

مطالعه بیان ژن MYB رمز کننده عامل رونویسی تحت شرایط تنش خشکی در برخی ارقام گندم نان

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۹۵-۱۰۴

Study of MYB gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars

حدیث تبارکی^۱، لیلا فهمیده^{۲*}، زیبا فولادوند^۳

Hadis Tabaraki¹, Leila fahmideh^{2*} and Ziba Fooladvand³

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی،

۲- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۳- مربی پژوهشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

1. M.Sc. Student, 2. Assistant Professor, Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
3. Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

l.fahmideh@uoz.ac.ir or leila.fahmideh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۹)

چکیده

تنش خشکی از جمله مهمترین عوامل کاهش کمی و کیفی محصول در کشت گندم محسوب می-شود. در سال های گذشته در راستای مقابله با تنش ها به ویژه تنش خشکی، توجه پژوهشگران کشاورزی به شناخت ژن های مقاومت در گیاهان و شناخت ساز و کار عمل این ژن ها معطوف شده است. دسته بسیار مهمی از ژن ها که در فرآیند ایجاد مقاومت نسبت به تنش های زیستی و غیر زیستی در گیاهان نقش اساسی ایفا می کنند، ژن های کد کننده عوامل رونویسی می باشند. در این مطالعه، میزان تظاهر ژن عامل رونویسی *TaMYB73* در برخی ارقام گندم نان (چمران ۲، کلک افغانی، سیستان، ارگ و افق) بعد از اعمال تنش خشکی (پنج سطح: ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد خشکی) با روش Real-time PCR بررسی و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش خشکی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *TaMYB73* و میزان آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در رقم متحمل ارگ بیشتر از ارقام دیگر بود.

واژه های کلیدی

ژن *TaMYB73*
Real-time PCR
گایاکول پراکسیداز،
کاتالاز،
ارقام مقاوم و حساس

مقدمه

MYC, *bHLH*, شبیه به پروتئین‌های *MYC* و *MYB* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005)، DREBها، عوامل اتصال به تکرار C یا اتصال به عنصر پاسخ به خشکی) (Novillo et al. 2004) و NAC (Xue et al. 2006) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌های غیرزنده دارند (De Leonardis et al. 2007).

به طور معمول سه آمینواسید تریپتوفان که با فاصله منظم در هر تکرار *MYB* قرار دارند، در خوشه هیدروفوبیکی شرکت می‌کنند که به احتمال زیاد در تشخیص اختصاصی DNA شرکت دارند (Yanhui et al. 2006). سوپر خانواده *MYB* یکی از بزرگترین خانواده ژنی متعلق به ژن‌های عامل رونویسی است که در بیشتر گیاهان سبب کنترل تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. تا به حال بیش از ۱۰۰ عضو از این خانواده در آرکیدوپسیس و ۸۰ عضو دیگر در برنج و ۷۸ عضو در ذرت شناسایی شده است (Chen et al. 2005). نتایج پژوهش هوشیار دل و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که عوامل رونویسی، نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌های القا کننده مقاومت گیاه به بیماری ساقه سیاه دارد. پژوهش بر روی موتانت‌ها در برنج بیانگر این بود که مقاومت به تنش سرما به شدت بسته به بیان ژن *MYBs3* می‌باشد (Su et al. 2010). بر اساس گزارش حسین‌یار و همکاران (۲۰۱۱) خانواده بزرگ *MYB* در گندم برای سازگاری به تنش شوری نقش ویژه‌ای دارند. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی بیان ژن‌های عوامل رونویسی (*NAC*, *MYB*, *WRKY*, *BHLH*, *BZIP*) در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری، مشاهده کردند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است. از جمله ژن‌های درگیر در تحمل به تنش خشکی ژن *PvLEA-18* که پروتئین *LEA* (Late Embryogenesis Abundant) را کد می‌کند و متعلق به گروه ۳ از این خانواده ژنی است و بیان این ژن در بافت‌های رویشی در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد (Colmenero-Flores et al., 1997). پس از این ژن، ژن *PvNCED* که هورمون ABA را کد می‌کرد، شناسایی شد (Qin et al., 1999). در سطح مولکولی، بسیاری از گروه‌های ژنی را شناسایی کردند که پروتئین‌های

