

توالی‌یابی و شناسایی اجزای پروموتور ژن 26Sp7 و بررسی بیان آن در گندم تحت تنش خشکی

Sequencing and characterization of promoter components 26Sp7 gene and expression pattern in wheat under drought

فهیمة چرکزی^۱، سیده ساناز رمضانپور^{۱*}، حسن سلطانلو^۱

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکترا، دانشیار، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

Charkazi F¹, Ramezanpour S^{*1}, Soltanloo H¹

1- PhD Student, Associate Professor, Associate Professor, Department of Plant
Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of
Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramezanpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده در تولید محصولات کشاورزی می‌باشد که هر ساله خسارت‌های زیادی به گیاهان زراعی مخصوصاً گندم وارد می‌نماید. مقاومت به خشکی صفی پیچیده است که به‌صورت چندژنی کنترل می‌شود و گواهی بر پیچیدگی اصلاح این صفت زراعی مهم می‌باشد. تاکنون روش‌های زیادی برای اصلاح گیاهان به تنش خشکی به کار گرفته شده‌است. در این میان پرتوتابی رهیافت مناسبی برای بهبود سطح تنوع ژنتیکی در کوتاه مدت به نظر می‌رسد. مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که بیان اکثر ژن‌ها در شرایط متغیر محیطی مبتنی بر کنترل ترکیبی چند فاکتور رونویسی و اتصال آن‌ها به عناصر موجود در ناحیهی پروموتور است. لذا در مطالعه‌ی حاضر توالی‌یابی کامل یکی از ژن‌های دخیل در تخریب پروتئین‌ها (26sP7) برای اولین بار، با روش پیمایش ژنومی، بررسی توالی پروموتور ژن با استفاده از نرم‌افزارهای NEW PLACE و plant CARE و همچنین بررسی الگوی بیان ژن با روش QRT-PCR در گندم رقم طبسی (حساس به خشکی) و لاین موتانت آن T-65-58-8 (نیمه متحمل به خشکی) تیمار شده با اشعه گاما، طی تنش خشکی اعمال شده با PEG در سطح ۰/۵ مگاپاسکال در مرحله گیاهچه‌ای انجام شد. بیان ژن 26sP7 در لاین متحمل موتانت و رقم حساس طبسی طی تنش خشکی افزایش یافته است. در لاین موتانت در تیمار سه ساعت پس از اعمال تنش، به حداکثر میزان تظاهر رسیده‌است. در طبسی، با شروع تنش خشکی میزان بیان این ژن افزایش یافته، تا اینکه در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش به حداکثر میزان خود رسیده است. الگوی بیان رقم طبسی نشان‌دهنده افزایش بیان ژن در تمامی تیمارهای تنش می‌باشد که احتمالاً نشان‌دهنده تخریب پروتئین‌ها طی تمامی تیمارها و دلیل بر حساس بودن این رقم می‌باشد. بررسی توالی پروموتور این ژن حاکی از وجود درصد بالایی از عناصر تنظیم‌کننده همسوساز طی تنش خشکی و دهیدراسیون سلولی مانند عناصر پاسخ‌دهنده به کم‌آبی (DRE)، جایگاه اتصال پروتئین‌های MYB و MYC، عناصر پاسخ‌دهنده به اسیدآبسیزیک (ABRE) و پاسخ‌دهنده به نور (GT) و عناصر تنظیم‌کننده رونویسی ژن مانند جعبه‌ی TATA و جعبه‌ی CAAT بود. بنابراین، افزایش بیان این ژن طی تنش خشکی را می‌توان احتمالاً به جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی که طی تنش خشکی موجب بیان این ژن می‌شود، نسبت داد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
توالی‌یابی
خشکی
شناسایی پروموتور
گندم

خشکی یکی از مهم‌ترین پدیده‌ها می‌باشد که تولید و عملکرد گیاهان را محدود می‌نماید. گیاهان پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی مختلفی در مواجهه با خشکی بروز می‌نمایند (Nejadahmadi et al. 2013). غلات مهمترین منبع کالری برای جمعیت انسانی به شمار می‌روند (Ingram and Bartels; 1996). امروزه تولید زراعی غلات تحت تاثیر خشکی می‌باشد (Rizhsky et al. 2002; Chaves et al. 2003). مقاومت به خشکی صفی پیچیده می‌باشد که به صورت چندژنی کنترل می‌شود، بیان این ژن‌ها تحت تاثیر عوامل محیطی مختلفی می‌باشد. این امر نشان‌دهنده این است که اصلاح این صفت بسیار مشکل بوده و روش‌های جدید مولکولی مانند نشانگر مولکولی، استراتژی‌های نقشه‌یابی QTL و بررسی الگوی بیان این ژن‌ها برای تولید ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی مورد نیاز می‌باشد (Nejadahmadi et al. 2013). شناسایی پروموتورها و عوامل تنظیم‌کننده آن‌ها یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بیوانفورماتیک می‌باشد (Rombauts et al. 2003). در آراییدوپسیس و احتمالاً بیشتر گیاهان به صورت نمایی تعداد زیادی از پروتئین‌های متصل به دی‌ان‌ای رمزگذاری می‌شوند، که به طور بالقوه به صورت فاکتور رونویسی (Tfs)¹ فعال می‌باشند. در حقیقت بیش از ۳۰۰۰ ژن شناسایی شده‌است که در رونویسی درگیر می‌باشند، که انتظار می‌رود بیش از نیمی از آن‌ها فاکتورهای رونویسی را رمزگذاری نمایند. فاکتورهای رونویسی به عناصر تنظیم‌کننده همسوساز (CAREs)² موجود در دی‌ان‌ای متصل شده و شروع رونویسی را هماهنگ می‌نمایند که این قسمت یکی از مهم‌ترین نقاط کنترل‌کننده تنظیم بیان ژن می‌باشد. عناصر تنظیم‌کننده همسوساز موتیف‌های کوتاه حفاظت شده شامل ۵ تا ۲۰ نوکلئوتید می‌باشد که معمولاً در ناحیه ۵' ژن‌ها که پروموتور نامیده می‌شود، یافت می‌شود. پروموتور توالی می‌باشد که معمولاً در بالادست ناحیه شروع رونویسی (Tss)³ است (de Boer et al. 1999; Dorsett et al. 1999). پیمایش ژنومی روشی برای تعیین توالی نواحی DNA

ژنومی، نزدیک به نواحی شناخته شده DNA و روشی ایده‌آل برای شناسایی پروموتور نزدیک نواحی رمزکننده می‌باشد. پیمایش ژنوم کاربرد وسیع در به دست آوردن ژن‌های هومولوگ در گونه‌های جدید زمانی که ژن‌ها دارای نواحی حفاظت شده قوی هستند را دارد (Shapter and Waters 2014).

