Archive of SID

مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۴۴۶-۴۳۳)

# بررسی الگوی بیان ژن‌های MYB در گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت دو تنش کوتاه مدت شوری و سرما با استفاده از راهکار RT-PCR کمی

مهدی رهایی[1*]، محمدرضا نقوی[2]، هوشنگ علیزاده[3]، محمد علی ملبوبی[4]، سیروس عبدمیشانی[5]، پییر شنک[6] و گنگ پینگ ژو[7]
۱، ۲، ۳، ۵، دانشجوی دکتری، استاد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ۶، ۷، استادان دانشگاه کوئینزلند استرالیا
(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۹ - تاریخ تصویب: ۸۸/۹/۱۱)

## چکیده

رشد گیاهان به شدت تحت تأثیر تنش‌های محیطی چون، خشکی، شوری زیاد، درجه حرارت کم یا زیاد قرار می‌گیرد و بر این اساس شناسایی ژن‌هایی که در انطباق یا تحمل تنش نقش دارند و به‌خصوص ژن‌های تنظیم‌گر، بسیار ضروری است. پروتئین‌های MYB یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی هستند که از اهمیت خاصی در تنظیم فرآیندهای نموی و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند. مشخصه اصلی اعضای این خانواده، وجود یک دامین اتصال به DNA (دامین MYB) است که از لحاظ ساختاری حفاظت شده است. به‌منظور بررسی نقش این عوامل تنظیمی و الگوی بیان آنها در زمان تنش در گیاه گندم، تعدادی از قطعات ژنی MYB پس از آنالیز توالی، انتخاب و جهت آنالیز Real Time RT PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت استخراج RNA کل، گیاهچه‌های ۱۳ روزه گندم تحت دو شرایط تنش کوتاه مدت شوری ۲۰۰ میلی مولار و سرمای ۴°C به‌مدت ۰، ۶ ساعت و ۲۴ ساعت قرار گرفته و از ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی آنها به‌طور جداگانه، نمونه‌گیری گردید. آنالیز فیلوژنتیک تعدادی از این ژن‌ها به‌همراه توالی‌های مرجع از آرابیدوپسیس و برنج، آنها را در سه گروه مجزا قرار داد. همچنین آنالیز RT-PCR کمی، نشان داد که بیان اغلب ژن‌های انتخاب شده در پاسخ به تنش تغییر می‌کند و بر این اساس می‌توان آنها را به دستجات مختلفی بر اساس نوع تنش و نوع بافت تقسیم‌بندی نمود. نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان به‌عنوان یک منبع اطلاعاتی مفید، در پروژه‌های مرتبط با همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های MYB در گیاه گندم استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** بیان ژن، عامل رونویسی، MYB، qRT-PCR.

### مقدمه

با ورود به قرن بیست و یکم، استفاده پایدار و سالم از محیط‌زیست و منابع طبیعی و ملاحظات مرتبط با سلامت انسان از مهمترین موضوعات مورد دغدغه بشر است (Rosenberg et al., 1993). این ملاحظات به‌شدت با کشاورزی (غذا)، اکولوژی و محیط‌زیست مرتبط می‌باشد که در این بین، زیست‌شناسی و به‌خصوص زیست‌شناسی گیاهی مهمترین نقش را ایفا می‌نماید و

* نویسنده مسئول: مهدی رهایی تلفن: ۰۹۱۲-۳۰۲۲۷۵۰۲ E-mail: mrahaie@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID



با توجه به آنکه گیاهان تنها منبع تجدید شونده و همچنین مواد و انرژی سازنده را تشکیل می‌دهند، بنابراین زیست گیاهی قدرتمندترین ابزار برای استفاده مناسب از منابع گیاهی می‌باشد (Charlesworth et al., 2001; Bazzaz, 2001; Aharoni et al., 2001). گیاهان غالباً در معرض توده‌ای از شرایط تنش می‌باشند و این شرایط، آنها را از رسیدن به پتانسیل ژنتیکی کامل باز می‌دارد و تولیدات گیاهی را در پهنه جهانی محدود می‌سازد. در واقع تنش غیره زنده، علت اصلی کاهش زراعی جهان و کاهش متوسط عملکرد برای اغلب گیاهان زراعی تا بیش از ۵۰٪ می‌باشد (Bray, 2001). از جمله تنش‌های محیطی، کمبود آب در خاک، وجود املاح نمکی زیاد و درجه حرارت‌های کم و زیاد می‌باشند که به‌شدت رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bartels & Sourer, 2004; Rizhsky et al., 2002). بدین لحاظ گیاهان از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا متحمل می‌سازند (Thomashow, 1999; Shinozaki et al., 2003; Bray et al., 2000). این پاسخ مولکولی و بیوشیمیایی وظیفه‌ای بسیار پیچیده است که نه تنها به طول دورهٔ تنش بستگی دارد بلکه به مراحل نموی و پارامترهای مرفولوژیکی-آناتومیکی گیاهان نیز وابسته است (Bartels & Sourer, 2004; Rizhsky et al., 2002). به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیرهای پیام‌رسانی (Signal Transduction) مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آنها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. فعالیت کامل همه این آبشارهای پیام‌رسانی القاء شده، منجر به انطباق گیاه و در نتیجه تحمل تنش در آن می‌شوند (Xiong & Zhu, 2001; Leonardis et al., 2007). فرآورده‌های این ژن‌ها نه تنها در حفاظت سلول از تنش عمل می‌نمایند بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama et al., 2004). بنابراین می‌توان فرآورده‌های این ژن‌ها را براساس نوع عملکرد آنها، به دو گروه طبقه‌بندی نمود: گروه اول شامل پروتئین‌هایی است که احتمالاً در تحمل تنش نقش دارند همچون چاپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئین‌های اواخر دوره جنین‌زایی (Late Embryogenesis Abundant Protein: LEA)، آنزیم‌های بیوسنتز اسمولیت‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و آنزیم‌های تغییر دهندهٔ لیپیدهای غشایی. گروه دوم شامل عوامل پروتئینی درگیر در تنظیم بیان ژن و پیام‌رسانی در پاسخ به تنش غیرزنده می‌باشند که از این دسته می‌توان مواردی چون پروتئین‌کینازها، آنزیم‌های درگیر در متابولیسم فسفولیپیدها و عوامل رونویسی (Transcription Factor: TF) را نام برد (Yamaguchi-Shinazaki & Shinozaki, 2005; Maruyama et al., 2004). در واقع عوامل رونویسی، پروتئین‌هایی (*trans* acting) هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به توالی‌های خاصی از DNA (*cis* acting)، واقع در ناحیه پروموترهای ژن‌های هدف آنها تقویت یا باز می‌دارند. تشخیص عملکردی عوامل رونویسی برای به‌دست آوردن تصویری کامل از شبکه‌های تنظیمی رونویسی کنترل‌کننده فرآیندهای نموی و فیزیولوژیکی، همچون رشد و تشکیل بافت‌ها و پاسخ به محرک‌های هورمونی یا محیطی، بسیار ضروری است (Riechmann et al., 2000; Gao et al., 2006; Caldana et al., 2005). ژن‌های عوامل رونویسی، بخش قابل توجهی از ژنوم‌های همه یوکاریوت‌ها و از جمله گیاهان آلی را تشکیل می‌دهند (Riechmann et al., 2000). مشخص شده است که در گیاهان، یک عامل رونویسی می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌ها را از طریق اتصال اختصاصی به عنصر *cis*-acting در ناحیه پروموتر ژن‌های هدف، کنترل کند (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2005). همچنین مشخص شده است که خانواده‌های زیادی از این عوامل، تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند که از جمله مهمترین آنها، پروتئین‌های bZIP (Uno et al., 2000)، WRKY (Martin & Paz-Ares, 1997)، DREB (Sakuma et al., 2006; Novillo et al., 2004)، NAC (Xue et al., 2006; Tran et al., 2004)، MYC و MYB شبیه به bHLH (Yamaguchi-Shinazaki & Shinozaki, 2005; Abe et al., 2003) را می‌توان نام برد. پروتئین‌های MYB در واقع کلاس متنوعی از