گندم (*Triticum aestivum*) گیاهی تک لپه و یکساله از تیره غلات، زیر تیره گندمیان و از نظر کروموزومی به سه دسته: دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید تقسیم می‌شود. مهمترین گیاه زراعی است که ۳۱ درصد سطح زیرکشت غلات را به خود اختصاص داده است (Khodabande, 2010). تنش خشکی از عوامل محیطی می‌باشد که تولیدات گیاهان زراعی را در مناطق خشک و نیمه‌خشک تحت تأثیر قرار می‌دهد (Allagulova et al. 2003). سرمدنیا و کوچکی (۱۹۹۰) بیان کردند که خشکی شایع‌ترین تنش محیطی است که تحت تأثیر آن، میزان تعرق از میزان جذب آب تجاوز می‌کند و میزان آب درون بافت‌ها و سلول‌های گیاهی به شدت کاهش و در نتیجه رشد کم شده و متوقف می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد، ژن‌های *NAM*, *ATAF*, *CUC* (*NAC*) در پاسخ به تنش خشکی و شوری بیان می‌شوند و عوامل رونویسی در تنظیم این ژن‌ها نقش دارند (et al. 2006). پروتئین‌های *MYB* (Myeloblastosis) در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی مسئول پاسخ به تنش‌های محیطی شامل سرما، شوری و خشکی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند (Jiangb et al. 2004). از مشخصه مهم آنها داشتن یک دامین حفاظت شده اتصال به DNA یعنی دامین *MYB* است. دامین *MYB* معمولاً مرکب از یک تا سه تکرار ناقص است که هر تکرار حاوی ۵۲ آمینواسید است که یک کنفورماسیون Helix-Turn-Helix را به وجود می‌آورد که در شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرد (Martin et al. 1997). دامین *MYB* که عامل رونویسی *c-MYB* پستانداران است به خوبی شناسایی و شامل سه تکرار R1, R2 و R3 می‌باشد (Paz-Ares et al. 1987). مشخص شده است که بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در مسیر پیام‌رسانی ناشی از تنش در گیاهان نقش دارند (Rahaie et al. 2011). در بین آنها، پروتئین‌های *Bzip* (عوامل اتصال به توالی Absciscic Acid Response Element, ABRE) (Uno et al. 2000)،

تولیدی این گروه‌ها نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی ایفا می‌کنند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های انتقال سیگنال و دخیل در سازگاری به تنش از قبیل HSP, LEA و پرولین اشاره کرد (Shinozaki et al., 2003). پس از شناسایی ژن‌های تحمل به تنش خشکی، می‌توان آنها را از طریق مهندسی ژنتیک به گیاهان مورد نظر منتقل کرد (Abebe et al., 2003). تنش خشکی سبب افای بیان ژن P5CS و افزایش سطح پرولین در برگ‌ها و جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی گردید. در بسیاری از ژنوتیپ‌ها، بیان ژن P5CS همبستگی بالایی با سطح پرولین مشاهده گردید که این افزایش سبب مقاومت احتمالی در این ژنوتیپ‌ها می‌گردد (Garaghanipur et al., 2014).