محتوای پروتئوم سلول در طول زمان تغییر می‌نماید، بنابراین علاوه بر نیاز به سنتز مداوم پروتئین‌های آن، تخریب پروتئین‌هایی که سلول به آن‌ها نیازی ندارد، نیز ضرورت دارد. در یوکاریوت‌ها اکثر شکست‌های پروتئینی، توسط یک سیستم واحد انجام می‌شود که یوبیکوئیتین و پروتئوزوم ۲۶s در آن نقش دارد (Fardesfahani and Allah yari 2011). پروتئوزوم ۲۶s بیان تعداد زیادی از پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی درگیر در مسیرهای علامت‌دهی و متابولیسم را کنترل می‌نماید. پروتئوزوم یک عامل ضروری برای کنترل کیفیت پروتئین‌ها می‌باشد، به طوری که پروتئین‌هایی را که دارای تاشدگی ناجور و دنا توره شده حاصل از خطا در ترجمه یا آسیب‌دیدگی پس از تولید می‌باشد را تخریب می‌نماید. این پروتئین‌ها ابتدا توسط چاپرون‌ها شناسایی، سپس توسط لیگازهای یوبیکوئیتین می‌شوند و در آخر توسط پروتئوزوم ۲۶s تخریب می‌شوند (Kurepa et al. 2009). پروتئوزوم ۲۶s از دو زیرواحد ساخته شده است. پروتئوزوم ۲۰s شبه استوانه، که به عنوان ستون تخریب پروتئین‌ها می‌باشد و اجزای تنظیم‌کننده (RPs)⁴ از دو زیرمجموعه، شامل پایه و کلاهک تشکیل شده است. به طوری که از هر دو طرف به انتهای استوانه‌ی ۲۰s متصل می‌شوند. اجزای تنظیم‌کننده، پروتئین‌های هدف یوبیکوئیتین شده را به استوانه ۲۰s برای تخریب هدایت می‌نمایند (Kurepa and Smalle 2008). جزء ۲۰s پروتئوزوم از چهارده زیرواحد مختلف ساخته شده‌است، پایه و کلاهک (RPها) از ۱۷ زیرواحد ساخته شده‌اند که هر کدام به وسیله اجزای دو خانواده ژنی رمزگذاری می‌شوند. به طوری که پایه مستقیماً روی ۲۰s قرار گرفته و دارای ۶ زیرواحد AAA-ATPase (RPTs) و سه زیرواحد non-ATPase (RPNs) است. زیرمجموعه‌ی کلاهک نیز دارای هشت زیرواحد (RPNs) است (Fu et al. 2001).

¹ Transcription factors (Tfs)² Cis acting regulatory elements³ Transcription start site⁴ Regulatory Particles

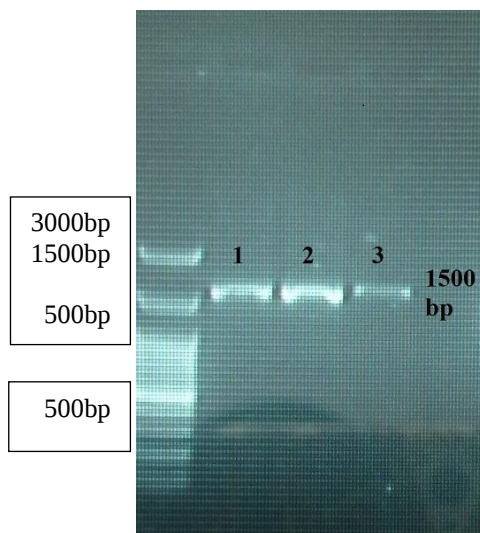
طبق مطالعات مختلف نقصان در کارکرد پروتئوزوم ۲۶s تحمل گیاه را به انواع تنش‌های محیطی تغییر می‌دهد. به‌عنوان مثال جهش در ژن‌های رمزکننده دو جزء rpn10 و rpn1 در آراییدوپسیس منجر به کاهش تحمل به تنش شوری شده است، همچنین گیاهان rpn10 نسبت به اشعه‌ی UV و عوامل تخریب کننده DNA واکنش فوق حساسیت از خود نشان دادند (Kurepa et al. 2008). بیان ژن در بافت‌ها و ارگان‌های مختلف، طی مراحل مختلف رشد و نمو، یا پس از تحریک عوامل بیرونی در سطح رونویسی، پس از رونویسی و یا پس از ترجمه تنظیم می‌شود. تنظیم در مرحله‌ی رونویسی نقش بسیار مهمی را در فعال نمودن و یا فرونشانی بیان بازی می‌نماید و به‌شدت تحت کنترل پروموتور و عوامل همسوساز مربوط به آن می‌باشد (Zou et al. 2011). از اهداف این تحقیق توالی‌یابی کامل ژن رمزکننده‌ی زیرواحد ۷ از زیرمجموعه‌ی کلاهی پروتئوزوم ۲۶s putative 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 در تخریب پروتئین‌ها (26Sp7) با روش پیمایش ژنومی، بررسی توالی پروموتور ژن مذکور با استفاده از نرم‌افزارهای NEW PLACE و plantCARE و همچنین بررسی الگوی بیان این ژن با استفاده از روش QRT-PCR در گندم رقم طبسی (حساس به خشکی) و لاین موتانت آن T-65-58-8 (نیمه متحمل به خشکی) تیمار شده با اشعه گاما به میزان ۲۵۰ گری (پژوهشگاه کشاورزی هسته‌ای کرج)، طی تنش خشکی اعمال شده با PEG در سطح ۰/۵ مگاپاسکال در مرحله گیاهچه‌ای بوده است.