www.SID.ir

Archive of SID


پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند. از مشخصه مهم این خانواده، داشتن یک دامین اتصال به DNA یعنی، دامین MYB می‌باشد که حفاظت شده است (Hailing & Martin, 1999). یک دامین MYB معمولاً مرکب از یک تا سه تکرار ناقص است که هر تکرار حاوی حدوداً ۵۲ آمینواسید است که یک کنفورماسیون Helix-Turn-Helix را به وجود می‌آورد که در شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرد. به‌عنوان مثال، دامین MYB عامل رونویسی c-MYB پستانداران که به‌خوبی شناسایی شده است مرکب از سه تکرار R1، R2 و R3 می‌باشد (Paz-Ares et al., 1987). به‌طور 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). پروتئین‌های MYB گیاهی به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند: MYB R2R3ها، که حاوی دو تکرار مجاور می‌باشند، MYB R1R2R3 با سه تکرار مجاور هم و یک گروه ناهمگن که در مجموع به‌عنوان پروتئین‌های مرتبط با MYB در نظر گرفته می‌شوند که معمولاً (اما نه همیشه) حاوی تنها یک تکرار MYB هستند (Yanhui et al., 2006). براساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که MYB R1 در تنظیم ساعت بیولوژیک (Schaffer et al., Schaffer et al., 1998 2001) و پروتئین‌های چسبنده به DNA تلومری نقش دارد (Yu et al., 2000). MYB R1R2R3 در تشکیل سایکلین نوع B مؤثر است (Ito et al., 2001). MYB R2R3 بزرگترین و از لحاظ عملکردی متنوع‌ترین زیرخانواده است و نقش‌های مهمی را در تنظیم بیوسنتز آنتوسیانین (Rongmin et al., 2005)، تعیین شکل و ساختار سلولی بافت‌های مختلف گیاهی (Schaffer et al., 2001; Schaffer et al., 1998; Aharoni et al., 2001) و پاسخ به سیگنال جیبرلیک اسید بازی می‌کند (Gubler et al., 2002). ژن‌هایی از زیرگروه MYB R2R3 نیز در پاسخ به تنش (کم‌آبی) و اسید سالیسیلیک (مرتبط با بیماری‌زایی) در آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند و اغلب، جزء ژن‌های تنظیم‌گر مثبت رونویسی محسوب می‌شوند. به‌عنوان مثال، *ZM1*، به‌طور مثبت، بیوسنتز فلاونوئید را با کنترل بیان ژن چالکون سنتتاز (CHS) تنظیم می‌کند (Paz-Ares et al., 1987) و *WER* یک تنظیم‌گر مثبت بیان *GL2* (Lee & Schiefelbein, 2001) می‌باشد. اما ژن MYB R2R3 می‌تواند، به‌عنوان تنظیم‌گر منفی نیز عمل نماید. به عنوان مثال، اورتولوگ *AMMYB305* گل میمون در آرابیدوپسیس، یعنی *AtMYB4*، تجمع سیناپلی‌لاملات را با جلوگیری از بیان ژن سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) تنظیم می‌کند (Jin et al., 2000).

هدف از این تحقیق، این بود که با توجه به نقش مهم خانواده MYB در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه، الگوی بیان این ژن‌ها در زمان تنش در گیاه گندم بررسی شود. برای این منظور تعدادی از قطعات ژنی کاندید MYB انتخاب و پس از آنالیز توالی و همچنین همریفی (Alignment) با ژن‌های MYB متناظر در گیاه آرابیدوپسیس و برنج، مورد آنالیز RT-PCR کمی قرار گرفتند.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و تیمارهای تنش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: رقم‌های گندم SB169 (به‌عنوان رقم متحمل) و SB165 (به‌عنوان رقم حساس) که هر دو از تلاقی رقم‌های Babex و Seri M82 در CSIRO استرالیا به دست آمده‌اند و نتایج آزمایشات مزرعه‌ای و آزمایشگاهی متحمل و حساس بودن آنها را ثابت کرده‌اند. از سیستم هیدروپونیک جهت اعمال تیمار شوری و سرما استفاده شد. برای اعمال شوری و سرما، گیاهان سیزده روزه گندم را به‌مدت ۰، ۶ و ۲۴ ساعت، به‌طور جداگانه در معرض شوری ۲۰۰ mM (NaCl) و درجه حرارت ۴°C قرار داده و سپس نسبت به نمونه‌گیری از آنها اقدام گردید. از هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار ۵ بوته مورد نمونه‌برداری از قسمت‌های هوایی و ریشه قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، بلافاصله آنها را در نیتروژن مایع قرار داده و برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



**دستورزی داده‌ها**

از تجزیه داده‌های حاصل از میکروآرایه (Mott & Wang, 2007) و استفاده از The Assembled Tentative Sequences (TCs) واقع در بانک اطلاعاتی شاخص ژن گندم (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/) به‌عنوان نقطه شروع برای انتخاب توالی‌های مناسب ژن‌های MYB و آنالیز بیوانفورماتیک بیشتر استفاده شد. گفتنی است که TC در واقع، یک توالی توافقی بین ESTهای یک ژن است که با همردیفی آنها به‌وجود آمده است. علاوه بر ESTها، TCها شامل ETها نیز می‌شوند که شامل رونوشت‌های پیش‌بینی شده (PT) و یا همسانه‌سازی شده‌اند. همردیفی جفتی (Pairwise Alignment) توالی و مقایسه این TCها جهت جلوگیری از تکرار و همچنین انتخاب بهترین توالی استفاده شد. توالی‌های با ۹۸٪ تشابه، به‌عنوان توالی‌های یکسان در نظر گرفته شده و از تکرار آنها خودداری شد. جهت کسب اطلاع بیشتر راجع به این توالی‌ها و همردیفی با نمونه‌های معادل در برنج و آرابیدوپسیس، از نرم‌افزار BLASTX استفاده گردید. از طریق کاوش توالی‌ها در Prosite و بانک اطلاعاتی دامین در NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrps cgi)، وجود دامین حفاظت شده حاوی تکرار MYB، ثابت گردید. در نهایت از تعداد زیادی قطعات ژنی MYB، ۱۱ ژن جهت آنالیز qRT-PCR انتخاب گردید[1].

