Archiv

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Analysis of Gene Expression Pattern of Some Members of NAC Gene Family in Lentil (*Lens Culinaris* M.) Under Cold Stress

Bentolhoda Farokhpour

Former M.Sc. Student, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: farokhpoor94@gmail.com

Ahmad Ismaili

*Corresponding author, Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: ismaili.a @lu.ac.ir

Hamid Reza Eisvand

Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: eisvand.hr@lu.ac.ir

Seyyed Mohsen Sohrabi

Former Ph.D. Student, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail: ms.seyyed@gmail.com

Abstract

Objective

Cold is one of the important stresses in cold and temperate regions and improving cold tolerance is in the top priority of the lentil breeding programs. NAC transcription factors play an important role in response to various biological stresses, including cold stress.

Materials and Methods: In this study, to evaluate the expression of MfNAC, MtNAC57 and GmNAC2 genes, the plants of Gachsaran lentil cultivar were subjected to five temprature treatments in a completely randomized design with three replications. Twenty-nine old plants were subjected to duration of cold stress treatments including 6h, 12h, 24h and 48h at 2°-4°c and plants grown under greenhouse conditions (23°C) were considered as controls. Total RNA extraction from tissues was performed using lithium chloride

www.SID.ir

method and cDNA was synthesized using TaKara kit. For each treatment, real-time PCR was performed in both shoot and root in three biological and two technical replications. Actin gene was used as internal control.

Results

The results of analysis of variance of all studied genes showed that there was a significant difference between the different duration of cold treatments in both shoot and root. GmNAC2 gene expression decreased significantly in the shoot, 6 hours after stress, while in the root, the expression decreased 24 hours after stress. The expression of MtNAC57 gene in 6h, 12h, and 24h treatments decreased compared to control, but in the root in 12h treatment, a significant expression was observed. MfNAC gene in shoot showed a significant reduction in expression in all treatments, while in root a significant increase was only observed during long-term treatment of 48h.

Conclusions

In the present study, for first time, the expression pattern of some members of NAC gene family was examined in lentils under cold stress and the results could be useful for studies on this plant and other legumes.

Keywords: Cold, lentil, real time PCR, root, shoot

Citation: Farokhpour B, Ismaili A, Eisvand HR, Sohrabi SM M (2019) Analysis of gene expression pattern of some members of NAC gene family in lentil (*Lens Culinaris* M.) under cold stress. Agricultural Biotechnology Journal 10(4), 111-132.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 111-132.
DOI: 10.22103/jab.2019.2252
Received: July 31, 2018; Accepted: December 13, 2018
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

بررسی الگوی بیانی برخی ژن‌های خانواده NAC در عدس (*Lens Culinaris* M.) تحت تنش سرما

بنت‌الهدی فرخ‌پوری

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: farokhpoor94@gmail.com

احمد اسماعیلی

* نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: ismaili.a@lu.ac.ir

حمیدرضا عیسوند

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: eisvand.hr@lu.ac.ir

سید محسن سهرابی

دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. ایمیل: ms.seyyed@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۲

چکیده

مقدمه: سرما یکی از تنش‌های مهم مناطق سردسیر و معتدل است و در برنامه‌های اصلاحی عدس، بهبود تحمل به سرما در اولویت قرار دارد. فاکتورهای رونویسی NAC در واکنش به تنش‌های مختلف غیرزیستی نقش مهمی دارند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به منظور ارزیابی بیان ژن‌های MfNAC، MtNAC57 و GmNAC2، گیاهان رقم گچساران عدس تحت پنج تیمار مدت زمان تنش سرما در قالب طرح تصادفی کامل با سه تکرار قرار گرفتند. تیمارهای مدت زمان تنش سرمایی ۲°C-۴ شامل ۶h، ۱۲h، ۲۴h و ۴۸h بود که روی گیاهان ۲۹ روزه اعمال شد و گیاهان رشد یافته در شرایط گلخانه

www.SID.ir

Archive of SID

(دمای ۲۳°C) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. استخراج RNA از بافت‌ها، با استفاده از روش لیتیم‌کلراید و ساخت cDNA با استفاده از کیت TaKara انجام شد. واکنش Real-time PCR برای ژن‌های مورد نظر در هر دو نوع اندام هـوایی و زمینـی در سه تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی انجام شد. از ژن Actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس بیان ژن‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف تیمارهای مدت زمان تنش دمایی در هر دو اندام اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیان ژن GmNAC2 در اندام هوایی، ۶ ساعت پس از تنش کاهش معنی‌داری یافت در حالی‌که در انـدام زمینی در تیمار ۲۴ ساعت پس از تنش بیان ایـن ژن کـاهش نشـان داد. بیـان ژن MtNAC57 در تیمارهـای ۶h، ۱۲h و ۲۴h نسبت به شاهد کاهش نشان داد ولی در اندام زمینی تیمار ۱۲h افزایش معنی‌دار مشاهده شـد. ژن mfNAC در انـدام هـوایی در همه تیمارها نسبت به شاهد کاهش بیان معنی‌دار نشان داد در حالی‌که در اندام زمینی فقط در تیمار بلند مدت ۴۸h افـزایش بیـان معنی‌دار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق، بیان برخی از ژن‌های خانواده NAC تحت تنش سرما در عدس برای اولـین بررسـی شـد و نتـایج حاصل می‌تواند برای مطالعات به‌نژادی این گیاه و سایر حبوبات مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: اندام هوایی، ریشه، سرما، عدس، PCR زمان واقعی

مقدمه

تنش سرما به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی سبب کاهش عملکرد گیاهان و حتی مرگ آنها می‌شود (Gao et al. 2009). عدم تحمل به سرما یکی از عوامل اصلی کاهش تولید محصول است. گیاهان وقتی در معرض دماهای پایین قرار می‌گیرند برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغیرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می‌کنند (Gomat et al. 2011). شناخت مکانیزم‌هایی که به وسیله آنها گیاهان پیام تنش‌ها را به سیستم سلولی جهت فعال‌سازی واکنش‌های منطبق با تنش ارسال می‌کنند، از جمله اساسی‌ترین نیازها برای ایجاد مقاومت گیاهان زراعی به تنش، در راستای افزایش بهره‌وری در تولید غذا برای جمیعت رو به رشد جهان به شمار می‌رود (Huang et al. 2012). فصل سرد به عنوان یک تنش عمده غیر زنده مؤثر بر حبوبات، موضوع مهم و قابل بررسی است (Singh and Saxena 1993).