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه و گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه (چمران ۲، کلک افغانی، سیستان، ارگ و افق) از نظر تنش خشکی و بررسی بیان ژن MYB در سطوح مختلف تنش خشکی و مقایسه نتایج مولکولی صفات در شرایط تنش خشکی با نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات فیزیولوژی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سطوح خشکی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل پنج رقم گندم نان منطقه سیستان چمران ۲ (متحمل)، کلک افغانی (متحمل)، سیستان (حساس)، ارگ (متحمل) و افق (حساس) بود. بذور ارقام مورد مطالعه از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه شد. به منظور کشت گیاه، ابتدا در پتری دیش‌های مربوط به هر رقم یک کاغذ صافی برای حفظ رطوبت بذر قرار داده شد. بذور با فاصله‌ی منظم از هم برای سهولت در جوانه زنی در شرایط نرمال کشت داده شدند. بعد از مشاهده‌ی ریشه‌چه، بذور ریشه‌دار شده به گلدان‌هایی که هر یک به ۵ قسمت مساوی تقسیم شده بود، انتقال و ۳ بذر ریشه‌دار شده از هر رقم در هر گلدان و در عمق ۳ سانتی‌متری از خاک کشت شدند. گلدان‌ها در آزمایشگاه پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تحت شرایط دمایی 25 ± 2

درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ نور) نگهداری و یک روز در میان با آب معمولی مورد آبیاری قرار گرفتند. با استفاده از محاسبات، تعیین مقدار آب در خاک خشک نسبت به ظرفیت مزرعه مشخص و برای تعیین تیمارهای مقادیر آب در هر گلدان، ابتدا مقدار گرم خاک در داخل آون در درجه حرارت ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت، توزین و وزن خاک خشک تعیین شد. سپس خاک خشک شده در گلدانی ریخته شده و به آرامی و تا حد اشباع آب به آن اضافه شد و پس از خارج شدن کامل آب ثقلی گلدان توزین و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری شده در ظرفیت زراعی ۲۵ درصد تعیین و تیمارهای مختلف بر این اساس محاسبه شدند.

سپس در مرحله چهار برگی عملیات تنک انجام شد، سرانجام از هر رقم یک بوته در هر گلدان باقی ماند. اعمال تیمار مورد نظر روی گیاهان ۴۵ روز پس از کشت در مرحله پنجه‌زنی انجام شد. آبیاری تیمارها در ۵ سطح زیر انجام شدند:

سطح اول آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۲۵ درصد، سطح دوم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۲۰ درصد، سطح سوم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۱۵ درصد، سطح چهارم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۱۰ درصد و سطح پنجم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۵ درصد، نمونه‌برداری از گیاهان ۴۵ روز پس از تنش انجام شد.

طراحی آغازگرها

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاص *TaMYB73* به همراه ژن خانه‌دار *18s* استفاده شد. طراحی این آغازگرها بر اساس انتهای ۳' به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

Table 1- Name and sequences of the primers.

Primer	Sequence of primer	PCR Product bp	Annealing °C
F: TaMYB73.FWD1	5'-GGATGGAACACGACGACAC	۲۲۹	۶۱/۵
R: TaMYB73.REV1	5'TCTAAATCTGCGACAACTCTGTATG		
F: 18S.FWD2	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT	۱۵۱	۵۹/۵
R: 18S.REV2	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT		

جدول ۲- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشتی طراحی شده.

Table 2: Reagents and volume for cDNA synthesis reaction by reverse primers

Reagents	Volume حجم مواد
Total RNA (۱۰۰ نانوگرم)	۳ میکرولیتر
Specific Primer (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
dNTP (۱۰ میلی مولار)	۰/۵ میکرولیتر
RTase reaction buffer (10X)	۱ میکرولیتر
DTT (۰/۱ میلی مولار)	۱ میکرولیتر
HYPER Script™ Reverse Trans criptase 200u/μl	۰/۵ میکرولیتر
Zym ALL™ RNase inhibitor	۰/۵ میکرولیتر
Nuclease free water	۳ میکرولیتر

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA با استفاده از کیت Total RNA isolation از گیاه گندم، با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت دنا زیست آسیا استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. از RNA تیمار شده با DNase1 برای ساخت cDNA استفاده شد.

