.3	-0.76	45.8
105161291	B3	192	21.6	4.6	-13.1	-0.56	56.2	105158331	B6	171	19.5	8.3	2.3	-0.81	42.2
105163408	B3	255	28.3	5.7	-3	-0.73	71.3	105174306	B6	272	29.9	8.6	2.5	-0.72	55
105158452	B3	234	26.1	5.2	-5.1	-0.61	49.1	105167730	B6	345	38.7	4.6	-24.1	-0.61	56.3
105171710	B3	236	26.2	5.3	-7.8	-0.68	64.3	105177355	B6	379	42.3	4.7	-23.9	-0.57	46.4
105160656	B3	320	35.7	7.8	1.1	-0.6	56.7	105159638	B6	280	31.4	5.2	-8.7	-0.72	46.4
105179200	B3	266	29.8	7.1	0.1	-0.69	58.2	105170257	B6	278	31.1	6.6	-0.9	-0.64	41.2
105164363	B3	254	28.3	5.9	-2.1	-0.51	65.7	105161026	B6	357	39.2	4.5	-27.9	-0.6	49.5
105160655	B3	229	25.3	5.2	-6	-0.64	69	105156390	B6	354	39.3	4.6	-23.9	-0.65	46.6
105179201	B3	215	23.8	5.1	-7	-0.62	60.7	105162118	B6	164	18.2	6.9	-0.1	-0.45	39.6
105169546	B3	278	30.7	6.4	-1	-0.77	45.3	105161018	B6	236	25.9	6.9	-0.1	-0.74	42.3
105172721	B3	269	29.7	6.8	-0.5	-0.78	51.2								

GI: نمایه ژن NCBI، GR: گروه ژن، PL: طول توالی پپتیدی، MW: وزن مولکولی (kD)، pI: نقطه ایزوالکتریک، NC: بار خالص، HP: متوسط آب‌گریزی، II: شاخص ناپایداری.

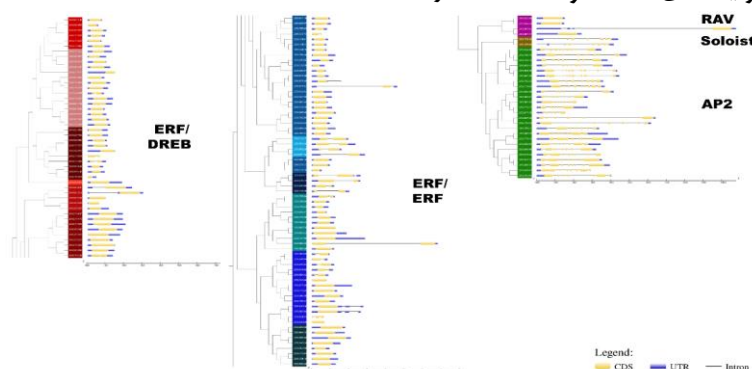
دارای ۷ ناحیه آگزونی بودند. ژن‌های خانواده AP2 نیز در ساختار ژنی خود ۷ تا ۱۰ ناحیه آگزونی داشتند. مشابه با ERF در سایر خانواده‌های مرتبط با پاسخ به تنش‌ها نیز تعداد کم یا فقدان اینترون دیده می‌شود (Guo *et al.*, 2014; Jing *et al.*, 2016). بنابراین به نظر می‌رسد تعداد پایین اینترون یک الگوی تکاملی حفاظت شده در بین ژن‌های مرتبط با تنش باشد چرا که به بیان این ژن‌ها سرعت می‌بخشد و از خطاهای احتمالی در حین فرآیند پیرایش ممانعت می‌نماید (Jeffares *et al.*, 2008).

در ادامه موتیف‌های حفاظت شده در توالی پپتیدی ژن‌ها بر اساس گروه‌بندی درخت فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). تعداد ۱۲ موتیف حفاظت

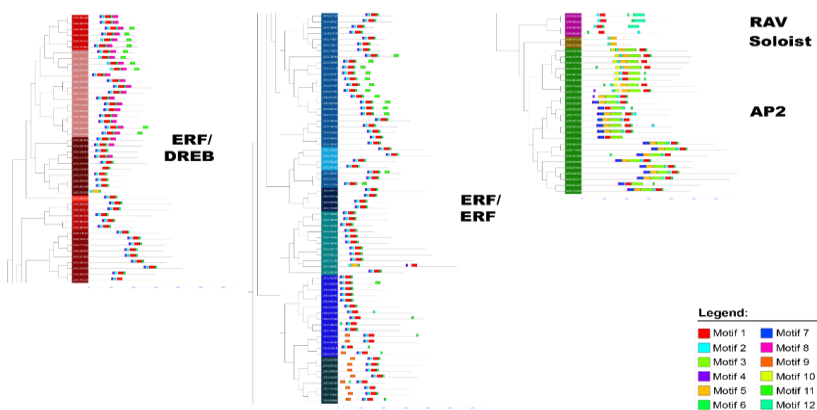
به‌منظور شناخت تنوع ساختاری ژن‌ها در بین اعضای ERF و مقایسه با دیگر خانواده‌های AP2/ERF سازمان‌دهی نواحی آگزون/ اینترون مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). همانطور که نشان داده شده است، تعداد آگزون‌های زیرخانواده DREB در محدوده ۱-۲ بوده و در بیشتر موارد تنها حاوی یک آگزون می‌باشد. در میان ژن‌های زیرخانواده ERF نیز ۱-۳ ناحیه آگزون دیده می‌شد، اگرچه اکثریت با ژن‌های تک آگزونی بود. به‌طور مشابه بجز ژن ۱۰۵۱۶۶۳۶۱ با ۴ آگزون سایر ژن‌های RAV تنها دارای یک ناحیه آگزونی بودند. از سوی دیگر ژن‌های Soloist و AP2 دارای نواحی متعدد آگزونی ساختار ژنی خود بودند. به طوری که هر دو ژن گروه Soloist

