Archive of SID

Crop Biotech.
Autumn (2018) 23: 25-39.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، شماره بیست‌وسوم، پائیز ۱۳۹۷ (۳۹-۲۵)

بررسی الگوی بیان ژن‌های عوامل رونویسی (MYB و WRKY) تحت تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای یونجه زراعی با استفاده از PCR در زمان واقعی

احمدعلی شوشی‌دزفولی[1]*، سید احمد کلانتراحمدی[1]

۱. استادیاران پژوهش بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، دزفول، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۳)

Gene expression patterns of some transcription factors (MYB and WRKY) under salt stress in the seedling stage of Alfalfa using qPCR

Ahmad Ali Shoushi Dezfuli[1]*, Seyed Ahmad Kalantar Ahmadi[1]

1. Assistant Professor Seed and Plant Improvement Institute Department, Safiabad Agricultural and Natural Resource Research Center, AREEO, Dezful, Iran.

(Received: Dec. 28, 2017 – Accepted: Oct. 25, 2018)

چکیده

یکی از عمده‌ترین مشکلات در تولید و گسترش سطح کشت یونجه در جهان و از جمله ایران، شوری است. در گیاهان شناخت کامل مکانیسم‌های تحمل و ژن‌های درگیر در شرایط تنش می‌تواند باعث بهبود تحمل تنش‌های مختلف در گیاهان زراعی با استفاده از روش‌هایی چون دستکاری ژنتیکی شود. یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل تنش در گیاهان، تنظیم در مرحله رونویسی ژن‌هاست. عوامل رونویسی از طریق اتصال به عناصر رونویسی در پروموتور DNA میزان بیان بسیاری از ژن‌ها را تنظیم می‌کنند و بنابراین اهمیت بسزایی در تحمل تنش شوری در گیاهان دارا می‌باشند. در این پژوهش میزان بیان ٤ ژن از عوامل رونویسی MYB (MYB112 و MYB14) و WRKY (WRKY53 و WRKY70) تحت تنش شوری در بافت برگ و ریشه ژنوتیپ یزدی (به عنوان ژنوتیپ متحمل شوری) و ژنوتیپ دیابلورده (به عنوان ژنوتیپ حساس شوری) مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب ژن‌های مذکور بر اساس تجزیه آماری داده‌های ریزآرایه یک مطالعه مربوط به تأثیر تنش شوری بر گیاه یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) بود. تنش شوری کوتاه مدت باعث ایجاد تنوع قابل ملاحظه در بیان ژن‌های مذکور در بافت برگ و ریشه دو ژنوتیپ یزدی و دیابلورده گردید. با کمک آنالیز qRT-PCR (PCR در زمان واقعی) مشخص شد که بیان بالاتر فاکتورهای رونویسی MYB112 و MYB14 تحمل بیشتر به تنش شوری را به‌همراه داشته است. این یافته می‌تواند به‌نژادگران نبات را برای استفاده از این عوامل رونویسی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به نمک در یونجه‌های زراعی یاری نماید.

واژه‌های کلیدی: qRT-PCR، شوری، MYB، WRKY، یونجه.

Abstract

Salinity is one the major problems for production and increasing the area under cultivation around the world and Iran. Understanding of defense mechanisms and genes involved could improve tolerance to different stresses in crops by using some methods such as genetic manipulation. Regulation in the gene transcription phase is one the most methods to control stress in plants. Transcription factors thought binding with transcription elements in DNA promoters regulate genes expression which plays a key role in tolerance to salinity stress in plants. An experiment was conducted to evaluate four genes expression of transcription factors of MYB (MYB14 and MYB112) and WRKY (WRKY53 and WRKY70) in leaf and root tissue of Yazdi genotype (tolerant genotype to salinity) and Diabloverde (sensitive genotype to salinity) under salinity stress. The selection of these genes was based on the statistical analysis of the microarray data that was related to a study on the effect of salinity stress on *Medicago truncatula*. Short-term salinity stress caused a significant variation in the expression of these genes in leaf and root tissues of Yazdi and Diabloverde genotypes. Real-Time PCR analysis revealed that higher expression of transcription factors (MYB112 and MYB14) associated with more tolerance to salinity stress. This finding could be assisted plant breeders to apply these transcriptional factors to choose tolerant genotypes to salinity in alfalfa.

Keywords: qRT-PCR, Salinity, MYB, WRKY, Alfalfa.

* نویسنده مسئول: احمدعلی شوشی دزفولی

E-mail: aashoushi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یونجه با نام علمی (*Medicago sativa* L.) از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که از قابلیت محصول‌دهی بالایی در دامنه وسیعی از شرایط اقلیمی برخوردار می‌باشد (Heidari Sharif Abad, 2001). بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی متوسط سطح زیر کشت یونجه در ایران در سال زراعی ۹۵-۹۴، ۶۵۰ هزار هکتار و در طی ده سال منتهی به سال ۱۳۸۳، حدود ۶۰۰ هزار هکتار (مقام هشتم جهانی) بوده است (Motahari *et al*., 2005). ایران بعد از چین، هند و پاکستان بیشترین اراضی شور را در سطح جهانی داراست (Kafi *et al*., 2010). یونجه از نظر مقاومت به شوری در گروه گیاهان نیمه متحمل قرار دارد، به‌طوری‌که شوری بیش از دو دسی‌زیمنس بر متر موجب کاهش رشد و عملکرد آن می‌گردد (Noble *et al*., 1984). یکی از عوامل مؤثر در کاهش تولید یونجه، شوری منابع آب و خاک می‌باشد که بر کمیت و کیفیت علوفه اثر می‌گذارد (Yarnia *et al*., 2001). لذا با توجه به سطح بالای اراضی شور در ایران، یکی از مهم‌ترین عوامل توسعه کشت یونجه در ایران، امکان کشت همراه با تولید محصول مناسب در مناطق شور می‌باشد. نشان داده شده‌است که گیاهان پس از بروز تنش، در سطح مولکولی سیستم علامت‌دهنده، موجب القای ژن‌های مشخصی در مقابل آثار زیان‌آور تنش‌های محیطی می‌شود که محصولات برخی از این ژن‌ها در حفاظت از گیاه شرکت کرده و موجب حفظ ساختار سلولی می‌شوند (Bartels and Sunkars, 2005).

شناخت کامل مکانیسم‌های تحمل و چگونگی عملکرد ژن‌های درگیر در شرایط تنش می‌تواند باعث بهبود تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان زراعی با استفاده از روش‌هایی چون دستکاری ژنتیکی شود (Li *et al*., 2005). امروزه چندین روش جهت بررسی تغییرات بیان ژن در گیاهان ارائه شده است که یکی از مفیدترین این روش‌ها برای مطالعه مکانیسم‌های پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، بررسی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از تکنیک ریزآرایه (Microarray) می‌باشد. براساس مطالعات ریزآرایه مشخص گردیده است که ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به سه شکل به این تنش‌ها عکس العمل نشان می‌دهند. در نوع اول ژن‌ها بصورت پروتئین‌های کارکردی عمل می‌کنند مانند پروتئین‌های انتقال دهنده آب و پروتئین‌های انتقال دهنده در غشاء سلولی و نوع دوم پروتئین‌هایی هستند که نقش انتقال دهنده سیگنال را به عهده داشته و نوع سوم نقش تنظیمی در بیان ژن‌ها را دارا می‌باشند مانند فاکتورهای رونویسی و کینازها (Chinnusamy *et al*., 2005). فاکتورهای رونویسی از طریق اتصال به به عناصر رونویسی در پروموتور DNA میزان بیان بسیاری از ژن‌ها را تنظیم می‌کنند و بنابراین دارای اهمیت زیادی در مبحث انتقال ژن برای اصلاح گیاهان جهت تحمل تنش شوری می‌باشند (Yamaguchi and Shinozaki, 2005).

یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل تنش در گیاهان تنظیم در مرحله رونویسی ژن‌هاست (Wang *et al*., 2003). در ژنوم‌های گیاهی توالی‌های زیادی به عنوان فاکتورهای رونویسی وجود دارند. در گیاه آرابیدوپسیس ژن‌های فاکتورهای رونویسی در حدود ۶ درصد از کل ژنوم (بیش از ۱۵۰۰ ژن) می‌باشد (Riechmann *et al*., 2000). بین کلیه فاکتورهای رونویسی بعضی از آن‌ها مانند خانواده‌های ژنی AP2/EREBP (Apetala2/ Ethylene Response Element Binding Protein)، bZIP/HD-ZIP (basic leucine ZIPper/ HomeoDomain-leucine ZIPper)، MYB (MYeloBlastosis)، HSF (Heat Shock Factor) و WRKY در پاسخ به تنش نقش دارند (Jiang and Deyholos, 2006). آزمایش‌های متعددی در خصوص بررسی و شناخت سازوکار پاسخ و تحمل به عوامل نامساعد محیطی از طریق تجزیه

www.SID.ir

Archive of SID

الگوی بیان ژن‌های مختلف و از جمله عوامل تنظیم‌گر انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌ها در مقیاس وسیع در شرایط تنش شوری (Kawaura *et al*., 2008) و مطالعه تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش غیر زنده مثل شوری (Mott and Wang, 2007) اشاره نمود. یکی از خانواده‌های فاکتورهای رونویسی، خانواده MYB (Myeloblastosis) است که که دارای یک دمین یا حوزه (در ساختمان سوم پروتئین‌ها، نواحی از پلی پپتیدها و با عملکردی خاص را که می‌توانند به طور مستقل تا گردند و با قطعه مشخصی از DNA ارتباط داشته باشند را domain می‌گویند) محافظت‌شده متصل‌شونده به DNA می‌باشد. MYB ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های ژنی در گیاهان هستند که دارای یک تا سه تکرار محافظت شده (R1، R2 و R3) در دمین متصل شونده به DNA بوده و اغلب با فاکتورهای رونویسی bHLH همکاری می‌کنند (Ramsay and Glover, 2005). این تکرارهای محافظت‌شده تشکیل یک ساختار مارپیچ دور مارپیچ می‌دهند که شامل ۵۱ الی ۵۳ اسید آمینه می‌باشد (Stracke *et al*., 2001).

گیاهان حاوی طیف وسیعی از ژن‌های MYB می‌باشند که تنوع بسیار بالایی در ساختمان و عملکرد دارند به‌طوری‌که خانواده ژنی MYB یکی از بزرگ‌ترین فاکتورهای رونویسی در گیاهان است و به‌عنوان ابر خانواده ژنی در نظر گرفته می‌شوند (Du *et al*., 2009). به‌طور کلی MYB ها در مسیرهای بیوسنتزی ثانویه، کنترل مرفولوژی سلول، تقسیم سلول، دخالت در بیماری‌ها یا مقاومت به آن و پاسخ به استرس‌های بیرونی دخالت دارند (Du *et al*., 2009). بسیاری از ژن‌های R1R2-MYB در تنظیم پاسخ به استرس‌های محیطی نظیر سرما، خشکی و شوری نقش دارند که احتمالاً از طریق تغییر هورمونی اکسین و ابسزیک اسید انجام می‌شود (Jianga *et al*., 2009). در سال‌های اخیر ژن‌های MYB که تنظیم‌کننده فلاونوئیدها هستند به‌صورت وسیعی در گیاهان مختلف مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. یکی از مهم‌ترین مشتقات فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها هستند که از ویژگی‌های مهم آن‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Lin-Wa *et al*., 2010). مطالعات زیادی نقش مهم عوامل رونویسی MYB را در تحمل تنش‌های غیر زیستی نشان داده است. در گیاه آرابیدوپسیس فاکتور رونویسی AtMYB73 از طریق افزایش بیان ژن‌های SOS1 و SOS3 باعث افزایش تحمل به شوری شده است (Kim *et al*., 2013). همانند گیاه آرابیدوپسیس در گیاهان تراریخته سویا نیز افزایش بیان AtMYB44 از طریق تنظیم اسید آبسیزیک و در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها، تحمل به شوری را در سویا افزایش داده است (Seo *et al*., 2012). افزایش بیان فاکتور رونویسی OsMYB3R-2 و OsMYB2 در برنج تراریخته تحمل به شوری، خشکی و یخزدگی گیاه را افزایش داده و حساسیت به آبسیزیک اسید را کاهش داده است (Dai *et al*., 2007; Yang *et al*., 2012).

Postnikova و همکاران (2013) با بررسی اثر تنش شوری بر دو ژنوتیپ یونجه AZGERM SALT-II (متحمل به شوری) و AZ-88NDC (حساس به شوری)، در واریته متحمل به شوری، ۱۰ نوع فاکتورونویسی MYB که در تنش شوری تفاوت میزان بیان نسبت به شاهد داشتند، شناسایی کردند از بین این ۱۰ فاکتور رونویسی ۴ نوع افزایش بیان و ۶ نوع کاهش بیان نشان دادند.

یکی دیگر از خانواده‌های فاکتورهای رونویسی، خانواده WRKY است. این خانواده جزء ۱۰ خانواده بزرگ ژنی در گیاهان عالی می‌باشند و مانند دیگر خانواده‌های ژنی گیاهی، طی تکامل گیاهان گسترش یافته‌اند. اولین گزارش‌ها از نقش مهم این فاکتورها، در زمینه تنظیم پاسخ گیاهان به پاتوژن‌ها بود. پژوهش‌های بعدی دیگر نقش‌های تنظیمی این فاکتورهای رونویسی را در رویش دانه، تکوین دانه،

www.SID.ir

Archive of SID

پیری، پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نیز نشان دادند (Rushton *et al*., 2010). نقش تنظیمی بعضی از فاکتورهای رونویسی WRKY در تحمل گیاهان به شوری مشخص گردیده است. در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس افزایش بیان ژن‌های TaWRKY2 و TaWRKY19 باعث تحمل به شوری شده است (Nie *et al*., 2012). علاوه بر این در گیاه آرابیدوپسیس نقش مهم عوامل رونویسی WRKY25 و WRKY33 در تحمل تنش‌های گرما و شوری گزارش شده است (Jiang and Deyholos, 2009). در گیاه تنباکو نیز افزایش بیان TaWRKY10 باعث بالا رفتن تحمل گیاه به تنش‌های خشکی و شوری از طریق تنظیم فشار اسمزی و حذف گونه‌های فعال اکسیژن گردیده است (Wang *et al*., 2013).

در چند سال اخیر یونجه یکساله *Medicago truncatula* به عنوان یک گیاه مدل بسیار مطلوب برای مطالعات ژنتیکی به دلیل ژنوم کوچک (Mbp ۵۰۰) و دیپلوئید، خودباروری گیاه، سیکل زندگی کوتاه و همچنین بررسی‌های وسیع ژنتیکی، مورد توجه محققین بوده است. خصوصیات ذکر شده باعث شده که این گیاه به عنوان یک گیاه مناسب برای تشخیص ژن‌های متحمل به تنش‌های غیر زنده و بهنژادی برای این ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Cook, 1999). مطالعات زیاد مولکولی در این گیاه مدل باعث شده حجم عظیمی از داده‌های مرتبط با توالی یابی ژنومی و آنالیز بیان ژن از آن در پایگاه‌های داده فراهم شده باشد (Young *et al*., 2005).