بیان ژن‌ها با روش Real time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen شرکت (Solis BioDyne) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real time PCR set Corbett (3000) بررسی شد. مخلوط واکنش برای هر نمونه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل ۴ میکرولیتر مخلوط EvaGreen، ۱ میکرولیتر آغازگر مستقیم، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی، ۱۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود. طبق برنامه: مرحله

واسرشته سازی اولیه: ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، به تعداد ۴۰ چرخه، مرحله واسرشته سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی-گراد، مرحله اتصال آغازگر: ۴۵ ثانیه در دمای ۶۱/۹ درجه سانتی-گراد، مرحله تکثیر: ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و منحنی ذوب با افزایش دما از ۵۰ تا ۹۹ درجه هر پنج ثانیه یک درجه بود.

تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه داده‌های دستگاه Real time PCR با نرم افزار SAS ver 9.1 انجام شد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livake and schmittgen, 2001) محاسبه شد.

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ نمونه کنترل} - \Delta Ct \text{ نمونه آزمایشی})$$

$$\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ ژن خانه‌دار} - \Delta Ct \text{ ژن هدف})$$

نتایج

با توجه به نقش مهم عوامل رونویسی در تنظیم پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های غیر زنده، لزوم بررسی بیان این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی در گندم نان زراعی اهمیت دارد. بنابراین در این مطالعه بیان ژن MYB به همراه میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در پنج رقم گندم نان منطقه سیستان تحت تنش خشکی بررسی شد تا با استفاده از روش‌های مولکولی و بررسی هم‌پوشانی نتایج مولکولی و فیزیولوژیکی بتوان مقایسه و گروه‌بندی ارقام مورد نظر را در سطوح مختلف تنش خشکی انجام داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌ها و همچنین نتایج تغییرات بیان ژن مورد مطالعه در زیر آورده شده است.

نتایج آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳ آورده شده است. تأثیر رقم در سطح یک درصد بر میزان آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود. با توجه به نمودار شکل ۱، رقم ارگ بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۵۰) و رقم افق با مقدار ۰/۲۱ کمترین میزان را به خود اختصاص داد. بیشترین میزان گایاکول پراکسیداز اندازه‌گیری شده را رقم ارگ و افق به ترتیب با مقدار ۰/۱۴ و ۰/۱۳ به خود اختصاص دادند که تفاوت معنی‌داری با رقم کلک افغانی که کمترین میزان گایاکول پراکسیداز را دارا بود (۰/۰۸۳۵)، نشان دادند (شکل ۱).

نتایج بررسی بیان ژن

اثر رقم، خشکی و اثر متقابل رقم و خشکی در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). با توجه به جدول ۵، رقم ارگ در سطح خشکی پنج درصد با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر ارقام مورد مطالعه، بیشترین میزان بیان را نشان داد.

برای هر نمونه سه تکرار برای ژن اختصاصی و سه تکرار برای ژن خانه دار 18s House keeping gene در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

استخراج عصاره آنزیمی

جهت استخراج عصاره آنزیمی از بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ استفاده شد. مقدار ۰/۲ گرم بافت سبز برگ با ۴ میلی لیتر بافر استخراج عصاره آنزیمی در هاون چینی به طور کامل ساییده شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس فاز رویی با سمپلر جدا شد.

اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز

آنزیم کاتالاز با روش بیور و سائزر (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در ۲/۸ سی سی بافر فسفات پتاسیم ریخته و ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی-مولار به آن اضافه و در طول موج ۲۴۰ نانومتر جذب اول و بعد از ۳۰ ثانیه جذب دوم خوانده شد. دستگاه با استفاده از بافر پتاسیم به عنوان محلول استاندارد صفر شد.

اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

گایاکول پراکسیداز با روش فیلدینگ و هال (۱۹۷۸) اندازه‌گیری شد. ابتدا بافر فسفات پتاسیم با استفاده از گایاکول ۱ درصد در ۱۰۰ سی سی بافر فسفات پتاسیم حل شد سپس مقدار ۴۸۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۳ درصد با ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ترکیب شد و در طول موج ۴۷۰ نانومتر جذب اول و بعد از ۳۰ ثانیه جذب دوم خوانده شد. دستگاه با استفاده از بافر پتاسیم به عنوان محلول استاندارد صفر شد.