توالی‌های خانواده AP2 حضور داشتند. همچنین موتیف ۵ نیز تنها در خانواده AP2 و Soloist مشاهده گردید. حضور موتیف ۱۲ نیز تنها در توالی پروتئینی اعضای RAV دیده شد. از سوی دیگر، موتیف ۱۱ فقط در خانواده ERF شناسایی شد. همچنین موتیف‌های ۸ و ۹ نیز به ترتیب تنها در توالی‌های پپتیدی زیرخانواده DREB و ERF مشاهده شدند.

شده برای ژن‌های AP2/ERF کنگد شناسایی گردید که مشخصات عمومی آن‌ها در جدول ۴ آورده شده است. بررسی توالی مورد توافق موتیف‌های شناسایی شده نشان داد که موتیف‌های ۱، ۲ و ۵ با دامنه AP2/ERF ارتباط دارند. همچنین موتیف ۱۲ نیز با دامنه B3 در ارتباط بود. بر پایه نتایج، موتیف ۱ و ۲ تقریباً در تمامی پروتئین‌ها (۱۴۱ پروتئین) حضور داشتند و در واقع وجه مشترک توالی‌های آمینواسیدی AP2/ERF بودند. موتیف‌های ۳، ۷ و ۱۰ فقط در



شکل ۳. آرایش ساختارهای ژنی مربوط به پروتئین‌های ابر خانواده AP2/ERF در کنگد.



شکل ۴. آرایش موتیف‌های حفاظت شده در توالی پروتئینی اعضای ابر خانواده AP2/ERF در کنگد.

جدول ۴. مشخصات موتیف‌های حفاظت شده شناسایی شده در ابر خانواده AP2/ERF کنگد

شماره No.	نمایش لوگو Logo	حاشیه‌نویسی Annotation	نواحی Sites
1		AP2/ERF	141
2		AP2/ERF	141
3		NA	25

4		NA	124
5		AP2/ERF	24
6		NA	135
7		NA	16
8		NA	24
9		NA	11
10		NA	8
11		NA	24
12		B3	3

شناسه ۱۰۵۱۷۸۵۵۹، ۱۰۵۱۷۶۴۷۵ و ۱۰۵۱۵۸۹۴۲ و بیشترین سطح بیان را داشتند. در بافت ریشه نیز بیشترین بیان برای ژن‌های ERF4L (گروه B1)، RAP2.3 و ERF071 (گروه B2) با شناسه ۱۰۵۱۷۸۵۵۹، ۱۰۵۱۷۱۵۵۶ و ۱۰۵۱۶۳۰۹۸ به دست آمد. ژن‌های ERF017L (گروه A5)، ERF4L (گروه B1) و RAP2.13 (گروه A6) با شناسه ۱۰۵۱۶۱۹۵۰، ۱۰۵۱۷۸۵۵۹ و ۱۰۵۱۵۸۹۴۲ در بافت گل از بیشترین سطح بیان نسبت به دیگران برخوردار بودند. بیشترین بیان در پرچم نیز متعلق به ژن‌های RAP2.12L (گروه B2)، ABR1L (گروه B4) و RAP2.12L (گروه B2) با شناسه ۱۰۵۱۷۸۷۴، ۱۰۵۱۷۹۳۲۶ و ۱۰۵۱۶۲۹۱۷ بود. ژن‌های ERF4L (گروه B1)، ERF5L (گروه B3) و RAP2.12L (گروه B2) با شناسه ۱۰۵۱۷۸۵۵۹، ۱۰۵۱۶۰۶۵۶ و ۱۰۵۱۵۷۸۷۴ دارای بالاترین سطح بیان در کپسول بودند. در دانه‌های بالغ کنجد نیز بیشترین بیان برای ژن‌های RAP2.2L (گروه A2)، ABI4 (گروه A3) و RAP2.12L (گروه B2) با شناسه ۱۰۵۱۶۶۹۳۸، ۱۰۵۱۶۰۸۶۹ و ۱۰۵۱۵۷۸۷۴ به دست آمد. همچنین ERF4L (گروه B1)، ERF5L (گروه B3) و RAP2.3 (گروه B2) با شناسه ۱۰۵۱۷۸۵۵۹، ۱۰۵۱۶۰۶۵۶ و ۱۰۵۱۷۱۵۵۶ نیز دارای بیشترین بیان در دانه در حال جوانه‌زنی بودند. در مجموع این نتایج نشان می‌دهد که اعضای