حبوبات پس از غلات از مهم‌ترین محصولات کشاورزی مورد تغذیه انسان و دام تلقی می‌شوند؛ به گونه‌ای که کشت و کار آن‌ها در سرتاسر دنیا گسترش یافته است (Yadollahi et al. 2014). عدس با نام علمی *Lens culinarys* Medik با ۲n=۲x=۱۴ یکی از مهم‌ترین حبوبات سرمادوست است. این گیاه با حدود ۲۸ درصد پروتئین، از حبوبات عمده در کشورهای در حال توسعه بوده و به عنوان مکملی برای غلات و منبعی مناسب جهت تأمین پروتئین و اسیدهای آمینه در رژیم غذایی مردم این کشورها محسوب می‌شود (Kader et al. 2002). عدس یک گیاه خود گرده‌افشان با اندازه ژنوم ۴ گیگا جفت باز، یک محصول

www.SID.ir

مهم است که پروتئین، کربوهیدرات‌ها، فیبر و مواد معدنی را برای انسان و خوراک دام فراهم می‌کند (Abraham 2015). در میان حبوبات، عدس از جمله گیاهانی است که غالباً در اراضی حاشیه‌ای و در خاک‌های نه چندان حاصلخیز کشت می‌شود. کشت عدس مزایای زیادی دارد، زیرا با تثبیت بیولوژیکی نیتروژن هوا، مقداری از نیاز خود و گیاهان غیر لگوم بعد از خود را تأمین می‌نماید و در نتیجه نیاز به مصرف کود نیتروژن را کاهش می‌دهد (Walley et al. 2007). در ایران عمده مناطق عدس کاری در نواحی کوهستانی و مرتفع با زمستان‌های سخت واقع شده است و با توجه به حساسیت ارقام موجود به سرما و یخبندان، کشت پاییزه آن مقدور نبوده و کشت آن غالباً در بهار و به صورت دیم انجام می‌شود. در این مناطق، قبل از رسیدن گیاه به مرحله زایشی و باردهی، بارندگی به اتمام رسیده، و علاوه بر آن به دلیل پراکنش نامناسب بارندگی و در نتیجه تخلیه رطوبت خاک، گیاه در حساس‌ترین مرحله زندگی خود با تنش خشکی مواجه شده و لذا عملکرد آن به شدت کاهش می‌یابد. در صورت در اختیارداشتن ارقام مقاوم به سرما و یخزدگی، کشت پاییزه- زمستانه عدس می‌تواند گزینه مناسبی برای برون‌رفت از این مشکل باشد. در برنامه‌های اصلاحی عدس برای مناطق معتدل، بهبود تحمل به سرما در اولویت قرار دارد (Saha and Vandemark 2013).

تحت تنش غیرزیستی بیان بسیاری از ژن‌ها القاء شده و محصولات آن‌ها نقش مهمی در واکنش‌های تنش و مقاومت بازی می‌کنند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006). سازگاری به سرما از طریق تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی مختلفی از قبیل تغییر در سطوح یون کلسیم، اینوزیتول فسفات، گونه‌های فعال اکسیژن، ترکیب لیپیدی غشاء و تغییر در سطوح بیان ژن‌های چاپرون، پروتئین‌های کانال آبی و آنزیم‌های اکسیداتیو همراه است (Xiong et al. 2002a; Nayyar et al. 2005). اگرچه افزایش یا کاهش تعداد رونوشت‌های یک ژن دلیل بر نقش کلیدی آن در واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نمی‌باشد، اما جست و جو برای این گونه ژن‌ها تاکنون تنها راهی است که می‌توان در جهت شناسایی و جداسازی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌ها به کار برد (Lievens et al. 2001).

عوامل رونویسی (TFs) تنظیم کننده‌های محوری درگیر در پاسخ به تنش‌های غیر زنده مانند سرما، خشکی و شوری هستند (Hong et al. 2016). معمولا عوامل نسخه برداری به اجزاء پروموتر در ژن‌هایی که توسط تنش‌های مختلف تنظیم می‌شوند، متصل می‌گردند (Guiltinan et al. 1990). مطالعات نشان داده است که عوامل نسخه برداری در تنظیم پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. با وجود این چگونگی فعالیت بسیاری از ژن‌های رمز کننده این عوامل هنوز روشن نیست (Chen et al. 2002).

ژن‌های NAC (NAM, ATAF½, CUC2) یک خانواده بزرگ از فاکتورهای رونویسی گیاهی را تشکیل می‌دهند (Wu et al. 2016). فاکتورهای رونویسی NAC دارای یک دامنه بسیار محافظت شده در N-Terminal خود هستند، که فعالیت اتصال DNA را تعیین می‌کند و یک دامنه متغیر در C-Terminal دارند که مسئول فعالیت رونویسی است (Olsen et al. 2005). ناحیه C-Terminal پروتئین NAC که معمولاً حاوی یک دامنه فعال‌سازی بیان است هم در میزان طول و هم در توالی بشدت متنوع است (Ooka et al. 2003). فاکتورهای رونویسی NAC در واسطه‌گری پاسخ‌های فیزیولوژیکی مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان درگیر هستند و در مسیرهای سیگنالینگ مختلف تحت تنش‌های زنده یا غیر زنده شرکت می‌کنند (Ling et al. 2017). همچنین فاکتورهای رونویسی NAC تنظیم کننده بسیار مهم در تنش‌های غیرزنده و توسعه گیاه هستند. با این حال دانش مربوط به عملکرد توابع فاکتورهای رونویسی NAC گیاهان در تحمل تنش و اساس ملکولی پایدار هنوز محدود است (Jin et al. 2017). در دهه‌های گذشته پیشرفت‌های بسیار بزرگی در رمزگشایی اجزای قابل توجهی که در شبکه سیگنالینگ سرما درگیر هستند صورت گرفته است (Peng et al. 2014). برای تولید مؤثر و کارآمد در کشاورزی، لازم است مقاومت محصول در برابر تنش‌های غیرزنده افزایش یابد بنابراین، مطالعه فاکتورهای رونویسی NAC پیش‌نیازی برای بهبود تحمل تنش در گیاهان است (Chen et al. 2015). در حدود ۹۷ مورد فاکتور رونویسی NAC در توالی ژنوم *Medicago trancatula* که یکی از مهم‌ترین گیاهان مدل حبوبات می‌باشد، شناسایی شده است (Ling et al. 2017). علاوه بر این، مشخصات بیان افتراقی MtNAC، آنها را برای پاسخ به تنش‌های مختلف پیشنهاد می‌کند. ژن همولوگ MtNAC83 و SsNAC23 به شدت در دمای ۴°C بیان می‌شوند که این نشان دهنده پاسخ مثبت این ژن‌ها به تنش سرما می‌باشد (Domingues 2009). آزمایشات ترنس‌ژنیک نشان می‌دهد که ژن TaNAC2 تحمل به تنش‌های انجماد، خشکی و شوری را در آرابیدوپسیس افزایش می‌دهد (Mao et al. 2012).

در سویا GmNAC11 و GmNAC20 در پاسخ به دمای پایین دخیل هستند و بیان بیش از حد این دو ژن تحمل به دمای پایین را افزایش می‌دهد (Hao et al. 2011). در مطالعه‌ای نشان داده شد که بیان ژن GmNAC20 به تدریج توسط سرمای ۴°C تنظیم می‌شود و در ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از قرارگیری در معرض سرما تقریبا ۵ برابر کاهش می‌یابد (Huang et al. 2016). ژن GmNAC2 (Ay974350) اولین فاکتور رونویسی ATAF1 مانند NAC می‌باشد که در سویا شناسایی شد (Meng et al. 2007). GmNAC2 بر اساس توالی نوکلئوتیدی، نزدیک‌ترین ارتباط را با ژن ATAF1 دارد. بنابراین، ژن GmNAC2 ممکن است عملکردی مشابه با ATAF1 داشته باشد (Pinheiro et al. 2009). بیان بیش از حد ATAF1 و ATAF2 حساسیت به پاتوژن‌های قارچی در آرابیدوپسیس را افزایش می‌دهد (Wu et al. 2009). به نظر می‌رسد نقش ژن GMNAC2 در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد. ژن GMNAC2 در برخی گیاهان باعث حساسیت می‌شود اما در برخی گیاهان باعث مقاومت به تنش‌های غیر زیستی شامل تنش سرما، شوری، خشکی و زخم‌های مکانیکی شده است (Pinheiro et al. 2009; Tran et al. 2009; Jin 2012).

