

شناسایی و گروه بندی خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو

Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley

بنیامین یزدانی^۱، رسول اصغری زکریا^۲، زهرا سادات شوبر^{۳*}
Beniamin Yazdani¹, Rasoul Asghari-Zakaria², Zahra-Sadat Shobbar³

۱- دانشجوی دکتری و ۲- دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1. Ph.D. Student and 2. Associate Professor, Department of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shobbar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۰)

چکیده

تنش‌های زیستی و غیرزیستی از مهمترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی مانند جو هستند. عوامل رونویسی در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به این تنش‌ها دخالت دارند که خانواده ژنی WRKY رمز کننده گروه بزرگی از آنهاست. بنابراین شناسایی و مطالعه این خانواده ژنی می‌تواند گامی موثر برای ایجاد تحمل به تنش‌ها در گیاهان باشد. در پژوهش حاضر، دانستنی‌های مربوط به اعضای خانواده WRKY جو از پایگاه‌های داده جمع آوری شدند. با انتخاب یک عضو از هر زیر گروه ژن‌های WRKY در برنج، tBLASTN در پایگاه داده‌های IBSC و NCBI انجام شد تا اعضای احتمالی دیگر این خانواده نیز اضافه شدند. بر اساس مدل مخفی مارکوف، جستجو برای توالی‌های دارای منطقه حفاظت شده WRKY علیه همه پروتئین‌های این خانواده و هر زیر گروه آنها انجام شد. اعضای پیدا شده که شامل ۹۶ عضو و یک توالی از هر زیر گروه عوامل رونویسی WRKY از گیاهان آراییدوپسیس، برنج و گندم بودند، به صورت چندگانه همردیف شده و درخت فیلوژنتیک آنها رسم شد. توالی‌های موجود بر مبنای تعداد پهنه‌های WRKY و ساختار انگشت روی موجود در سه گروه دسته‌بندی شدند. بر این اساس ۱۳ پروتئین در گروه I، ۳۰ پروتئین با ساختار انگشت روی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و بقیه پروتئین‌ها با ساختار انگشت روی Cx₄₋₅Cx₂₂₋₂₃HxH در گروه II قرار گرفتند. با توجه به نقش گروه III در تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، فزونی درصد حضور اعضای این گروه در جو همانند گندم نسبت به میانگین گیاهان عالی را می‌توان با مضاعف شدگی در اجداد وحشی تک لپه‌ای‌ها و انتخاب طبیعی برای ارقام مقاوم‌تر در شرایط نامساعد محیطی در ارتباط دانست.

واژه‌های کلیدی

جو
خانواده ژنی WRKY
درخت فیلوژنتیک
عوامل رونویسی
مدل مخفی مارکوف

مقدمه

تنش‌های زیستی و غیرزیستی از مهمترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شوند (Zhang *et al.* 2010). بسیاری از پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در نتیجه تنظیم بیان ژن‌ها در رونویسی توسط عوامل رونویسی هستند (Eulgem, 2005).

غلات مهمترین منبع تامین کننده غذای بشر هستند (Garcia, 2003). جو (*Hordeum vulgare* L.) از اولین گیاهانی است که اهلی گشته و یکی از مهمترین گیاهان زراعی است. جو دیپلوئید بوده و اندازه ژنوم هاپلوئید آن ۵/۱ گیگاباز (Gb) است رقم‌های تجاری جو مشتق شده از جد وحشی (*Hordeum vulgare* spp. *Spontaneum*) آنها بوده (Purugganan and Fuller, 2009) و بر اساس آمار فائو (جدول ۱) ۷۵ درصد تولید جهانی آن برای تغذیه دام، ۲۰ درصد در صنایع تولید نوشیدنی و ۵ درصد در تولید طیف وسیعی از غذاها استفاده می‌شود (Blake *et al.* 2011). در کشورهای فقیرتر همچنان از جو به عنوان منبع غذایی اصلی استفاده می‌شود و عملکرد مناسب آن در شرایط سخت محیطی مورد توجه است (Grando and Macpherson, 2005). جو به عنوان گیاهی خودگشن و معتدل، همیشه گیاهی مدل برای پژوهش‌های ژنتیکی بوده است (Bockelman and Valkoun, 2011).

عوامل رونویسی پروتئین‌هایی هستند که به‌طور اختصاصی به فعال کننده‌های اطراف ژن یا نواحی پیشبر متصل شده (Latchman, 1997) و بسته به نوع آن بعد از اتصال عامل رونویسی بیان ژن کم یا زیاد می‌شود (Babu *et al.* 2004). عوامل رونویسی با مهار یا تحریک فعالیت پلیماز موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند. تعداد عوامل رونویسی در هر موجود زنده بستگی به اندازه ژنوم آن دارد، هر چه اندازه ژنوم بزرگتر باشد، تعداد عوامل رونویسی بیشتری وجود دارد (Nimwegen, 2006).

خانواده عوامل رونویسی WRKY - نام این خانواده از چهار اسید آمینه حفاظت شده آن (-tryptophan-arginine lysine-tyrosine) گرفته شده است - از بزرگ‌ترین خانواده‌های تنظیم کننده رونویسی در گیاهان هستند و به عنوان فعال‌کننده و مهارکننده در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می‌کنند (Rushton *et al.* 2010). WRKY یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی است که در تکامل سلسله گیاهی دچار مضاعف شدگی گسترده شده‌اند (Berri *et al.* 2009). حدود ۲۰ سال از اولین گزارش مربوط به کشف عوامل رونویسی خانواده‌ی ژنی WRKY در سیب زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) می‌گذرد (Ishiguro and Nakamura, 1994). اولین بار نام‌گذاری اعضای این خانواده یک سال بعد در گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) با شناسایی سه عضو (ژن‌های WRKY1، WRKY2 و WRKY3) انجام شد (Rushton *et al.* 1995). عوامل رونویسی WRKY تنظیم کننده‌هایی هستند که هم فعالیت‌های تنظیمی مثبت و هم منفی دارند (Eulgem and Somssich, 2007). WRKY یکی از ده خانواده بزرگ ژنی است که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده است (Ulker and Somssich, 2004). ژن‌های این خانواده در طی تکامل خود را با پیچیدگی‌های زیاد سازوکارهای دفاعی مقابله کننده با پاتوژن‌ها وفق داده‌اند (Eulgem *et al.* 2000). تکامل اجدادی خانواده ژنی WRKY ویژه بوده و دامنه ژن‌های موجود در گیاهان از یک ژن در جلبک سبز تک سلولی کلامیدوموناس (*Chlamydomonas nivalis*)، ۳۷ ژن در خزه (Bryophytes)، ۷۴ ژن در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تا تقریباً ۲۰۰ ژن در سویا (*Glycine max*) متغیر است (Ulker and Somssich, 2004). ساختار دمین WRKY (domain) شامل چهار صفحه بتا (b-sheet) است که اسید آمینه‌های حفظ شده سیستمین و هیستیدین در ساختار انگشت روی قرار دارند (Yamasaki *et al.* 2005). توالی آمینواسیدی WRKYGQK موجب

به پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی درگیر هستند (Chen and Chen, 2000) و با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در سیستم دفاعی به خصوص مسیر سالیسیلیک اسید (salicylic acid) کار خود را انجام می‌دهند (Du and Chen, 2000). عوامل رونویسی WRKY در تنظیم فعالیت‌های پیری در برگ دخیل هستند. پروفایل بیانی در آرآبیدوپسیس نشان دهنده این است که عوامل رونویسی WRKY به طور قابل توجهی در ترانسکریپتوم پیری موجود هستند (Guo et al. 2004). هدف از انجام این پژوهش شناسایی همه اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو و طبقه بندی آنها بر اساس مناطق حفاظت شده به منظور به کارگیری نتایج آن برای پژوهش‌های بعدی از جمله بررسی الگوی بیان این ژن‌ها است که می‌تواند کمک شایانی در راستای اصلاح این گیاه زراعی برای افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY با استفاده از پایگاه‌های داده مرتبط ابتدا تمامی اعضای ثبت شده خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو از پایگاه داده‌های PTFDB و GTFDB (جدول ۱) جمع‌آوری شدند.

شناسایی اعضا از طریق tBLASTN بر اساس توالی‌های حفظ‌شده در برنج با انتخاب یک عضو از هر زیر گروه ژن‌های WRKY در برنج (Paul et al. 2010)، tBLASTN در پایگاه داده‌های IBSC و NCBI (جدول ۱) انجام شد تا اعضای احتمالی دیگر خانواده عوامل رونویسی WRKY نیز اضافه شوند.

برآمدگی بر سطح پروتئین شده و توانایی پروتئین را در اتصال به شیارهای DNA افزایش می‌دهد. این توالی از نظر طولی با توالی حفاظت‌شده W در DNA برابری می‌کند (Babu et al. 2006). عوامل رونویسی WRKY توالی حفاظت شده W (TTGACC/T) را به عنوان علامت موجود در پیشبر شناسایی کرده و موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند (Rushton et al. 1996). ویژگی خاص عوامل رونویسی WRKY در اتصال به DNA وجود پهنه تقریباً غیر قابل تغییر WRKY در انتهای آمینی پروتئین است (Rushton et al. 1996). آزمایش‌های جهش‌زایی نشان می‌دهد که اسید آمینه‌های حفظ‌شده سیستئین (cysteine) و هیستیدین (histidine) و پهنه WRKYGQK برای اتصال پروتئین به DNA ضروری هستند (Maeo et al. 2001). در تعداد کمی از این توالی‌ها در گیاهان مختلف تغییرات کمی مانند WKY, WVKY, WRRY, WSKY و WKKY گزارش شده است (Xie et al. 2005). عوامل رونویسی WRKY بر مبنای تعداد پهنه‌ها و ساختار انگشت روی (zinc finger) به سه گروه تقسیم می‌شوند (Eulgem et al. 2000). پروتئین‌های گروه I دارای دو پهنه و گروه II که شامل زیر گروه‌های IIe, IIc, IIb, IIa بوده و III دارای یک پهنه WRKY بوده (Rushton et al. 2008) و الگوی انگشت روی در انتهای C آنها در گروه I و II به صورت Cx₄ Cx₇Cx₂₃HxC₅ و در گروه III به صورت Cx₂₂₋₂₃HxC₅ است (Zhang and Wang, 2005).

عوامل رونویسی WRKY در هنگام مواجهه گیاه با شوری زیاد، گرما، تنش اسمزی، غلظت‌های بالای CO₂ و سرما یا خشکی بیان می‌شوند (Li et al. 2009). در غلات آلفاآمیلاز (alpha amylase) یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرآیند جوانه‌زنی و فرآیندهای پس از جوانه‌زنی است، در جو بعضی از عوامل رونویسی WRKY به توالی W در پیشبرهای ژن آلفاآمیلاز متصل می‌شوند (Rushton et al. 1995). بیشتر پروتئین‌های خانواده WRKY در پاسخ گیاه

جدول ۱- اسامی و آدرس پایگاه داده‌های مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Name and URL address of the databases exploited in the current research

Database	URL
The international barley sequencing consortium (IBSC)	http://webblastipk-gaterslebende/barley
GeneBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Plant Transcription Factors Database (PTFDB)	http://planttfdbcbi.edu.cn
Gramineae Transcription factor database (GTFDB)	http://gramineatfdbpscribe.njp
Pfam	http://pfamsanger.ac.uk/
Ensemble Plants	http://plantsensembl.org/
Weblogo	http://weblogoberkeleyedu/logo.cgi
Fao	http://faostatfao.org

شایان ذکر است انواع رونوشت‌های گزارش شده یک ژن (شامل mRNA، cDNA، EST) در یک Unigene جمع‌آوری شده است. در صورت عدم وجود Unigene، توالی‌های تکراری از طریق هم‌ردیفی، شناسایی و تلفیق شدند.

هم‌ردیفی و ترسیم درخت فیلوژنتیک

بعد از حذف توالی‌های ترانسکرپت‌های یک پروتئین، هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی WRKY بدست آمده در جو به همراه یک توالی از هر زیر گروه خانواده عوامل رونویسی WRKY در گندم (Zhu *et al.* 2013)، برنج (Paul *et al.* 2010) و آرابتیدوپسیس (Wu *et al.* 2005) با استفاده از نرم افزار Clustalx 2010 انجام و درخت فیلوژنتیک آنها بر اساس روش اتصال همسایه (neighbor-joining) و با انجام خودراه‌اندازی (bootstrap) با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم افزار MEGA 60 (Tamura *et al.* 2013) رسم شد.

تعیین محدوده کرموزومی

برای یافتن توالی ژنومی، توالی cDNA هر یک از اعضا به عنوان الگو برای BLASTN بر علیه ژنوم جو (در بین توالی‌های Morex) در پایگاه‌های IBSC و Ensemble Plants (جدول ۱) بارگذاری شدند.

حصول توالی‌های توافقی (consensus) مناطق حفاظت شده WRKY در زیر گروه‌های این خانواده توالی‌های توافقی مناطق حفاظت شده WRKY در هر کدام از زیر گروه‌های این خانواده با استفاده از پایگاه Weblogo طراحی شدند.

جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف (Hidden Markov

(Model)

برای جستجو بر اساس HMM ابتدا پروفایل hmm برای دمین حفاظت شده WRKY با کد PF03106hmm از پایگاه Pfam (Punta *et al.* 2014) (جدول ۱) گرفته شده و از آنها برای جستجو علیه مجموعه پروتئین‌های بدست آمده از IBSC (Mayer *et al.* (barley_HighConffa & barley_LowConffa) (2012) با استفاده از نرم افزار HMMER 31b1 (Finn *et al.* 2011) استفاده شد. در این مرحله پروفایل hmm دوباره بر اساس توالی‌های مناطق حفاظت‌شده همه پروتئین‌ها و ناحیه حفاظت شده در هر زیر گروه ایجاد و از پروفایل حاصل برای جستجوی مجموعه پروتئین‌های بدست آمده از IBSC استفاده شد.

در همه جستجوها فقط توالی‌هایی با $E\text{-value} < 1$ انتخاب شده و سپس همه آنها به صورت دستی برای وجود مناطق حفاظت شده WRKY بررسی شدند و این نتایج با داده‌های پایگاه Pfam برای مناطق حفاظت شده دوباره چک شدند. جهت جلوگیری از ثبت تکراری توالی‌های مشابه گزارش شده برای هر ژن، توالی‌های یافت شده در پایگاه‌های مختلف، در NCBI جستجو شدند تا Unigene توالی‌ها در صورت وجود پیدا شد.

نتایج

زیرگروه II d و ۹ پروتئین در زیرگروه II e. در درخت فیلوژنتیک رسم شده مشاهده می‌شود که حدود ۳۱ درصد توالی‌های یافت شده در گروه III، حدود ۱۴ درصد آنها در گروه I و باقی در گروه II قرار دارند (شکل ۱).

شباهت ساختاری دمین‌های حفاظت شده توالی‌ها بین گروه‌ها و زیرگروه‌های II a و II b، II c و I و همچنین بین III و II d مشهود است که این گروه‌ها و زیرگروه‌ها در شکل ۱ نیز کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. توالی حفاظت شده WRKYGQK در دمین همه توالی‌های یافت شده به همراه ساختار انگشت روی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و ساختار انگشت روی Cx_{4.5}Cx₂₂₋₂₃HxH در گروه‌های I و II مشهود هستند (شکل ۲).

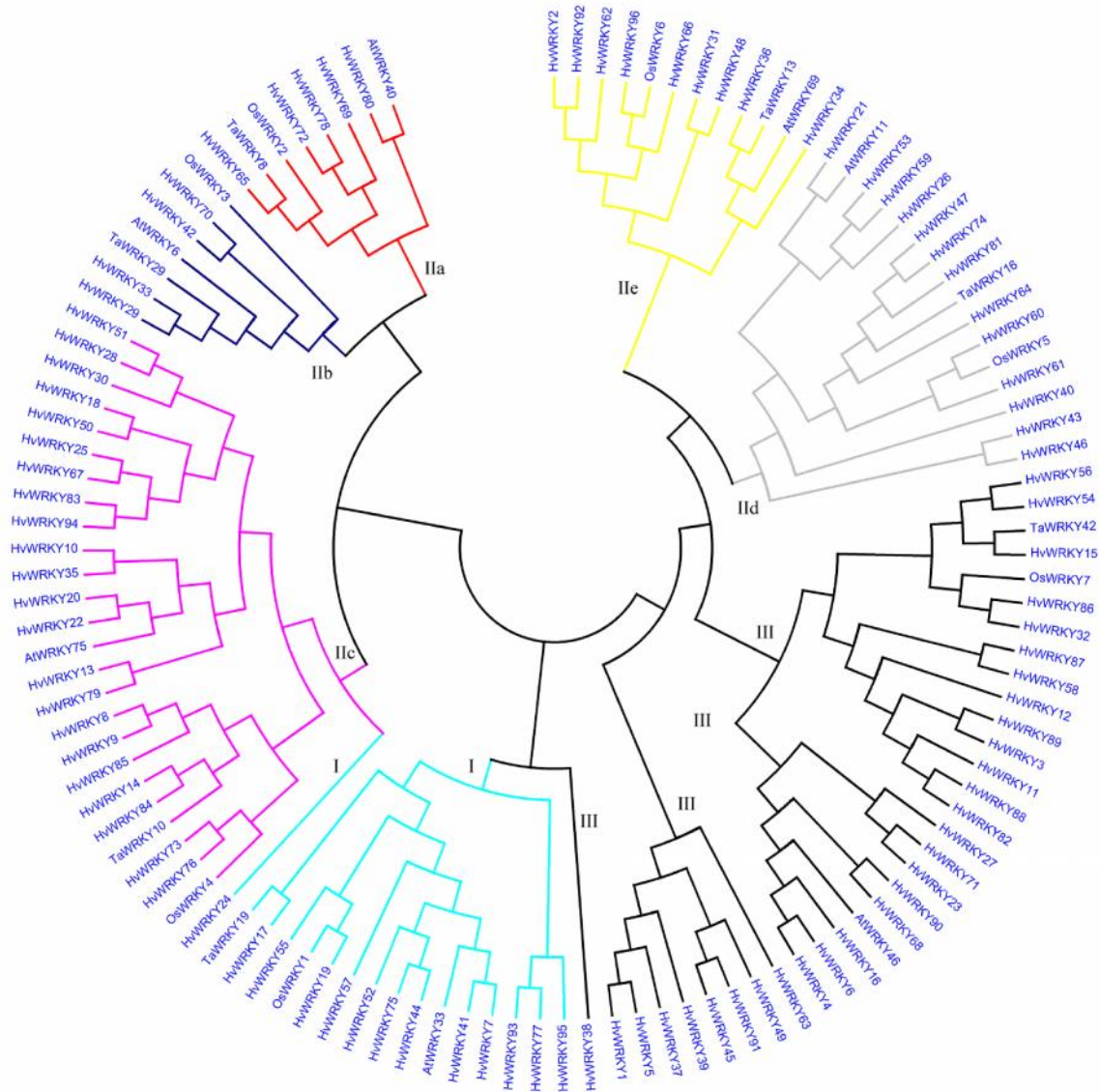
۹۶ توالی پروتئینی به عنوان اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو یافت شد که بر طبق طبقه بندی تعریف شده (Eulgem *et al.* 2000)، بر اساس تشابه در دمین حفاظت شده، در ۳ گروه دسته‌بندی شدند (جدول ۲). بر این اساس ۱۳ پروتئین دارای ۲ دمین حفاظت شده WRKY در گروه I، ۳۰ پروتئین دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی Cx₇Cx₂₃HxC در گروه III و پروتئین‌های دارای یک دمین WRKY با ساختار انگشت روی Cx_{4.5}Cx₂₂₋₂₃HxH بر اساس شباهت‌های ساختاری به کار رفته برای طبقه بندی‌های مذکور برای گندم، برنج و آراییدوپسیس به شرح زیر در زیرگروه‌های پنج‌گانه گروه II قرار گرفتند: ۵ پروتئین در زیرگروه II a، ۴ پروتئین در زیرگروه II b، ۲۲ پروتئین در زیرگروه II c، ۱۳ پروتئین در