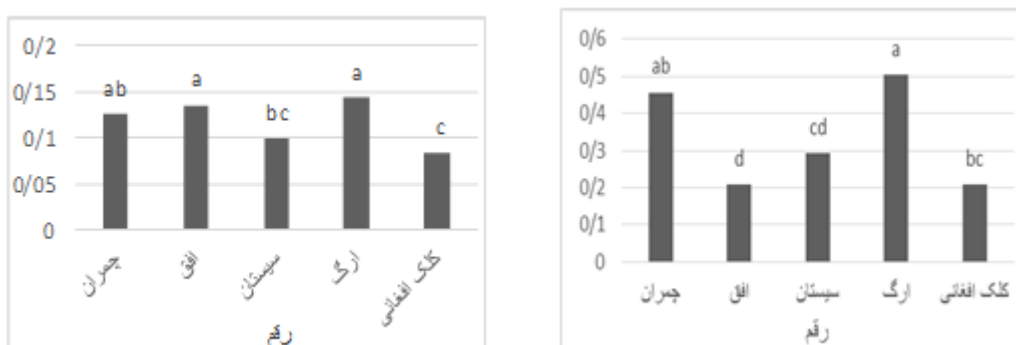
داده ها و نرم افزارها

پس از اندازه‌گیری و به دست آوردن داده‌های فیزیولوژیکی و مولکولی، تجزیه واریانس، مقایسه میانگین (با روش LSD) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SAS نسخه ۹/۱ و اکسل انجام شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان تغییرات فعالیت آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز.

Table 3. Analysis variance of catalase and guaiacol peroxidase change activity enzyme.

میانگین مربعات (MS)				
منابع تغییرات	درجه آزادی	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	
بلوک	۲	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۵ ^{ns}	
تنش خشکی	۴	۰/۰۰۵۴ ^{ns}	۰/۰۰۰۴ ^{ns}	
رقم	۴	۰/۱۷۳ ^{**}	۰/۰۰۷۷ ^{**}	
برهمکنش تنش و رقم	۱۶	۰/۰۰۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	
خطا	۴۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۱۴	
CV	-	۹/۶۸	۱۲/۱۹	



شکل ۱- میزان تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (راست) و گایاکول پراکسیداز (چپ) در پنج رقم گندم نان تحت تنش خشکی.

Figure 1. Changes in Catalase (Right) and Guaiacol peroxidase (left) enzymes activity in five bread wheat cultivars under drought stress.

جدول ۵- مقایسه میانگین بیان ژن عامل رونویسی MYB ارقام گندم تحت تنش خشکی

Table 5. Mean comparison of transcription factor MYB expression in wheat cultivars under drought stress

سطوح خشکی				
رقم	۲۰	۱۵	۱۰	۵
چمران ۲	۱/۰۵ ^b	۰/۰۹۳۳ ^c	۱/۰۸ ^b	۰/۰۰۷۳ ^c
افق	۰/۰۱۶۷ ^c	۰/۰۰۰۱ ^c	۰/۰۰۰۲ ^c	۰/۰۰۰۶ ^c
سیستان	۱/۴۲۶۷ ^b	۰/۰۰۵۰ ^c	۰/۰۰۰۹ ^c	۰/۰۳۷۷ ^c
ارگ	۰/۰۷۹۶ ^c	۰/۰۲۳۳ ^c	۰/۰۱ ^c	۷/۱۱۲۳ ^a
کلک افغانی	۰/۴۴۶۷ ^c	۰/۰۴۹۸ ^c	۰/۱۷۵۱ ^c	۰/۰۵ ^c

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن عامل رونویسی MYB ارقام گندم تحت تنش خشکی

Table 4. The results of analysis of variance for transcription factor MYB expression in wheat cultivars under drought stress

میانگین مربعات (MS)		
منابع تغییرات	درجه آزادی	بیان ژن MYB
بلوک	۲	۰/۲۰۵۷۶ ^{ns}
تنش خشکی	۴	۵/۶۳۵۲۸ ^{**}
رقم	۴	۴/۴۴۳۴۹ ^{**}
برهمکنش تنش و رقم	۱۶	۷/۸۹۱۱۶ ^{**}
خطا	۴۰	۰/۰۷۴۳۶
CV	-	۱۸/۶۸

بحث

کردند که محلول پاشی آهن و روی توأم با تنش خشکی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شد. در این مطالعه میزان آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در رقم متحمل ارگ بیشترین مقدار را نشان داد.