در مطالعه‌ای، یک ژن mfNAC3 شناسایی شد که تحت تنش سرما، خشکی و شوری القاء می‌شد. با تولید لاین‌های با بیان بیش از حد ژن mfNAC3، نوعی فنوتیپ مقاوم به سرما مشاهده شد که هم در شرایط سرما و هم در شرایط غیر سرما به طور قابل ملاحظه‌ای سطح بالایی از بیان ژن‌های پاسخ دهنده به سرمای mfCBFs و mtCACs را نشان داد. این ژن یک عامل رونویسی NAC را رمزگذاری می‌کند که در هسته قرار دارد و دارای فعالیت در فرآیند رونویسی است (Qu et al. 2016)

www.SID.ir

بیوتکنولوژی روشی برای غلبه بر محدودیت تنش‌های زنده و غیرزنده در حبوبات می‌باشد. درک مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تنش یک مسأله اساسی در زیست‌شناسی گیاهی است و برای بهبود ژنتیکی حبوبات لازم خواهد بود (Dita et al. 2006) بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی بیان سه ژن تنظیمی NAC شامل GmNAC2, mtNAC57 و mfNAC تحت تیمارهای مختلف سرمایی در عدس و همچنین بررسی روند تغییرات بیانی آن‌ها تحت شرایط مدت زمان تنش سرما بود. تا کنون گزارش‌های معدودی در مورد تراریزش عدس در دسترس می‌باشد (Bagheri et al. 2012). در تحقیقی تراریزش عدس با ریزنمونه‌های گره کوتیلدونی با استفاده از تفنگ ژنی انجام شد و بیان ژن گزارشگر GUS به میزان 50 درصد در ریزنمونه‌های بمباران شده مشاهده شد (Oktem et al. 1999). در آزمایشی به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه عدس با استفاده از آگروباکتریوم، نتیجه گرفته شد که ریزنمونه لپه شاخه‌دار شده روی محیط کشت دارای سیتوکینین پس از حذف سرشاخه‌ها یک ریزنمونه خوب برای فرآیند انتقال ژن است (Zaker Tavallaie et al. 2017). در تحقیق دیگری ژن DREB1A جهت ایجاد تحمل به علف‌کش با اگروباکتریوم به عدس منتقل شد (Khatib et al. 2011). در پژوهش دیگری، ژن کولین اکسیداز *codA* با هدف تحمل به تنش‌های غیر زیستی، به ویژه سرما، به رقم گچساران عدس منتقل شد (Zaker Tavallaie et al. 2016).

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان، شرایط رشدی و اعمال تیمار

به منظور ارزیابی بیان سه ژن تنظیمی NAC (شامل mtNAC57 ، mfNAC و GmNAC2) تحت تنش سرما، بذرها رقم گچساران گیاه عدس با ۵ تیمار دمایی (هر تیمار در ۳ تکرار) در گلخانه کشت شد. بذور در اوایل آذرماه در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه، پرلیت، پیت‌موس و ورمی‌کولایت، در عمق ۲cm کشت شد. گلدان‌ها به مدت ۳ هفته در دمای ۲۳°C در شرایط گلخانه نگهداری شدند و هر ۲ روز یک بار آبیاری سبک صورت گرفت. در این آزمایش از ۳۰ گلدان استفاده شد که هر گلدان حاوی ۵ گیاهچه عدس بود. در هر تیمار از ۶ گلدان استفاده شد که هر دو گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شدند. برای اعمال تیمار سرما، ابتدا دمای یخچال روی ۴°C تنظیم شد و در دو روز متوالی، روزی دو بار به مدت یک ساعت دمای آن اندازه گیری شد و از دمای آن اطمینان حاصل شد. سپس گلدان‌های حاوی گیاهان ۲۹ روزه به یخچال با دمای ۴°C انتقال داده شدند. در این مطالعه، اثر ۴ تیمار دوره سرمادهی شامل ۶h، ۱۲h، ۲۴h و ۴۸h در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی بیان ژن‌های مورد نظر بررسی شد. همچنین یک تیمار به عنوان شاهد در شرایط گلخانه (دمای ۲۳°C) در نظر گرفته شد. بعد از اعمال تیمار تنش، اندام هوایی و اندام زمینی بصورت جداگانه در مرحله رویشی (پس از مدت زمان اعمال تنش)

www.SID.ir

Archive of SID

برداشت و بلافاصله در ازت مایع منجمد و پودر شد و سپس در ویال‌های پلاستیکی در یخچال در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. نمونه‌گیری از تیمار شاهد نیز از گیاهان در دمای ۲۳°C در گلخانه صورت گرفت.

استخراج RNA و طراحی آغازگرها

استخراج RNA کل با استفاده از روش لیتیم‌کلراید انجام شد. نمونه‌های RNA استخراج شده برای یکپارچگی و همچنین غلظت و کیفیت آنها به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و خوانش اسپکتروفتومتری۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی شدند. برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها، از روش تیمار با آنزیم DNase I استفاده گردید. جهت طراحی آغازگر، توالی ژن‌های مورد نظر از بانک ژن NCBI دریافت و آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Workbench 9.0 و Allele ID 7.0 طراحی شدند. لیست آغازگرهای طراحی شده GmNAC2، mtNAC57، mfNAC و Actin در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده

Table 1. Specifications of used primers

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence (5'-3')	دمای اتصال T_a (C)	اندازه قطعه مورد تکثیر Amplicon size (bp)
MF NAC (F)	TTTGACTCCATACCCGAAT	60	149
MF NAC (R)	TGAACCTCTTCTTCCGTG		
MT NAC57 (F)	ATACTACTAACAACTCTTATGG	56.3	133
MT NAC57 (R)	TGGTAATCCTTATCGTCAT		
GM NAC2 (F)	AAGCGAACCTAAGTGGAA	60	118
GM NAC2 (R)	CGGCGACATCTGATTATTG		
Actin (F)	CTCCTGCTATGTATGTTGCTA	60	150
Actin (R)	AGGATTGCATGTGGAAGTG		

ساخت cDNA

برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها از روش تیمار با آنزیم DNase I استفاده گردید. با انجام PCR و بررسی محصول PCR روی ژل آگارز، از عدم آلودگی RNA به DNA اطمینان حاصل شد. برای ساخت cDNA از کیت شرکت Takara استفاده شد. به این ترتیب که، ۲ میکرولیتر از 5x Primerscript Buffer، نیم میکرولیتر از Primerscript RT Enzyme Mix 1، نیم میکرولیتر از Oligo dt primer 50 µM، نیم میکرولیتر از Random 6 mers 100 µM و نیز مقدار یکسان RNA 5 µl به ویال اضافه شد و حجم نهایی به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. ویال به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵°C قرار داده شد. با استفاده از دستگاه PCR دماها و زمان‌ها تنظیم و cDNA ساخته شد.

www.SID.ir

PCR زمان واقعی

از cDNAهای رقیق شده به عنوان الگو در شرایط کاملاً یکسان با cDNAهای مورد استفاده در هر نمونه برای ژن کنترل داخلی اکتین برای تمام نمونه‌ها، در واکنش Real time RT-PCR استفاده شد. غلظت تمام مواد موجود در واکنش‌ها برای تمام نمونه‌ها یکسان بود. واکنش‌ها در دستگاه Rotor Gene Q شرکت Thermo Fisher Scientific و برای سنجش میزان بیان ژن‌های مورد نظر در دستگاه ریل تایم از رنگ سایبر گرین استفاده شد. به منظور کمی‌سازی بیان ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های مختلف از روش $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001). تجزیه و تحلیل داده ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS صورت گرفت. اجزای واکنش و شرایط دمایی PCR در زمان واقعی در جدول‌های ۲ و ۳ ارائه شده است.