به‌منظور بررسی تفاوت میان دامنه AP2 اعضای DREB و ERF توالی هم‌تراز شده دامنه این دو زیرگروه مورد مقایسه قرار گرفته شد (شکل ۵). بنابر نتایج در اکثر موارد ۲ اسید آمینه حفاظت شده در ناحیه ۱۶ و ۲۱ بین DREB و ERF متفاوت بود. در پروتئین‌های زیرگروه DREB به‌ترتیب اسیدهای آمینه والین (V) و اسید گلوتامیک (E) حفاظت شده بودند. در حالی که، در جایگاه متناظر پروتئین‌های ERF اسیدهای آمینه حفاظت شده آلانین (A) و اسید آسپارتیک (D) بود. چنین الگو حفاظت شده‌ی متمایز بین DREB و ERF در سایر گیاهان نیز نشان داده شده است (Sakuma *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2010). در آرآیدوپسیس نشان داده شده است که برای عملکرد صحیح پروتئین DREB1A حضور والین نسبت به اسید گلوتامیک در نواحی مذکور از اهمیت بیشتری برخوردار است و جایگزینی آن موجب کاهش شدید توانایی اتصال به DNA این پروتئین خواهد شد (Sakuma *et al.*, 2002).

پروفایل بیانی ژن‌های ERF

بیان ژن‌های خانواده ERF در بافت‌های برگ، ریشه، گل، پرچم، کپسول، دانه رسیده و دانه در حال جوانه‌زنی بر اساس داده‌های پروژه‌های پیشین کنجد محاسبه و ارزیابی گردید (شکل ۶-الف). با توجه به نتایج، در بافت برگ ژن‌های ERF4L (گروه B1)، RAP2.4 و RAP2.13 (گروه A6) و به‌ترتیب با

خانواده ERF احتمالاً نقش مهمی در رشد و نمو گیاه داشته باشند. مطابق با یافته‌های ما بیان بالای ژن‌های خانواده ERF در بافت‌های مختلف گیاهان متعدد گزارش شده است (Charfeddine *et al.*, 2015; Zhang and Li, 2018; Kabir *et al.*, 2021). در مطالعه‌ای بر روی عناب چینی بیان بالای ژن‌های ERF در بافت‌های میوه، گل و برگ نشان داده شد (Zhang and Li, 2018). نشان داده شده است که RAP2.4 (گروه A6) در تنظیم فرآیندهای نمو واسطه شده با نور و اتیلن از جمله طولیل شدن ساقه‌چه، زمان گلدهی، طولیل شدن ریشه، تشکیل ریشه موئین نقش دارد (Lin *et al.*, 2008). در آرآبیدوپسیس نشان داده شد که RAP2.3 (گروه B2) به‌عنوان حسگر نیتریک اکسید (NO) عمل کرده و در تقویت مسیر سیگنال‌دهی مرتبط با آبسزیک اسید (ABA) و جاسمونات مؤثر می‌باشد (Leon *et al.*, 2020). همچنین نشان داده شده است که ABI4 در تنظیم خواب اولیه بذر در آرآبیدوپسیس از طریق کنترل توازن بین ABA و جیبرلیک اسید (GA) نقش دارد (Shu *et al.*, 2013). ABR1 نیز به‌عنوان یک مهار کننده بیان ژن‌های تنظیم شده با ABA در آرآبیدوپسیس پیشنهاد شده است (Pandey *et al.*, 2005). همچنین RAP2.2 از گروه B2 نیز در تنظیم بیوسنتز اسیدهای چرب و مسیر سنتز اسیدهای چرب غیر اشباع نقش دارد (Li *et al.*, 2012). در ادامه بیان نسبی ژن‌های خانواده ERF تحت تنش‌های محیطی شامل خشکی، شوری، اسمزی و غرقابی بر پایه داده‌های بیانی در دسترس مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت (شکل ۶-ب). نتایج به‌دست آمده نشان داد که تحت تنش خشکی در برگ کنجد ژن‌های ERF017L (گروه A2)، ERF061L (گروه A6) با شناسه ۱۰۵۱۶۶۹۳۸ و