علی‌رغم وجود اطلاعات زیاد در زمینه تأثیر شوری بر الگوی ترانسکریپتوم یونجه *M. truncatula*، گزارشات اندکی در زمینه فوق در گونه‌های زراعی تتراپلوئید یونجه چند ساله (مخصوصاً در اکوتیپ‌های ایرانی) که اهمیت زیادی در تولید علوفه با کیفیت دارند، وجود دارد. لذا این مطالعه با هدف بررسی الگوی بیان ژن‌های عوامل رونویسی MYB (MYB112 و MYB14) و WRKY (WRKY53 و WRKY70) تحت تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای یونجه زراعی با استفاده از PCR در زمان واقعی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ در آزمایشگاه و گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد دزفول و آزمایشگاه مرکزی و بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گرفت. در این مطالعه ژنوتیپ یزدی به عنوان ژنوتیپ متحمل به شوری و دیابلورده به عنوان ژنوتیپ حساس به شوری کشت گردیدند. انتخاب مواد ژنتیکی بر اساس نتایج به‌دست آمده از دو تحقیق مقدماتی مربوط به تأثیر تنش شوری بر روی صفات مورفولوژیکی در ۲۰ اکوتیپ یونجه (Shoushi Dezfuli *et al*., 2016; Shoushi Dezfuli *et al*., 2017a) و همچنین یک پژوهش دیگر در مورد بررسی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تنش شوری در یونجه بر پنج اکوتیپ یونجه استوار بود (Shoushi Dezfuli *et al*., 2017b).

روش اجرای آزمایش

به منظور اجرای آزمایش، در ابتدا بذور ضدعفونی شده و برای جوانه‌زنی به‌مدت ۲ روز در شرایط تاریکی در ژرمیناتور و در درون پتری دیش جوانه‌دار شدند، سپس بذور یکنواخت جوانه‌دار شده در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۰ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر حاوی کوکوپیت، پرلایت و شن به نسبت ۲:۳:۳ در عمق یک سانتیمتری کشت گردیدند. تعداد بوته در هر گلدان که همان کرت آزمایشی است ۱۵ عدد بود (Scasta *et al*., 2012).

به منظور استقرار کامل گیاهچه‌ها در ۳۰ روز اول بعد از کاشت تمام گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۴ قدرت

www.SID.ir

Archive of SID

تغذیه گردیدند. بعد از استقرار و رشد گیاهچه در روز سی‌ویکم بعد از کاشت، تنش ۱۸۰ میلی‌مولار نمک اعمال شد و بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری انجام گرفت (Li *et al.*, 2011). برای اعمال سطح بدون تنش شوری از محلول هوگلند بدون نمک (NaCl) و برای تنش شوری از محلول هوگلند حاوی ۱۸۰ میلی مولار نمک استفاده شد. در طی دوره آزمایش، دما در محدوده ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، شدت نور طبیعی و طول روز ۱۶ ساعت بود.

مطالعات بیوانفورماتیکی

در پژوهش حاضر بیان ۴ ژن از عوامل رونویسی MYB و WRKY در ارتباط با تنش شوری در یونجه زراعی مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت دستیابی به توالی mRNA ای ژن‌های مورد نظر، داده‌های ریزآرایه یونجه مدل *M. truncatula* CV.A17 تحت تنش شوری و بدون تنش شوری (شاهد) با شماره GSE 13921 و GSE 14029 موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI گردآوری و ذخیره شد.

این داده‌ها، سری داده ریزآرایه مربوط به بروز ژن گیاهچه‌های *M. truncatula* تحت شرایط تنش شوری ۱۸۰ میلی مولار از NaCl و شرایط کنترل آن بود که توسط Li و همکاران (2009) تهیه شده است.

برای انجام آنالیز داده‌های ریزآرایه و یافتن ژن‌های جدید مؤثر در تنش شوری در یونجه CV.A17 ابتدا داده‌های خام ریزآرایه با استفاده از نرم افزار Expression Console و با روش RMA نرمال شده و سپس به کمک نرم‌افزار Flexy Array ژن‌های دارای افزایش بیان مشخص شدند.

در این مطالعه ژن‌هایی به عنوان ژن‌های دارای افزایش بیان انتخاب شدند که نسبت به شرایط کنترل، بیان آن‌ها ۲ برابر و دارای pvalue<0.05 بودند. برای شناسایی و دستیابی به توالی mRNA ای ژن‌های مذکور و نیز مشخصات عملکردی از اطلاعات موجود در پایگاه Plant Expression (www.Plexdb.org) Database استفاده شد. بر این اساس توالی mRNA ای مربوط به Mtr.5010.1.S_s1_at (ارتولوگ ژن AtMYB112 در آرابیدوپسیس) و هم‌چنین توالی mRNA ای ژن Mtr.37886.1.S_at (ارتولوگ ژن AtMYB14 در آرابیدوپسیس) به عنوان رونوشت‌های کاندید از خانواده MYB انتخاب شدند. به‌طور مشابهی توالی mRNA ای Mtr.11349.1.S1_at (ارتولوگ ژن AtWRKY53 در آرابیدوپسیس) و توالی mRNA ای Mtr.23616.1.S1_at (ارتولوگ ژن AtWRKY70 در آرابیدوپسیس) به‌عنوان رونوشت‌های کاندید از خانواده WRKY انتخاب شدند. توالی بدست آمده از پایگاه مذکور با فرمت FASTA در پایگاه NCBI در مقابل ژنوم *M. truncatula* بلاست گردید تا طراحی آغازگر براساس آن صورت گیرد.

نمونه برداری جهت استخراج RNA

جهت مطالعات مولکولی، نمونه‌برداری از برگ و ریشه هر دو ژنوتیپ یونجه یزدی (متحمل به شوری) و یونجه دیابلورده (حساس به شوری) انجام گرفت. از هر ژنوتیپ دو نمونه سه گرمی بالک (مخلوط) از ریشه وبرگ (شامل ۱۰ بوته) تهیه شد. نمونه‌ها ابتدا درپوشش فویل آلومینیوم در پاکت حاوی نیتروژن مایع قرار داده شده و سریعاً به ظرف حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شدند. لازم به ذکر است که برای نمونه برداری ریشه، ریشه‌ها بلافاصله با آب مقطر و سپس آب تیمار شده با DEPC، شستشو داده شدند. بعد از اتمام نمونه برداری، کلیه نمونه‌ها به فریزری با دمای ۸۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شدند.

استخراج کل محتوای RNA

استخراج RNA بوسیله کیت Ribospin^{TM} Plant ساخت شرکت GeneAll کره جنوبی طبق پروتکل شرکت انجام شد. به منظور حذف احتمالی آلودگی DNA ژنومی از نمونه‌های استخراجی RNA، نمونه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

با آنزیم DnaseI تیمار شدند. کمیت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C, USA تعیین شد و جهت تعیین کیفیت نمونه‌های RNA از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱ درصد در بافر 1X MOPS استفاده شد (شکل ۱).