جدول ۲. اجزای واکنش PCR زمان واقعی

Table 2. Real-time PCR reaction components

components Reaction اجزای واکنش	Quantity مقدار
CYBR premix EX Taq II	10 µl
Forward primer (10 pm/µl)	1 µl
Reverse primer (10 pm/µl)	1 µl
cDNA (10 ng/µ)	5 µl
Water	to 20 µl

جدول ۳. شرایط دمایی واکنش PCR زمان واقعی

Table 3. Real-time PCR reaction conditions

Time مدت	دما (درجه سلسیوس) Temperature (°C)	Reaction step مرحله واکنش	
2 min	95	واسرشته سازی اولیه Primary Denaturation	
15 sec	95	واسرشته سازی Denaturation	چرخه Cycle 40
15 sec	T_a Annealing	اتصال Annealing	
15 sec	72	گسترش Extension	
10 min	70-95	ذوب Melting	

www.SID.ir

Archive of SID

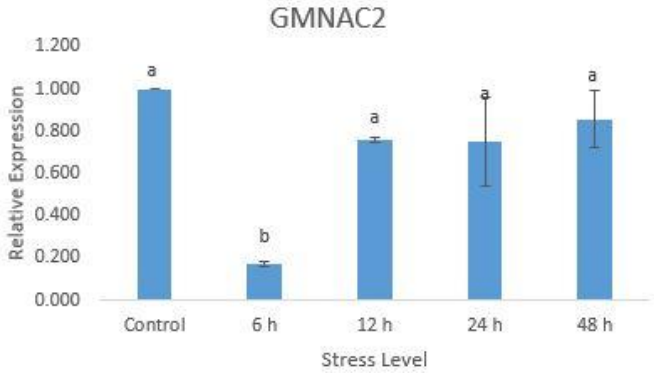
نتایج

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن GmNAC2 در اندام هوایی اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمارهای دمایی در سطح یک درصد را نشان داد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن GmNAC2 در اندام هوایی نشان داد که با افزایش تنش، بیان ژن روند یکسانی نداشته و در تیمار ۶h به شدت کاهش یافته و سپس در تیمارهای بعدی با افزایش مدت زمان تنش افزایش یافت ولی بیان در همه تیمارها کمتر از شاهد بود. بین سطوح مختلف تیمار تنش ۱۲h، ۲۴h و ۴۸h با شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده نشد. اما بین سطح تیمار ۶h با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ٤. تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن‌های MfNAC، MtNAC57 و GmNAC2 در اندام هوایی

Table 4. Analysis of variance of gene expression data of MfNAC, MtNAC57, GmNAC2 in shoot

میانگین مربعات Mean squares			درجه آزادی	منابع تغییرات
Mt	Mf	Gm	Degrees of freedom	Sources of variation
0.425**	0.537**	0.301**	4	تیمار Treatment
0.010	0.008	0.038	10	خطا Error



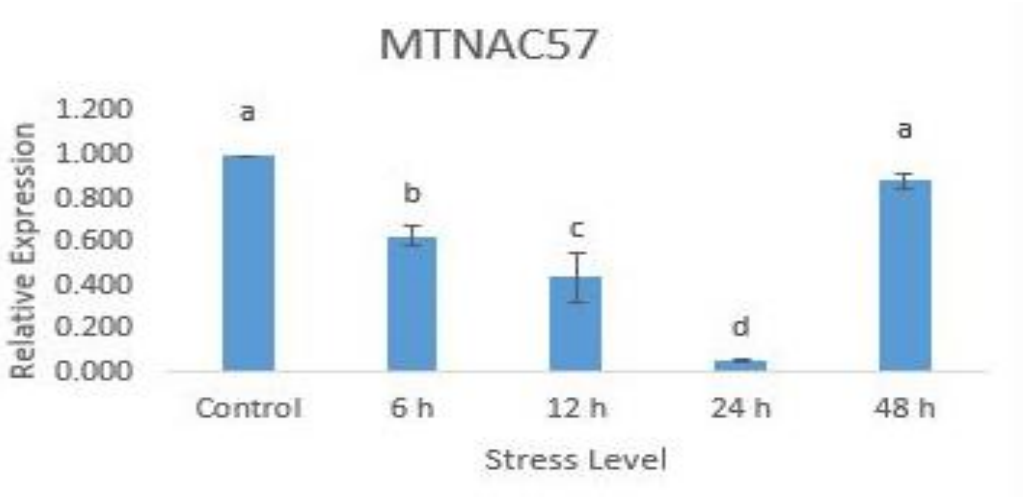
شکل ۱. بیان نسبی ژن GmNAC2 در اندام هوایی تحت تنش سرما

Figure 1. Relative expression of GmNAC2 gene in the shoot under cold stress

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن MtNAC57 در اندام هوایی بین سطوح مختلف تیمارهای دمایی، در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد. نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن در اندام هوایی در سطح یک درصد بین تیمار ۶h، ۱۲h و ۲۴h با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین بیان ژن MtNAC57 در اندام

www.SID.ir

هوایی، اختلاف معنی‌داری را بین سطح تیمار ۴۸h با شاهد نشان نداد. از طرفی، نتایج مقایسه میانگین بیان ژن MtNAC57 در اندام هوایی، اختلاف معنی‌داری بین سطح تیمار ۴۸h با تیمارهای ۶h، ۱۲h و ۲۴h نشان داد. این ژن در مدت زمان ۲۴h پس از تنش بیشترین کاهش بیان را داشت (شکل۲) . علت آنکه ژن MtNAC57 در زمانهای اولیه تنش دمای پایین کاهش بیان داشته و سپس مجدد افزایش بیان داشته است، احتمالاً ناشی از آن است که گیاه در مدت زمان طولانی‌تر (یعنی ۴۸h) پس از تنش به سرما خو گرفته است و بیان آن افزایش یافته است.



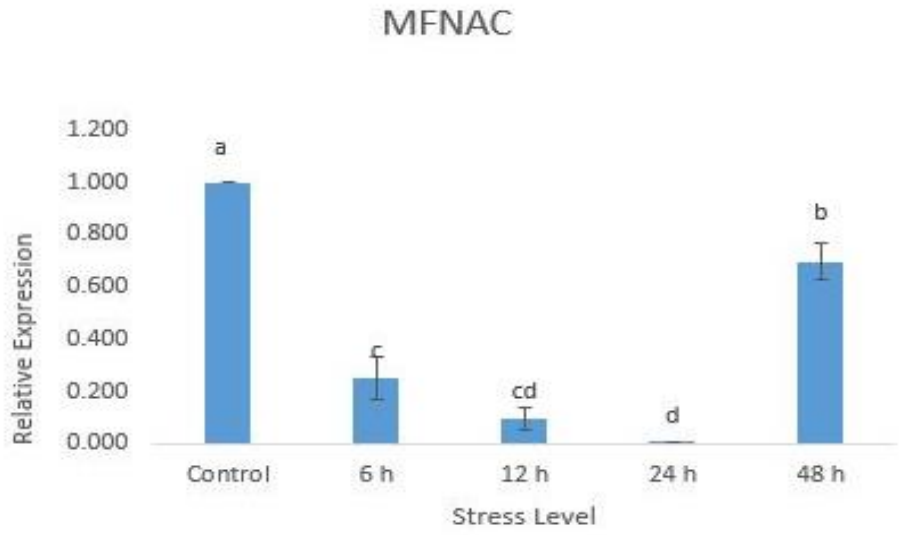
شکل ۲. بیان نسبی ژن MtNAC57 در اندام هوایی تحت تنش سرما