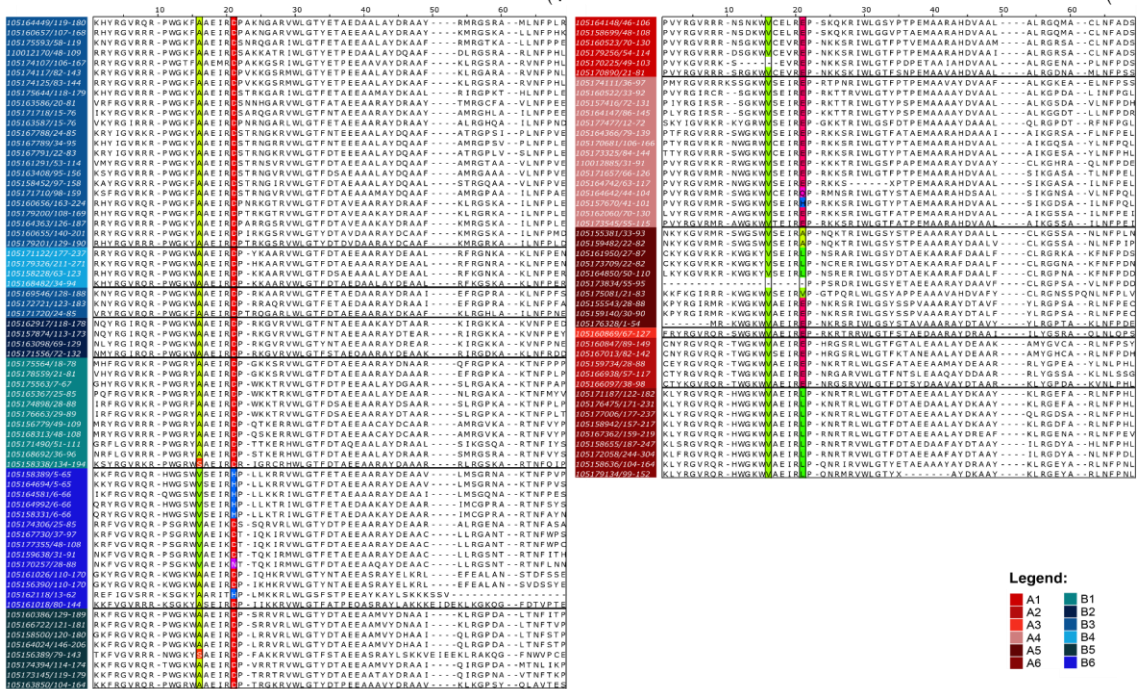
۱۰۵۱۷۳۸۳۴ و ۱۰۵۱۵۸۶۳۶ بیشترین افزایش بیان را نسبت به شاهد داشتند. از سوی دیگر در طول تنش اسمزی نیز ژن‌های PTI6 (گروه B5)، TINYL و TINY (گروه A4) با شناسه ۱۰۵۱۷۳۱۴۵، ۱۰۵۱۷۳۵۴۵ و ۱۰۵۱۶۲۰۶۰ بیشترین افزایش بیان را در ریشه نسبت به کنترل نشان دادند. همچنین تحت تنش شوری ژن‌های ERF017L (گروه A5)، ABR1L (گروه B4) و DREB3 (گروه A4) با شناسه ۱۰۵۱۷۳۸۳۴، ۱۰۵۱۷۹۳۲۶ و ۱۰۵۱۵۷۶۷۰ در بخش هوایی کنجد بیشترین افزایش بیان را نسبت به شرایط عادی نشان دادند. ژن‌های ERF096، ERF098L و ERF5L (گروه B3) با شناسه ۱۰۵۱۷۱۷۱۸، ۱۰۵۱۶۳۵۸۷ و ۱۰۵۱۶۰۶۵۶ نیز دارای بیشترین افزایش بیان در ریشه تحت شرایط غرقابی نسبت به شاهد بودند. در نقطه مقابل اما، ژن‌های TINYL، ERF023 (گروه A4) و WIN1L (گروه B6) با شناسه ۱۰۵۱۷۳۵۴۵، ۱۱۰۰۱۲۸۸۵ و ۱۰۵۱۶۴۵۸۱ بیشترین کاهش بیان تحت تنش خشکی نسبت به شاهد در بافت برگ نشان دادند. همچنین تحت تنش اسمزی در ریشه بیشترین کاهش بیان نسبی برای ژن‌های ERF087L، ERF003L (گروه B6) و ERF062 (گروه A6) با شناسه ۱۰۵۱۷۴۳۰۶، ۱۰۵۱۵۸۳۳۱ و ۱۰۵۱۷۲۰۵۸ به‌دست آمد. از سوی دیگر، ژن‌های ERF039L، TINYL (گروه A4) و ERF1AL (گروه B3) با شناسه ۱۰۵۱۶۴۳۶۶، ۱۰۵۱۷۳۵۴۵ و ۱۰۵۱۶۴۴۴۹ بیشترین کاهش بیان نسبت به شاهد را تحت تنش شوری در اندام هوایی نشان دادند. همچنین تحت تنش غرقابی بیشترین کاهش بیان نسبی برای ژن‌های ERF1L (گروه B3)، ERF039 (گروه A4) و CRF2 (گروه B5) با شناسه ۱۰۵۱۷۴۱۰۷، ۱۰۵۱۷۳۳۲۵ و ۱۰۵۱۶۴۰۲۴ به‌دست آمد. در مجموع برآیند نتایج این بخش حاکی از نقش مهم ژن‌های ERF در تنظیم پاسخ کنجد به تنش‌های