جدول ۲- فهرست اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو، موقعیت کروموزومی، طول پروتئین، موقعیت دمین حفاظت شده و گروه‌بندی آنها

Table 2- List of WRKY transcription factor family members in barley, chromosomal position, protein length and the position of conserved domain

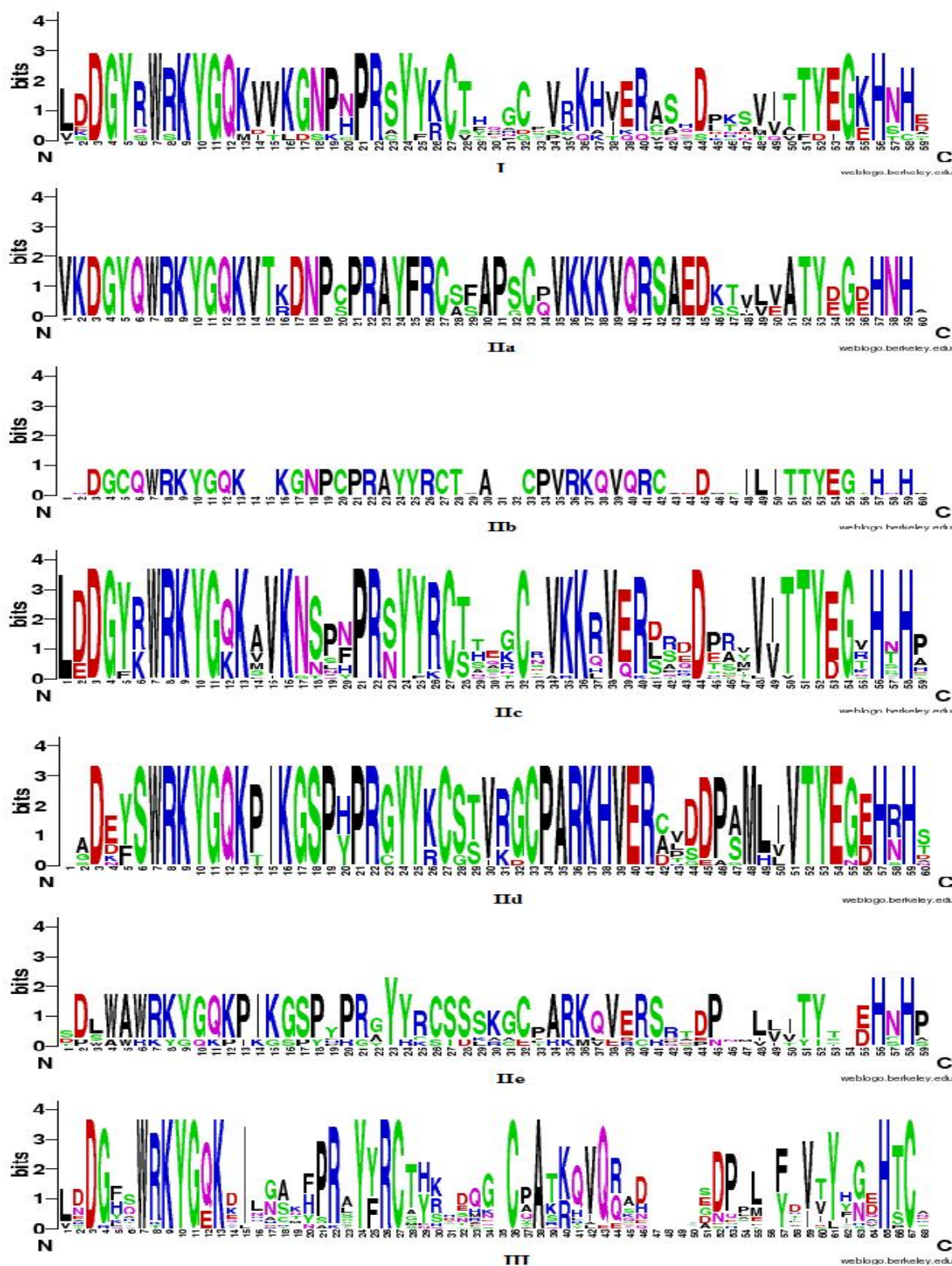
Name	Chromosome No	Pervious Name	UniGene	Protein ID	MIPS acc No	Protein Length (WRKY Domain)
HvWRKY1	1	-----	---	-----	MLOC_57051	290(138-199)
HvWRKY2	1	-----	---	-----	MLOC_71477	340(182-240)
HvWRKY3	1	-----	---	-----	MLOC_79171	140(1-50)
HvWRKY4	1	HvWRKY31	Hv29798	ABI13397	MLOC_5971	309(113-172)
HvWRKY5	1	-----	---	-----	MLOC_11088	289(135-196)
HvWRKY6	1	-----	---	-----	MLOC_15430	300(105-164)
HvWRKY7	1	HvWRKY43	Hv29827	ABI13408	MLOC_72586	512(178-235)-(344-402)
HvWRKY8	1	HvWRKY19	Hv15087	ABI13385	MLOC_81131	248(125-183)
HvWRKY9	1	HvWRKY20	Hv29796	BAJ94655	MLOC_10264	216(128-186)
HvWRKY10	1	HvWRKY13	Hv18628	ABI13379	MLOC_32433	139(60-118)
HvWRKY11	1	HvWRKY29	Hv29824	ABI13395	MLOC_65699	247(96-156)
HvWRKY12	1	-----	---	-----	MLOC_17779	149(1-53)
HvWRKY13	1	-----	---	-----	MLOC_44947	196(54-112)
HvWRKY14	1	HvWRKY17	Hv29828	BAJ98268	MLOC_12079	199(108-166)
HvWRKY15	2	HvWRKY30	Hv3567	BAJ92999	MLOC_71897	328(148-208)
HvWRKY16	2	-----	---	-----	MLOC_7000	321(140-204)
HvWRKY17	2	HvWRKY41	Hv9019	ABI13406	MLOC_5850	489(218-273)-(383-441)
HvWRKY18	2	-----	---	-----	MLOC_58026	285(127-184)
HvWRKY19	2	HvWRKY46	Hv15882	AAQ63880	MLOC_74884	573(189-246)-(362-420)
HvWRKY20	2	HvWRKY12	Hv14881	BAJ86072	MLOC_36657	216(123-181)
HvWRKY21	2	HvWRKY10	Hv7458	BAJ97150	MLOC_63184	318(247-305)
HvWRKY22	2	-----	---	-----	ABI13378	205(112-170)
HvWRKY23	2	HvWRKY4	Hv13574	BAK023311	MLOC_74606	348(117-175)
HvWRKY24	2	-----	Hv33030	BAK079591	MLOC_77883	736(300_356)-(530-587)
HvWRKY25	2	-----	---	-----	MLOC_66345	179(100-158)
HvWRKY26	2	HvWRKY7	Hv10971	BAK03156	MLOC_22106	326(230-278)
HvWRKY27	3	-----	---	-----	MLOC_68061	114(23-80)
HvWRKY28	3	-----	---	-----	MLOC_54895	205(183-205)
HvWRKY29	3	-----	Hv4932	BAJ96003	MLOC_68299	569(301-359)
HvWRKY30	3	-----	Hv16746	BAJ98040	MLOC_54606	364(168-225)s
HvWRKY31	3	-----	Hv33406	BAJ997161	MLOC_7126	320(137-198)
HvWRKY32	3	-----	Hv21259	BAJ89144	MLOC_44455	308(125-186)
HvWRKY33	3	-----	---	-----	-----	569(302-360)
HvWRKY34	3	HvWRKY45	Hv18266	ABI13410	MLOC_14821	297(74-132)
HvWRKY35	3	-----	---	-----	MLOC_54950	231(152-210)
HvWRKY36	3	HvWRKY39	Hv16074	ABI13404	MLOC_69778	275(105-163)