Figure 2. Relative expression of MtNAC57 gene in the shoot under cold stress

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن MfNAC در اندام هوایی، اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمارهای دمایی در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن MfNAC در اندام هوایی نشان داد که، با افزایش تنش بیان ژن روند یکسانی نداشته و بیان ژن با افزایش مدت زمان تنش به شدت کاهش یافته و سپس در تیمار ۴۸h روند افزایشی داشته است. نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن MfNAC در اندام هوایی نشان داد این ژن در همه تیمارها کاهش بیان داشته و در مدت زمان ۲۴h پس از تنش بیان بسیار پایینی داشته است. نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن MfNAC در اندام هوایی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین تیمار ۶h با تیمارهای ۲۴h، ۴۸h و شاهد نشان داد. همچنین بین تیمار ۲۴h با تیمارهای ۴۸h، ۶h و شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد. بین تیمار ۱۲h با ۶h و ۲۴h اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. بیان نسبی ژن MfNAC در اندام هوایی تحت تنش سرما

Figure 3. Relative expression of MfNAC gene in the shoot under cold stress

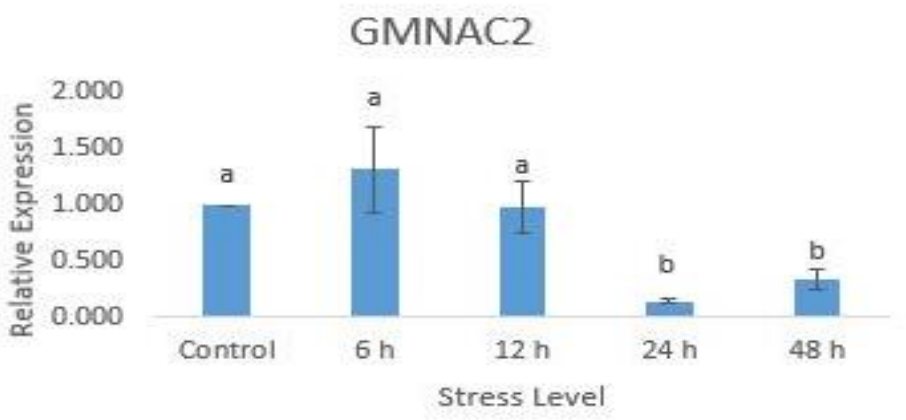
نتایج تجزیه واریانس بیان ژن GmNAC2 در اندام زمینی اختلاف معنی‌داری را بین سطوح مختلف تیمارهای دمایی در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن GmNAC2 در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۶h و ۱۲h با شاهد در سطح یک درصد نشان نداد. اما بین سطوح تیمارهای ۲۴h و ۴۸h با تیمار شاهد و با تیمارهای ۶h و ۱۲h اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن GmNAC2 در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار ۲۴h و ۴۸h در سطح یک درصد نشان نداد. در مجموع نتایج نشان داد که تیمار ۲۴h پس از تنش سرما بیشترین کاهش بیان را نشان داده است (شکل ۴).

جدول ۵. تجزیه واریانس داده‌های ژن‌های MfNAC، MtNAC57 و GmNAC2 در اندام زمینی

Table 5. Analysis of variance of gene expression data of MfNAC, MtNAC57, GmNAC2 in the root

میانگین مربعات Mean squares			درجه آزادی	منابع تغییرات
Mt	Mf	Gm	Degrees of freedom	Sources of variation
2043.441**	161.621*	2.940**	4	تیمار Treatment
118.141	19.282	0.123	10	خطا Error

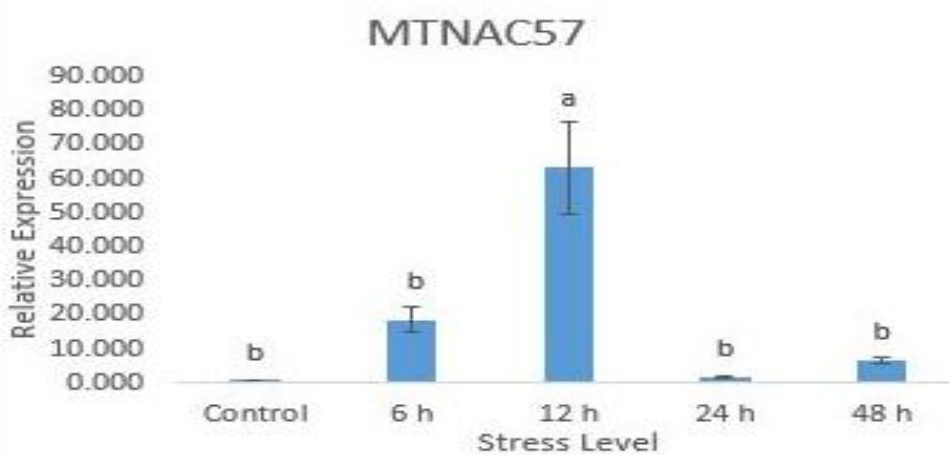
www.SID.ir



شکل ٤. بیان نسبی ژن GmNAC2 در اندام زمینی تحت تنش سرما

Figure 4. Relative expression of GmNAC2 gene in the root under cold stress

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن MtNAC57 در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمارهـای دمـایی در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیـان ژن MtNAC57 در انـدام زمینـی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۶h، ۲۴h و ۴۸h با شاهد در سطح یک درصد نشان نداد. نتـایج مقایسـه میـانگین آزمـون چنـد دامنه‌ای دانکن بیان ژن MtNAC57 در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۱۲h با شاهد در سطح یک درصد نشـان داد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن MtNAC57 در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بـین تیمـار ۱۲h با تیمارهای ۶h، ۲۴h و ۴۸h در سطح یک درصد نشان داد. بیشترین بیـان ژن ۱۲hپـس از تـنش سـرما مشـاهده شـد. ژن MtNAC57 در همه تیمارها در اندام زمینی پس از تنش سرما افزایش بیان داشت و در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از تنش سرما کمترین افزایش بیان را نشان داد (شکل ۵).