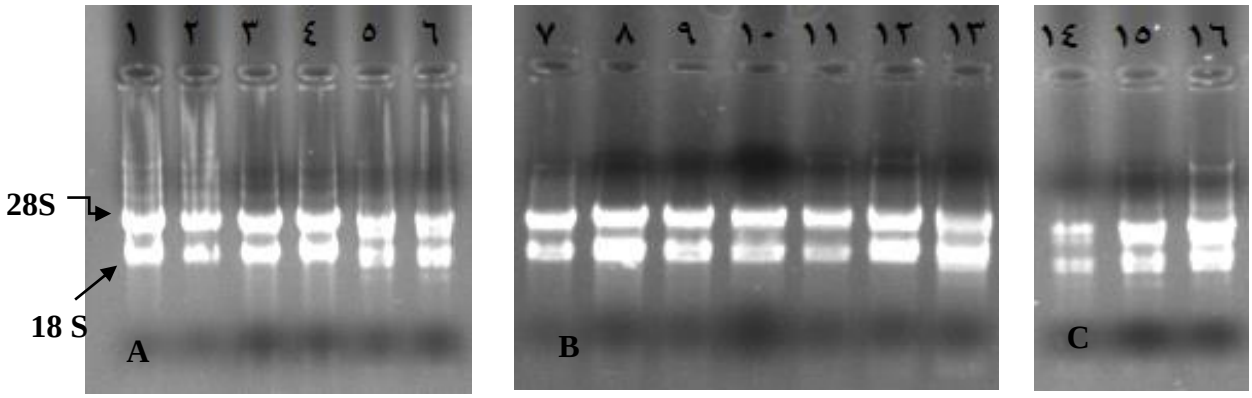
سنتز cDNA

رشته اول cDNA با استفاده از کیت ۲-STEP RT-PCR (ساخت شرکت (VIVANTIS) و طبق دستورالعمل این شرکت و با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام شد.

طراحی آغازگرها

پس از استخراج توالی ژن‌های عوامل رونویسی MYB (MYB112 و MYB14) و WRKY (WRKY53 و WRKY70)، با استفاده از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT (Integrated DNA Technologies) آغازگرهای ژن‌های مورد نظر طراحی گردیدند. جهت حصول اطمینان از اینکه آغازگرهای طراحی شده فقط به ژن مد نظر اتصال می‌یابند و اختصاصی آن هستند، آنالیز BlastN در سایت NCBI بر روی آغازگرهای طراحی شده انجام گرفت و سپس جهت سنتز به شرکت سیناکلون (ایران-کرج) ارسال گردید.

سعی شد در طراحی آغازگرها طول آغازگر (۱۰۰ الی ۱۳۰bp)، درصد GC (۴۰ تا ۶۰ درصد)، مکمل بودن آغازگرها با هم و هم‌چنین احتمال تشکیل حلقه مورد توجه قرار گیرد. لازم به ذکر است که از ژن اکتین که معمولاً دارای بیان نسبتاً ثابتی در بافت‌های برگ و ریشه، در شرایط کنترل و تنش است، به عنوان ژن کنترل داخلی در واکنش qRT-PCR استفاده شد. این ژن در هر دو شرایط کنترل و تنش دارای بیان یکسان بوده و برای نرمال کردن میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد. توالی آغازگرهای رفت و برگشت در این پژوهش، جهت تکثیر ژن‌های مربوط به عوامل رونویسی مورد نظر، در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی 28S و 18S استخراج شده از گیاه یونجه. A: چاهک‌های شماره ۱ تا ۶ بترتیب شامل نمونه‌های اول ریشه ژنوتیپ یزدی، ریشه ژنوتیپ یزدی تحت تنش شوری، برگ ژنوتیپ یزدی، برگ ژنوتیپ یزدی تحت تنش شوری، ریشه ژنوتیپ دیابلورده و ریشه ژنوتیپ دیابلورده تحت تنش شوری. B: چاهک‌های شماره ۷ و ۸ بترتیب نمونه‌های اول برگ ژنوتیپ دیابلورده، برگ ژنوتیپ دیابلورده تحت تنش شوری و چاهک‌های شماره ۹ تا ۱۳ بترتیب نمونه‌های دوم ریشه ژنوتیپ یزدی، ریشه ژنوتیپ یزدی تحت تنش شوری، برگ ژنوتیپ یزدی، برگ ژنوتیپ یزدی تحت تنش شوری و ریشه ژنوتیپ دیابلورده C: چاهک‌های شماره ۱۴ تا ۱۶ بترتیب شامل نمونه‌های دوم ریشه ژنوتیپ دیابلورده تحت تنش شوری، برگ ژنوتیپ دیابلورده و برگ ژنوتیپ دیابلورده تحت تنش شوری.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای ژن‌های عوامل رونویسی MYB112، MYB14، WRKY70-1، WRKY53 و ژن خانه دار اکتین

ژن Gene	آغازگر primer	توالی ('3-'5) sequence (5'-3')	طول قطعه مورد انتظار (جفت باز) Product size (bp)
MYB112	F	CTTGACCTCCACTCTCGCTG	۱۲۵
	R	GCATCCAAACGTGACGCAAT	
MYB14	F	CCGAGTTACCTGGAAGAACAG	۱۱۶
	R	TCTCCCTTGTGTGGATTTGG	
WRKY70-1	F	GACAACTCTTTCCCAACACC	۱۲۳
	R	AGTGAGTCCAGAGAGGTAATC	
WRKY53	F	AGACATCCTTGGAGCCATGC	۱۰۷
	R	GGACCAACCACATTGGAAGC	
Actine	F	GGATCTTGCTGGTCGTGATCT	۱۱۶
	R	CTGGTGGAGCCACAACCTTA	

واکنش Real Time PCR

به منظور تأیید ژن‌های انتخاب شده، به عنوان ژن‌های کاندید برای تحمل به تنش شوری در یونجه از واکنش PCR در زمان واقعی (Real-Time PCR) استفاده گردید. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از محلول مادری ساخت شرکت تاکارا حاوی SYBR Green و آغازگر اختصاصی طراحی شده برای هر ژن صورت گرفت. واکنش برای هر نمونه در سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شد. برای واکنش Real-Time PCR از دستگاه Time PCR System One Plus Real Step ABI استفاده شد. به منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی ژن‌های عوامل رونویسی نمودار منحنی ذوب در دماهای مختلف برای همه ژن‌های عوامل رونویسی مورد مطالعه به‌دست آمد (شکل ۲).

آنالیز آماری

برای آنالیز نتایج Real time PCR جهت بررسی اختلافات معنی دار مربوط به میزان بیان ژن هر ژنوتیپ (در حالت بدون تنش با حالت تحت تنش شوری) از آزمون آماری Boot strap استفاده شد بدین‌صورت که در ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع (در این پژوهش اکتین)، نرمال سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از برآورد $2^{-\Delta\Delta Ct}$، شرح داده شده توسط Schmittgen and Livak (2008) و با کمک نرم‌افزار REST® تهیه‌شده توسط Pfaffl (2001) به شرح ذیل محاسبه و نهایتاً مقادیر تفاوت در تغییرات چرخه آستانه ملاک مقایسه ژنوتیپ‌ها قرار گرفت.