از جمله ژن های دخیل در ایجاد مقاومت مؤثر در برابر استرس- های محیطی ژن های وابسته به خانواده عوامل رونویسی هستند. روبیو و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که پروتئین mbc1 که توسط ژن MYBs3 بیان می شود با باند شدن به منطقه ای به نام GATA یک غیر فعال کننده بیان هورمون جیبرلین در دانه های جو می شود. در آراییدوپسیس دو ژن عامل رونویسی از نوع GATA به نام GNC و GNL/CGA1 سبب مهار بیان جیبرلین از طریق افزایش اثر دلا پروتئین می شوند (Richter et al. 2010). پژوهش بر روی موتانت ها در برنج بیان گر این بود که مقاومت به تنش سرما به شدت بسته به بیان ژن MYBs3 می باشد (Su et al. 2010). در این گیاهان افزایش دلا پروتئین و به طبع آن کاهش میزان جیبرلین سبب بروز مقاومت در برابر تنش سرما می شود. در گیاهان رونوشت ژن های کدکننده عوامل رونویسی از جمله خانواده MYB به هنگام بروز تنش های غیر زنده افزایش می یابد. اعضای این خانواده دارای نقش های متعددی هستند. به عنوان مثال AtMYB60 در آراییدوپسیس در مقابله با تنش خشکی، منجر به بسته شدن روزنه ها می شود و یا OsMYB4 در برنج سبب افزایش ساخت اسمولیت ها همچون گلوکز، فروکتوز و پرولین می شود. حسین یار و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می دهند برخی در مواجهه با تنش طولانی مدت واکنش نشان می دهند و خانواده بزرگ MYB ها در گندم برای سازگاری به تنش شوری نقش دارند. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه بیان ژن های عوامل رونویسی (NAC, MYB, WRKY, BHLH,) BZIP را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری مورد بحث قرار دادند و مشاهده کردند که تغییر میزان بیان ژن ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است.

در این مطالعه تغییرات بیان ژن TaMYB73 در شرایط تنش خشکی در پنج رقم گندم نشان دهنده القای بیان این ژن در

از آنجایی که گندم یکی از محصولات استراتژیک کشت شده در مناطق نیمه خشک محسوب می شود، مطالعه ساز و کار مقاومت آن به تنش خشکی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است (Zhang et al. 2012). آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز همانند چرخه گلو تاتیون آسکوربات و پراکسی ردوکسین قادرند پراکسید هیدروژن را تجزیه و به آب تبدیل نمایند (Reddy et al. 2004). کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم ها در این مورد است (Mittler, 2002). این آنزیم پراکسید هیدروژن حاصل از بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و افزایش گلی کولات اکسیداز را در پراکسی زوم جمع آوری می کند (Morita et al. 1994). آنزیم گلو تاتیون پراکسیداز نیز در سیتوسول فعالیت داشته و از گلو تاتیون به عنوان کوفاکتور استفاده می کند (Dixon et al. 1998). افزایش فعالیت این آنزیم به همراه سایر واکنش های دفاعی در سیتوسول کمک شایانی به پایداری در این بخش کرده است.