**استخراج RNA و آنالیز RT-PCR کمی**

RNA کل از بافت‌های ریشه و قسمت‌های هوایی گیاهان گندم با استفاده از کیت استخراج RNA گیاهی شرکت (Promega) استخراج گردید. جهت حذف DNA باقیمانده در نمونه‌های RNA، از DNase I (Invitrogen) استفاده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق تیمار شدند. سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت، همراه با یک واحد آنزیم Superscript III از شرکت Invitrogen و با استفاده از مخلوطی از آغازگرهای Oligo dT و تصادفی (۶ نوکلئوتیدی) سنتز شد. جهت کنترل کیفیت RNA، نمونه‌های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و اسپکتروفتومتری، آزمایش شدند. RT-PCR کمی، جهت تکثیر رونوشت‌های ژن‌هایMYB، با به‌کارگیری آغازگرهای موجود در جدول ۱ و با استفاده از سیستم تشخیص توالی ABI Prism 7900، (Applied Biosystem) و روش SYBR Green، مطابق با دستورالعمل‌های دستگاه شامل ۳ میکرولیتر از SYBR Mix (حاوی SYBR Green، *Taq* DNA پلیمراز و بافر PCR)، ۲ میکرولیتر از محلول حاوی جفت آغازگر (با غلظت هر کدام ۱ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر از محلول cDNA (غلظت ۱۰ نانوگرم/میکرولیتر) انجام شد.

ژن‌های *TaRPII36* (زیر واحد *T. aestivum* RNA polymerase II 36 kDa، TC235230) و *TaRP 15* (زیر واحد *T. aestivum* RNA polymerase I, II and III, 15 kDa، TC265122)، به‌عنوان ژن‌های مرجع، جهت محاسبه سطح بیان نسبی ژن‌های MYB، استفاده شدند. اختصاصی بودن آغازگرها جهت واکنش PCR با دو روش زیر تأیید شدند:

۱. وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیر شده PCR

۲. رؤیت یک باند تکی بروی ژل آگاروز (شکل ۱).

سطح نسبی بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با ژن‌های کنترل مرجع، با استفاده از فرمول ارایه شده توسط Pfaffl (2001) محاسبه گردید:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{ref})^{CP\ Sample}}{(E_{target})^{CP\ Sample}} \div \frac{(E_{ref})^{CP\ Calibrator}}{(E_{target})^{CP\ Calibrator}}$$

**آنالیز همردیفی و روابط خویشاوندی**

به‌منظور آنالیز روابط خویشاوندی و گروه‌بندی ژن‌های انتخاب شده و همچنین تعیین میزان تشابه ژن‌ها، در ابتدا با توالی‌های مربوط به دامین‌های اتصال به DNA یا دامین‌های MYB حاصل از ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی به توالی‌های پروتئینی استخراج و با استفاده از روش CLUSTAL W (Jeanmougin et al., 1998)، مورد همردیفی چندگانه (Multiplex Alignment) قرار گرفتند و سپس با استفاده از نرم افزار MEGA3 (Kumar et al., 2004) و بر اساس روش NJ

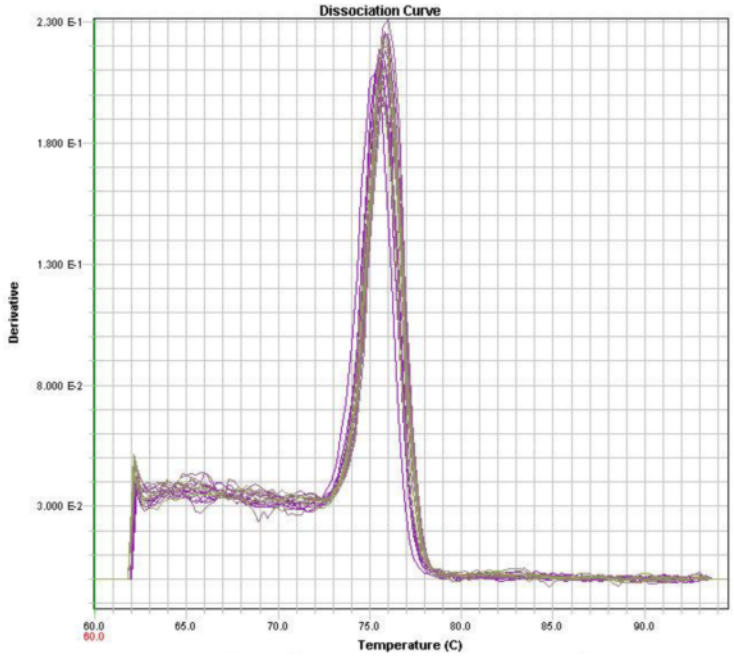
۱. در حال حاضر شماره ID این قطعات ژنی در بانک اطلاعاتی TaGI تغییر کرده است و شماره‌های جدید به‌صورت تیره (داخل پرانتز) در جدول ۱ آورده شده است. ولی از IDهای جدید در متن مقاله به لحاظ حفظ فرمت اولیه استفاده نگردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID


جدول ۱- توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR کمی

| TC Number | آغازگر رفت 5′→3′ | آغازگر برگشت 5′ →3′ |
|---|---|---|
| TC238371 (**TC335859**) | TCGGACTTCGTTGACAATACTC | CGAGTTCGTGCTTGGTTTAAG |
| TC238729 (**TC277220**) | GGTGTTTCTAAAGTCCCCAGTTAG | GGTATTGCGTGTAAGCGTGCTC |
| TC251032 (**TC354050**) | TTCCGTCAAAGCTTGAAAGTGC | TCAATGGAGGGAAAAGGGAGTAAC |
| TC256962 (**TC326615**) | TGCAGTTTGAAGAGTCATGGAATG | GCGCAGGAGCTTACGCAAC |
| TC253140 (**TC282418**) | TGGGCATGTCGAAGCTAAG | CCTGGAAAGCCGATTGTC |
| TC270358 (**TC301150**) | TACAACTCCTTTGGAAGCTGAAAC | CCAGCCTGATTGCATCATC |
| TC236359 (**TC304281**) | GGATGGAAACCAGCGACAC | TCTAAATCTGCGACAAACTCTGTATG |
| CJ613648 (**BT008981**) | ATCATGCATTTCTTCCGAGTTC | CAGTTCGATCTCCCGTTCTC |
| TC236628 (**TC280669**) | GGACGCACATGAGGAAGAAG | GTCGTAAGCGACGTGGAGTC |
| TC269486 (**TC282770**) | AGCATTCCAAGTGGGCTCATG | GAATACAGAGTGGAAGTGTCCTTGC |
| TC251026 (**TC300748**) | AGACGCTTGTGTTCTCCTTGTACTG | CGGAAACTGTACAAATGTCACTGC |




شکل۱- نمونه‌ای از سیگنال‌های تک پیکی که در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیر شده PCR (تمام ژن‌های MYB) به‌دست آمده است.

(Neighbor-Joining)، دسته‌بندی شده و درخت روابط خویشاوندی تشکیل شد. از آزمون Bootstrap جهت تعیین و دقت برازش درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. همچنین جهت کسب اطلاع بیشتر، در گروه‌بندی این توالی‌ها از توالی‌های مرجع از آرابیدوپسیس و برنج و همچنین توالی‌های مرجعی که به‌عنوان Query ژن‌های زیرخانواده MYB آرابیدوپسیس در بانک اطلاعاتی RARTF (Iida et al., 2005) معرفی شده‌اند، استفاده گردید. این توالی‌ها عبارت بودند از: *ATR1*، *WEREWOL*، *GL1*، *CAPRICE* و *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED*.

**تجزیه آماری**

به‌منظور تجزیه آماری و تعیین سطح معنی‌داری نتایج حاصل از آنالیز تفاوت سطوح بیان نسبی ژن‌ها در

www.SID.ir

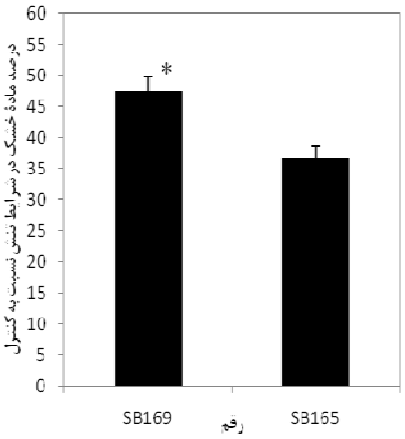
Archive of SID



مقایسه با ژن مرجع، از آزمون F (تجزیه واریانس) و در قالب آزمایش فاکتوریل و در سطح احتمال P = ۰/۰۵ استفاده گردید. مقایسه میانگین‌های سطوح بیان نسبی، با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