با توجه به نتایج قبلی، بیان نسبی ژن ERF061L (گروه A6) با شناسه ۱۰۵۱۵۸۶۳۶ تحت تنش خشکی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل به روش qPCR مورد مطالعه قرار گرفت. بیان افزایش یافته‌ی ژن ERF061L نسبت به شاهد در شرایط خشکی ضعیف تا متوسط در هر دو ژنوتیپ مشاهده گردید، اگرچه این افزایش در ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (شکل ۷). اما تحت خشکی شدید در ژنوتیپ حساس بیان این ژن به سطحی نزدیک شاهد کاهش پیدا کرد، در حالی که در ژنوتیپ متحمل بیان ERF061L به میزان بسیار چشمگیری نسبت به سطوح قبلی افزایش یافته بود. این کاهش شدید بیان در ژنوتیپ حساس تحت خشکی شدید احتمالاً به علت تخریب ساختارها و آنزیم‌های حیاتی بوده که نهایتاً منجر به اختلال در فعالیت عدای سیستم دفاعی این گیاهان گردید.

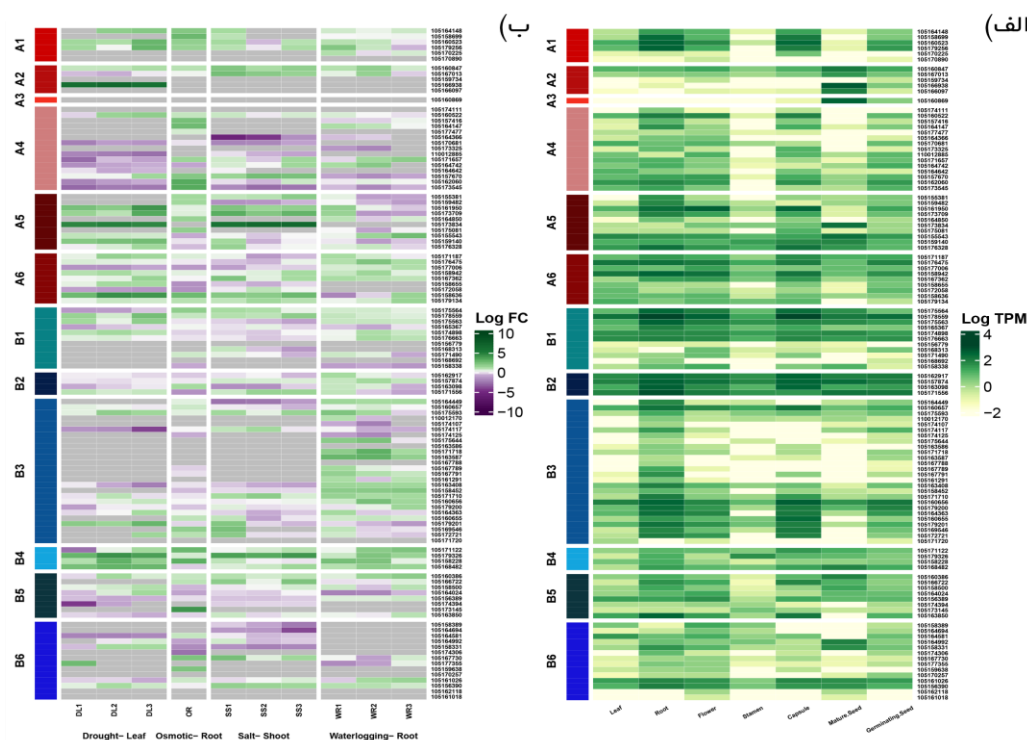
محیطی از جمله خشکی، شوری و غرقابی می‌باشد. مشابه با یافته‌های این مطالعه در آراییدوپسیس بخوبی نشان داده شده است که اعضای گروه A2 از جمله DREB2A که همولوژی قابل توجهی با RAP2.2L دارند کنجد دارد، در تحمل به تنش خشکی نقش دارند (Mizoi et al., 2012). مطالعات متعدد نشان داده است که اعضای گروه A6 در تنظیم بیان ژن‌های مؤثر در تحمل خشکی از جمله آکوئوپورین‌ها، پراکسیدازهای کلروپلاستی و پروتئین‌های LEA به‌ویژه ده‌ایدین‌ها نقش مؤثر دارند (Rae et al., 2011; Rudnik et al., 2017). مطابق با نتایج ما بیان بالای ژن ABR1 (گروه B4) در آراییدوپسیس تحت تنش شوری نشان داده شده است (Pandey et al., 2005). همچنین گزارش شده است که موتانت‌های فاقد این ژن شدت به شوری حساس بودند. افزایش بیان ژن DREB3 (گروه A4) نیز در گوجه تحت تنش شوری گزارش شده است که با نتایج حاضر مطابق دارد (Islam and Wang, 2009).