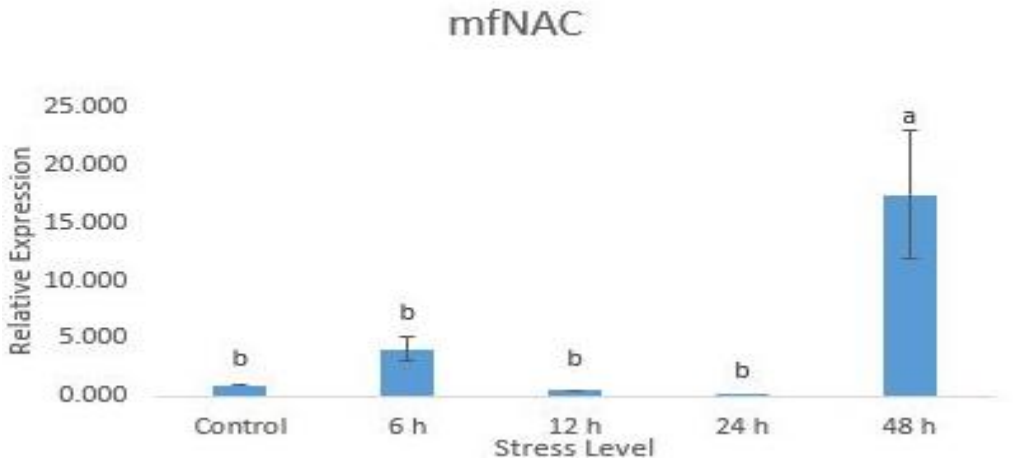
شکل ۵. بیان نسبی ژن MtNAC57 در اندام زمینی تحت تنش سرما

Figure 5. Relative expression of MtNAC57 GmNAC2 gene in the root under cold stress

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن MfNAC در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف دمایی در سطح پنج درصد نشان داد (جدول۵). نتایج مقایسه میانگین آزمون چند دامنه‌ای دانکن بیان ژن MfNAC در اندام زمینی، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای ۶h، ۱۲h و ۲۴h با شاهد نشان نداد، در حالیکه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۶h، ۱۲h، ۲۴h و شاهد با تیمار ۴۸h در سطح پنج درصد وجود داشت. در مجموع بیشترین بیان این ژن ۴۸h پس از تنش سرما مشاهده شد (شکل ۶). نتایج تحقیق نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تنش، بیان این ژن تغییر خاصی نسبت به شاهد نداشته ولی در تیمار ۴۸h روند افزایشی نشان داده است. از نتایج این تحقیق چنین به نظر می‌رسد که ژن MfNAC جزء ژن‌های دیرپاسخ‌دهنده به تنش سرما باشد.



شکل٦. بیان نسبی ژن MfNAC در اندام زمینی تحت تنش سرما

Figure 6. Relative expression of MfNAC gene in the root under cold stress

بحث

در یک مطالعه به منظور ارزیابی تحمل به انجماد ژنوتیپ‌های عدس تحت شرایط کنترل شده، هفت نمونه عدس شامل ژنوتیپ‌های MLC-357, MLC-225, MLC-185, MLC-60, MLC-7، رباط و قزوین مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که ژنوتیپ‌های MLC-60 و رباط به ترتیب بیشترین و کمترین درصد بقاء را داشتند(Nezami et al. 2011). همچنین برای هیچ کدام از ارقام ذکر شده مقاومت به پژمردگی فوزاریومی و آسکوچیتا (که دو نمونه از بیماری‌های بسیار مهم حبوبات در ایران هستند) ذکر نشده است در صورتی که رقم گچساران مقاومت به هر دو بیماری را دارا می‌باشد. برای ژن کولین اکسیداز *cod A* که به رقم گچساران عدس انتقال یافته است، مقاومت به سرما (و برخی تنش‌های غیرزیستی دیگر) ذکر شده است که به نقش گلایسین بتائین در حفاظت از ساختارهای سلولی گیاه مرتبط می‌گردد (Zaker Tavallaie et al. 2016).

www.SID.ir

رقم گچساران عدس یک رقم مقاوم به سرما می‌باشد و برنامه اصلاح نژاد ICARDA رقم گچساران عدس را به عنوان یکی از ژنوتیپ‌های بادوام زمستان در ایران ثبت کرده است (Tepe et al. 2005; Ali and Gupta 2012). رقم گچساران عدس زودرس و با ثبات بالا و با دانه‌های بزرگ زرد رنگ می‌باشد که به منظور کاشت پاییزه در مناطق زمستانی خفیف ایران مناسب می‌باشد. رقم گچساران مقاومت ترکیبی به پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum f. sp* و بلایت آسکوچیتا نشان می‌دهد که به ثبات عملکرد کمک می‌کند(Sabaghpour et al. 2007).

پروتئین‌های خانواده فاکتور رونویسی NAC در مراحل مختلف رشد و توسعه و همچنین در پاسخ به تنش‌های مختلف در گیاهان بیان می‌شوند. هنگامی که گیاهان تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده قرار می‌گیرند فاکتورهای رونویسی NAC در مسیرهای سیگنالینگ مختلف برای مقابله با این شرایط نامساعد شرکت می‌کنند (Pinheiro et al. 2009). بنابراین مطالعه فاکتورهای رونویسی NAC پیشنیازی برای بهبود تحمل تنش در گیاهان است (Chen et al. 2015). فاکتورهای رونویسی NAC یک نقش مهم نظارتی در گیاهان در معرض تنش‌های غیرزنده ازجمله شوری، خشکی، سرما و اسیدآبسیزیک بازی می‌کنند (Olsen et al. 2005).

در این تحقیق، پاسخ بیانی سه ژن mfNAC، MtNAC57 و GmNAC2 به سرما در رقم گچساران عدس بررسی شد. نتایج بررسی بیان ژن GmNAC2 در اندام هوایی نشان داد که، با افزایش تنش بیان این ژن روند یکسانی نداشته است. به نظر می‌رسد بیان ژن GmNAC2 در اندام هوایی در تنش اولیه 6h، به شدت کاهش یافته ولی در تیمارهای بلند مدت‌تر که گیاه به سرما خو گرفته است، افزایش می‌یابد. الگوی بیان ژن GmNAC2 در اندام زمینی نسبت به اندام هوایی کاملاً متفاوت بود و در تیمارهای اولیه تنش کمی افزایش یافت ولی با افزایش مدت زمان تنش بیان آن کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که ژن GmNAC2 در اندام هوایی گیاه دارای نقش خیلی مهم‌تری بوده و به همین دلیل گیاه بیان آن را بالا نگه داشته تا بتواند بهتر با تنش مقابله کند. به عبارتی دیگر، این ژن به گونه‌ای عمل می‌کند که بتواند بیان خود را با شرایط تنش بلند مدت‌تر تنظیم کرده تا در آن شرایط کاهش بیان نداشته باشد. در مطالعه‌ای در سویا مشخص شد که ژن‌های GmNAC11 و GmNAC20 در پاسخ به دمای پایین درگیر هستند و بیان بیش از حد این دو ژن تحمل به دمای پایین را افزایش می‌دهد (Hao et al. 2011). در یک مطالعه برخی از ژن‌های مهار گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) که در پایین دست بیان ژن GmNAC2 تنظیم می‌شوند، در تنباکو شناسایی شدند (Jin 2012). همچنین مشاهده شد که برگ گیاهان توتون تراریخت با ژن GmNAC2 تحت تنش‌های غیرزنده سرما، شوری و خشکی در مقایسه با گیاهان شاهد دارای سطح مالون‌دی‌آلدئید بالاتری بود. بالا بودن سطح مالون‌دی‌آلدئید اغلب به عنوان یک شاخص برای تشخیص گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تخریب غشاء سلولی مربوطه یا اختلال عملکرد استفاده می‌شود (Jin 2012). اگرچه تحقیق مذکور در سه نوع تنش غیرزنده متفاوت بود ولی تفاوت نتایج آن با نتایج تحقیق حاضر ممکن است به این دلیل باشد که ژن GmNAC2 در گیاهان مختلف نقش‌های متفاوتی از نظر حساسیت و مقاومت به تنش دارد. بعلاوه آنکه بیان یک ژن متأثر از شرایط مختلف از قبیل نوع گونه، نوع بافت، مدت زمان تنش است . مطالعات نشان

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهد که ژن GmNAC2 به عنوان یک تنظیم کننده منفی در تنش‌های غیر زنده در تنباکو و در مسیرهای سیگنالینگ ROS می‌باشد و بیان ژن‌های مرتبط با مهار ROS را تعدیل می‌کند (Jin 2012). بنابراین به نظر می‌رسد بیان بیش از حد ژن GmNAC2 همیشه باعث افزایش تحمل به تنش نمی‌شود که احتمالاً به این دلیل است که در صفت تحمل به تنش‌های غیرزیستی ژن‌ها و مکانیسم‌های مختلفی در این تنشها درگیر باشند. ژنهای خانواده NAC در فرایندهای تنظیمی گوناگونی نظیر نمو بذر و جنین، تشکیل مریستم انتهایی ساقه، پیری برگ، تقسیم سلولی، تشکیل دیوار ثانویه، تشکیل ریشه‌های جانبی، انتقال پیام اکسین، رشد فیبر و همچنین، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی درگیر هستند (Koyama 2014; Shen et al. 2009; Sperotto et al. 2009).

نتایج بررسی بیان ژن MtNAC57 در اندام هوایی نشان داد که بیان این ژن با افزایش مدت زمان تنش کاهش یافته ولی در تیمار ۴۸h بیان آن افزایش پیدا کرده و به سطح بیان تیمار شاهد رسید. بیان ژن MtNAC57 در اندام زمینی با شروع تنش افزایش یافت و در تیمار ۱۲h به بیشترین میزان رسید و سپس در تیمارهای بعدی کاهش یافت اما بیان آن در همه تیمارها بیشتر از شاهد بود. در مجموع به نظر می‌رسد که این ژن در اندام هوایی نسبت به اندام زمینی نقش کمتری داشته باشد و در اندام زمینی نیز وقتی تنش بلند مدت‌تر می‌شود بیان آن کاهش می‌یابد. در یک مطالعه مشخص شد ژن‌های MtNAC در طول توسعه بذر و دیگر فرآیندهای فیزیولوژیکی در *Medicago sativa* (یونجه) بیان بالایی دارند (Ling et al. 2017). در *Medicago trancatula* (یونجه دیپلوئید)، ژن MtNAC969 توسط چندین مسیر (مسیرهای سیگنالینگ اتیلن و اکسین) در سیستم ریشه درگیر است (Ling et al. 2017). ژن همولوگ MtNAC83 و SsNAC23 به شدت در دمای ۴°C بیان می‌شوند و این نشان دهنده پاسخ مثبت به تنش سرما می‌باشد (Domingues 2009).

نتایج بررسی بیان ژن MfNAC در اندام هوایی نشان داد که با افزایش تنش، بیان ژن روند یکسانی نداشته و بیان ژن با افزایش مدت زمان تنش به شدت کاهش پیدا کرده و سپس در تیمار ۴۸h روند افزایشی داشته است. روند بیان این ژن در اندام هوایی و اندام زمینی متفاوت بود به طوری که در اندام هوایی کاهش بیان ژن در مجموع نسبت به شاهد وجود داشت. در حالیکه در اندام زمینی در تنش بلند مدت ۴۸h افزایش بیان ژن نسبت به شاهد وجود داشت و چون بیان ژن در تنش بلندمدت‌تر اهمیت بیش‌تری دارد، به احتمال قوی نقش این ژن در تنش سرما در اندام زمینی کلیدی‌تر به نظر می‌رسد. البته نتایج این تحقیق با نتایجی که از تحقیق در *M. Truncatula* که یکی از گیاهان مدل حبوبات می‌باشد انجام شد همخوانی دارد. در یک مطالعه مشخص شد عملکرد mfNAC3 با mtNAC3 متفاوت است و گونه یونجه *M. falcata* دارای مقاومت بیشتری نسبت به گونه یونجه *M. Truncatula* تحت تنش سرما می‌باشد. ژن mtNAC3 دارای توانایی فعال‌سازی رونویسی است و تشابه بالایی بین mfNAC3 و mtNAC3 دیده می‌شود و در نتیجه فعالیت این دو پروتئین می‌تواند شبیه هم باشد. اما نتایج q RT-PCR در گیاهان تراریخت با این دو ژن نشان داد که mfNAC3 به طور قوی سبب تحمل به سرما می‌شود ولی ژن mtNAC3 در تحمل به سرما تأثیرگذار است ولی تأثیر قوی ندارد (Qu et al. 2016). نتایج یک مطالعه نشان داد که ژن mfNAC3 نقش

www.SID.ir

مهمی در پاسخ به سرما دارد و به عنوان یک تنظیم کننده مثبت ژن mtCBF4 (ژن مربوط بـه آبشـار سـیگنالینگ سـرما) عمـل می‌کند. سطح بیان ژن mtCBF4 در گیاهان تراریخت با mfNAC3 به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و مـی‌تـوان نتیجـه گرفت که mfNAC3 می‌تواند بیان ژن‌های پاسخ‌گو به سرما را تنظیم کند (Qu et al. 2016). نتایج یک تحقیق نشان داد که، ناحیه پروموتر ژن mtCBF4 حاوی موتیف‌های CACG و CATGTG برای اتصال عوامـل رونویسـی خـانواده NAC اسـت. پروتئین mfNAC3 به طور ویژه به موتیف‌های CACG و CATGTG در پروموتر MtCBF4 متصـل مـی‌شـود. در همـین مطالعه (Qu et al. 2016) در دمای ۴°C، mfCBF4 پنج ساعت پس از تنش سرما افزایش یافت و سطح بیان آن در تیمار ۳h و ۱۲h بالا بود. بر اساس این نتایج، این احتمال وجود دارد که mfNAC3 تحت تنش سرما mtCBF4 را تنظیم کند. این نتـایج نشان داد که mfNAC3 به تنش سرما پاسخ داده و نقش مثبتی در تحمل سرما بازی می‌کند (Qu et al. 2016). در این مطالعه همچنین مشخص شد که عملکرد mfNAC3 با mtNAC3 متفاوت است و *M. falcata* دارای مقاومت بیشتری نسبت به *M. truncatula* تحت تنش سرما می‌باشد. با آنکه تشـابه بـالایی بـین mfNAC3 و mtNAC3 دیـده مـی‌شـود امـا در گیاهـان تراریخت با این دو ژن دیده شد که mfNAC3 تحمل به سرما را تضمین می‌کند ولی mtNAC3 در تحمل به سـرما تأثیرگـذار است اما آن را تضمین نمی‌کند. در این مطالعه مشخص شد که mfNAC3 بـه طـور مسـتقیم بـه پروموتـور mtCBF4 متصـل می‌شود و این موضوع یک دلیل قابل قبول را ارائه می‌کند که بیان بیش از حد mfNAC3 می‌توانـد تحمـل بـه دمـای پـایین را افزایش دهد. با توجه به نتایج این تحقیق ژن mtCBF4 یـک ژن هـدف بـرای mfNAC3 مـی‌باشـد (Qu et al. 2016). در مجموع، نتایج یک مطالعه نشان داد که MfNAC3 نقش مثبت در تحمل سرما در *Medicago*، بازی می‌کند و زمینه را برای به دست آوردن لاین با تحمل سرمای بالا فراهم می‌آورد (Domingues 2009).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که درک مکانیسم‌های مولکولی شبکه‌های رونویسـی NAC، در درک پاسـخ‌هـای تنش چندگانه برای توسعه گیاهان زراعی مقاوم به طیف گسترده‌ای از تنش‌ها ضروری می‌باشد که می‌توانند با چالش‌هـای زیسـت محیطی که در شرایط آب و هوایی آینده مواجه می‌شوند، مقابله بهتری داشته باشند. بنابراین پیشنهاد مـی‌شـود: ۱- بررسـی بیـان ژن‌های دیگر NAC، در گیاهان زراعی بویژه در تنش‌های ترکیبی مورد ارزیابی قرار گیرد. ۲- بررسی پرومـوتر ژن‌هـای NAC و تحلیل نواحی پاسخ دهنده این پروموترها در مقابله با تنش‌ها صورت گیرد. ۳- بیان این ژن‌ها در طیفی از ارقام عدس متحمـل بـه سرما بررسی شود.