$\Delta\Delta Ct = A - B$

A =

(ژن خانگی تحت شرایط تنش Ct – ژن مورد نظر تحت شرایط تنش Ct)

B =

(ژن خانگی تحت شرایط کنترل Ct – ژن مورد نظر تحت شرایط کنترل Ct)

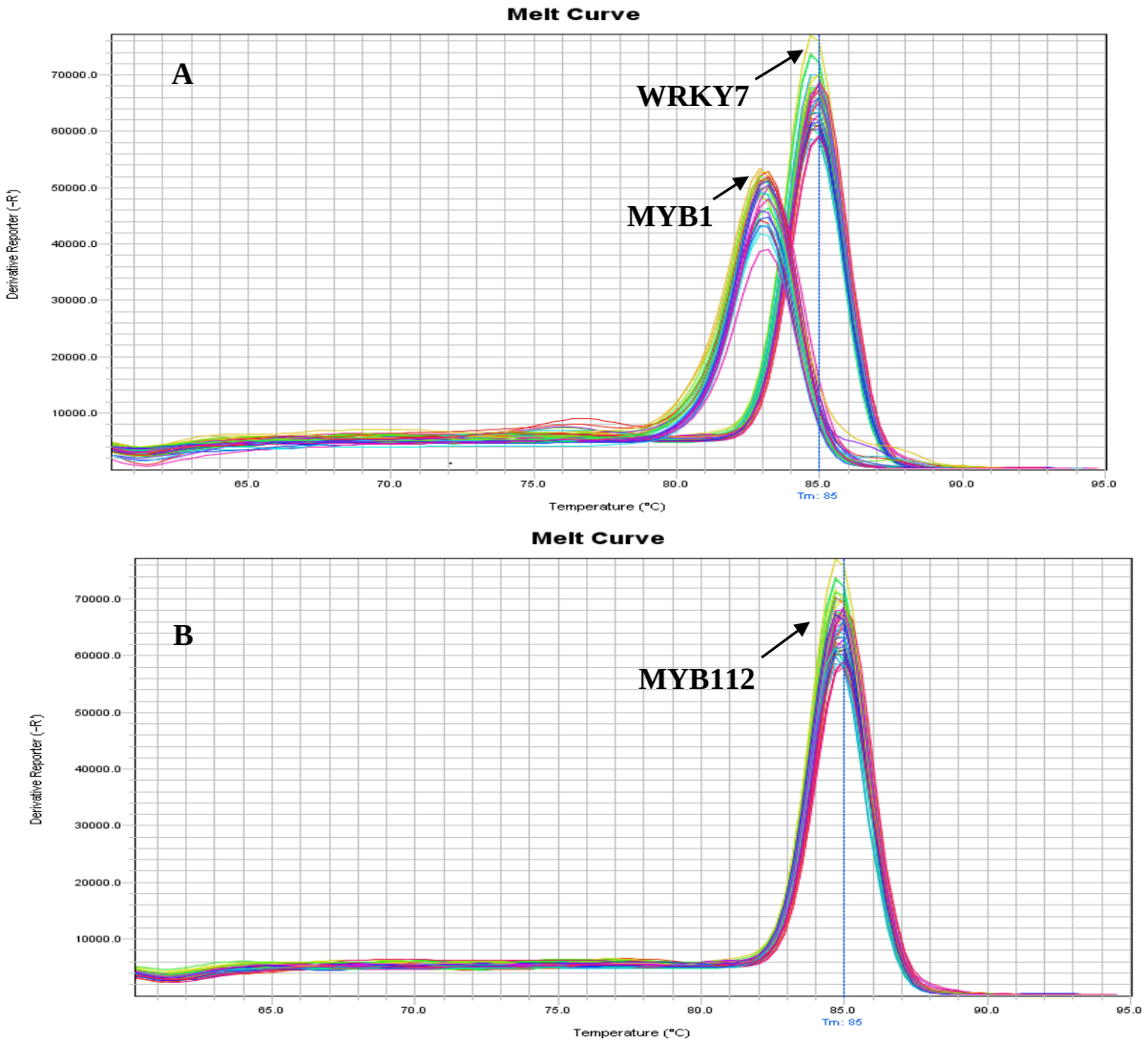
نتایج و بحث

بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی خانواده MYB (MYB14 و MYB112)

نتایج حاصل از qRT-PCR جهت بررسی بیان ژن‌های MYB112 و MYB14 به صورت نموداری به ترتیب در اشکال شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. مشاهده نمودارهای مذکور بیانگر تنوع، برای بیان ژن‌های مذکور تحت تنش شوری بود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. نمودار مرحله ذوب ژن‌های عوامل رونویسی مورد مطالعه در یونجه زراعی، وجود یک تک قله با دمای ذوب مشخص بیانگر عدم وجود تکثیر غیر اختصاصی ژن مد نظر می‌باشد A: نمودار مرحله ذوب ژن‌های عوامل رونویسی MYB14 و WRKY70 *به‌صورت* همزمان B: نمودار مرحله ذوب ژن عامل رونویسی MYB112.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن MYB112 فقط در ژنوتیپ متحمل یزدی در اثر تنش شوری افزایش معنی داری در بافت‌های ریشه و برگ یافته است ولی در ژنوتیپ حساس دیابلورده در هر دو بافت مذکور تفاوت معنی داری نسبت به شرایط بدون تنش نداشته است. در موجودات یوکاریوت، شمار زیادی از پروتئین‌های خانواده فاکتورهای رونویسی MYB وجود دارد که نقش مهمی در کنترل شبکه‌های تنظیمی جهت پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده ایفا می‌کنند (Dubos *et al.*, 2010). تجزیه و تحلیل فیلوژنیک فاکتورهای رونویسی MYB در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که MYB112 در گروه R2R3-MYB قرار می‌گیرد. R2R3-MYB بزرگ‌ترین و از لحاظ عملکردی متنوع‌ترین زیرخانواده MYB است و نقش‌های مهمی را در تنظیم بیوسنتز آنتوسیانین، تشکیل شکل و ساختار سلولی بافت‌های مختلف گیاهی و پاسخ به سیگنال جیبرلیک اسید بازی می‌کند (Rahaei *et al.*, 2011). ژن‌هایی از این زیرگروه نیز، در پاسخ به تنش کم آبی، شوری و اسید سالیسیلیک (مرتبط با

www.SID.ir

Archive of SID

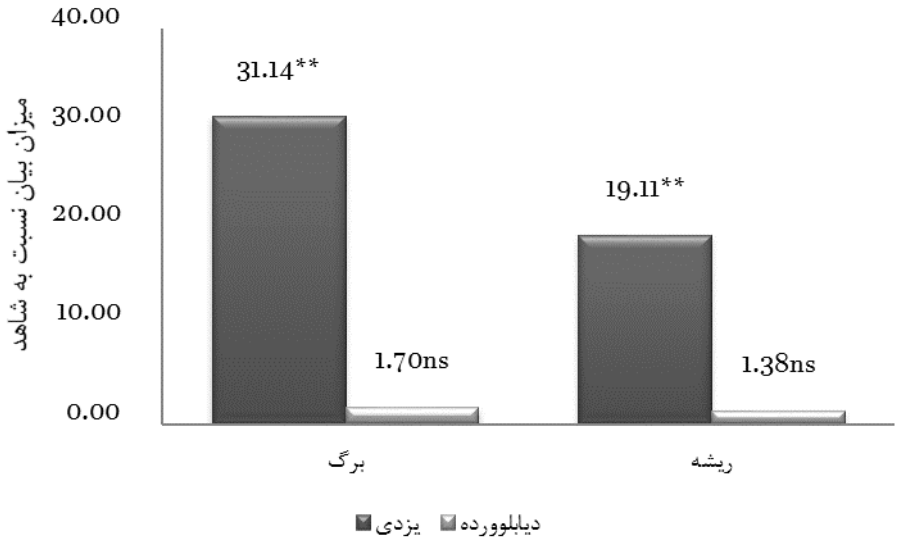
بیماری زایی) در آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند و اغلب جز ژن‌های تنظیم‌گر مثبت رونویسی محسوب می‌شوند (Paz-Ares *et al*., 1987). Li و همکاران (2011) و Mokhtari و همکاران (2017) نیز افزایش بیان MYB112 را در ریشه یونجه یکساله (در مرحله گیاهچه‌ای)، تحت تنش شوری گزارش کردند. در بافت برگ ژنوتیپ یزدی میزان افزایش بیان نسبت به گیاهان متناظر در شرایط عدم تنش، ۳۱/۱۴ برابر بود در حالی‌که این میزان در ریشه همین ژنوتیپ ۱۹/۱۱ برابر برآورد گردید (شکل ۳). نتیجه مذکور با توجه به نقش MYB112 در تنظیم تجمع آنتوسیانین و همچنین وجود این رنگدانه در برگ بدست آمده است (Lotkowska *et al*., 2015). در گیاه آرابیدوپسیس نیز گزارش شده است که MYB112 به عنوان یک فاکتور رونویسی تنظیم کننده تجمع آنتوسیانین می‌باشد. این فاکتور رونویسی از طریق تنظیم تجمع آنتوسیانین نقش مهمی در تنش‌های غیر زنده ازجمله شوری، خشکی و نورشدید ایفا می‌کند. همچنین مشخص گردیده است که MYB112 از طریق اتصال به پروموتر MYYB7 و MYB32 باعث افزایش بیان ژن‌های مذکور گردیده است (Lotkowska *et al*., 2015).