کاتالاز سلول ها را از تأثیرات پراکسید هیدروژن محافظت می کند. در شرایط عادی حضور کاتالاز در سلول ها، می تواند تأثیر مهمی در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو داشته باشد. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل می کند (Nayyar and Gupta, 2006; Sairam and Saxena, 2000). تولید گونه های فعال اکسیژن از مهمترین عوامل آسیب رسان به سیستم های فتوسنتزی در شرایط تنش های محیطی از جمله تنش خشکی است. یکی از راه های مقابله گیاهان به منظور کاهش آثار مخرب گونه های اکسیژن فعال، تولید آنزیم های آنتی اکسیدان است که در این میان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز از مهم ترین آنزیم های زداینده پراکسید هیدروژن به شمار می آیند (Sairam and Saxena, 2000; Hong and Ji-Yan, 2007). عناصر ریز مغذی مانند روی در بیان ژن های سنتزکننده پروتئین ها و آنزیم آنتی اکسیدان مؤثرند و کوفاکتور افزایش فعالیت این آنزیم ها محسوب می شود (Bagci et al. 2007; Grewal and Williams, 2000). امیری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ در پژوهشی روی گیاه دارویی زیره سبز اعلام

(et al. 2004). در نتیجه رقم ارگ بیشترین و افق کمترین مقدار بیان ژن را دارا بود. طبق پژوهش‌های انجام شده با افزایش تنش خشکی مقدار آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز افزایش پیدا می‌کند و افزایش این نوع از آنزیم‌ها مقاومت گیاه را سبب می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه، بیشترین تغییرات میان فعالیت آنزیم‌های فوق در رقم ارگ مشاهده شد. در نتیجه با توجه به هم پوشانی نتایج مولکولی و فیزیولوژیکی، رقم ارگ به عنوان بهترین رقم تحت شرایط این آزمایش معرفی می‌شود.

سطوح تنش خشکی بود که با پژوهش‌های انجام شده مطابقت دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن MYB در سطح خشکی پنج درصد بیشترین مقدار را داشت و در نتیجه با افزایش تنش، بیان ژن هم افزایش داشت. مطالعات نشان می‌دهد، فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش خشکی و شوری بیان می‌شوند و عوامل رونویسی در تنظیم ژن‌های خشکی نقش دارند (et al. 2006) پروتئین‌های MYB در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی مسئول پاسخ به تنش‌های محیطی شامل سرما، شوری و خشکی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند Jiangb

منابع

- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 13: 1748-1755.
- Allagulova ChR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Mascow)* 68: 945-951.
- Amiri Nejad M, Akbari GhA, Baghizadeh A, AllahDadi A, Shahbaz D, Naimi D. 2015. Effect of drought stress and MhlvlPashy iron and zinc on some biochemical traits Cuminum. *Journal of Crops* 17 (4): 855-866. (In Farsi with English abstract).
- Bagci SA, Ekiz H, Yilmaz A, Cakmak I. 2007. Effects of zinc deficiency and water stress on grain yield of field-grown Wheat cultivars in central Anatolia. *Agronomy and Crop Science* 193(3): 198-206.
- Beers GR, Sizer IV. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195(1): 133-140.
- Chen R, Ni Z, Nie X, Qin Y, Dong G, Sun Q. 2005. Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 169:1146-1154.
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 1997. Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* 35: 393-405.
- De Leonardis AM, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo AM. 2007. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science* 172: 1005-1016.
- Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 258-266.
- Fielding JL, Hall J. 1978. A biochemical and cytochemical Study of peroxidase a activity in root *Journal of Experimental Botany Bot* 29: 98 - 989.
- Garaghanipur N, Shiran B, Khodambashie M, Molaie AR. 2014. Study of Proline accumulation and gene expression of P5CS in leaves and flower buds of common bean cultivars under drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6(4):129-142
- Grewal HS, and Wiliams, R. 2000. Zinc nutrition affects alfalfa response to water stress and excessive moisture. *Plant Nutrition* 23(7): 942- 962.
- Hong W, Ji-Yan J. 2007. Effects of zinc deficiency and drought stress on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea mays* L.). *Agricultural Science in China* 6(8): 988-995.
- Honghong Hu, Mingqiu Dai, Jialing Yao, Benze Xiao, Xianghua Li, Qifa Zhang, Lizhong Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Agricultural Science in China* 12987-12992.
- Hoshyardel F, Hatami Malki H, Darvishzadeh R, Jafari M. 2015. Study of Expression of transcription factor Associated with Resistance to Black Stem Disease in sSunflower 3(2):78-95.
- Jiang C, Gu J, Chopra S, Gu X, Peterson T. 2004. Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb

- genes. Gene 326:13-22.
- Khodabande N. 2010.** Cultivation of crops. Tehran University Press. (In Farsi with English abstract).
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods 25(4): 402-408. (Zea mays L.). Agricultural Science in China, 6(8): 988-995. (In Farsi with English abstract).
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H. 1987.** The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO Journal 6(12), p.3553.
- Nakano Y, Asada K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach Chloroplasts. Plant cell physiology 22(5): 867-880.
- Novillo F, Alonso JM, Ecker J R, Salinas J. 2004.** CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 3985-3990.
- Martin C, Paz-Ares MY. 1997.** BTranscription factors in plants. Trends Genetics 13, pp. 67-73.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7:405-410.
- Morita S, Tasake M, Fujisawa H, Ushimaru T, Tsuji H. 1994.** A cDNA clone encoding a rice catalase isozyme. Plant Physiol 105: 1015-1016.
- Qin X, Zeevaart JAD. 1999.** The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. PNAS 96: 15354-15361.
- Rahaie M, Xue G-P, Naghavi M R, Alizadeh H, Schenk PM. 2011.** The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. Iranian Crop Sciences. 13(3): 580-595. (In Farsi with English abstract).
- Reddy AR, Chiatanya KV, Vivekanandan M. 2004.** Draught induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J Plant Physiol 161(11):1189-1202.
- Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B, Rosolowski M, Ammerpohl O. 2012.** Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. Nature Genetics 44(12):1316-20
- Sairam RK, Saxena GC. 2000.** Oxidative stress and antioxidant in wheat genotype: Possible mechanism of water stress tolerance. Agronomy and Crop Sciences 184(1): 55-61.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki M, Seki M. 2003.** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion Plant Biology 6: 410-417.
- Srmdnya Gh, small A. 1990.** Crop Physiology. Publications University of Mashhad 467 p. (In Farsi with English abstract).
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000.** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 11632-11637.
- Xue GP, Bower NI, McIntyre CL, Riding GA, Kazan K, Shorter R. 2006.** TaNAC69 from the NAC super family of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences. Function Plant Biology 33: 43-57.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S. 2006.** The MYB transcription factor super family of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant molecular biology 60 (1), pp.107-124
- Yamaguchi-Shinazaki K, Shinozaki K. 2005.** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. Trends Plant Science 10: 88-94.
- Yar Hussain M, Heydariyan z, neazaei A , Ramezani I. 2011.** Examined the expression levels of two genes encoding the transcription factors related -MYB family in two varieties of wheat under salt stress. National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. (In Farsi with English abstract).

Study of MYB gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars

Hadis Tabaraki¹, Leila fahmideh^{2*} and Ziba Fooladvand³

1. M.Sc. Student, 2. Assistant Professor, Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
3. Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol. Iran

*Corresponding Author: leila.fahmideh@yahoo.com , l.fahmideh@uoz.ac.ir

Abstract

Drought stress is one of the most important factors reducing wheat quality and quantity. In the past years research on stress, especially drought stress, has focused on plant resistance genes and their mechanism of action. This research has revealed that a majority of the genes that have important roles in biotic and abiotic stress resistance encode transcription factors. In this survey, the level of expression of the *TaMYB73* gene, a gene whose product is involved in transcription in several wheat cultivars (cultivars Chamran2, Afghani calk, Sistan, Arg and Ofogh) was studied under five draught conditions (5, 10, 15, 20 and 25 drought percent) by real-time PCR. Catalase and glycol peroxidase enzyme levels were also measured in drought conditions. The results show that *TaMYB73* gene expression levels and catalase and glycol peroxidase enzyme activity in the Arg cultivar was higher than in the other cultivars. Arg may thus be considered as resistant cultivar.

Key words: *TaMYB73* gene, Real-time PCR, resistant and sensitive cultivars, glycol peroxidase and catalase