(ب)

(الف)



شکل ۵. توالی‌های هم‌تراز شده دامنه AP2/ER در زیرخانواده‌های (الف) DREB و (ب) ERF کنجد.



شکل ۶. پروفایل بیانی ژن‌های خانواده ERF (کنجد الف) در بافت‌های مختلف و (ب) تحت تنش‌های غیر زنده. بافت‌های مورد مطالعه به ترتیب از چپ به راست: برگ، ریشه، گل، پرچم، کپسول، دانه رسیده، دانه در حال جوانه‌زنی. تنش‌های غیر زنده به ترتیب از چپ به راست: خشکی در برگ (DL)، آسمزی در ریشه (OR)، شوری در بخش هوایی (SS) و غرقابی در ریشه (WR). سطوح تنش ۱: ضعیف، ۲: متوسط و ۳: شدید (شرح کامل در بخش مواد و روش‌ها).

افزایش بیان بالای ژن ERF061 را تحت تنش خشکی در کنجد نشان دادند و این بیان بالا را نشان از نقش مهم این ژن در تحمل به خشکی دانستند. در مطالعه‌ای دیگر بر روی ذرت نیز بیان افزایش یافته ERF061 تحت تنش خشکی مشاهده گردید (Zhang *et al.*, 2017). پیشنهاد شده است که افزایش بیان این ژن احتمالاً تحمل یا سازگاری گیاه را نسبت به خشکی افزایش دهد. همانطور که پیش‌تر بیان شد، اعضای گروه A6 در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی از جمله دهایدرین‌ها، آکوئپورین‌ها، پراکسیدازها و همچنین چندین ژن از خانواده عامل رونویسی انگشت روی^۱ (ZF-TF) نقش کلیدی دارند (Rae *et al.*, 2017; Rudnik *et al.*, 2011). به‌طور ویژه نشان

در ادامه پس از آبیاری مجدد گیاهان متحمل بیان این ژن به سطح پایین‌تر از شاهد کاهش یافت. در حالی که در ژنوتیپ حساس، آبیاری مجدد موجب افزایش بیان ژن مورد نظر به سطحی بالاتر از شاهد و خشکی شدید گردید.

در واقع به نظر می‌رسد گیاه متحمل با به‌کارگیری مکانیسم‌های پاسخ به خشکی مناسب از جمله تنظیم بالای بیان ERF061L موفق به تحمل شرایط تنش گردید و بر این اساس احتمالاً پس از رفع تنش با کاهش بیان ژن‌های مرتبط با خشکی انرژی خود را صرف بازیابی و ترمیم ساختارهای خود نموده باشد. در نقطه مقابل اما در ژنوتیپ حساس احتمالاً شدت آسیب‌ها به قدری بود که بعد از آبیاری مجدد نیز هنوز گیاه دیگر مکانیسم‌های دفاعی بوده باشد.

مشابه با نتایج ما Dossa و همکاران (۲۰۱۶)

1. Zinc finger transcription factor

ژنوتیپ‌های کنجد. C0: شاهد؛ D1: خشکی ضعیف؛ D2: خشکی متوسط؛ D3: خشکی شدید؛ R4: آبیاری مجدد.

همچنین پروفایل‌های بیانی نشان داد که اکثر ژن‌های ERF به تنش‌های غیر زنده از جمله خشکی، شوری و غرقابی پاسخ می‌دهند. در این میان، ژن‌های ERF096 و ERF017L، PTI6، RAP2.2L به ترتیب تحت تنش‌های خشکی، اسمزی، شوری و غرقاب بشدت افزایش بیان نشان دادند. افزون بر این، بیان ژن ERF061L که در تمامی تنش‌ها به‌ویژه تنش خشکی دارای بیان افزایش یافته بود، به‌طور جداگانه در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به روش qPCR بررسی گردید. بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ متحمل کنجد در مقایسه با ژنوتیپ حساس تحت شرایط خشکی بیشتر می‌باشد. این مطالعه داده‌های مهمی را برای درک تکامل و عملکرد خانواده ERF فراهم نموده است که می‌تواند در مطالعات آینده جهت بهبود تحمل کنجد تحت تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

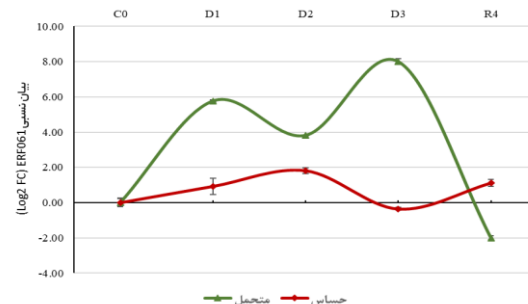
نویسندگان بدین‌وسیله از کمک و حمایت دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان در مراحل انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., ... & Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* 37(suppl_2): W202-W208.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.W., & Chua, N.H. (2001). Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *The Plant Cell*, 13(12), 2609-2618.
- Bedigian, D. (2010). Introduction History of the Cultivation and Use of Sesame. In *Sesame* (pp. 25-56). CRC Press.