## نتایج

در این مطالعه، ۱۱ قطعه ژنی حاوی تکرارهای MYB (دامین MYB) از طریق تجزیه آماری روی داده‌های میکروآرایه و شناسایی ESTهای مربوطه (TCs) از بانک اطلاعاتی انتخاب شدند. برای کسب اطمینان و همچنین به‌دست آوردن اطلاعات بیشتر راجع به این توالی‌ها از منظر عملکردی، با استفاده از برنامه BLASTX، همولوگ‌های این قطعات ژنی در ژنوم برنج و آرابیدوپسیس شناسایی شدند (جدول۲) و روابط خویشاوندی این قطعات به‌همراه همولوگ‌های خود با تشکیل یک درخت فیلوژنتیک به‌دست آمد (شکل۴). جهت تأیید و بررسی الگوی بیان این قطعات ژنی، گیاهان گندم به‌طور جداگانه تحت دو تنش کوتاه مدت شوری (۲۰۰mM) و سرما (۴°C)، مورد آنالیز RT-PCR کمی قرار گرفتند. اندازه‌گیری ماده خشک در دو رقم فوق (میانگین تمام تکرارها) و سپس تعیین درصد کاهش ماده خشک در شرایط تنش در دو رقم حساس و متحمل نسبت به حالت کنترل، نشان داد که این درصد کاهش، در رقم متحمل کمتر از رقم حساس بوده و از این لحاظ، صحت آزمایش در ارتباط با انتخاب این دو رقم به عنوان مواد آزمایشی را تأیید نمود (شکل ۲).




شکل۲- درصد ماده خشک در دو رقم حساس (SB165) و متحمل (SB169) در شرایط تنش نسبت به حالت کنترل

### آنالیز توالی دامین و روابط خویشاوندی

همردیفی دامین روی توالی‌های حفاظت شده ناحیه اتصال به DNA (دامین MYB) بر روی هشت عدد از این قطعات ژنی با استفاده از روش CLUSTAL W نشان داد که نمی‌توان نواحی کاملاً حفاظت شده‌ای را در بین تمام دامین‌ها، مشاهده نمود. به‌طوری که قطعات ژنی TC269486، TC236359، CJ613648 و TC236628 که هر یک حاوی دو دامین MYB می‌باشند دارای دو ناحیه حفاظت شده مشابه و قطعات ژنی TC270358 و TC238729 که حاوی یک دامین MYB می‌باشند، دارای دو ناحیه حفاظت شده دیگر در ناحیه دامین خود می‌باشند. همچنین به‌نظر می‌آید که TC251026 و TC251032 از لحاظ توالی ناحیه اتصال به DNA بسیار شبیه به یکدیگر باشند هرچند که نتایج

جدول۲- نتایج بررسی همولوژی توالی (BLASTX) ژن‌های MYB بین گندم، برنج، آرابیدوپسیس

| TC Number | Rice Gene ID | BLAST X E value | Arabidopsis Gene ID | BALST X E value |
|---|---|---|---|---|
| TC238371 | OS06g0728700 | 1e-108 | AT5G17300 | 9e-26 |
| TC 238729 | OS05g0491500 | 3e-127 | AT2G01060 | 5e-58 |
| TC251032 | OS02g0680700 | 3e-106 | AT5G52660 | 2e-86 |
| TC256962 | OS01g0187900 | 2e-61 | AT3G16350 | 8e-15 |
| TC253140 | OS10g0561400 | 3e-99 | AT5G47390 | 7e-46 |
| TC270358 | OS12g0105600 | 3e-46 | AT2G38300 | 6e-31 |
| TC236359 | OS02g0624300 | 4e-95 | ATMYB15/ATY19/MYB15 | 8e-66 |
| CJ613648 | OS06g0258000 | 1e-111 | Myb43 | 2e-69 |
| TC236628 | OS05g0114700 | 2e-57 | Myb111 | 1e-51 |
| TC269486 | Os12g0567300 | 9e-119 | Myb59 | 7e-68 |
| TC251026 | OS06g0105800 | 5e-107 | AT5G52660 | 4e-82 |