در شرایط تنش، بیان ژن MYB14 نیز در بافت ریشه و برگ هر دو ژنوتیپ یزدی (متحمل) و دیابلورده (حساس) تغییر معنی داری نشان داد. بر خلاف ژن MYB112 میزان افزایش بیان در بافت ریشه بیشتر از برگ بود. علاوه بر این مقدار افزایش بیان ژن فاکتور رونویسی مذکور، در اثر تنش شوری در ژنوتیپ یزدی در هر دو بافت برگ و ریشه بیشتر از ژنوتیپ حساس به شوری دیابلورده بود (شکل ۴).

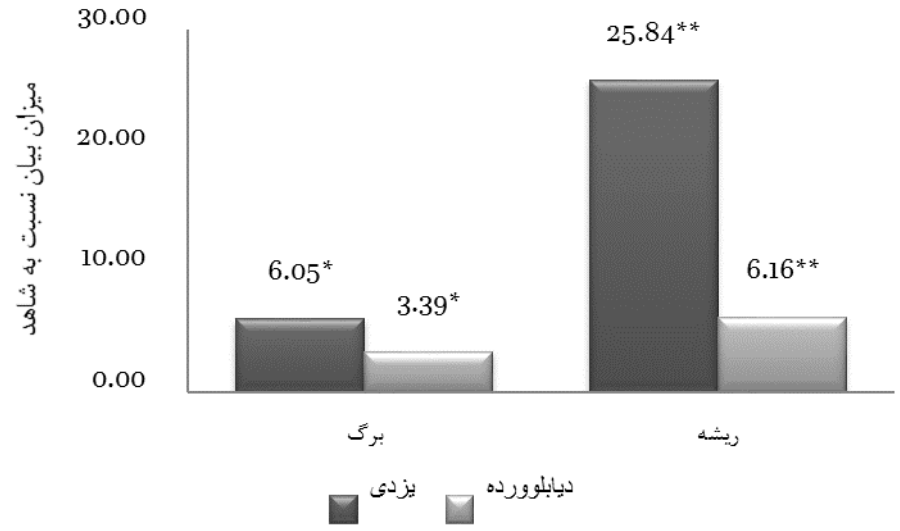
طبق شکل ۴ افزایش بیان ژن MYB14 بر اثر تنش در بافت برگ ژنوتیپ یزدی نسبت به گیاهان متناظر در شرایط عدم تنش، ۶/۰۵ برابر بود در حالیکه این میزان برای ژنوتیپ دیابلورده ۳/۳۹ برابر بود. برای فاکتور رونویسی مذکور در بافت ریشه روندی مشابه بافت برگ، وجود داشت. بیان این ژن در شرایط تنش، در بافت ریشه به مقدار ۲۵/۸۴ برابر در ژنوتیپ یزدی و ۶/۱۶ برابر در ژنوتیپ دیابلورده نسبت به شاهد افزایش یافت. به نظر می‌رسد در صورت به‌دست آمدن نتایج مشابه در سایر ارقام یونجه‌های زراعی توسط دیگر محققین، فاکتور رونویسی MYB14 می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل در یونجه، مدنظر به‌نژادگران نبات قرار گیرد. تجزیه و تحلیل فیلوژنیک از فاکتورهای رونویسی MYB در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که همانند MYB112 فاکتور رونویسی MYB14 در گروه R2R3-MYB قرار می‌گیرد (Rahaei *et al*., 2011). Chen و همکاران (2013) نشان دادند که AtMYB14 نقش مهمی در مسیر پیام‌رسانی برای تحمل تنش سرما ایفا می‌کند. این محققان گزارش کردند که AtMYB14 از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی CBF، در تحمل تنش سرما و یخ زدگی در گیاهان نقش بسزایی دارد. در انگور فاکتورهای رونویسی MYB، مسیر بیوسنتز ترکیبات شیمیایی کریستالی (stiblene) را تنظیم می‌کنند. در این گیاه MYB14 و MYB15 از طریق فعال کردن پروموتورهای ژن‌های STS (Stilbene synthases) باعث افزایش بیان ژن‌های مذکور (STS) می‌شوند (Holl *et al*., 2013). افزایش بیان STS در گیاهان باعث تجمع ترکیبات شیمیایی کریستالی گلیکوسیلات می‌گردد. Duan و همکاران (2016) دریافتند که آنزیم بیوسنتز کننده ترکیبات شیمیایی کریستالی (Stilbene synthase) یک آنزیم کلیدی جهت تولید فیتوآلکسین رسوراترول (phytoalexin resveratrol) است که نقش مهمی در پاسخ به اشکال مختلف تنش ایفا می‌کند. مشخص شده است که بیان بیشتر فاکتور رونویسی MYB14 باعث افزایش آنزیم Stilbene synthase می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. تأثیر شوری بر میزان رونویسی ژن *MYB*112 در بافت برگ و ریشه دو ژنوتیپ یزدی (متحمل به شوری) و دیابلووردہ (حساس به شوری). (علائم ** و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و و عدم معنی‌دار).



شکل ۴. تأثیر شوری بر میزان رونویسی ژن *MYB*14 در بافت برگ و ریشه دو ژنوتیپ یزدی (متحمل به شوری) و دیابلووردہ (حساس به شوری). (علائم **، * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد).