مواد و روش‌ها

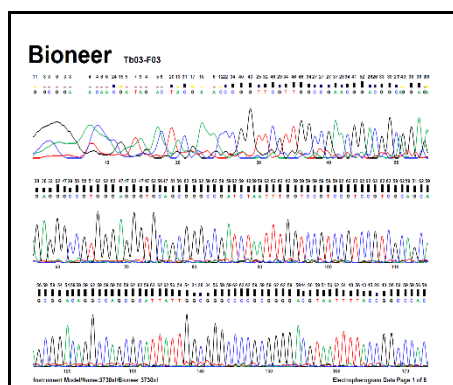
این تحقیق در آزمایشگاه گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. با توجه به دو مرحله‌ای بودن آزمایش، استخراج DNA و RNA کل انجام شد. بنابراین برای استخراج DNA، نمونه‌های بذور رقم حساس طبسی و متحمل موتانت T-65-58-8 (پژوهشگاه کشاورزی هسته‌ای کرج) در مرحله‌ی اول ضدعفونی شده و در گلدان کشت شدند، پس از گذشت ده روز از برگ‌های تازه از طریق روش CTAB، DNA ژنومی استخراج شدند، پس از استخراج،

کیفیت DNA ژنومی بر روی ژل آگارز یک درصد سنجیده شد. در این تحقیق از روش پیمایش ژنومی جهت ارزیابی توالی کامل ژن 26Sp7 استفاده شد. بدین منظور توالی رونوشت افتراقی TDF که نتیجه‌ی انجام تکنیک cDNA-AFLP (Vakili 2016) بر روی رقم طبسی و لاین جهش‌یافته‌ی آن بود استفاده شد. این توالی ۲۸۵ جفت‌بازی، دارای بیان افتراقی طی تنش خشکی در لاین جهش‌یافته نسبت به رقم حساس طبسی بود. در طی این تحقیق، مشخص شده بود که این توالی با ژن 26Sp7 با شماره ثبت شده‌ی EMS65641.1 که درگیر در تنش خشکی می‌باشد در گیاه *Triticum urata* ۹۹ درصد شباهت داشت. پس از بلاست نمودن توالی مورد نظر در پایگاه داده‌ی NCBI مشخص شد که این رونوشت با توالی گیاهان *Aegilops. Tauschii* با شماره‌ی دسترسی XM_020308985.1 و همچنین *Hurdeum.vulgare* با شماره‌ی دسترسی AK355684.1 هم‌پوشانی بالایی در موقعیت ژن 26Sp7 دارد. همچنین پس از همردیف نمودن توالی پروتئینی این ژن، در گیاهان مذکور مشخص شد که شباهت بسیار زیادی وجود دارد. سپس در ادامه‌ی کار، پس از تشخیص مکان اتصال این توالی به ژنوم *Triticum. aestivum* در پایگاه اطلاعاتی plant ensemble به‌کمک BLASTn، جایگاه اتصال این رونوشت روی کروموزوم 2DL در موقعیت ۲۳۶۲۶-۲۳۵۳۶ شناسایی شد. همچنین مشخص شد که این رونوشت در گندم نیز دقیقاً به توالی ژن 26Sp7 متصل می‌شود. بنابراین برای توالی‌یابی کامل این ژن و پروموتور آن موقعیت کامل این ژن در مکان ۲۴۲۳۶-۱۹۷۶۶، مشخص شد. سپس با استفاده از روش پیمایش ژنومی (Genome walking) و به‌صورت گام به گام انتهای ۵' و ۳' ژن توالی‌یابی شد. این عمل در اولین مرحله با طراحی آغازگر از جایی که TDF به توالی گندم متصل شده بود، به‌عنوان آغازگر برگشتی و ۱۵۰۰ نوکلئوتید بالاتر به طرف ۵' به‌عنوان آغازگر پیشرو انجام شد. سپس از آغازگرهای مورد نظر بر روی DNA گندم در هر دو رقم و لاین موتانت با کمک PCR استفاده شد و محصولات آن بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. در مرحله بعد باند مورد نظر از روی ژل آگارز به‌وسیله‌ی کیت خالص‌سازی شرکت Roche جداسازی شد و جهت تایید نهایی، محصول خالص‌سازی در هر مرحله بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند

(شکل ۱). سپس این محصولات در مرحله‌ی نهایی برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست (بایونیر کره‌ی جنوبی) ارسال شد (شکل ۲)، توالی‌یابی از دو جهت با استفاده از آغازگر پیشرو و پسرو انجام شد (جدول ۱). نتایج توالی‌یابی در پایگاه داده‌ای plant ensemble بررسی و تایید شدند (شکل ۲). جهت توالی‌یابی کامل این ژن و شناسایی ناحیه پروموتور آن، با توجه به موقعیت اولیه‌ی TDF در روی ژنوم گندم نان، یک مرحله توالی‌یابی به سمت ۳' و ۴' مرحله به سمت ۵' انجام شد. پس از طی این مراحل، جهت سرهم نمودن contig‌های حاصل از توالی‌یابی و درست نمودن توالی کامل این ژن از نرم‌افزار انالاین CAP3 استفاده شد. آنالیز توالی پروموتور ژن 26Sp7 با استفاده از پایگاه داده‌ای New PLACE (<https://dna.affrc.go.jp>) و plant CARE انجام شد.



شکل ۱- نمونه تکثیر باندها پس از استخراج با کیت خالص‌سازی (*) چاهک شماره ۲۱ باند مربوط به رقم طوسی و چاهک شماره ۳ باند مربوط به لاین موتانت در مرحله چهارم توالی‌یابی

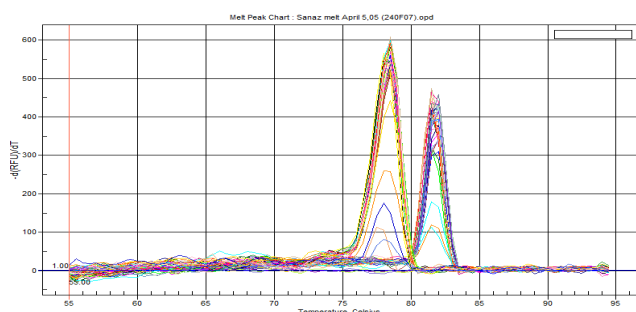


شکل ۲- نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

جدول ۱- مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در پیمایش ژنومی

موقعیت مورد تکثیر	توالی آغازگر	طول باند (bp)	دمای اتصال (°C)
۲۳۲۸۰-۲۴۳۸۰	F 5'GTCGCCATCAGTTTACCAGAAC3' R 5'CAGCCATCTCTAAGGTGTTTCC3'	۹۳۱	۶۰
۲۳۶۸۰-۲۲۵۰۰	F 5'TCTGTTGCCCATGAAC3' R 5'CCAAAGACGGAAGGATTGG3'	۱۱۵۰	۵۶
۲۲۶۲۵-۲۱۱۷۵	F 5'CCTCTCCCTCCATCAGTAAAC3' R 5'CTTCCGGAGACTACAGCAAT3'	۱۴۵۱	۵۷
۲۱۲۷۵-۱۹۷۷۵	F 5'AGCAGAGGAGCAGCAGACA3' R 5'GTTTACTGATGGAGGGAGAGGA3'	۱۴۲۵	۵۹
۱۹۹۰۰-۱۸۴۰۰	F 5'GTGAATCAGTGTGCTCTTGC3' R 5'GCGTTCGTTTGTGCTTTGCT3'	۱۴۱۴	۵۹

۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه تنظیم شد. تمامی نمونه‌ها در ۳ تکرار تکنیکی و ۳ تکرار بیولوژیکی تکثیر شدند و مقادیر میانگین مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار پرایمر^۲ از ناحیه ترجمه نشده ۳' انجام شد. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی در جدول (۲) نشان داده شده است. غلظت آغازگرها و دمای مرحله اتصال از فاکتورهای اساسی در بهینه نمودن واکنش QRT-PCR می‌باشد. از آنجایی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در این روش از اهمیت بالایی برخوردار است، به‌همین منظور در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آن‌ها اطمینان حاصل نمود (مشاهده یک پیک ذوب منفرد برای هر تیمار مربوط به هر ژن) (شکل ۳). سطح نسبی بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با ژن کنترل مرجع، با استفاده از نرم‌افزار GenEx مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارهای مربوط در محیط Excel رسم شد.



شکل ۳- منحنی ذوب آغازگر اختصاصی و آغازگر ژن مرجع

برای انجام مرحله دوم تحقیق و بررسی بیان این ژن، تعداد ده بذری از دو رقم حساس و متحمل به خشکی، پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و آبکشی با آب مقطر در پتری دیش‌های ۹ سانتی کشت داده شدند و در اتاقک رشد (دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، دوره ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بیولوژیکی قرار داده شدند. به منظور حفظ رطوبت روی پتری‌دیش‌ها با پارافیلیم پوشانده شد، پس از رسیدن ارتفاع گیاهچه‌ها به سطح پارافیلیم، در محل خروج گیاهچه منفذ کوچکی ایجاد شد. پس از رسیدن به مرحله دو برگگی هر پتری‌دیش با ۶ میلی‌لیتر محلول PEG^۱ در سطح پتانسیل اسمزی ۰/۵- مگاپاسکال تیمار شد (1983 and Kaufman Michel). پس از شروع تنش، در زمان‌های ۰، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از برگ‌های تحت تنش نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

از بافر p-BIOZOL (Bioflux، ژاپن) جهت استخراج RNA کل از نمونه‌ها استفاده شد. سپس، به‌منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از آنزیم *DNase1* (Fermantas) استفاده شد. ساخت cDNA نیز بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمتاز انجام شد. در پایان، کمیت و کیفیت RNA کل به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز سنجیده شد. جهت انجام واکنش‌های کمی از غلظت ۱:۲۰ هر نمونه cDNA و همچنین از دستگاه iQ5 شرکت BioRad استفاده شد. به‌منظور ارزیابی کمی، محلول واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر در تیوب‌های مخصوص تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با چرخه‌های حرارتی شامل

^۱ Poly Ethylene Glycol

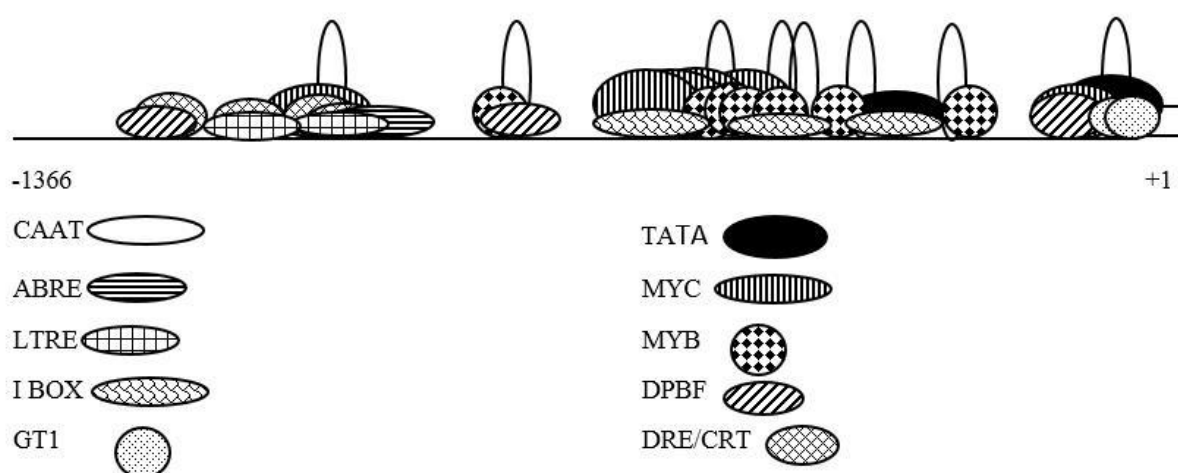
جدول ۲- مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش QRT-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	شماره دسترسی	طول محصول (bp)	دمای اتصال (°C)
26Sp	5'ACGAGGTCAACGACAAAACC3' 5'CCTGACGGCTCTACCAAAGT3'R		190	57
GAPD H	5'TCACCACCGACTACATGAC C3'f 5'ACAGCAACCTCCTTCTCACC 3'r	EF592180	121	60