HvWRKY37	3	-----	---	-----	MLOC_3853	189(117-175)
HvWRKY38	3	-----	---	-----	MLOC_6114	256(54-112)
HvWRKY39	3	-----	---	-----	MLOC_34506	360(120-183)
HvWRKY40	3	HvWRKY36	Hv29825	ABI13412	MLOC_19031	197(37-97)
HvWRKY41	3	-----	---	-----	MLOC_67851	207(23-81)
HvWRKY42	3	HvWRKY37	Hv19834	BAJ992451	MLOC_7939	475(216-274)
HvWRKY43	3	-----	---	-----	MLOC_7470	230(152-208)
HvWRKY44	4	-----	---	-----	MLOC_31894	372(90-148)-(250-308)
HvWRKY45	4	-----	---	-----	MLOC_57764	206(33-94)
HvWRKY46	4	-----	---	-----	MLOC_16746	96(42-96)
HvWRKY47	4	-----	Hv26258	BAJ85995	MLOC_77258	360(225-283)-(286-344)
HvWRKY48	4	-----	---	-----	MLOC_56822	225(140-1198)
HvWRKY49	4	HvWRKY34	Hv1750	ABI13400	MLOC_34522	223(45-103)
HvWRKY50	5	HvWRKY15	Hv15485	BAK01500	MLOC_59259	303(136-193)
HvWRKY51	5	-----	Hv36645	BAJ950061	MLOC_59246	87(1-35)
HvWRKY52	5	-----	---	-----	MLOC_69575	360(92-148)-(248-306)
HvWRKY53	5	-----	---	-----	MLOC_22356	286(220-278)
HvWRKY54	5	HvWRKY22	Hv29810	ABI13388	MLOC_45055	187(130-188)
HvWRKY55	5	HvWRKY40	Hv29818	ABI13405	MLOC_10687	181(145-181)
HvWRKY56	5	HvWRKY28	Hv13249	ABI13394	MLOC_52504	346(123-181)
HvWRKY57	5	HvWRKY42	Hv15670	ABI13407	MLOC_58019	274(86-144)
HvWRKY58	5	HvWRKY24	Hv29804	ABI13390	MLOC_74974	214(18-56)
HvWRKY59	5	-----	---	-----	MLOC_66612	299(231_289)
HvWRKY60	5	HvWRKY9	Hv17161	ABI13375	MLOC_76441	339(269-328)
HvWRKY61	5	HvWRKY11	Hv15434	ABI13377	MLOC_67268	87(12-69)
HvWRKY62	5	-----	---	-----	MLOC_58349	256(154-215)
HvWRKY63	5	-----	---	-----	MLOC_68369	337(149-207)
HvWRKY64	5	HvWRKY8	Hv29784	BAK059431	MLOC_56247	355(289-346)
HvWRKY65	6	HvWRKY1	Hv20710	BAJ91478	MLOC_60890	353(187-244)
HvWRKY66	6	-----	Hv33156	BAK03476	MLOC_64446	488(234-291)
HvWRKY67	6	-----	---	-----	MLOC_12078	227(153-211)
HvWRKY68	7	-----	---	-----	MLOC_66134	308(110-168)
HvWRKY69	7	HvWRKY23	Hv4870	ABI13413	MLOC_70190	382(310-368)
HvWRKY70	7	-----	---	-----	MLOC_60283	609(230-258)
HvWRKY71	7	-----	---	-----	MLOC_78461	341(115-173)
HvWRKY72	-----	HvWRKY2	Hv13583	CAH68818	-----	314(166-224)
HvWRKY73	-----	HvWRKY5	Hv22109	CAH68821	MLOC_66204	245(123-181)
HvWRKY74	-----	-----	Hv26258	-----	-----	340(273-231)
HvWRKY75	-----	-----	Hv25183	-----	-----	493(208-266)-(376-434)
HvWRKY76	-----	-----	Hv22109	-----	-----	237(116-173)
HvWRKY77	-----	-----	Hv20442	-----	-----	521(199-255)-(367-424)
HvWRKY78	-----	-----	Hv13583	BAJ90162	-----	264(127-186)
HvWRKY79	-----	-----	Hv33326	BAJ98419	-----	314(165-223)
HvWRKY80	-----	-----	Hv32682	BAJ99717	-----	229(69-128)
HvWRKY81	-----	-----	Hv26258	BAK00560	-----	353(275-313)
HvWRKY82	-----	-----	Hv1115	BAK01005	-----	254(94-155)
HvWRKY83	-----	HvWRKY14	Hv29823	ABI13380	-----	88(11-69)
HvWRKY84	-----	HvWRKY16	Hv29833	ABI13382	-----	169(113-169)
HvWRKY85	-----	HvWRKY18	Hv29775	ABI13384	-----	187(127-185)
HvWRKY86	-----	HvWRKY21	Hv21259	ABI13387	-----	266(136-204)
HvWRKY87	-----	HvWRKY25	Hv29821	ABI13391	-----	168(27-85)
HvWRKY88	-----	HvWRKY26	Hv1115	ABI13392	-----	209(63-121)
HvWRKY89	-----	HvWRKY27	Hv29820	ABI13393	-----	173(125-163)
HvWRKY90	-----	HvWRKY32	Hv15495	ABI13398	-----	330(145-203)
HvWRKY91	-----	HvWRKY33	Hv16020	ABI13399	-----	142(70-128)
HvWRKY92	-----	HvWRKY44	Hv29819	ABI13411	MLOC_58423	144(46-104)
HvWRKY93	-----	-----	---	ABR87003	MLOC_21482	281(80-138)
HvWRKY94	-----	-----	---	ABL11228	-----	103(65-103)
HvWRKY95	-----	-----	---	-----	-----	53(23-53)
HvWRKY96	-----	HvWRKY6	---	-----	-----	219(186-219)



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY در جو، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustalx 2010 به صورت چندگانه هم‌ردیف شده و بر اساس روش اتصال همسایه و با انجام خودراندازی با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم‌افزار MEGA6 درخت فیلوژنتیک آنها رسم شد.