داده شد که عوامل رونویسی این گروه با تنظیم ژن‌های کمپلکس فنی‌اسیدلانگاز (طول‌کننده اسیدهای چرب) تجمع موم کوتیکولی و تحمل به خشکی را افزایش می‌دهد (Zhang et al., 2005; Yang et al., 2020). بنابراین با توجه به دمین متصل‌شونده به DNA بسیار مشابه بین اعضای این گروه احتمال بسیار قوی وجود دارد که به موتیف‌های یکسان متصل شده و دارای نقش یکسان باشند (Weirauch et al., 2014).

در این بررسی، در مجموع ۱۱۳ ژن ERF از ژنوم کنجد شناسایی گردید. همچنین اعضای این خانواده به دو زیرخانواده شامل ۴۶ ژن DREB و ۶۷ ژن ERF تقسیم شدند. روابط فیلوژنتیکی، خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی پروتئین‌ها، ساختارهای ژنی و موتیف‌های آمینواسیدی حفاظت‌شده ویژه خانواده ERF کنجد شناسایی شدند. در مجموع اعضای ERF در بافت‌های مختلف کنجد به‌ویژه در ریشه، کپسول و گل از بیان قابل ملاحظه‌ای برخوردار بودند.



شکل ۷. اثر تنش خشکی بر بیان نسبی ژن ERF061 در برگ

- Charfeddine, M., Saïdi, MN., Charfeddine, S., Hammami, A., & Gargouri Bouzid, R. (2015). Genome-wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular biotechnology*, 57(4), 348-358.
- Dong, C. J., & Liu, J. Y. (2010). The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2. 1 function as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC plant biology*, 10(1), 1-15.
- Dossa, K., Mmadi, M.A., Zhou, R., Zhang,

- T., Su, R., Zhang, Y.,...& Zhang, X. (2019). Depicting the core transcriptome modulating multiple abiotic stresses responses in sesame (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3930.
- Dossa, K., Wei, X., Li, D., Fonceka, D., Zhang, Y., Wang, L., ... & Zhang, X. (2016). Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress. *BMC plant biology*, 16(1), 1-16.
- Dossa, K., You, J., Wang, L., Zhang, Y., Li, D., Zhou, R., ... & Zhang, X. (2019). Transcriptomic profiling of sesame during waterlogging and recovery. *Scientific data*, 6(1), 1-5.
- Du, X., Li, W., Sheng, L., Deng, Y., Wang, Y., Zhang, W., ... & Chen, S. (2018). Over-expression of chrysanthemum CmDREB6 enhanced tolerance of chrysanthemum to heat stress. *BMC plant biology*, 18(1), 1-10.
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., & Durinx, C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W216-W227.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002195.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.
- Guo, M., Yin, Y. X., Ji, J. J., Ma, B. P., Lu, M. H., & Gong, Z. H. (2014). Cloning and expression analysis of heat-shock transcription factor gene CaHsfA2 from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genet. Mol. Res*, 13, 1865-1875.
- Hong, J. C. (2016). General aspects of plant transcription factor families. In *Plant transcription factors* (pp. 35-56). Academic Press.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Islam, F., Gill, R.A., Ali, B., Farooq, M.A., Xu, L., Najeeb, U., Zhou, W. (2016). Sesame. In: Gupta SK (ed) *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production*, Academic Press, Cambridge, pp 135-147.
- Islam, M. S., & Wang, M. H. (2009). Expression of dehydration responsive element-binding protein-3 (DREB3) under different abiotic stresses in tomato. *BMB reports*, 42(9), 611-616.
- Jeffares, D. C., Penkett, C. J., & Bähler, J. (2008). Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in genetics*, 24(8), 375-378.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2016). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic acids research*, gkw982.
- Jing, H., Li, C., Ma, F., Ma, J. H., Khan, A., Wang, X., ... & Chen, R. G. (2016). Genome-wide identification, expression diversification of dehydrin gene family and characterization of CaDHN3 in pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS one*, 11(8), e0161073.
- Kabir, S. M. T., Hossain, M. S., Bashar, K. K., Honi, U., Ahmed, B., Emdad, E. M., ... & Islam, M. S. (2021). Genome-wide identification and expression profiling of AP2/ERF superfamily genes under stress conditions in dark jute (*Corchorus olitorius* L.). *Industrial Crops and Products*, 166, 113469.
- Kudo, M., Kidokoro, S., Yoshida, T., Mizoi, J., Todaka, D., Fernie, A. R., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. *Plant biotechnology journal*, 15(4), 458-471.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., &

- Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- León, J., Costa-Broseta, Á., & Castillo, M. C. (2020). RAP2. 3 negatively regulates nitric oxide biosynthesis and related responses through a rheostat-like mechanism in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 71(10), 3157-3171.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W293-W296.
- Li, Z. H. A. N. G., Qiaoying, L. I., Jie, S. H. E. N., Jinai, X. U. E., & Yuanhuai, H.A.N. (2012). Transcriptional regulatory networks in response to salt and drought stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(6), 950-958.
- Lin, R. C., Park, H. J., & Wang, H. Y. (2008). Role of Arabidopsis RAP2. 4 in regulating light-and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Molecular plant*, 1(1), 42-57.
- Luan, H., Guo, B., Shen, H., Pan, Y., Hong, Y., Lv, C., & Xu, R. (2020). Overexpression of barley transcription factor HvERF2. 11 in Arabidopsis enhances plant waterlogging tolerance. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1982.
- Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W327-W331.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96.
- Morris, J.B. (2002). Food, industrial, nutraceutical, and pharmaceutical uses of sesame genetic resources. *Trends in new crops and new uses*, 1(1), 153-156.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant physiology*, 140(2), 411-432.
- Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., & Torres, R. (2015). Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *Small*, 12, 44-444.
- Pandey, G. K., Grant, J. J., Cheong, Y. H., Kim, B. G., Li, L., & Luan, S. (2005). ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(3), 1185-1193.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature methods*, 14(4), 417-419.
- Rae, L., Lao, N. T., & Kavanagh, T.A. (2011). Regulation of multiple aquaporin genes in Arabidopsis by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta*, 234(3), 429-444.
- Rao, G., Sui, J., Zeng, Y., He, C., & Zhang, J. (2015). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in Salix arbutifolia. *FEBS Open Bio*, 5, 132-137.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rudnik, R., Bulcha, J. T., Reifschneider, E., Ellersiek, U., & Baier, M. (2017). Specificity versus redundancy in the RAP2. 4 transcription factor family of Arabidopsis thaliana: transcriptional regulation of genes for chloroplast peroxidases. *BMC plant biology*, 17(1), 1-17.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of

- Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), 998-1009.
- Sharma, M.K., Kumar, R., Solanke, A.U., Sharma, R., Tyagi, A.K., & Sharma, A.K. (2010). Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *olecular Genetics and Genomics*, 284(6), 455-475.
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2011). Expression of abscisic acid insensitive 4 (ABI4) in developing Arabidopsis seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), 694-696.
- Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., ... & Xie, Q. (2013). ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 9(6), e1003577.
- Soneson, C., Love, M. I., & Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, 4.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. D., Hooykaas, P. J., & Keller, B. (2000). Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 127(22), 4971-4980.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.
- Voorrips, R. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wei, L., Miao, H., Zhao, R., Han, X., Zhang, T., & Zhang, H. (2013). Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. *Planta*, 237(3), 873-889.
- Weirauch, M. T., Yang, A., Albu, M., Cote, A. G., Montenegro-Montero, A., Drewe, P., ... & Hughes, T. R. (2014). Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*, 158(6), 1431-1443.
- Wessler, S. R. (2005). Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain. *Trends in plant science*, 10(2), 54-56.
- Wuddineh, W. A., Mazarei, M., Turner, G. B., Sykes, R. W., Decker, S. R., Davis, M. F., & Stewart Jr, C. N. (2015). Identification and molecular characterization of the switchgrass AP2/ERF transcription factor superfamily, and overexpression of PvERF001 for improvement of biomass characteristics for biofuel. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 101.
- Xu, W., Li, F., Ling, L., & Liu, A. (2013). Genome-wide survey and expression profiles of the AP2/ERF family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *BMC genomics*, 14(1), 1-15.
- Xu, Z. S., Xia, L. Q., Chen, M., Cheng, X. G., Zhang, R. Y., Li, L. C., ... & Ma, Y.Z. (2007). Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. *Plant molecular biology*, 65(6), 719-732.

- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 781-803.
- Yang, S. U., Kim, H., Kim, R. J., Kim, J., & Suh, M. C. (2020). AP2/DREB transcription factor RAP2. 4 activates cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis leaves under drought. *Frontiers in plant science*, 895.
- You, J., Zhang, Y., Liu, A., Li, D., Wang, X., Dossa, K., ... & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC plant biology*, *19*(1), 1-16.
- Zhang, J. Y., Broeckling, C. D., Blancaflor, E. B., Sledge, M. K., Sumner, L. W., & Wang, Z. Y. (2005). Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, *42*(5), 689-707.
- Zhang, X., Liu, X., Zhang, D., Tang, H., Sun, B., Li, C., ... & Li, Y. (2017). Genome-wide identification of gene expression in contrasting maize inbred lines under field drought conditions reveals the significance of transcription factors in drought tolerance. *PLoS One*, *12*(7), e0179477.
- Zhang, Y., Li, D., Zhou, R., Wang, X., Dossa, K., Wang, L., ... & You, J. (2019). Transcriptome and metabolome analyses of two contrasting sesame genotypes reveal the crucial biological pathways involved in rapid adaptive response to salt stress. *BMC plant biology*, *19*(1), 1-14.
- Zhou, Y., Zhou, W., Liu, H., Liu, P., & Li, Z. (2020). Genome-wide analysis of the soybean DREB gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to drought stress. *Plant Breeding*, *139*(6), 1158-1167.