تأثیر تنش شوری بر الگوی بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی خانواده WRKY

در این پژوهش از خانواده WRKY، دو فاکتور رونویسی WRKY53 و WRKY70 مورد بررسی قرار گرفت. برای فاکتور رونویسی WRKY53، PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده منجر به تکثیر ژن مذکور نگردید. به منظور حل مشکل، دامنه دماهای آنیلینگ PCR افزایش داده شد، ولی مجدداً باندی بر روی ژل آگاروز دیده نشد. علاوه بر بررسی دمای متفاوت آنیلینگ، برای تکثیر ژن این فاکتور رونویسی طراحی دوباره آغازگر صورت گرفت. ولی باز هم منجر به تکثیر ژن نگردید و مشخص گردید که توالی ژن مذکور در یونجه زراعی وجود ندارد (لازم به ذکر است که توالی ژن WRKY53 از گیاه یونجه

www.SID.ir

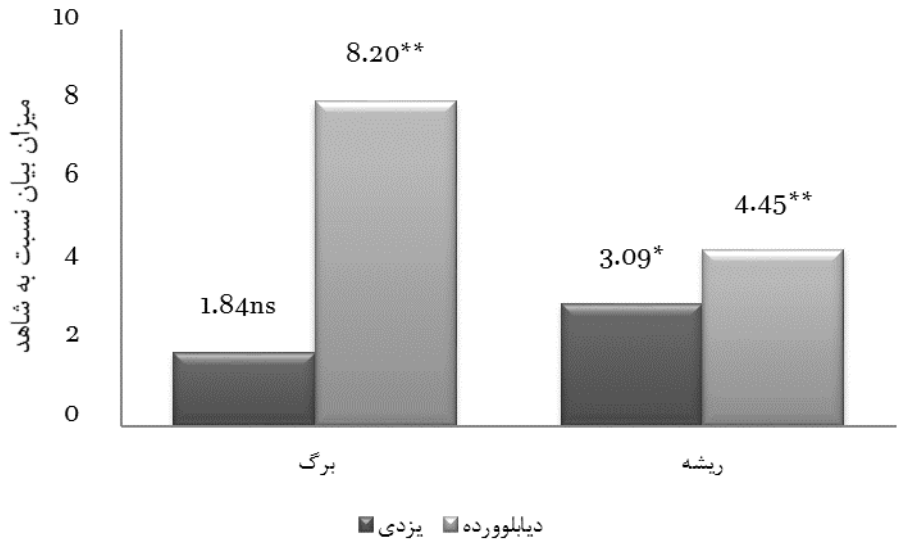
Archive of SID

M. truncatula به‌دست آمده بود). Postnikova و همکاران (2013) با آنالیز ترانسکریپتوم ریشه دو ژنوتیپ یونجه زراعی تتراپلوئید AZGERM SALT-II (متحمل به شوری) و AZ-88NDC (حساس به شوری) تحت تنش شوری با استفاده از تکنیک RNA-seq، خصوصیات (annotation) حدود ۷۵ درصد از ژن‌ها را شناسایی کردند. خصوصیات ۹۰ درصد از ژن‌های مذکور با استفاده از گیاه مدل *M. truncatula* مشخص گردید ولی ۱۰ درصد باقی مانده ژن‌ها در گیاه یونجه *M. truncatula* وجود نداشت و با استفاده از ژنوم گیاهان دیگر شناسایی شد.

الگوی بیان ژن WRKY70 در برگ و ریشه ژنوتیپ یونجه یزدی (متحمل به شوری) و دیابلورده (حساس به شوری) در شکل ۵ نشان داده شده‌است. طبق شکل مذکور تنش شوری باعث افزایش بیان معنی دار در بافت ریشه هر دو ژنوتیپ متحمل (یزدی) و حساس (دیابلورده) گردید ولی در بافت برگ فقط افزایش بیان معنی‌دار در ژنوتیپ حساس دیابلورده مشاهده گردید. برخلاف دیگر ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش، هم در بافت ریشه و هم در بافت برگ میزان بیان ژن WRKY70 در ژنوتیپ حساس دیابلورده بیشتر بود. در بافت برگ، اعمال تنش شوری فقط باعث افزایش بیان ژن WRKY70 در ژنوتیپ دیابلورده به مقدار ۸/۲۰ برابر نسبت به گیاهان متناظر در شرایط عدم تنش گردید و در ژنوتیپ متحمل یزدی این میزان افزایش فقط ۱/۸۴ برابر بود و آنالیز آماری این مقدار را معنی دار نشان نداد.

در بافت ریشه، نتایج حاصل از qRT-PCR برای هر دو ژنوتیپ، روندی مشابه برگ را مشخص ساخت ولی در این بافت هر دو ژنوتیپ تحت تنش شوری، افزایش بیان معنی‌داری نسبت به شاهد بدون تنش از خود نشان دادند. طبق شکل ۵ در بافت ریشه، مقدار افزایش بیان نسبت به شاهد برای ژنوتیپ یزدی مقدار معنی‌دار ۳/۰۹ برابر و برای ژنوتیپ دیابلورده ۴/۴۵ برابر برآورد شد.

مطالعات متعدد نشان داده است که طی فرآیند پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان مثل خشکی و شوری فاکتورهای رونویسی WRKY به شدت و با سرعت زیاد بیان می‌شوند که این امر به‌دلیل عملکرد تنظیمی آن‌ها در این مسیر پیام‌رسانی است، که مقاومت به تنش را سبب می‌شود (Chen *et al*., 2011).



شکل ۵. تأثیر شوری بر میزان رونویسی ژن WRKY70 در بافت برگ و ریشه دو ژنوتیپ یزدی (متحمل به شوری) و دیابلوورده (حساس به شوری). (علائم**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌دار).

www.SID.ir

Archive of SID

Mokhtari و همکاران (2017) با مطالعه سه گونه یونجه یکساله گزارش کردند که در گونه متحمل (*Medicago polymorpha*)، میزان بیان فاکتور رونویسی WRKY70 تحت تنش شوری کوتاه مدت تغییر نمی‌کند و این وضعیت بیانگر ثبات و ادامه روند عادی فعالیت‌های این گونه (مانند فتوسنتز) تحت تنش شوری کوتاه‌مدت است. تحقیقات پژوهشگران مشخص کرده است که WRKY53 و WRKY70 به‌ترتیب به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی در پدیده پیری برگ نقش دارند (Ulker *et al*., 2007). مطالعات و تحقیقات جدید نشان داده است که فاکتورهای رونویسی WRKY70 و WRKY54 علاوه بر تنظیم مکانیسم‌های دفاعی گیاه، نقش مهمی در تحمل تنش‌های اسموتیک ایفا می‌کنند. در گیاه آرابیدوپسیس مشخص شده است که فاکتورهای رونویسی WRKY70 و WRKY54 از طریق تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها باعث افزایش تحمل به تنش‌های غیر زنده شده‌اند (Li *et al*., 2013).

در مطالعه حاضر اثر تنش شوری کوتاه مدت بر الگوی بیان دو خانواده مهم فاکتور نسخه‌برداری MYB (MYB112 و MYB14) و WRKY (WRKY70) در بافت برگ و ریشه مربوط به دو ژنوتیپ یزدی (متحمل به شوری) و دیابلورده (حساس به شوری)، تنوع قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. با کمک آنالیز qRT-PCR مشخص شد که فاکتورهای رونویسی MYB112 و MYB14 در ژنوتیپ متحمل به شوری، بیان بالاتری دارند. بعبارتی بیان بالاتر فاکتورهای رونویسی MYB112 و MYB14 تحمل بیشتر به تنش شوری را به‌همراه داشته است. این یافته در صورت تأیید توسط دیگر محققین و به‌دست آمدن نتایج مشابه در سایر ارقام یونجه‌های زراعی می‌تواند به‌نژادگران نبات را برای استفاده از این فاکتورهای رونویسی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به نمک در یونجه‌های زراعی یاری نماید.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول و دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین به دلیل فراهم آوردن امکانات اجرایی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Bartels D, Sunkars R (2005) Drought and salt tolerance in plants. CRC. Crit. Rev. Plant. Sci. 24: 23–58.

Chen L, Song Y, Li SH, Zhang L, Zou SH, Yu D (2011) The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. Biochim. Biophys. Acta. 9(2): 1-8.

