"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سیزدهم، شماره ۳ پاییز ۱۳۹۰

تجزیه بیان عوامل رونویسی در شرایط تنش شوری بلندمدت در دو ژنوتیپ متحمل و حساس گندم با استفاده از روش نورترن بلات معکوس

The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique

مهدی رهایی[۱]، مسعود گماریان[۲]، هوشنگ علیزاده[۳]، محمد علی ملبوبی[۴] و محمدرضا نقوی[۵]

چکیده

رهایی، م.، م. گماریان، ه. علیزاده، م. ع. ملبوبی و م.ر نقوی. ۱۳۹۰. تجزیه بیان عوامل رونویسی در شرایط تنش شوری بلندمدت در دو ژنوتیپ متحمل و حساس گندم با استفاده از روش نورترن بلات معکوس. **علوم زراعی ایران. ۱۳(۳): ۵۹۵-۵۸۰.**

شناسایی ژن‌هایی که بیان آنها گیاه را قادر به انطباق و یا تحمل تنش شوری می‌کند، برای برنامه‌های اصلاحی ضروری است، اما در مورد نقش عوامل رونویسی مختلف به‌طور همزمان، به‌عنوان ژن‌های تنظیم‌گر مهم در تنش شوری و به‌خصوص شوری بلندمدت، تحقیقات اندکی صورت گرفته است. در این آزمایش به‌منظور روشن شدن نقش عوامل تنظیم‌گر در پاسخ به تنش شوری بلندمدت در دو رقم حساس (چینی بهاره) و متحمل (ماهوتی) گندم، بیان ۱۱ ژن عامل رونویسی از خانواده‌های مختلف (bZIP، bHLH، WRKY، MYB و NAC) با استفاده از روش نورترن بلات معکوس، تحت دو شرایط بدون تنش و تنش (۱۲ روز تیمار ۲۵۰ میلی مولار NaCl) در سال ۱۳۸۷ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن‌های انتخاب شده در هر دو ژنوتیپ تحت تأثیر شوری قرار گرفته و افزایش و یا کاهش بیان داشتند و این تغییر میزان بیان، در رقم ماهوتی بیشتر از رقم چینی بهاره بود. تغییر بیان سه ژن عامل رونویسی (bHLH2، bZIP5 و MYB3) در پاسخ به تنش شوری، بیش از دو برابر حالت بدون تنش بود. این ژن‌ها تنها در رقم متحمل افزایش بیان معنی‌دار داشتند که نشان می‌دهد آنها ممکن است به‌طور بالقوه پاسخ انطباق به شوری بلندمدت را در گیاه گندم تنظیم کنند و بنابراین می‌توانند به عنوان کاندیداهای مناسب برای آزمایش های بعدی در نظر گرفته شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که این عوامل رونویسی، بر خلاف اطلاعات موجود که نقش این گونه ژن های تنظیم گر را در پاسخ گیاه به تنش کوتاه مدت گزارش کرده‌اند، به تنش‌های بلند مدت نیز عکس العمل نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، شوری بلند مدت، عامل رونویسی، گندم و نورترن بلات معکوس.

Archive of SID

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱

۱- استادیار دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: mrahaie@ut.ac.ir)
۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
۳- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴- استاد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۵- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

www.SID.ir

مقدمه

نتایج تحقیقات نشان داده است که تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری و دماهای بالا، عملکرد گیاه زراعی را بیش از ۵۰ درصد و در مورد گندم تا ۸۰ درصد کاهش می دهند. بر اساس نتایج بررسی‌های به‌عمل آمده ۲۰ الی ۳۰ درصد زمین‌های تحت آبیاری جهان به‌طور نامطلوبی تحت تأثیر شوری قرار دارند (Mott and Wang 2007). برای غلبه بر این محدودیت‌ها و بهبود عملکرد گیاهان زراعی در شرایط تنش از جمله شوری، لازم است که دیدگاه محققان راجع به سازوکار تحمل تنش در گیاهان زراعی به طور مرتب بهبود یابد. پاسخ گیاهان به تنش شوری همواره یکی از موضوعات مهم مطالعات فیزیولوژی و مولکولی (Munns and James 2003) و مهندسی ژنتیک بوده است (Kawaura *et al*., 2008).

پروتئین‌هایی که نقش آنها در فرآیند حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر خسارت تنش به‌خوبی مشخص شده است عبارتند از: چاپرون‌ها و پروتئین‌های تنظیم اسمزی (Tamura *et al*., 2003)، کانال‌های یونی (Ward and Schroeder, 1994)، ترنسپورترها (Klein *et al*., 2004) و پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان و سم‌زدایی (Bartels, 2001). بیان این پروتئین‌های عملکردی به‌شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود. مشخص شده است که بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در مسیر پیام‌رسانی ناشی از تنش در گیاهان نقش دارند. در بین آنها، پروتئین‌های bZIP (عوامل اتصال به توالی Abscisic Acid Response Element, ABRE) (Uno *et al*., 2000)، MYC، bHLH شبیه به MYC و پروتئین‌های MYB (Yamaguchi-Shinazaki and Shinozaki, 2005)، پروتئین‌های WRKY (Mare *et al*., 2004)، DREBها (عوامل اتصال به تکرار C یا اتصال به عنصر پاسخ به خشکی) (Novillo *et al*., 2004) و NAC (Xue *et al*., 2006)، بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌های غیرزنده دارند (De Leonardis *et al*., 2007). بنابراین شناسایی ژن‌های جدید از جمله عوامل رونویسی، تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش شوری و درک بهتر از نقش کارکردی آنها در انطباق با تنش، اساس راهکارهای مهندسی بهتر را با هدف بهبود تحمل به تنش فراهم می‌آورد (Rabbani *et al*., 2003).

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از گیاهان عمده زراعی جهان است و تنش‌های غیرزنده از جمله شوری و خشکی، از مهم‌ترین عوامل محیطی کاهش دهنده عملکرد این گیاه در بسیاری از مناطق محسوب می شوند. آزمایش‌های متعددی در خصوص بررسی و شناخت سازوکار پاسخ و تحمل گندم به عوامل نامساعد محیطی از طریق تجزیه 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)، نقش عوامل رونویسی MYB (Rahaie *et al*., 2010)، bZIP (Zhang *et al*., 2009) و NAC (Xue *et al*., 2006) در شرایط تنش غیرزنده، مطالعه تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش‌های غیرزنده سرما (De Leonardis *et al*., 2007) و شوری (Mott and Wang, 2007) اشاره نمود.