Figure 1- Phylogenetic tree of WRKY transcription factor family members in barley, multiple sequence alignment were performed using Clustalx 2010 software and phylogenetic trees were constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method with bootstrap values from 1,000 replicates and drawn by MEGA4.



شکل ۲- توالی‌های توافقی مناطق حفاظت شده در زیر گروه‌های خانواده عوامل رونویسی WRKY که با استفاده از پایگاه Weblogo (جدول ۱) طراحی شده‌اند.

Figure 2. The consensus sequences of the conserved regions in WRKY transcription factor family subgroups of barley, designed by Weblogo tool (table 1).

در این مطالعه به دلیل قرابت ژنتیکی جو به برنج و همچنین تک-لپه‌ای بودن هر دو گیاه، از توالی‌های پروتئینی حفاظت شده هرکدام از زیرگروه‌های برنج (Wu *et al.* 2005) برای پیداکردن اعضای جدید خانواده WRKY در جو استفاده شد. در پایگاه‌های داده، بسیاری از توالی‌ها شرح نویسی نشده‌اند؛ بنابراین برای پیدا کردن اعضای جدید جستجوی توالی‌ها با BLAST آگاهی بیشتری را در دسترس قرار می‌دهد، از طرفی توالی‌های نوکلئوتیدی بسیار بیشتری نسبت به توالی‌های پروتئینی موجود هستند؛ و چون برای پیدا کردن اعضای جدید و داشتن عملکرد مشابه نیاز به توالی حفاظت‌شده پروتئین است، استفاده از tBLASTN برای پیدا کردن اعضای جدید از میان توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از توالی‌های حفاظت‌شده پروتئینی منطقی به نظر می‌رسد. در پیدا کردن اعضای خانواده ژنی WRKY داشتن ساختار حفاظت‌شده WRKYGQK و توالی انگشت روی به‌دقت بررسی و تائید شد شایان‌ذکر است دلیل انتخاب توالی‌های ناقص گزارش شده به‌عنوان اعضای این خانواده، دارا بودن موتیف WRKYGQK و شباهت زیاد ساختاری با توالی‌های WRKY و یا ثبت در پایگاه NCBI به نام WRKY بوده است.

مطالعات بیوانفورماتیک و عملکردی پیشبرهای گیاهی نشان می‌دهد توالی‌های W و توالی‌های مشابه آن در بسیاری از پیشبرهای القایی تحت تنش مشارکت فعال دارند (Maleck *et al.* 2000). گزارش‌های کمی درباره وجود اتصال پروتئین WRKY به توالی‌های حفاظت‌شده غیر از W وجود دارد (Cai *et al.* 2007). عامل رونویسی SUSIBA2 که نام دیگر عامل رونویسی HvWRKY46 است (Mangelsen *et al.* 2008) توانایی اتصال به دو توالی حفاظت‌شده W و SURE و (TAAAGATTACTAATAGGAA) را دارد (Grierson *et al.* 1994).

ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان به فراوانی در ژنوم گیاهان و جانوران حضور دارند و تنوع و تکامل یوکاریوت‌ها مربوط به گسترش و تکامل انواع خاص ژن‌های تنظیم‌کننده بیان است (Riechmann *et al.* 2000). روند تکاملی خانواده WRKY از موجودات تک-سلولی به سمت موجودات پرسلولی است. گیاهان گل‌دار در

مقایسه با مخروطیان، سرخس‌ها و خزها دارای اعضای بیشتری از خانواده ژنی WRKY هستند و این عوامل رونویسی نقش تنظیمی بسیار مهمی را در گیاهان گل‌دار بازی می‌کنند (Berri *et al.* 2009). بر اساس مطالعات صورت گرفته در جلبک کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) به‌عنوان یک گیاه پست که قرابت ژنتیکی فراوانی با اجداد گیاهی دارد فقط یک ژن WRKY وجود دارد که این ژن جزء گروه I است (دارای دو دمین WRKY) و نشان‌دهنده‌ی این است که گروه I جد واقعی خانواده‌ی WRKY بوده و دیگر گروه‌های این خانواده از تکامل گروه اول حاصل‌شده‌اند. جستجو بر مبنای داده‌های موجود در GeneBank نشان می‌دهد ژن‌های WRKY مشابه گروه I در دو یوکاریوت غیرفوتوستزکننده، یکی در کپک *Dictyostelium discoideum* (شماره‌ی شناسایی: AAO52331) و دیگری در یک تک‌یاخته‌ای به نام *Giardia lamblia* (شماره‌ی شناسایی: EAA40901) وجود دارد و به‌طور کلی مؤید این فرضیه هستند که جد واقعی ژن‌های WRKY گروه I هستند و قبل از اینکه ژن‌های WRKY وارد سلسله گیاهی شوند، حدود یک و نیم تا دو میلیارد سال پیش از یوکاریوت‌های اولیه منشأ گرفته‌اند، اما چگونگی گسترش ژن‌های این خانواده در گیاهان و عدم وجود آنها در مخمرها و در جانوران مشخص نیست (Ulker and Somssich, 2004). در این مطالعه ۱۳ پروتئین دارای ۲ دمین حفاظت‌شده WRKY بر اساس شباهت‌های ساختاری به‌کاررفته برای طبقه‌بندی‌های مذکور برای گندم، برنج و آرابیدوپسیس در گروه I قرار گرفتند.

دلیل قرار گرفتن زیرگروه Iic در کنار گروه I در درخت فیلوژنتیک شباهت ساختاری در توالی‌های این دو گروه است به طوری که گمان می‌رود رابطه تکاملی این دو گروه نزدیک‌تر بوده و زیر گروه Iic در اثر حذف یکی از دو منطقه حفاظت‌شده WRKY از گروه I مشتق شده باشد. اما باید توجه داشت که ممکن است بعضی از اعضای زیرگروه Iic در واقع توالی‌های ناقص گروه I باشند. همچنین در مطالعاتی که بر روی آرابیدوپسیس و گوجه‌فرنگی صورت گرفته است نشان داده شده است که بعضی از ژن‌ها مثل *AtWRKY10* فقط دارای یک دمین

هستند. اما در گروه بندی این ژن در گروه ژن های دو دمینی (گروه I) قرار گرفته است (Rushton *et al.* 2000) بنابراین به دلیل قرابت ژنتیکی بالای گروه IIc با دمین کربوکسیلی ژن های گروه I می توان نتیجه گرفت که زیرگروه IIc در طی دوران تکامل دمین انتهایی آمینی خود را ازدست داده اند که این مساله تایید کننده این است که گروه I جد واقعی خانواده WRKY هستند و دیگر گروه های این خانواده از تکامل گروه اول حاصل شده اند (Ulker and Somssich, 2004). در پژوهش های دیگر به ایجاد و تکامل گروه II از گروه I به دلیل از دست رفتن دمین انتهایی آمینی (N) اذعان شده و نتایج نشان داد که گروه II از تکامل دمین کربوکسیلی (C) گروه I ایجاد شده اند (Zhang and Wang, 2005). در پروتئین های گروه I دمین کربوکسیلی کار اتصال به DNA و دمین آمینی به تخصصی بودن این اتصال کمک می کند، بنابراین به دلیل ماهیت یک عامل رونویسی مبنی بر اتصال به DNA، تکامل گروه II از دمین کربوکسیلی منطقی است.