www.SID.ir

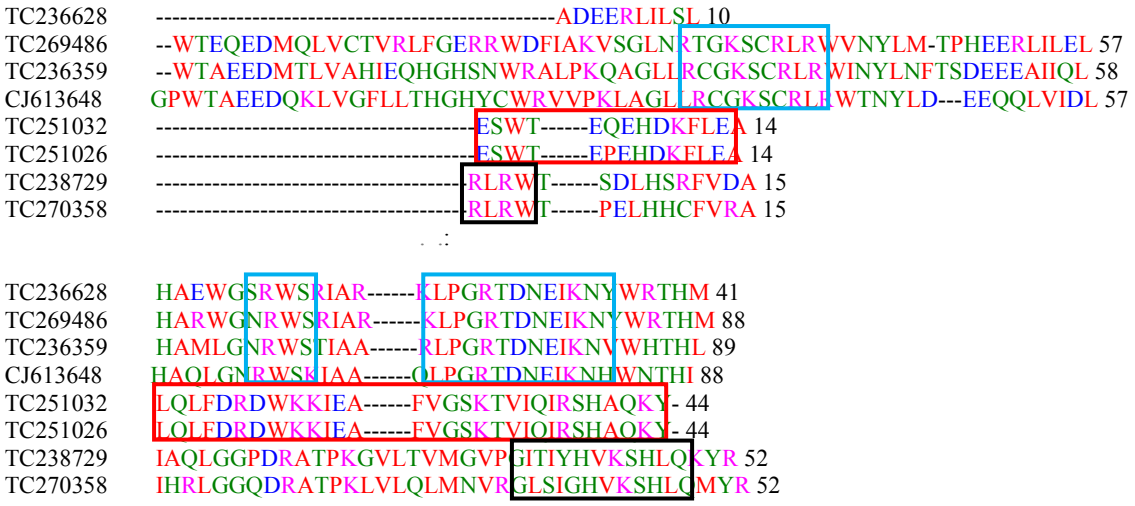
Archive of SID


همردیفی چندگانه در نواحی دیگر این قطعات (به سمت دامین فعال‌سازی رونویسی یا انتهای C)، شباهت و همولوژی کمتری را نشان داد. تفاوت بین این دو قطعه اخیر در ناحیه اتصال به DNA تنها در یک اسید آمینه بود (پرولین در TC251032 بوسیله گلوتامین در TC251026جایگزین شده است) (شکل ۳).

همچنین به‌منظور تعیین روابط خویشاوندی این قطعات ژنی، درخت فیلوژنتیک، براساس توالی آمینواسیدی ناحیه اتصال به DNA، با به‌کارگیری نتایج حاصل از روش CLUSTAL W و با استفاده از نرم افزار MEGA3 ترسیم شد که در نتیجه آن قطعات ژنی به سه گروه مجزای MYB R2R3 و MYB R1 و MYB Related تقسیم‌بندی شدند. شکل ۴، نتایج گروه‌بندی این توالی‌ها را نشان می‌دهد. همچنان که در این شکل مشخص است، توالی‌های مرجعی که به‌عنوان Query ژن‌های زیرخانواده MYB آرابیدوپسیس از بانک اطلاعاتی RARTF انتخاب شده بودند، در دو گروه اول قرار گرفتند که این نشان می‌داد که توالی‌های قرار گرفته در گروه سوم (MYB Related)، جدید و یا شباهتی با توالی‌های مرجع حاصل از آرابیدوپسیس ندارند.

**آنالیز بیان ژن**

به‌منظور بررسی الگوی بیان این قطعات ژنی در شرایط تنش، گیاهچه‌های ۱۳ روزه گندم از دو رقم حساس و متحمل، تحت تنش کوتاه مدت شوری و سرما بر اساس دستورالعمل موجود در قسمت مواد و روش‌ها، قرار گرفتند. از این دو رقم، RNA کل از هر دو بخش هوایی و ریشه به‌صورت مجزا استخراج و سپس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، مورد آنالیز Real Time RT-PCR قرار گرفتند. شکل ۵ به‌صورت شماتیک، نتایج این آنالیز را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بیان سه قطعه ژنی TC238371، TC251026 و TC251032 در هر دو شرایط تنش و در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس و در هر دو بافت هوایی و ریشه، افزایش یافته است. بنابراین می‌توان استنباط کرد که این قطعات ژنی، مرتبط با پاسخ به تنش در گیاه گندم هستند و صرف‌نظر از ژنوتیپ، در پاسخ به تنش در گیاه گندم بیان می‌شوند. برخی از قطعات ژنی فقط در یک ژنوتیپ، بیان‌شان تغییر و میزان آن افزایش یافت (TC238729 در بافت ریشه و در تنش سرما در رقم SB169). برخلاف این ژن‌ها، قطعات ژنی TC256962، TC269486 در تنش شوری و در بافت هوایی و قطعات ژنی TC270358، TC236359 و CJ613648 در تنش سرما و در بافت ریشه و در هر دو رقم حساس و مقاوم بیان‌شان کاهش یافت. در تنش سرما، بیان اغلب ژن‌ها در زمان تیمار ۶ ساعته، تغییر کرد و در زمان ۲۴ ساعت دوباره به حالت اولیه بازگشتند که این بدان معنی است که اغلب این ژن‌ها، در پاسخ به شوک سرما بیان و