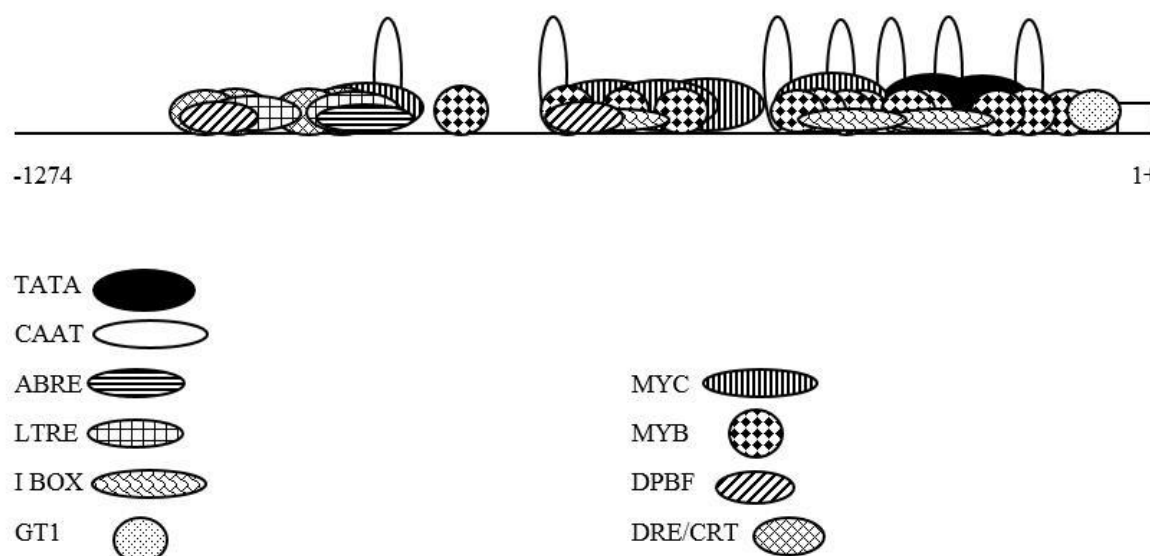
نتایج و بحث

پیمایش ژنوم دارای پتانسیل شناسایی ۶ تا ۷ کیلوباز توالی فقط در یک دوره می‌باشد. پیمایش ژنوم کاربرد وسیع در به‌دست آوردن توالی ژن‌های هومولوگ در گونه‌های جدید زمانی‌که ژن‌ها دارای نواحی حفاظت شده قوی هستند را دارد (Shapter and Waters 2014). در بیست سال گذشته تکنیک پیمایش ژنوم با اضافه شدن روش‌هایی مانند تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS)^۱ به استراتژی‌های اساسی اولیه توسعه یافت، که دارای پتانسیل بالا در بدست آوردن توالی نوکلئوتید می‌باشد. این تکنیک یک روش مولکولی برای شناسایی مستقیم توالی نوکلئوتیدی در ژنوم‌های خالص شده می‌باشد که فقط به یک توالی نوکلئوتیدی شناخته شده برای شروع نیازمند است (Leoni et al. 2010; Volpicella 2012; Wang et al. 2013). در توالی ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش برخی عوامل غیرهمسوساز^۲ شناخته شده‌اند که با ایجاد پیوند با عناصر همسوساز^۳ ناحیه راه‌انداز ژن مقاومت، باعث القای رونویسی از این ژن‌ها به هنگام تنش می‌شوند (Gamboa et al. 2007). طی این تحقیق، مشخص شد که اندازه‌ی کامل ژن 26Sp7

۴۴۷۰ جفت‌باز دارای ۹ ایترون و ۱۰ اگزون است و پروتیین رمز شده توسط این ژن دارای ۳۱۰ آمینو اسید می‌باشد. پس از بررسی‌های لازم و ترجمه‌ی توالی با کمک نرم‌افزار آنالین EXPASY، کدون آغازین که همان کدون مربوط به باز متیونین (ATG) می‌باشد مشخص شد، و ۱۳۶۶ باز ترجمه نشده‌ی بالادست به‌عنوان توالی کامل پروموتور در رقم طبسی و ۱۲۴۷ باز در لاین موتانت توالی‌یابی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ترکیب بازی این پروموتور در رقم طبسی شامل ۵۰/۴۳ درصد بازهای گوانین-سیتوزین و ۴۹/۵۶ درصد بازهای آدنین-تیمین می‌باشد. در پروموتور این ژن جعبه TATA در موقعیت ۸۳- با توالی حفاظت شده TATA و اولین جعبه‌ی CAAT در موقعیت ۵۱- قرار گرفته است. در طول پروموتور این ژن در رقم طبسی ۶ توالی MYC، ۷ توالی MYB، ۸ جعبه‌ی CAAT، ۲ جعبه‌ی TATA، ۳ توالی DPBF، ۲ توالی GT1، ۴ توالی DRE/CRT، یک توالی ABRE^۵ و ۲ توالی LTRE^۶ ۳ توالی I BOX مشاهده شد (شکل ۴).

^۴ Dehydration responsive element^۵ ABA responsive element^۶ Low temperature responsive element^۱ Next generation sequencing^۲ Trans acting.^۳ Cis acting

شکل ۴- جایگاه عناصر پروموتور ژن 26Sp7 در رقم طبسی



شکل ۵- جایگاه عناصر پروموتور ژن 26Sp7 در لاین موتانت

در لاین موتانت درصد بازهای گوانین و سیتوزین در طول این پروموتور ۵۱/۴۰ درصد و برای بازهای آدنین و تیمین ۴۸/۵۹ درصد می‌باشد. همچنین ۵ توالی MYB، ۸ توالی MYC، ۷ جعبه‌ی CAAT، ۲ جعبه‌ی TATA، یک توالی GT1، ۳ توالی IBOX، ۴ توالی DRE/CRT، ۲ توالی DPBF، ۱ توالی ABRE و ۲ توالی LTRE مشاهده شد. جعبه TATA در موقعیت ۲۳۴- و اولین جعبه‌ی CAAT در موقعیت ۱۶۱- قرار گرفته است (شکل ۵).