References

Abraham R (2015) Lentil *(Lens culinaris Medikus)* Current status and future prospect of production in Ethiopia. Adv Plant Agric Res 2, 00040.

Ali M, Gupta S (2012) Carrying capacity of Indian agriculture: Pulse Crops. Curr Sci 102, 874-881.

www.SID.ir

Bagheri A, Ghasemi Omran V, Hatefi S (2012) Indirection in vitro regeneration of lentil (Lens culinaris Medik.). J Plant Mol Breed 1, 43-50.

Chen W, Provart NJ, Glazebrook J et al. (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell 14, 559-574.

Chen X, Lu S, Wang Y, et al. (2015) OsNAC2 encoding a NAC transcription factor that affects plant height through mediating the gibberellic acid pathway in rice. Plant J 82, 302-314.

Dita MA, Rispail N, Prats E et al. (2006) Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica 147, 1-24.

Domingues D (2009) Sure e Garapa: Caracterização Molecular e Distribuição de Dois Retrotransposons com LTR de Cana-de-Açúcar. PhD thesis, University of São Paulo.

Gao JJ, Tao L, Yu XC (2009) Gene expression and activities of SOD in cucumber seedlings were related with concentrations of Mn2+, Cu2+, or Zn2+ under low temperature stress. Agric Sci China 8, 678-684.

Gomat HY, Deleporte P, Moukini R et al. (2011) What factors influence the stem taper of Eucalyptus: growth, environmental conditions, or genetics? Ann For Sci 68, 109-120.

Guiltinan MJ, Marcotte WR, Quatrano RS (1990) A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. Sci 250, 267-271.

Hao YJ, Wei W, Song QX et al. (2011) Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. Plant J 68, 302-313.

Hong Y, Zhang H, Huang L et al. (2016) Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improves drought and salt tolerance in rice. Front Plant Sci 7, 4.

Huang GT, Ma SL, Bai LP et al. (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Mol Biol Report 39, 969-987.

Huang L, Hong Y, Zhang H et al. (2016). Rice NAC transcription factor ONAC095 plays opposite roles in drought and cold stress tolerance. BMC Plant Biol 16, 203.

Jin C, Li KQ, Xu XY et al. (2017) A Novel NAC Transcription Factor, PbeNAC1, of Pyrus betulifolia Confers Cold and Drought Tolerance via Interacting with PbeDREBs and Activating the Expression of Stress-Responsive Genes. Front Plant Sci 8, 1049.

Jin H (2012) Overexpression of the GmNAC2 gene, an AC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco. Plant Mol Biol Report 31, 435-442.

Kader M, Mian M, Hoque M (2002) Effects of Azotobacter inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. J Biol Sci 2, 259-261.

www.SID.ir

Khatib F, Makris A, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Expression of the DREB1A gene in lentil (Lens culinaris Medik. Subsp culinaris) transformed with the Agrobacterium system. Crop Past Sci 62, 488-495.

Koyama T (2014) The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. Front Plant Sci 5, 1–8.

Lievens S, Goormachtig S, Holsters M (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. Nucleic Acids Res 29, 3459-3468.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods 25, 402-408.

Ling L, Song L, Wang Y, Guo C (2017) Genome-wide analysis and expression patterns of the NAC transcription factor family in Medicago truncatula. Physiol Mol Biol Plant 23, 343-356.

Mao X, Zhang H, Qian X et al. (2012) TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in Arabidopsis. J Exp Bot 63, 2933-2946.

Meng Q, Zhang C, Gai J, Yu D (2007) Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (Glycine max (L.) Merr.). J Plant Physiol 164, 1002-1012.

Nayyar H, Bains T, Kumar S (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environ Exp Bot 54, 275-285.

Nezami A, Khazaei H, Shojaei K, Rezaei A (2011) Evaluation of freezing tolerance of lentil (Lens culinaris Medik.) genotypes in controlled conditions. J Crop Prod Environ Stress 3(1,2), 45-85.

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trend Plant Sci 10, 79-87.

Ooka H, Satoh K, Doi K et al. (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana. DNA Res 10, 239-247.

Öktem HA, Mahmoudian M, Eyidoðan F, Yücel M (1999) Gus gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. Lens Newsl 26, 3-6.

Peng T, Zhu X, Duan N, LIU JH (2014) PtrBAM1, a β amylase coding gene of Poncirus trifoliata, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels. Plant Cell Environ 37, 2754-2767.

www.SID.ir

Pinheiro GL, Marques CS, Costa MD et al. (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. Gene 444, 10-23.

Qu Y, Duan M, Zhang Z et al. (2016) Overexpression of the Medicago falcata NAC transcription factor MfNAC3 enhances cold tolerance in Medicago truncatula. Environ Exp Bot 129, 67-76.

Saha GC, Vandemark GJ (2013) Stability of expression of reference genes among different lentil (Lens culinaris) genotypes subjected to cold stress, white mold disease, and Aphanomyces root rot. Plant Mol Biol Report 31, 1109-1115.

Sabaghpour SH, Safi Khani M (2007) Registration of 'Gachsaran' Lentil. J Plant Registrations 1, 39.

Shen H, Yin Y, Chen F et al. (2009) A bioinformatic analysis of NAC genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production. Bioenergy Res 2(4), 217–232.

Singh K, Saxena MC (1993) Breeding for Stress Tolerance in Cool-season Food Legumes, John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 245-270.

Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL et al. (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta 230 (5), 985–1002.

Tepe I, Erman M, Yazlik A et al. (2005) Comparison of some winter lentil cultivars in weed-crop competition. Crop Prot 24, 585–589.

Tran LSP, Quach TN, Guttikonda SK et al. (2009) Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean. Mol Genet Genomics 281, 647-664.

Walley FL, Clayton GW, Miller PR et al. (2007) Nitrogen economy of pulse crop production in the Northern Great Plains. Agron J 99, 1710-1718.

Wu J, Wang L, Wang S (2016) Comprehensive analysis and discovery of drought-related NAC transcription factors in common bean. BMC Plant Biol 16, 193.

Wu Y, Deng Z, Lai J et al. (2009) Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. Cell Res 19, 1279.

Xiong L, Lee H, Ishitani M et al. (2002) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. Proc Nat Acad Sci 99, 10899-10904.

Yadollahi P, Abad ARB, Khaje M et al. (2014) Effect of intercropping on weed control in sustainable agriculture. Int J Agri Crop Sci 7, 683.

www.SID.ir

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Ann Rev Plant Biol 57, 781-803.

Zaker Tavallaie F, Ghareyazie B, Bagheri A, Sharma KK (2016) Genetic transformation of Lentil (Lens culinaris M.) and production of transgenic fertile plants. Iranian J Pulses Res 7(2), 215-229.

Zaker Tavallaie F, Ghareyazie B, Bagheri A, Sharma KK (2017) Optimization of genetic transformation in Lentil (Lens culinaris Medik.) using Agrobacterium tumefaciens. Iranian J Pulses Res 8(2), 84-95.

www.SID.ir