با توجه به اینکه گروه های II و III تک دمینی هستند برای جداسازی و مشخص کردن آنها از یکدیگر تفاوت ساختار انگشت روی آنها مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که مطابق گزارش های قبلی (Zhang, 2005) توالی های دارای ساختار انگشت روی با الگوی $Cx_7Cx_{23}HxC$ در گروه III و توالی هایی که دارای ساختار انگشت روی با الگوی $Cx_{4-5}Cx_{22-23}HxH$ هستند در گروه I و II قرار گرفتند گروه II نیز در برنج به چهار زیرگروه IIa, IIb, IIc و IId تقسیم بندی می شوند (Guo *et al.* 2005). توالی های گروه II در این مطالعه مانند تقسیم بندی خانواده عوامل رونویسی WRKY در گندم (Zhu *et al.* 2013) به زیرگروه های IIa, IIb, IIc, IId و IIe تقسیم شدند. اساس این طبقه بندی شباهت ساختاری توالی های پروتئین های WRKY است. در گروه بندی گروه II به ترتیب ۵، ۴، ۲۲، ۱۳ و ۹ عضو در زیرگروه های IIa, IIb, IIc, IId و IIe قرار گرفتند.

بوجود آمده اند (Dong and chen, 2003; Kalde and Barth, 2003). گروه II فقط در گیاهان عالی وجود دارند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که این گروه از ژن های خانواده WRKY در اثر مضاعف شدگی ایجاد شده اند و به دلیل ایفای نقش در تحمل فشارهای محیطی و تنش های وارده بر گیاه انتخاب شده اند. این میزان در پژوهش حاضر حدود ۳۱ درصد است. می توان فزونی حضور این گروه در جو نسبت به میانگین گیاهان عالی را با مقاومت بالای آن در بین غلات و انتخاب اجداد وحشی مقاوم تر برای بدست آوردن ارقام مقاوم تر و تکامل آن برای حصول عملکرد نسبی بالاتر در شرایط نامساعد در ارتباط دانست. ژن های گروه III نقش بسیار مهمی را در تکلیف های بازی می کنند، این گروه از نظر تکاملی پیشرفته ترین گروه خانواده WRKY به حساب آمده و موجب سازگاری گیاه می شوند (Zhang and Wang, 2005). گروه III در برنج نسبت به آرآیدوپسیس از نظر تکاملی بسیار فعال تر هستند، زیرا در توالی های گروه III برنج مضاعف شدگی پی در پی دیده می شود (Eulgem *et al.* 2000). ۳۴ درصد از ژن های خانواده ژنی WRKY در برنج نیز مربوط به گروه III هستند (Christian *et al.* 2007). با توجه به نتایج به دست آمده گروه III در اجداد جو در دوران تکامل بعد از گروه II ایجاد شده اند و این گروه نسبت به گروه II قرابت ژنتیکی کمتری نسبت به گروه I به عنوان جد خانواده WRKY دارند (شکل ۲) و این نشان دهنده تایید مباحث مبتنی بر حفاظت شدگی گروه II در جو همانند گندم به دلیل سازگاری این گیاه با شرایط و فشارهای محیطی است.

با توجه به اهمیت پدیده ی در حال گسترش خشکسالی در جهان و ایران، و محدودیت های گسترده ای که بر کشاورزی کشور تحمیل می کند، تلاش برای ایجاد گیاهان متحمل به خشکی و شوری اجتناب ناپذیر به نظر می رسد. از آنجایی که صفاتی مانند تحمل به تنش خشکی دارای کنترل چند ژنی هستند، بررسی ژن های تنظیمی که خوشه های ژنی را تنظیم می کنند یکی از راهکارهای امید بخش برای متحمل کردن گیاهان حساس به تنش خشکی است. نظر به وقت و هزینه بالای مورد نیاز برای بررسی های آزمایشگاهی و به ویژه مهندسی ژنتیک، منطقی است قبل از اقدام به هرگونه دستورزی ژنتیکی، خانواده های ژنی مهم و

به طور میانگین حدود ۲۰ درصد از ژن های خانواده ژنی WRKY در گیاهان عالی مربوط به گروه III هستند. در حالی که اعضای این گروه در خزهی فیسکومترا (Physcomitrella patens) وجود ندارند و نشان دهنده این است که این گروه از ژن های WRKY در طی دوران تکامل بعد از گروه های I و II

به طور میانگین حدود ۲۰ درصد از ژن های خانواده ژنی WRKY در گیاهان عالی مربوط به گروه III هستند. در حالی که اعضای این گروه در خزهی فیسکومترا (Physcomitrella patens) وجود ندارند و نشان دهنده این است که این گروه از ژن های WRKY در طی دوران تکامل بعد از گروه های I و II

یکی از مهم ترین تنظیم کننده های رونویسی در گیاهان با توجه به نقش اثبات شده ی آنها در تحمل به تنش های زیستی و غیرزیستی می تواند ما را در ایجاد بستری برای افزایش تحمل به خشکی یاری کند.

کلیدی، مورد بررسی دقیق و جامعی قرار گیرند و تمامی داده های موجود در مورد این ژن ها جمع آوری، تجزیه و تحلیل و تفسیر و تلفیق شوند تا بهترین ژن های نامزد برای بررسی های آزمایشگاهی پیشنهاد شوند. مطالعه بر روی عوامل رونویسی WRKY به عنوان

منابع

Babu MM, Iyer LM, Balaji S, Aravind L. 2006. The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic acids research* 34: 6505-6520.

Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. 2004. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Current opinion in structural biology* 14: 283-291.

Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, Brasileiro A, Fumasoni I, Satoh K, Kikuchi S, Mizzi L, Morandini P, Pè M. 2009. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. *BMC plant biology* 9: 120-126.

Blake T, Blake V, Bowman J, Abdel-Haleem H. 2011. In *Barley: Production Improvement and Uses* (ed SE Ullrich) 522-531 (Wiley-Blackwell).

Bockelman HE, Valkoun J. 2011. In *Barley: Production Improvement and Uses* (ed SE Ullrich) 144-159 (Wiley-Blackwell).

Brivanlou AH, Darnell Jr J E. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-818.