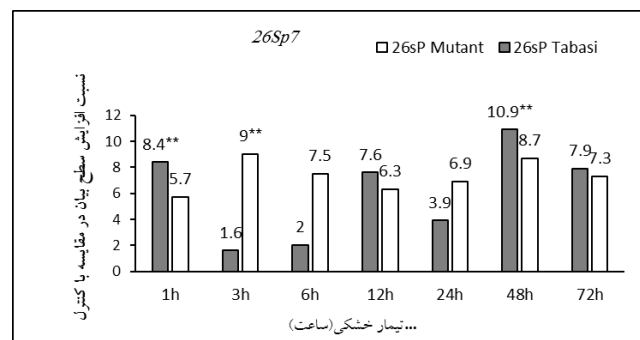
با توجه به بررسی‌های انجام شده مشخص شد که قسمت اعظم عناصر موجود در پروموتور مسئول پاسخ به تنش‌ها مانند خشکی و اسید ابسیزیک هستند. به نظر می‌رسد نیمه‌ی اول پروموتور در کنترل تظاهر ژن در شرایط تنش خشکی دخیل می‌باشد زیرا در حدود ۵۸ درصد عناصر مسئول پاسخ به تنش خشکی در این ناحیه قرار گرفته‌اند و منطقه‌ی ابتدایی پروموتور شامل جعبه‌های TATA و CAAT به‌عنوان عناصر راه‌انداز در شروع نسخه‌برداری عمل می‌نماید (شکل ۴ و ۵)، بنابراین احتمال می‌رود با حذف این ناحیه از پروموتور، بیان ژن گزارش‌گر در شرایط تنش خشکی ناموفق باشد. همان‌طور که گفتیم بخش اعظم عناصر موجود روی پروموتور ژن مورد بررسی را عناصر پاسخ‌دهنده به تنش خشکی تشکیل می‌دهد که این خود می‌تواند شهادتی بر حضور این ژن در شبکه‌های ژنی تنظیم‌کننده‌ی پاسخ به تنش خشکی باشد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ناحیه پروموتور این ژن نشان می‌دهد که عناصر اصلی توالی پروموتور ژن‌های یوکاریوتی CAAT-box و TATA-box دارای بالاترین تعداد در توالی پروموتور این ژن در هر دو رقم می‌باشد، به‌طوری‌که TATA-box به‌عنوان عناصر همسوساز در نواحی هسته‌ی پروموتور و CAAT-box به‌عنوان عناصر تنظیم‌کننده فعالیت دارند. توالی ABRE در پروموتور ژن‌های تنظیم‌کننده مقاومت به خشکی که در بیان مقاومت به تنش‌هایی که توسط خانواده‌های چندژنی صورت می‌گیرد، درگیر هستند (Eva et al. 2007). از سویی دیگر دو مسیر علامت‌دهی طی تنش خشکی مسیر وابسته به اسیدآبسیزیک و مستقل از اسیدآبسیزیک وجود دارد که در مسیر وابسته، تولید فاکتورهای رونویسی از نوع MYC و MYB و اتصال آن‌ها به پروموتور ژن‌ها طی تنش خشکی باعث بیان ژن‌ها می‌شود (Kiziz et al. 2001). I BOX و GT1 از عناصر تنظیم‌کننده در راه‌انداز برخی از ژن‌های گیاهی می‌باشد که نقش مهمی در دریافت سیگنال‌های نوری و در طی آن تنظیم بیان ژن‌های وابسته به نور دارد (Lindlof et al. 2009).

باتوجه به آنالیز هستی‌شناسی^۱ ۴۹۰ ژن دخیل در تحمل به تنش خشکی در برنج مشاهده شد که در ۸۵ درصد از پروموتورها دارای جایگاه اتصال MYB، MYC و GT بودند. اعضای خانواده‌های

¹ Gene ontology analysis (GO)

است که از یک یا دو انتها توسط یک جزء تنظیم‌کننده RP پوشیده شده است. دسترسی به جایگاه فعال کمپلکس ۲۰s توسط RP تنظیم می‌شود، به‌طوری‌که به کارگیری سوپسترا، بازکردن پیچش، انتقال به محفظه پروتئولیتیک ۲۰s و بازیافت مولکول‌های یوبیکوئیتین را وساطت می‌نماید (Navon and Goldberg 2001; Weinl and Kudla 2009).



شکل ۶- مقایسه بیان ژن 26Sp7 در لاین متحمل موتانت و رقم حساس طبسی
(*) h: تعداد ساعت پس از شروع تنش خشکی

بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان ژن 26Sp7 در هر دو رقم و لاین موتانت از اولین ساعات واکنش به خشکی افزایش معنی‌داری نشان داد. در لاین متحمل موتانت بیشترین فعالیت در سه ساعت پس از شروع تنش دیده شد که افزایش معنی‌داری نسبت به اولین ساعت نشان می‌دهد. پس از آن تظاهر ژن کاهش معنی‌داری نشان داده است و تا پایان دوره‌ی تنش خشکی در سطح ثابتی حفظ شده است (شکل ۶). در رقم حساس طبسی نیز بیشترین سطح بیان ژن در اولین ساعت پس از اعمال تنش دیده شده است و پس از آن کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل دیده شده است تا اینکه در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش افزایش تظاهر ژن در مقایسه با تیمار کنترل به بالاترین سطح خود رسیده است که این امر در رقم حساس می‌تواند دلیلی بر واکنش حساسیت به تنش خشکی باشد. جهش در زیرواحدهای RP کارکرد پروتئوزوم ۲۶s را تحت تاثیر قرار می‌دهد بدین صورت که می‌تواند تجمع کمپلکس را کاهش دهد، از میزان پروتئولیز وابسته به یوبیکوئیتین بکاهد و همچنین پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزنده را تغییر دهد (Kurepa and Smalle 2008). تجزیه‌های مقایسه‌ای گیاهان موتانت که دارای پروتئوزوم ۲۶s آسیب دیده می‌باشند، نشان

MYC و MYB در فعال شدن مسیر وابسته به ABA نقش مهمی دارند و بسیاری از پروتئین‌های فعال در این مسیر به‌وسیله‌ی اعضای این خانواده از عوامل رونویسی تنظیم می‌شود (Yang et al. 2012; Liu et al. 2014).

طی تحقیق (Ramezanzpour 2010) بیان ژن، *SUT4* از گروه ژن‌های انتقال‌دهنده‌ی کربوهیدرات‌ها و آنالیز توالی پروموتور ژن مذکور در گندم طی تنش سرما، این ژن از گروه ژن‌های فاقد جعبه‌ی CAAT^۱ و TATA بود که توالی‌های دیگری به‌عنوان عوامل شروع رونویسی عمل می‌نمودند. به‌طوری‌که فقدان جعبه‌ی TATA در بسیاری از ژن‌های گیاهی دخیل در فتوسنتز و بسیاری از ژن‌های خانه‌دار گزارش شده است (Chay et al. 1992). طی این تحقیق مشخص شد که ۵۲ درصد از عناصر موجود در پروموتور مسئول درجه حرارت پایین LTRE و ۲۹ درصد عناصر مسئول دفاع گیاهی و ۱۹ درصد عناصر مسئول تجمع کربوهیدرات‌ها هستند و در نهایت با وجود این عناصر مشخص شد که این ژن دارای نقش دوگانه هم در کنترل تنش سرما و بیماری کپک برفی می‌باشد. جداسازی پروموتور مختص بذر ژن β-کانگلاپسینین در گیاه سویا و همسانه‌سازی و تعیین توالی پروموتور آن، نواحی حفاظت‌شده‌ی مهم در این پروموتور از قبیل جعبه‌ی TATA و جعبه‌ی CAAT و جعبه‌ی G و عناصر تکراری و مختص بذر SKn1 و RY را شناسایی شد. این مشاهدات نشان داد که حضور چند نسخه از موتیف‌های مختص بذر در پروموتور ژن β-کانگلاپسینین ممکن است مسئول عمل اختصاصی آن در آندوسپرم بذر باشد (Sabari et al. 2016).