با توجه به اینکه گندم اصلی‌ترین غله زراعی در ایران است و با در نظر گرفتن این موضوع که عوامل مهم محدودکننده کشت آن در ایران، وجود شرایط نامساعدی چون کمبود آب و زمین شور می‌باشد، بررسی و مطالعه بیان ژن در زمان تنش و شناسایی ژن‌های مقاومت یا تحمل به تنش و به‌خصوص ژن‌های تنظیم‌گری همچون عوامل رونویسی که نقش مهمی را در فرآیند پاسخ به تنش در گیاهان بازی می‌کنند، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به سازوکار تحمل به شرایط نامساعد محیطی در گندم را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از طریق بیوتکنولوژی

Archive of SID

www.SID.ir

را هموارتر می‌نماید. روش‌های مختلفی جهت تجزیه پروفیل بیان ژن در گیاهان و از جمله گندم مورد استفاده قرار می‌گیرد. نورترن بلات معکوس یکی از معمول‌ترین روش‌هایی است که به عنوان رابط، اطلاعات توالی (ژنومیکس ساختاری) را به ژنومیکس عملکردی (تعیین عملکرد و نوع فعالیت) پیوند می‌دهد (Rabbani *et al.*, 2003).

با توجه به اطلاعات اندک راجع به نقش عوامل رونویسی در پاسخ گندم به تنش بلندمدت شوری، در این آزمایش ابتدا تعدادی از ژن‌های عوامل رونویسی از خانواده‌های مختلف انتخاب شدند، سپس الگوی بیان آنها در شرایط تنش شوری بلندمدت، با هدف کسب اطلاعات بیشتر در مورد اعضای خانواده‌های مختلف و نقش احتمالی آنها در تحمل گندم به تنش شوری، با روش نورترن بلات معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در سال ۱۳۸۷ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی به اجرا گذاشته شد. مواد گیاهی به‌کار رفته در این آزمایش عبارت بودند از گندم رقم ماهوتی به‌عنوان رقم متحمل و گندم رقم چینی بهاره به‌عنوان رقم حساس به شوری (Ghavami *et al.*, 2004). از محیط هیدروپونیک جهت اعمال تیمارهای تنش و کنترل (بدون اعمال تیمار نمک) استفاده شد. پس از کشت اولیه بذرها در ظروف پتری، گیاهچه‌های کوچک به محیط هوگلند ۰/۵X و در شرایط کنترل شدهٔ نوری (۱۶ ساعت نور در شبانه‌روز)، دمایی (۱۸ و ۲۴°C به‌ترتیب در شب و روز) و رطوبتی (۶۰ درصد) انتقال داده شده و در روز بعد، غلظت محلول هوگلند به ۱X رسانده شد. گیاهچه‌ها به‌مدت ۷ روز در این شرایط نگه داشته شده و از روز هفتم، تیمار شوری شروع شد. تیمار شوری (با حفظ نسبت مولی Na^+/Ca^{2+} برابر با ۱۵) به‌صورت تدریجی و با افزودن روزانه ۵۰ میلی مولار نمک (NaCl) به محلول اعمال گردید و پس از پنج روز غلظت آن به ۲۵۰ میلی مولار رسانده شد. گیاهچه‌ها به‌مدت ۱۲ روز در شوری ۲۵۰ میلی مولار نگهداری شده و سپس نسبت به جمع‌آوری قسمت‌های هوایی از گیاهان تحت تنش و شاهد بدون تنش اقدام شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای استخراج RNA در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

ارزیابی فنوتیپی

۱۲ روز بعد از شروع تنش شوری، پاسخ گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بافت هوایی جهت تجزیه محتوای یونی و وزنی برداشت شد (آزمایشات در سه تکرار انجام شد). برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک، پنج گیاه به‌صورت تصادفی از هر یک از دو ژنوتیپ انتخاب گردید. غلظت Na^+ و K^+ بر اساس روش قوامی و همکاران (Ghavami *et al.*, 2004) در برگ چهارم هر گیاه اندازه‌گیری شد.

استخراج داده‌های توالی اختصاصی هر ژن برای تهیهٔ کاوشگر

با مرور منابع و در نظرگیری نقش عوامل رونویسی مختلف در تحمل و پاسخ به تنش، از بانک اطلاعاتی عوامل رونویسی گیاهی (http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/ver2.0) به‌عنوان نقطهٔ شروع برای استخراج داده‌ها، استفاده شد. از ژن‌ها و ESTهای موجود برنج در این بانک که نقش آنها در تنش مشخص شده بود، به‌عنوان Query مناسب جهت جستجو و یافتن ESTهای کاندیدا در بانک اطلاعات نوکلئوتیدی گندم (EST) استفاده گردید. در نهایت یازده مورد از پنج خانوادهٔ مختلف برای طراحی آغازگر جهت تهیهٔ کاوشگر برای آزمون نورترن بلات معکوس انتخاب شد. از BLASTX جهت تخمین عملکرد احتمالی این ESTها استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- ESTهای مورد استفاده در نورترن بلات معکوس و اسامی اختصاری آنها

Table 1. ESTs in Reverse Northern Blot and their abbreviations

No.	شماره دسترسی Gene bank accession number	اسامی اختصاری Abbreviations
1	CN011839	bZIP1
2	CA744752	bZIP2
3	CK163666	bZIP3
4	CV765814	bZIP5
5	CA599618	bHLH2
6	CJ685625	bHLH3
7	CN009320	WRKY1
8	CJ873146	WRKY2
9	DQ353858.1	MYB2
10	CJ920766	MYB3
11	BU672229	NAC67

گردید (جدول۱). برای هر EST یک اسم اختصاری انتخاب شد که در جدول یک ارائه شده‌اند.

تهیهٔ کاوشگر

به‌منظور تهیهٔ کاوشگرهای ۵۰۰ جفت بازی (یا بیشتر) مورد نیاز برای آزمایش نورترن بلات معکوس، در ابتدا گیاهچه‌های پنج روزه تا یک هفته‌ای گندم، تحت تیمار تنش نمک (۲۵۰ میلی مولار) قرار گرفتند و پس از ۶ یا ۱۲ ساعت نسبت به جمع‌آوری نمونه‌ها از قسمت هوایی اقدام و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و برای استخراج RNA کل در مرحلهٔ بعد، در دمای $-80^{o}C$ نگهداری شدند. طراحی آغازگر برای جداسازی قطعات ژنی (ESTها)، با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 و با در نظر گرفتن پارامترهای لازم روی ESTهای انتخابی انجام شد. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX plus™ (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل‌های مربوطه انجام گرفت. رشتهٔ اول cDNA با استفاده از آغازگرهای OligodT و ۲۰۰ واحد از آنزیم MMV Reverse Transcriptase (سیناژن، ایران) مطابق با پروتکل توصیه شده، ساخته شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Taq* DNA پلیمراز (سیناژن، ایران) بر اساس پروتکل بهینه شده در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام شد. پس از PCR و الکتروفورز محصولات ژن، تک باندهای حاصله از ژل آگاروز جداسازی، خالص‌سازی و تعیین توالی شد و به‌عنوان کاوشگر جهت آزمون نورترن بلات معکوس استفاده گردید.