Cai M, Qiu D, Yuan T, Ding X, Li H, Duan L, Xu C, Li X, Wang S. 2007. Identification of novel pathogen-responsive cis-elements and their binding proteins in the promoter of OsWRKY13 a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell & Environment* 31: 86-96.

Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE. 2008. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant molecular biology* 68: 81-92.

Chen C, Chen Z. 2000. Isolation and characterization of two pathogen-and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant molecular biology* 42: 387-396.

Collins HM, Burton RA, Topping DL, Liao ML, Bacic A, Fincher GB. 2010. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry* 87: 272-282.

Christian AR, Liu Y, Shen QJ. 2007. The WRKY Gene Family in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(6): 827-842.

De Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J. 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from Arabidopsis. *Nucleic acids research* 24: 4624-4631.

Dong J, Chen C. 2003. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51(1):21-37.

Du L, Chen Z. 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 24: 837-847.

Eulgem T. 2005. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* 10: 71-78.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-205.

Eulgem T, Somssich IE. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology* 10: 366-371.

FAO. 2009. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available on: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.

Garcia DELM. 2003. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions. An ontogenic approach *Agronomy Journal* 95: 266-274.

Grando S, Macpherson HG. 2005. In *Proceedings of the International Workshop on Food Barley Improvement 14-17 January Hammamet Tunisia 156* (ICARDA Aleppo Syria).

Grierson S, Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M. 1994. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal* 5: 815-826.

- Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004.** Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell & Environment* 27: 521-549.
- Kalde M, Barth M. 2003.** Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular plant-microbe interactions* 16(4): 295-305.
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K. 2005.** RARTF: database and tools for complete sets of Arabidopsis transcription factors. *DNA research* 12: 247-256.
- Ishiguro S, Nakamura K. 1994.** Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein SPF1 that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and α -amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics* MGG 244: 563-571.
- Jiang W, Yu DQ. 2009.** Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and post-germination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biology* 22: 994-996.
- Karin M. 1990.** Too many transcription factors: positive and negative interactions. *The New biologist* 2: 126-131.
- Latchman DS. 1997.** Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29: 1305-1312.
- Li S, Fu QT, Huang WD, Yu DQ. 2009.** Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor WRKY25 in heat stress. *Plant Cell Rep* 28: 683-693.
- Mao K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. 2001.** Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience biotechnology and biochemistry* 65: 2428-2436.
- Mangelsen E, Kilian J, Berendzen K, Kolukisaoglu Ü, Harter K, Jansson C, Wanke D. 2008.** Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC genomics* 9: 194-201.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2000.** The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics* 26: 403-410.
- Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, Platzer M, Fincher GB, Muehlbauer GJ, Sato K, Close TJ, Wise RP, Stein N. 2012.** A physical genetic and functional sequence assembly of the barley. *Genome Nature* 491(7426): 711-716.
- Mitchell PJ, Tjian R. 1989.** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-376.
- Nevo E, Bi Fu Y, Pavlicek T, Khalifa S, Tavasi M, Beiles A. 2012.** Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *Proceeding of National Academy Science of USA* 109 3412-3415.
- Nimwegen E. 2006.** Scaling laws in the functional content of genomes. *Power Laws Scale-Free Networks and Genome Biology*: 236-253.
- Paul J, Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Qingxi Shen J. 2010.** WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15: 1360-1385.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP. 2009.** MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* 23: 80-92.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. 2014.** Nucleic Acids Research The Pfam protein families database. *Database Issue* 42:D222-D230.
- Purugganan MD, Fuller DQ. 2009.** The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457:843-848.
- Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, Chen X, Laudeman TW, Timko MP. 2008.** Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the solanaceae. *Plant Physiology* 147: 280-291.
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R. 1995.** Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of α -Amy2 genes. *Plant molecular biology* 29: 691-702.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. 2010.** WRKY transcription factors *Trends in Plant Science* 15: 247-258.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. 1996.** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO journal* 15: 569-576.
- Riechmann J, Heard LJ. 2000.** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ülker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P. 2007.** Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315: 1098-1107.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S .2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC). 2012.** A Physical genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711-717.
- Ulker B, Somssich IE. 2004.** WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current opinion in plant biology* 7: 491-498.
- Wu KL, Guo HH, Wang J. 2005.** The WRKY family of transcription factor in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA research* 12: 9-26.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ. 2005.** Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology* 137: 176-189.
- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. 1999.** Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development* 9: 140-147.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y. 2005.** Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *The Plant Cell Online* 17: 944-956.
- Zhang H, Mao X, Wang C, Jing R. 2010.** Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2 8 enhances tolerance to drought salt and low temperature in Arabidopsis. *PLoS One* 5(12): e16041.
- Zhang Y, Wang L. 2005.** The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolution Biology* 5: 1-6.
- Zhu X, Liu S, Meng C, Qin L, Kong L, Xia G. 2013.** WRKY Transcription Factors in Wheat and Their Induction by Biotic and Abiotic Stress. *Plant Molecular Biology Rep* 10: 1105-1113.

Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley

Beniamin Yazdani¹, Rasoul Asghari-Zakaria², Zahra-Sadat Shobbar^{3*}

1. Ph.D. Student and 2. Associate Professor, Department of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

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

*Corresponding Author, Email: shobbar@abrii.ac.ir

ABSTRACT

Biotic and abiotic stresses are the most important constraints on production by crop plants, including barley. Transcription factors are involved in the regulation of biotic and abiotic stress- response genes and the WRKY transcription factor family encodes a large group of them. Therefore, identification and classification of these factors represent important steps in our quest to find smart strategies for enhancing stress tolerance in plants. In an attempt to identify WRKY transcription factors in barley, multiple searches were done in Plant TFDB and Gramineae TFDB databases. Rice WRKY-conserved sequences were used as the templates for tBLASTN searches in the nr, EST and HTGS datasets for finding new members in barley. An HMM search was used to find sequences containing WRKY conserved domains. The identified 96 HvWRKYs as well as one member of each WRKY subgroup from Arabidopsis, rice and wheat were subjected to multiple alignment using clustalx software and phylogenetic trees were reconstructed using MEGA6 software based on neighbor-joining method with a 1000 repeats bootstrap index. Sequences were divided into 3 groups based on the number of WRKY domains and the structure of zinc-finger motifs. Conclusively, there were 13 proteins with 2 WRKY conserved domain in group I, 30 proteins with 1 WRKY conserved domain and C_x7C_x23HxC zinc-finger motif in group III and other proteins with 1 WRKY conserved domain and C_x4-5C_x22-23HxH zinc-finger motif in group II. Regarding the role of group III in plant tolerance to abiotic and biotic stresses, it can be argued that the higher percentage presence of group III members in barley that are similar to rice than to other higher plants can be attributed to duplications in wild monocotyledous ancestors and natural selection for more resistant genotypes in harsh conditions.

Key Words

Abiotic stresses, Transcription factors, HMM, Phylogenetic tree, Multiple alignment.