محتوای پروتئوم سلول در طول زمان تغییر می‌نماید، بنابراین علاوه بر نیاز به سنتز مداوم پروتئین‌های آن، تخریب پروتئین‌هایی که سلول به آن‌ها نیازی ندارد نیز ضرورت دارد. پروتئوزوم، پروتئین‌هایی را که دارای تاشدگی ناجور حاصل از خطا در ترجمه یا آسیب‌دیدگی پس از تولید می‌باشد را تخریب می‌نماید (Jiang et al. 2001; Zhang et al. 2014). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند که فعالیت ۲۶s کنترل نمو گیاه و پاسخ به تنش را تنظیم می‌نمایند (Kurepa et al. 2009). پروتئوزوم ۲۶s یک ترکیب پروتئازی وابسته به ATP شامل یک کمپلکس پروتئولایتیکی ۲۰s

^۱ TATAless

می‌دهد که کاهش در تولید این پروتئوزوم منجر به فوق‌حساسیت به شوک گرمایی و کاهش در سرعت تقسیم سلولی می‌شود، بنابراین برای حفظ مقاومت به تنش‌ها سطح بهینه این پروتئوزوم مورد نیاز است (Kurepa et al. 2009). تظاهر ژن در لاین موتانت در همان ساعات اولیه به تنش و نشان دادن درجه‌ای از تحمل در تنش‌های بالاتر در برابر تخریب پروتئین و کاهش بیان این ژن می‌باشد. از سویی دیگر در رقم حساس طبسی علاوه بر ساعات اولیه شروع تنش در انتهای طول دوره‌ی تنش نیز افزایش بیان را داریم، این امر می‌تواند احتمالاً دلیلی بر تخریب پروتئین‌ها در این تیمارهای تنش و همچنین می‌تواند مؤید حساس بودن این رقم نیز باشد. به‌طور کلی در لاین موتانت افزایش بیان در اوایل تنش خشکی بوده است، اما در رقم طبسی در اواخر اعمال تنش به بیشترین میزان تظاهر نسبت به تیمار کنترل رسیده است. vakili (2016) طی بررسی بیان ژن 26Sp7 در گیاهان بالغ گندم موتانت، افزایش تجمع رونوشت‌های این ژن را طی تیمارهای اولیه تنش خشکی نشان دادند، که با نتایج حاصل از این تحقیق همپوشانی دارد. لازم به ذکر است که با توجه به اهمیت بررسی سیستم تخریب پروتئین‌ها طی تنش‌ها، شناسایی ژن‌های دخیل در این سیستم‌ها، بررسی عملکرد و نحوه بیان آن‌ها می‌تواند در ایجاد گیاهانی مقاوم‌تر در برابر تنش‌ها کمک شایانی نماید. با توجه به موارد پیش گفته شده، MYB، MYC و DRE از اجزای عوامل رونویسی می‌باشند که در تنظیم پاسخ‌های مناسب در ارتباط با تنش خشکی نقش حیاتی دارند. از سویی دیگر با توجه به افزایش بیان این ژن طی تیمارهای تنش خشکی می‌توان اذعان نمود که با وجود عوامل همسوساز مذکور، در ناحیه‌ی پروموتور، موجب رونویسی و بیان این ژن شده است. عوامل تنظیمی همسوساز، کلیدهای مولکولی^۱ مهمی می‌باشند که در تنظیم رونویسی از شبکه‌های پویای ژنی و کنترل فعالیت آن‌ها طی فرایندهای بیولوژیکی مختلف و پاسخ به تنش‌های غیرزنده، هورمون‌ها و فرایندهای رشدی مختلف درگیر هستند. مخصوصاً، درک شبکه‌های ژنی تنظیم‌کننده، در آبشارهای^۲ پاسخ به تنش، به تجزیه‌های عملکردی موفق عوامل همسوساز وابسته است. هر

¹ Molecular switches² Cascads

پیشرفت دقیقی در بیان رونویسی منجر به شناسایی ترکیبات مختلف عوامل همسوساز در نواحی پروموتور ژن‌های القا شونده با تنش می‌شود (Shinozaki et al. 2003). بیان پروتئین‌ها، وابسته به القای رونویسی از ژن می‌باشد، بنابراین شناسایی عوامل تنظیم‌کننده، مناطق تنظیم‌کننده و پروموتورها بسیار مهم می‌باشد. شناسایی پروموتورهای گیاهی اغلب شامل شناسایی و مشخصه‌یابی ژن‌های بیان شده در بافت‌های خاص یا تحت شرایط تنش فیزیولوژیکی انجام می‌شود. برای توصیف کارکردی بیان ژن، خالص‌سازی و تجزیه ساختمانی منطقه‌ی بالادست ژن مورد نیاز است پس از خالص‌سازی ناحیه‌ی پروموتور، مناطق فعال‌کننده یا بازدارنده بیان ژن با حذف مناطق پروموتور قابل شناسایی می‌باشند (Cai et al. 2007). در مهندسی ژنتیک پس از اینکه پروموتور از لحاظ ساختمانی شناسایی شد، مناطقی که مورد نظر برای الحاق به ژن هدف می‌باشند را شناسایی نموده تا بعداً برای ترانسفورماسیون گیاه استفاده نمایند (Porto et al. 2014). با این وجود، آنالیز توالی‌های همسوساز موجود در پروموتور ژن‌ها ساده و آسان نمی‌باشد و بررسی‌های بیشتری با استفاده از چندین پایگاه داده‌ای قوی و وصول نتایج با ارزش و تایید نتایج توالی‌یابی با استفاده از ژن‌های گزارشگر مورد نیاز می‌باشد که برای این منظور می‌بایست توالی پروموتورها توسط آنزیم‌های مختلف در فواصل متعددی هضم شده، سپس قطعات حاصل به ژن گزارشگر (GUS) متصل شده و بیان ژن گزارشگر مورد بررسی قرار گیرد. تنها در این صورت است که با اطمینان بالایی می‌توان در مورد این عناصر اظهار نظر نمود. از اینرو با توجه به کاربرد بیولوژی مولکولی در تکنیک‌های بیوتکنولوژی پیشرفته، اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک یک ابزار بسیار مهمی در پیدایش گیاهان تغییر یافته ژنتیکی در دهه‌های اخیر شده است. چندین شرکت در دنیا بر روی ترنس جنسیس تحقیق می‌نمایند، تکنیکی که مشکلات خاص کشاورزی را که با کاربرد متدهای اصلاح سنتی قابل حل نیستند را شناسایی می‌نماید. با توجه به تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود که، در دسترس بودن توالی کامل ژنوم در بانک‌های ژنی باعث پیشرفت فعالیت و تنظیم ژن‌های مختلف در سطح مولکولی شده است. با این وجود، کاربرد این ژن‌ها در ترنس جنسیس نیاز به دانسته‌های قبلی از مکان و سطوح بیان،

زیادی به تولید غذا برای حفظ امنیت غذایی، معقولانه‌تر خواهد بود. در نتیجه هرگونه تحقیق در زمینه‌ی افزایش محصول و مقاومت غلات به تنش‌های محیطی مخصوصاً خشکی که بتواند در زمان کوتاهی نتیجه‌ی مفیدی داشته باشد و به حفظ امنیت جهانی غذا کمک نماید، مورد توجه خواهد بود.

اندازه‌ی ژن، اندازه‌ی پروموتور و عناصر همسوساز و تنظیم‌کننده‌ی ژن دارد. نظر به اینکه، گندم از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین غله در دنیا محسوب می‌شود. باتوجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ نیاز به افزایش تولید گندم به بیش از ۵۰ درصد هم‌اکنون برسد. محققان پیشنهاد می‌نمایند که افزایش عملکرد محصولات نسبت به اختصاص دادن زمین‌های

منابع

- Cai M, Wei J, Li X, Xu C, Wang S (2007) A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* 5:664-674.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chay ML, Tan CT, Chua NH (1992) Three genes encode 3-hydroxi-3 methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Molecular Biology* 19:473-484.
- De Boer GJ, Testerink C, Pielage G, Nijkamp HJ, Stuitje AR (1999) Sequences surrounding the transcription initiation site of the Arabidopsis enoyl-acyl carrier protein reductase gene control seed expression in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 39: 1197-1207.
- Dorsett D (1999) Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Current Opinion Genetics Development* 9:505-514.
- Eva M, Kalembe A, Stanisawa P (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection. *Biological leet* 44:3-16.
- Fardesfahani P, Allah yari M (2011) Genome 3. Pasture institute press, Tehran, Iran. (In farsi).
- Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD (2001) Subunit intraction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO Journal* 20:7096-7107.
- Gamboa M, Resmusen-Poblet S, Valenzuela P, Krauskopf E (2007) Isolation and characterization cDNA encoding a CBF transcription factor from *E.globulus*. *Plant physiology and biochemistry* 45:1-5.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification Of Hsc70 as a target for ubiquitilation. *Journal of Biology Chemistry* 276: 38-44.
- Kizis D, Lumbreras V, Pages M (2001) Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters* 498:187-189.
- Kurepa J, Smalle, J (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90:324-335.
- Kurepa J, Toh-E A, Smalle JA (2008) 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *The Plant Journal* 53:102-114.
- Kurepa J, Wang S, Li Y, Smalle J (2009) Proteasome regulation, plant growth and stress Tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 4:924-927.
- Leoni C, Volpicella M, Placido A, Gallerani R, Ceci LR (2010) Application of a genome walking method for the study of the spinach Lhcb1 multigene family. *Journal of Plant Physiology* 167:138-143.
- Lindlof A, Brautigam M, Chawade A, Olsson O, Olsson B (2009) Insilico analysis of promoter regions from cold-induced genes in rice (*Oryza sativa L.*) and Arabidopsis thaliana reveals the importance of combinatorial control. *Bioinformatics* 25:1345-1348.
- Liu C, Mao B, Ou S, Wang, W, Liu L, Wu Y (2014) OsZIP71, a Bzip transcription factor, confers salinity and dr deought tolerance in rice. *Plant molecular biology* 84:19-36.
- Michel BE, Kaufman MR (1983) The osmotic pressure of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol* 51:914-916.
- Mohammadi SM, Shobbar ZS (2016) In silico analysis of the promoter of drought involved genes. 14th Iranian genetics congress. Iran, Shahid Beheshti University, 1-6. (In Farsi).
- Navon A, Goldberg AL (2001) Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Molecular Cell* 8:1339-1384.
- Nezhadahmadi A, Prodhan ZH, Faruq G (2013) Drought Tolerance in Wheat. *The Scientific World Journal* 130:1143-1151.
- Porto MS, Pinheiro Nobrega MP, Lyra Batista VG, Cavalcanti dos Santos R, Melo Filho PA, Maria de Lima, L (2014) Plant Promoters: An Approach of Structure and Function. *Molecular Biotechnology* 56:38-49
- Ramezanpour SS, Quantitative patterns of gene expression in wheat under cold stress. (2008) Dissertation, University of Tehran, Iran.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant physiology* 130:1143-1151.

- Rombauts S, Florquin K, Lescot M, Marchal K, Rouze P, Van de Peer Y (2003) Computational Approaches to Identify Promoters and Cis-Regulatory Elements in Plant Genomes. *Plant Physiology* 132:1162-1176.
- Saboori Robat E, Habashi AA, Solouki M, Mohsenpour M, Emamjomeh, A (2016) Identification, isolation and sequence analysis of a β -conglycinin seed specific promoter. *Genetic novin journal*. 2:187-196.
- Shapter FM, Waters DL (2014) Genome walking. *Methods in Molecular Biology* 1099:133-146.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki, M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Plant Biology* 6:410-417.
- Vakili Sh (2016) Study on transcriptome changes resulted from gama radiation to increase drought tolerance in wheat. Dissertation, University of Gorgan, Iran.
- Volpicella M, Leoni C, Costanza A, Fanizza I, Placido AR. Ceci L (2012) Genome walking by next generation sequencing approaches. *Biology* 1:495-507.
- Wang H, Yao T, Cai M, Xiao X, Ding X, Xia L (2013) A genome walking strategy for the identification of nucleotide sequences adjacent to known regions. *Biotechnology Letters* 35:279-284.
- Weinl S, Kudla J (2009) The CBL-CIPK Ca^{2+} decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist Foundation* 184:517-528.
- Yang A, Dai X, Zhang WH (2012) A R2R3-Type MYB gene, osMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Jornal of Experimental botany* 63:2541-56.
- Zhang H, Yang B, Liu W, Hongwei L, Wang L, Wang B, Deng M, Liang W, Deyholos M, Yuan-Qing JiangYQ (2014) Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus L.*). *BMC Plant Biology* 14:1-24.
- Zou C, Sun K, Mackaluso JD, Seddon AE, Jin R, Thomashow MF, Shiu SH (2011) Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:14992-14997.