استخراج RNA و آزمون نورترن بلات معکوس

استخراج RNA کل از بافت هوایی با استفاده از کیت RNXplus (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل‌های مربوطه انجام گرفت. تهیهٔ cDNA با استفاده از آغازگرهای Oligo dT و آنزیم AMV Reverse Transcriptase (فرمنتاز، ایران)، مطابق با روش توصیه شده در دستورالعمل آنزیم انجام گرفت. نورترن بلات معکوس بر اساس دستورالعمل کیت dig DNA labeling شرکت روش (Roche) و با اندکی تغییرات انجام شد. از ژن آلفاتوبولین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

تجزیه داده‌ها

امتیازدهی به لکه‌ها با استفاده از نرم‌افزار (ver 1.10) Totallab (Nonlinear Dynamics Ltd.) انجام گرفت. برای اینکار میانگین تیرگی زمینهٔ بلات از میزان تیرگی مربوط به هر لکه کسر گردید. پس از آن، کل لکه‌ها بر اساس لکهٔ آلفاتوبولین و با استفاده از نرم‌افزار، استاندارد (تبدیل لگاریتمی؛Log10) شدند. تجزیه و تحلیل (تجزیهٔ واریانس) داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در دو تکرار و با دو عامل ژنوتیپ در دو سطح (متحمل و حساس) و محیط در دو سطح (کنترل و شوری ۱۲ روزه)، با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از نرم‌افزار MSTATC ver. 2.10 انجام گرفت. برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون LSD و در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. جهت تعیین پروفیل الگوهای بیان در پاسخ به تنش شوری از نرم‌افزار MeV ver4.3 (Saeed *et al.*, 2003) استفاده شد. ژن‌ها با استفاده از روش خوشه‌بندی سلسله مراتبی (Complete Linkage) و براساس ضریب همبستگی پیرسون، گروه‌بندی شدند.

نتایج

تفاوت های فنوتیپی

غلظت Na^+ و K^+ در ژنوتیپ‌های ماهوتی و چینی بهاره که در همان مرحله استخراج RNA اندازه‌گیری شد، نشان داد که غلظت Na^+ در رقم ماهوتی به‌طور معنی‌داری کمتر از رقم چینی بهاره بود. اگرچه غلظت K^+ در هر دو ژنوتیپ در شرایط تنش شوری کاهش یافت، اما رقم ماهوتی سطح کمتری از K^+ را در مقایسه با چینی بهاره نشان داد. نسبت K^+/Na^+ نیز به‌طور معنی‌داری در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بود. در مجموع، وزن تر و خشک ماهوتی تحت شرایط تنش بیشتر از رقم چینی بهاره بود (جدول۲).

همردیفی توالی

نتایج تجزیه BLASTX روی ESTهای انتخابی در این آزمایش نشان داد که bZIP1 (CA744752) و bZIP3 (CK163666) تشابه کمتری به ژن‌های مربوطه خود در گندم داشته و در مورد bZIP5، هنوز

جدول۲- پاسخ فنوتیپی ژنوتیپ‌های متحمل (ماهوتی) و حساس (چینی بهاره) گندم در تیمار ۲۵۰ میلی‌مولار نمک کلرور سدیم (a, b t-test $P < 0.05$)

Table 2. Phenotypic responses of salt-tolerant (Mahouti) and salt-sensitive (Chinese spring) wheat genotypes under 250 mM of salt treatment. (a, b t-test $P < 0.05$)

ژنوتیپ های گندم Wheat genotypes	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)	غلظت یون سدیم Na^+ (mmol.gDW^{-1})	غلظت یون پتاسیم K^+ (mmol.gDW^{-1})	نسبت پتاسیم به سدیم K^+/Na^+
ماهوتی Mahouti	0.45a	0.061a	3.6986b	0.4231b	0.1143a
چینی بهاره Chinese spring	0.15b	0.021b	8.6070a	0.4938a	0.0573b

ژن مرتبط در گندم مشخص نشده است، اما ژن اخیر در آرابیدوپسیس (*AtbZIP52*, E value=$2e^{-12}$) و برنج (Os12g0162500, E value=$2e^{-32}$) همولوگ دارد. به‌منظور بررسی عملکردهای احتمالی این قطعات ژنی کاندیدا، علاوه بر نقش آنها در تحمل یا پاسخ به تنش و یا نوع فعالیت ویژه آنها در زمان تنش، از مقالات منتشر شدهٔ موجود در مورد هر ژن و هم‌خانواده‌های آنها، جهت تفسیر نتایج حاصل از تجزیه بیان در این تحقیق استفاده شد (Gene Antology و Annotation). نتایج حاصله از این نوع بررسی در جدول ۳ ارائه شده است.

تجزیه الگوی بیان

به‌منظور بررسی تغییر بیان ژن‌های عوامل رونویسی در اندام‌های هوایی در دو حالت بدون تنش و تنش شوری بلند مدت در دو رقم حساس (چینی بهاره) و متحمل (ماهوتی)، از روش نورترن بلات معکوس استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه الگوی بیان ژن‌های عوامل رونویسی مختلف در شرایط تنش در دو رقم چینی بهاره و ماهوتی (به تفکیک هر ژن) در شکل یک نمایش داده شده است. تجزیه داده‌ها نشان داد که میزان بیان تمام عوامل رونویسی در شرایط تنش در رقم ماهوتی بیشتر از رقم چینی بهاره بود ولی تغییر بیان تنها سه ژن bZIP5، bHLH2 و MYB3 بیشتر از دو برابر حالت شاهد بدون تنش بود (جدول۴).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- نتایج حاصل از تأیید نقش ژن‌های انتخابی مورد استفاده در نورترن بلات معکوس در تحمل و یا پاسخ به تنش

Table 3. The Annotated role of used selected genes in Reverse Northern Blot in stress tolerance or response

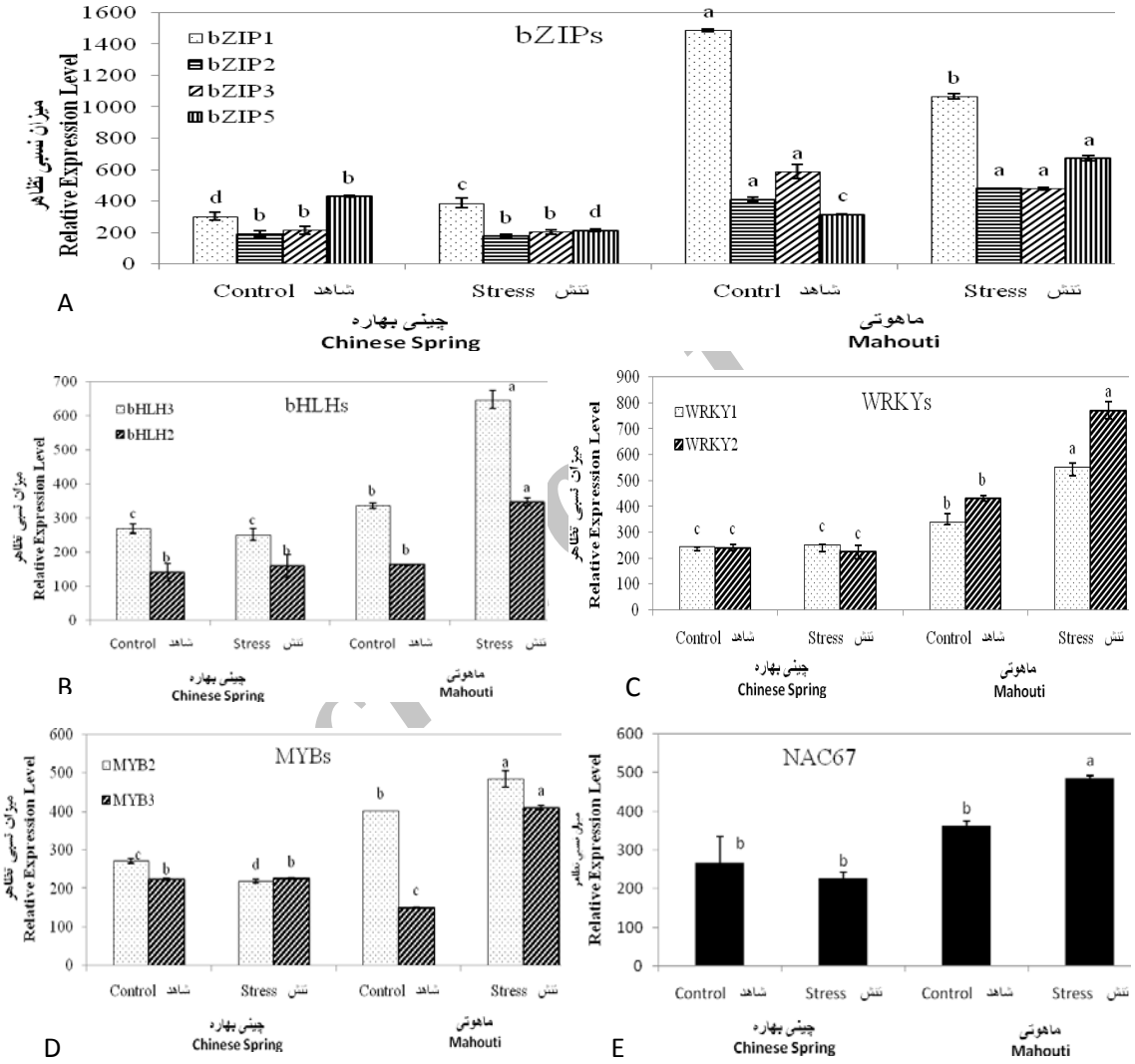
نام ژن Gene	نام ژن همولوگ Homologue	نوع فعالیت مرتبط با تنش Related role in stress	نام گیاه Plant	منبع Reference
bZIP1	*TaBFB* *HY5* یا *AtbZIP56*	۱- *TaABF* به همراه *PKABA1* در مرحلهٔ رسیدگی دانه گندم و خواب بذر، در بذر تجمع می‌یابد. 1- *TaABF* mRNA accumulated together with *PKABA1* mRNA during wheat grain maturation and dormancy acquisition ۲- *HY5* برای پاسخ به نور ضروریست و به‌عنوان یک تنظیم‌گر مثبت در فتومرفوژنز با اثر بر ژن‌های پایین‌دست در پاسخ به سیگنال نور عمل می‌کند. 2- *HY5* is necessary for response to light and acts as a positive regulator in photomorphogenesis by affecting the expression of downstream genes in response to a light signal	گندم Wheat آرابیدوپسیس Arabidopsis	Johnson *et al*. 2002, Chang *et al*., 2008
bZIP2	*HBP*-1b *TGA2*	۱- HBP-1b در گیاه گندم در تنظیم رونویسی ژن‌های هیستون (H3) نقش دارد 1- HBP-lb in Wheat plant plays a role in regulation of histone genes (H3) transcription. ۲- بیان *TGA2* به‌عنوان یک عامل رونویسی در آرابیدوپسیس و در پاسخ به پاتوژن افزایش می‌یابد و باعث افزایش و یا جلوگیری از بیان ژن‌های پایین‌دست پاسخ به پاتوژن می‌شود 2- the expression of *TGA2* as a transcription factor in Arabidopsis increases in response to pathogens and is caused to up-regulation or suppression of pathogen response related genes	گندم Wheat آرابیدوپسیس Arabidopsis	Johnson *et al*., 2008, Jakoby *et al*., 2002
bZIP3	*TaOBF1a*	میزان بیان این ژن در اثر تنش سرما و خشکی، به‌خصوص در بافت برگ افزایش می‌یابد و با گذشت زمان و در تنش سرمایی همچنان میزان بیان آن در سطح بالا باقی می‌ماند This gene is un-regulated in cold and drought stresses specially in leaves and shows a high level of expression during cold stress	گندم Wheat	Kobayashi *et al*., 2008
bZIP5	*AtbZIP52*	در فرآیند نمو آوندی نقش دارند It might play a role in vascular development	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Jakoby *et al*., 2002
bHLH2	*AtAIB*	*AtAIB* در فرآیند پاسخ به تیمار ABA و تنش خشکی دخیل است و باعث افزایش تحمل به خشکی می‌شود *AtAIB* involves in ABA treatment and drought stress response and increases drought tolerance	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Li *et al*., 2007
bHLH3	*AtAIB*	*AtAIB*، در فرآیند پاسخ به تیمار ABA و تنش خشکی دخیل است و باعث افزایش تحمل به خشکی می‌شود *AtAIB* involves in ABA treatment and drought stress response and increases drought tolerance	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Li *et al*., 2007
WRKY1	*AtWRKY75*	بیان ژن *AtWRKY75* در پاسخ به تنش کمبود فسفر در خاک، افزایش می‌یابد. همچنین این ژن به‌عنوان تنظیم‌گر مثبت پاسخ‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند is up-regulated in response to phosphorous deficit stress. This gene also acts as positive regulator in defense response to pathogens. *AtWRKY75*	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Encinas-Villarejo *et al*., 2009
WRKY2	*AtWRKY33*	بیان *WRKY33* در پاسخ به تیمار نمک، مانیتول (خشکی) و سرما در بافت هوایی و ریشه افزایش، ولی در تنش گرمایی کاهش می‌یابد. فراوانی آن در ریشه و گل بیشتر از سایر بافت‌ها است *AtWRKY33* is up-regulated in response to salt, Mannitol (drought) treatment and cold stress in shoot and root but in heat stress is down regulated. The abundance of its transcript in roots and flowers is more than other tissues	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Jiang *et al*., 2009
MYB2	*TaMYB1* *AtMYB44*	۱- *TaMYB1* در پاسخ گیاه گندم به تنش‌های غیرزنده دخیل است. میزان بیان این ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی‌اتیلن گلیکول و نمک، به‌خصوص در بافت ریشه افزایش می‌یابد 1-*TaMYB1* involves in abiotic stresses responses in wheat. The expression of this gene in oxygen deficiency (flooding), PEG treatment (drought) and salt especially in root increases ۲- میزان بیان ژن *AtMYB44* در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرما و ABA و به‌خصوص در سلول‌های محافظ روزنه و بافت آوندی افزایش می‌یابد 2- *AtMYB44* is up-regulated in response to drought, salt, cold and ABA treatments especially in stomata guard cells and vascular tissue	گندم Wheat آرابیدوپسیس Arabidopsis	Lee *et al*. 2007, Jung *et al*., 2008
MYB3	*AtMYB59*	نقش این ژن در مسیرهای سیگنالی هورمونی پاسخ به تنش زنده و پاسخ دفاعی گیاه بر علیه عوامل بیماری‌زا است. This gene plays a role in hormonal signal pathway in response to biotic stresses and plant defense against pathogen attacks.	آرابیدوپسیس Arabidopsis	Libault *et al*., 2007
NAC67	*TaNAC69* *AtNAC2*	۱- دخیل در پاسخ به تنش خشکی، سرما و تیمار ABA در گندم. در بافت برگ و ریشه (تیمار سرما نامشخص) و در پاسخ به تیمارهای ذکر شده افزایش می‌یابد 1- Involved in response to drought, cold and ABA treatments in Wheat. It is up-regulated during mentioned stresses in root and leaves (it has an unknown role in cold stress) ۲- دخیل در پاسخ به تنش شوری، تیمار هورمون‌های ABA، ACC و NAA در آرابیدوپسیس 2-Involved in response to salt stress and ABA, ACC and NAA hormones treatments in Arabidopsis	گندم Wheat آرابیدوپسیس Arabidopsis	Xue *et al*., 2006, He *et al*., 2005

Archive of SID

www.SID.ir

خانوادهٔ bZIP

در ایـن آزمـایش، چهـار ژن خـانوادهٔ bZIP بـه‌عنـوان کاندیدا در پاسخ به تـنش مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد. نتایج حاصل از تجزیه بیان این ژن‌ها در شرایط شـاهد و تنش در دو رقم در شـکل ۱-A نشـان داده شـده اسـت. محاسبهٔ میزان بیان ژن‌های bZIP نشان داد که ژن bZIP1 در زمان تنش در رقم چینی بهاره افزایش و برعکس در رقـم مـاهوتی کـاهش بیـان داشـت. ژن‌هـای bZIP2 و bZIP3 تحت تأثیر تنش قرار نگرفته و بنابراین میزان بیان آنها در شرایط تنش در دو رقم نسبت به حالـت کنتـرل، تغییـری نداشـت. در ارتبـاط بـا ژن bZIP5، در تـنش شوری، میزان بیان آن در رقم چینی بهـاره کـاهش و در رقم ماهوتی افزایش یافت. یعنی این ژن برعکس bZIP1 عمل کرد (جدول۴).



شکل۱- بیان ژن‌های عوامل رونویسی از خانواده‌های bZIP (A)، bHLHs (B)، WRKY (C)، MYB (D)، NAC67 (E) در اندام هوایی ژنوتیپ‌های گندم (ماهوتی و چینی بهاره) در پاسخ به تنش شوری بلندمدت. اعداد روی محور عمودی داده‌های اصلی هستند (بدون تغییر لگاریتمی)

Fig. 1. Expression of TFs genes from different families, bZIPs (A), bHLHs (B), WRKYs (C), MYBs (D), NAC (E), in shoots of wheat genotypes (Mahouti and Chinese Spring) in response to long-term salt stress. The numbers on Y axis are original data (without logaritmic transformation)

www.SID.ir

خانوادهٔ bHLH

نتایج حاصل از نورترن بلات معکوس نشان داد که دو عضو انتخابی این خانواده، یعنی bHLH2 و bHLH3 در پاسخ به تنش تنها در رقم ماهوتی افزایش بیان داشته‌اند و تغییری در سطح بیان این قطعات ژنی، در رقم چینی بهاره و در پاسخ به تیمار تنش به‌وجود نیامد. مفهوم این موضوع این است که این ژن‌ها تنها در رقم متحمل بیان شده و به‌عنوان بخشی از ژن‌هایی که باعث تحمل بیشتر رقم متحمل نسبت به حساس می‌شوند، عمل می‌نمایند. تفاوت الگوی بیان این دو ژن در شرایط بدون تنش و تنش در دو رقم در شکل ۱-B شان داده شده است.

خانوادهٔ WRKY

همان‌طورکه در شکل ۱-C نشان داده شده، بیان هر دو عضو انتخابی این خانواده (WRKY1 و WRKY2) تنها در رقم ماهوتی و در پاسخ به تنش افزایش یافت. نتایج بدست آمده نشان داد که اعمال تنش شوری در رقم چینی بهاره، تأثیری بر سطح بیان این دو ژن نداشته و نسبت به شرایط غیر تنش ثابت باقی ماند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ژن‌ها منحصراً در رقم متحمل بیان شده و باعث افزایش تحمل رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره می‌شوند.

خانوادهٔ MYB

نتایج نشان داد که هر دو عضو کاندیدای این خانواده یعنی MYB2 و MYB3 در رقم ماهوتی تغییر بیان داشته و سطح بیان آنها در شرایط تنش افزایش یافت، اما تنها یک عضو این خانواده، یعنی MYB2، در رقم چینی بهاره به تیمار تنش پاسخ داد و میزان بیان آن کاهش یافت. این استنباط را می‌توان در خصوص MYB3 نیز داشت. به‌عبارتی این ژن، اختصاصی رقم متحمل است (شکل ۱-D).

خانوادهٔ NAC

در این آزمایش ژن NAC67 مورد تجزیه و تحلیل پروفیل بیان قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان این ژن در رقم ماهوتی و در تیمار تنش افزایش یافت (شکل ۱-E).