Chen Y, Chen Z, Kang J, Kang D, Gu H, Qin G (2013) AtMYB14 regulates cold tolerance in Arabidopsis. Plant. Mol. Biol. Report. 31: 87–97.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. Crop. Sci. 45: 437-448.

Cook DR (1999) *Medicago truncatula*, a model in the making! Curr. Opin. Plant. Biol. 2: 301–304.

Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, Huang YB, Tang YX (2009) Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. Biochemistry (Moscow). 74: 1-11.

Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, Chong K (2007) Overexpression of an R1R2R3 MYB gene OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, salt stress in transgenic Arabidopsis. Plant Physiol 143: 739-1751.

Duan D, Fischer S, Merz P, Bogs J, Riemann M, Nick P (2016) An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence. J. Exp. Bot. 67(6): 1795-1804.

www.SID.ir

Archive of SID

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci. 15: 573-581.

Heidari Sharif Abad H (2001) Plants and salinity. Research Institute of Forests and Rangelands press. Tehran. (In Persian).

Holl J, Vannozzi A, Czemmel S, D'Onofrio C, Walker AR, Rausch T, Lucchin M, Boss PK, Dry IB, Bogs J (2013) The R2R3-MYB Transcription Factors MYB14 and MYB15 Regulate Stilbene Biosynthesis in Vitis vinifera. Plant. Cell. 25: 4135–4149.

Jiang Y, Deyholos MK, (2006) Comprehensive transcriptional prowling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. BMC. Plant. Biol. 6: 1471–2229.

Jiang Y, Deyholos MK, (2009) Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. Plant. Mol. Biol. 69: 91-105.

Jianga C, Gua J, Chopraa S, Gua X, Peterson T (2004) Ordered origin of the typical two- and three- repeat Myb genes. Gene. 326: 13–229.

Kafi M, Borzouei A, Salehi M (2010) Physiology of environmental stresses in plants. Ferdowsi University Press, Mashhad. (In Persian).

Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y (2008) Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. Funct. Integr. Genomics. 8: 277–86.

Kim, IH, Nguven NH, Jeong CY, Nguyen NT, Hong S, Lee H (2013). Loss of the R2R3 MYB AtMyb73 causes hyper-induction of the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in *Arabidopsis*. J. Plant Physiol. 170: 1461-1465.

Li D, Zhang Y, Hu X, Shen X, Ma L, Su Z, Wang T, Dong J (2011) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* under salt stress identified novel CBF transcription factor MtCBF4 that plays an important role in abiotic stress response. BMC. Plant. Biol. 11: 109.

Li D, Su Z, Dong J, Wang T (2009) An expression database for roots of the model legume *Medicago truncatula* under salt stress. BMC. Genomics. 10: 517.

Li J, Besseau S, Toronen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Palva ET (2013) Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in Arabidopsis. New. Phytol. 200: 457–472.

Lin-Wa K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. BMC. Plant. Biol. 10: 3-17.

Lotkowska ME, Tohge T, Fernie AR, Xue GP, Balazadeh S, Mueller-Roeber B (2015) The Arabidopsis Transcription Factor MYB112 Promotes Anthocyanin Formation during Salinity and under High Light Stress. Plant. Physiol. (169): 1862–1880.

Mokhtari F, Rafiei F, Shabani L, Shiran B (2017) Differential expression pattern of transcription factors across annual *Medicago* genotypes in response to salinity stress. Biol plantarum. 61 (2): 227-234.

Motahari M, Namaki Shoushtari A, Klantari M (2005) Study of the effects of salinity stress on nitrogen fixation system of *Agrobacterium tumefaciens* in two cultivars of alfalfa. Master thesis of Shahid Bahonar University of Kerman. (In Persian).

Mott IW, Wang RRC (2007) Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. Plant. Sci. 173: 327–339.

www.SID.ir

Archive of SID

Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ (2012) Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Cell Environ 35:1156-1170.

Noble CL, Halloran GM, West DW (1984) Identification and selection for salt tolerance in lucerne. Aust. J. Agri. Res. 35: 239-252.

Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson P, Saedler H, (1987) The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO. J. 6: 3553-3558.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic. Acids. Res. 29(9): 44-45.

Postnikova OA, Shao J, Nemchinov LG (2013). Analysis of the Alfalfa Root Transcriptome in Response to Salinity Stress. Plant Cell Physiology 54(7): 1041–1055.

Rahaei M, Gomarian M, Alizadeh H, Malboubi M, Naghavi MR (2011) Analysis of expression of transcription factors under long-term salinity stress conditions in two susceptible wheat genotypes using Norton Blot reverse method. Iran. J. Crop. Sci. 13(3): 580-595.

Ramsay NA, Glover BJ (2005) MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends. Plant. Sci. 10: 63-70.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science. 290: 2105–2110.

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. Trends. Plant. Science. 15(5): 247-258.

Scasta JD, Trostle CL, Foster MA (2012) Evaluating Alfalfa (*Medicago sativa L.*) Cultivars for Salt Tolerance Using Laboratory, Greenhouse and Field Methods. J. Agric. Sci. 4(9): 90-10.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat. Protoc. 3: 1101-1108.

Seo JS, Sohn HB, Noh K, Jung C, An JH, Donovan CM, Somers DA, Kim DI, Jeong SC, Kim C, Kim HM, Lee S, Choi YD, Moon TW, Kim CH, Cheong J (2012). Expression of the *Arabidopsis AtMYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean. Mol. Breeding 29: 601-608

Shoushi Dezfuli AA, Mohammady Dehcheshmeh S, Rafiei F, Shiran B (2016) Evaluation of Salinity Tolerance of Alfalfa Genotypes during Germination Stage Using Multivariate Analysis. 6(3): 51-56.

Shoushi Dezfuli AA, Mohammady Dehcheshmeh S, Rafiei F, Shiran B (2017a) Variation among Iranian alfalfa genotypes for absolute growth rates and salt stress tolerance indices. Environ. Conserv. J. 18(1): 27-39.

Shoushi Dezfuli AA, Paknegad AR, Asareh A, Zarifinia N (2017b) Evaluation of Alfalfa Echotype's Tolerance to Salinity by Using some Morphological and Chemical Characteristic. Crop. Physiol. J. 35: 105-120. (In Persian).

Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. Curr. Opin. Plant. Biol. 4:447–456.

Ulker B, Shahid Mukhtar M, Somssich IE (2007) The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. Planta. 226: 125–137.

Wang H, Miyazaki S, Kawai K, Deyholos M, Galbraith DW, Bohnert HJ (2003) Temporal progression of gene expression responses to salt

www.SID.ir

Archive of SID

shock in maize roots. Plant. Mol. Biol. 52: 873–891.

Wang YJ, Zhang ZG, He XJ, Zhou HL, Wen YX, Dai JX, Zhang JS, Chen SY (2003) A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response. Theor. Appl. Genet. 107: 1402–1409.

Yarnia M., Heydari H, Hashemi Dezfuli A, Rahimzadeh Khouei F, Galavand A (2001) Evaluation of alfalfa (medicage sativa) lines to salinity. Iran. J. Crop. Sci. 3(2): 12-26.

Yamaguchi-Shinazaki K, Shinozaki K, (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. Trends. Plant. Sci. 10: 88–94.

Yang A, Xiaoyan Dai X, Zhang WH (2012) A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. J Exp Bot 63(7):2541–2556.

Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim DJ, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S (2005) Sequencing the gene spaces of *Medicago truncatula* and Lotus japonicus. Plant. Physiol. 137: 1174–1181.

www.SID.ir