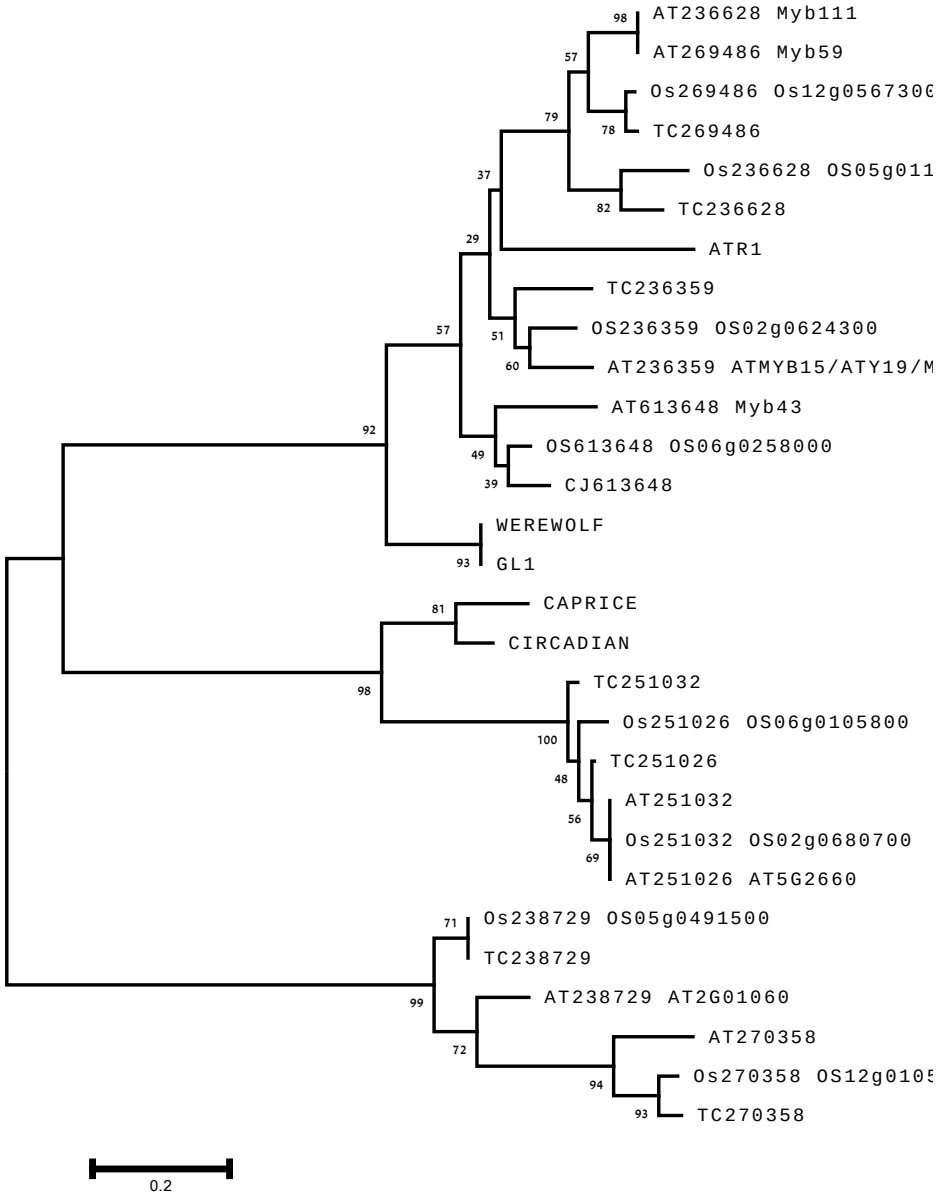

شکل ۳- همردیفی توالی آمینواسیدی ناحیه دامین MYB بین هشت قطعه ژنی حاوی این دامین در گندم. نواحی داخل کادر، توالی‌های حفاظت شده را نشان می دهند.

www.SID.ir

Archive of SID



سپس به حالت اولیه باز می‌گردند، در حالی که در تنش شوری، بیان اغلب ژن‌ها در ۶ ساعت شروع و اغلب تا ۲۴ ساعت ادامه می‌یافت، یعنی ژن‌های انتخاب شده اغلب، به محرک شوری پاسخ می‌دهند. الگوی بیان برخی از این ژن‌ها در دو بافت هوایی و ریشه با هم تفاوت داشت. در کل می‌توان ژن‌های فوق را بر اساس الگوی بیان‌شان در چهار گروه کلی قرار داد: ۱- ژن‌هایی که در هر دو تنش کوتاه مدت و در هر دو رقم افزایش بیان نشان می‌دهند؛ شامل، TC238371، TC251026 و TC251032 ۲- ژن‌هایی که در هر دو رقم و تنها در یک تنش کاهش بیان نشان می‌دهند؛ شامل، TC256962، TC269486 و CJ613648 ۳- ژن‌هایی که در یک تنش و تنها در یک رقم بیان‌شان تغییر می‌کند؛ شامل، TC238729 (SB169) ۴- ژن‌هایی که در یک تنش کاهش و در یک تنش افزایش را نشان می‌دهند؛ شامل، TC269486.




شکل ۴- درخت روابط خویشاوندی بر اساس توالی دامین MYB گندم، برنج و آرابیدوپسیس و توالی‌های مرجع زیر خانواده‌های MYB آرابیدوپسیس (*ATR1*، *WEREWOL*، *GL1*، *CAPRICE* و*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED*). همردیفی توالی‌ها با استفاده از روش CLUSTAL W و گروه‌بندی آنها با استفاده از روش Neighbor–Joining، قطعات ژنی MYB را در سه گروه اصلی قرار داد.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir