

بررسی بیان ژن‌های *MYB93* و *MAD8* در گیاه برنج تراریخت و غیرتراریخت، تحت تنش خشکی

کبری عرب^۱، رودابه راوش^{۲*} و بهروز شیران^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۳)

چکیده

افزایش تحمل به خشکی مخصوصاً در برنج که از مهم‌ترین گیاهان زراعی در آسیا محسوب می‌شود، لازم و ضروری است. فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های متصل شونده به توالی‌های خاصی از DNA هستند که قادر به فعال یا سرکوب کردن رونویسی ژن‌ها می‌باشند. این پروتئین‌ها با اتصال به عناصر تنظیمی *cis* در پروموتور ژن‌های هدف، سطوح بیان ژن را تنظیم می‌کنند و به این طریق، مراحل مختلف بیولوژیکی از قبیل رشد، تقسیم سلولی و پاسخ به تنش‌های محیطی را کنترل می‌کنند. در این تحقیق بیان ژن‌های *MAD8* و *MYB93* که در تنش خشکی در گیاه برنج نقش دارند، در دو بافت برگ و بساک در زمانهای صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و یک هفته پس از قطع آبیاری، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های q-PCR نشان دهنده تغییرات بیان معنی‌دار این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی بود. در این بررسی افزایش بیان معنی‌دار این فاکتورهای رونویسی در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی در گیاه تراریخت (دارای ناحیه پروموتوری با شماره دسترسی NC_029264.1 و ژن *GUS*) نسبت به گیاه غیرتراریخت، ارتباط این فاکتورهای رونویسی با بیان بالاتر پروموتور انتقال یافته در گیاهان تراریخت را نشان داد.

واژگان کلیدی: برنج، تنش غیرزیستی، فاکتورهای رونویسی، *MAD8*، *MYB93*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: r.ravash@sku.ac.ir

مقدمه

فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های تنظیم بیان ژن‌ها، در همه سلول‌های زنده هستند که اغلب توالی خاصی از DNA را دارا هستند. علاوه بر این فاکتورهای رونویسی قادر به فعال کردن یا سرکوب کردن طیف گسترده‌ای از ژن‌های هدف هستند و نقش مهمی را در فرآیند رشد گیاهان و واکنش گیاه به تغییرات محیطی ایفا می‌کنند (Zhang, 2003). هم‌چنین فاکتورهای رونویسی نقش مهمی را در انتقال پیام‌های دفاع در برابر پاتوژن‌ها ایفاء می‌کنند و با افزایش بیان، سرکوب کردن بیان یا خاموشی یک ژن (Anderson et al., 1986; Lorenzo et al., 2003) ایفاء نقش می‌کنند. ژن مسئول این فاکتورهای رونویسی، خود ممکن است توسط miRNAهایی که در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند، تنظیم بیان شوند (Moayedinezhad et al., 2019). با در دسترس بودن توالی ژنوم برنج این امکان بوجود آمده که مقایسه‌ای بین فاکتورهای رونویسی تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها صورت گیرد (Xiong et al., 2005). شناسایی ۱۶۱۱ ژن فاکتورهای رونویسی که به ۳۷ خانواده ژنی در برنج متعلق می‌باشند، قابل مقایسه با ۱۵۱۰ خانواده در *A. thaliana* است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مشخص کرده است که نزدیک به نیمی از ژن‌های فاکتورهای رونویسی به صورت اورتولوگ یا گروهی تشکیل می‌شوند که از ۳۸۳ ژن اجدادی از اجداد مشترک برنج و آرابیدوپسیس مشتق می‌شوند. بررسی مکانیسم‌های تکثیر ژن‌ها نشان می‌دهد که دوازده جفت بلوک تکراری در ژنومیک داخلی بزرگ وجود دارد که برای بیش از ۴۰ درصد ژنوم برنج محاسبه شده است. حدود ۶۰ درصد از ژن‌های فاکتورهای رونویسی تکثیر شده در بخش‌های تکراری حفظ شده‌اند (Xiong et al., 2005). ژن‌های تنظیم‌کننده که بیوستنز آنتوسیانین را کنترل می‌کنند در درجه اول متعلق به دسته فاکتورهای رونویسی MYB و MYC هستند (Goodrich et al., 1992). کنترل بیان ژن تحت تأثیر بسیاری از عوامل بیولوژیکی از جمله پاسخ به

تنش‌های محیطی، مسیرهای متابولیکی و پاسخ دفاع به حمله پاتوژن‌ها در گیاهان می‌باشد (Riechmann, 2000). بسیاری از جنبه‌های رشد گیاه تحت تأثیر شبکه فاکتور-های رونویسی می‌باشد مانند رشد گل و رشد ریشه، تعیین مشخصات و ویژگی‌های سلول در اپیدرم و هم‌چنین پایه‌ریزی و تشکیل قطبیت برگ می‌باشد (Benfey and Weigel, 2001; McConnell et al., 2001). تنوع مورفولوژی و تغییراتی که تحت تأثیر رشد گیاه می‌باشد نیز وابسته به ایجاد جهش در فاکتورهای رونویسی و تغییر در بیان آن‌ها می‌باشد (Lee et al., 2003; Wang et al., 2018). MYBها یک خانواده بزرگ از فاکتورهای رونویسی در گیاهان هستند. بیش از ۱۹۸ و ۱۸۳ ژن MYB در آرابیدوپسیس و برنج وجود دارد، که در آن بسیاری از آن‌ها توسط خشکی تنظیم می‌شوند (Katiyar et al., 2012). پروتئین‌های خانواده MYB هم در گیاهان و هم در حیوانات عملکردهای بسیار متنوعی را ایفاء می‌کنند. در گیاهان، این خانواده‌ها در مسیر وابسته به ABA از سیگنالینگ تنش‌ها، برای تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شرکت دارند. نقش بسیاری از ژن‌های MYB در تنظیم پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Baldoni et al., 2015; Kazan, 2015). فاکتورهای رونویسی MYB حاوی دمین MYB درگیر در اتصال DNA است. دمین MYB معمولاً شامل یک تا سه تکرار ناقص (هر کدام با حدود ۵۲ آمینواسیدی) است؛ باقی‌مانده‌هایی که اولین آن‌ها سه آلفا هلیکس (α -helix) تشکیل می‌دهند و دومین و سومین تکرار در شکل‌گیری یک helix-turn-helix (HTH) درگیر هستند (Dubos et al., 2010). پروتئین‌های MYB نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی ایفاء می‌کنند. در شرایط عادی یا تنش، فاکتورهای رونویسی MYB در مسیر وابسته به ABA برای سیگنال‌های تنش، در تنظیم ژن‌های واکنش‌دهنده تنش دخالت دارند (Li et al., 2015). کاتیار و همکاران (Katiyar et al., 2012)، گزارش دادند که ۶۵ درصد از ژن‌های MYB در نهال برنج تحت تنش خشکی بیان

و کشت در دو تکرار بیولوژیکی در اتاقک کشت ایزوله با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد در تشت‌های پر آب انجام شد. جهت ایجاد تنش به مدت ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۷ روز در مرحله میکروسپور جوان، گلدان‌ها از آب خارج شدند و همزمان، RWC اندازه‌گیری شد. پس از قطع آبیاری در گیاهان، RWC در روزهای نمونه‌برداری اندازه‌گیری شد و میزان آن در هر زمان انتخابی برای نمونه‌گیری به میزان ۲۰-۱۰ درصد نسبت به زمان قبل کاهش داشت (Thapa et al., 2011). اندازه‌گیری RWC نشان دهنده تنش خشکی وارد شده به گیاه می‌باشد (Siddique et al., 2000). نمونه‌برداری از اندام‌های برگ و بساک انجام شد. در این تحقیق ناحیه پرموتری با شماره دسترسی NC_029264.1 که به گیاهان تراریخت انتقال یافته بود (Ravash et al., 2013; Ravash et al., 2018)، با استفاده از ابزار تحلیل پرموتر موجود در سایت Genomatix (<http://www.genomatix.de>) مورد آنالیز قرار گرفت (Cartharius et al., 2005).

به‌منظور طراحی آغازگر برای ژن‌های انتخابی حاصل از آنالیز پرموتر، از سایت‌های Primer 3، نرم افزار Oligo 7 استفاده شد. تنظیمات طراحی آغازگر شامل این موارد بود: محتوای CG حدود ۵۰ درصد، حضور نوکلئوتید G در سر ۳، اندازه قطعه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید و میزان دمای Tm بین ۵۷ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد. سپس در سایت NCBI Primer blast صحت آغازگر برای تکثیر تک‌باند در PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات آزمایشگاهی: برای استخراج RNA، از محلول RNXTM-plus (شرکت سیناژن) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل MOPS تعیین گردید. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت YTA (یکتا تجهیز آزما) صورت گرفت. انجام PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Rotor-gene Q ساخت شرکت QIAGEN در پژوهشکده زیست‌فناوری انجام گرفت. واکنش qPCR با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر انجام گرفت.

متفاوتی را نشان داده‌اند. در آرابیدوپسیس ۵۱ درصد از ژن‌های *AtMYB* تحت تنش خشکی افزایش بیان داشته‌اند، این در حالی است که ۴۱ درصد کاهش بیان داشتند (Katiyar et al., 2012; Zimmerli et al., 2004). بیان فاکتورهای رونویسی MAD و MYB در تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفتند. پروتئین‌های Mad1، Mxi1، Mad3 و Mad4، جزو خانواده MAD محسوب می‌شوند (Abe et al., 1997). توالی‌های کدکننده این پروتئین‌ها، مشابه با یکدیگر و هم‌چنین در ارتباط با دمین‌های محافظت شده bHLHZ هستند (میزان شباهت اعضای این خانواده بین ۵۶ تا ۷۲ درصد می‌باشد). در رفتارهای بیوشیمیایی، پروتئین‌های MAD بسیار شبیه به اعضاء خانواده MYC هستند و در کل خانواده‌های پروتئین MAD چرخه‌سلولی، رشد، طول عمر و مورفولوژی را تنظیم می‌کنند (Okada and Shi, 2018; Riechmann and Meyerowitz, 1997). در این تحقیق فاکتورهای رونویسی *MAD8* و *MYB93* مورد مطالعه قرار گرفتند تا نقش آن‌ها در افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گیرد و میزان تغییرات بیان آن‌ها شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

در تحقیق قبلی، با وارد کردن قطعه حاوی ناحیه پرموتری ژن *S-like RNase* و ژن *GUS*، به برنج رقم Nipponbare، بذور تراریخت این رقم ایجاد شده بود، که با بررسی های هیستوشیمیایی، بیشترین فعالیت این پرموتر (که منجر به بیان بالای ژن گزارشگر *GUS* می‌گردد)، در بساک گیاهان تراریخت مشاهده شد و میزان فعالیت پرموتر در برگ کمتر و در ریشه به مقدار ناچیز تخمین زده شد (Ravash et al., 2018). در ادامه موضوع ذکر شده؛ در این تحقیق بذور گیاه برنج، رقم Nipponbare و بذور تراریخت این رقم که در آن‌ها ناحیه پرموتری ژن *S-like RNase* قبل از ژن *GUS* قرار داده شده بود، از مؤسسه CSIRO دریافت شدند (Ravash et al., 2018). گلدان‌ها با خاک دارای بافت سبک پر شدند

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در RT-PCR

Table 1. Basic information of RT-PCR primers

شماره No.	نام آغازگر Primer name	نام ژن Gene name	آغازگر ۵'-۳' Primer 5' - 3'	دمای اتصال (°C) Tm (°C)
1	MYB F MYB R	Transcription factor <i>MYB93</i> (LOC4340520)	TTGCTGGCTTGAACAGATGTGGT TGCTCTTCCTCACGCGAGAAGT	59
2	MAD F MAD R	MADS-box transcription factor 8-like (LOC4347517)	CGGGTTTACTCCAGAGCAGA GGTGC GACTTGATCTGTGTC	56
3	actin1 F actin1 R	Actin-1 (LOC4338914)	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCTGA ATCCAACCGGAGGATAGCATG	58

تکثیر فاکتور رونویسی *MYB93* با انجام qPCR مورد تأیید قرار گرفت و یک peak در نمودار ذوب مشاهده شد.

بررسی بیان ژن *MYB93* در نمونه برگ در گیاه تراریخته و غیرتراریخته نشان داد که بیشترین بیان این ژن در زمان ۷۲ ساعت پس از قطع آبیاری بوده است، اما میزان بیان در این زمان در گیاه غیرتراریخت حدود ۴ برابر گیاه تراریخت بود (شکل ۱ و ۲). بیان ژن کدکننده فاکتور رونویسی *MYB93* در همه زمان‌های تنش در برنج غیرتراریخت بالاتر از برنج تراریخت بود و این در حالی است که روند تغییرات بیان در زمان‌های مختلف در هر دو گیاه یکسان بود و بعد از ۷۲ ساعت، بیشترین بیان در ۲۴ ساعت پس از تنش مشاهده شده است. مقایسه بیان این ژن در برگ گیاه تراریخته نسبت به برگ گیاه غیرتراریخته با آزمون t-test نشان داد که تفاوت بیان معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین این دو وجود دارد. همچنین نتیجه آزمون t-test در بافت بساک نیز تفاوت بیان معنی‌دار این ژن در گیاهان تراریخت نسبت به غیرتراریخت را تأیید کرد.

بیان ژن کدکننده فاکتور رونویسی *MYB93* در بافت بساک روند متفاوتی نسبت به بافت برگ داشت. بیشترین بیان ژن *MYB93* در گیاه تراریخت در ۲۴ ساعت پس از تنش بود که بیان بسیار بالایی نسبت به حالت کنترل داشت. در زمان ۴۸ ساعت بیان در گیاه تراریخت و غیرتراریخت، تقریباً برابر بود. ولی در زمان‌های ۷۲ ساعت و یک هفته، در بساک گیاهان تراریخت به‌علت خشک شدن بافت، به احتمال زیاد RNA تجزیه شده و بیان برای هیچ‌یک از ژن‌ها در گیاه تراریخت در این زمان‌ها، دیده نشد.

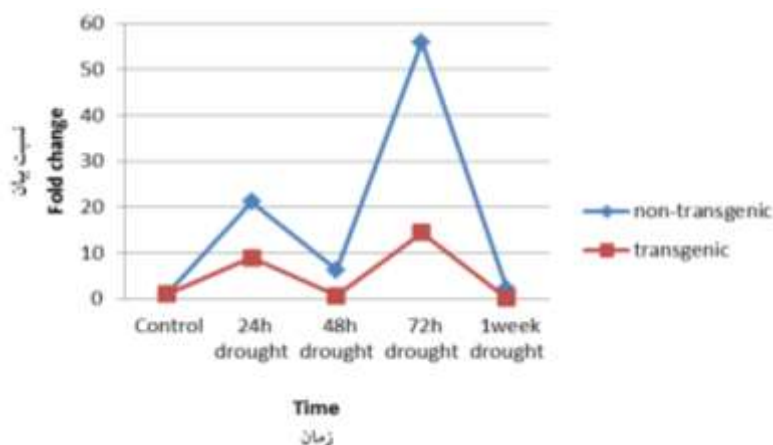
برنامه واکنش شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس طی ۴۰ سیکل با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، بود. الگویابی منحنی ذوب از ۶۲ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام گرفت. برای هر نمونه دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی وجود داشت. میزان بیان داده‌های Real-time PCR با میزان رونویسی هر ژن خانه‌دار از طریق روش مقایسه کمی و روش دلتا دلتا سی تی انجام گرفت (Livak and Schmittgen, 2001).

نتایج و بحث

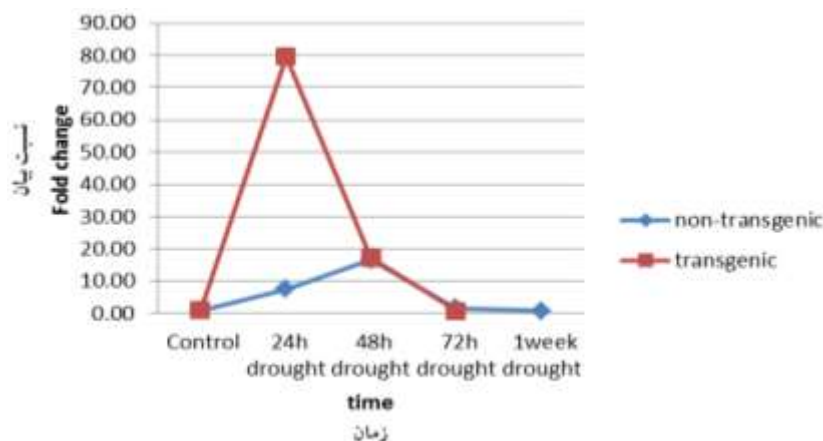
در این تحقیق با آنالیز این ناحیه پروموتوری با شماره دسترسی NC_029264.1، چندین فاکتور رونویسی شناسایی شدند که در تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی نقش مهمی را ایفاء می‌کردند، از جمله این فاکتورهای رونویسی *MAD8* و *MYB93* بود که در ایجاد مقاومت و پاسخ گیاه به تنش خشکی نقش اساسی دارند (Baldoni et al., 2015; Kazan, 2015). پس از گرفتن توالی و طراحی آغازگر، بیان ژن سنتزکننده این فاکتورهای رونویسی به وسیله qPCR سنجیده شد.

پایین آمدن پتانسیل آب و کاهش تورژسانس در بافت‌های گیاهی می‌تواند اولین اثر تنش خشکی باشد که به‌طور طبیعی رشد سلول و اندازه نهایی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با بررسی اثر تنش خشکی روی تیمارهای مختلف مشخص شد درصد آن از حدود ۹۳ درصد در گیاهان کنترل به حدود ۷۱ درصد در گیاهان تحت تنش شدید کاهش یافت.

بررسی بیان ژن *MYB93* در ابتدا تک‌باند بودن محصول



شکل ۱- تغییر بیان ژن *MYB93* در زمان‌های مختلف تنش خشکی در بافت برگ گیاه تراریخت و غیرتراریخت
 Figure 1. Changes in *MYB93* expression in various times of drought in leaf tissue of transgenic and non-transgenic plants



شکل ۲- تغییر بیان ژن *MYB93* در زمان‌های مختلف تنش خشکی در بافت بساک گیاه تراریخت و غیرتراریخت
 Figure 2. Changes in *MYB93* expression in various times of drought in anther tissue of transgenic and non-transgenic plants

تانگ و همکاران (Tang et al., 2019) با تحقیق بر روی گیاه برنج و آنالیز داده‌های qPCR نشان دادند که میزان بیان ژن *OsMYB6* از فاکتورهای رونویسی MYB در گیاه برنج تراریخته تحت تنش خشکی افزایش بیان دارند. گزارش شده است که *OsMYB4* برنج نقش مهمی را در گیاهان تراریخته از جمله آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و سیب در تحمل به سرما و خشکی دارد (Pasquali et al., 2008). یانگ و همکاران (Yang et al., 2012) مطالعه‌ای ویژگی‌های مولکولی از *OsMYB2* را در برنج مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که نقش نظارتی

زائو و همکاران (Zhao et al., 2018) با تحقیقاتی که بر روی اعمال تنش خشکی در گیاهان آرابیدوپسیس و گندم انجام دادند، نشان دادند که میزان بیان ژن *MYB31* در این دو نمونه تحت تنش خشکی، در بیشتر بافت‌ها بالا رفته است. این نتایج نشان داد که *TaMYB31* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت مقاومت به خشکی عمل می‌کند و کاربرد بالقوه آن در ژنتیک در اصلاح محصول در تحمل به خشکی را توجیه می‌کند. علاوه بر این در این تحقیق مشخص شد که این فاکتور در مرحله رشد گیاه و جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در گیاهان تراریخته نقش به‌سزایی دارد (Tang et al., 2019; Zhao et al., 2018).

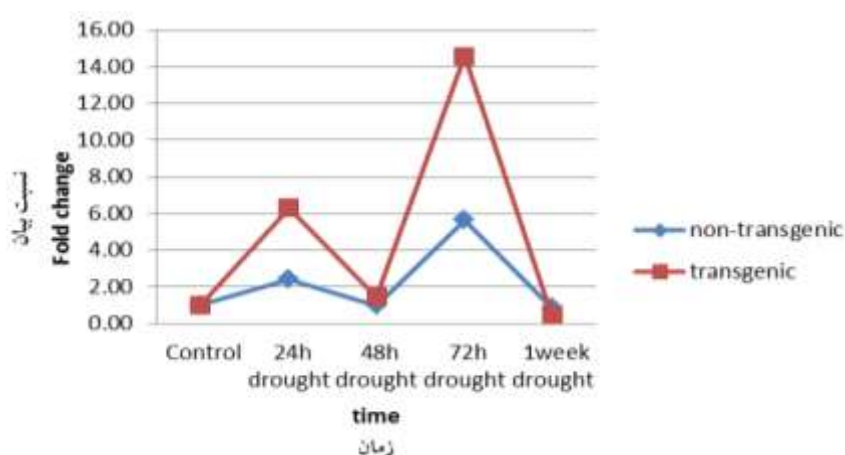
خشکی و سرما، نقش مثبت این ژن را در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیر زیستی اعلام کردند (Liu *et al.*, 2018; Pasquali *et al.*, 2008).

بررسی بیان ژن *MAD8*: تک‌باند بودن محصول تکثیر ژن *MAD8* با انجام qPCR مورد تأیید قرار گرفت و یک peak در نمودار ذوب مشاهده شد. با آنالیز داده‌های حاصل از qPCR میزان بیان ژن *MAD8* در دو بافت برگ و بساک مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان این ژن در بافت برگ در گیاه تراریخت در همه زمان‌ها بیشتر از گیاه غیرتراریخت بود (شکل ۳) و در هر دو گیاه بیشترین بیان در برگ در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش اتفاق افتاد.

OsMYB2 به‌وضوح نشان دهنده تحمل به شوری، سرما و خشکی در برنج است.

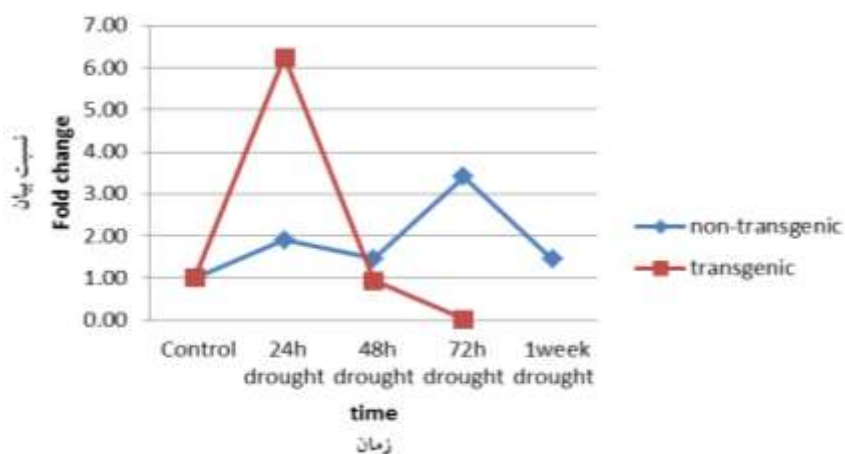
کاتیار و همکاران (Katiyar *et al.*, 2012) با تحقیق بر روی گیاه برنج و آرابیدوپسیس و آنالیز داده‌های qPCR نشان دادند که تعداد زیادی از اعضای فاکتورهای رونویسی MYB به نام‌های 1R-MYB، 2R-MYB، 3R-MYB و 4R-MYB در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی افزایش بیان دارند (Katiyar *et al.*, 2012).

در مطالعات دیگری ژن *DSMYB4* را در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که بیان بالای ژن *DSMYB4* در



شکل ۳- تغییر بیان ژن *MAD8* در زمان‌های مختلف تنش خشکی در بافت برگ گیاه تراریخت و غیرتراریخت

Figure 3. Changes in *MAD8* expression in various times of drought in leaf tissue of transgenic and non-transgenic plants



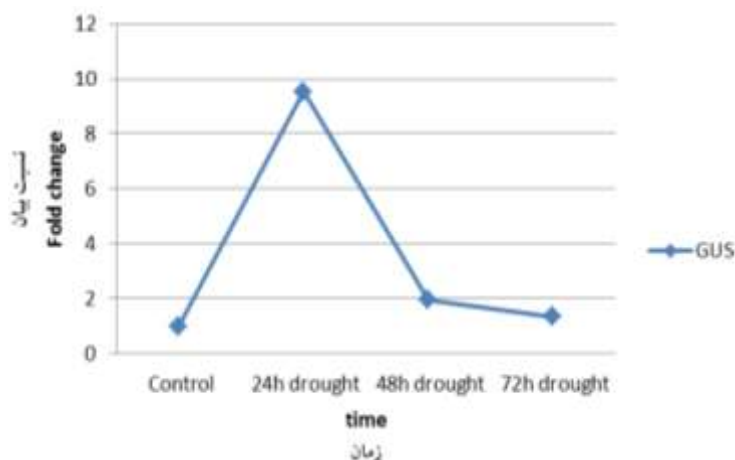
شکل ۴- تغییر بیان ژن *MAD8* در زمان‌های مختلف تنش خشکی در بافت بساک گیاه تراریخت و غیرتراریخت

Figure 4. Changes in *MAD8* expression in various times of drought in anther tissue of transgenic and non-transgenic plants

به‌همین دلیل در این تحقیق بیان ژن *GUS* در بساک گیاهان تراریخت نیز اندازه‌گیری شد تا با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بافت‌ها در مطالعات قبلی مقایسه گردد. محققان دیگری نیز فعالیت متفاوت ژن‌ها و پروموتورها را در بافت‌های مختلف گزارش نموده‌اند. به‌عنوان مثال ژن *CSDC9* که به ژن *GUS* ملحق شده بود، بیان اختصاصی در بافت گلبرگ و ساقه نشان داد (Kim et al., 2004). همچنین پروموتور ژن *YY2* دارای فعالیت اختصاصی در بساک برنج و آرابیدوپسیس می‌باشد که یک ژن کلیدی در چرخه تولید فلاونوئید است. پروموتور *Arabidopsis proflin 2 (AtPfn2)* نیز برای بیان *GUS* مورد استفاده قرار گرفته شد و به‌طور خاص در دسته‌های آوندی اکثر بافت‌های گیاهان مانند ریشه‌ها، برگ‌ها، کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها، پرچم و ساقه‌های در حال توسعه بیان شده بود (Park et al., 2018). در سبب‌زمینی تراریخته پروموتور *S2-RNase* واسطه بیان *GUS* در گرده و مادگی می‌باشد این در حالی است که گیاه تنباکو بیان کمی از *GUS* را نشان می‌دهد و بسیاری از گیاهان بیان *GUS* را در دیگر اندام‌ها نشان دادند. بررسی جزئیات هیستوشیمیایی بافتی و سلولی از گیاهان تنباکو با قطعات مختلف پروموتور *S2*، متوسط بیان منظم در مادگی و بیان زیاد در بساک را نشان داده است (Yang et al., 2000).

آنالیز داده‌های بساک نشان داد که میزان بیان ژن *MAD8* در بافت بساک برنج تراریخته در ۲۴ ساعت اول که گیاه تحت تنش خشکی قرار گرفته بود، افزایش یافت (شکل ۴)، نکته قابل‌توجه اینکه تمام نمونه‌های بساک چه تراریخته و چه غیرتراریخته بیان بالای این فاکتور را نشان دادند که بیشترین میزان بیان (۶/۵) برابر نسبت به حالت کنترل) مربوط به نمونه بساک ۲۴ ساعت تنش دیده گیاه تراریخته بود. بیان در تنش ۲۴ ساعت در نمونه غیرتراریخت نیز نسبت به کنترل افزایش داشت ولی میزان افزایش بیان در گیاه تراریخت در حدود ۳ برابر بیشتر از گیاه غیرتراریخت بود. در بساک گیاه غیرتراریخت بیشترین بیان مربوط به زمان ۷۲ ساعت تنش بود ولی بساک گیاهان تراریخت به‌علت خشکی زیاد بافت، در زمان‌های ۷۲ ساعت و یک هفته پس از تنش نمونه مناسبی برای RNA نداشتند. نتیجه آزمون t-test در بافت برگ و بساک نیز تفاوت بیان معنی‌دار این ژن در گیاهان تراریخت نسبت به غیرتراریخت را نشان داد.

بررسی بیان ژن *GUS* در بساک گیاهان تراریخت:
 راوش و همکاران (Ravash et al., 2018) پروموتور ژن *S-like RNase* را که به ژن *GUS* ملحق شده بود، در برنج تراریخته مورد بررسی قرار دادند و با بررسی فعالیت هیستوشیمیایی ژن *GUS*، بیشترین میزان فعالیت پروموتور این ژن را در ناحیه بساک برنج تراریخت گزارش دادند.



شکل ۵- تغییر بیان ژن *GUS* در زمان‌های مختلف تنش خشکی در بافت بساک گیاه تراریخت

Figure 5. Changes in *GUS* expression in various time of drought in anther tissue of transgenic plants

مقایسه بیان ژن‌های MYB93 و MAD8 با رفتار بیان ژن GUS در بافت بساک تنش ۲۴ ساعت نشان داد که همانطور که انتظار می‌رفته است، وجود پروموتور قبل از ژن GUS بر روی بیان ژن بعد از آن تأثیر گذاشته است و رفتار بیانی ژن نیز مشابه با فعالیت فاکتورهای رونویسی روی پروموتور آن بوده است. به طوری که مشاهده شد ژن GUS در ۲۴ ساعت تنش در گیاه تراریخته بیان بالایی از خود نشان داد و بیان مشابه بالاترین بیان معنی‌دار ژن‌های MYB93 و MAD8 در بافت بساک در زمان ۲۴ ساعت خشکی مشاهده گردید.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت پروموتور با فعالیت ژن‌های سنتزکننده فاکتورهای رونویسی روی آن پروموتور هم‌خوانی دارد. هم‌چنین در بافت‌های برگ و بساک حداکثر بیان در زمان‌های متفاوتی رخ داده است.

مقایسه رفتار بیان ژن‌های MYB93 با بیان MAD8 در نمونه بافت برگ نشان داد که این دو فاکتور در تنش‌های مشابه در ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت، در گیاه تراریخت، رفتار افزایش بیان مشابهی را نشان داده اند. در بساک نیز بیشترین بیان هر دو فاکتور در ۲۴ ساعت اتفاق افتاده است.

همان‌طور که مشخص است، ژن گزارش‌گر GUS در برنج غیرتراریخت وجود ندارد و فعالیت آن در گیاهان عالی، قارچ‌ها و جلبک‌ها گزارش نشده است، بنابراین بیان آن فقط در گیاه تراریخت بررسی شد. نتایج شکل ۵ نشان می‌دهد که در شرایط تنش خشکی ۲۴ ساعت، بیان این ژن در برابر در بساک بالاتر رفته است که این به دلیل فعالیت پروموتور قرار داده شده قبل از این ژن در سازواره منتقل شده به گیاهان تراریخت می‌باشد. این نتایج با نتایج تحقیق قبلی مطابقت داشت (Ravash et al., 2018).

References

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*, **9**: 1859-1868.
- Anderson, M.A., Cornish, E., Mau, S.L., Williams, E., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R. and Roche, P. (1986). Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, **321**: 38.
- Baldoni, E., Genga, A. and Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 15811-15851.
- Benfey, P.N. and Weigel, D. (2001). Transcriptional networks controlling plant development. *Plant Physiology*, **125**: 109-111.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, **21**: 2933-2942.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **15**: 573-581.
- Goodrich, J., Carpenter, R. and Coen, E.S. (1992). A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell*, **68**: 955-964.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S.K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V. and Bansal, K.C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, **13**: 544.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **20**: 219-229.
- Kim, Y.J., Lee, S.H. and Park, K.Y. (2004). A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco. *FEBS Letters*, **578**: 229-235.
- Lee, H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (2003). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**: 2152-2156.

- Li, C., Ng, C.K.Y. and Fan, L.M. (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*, **114**: 80-91.
- Liu, W., Mazarei, M., Ye, R., Peng, Y., Shao, Y., Baxter, H.L., Sykes, R.W., Turner, G.B., Davis, M.F. and Wang, Z.Y. (2018). Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) promoters for green tissue-specific expression of the MYB4 transcription factor for reduced-recalcitrance transgenic switchgrass. *Biotechnology for Biofuels*, **11**: 122.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J. and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, **15**: 165-178.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M.K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature*, **411**: 709.
- Moayedinezhad, A., Mohammadparast, B., Hosseini Salekdeh, G.H., Mohsenifard, E. and Nejatian, M.A. (2019). Upstream regulatory elements, potential targets and expression patterns of three drought responsive miRNAs in two grapevine cultivars. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 115-126 (In Persian).
- Okada, M. and Shi, Y.B. (2018). The balance of two opposing factors Mad and Myc regulates cell fate during tissue remodeling. *Cell & Bioscience*, **8**: 51.
- Park, S.C., Kim, I.R., Kim, J.Y., Lee, Y., Kim, E.J., Jung, J.H., Jung, Y.J., Jang, M.-K. and Lee, J.R. (2018). Molecular mechanism of Arabidopsis thaliana profilins as antifungal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1862**: 2545-2554.
- Pasquali, G., Bircolli, S., Locatelli, F., Baldoni, E. and Mattana, M. (2008). Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Reports*, **27**: 1677-1686.
- Ravash, R., Shiran, B., Ebrahimie, E. and Houshmand, S. (2013). Study of S-Like RNase expression in wheat and its wild relatives under drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **5(1)**: 27-38 (In Persian).
- Ravash, R., Shiran, B., Ebrahimie, E. and Houshmand, S. (2018). Promoter analysis of S-Like RNase gene in transgenic rice. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **9(4)**: 65-80 (In Persian).
- Riechmann, J. (2000). Transcription factors: genome-wide Arabidopsis. *Science*, **290**: 2105-2105.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biological Chemistry*, **378**: 1079-1102.
- Siddique, M., Hamid, A. and Islam, M. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **41**: 35-39.
- Tang, Y., Bao, X., Zhi, Y., Wu, Q., Yin, X., Zeng, L., Li, J., Zhang, J., He, W. and Liu, W. (2019). Overexpression of a MYB family gene, OsMYB6, increases drought and salinity stress tolerance in transgenic rice. *Frontiers in Plant Science*, **10**: 168.
- Thapa, G.D., Dey, M., Sahoo, L. and Panda, S. (2011). An insight into the drought stress induced alterations in plants. *Biologia Plantarum*, **55**: 603.
- Wang, W.L., Wang, Y.X., Li, H., Liu, Z.W., Cui, X. and Zhuang, J. (2018). Two MYB transcription factors (CsMYB2 and CsMYB26) are involved in flavonoid biosynthesis in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *BMC Plant Biology*, **18**: 288.
- Xiong, Y., Liu, T., Tian, C., Sun, S., Li, J. and Chen, M. (2005). Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology*, **59**: 191-203.
- Yang, Y., Li, R. and Qi, M. (2000). In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal*, **22**: 543-551.
- Zhao, Y., Cheng, X., Liu, X., Wu, H., Bi, H. and Xu, H. (2018). The wheat MYB transcription factor TaMYB31 is involved in drought stress responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, **9**: 1426.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Somerville, S. (2004). Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **40**: 633-646.

Evaluation of *MYB93* and *MAD8* Genes in Transgenic and Non-Transgenic Rice

Kobra Arab¹, Rudabeh Ravash^{2,*} and Behrouz Shiran³

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, Iran
- 3- Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, Iran

(Received: December 14, 2019 – Accepted: March 3, 2020)

Abstract

Increasing drought tolerance, especially in rice, which is one of the most important crops in Asia, is necessary. Transcription factors are specific sequence DNA-binding proteins that are capable of activating or suppressing transcription. These proteins regulate gene expression levels by binding to cis regulatory elements in the promoter of target genes to control various biological processes such as growth, cell division and response to environmental stresses. In this study, *MAD8* and *MYB93* genes that were involved in drought stress in rice were considered in two leaf and anther tissues at 0, 24, 48, 72 h and one week after stopping irrigation. The results of q-PCR analysis showed significant expression changes of these transcription factor genes under drought stress conditions. In this study, a significant increase in the expression of these genes at 24 h after drought stress in transgenic plants (Promoter region with accession: NC_029264.1 and *GUS* gene have transformed) compared to non-transgenic plants showed a relationship between these transcription factors and higher expression of transported promoter in transgenic plants.

Keywords: Rice, Abiotic stress, Transcription factors, *MYB93*, *MAD8*

*Corresponding Author, E-mail: r.ravash@sku.ac.ir