به‌منظور شناسایی عوامل رونویسی که به‌طور معنی‌داری در دو ژنوتیپ متحمل و حساس تفاوت بیان دارند، دو معیار شامل بیش از دو برابر افزایش بیان و P=۰/۰۵ به‌طور توأم در نظر گرفته شدند. این معیار برای هر دو ژنوتیپ ماهوتی و چینی بهاره به‌منظور شناسایی ژن‌هایی که پاسخ معنی‌داری به تیمار شوری می‌دهند مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس این معیار، سه ژن شامل bZIP5 (۲/۱۳۹۱ برابر)، bHLH2 (۲/۷۲۳۱ برابر) و MYB3 (۲/۱۳۵۱ برابر) در رقم ماهوتی ودر شرایط تنش، افزایش بیان داشتند، اما هیچ ژنی از لحاظ آماری در رقم چینی بهاره افزایش بیان نداشت (جدول۴ و شکل ۲).

گروه‌بندی و تعیین پروفایل بیان ژن‌ها بر اساس نسبت‌های بیان در شرایط تنش به غیر تنش با استفاده از روش سلسله مراتبی، آنها را به دو گروه مجزا تقسیم‌بندی نمود (شکل۳). گروه اول شامل دو ژن bZIP1 و bZIP3 بود و گروه دوم بقیه ژن‌ها را شامل شد.

آزمون تبدیل‌پذیری با هدف تعیین مهم‌ترین ژن افزایش و یا کاهش بیان یافته در زمان تنش نشان داد که به‌ترتیب در دو رقم ماهوتی و چینی بهاره و در زمان تنش، MYB3 و bZIP1 مهم‌ترین ژن‌های افزایش بیان یافته و bZIP1 و bZIP5 مهم‌ترین ژن‌های کاهش بیان یافته بودند.

بحث

نتایج نشان داد که تمام خانواده‌های انتخاب شده در پاسخ به تنش شوری دخیل بوده و بیان برخی از اعضای آنها در فرآیند پاسخ، به‌صورت افزایش یا کاهش، تغییر یافت. بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌های خانوادهٔ bZIP نشان داد که از چهار عضو انتخابی این خانواده دو عضو آن در پاسخ به تنش شرکت داشتند. خانوادهٔ bZIP

Archive of SID

www.SID.ir

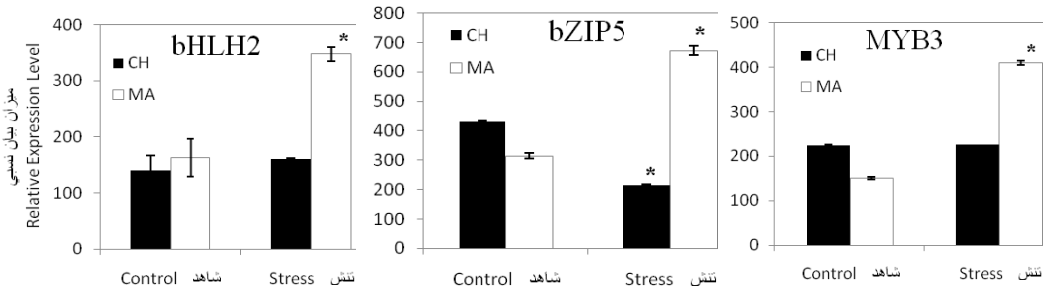
جدول ۴- میزان بیان نسبی ژن‌ها در شرایط تنش نسبت به غیر تنش در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره. MN: رقم ماهوتی در شرایط غیر تنش، MS: رقم ماهوتی در شرایط تنش، CHN: رقم چینی بهاره در شرایط غیر تنش، CHS: رقم چینی بهاره در شرایط تنش. یک= عدم تغییر، ۱< = افزایش بیان و ۱>= کاهش بیان

Table 4. Relative expression levels of genes in Mahouti compared to Chinese spring wheat genotype in salt stress and control conditions. MN: Mahouti under control condition, MS: Mahouti in salt stress, CHN: Chinese spring under contrl condition and CHS: Chiense spring in salt stress, 1= Unchanged, >1=Up-regulated, <1=Down-regulated

ژنوتیپ و نوع تیمار Genotype and treatment	میزان بیان نسبی ژن ها در شرایط تنش نسبت به شاهد (بدون تنش) در دو رقم ماهوتی و چینی بهاره		میزان بیان نسبی ژن ها در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره در دو شرایط تنش و غیر تنش		میزان بیان نسبی ژن ها در شرایط تنش نسبت به شاهد (بدون تنش) در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره
نام ژن Genes	MS/MN	CHS/CHN	MS/CHS	MN/CHN	(MS/MN)/(CHS/CHN)
bZIP1	0.7170	1.2751	2.7452	4.8820	0.5623
bZIP2	1.1761	0.9305	2.7209	2.1529	1.2639
bZIP3	0.8170	0.9487	2.3564	2.7361	0.8612
bZIP5	2.1391	0.4960	3.1397	0.7280	4.3127
bHLH2	2.1351	1.1401	2.1718	1.1597	1.8727
bHLH3	1.9282	0.9341	2.5770	1.2484	2.0642
WRKY1	1.6274	1.0399	2.1819	1.3942	1.5650
WRKY2	1.7878	0.9332	3.4309	1.7909	1.9158
MYB2	1.2045	0.8064	2.2158	1.4835	1.4937
MYB3	2.7231	1.0095	1.8152	0.6729	2.6975
NAC67	1.3410	0.8497	2.1438	1.3583	1.5782

Archive of SID

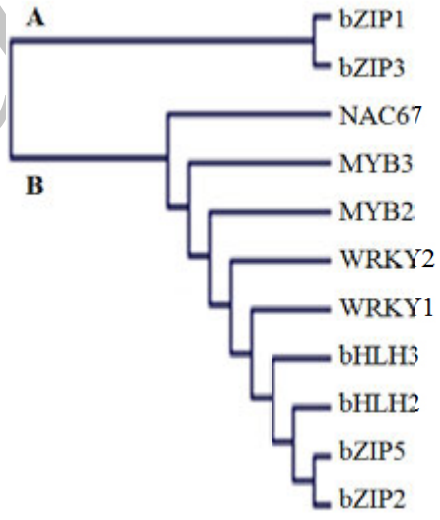
www.SID.ir



شکل۲ – سه ژن bHLH2، bZIP5 و MYB3 که در اندام هوایی ژنوتیپ های گندم و در پاسخ به تنش شوری به‌طور متفاوت بیان می‌شوند. * تفاوت بین شاهد و تنش شوری بلند مدت ($p< 0.05$) (اعداد روی محوی عمودی، اعداد اصلی هستند)

Fig 2. Three differentially expressed TFs genes (bHLH2, bZIP5 and MYB3) in the shoots of wheat genotypes (Chinese Spring (CH) and Mahooti (MA)) in response to Long-Term salt stress. *Difference between control and Long-Term salt stress ($P < 0.05$). (The numbers on Y axis are original data)

گروه متنوعی از عوامل رونویسی در گیاهان هستند که با داشتن یک ناحیه اتصال به DNA و یک موتیف با ساختار زیپ لوسینی، تنظیم فرآیندهای متنوعی از جمله پاسخ به تنش زنده و غیرزنده و رسیدگی بذر و نمو گل را بر عهده دارند (Jakoby *et al*. 2002). از دو عضوی که تغییر بیان داشتند یکی bZIP1 بود که در پاسخ به تنش شوری در رقم چینی بهاره افزایش و در رقم ماهوتی کاهش بیان داشت. تجزیه توالی این قطعهٔ ژنی با استفاده از BLASTX نشان داد که از لحاظ توالی با دو ژن *TaABF* از گندم(E Value=$6e^{-5}$) و *HY5* یا *AtbZIP56* (E Value=$1e^{-20}$) از گیاهآرابیدوپسیس مشابهت دارد. نتایج سایر آزمایشات نشان داده‌اند که *TaABF* به همراه PKABA1 (یک پروتئین کیناز القاء شونده به‌وسیلهٔ ABA) در حین رسیدگی دانه گندم و



شکل۳- گروه‌بندی سلسله مراتبی یازده ژن بر اساس الگوی بیان آنها. حروف A و B روی خوشه‌ها، گروه‌های ژنی دارای الگوی بیان مشابه را نشان می‌دهند

Fig. 3. Hierarchical clustering of 11 genes based on their gene expression patterns. Letters A and B on clusters indicating gene groups showing similar expression patterns

Archive of SID
www.SID.ir

خواب بذر، در بذر تجمع یافته و میزان این عامل رونویسی در شروع خواب، به‌طور موقت افزایش می‌یابد. اما بر خلاف *PKABA1*، *TaABF* به‌طور اختصاصی در بذر بیان می‌شود و در پاسخ به تنش یا تیمار ABA در بافت های رویشی افزایش نمی‌یابد (Johnson *et al*., 2002). اما نقش همولوگ آن در آرابیدوپسیس یعنی *HY5* که از زیرگروه H خانوادهٔ bZIPها می‌باشد (Jakoby *et al*., 2002) و تشابه بیشتری نیز با آن دارد، تنظیم مورفوژنز در پاسخ به نور است. وجود این ژن برای پاسخ به نور ضروری است و به‌عنوان یک تنظیم‌گر مثبت در فتومورفوژنز، با اثر بر ژن‌های پایین‌دست در پاسخ به پیام نور، عمل می‌کند. این عامل رونویسی اثر نور و مسیرهای هورمونی را با هم تلفیق می‌کند. در غیاب این عامل رونویسی، بیان صدها ژن به‌وسیلهٔ نور UV-B و آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Chang *et al*., 2008). bZIP5 دیگر ژن القاء شونده به‌وسیلهٔ تنش شوری در رقم متحمل بود. این ژن مشابه ژن *AtMYB52* است (E value=$2e^{-12}$). نقش این ژن، توسعهٔ سیستم آوندی است (Jakoby *et al*., 2002).

خانوادهٔ bHLH، گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که با دارا بودن ناحیه bHLH قابل تشخیص بوده و در گیاهان عملکردهای متفاوتی شامل بیوسنتز آنتوسیانین ها، فرآیند سیگنالی فیتوکروم، تشکیل میوه، نمو نهنج و اپیدرم و همچنین پاسخ به تنش را برعهده دارند (Li *et al*., 2007). در آزمایش حاضر از خانوادهٔ bHLH دو عضو انتخاب شد که هر دو در پاسخ به تنش شوری و در گندم رقم ماهوتی، افزایش بیان داشتند. در تعیین همولوژی توالی و تعیین پروتئین همولوگ در بانک اطلاعاتی آرابیدوپسیس و گندم با استفاده از BLASTX، مشخص شد که ژن bHLH94 در گندم با E Value بسیار پایین ($1e^{-85}$ برای bHLH2 و $5e^{-102}$ برای bHLH3) می‌تواند به‌عنوان همولوگ آنها در نظر گرفته شود. همچنین عضو همولوگ دیگر برای bHLH3 و در گیاه آرابیدوپسیس، ژن *ATAIB* می‌باشد. *AtAIB* در آرابیدوپسیس، در تنظیم فرآیند پیام‌رسانی ABA نقش داشته و در پاسخ به تیمار ABA و تنش خشکی دخیل و باعث افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود (Li *et al*., 2007). بنابراین، با توجه به شباهت زیاد bHLH3 با این ژن (E Value=$2e^{-51}$) و نتایج حاصله از بررسی نورترن بلات معکوس مبنی بر افزایش بیان آن، این افزایش بیان می‌تواند گویای نقش آن در پاسخ به تنش غیرزنده در گندم باشد.

در این تحقیق دو عضو خانوادهٔ MYB (MYB2 و MYB3) در گندم رقم ماهوتی و در پاسخ به تنش افزایش بیان داشتند، ولی در رقم چینی بهاره تنها MYB2 کاهش بیان را نشان داد. تجزیه توالی و نتایج BLASTX و GO نشان داد که MYB2 در واقع قسمتی از ژن *TaMYB1* (E Value=$6e^{-155}$) است. نتایج مطالعات قبلی نشان داده اند که *TaMYB1* در پاسخ گندم به تنش‌های غیرزنده دخیل است. میزان بیان این ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی‌اتیلن گلیکول (خشکی) و شوری به‌خصوص در بافت ریشه افزایش می‌یابد. همچنین میزان رونوشت این ژن در زمان شروع تیمار گیاه با ABA و پلی‌اتیلن‌گلیکول به کندی افزایش می‌یابد (Lee *et al*., 2007). در آزمایشی که توسط مات و ونگ (Mott and Wang, 2007) در ارتباط با تغییر ترانسکریپتوم ارقام متحمل گندم در شرایط تنش شوری بلند مدت با استفاده از ریزآرایه انجام گرفت، مشخص شد که *TaMYB1* از جمله ژن‌هایی بود که افزایش بیان داشتند و میزان این افزایش ۳۴ برابر بیشتر از حالت شاهد (بدون تنش) بود. لازم به‌ذکر است که این ژن روی گروه همیولوگ 6L قرار دارد. تجزیه عملکرد همولوگ این ژن (MYB2) در گیاه آرابیدوپسیس یعنی *AtMYB44* (Value=$1e^{-59}$)، نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در آرابیدوپسیس در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرما و ABA و به‌خصوص در سلول‌های محافظ روزنه و بافت آوندی افزایش می‌یابد. همچنین گیاهان تراریختهٔ حاصل از آن،

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومت بیشتری به تنش‌های ذکر شده نشان دادند (Jung *et al*., 2008). آزمون همولوژی بر MYB3 که در واقع عضوی از زیرخانوادهٔ MYB R2R3 است، نشان داد که همولوژی مناسبی بین این قطعهٔ ژنی و ژن‌های *AtMYB59* در آرابیدوپسیس (E value=$4e^{-60}$) وجود دارد. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که بیان *AtMYB59* در پاسخ به فیتوهورمون‌های JA، SA، GA و اتیلن، به‌خصوص در بافت برگ و ساقه افزایش می‌یابد، ولی میزان بیان آن در ریشه و گل آذین کمتر است و این به‌مفهوم نقش این ژن در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی پاسخ به تنش‌های زنده و پاسخ دفاعی گیاه بر علیه عوامل بیماریزا است (Libault *et al*., 2007).

در خصوص تفاوت دو رقم متحمل و حساس در سطح رونوشت و میزان آن، همان‌طور که در جدول۴ نشان داده شده است، تعداد ژنهایی که میزان بیان آنها در شرایط تنش نسبت به حالت شاهد کاهش یافته است، در گندم رقم ماهوتی (bZIP1 و bZIP3) کمتر از رقم چینی بهاره (bZIP2، bZIP3، bZIP5، bHLH3، WRKY2، MYB2 و NAC67) بوده است. همچنین تنها بیان سه ژن bZIP5، bHLH2 و MYB3 در شرایط تنش در رقم ماهوتی، بیش از دو برابر حالت شاهد بدون تنش بوده است و در واقع، این ژن‌ها را می‌توان به‌عنوان ژن‌های افزایش بیان یافتهٔ واقعی معرفی نمود. در مقایسهٔ نسبت بیان ژن‌های مطالعه شده در شرایط تنش به غیر تنش در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره (جدول۴)، bZIP5 بیشترین میزان (۴/۳۱۲۷) را به‌خود اختصاص داد. نتایج همچنین نشان داد که بیان این ژن فقط در رقم ماهوتی افزایش می‌یابد و علاوه بر اینکه میزان بیان آن در شرایط تنش در رقم ماهوتی به بیش از دو برابر حالت شاهد می‌رسد، میزان بیان آن در شرایط تنش نیز بسیار شدیدتر از رقم چینی بهاره است (۳/۱۳۹۷). با توجه به اینکه تجزیه آماری داده‌ها نیز وجود تفاوت آماری زیادی بین تیمار شاهد (c) و تنش (a) در ارتباط با این ژن نشان می‌دهد، به‌نظر می‌رسد که این ژن می‌تواند کاندیدای مناسبی برای معرفی به‌عنوان ژن تحمل به تنش شوری باشند، هرچند که کسب اطمینان بیشتر در این خصوص، مستلزم تجزیه عملکرد، از طریق انتقال این ژن و یا استفاده از سازوکارهای خاموش کردن ژن است. مقایسهٔ نسبت بیان ژن‌ها درشرایط تنش به غیر تنش بین رقم ماهوتی و چینی بهاره (جدول۴) نشان داد که میزان بیان تمام ژن‌ها به جز bZIP1 و bZIP3 در شرایط تنش در رقم ماهوتی بیشتر از رقم چینی بهاره بوده است و احتمالاً تحمل بیشتر رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره به تنش نیز به همین علت می‌تواند باشد، هر چند که میزان این تغییر بین ۱ تا ۲ برابر حالت شاهد بوده است.

گروه‌بندی ژن‌ها بر اساس نسبت بیان نیز، این ژن‌ها را در دو گروه مجزا تقسیم‌بندی نمود. بر این اساس می‌توان دریافت که ژن‌های bZIP1 و bZIP3 در گروه اول، رفتار مشابهی را در گندم در شرایط تنش از خود نشان داده و به‌صورت افزایش بیان، تظاهر می‌یابند. بقیه ژن‌ها نیز در گروه دوم، الگوی مشابهی را نشان دادند.

از نتایج فوق می‌توان استنباط کرد که در سیستم تنظیم بیان ژن در گیاه گلیکوفیت گندم و در ارقام متحمل و حساس به تنش، تفاوت در میزان بیان و حتی نوع ژن‌های تنظیمی است که باعث تفاوت فنوتیپی این دو رقم (ماهوتی و چینی بهاره) در شرایط تنش می‌شود. بنابراین می‌توان تصور کرد که کاهش بیان و یا القاء نشدن ژن‌هایی که عملکردهای مهمی در تحمل به تنش دارند، ممکن است عامل حساسیت رقم چینی بهاره به شوری باشد.

در این تحقیق با استفاده از روش نورترن بلات معکوس و همردیفی توالی و راهکار ژنومیکس مقایسه‌ای (BLASTX)، عوامل رونویسی از خانواده‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصله نشان داد که این عوامل در پاسخ به تنش شوری بلندمدت دخالت دارند، این یافته برخلاف اطلاعات موجود که تنها نقش این عوامل را در

Archive of SID

www.SID.ir

پاسخ کوتاه‌مدت گیاه ذکر کرده اند، می باشد. همچنین مشخص شد که در آینده، یکی از ژن‌های مورد مطالعه (bZIP5) می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تجزیه عملکرد بیشتر در شرایط تنش مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

References

Bartels, D. 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance. Trends Plant Sci. 6: 284–286.

Chang, C-S. J., Y-H. Li, L-T. Chen, W-C. Chen, W-P. Hsieh, J. Shin, W-N. Jane, S-J. Chou, G. Choi, J-M. Hu, S. Somerville and S-H. Wu. 2008. *LZF1*, a *HY5*-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation. Plant J. 54: 205–219.

De Leonardis, A. M., D. Marone, E. Mazzucotelli, F. Neffar, F. Rizza, N. Di Fonzo, L. Cattivelli, A. and M. Mastrangelo. 2007. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. Plant Sci. 172: 1005–1016.

Encinas-Villarejo, S., A. M. Maldonado, F. Amil-Ruiz, B. d. l. Santos, F. Romero, F. Pliego-Alfaro, J. M. oz-Blanco and J. L. Caballero. 2009. Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria ananassa*) *FaWRKY1* and Arabidopsis *AtWRKY75* proteins in resistance. J. Exp. Bot. 60(11): 3043–3065.

Ghavami, F., M. A. Malboobi, M. R. Ghannadha, B. Yazdi Samadi, J. Mozaffari and J. Aghaiee. 2004. The study of Iranian tolerant wheat varieties response to salinity stress in germination and seedling stage. Iran. J. of Agric. 35: 453–464. (In Persian with English abstract).

He, X-J., R-L. Mu, W-H. Cao, Z-G. Zhang, J-S. Zhang and S-Y. Chen. 2005. *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. Plant J. 44: 903–916.

Jakoby, M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj and F. Parcy. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. Trends Plant Sci. **7**: 106–111.

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

Johnson, C., A. Mhatre and J. Arias. 2008. *NPR1* preferentially binds to the DNA-inactive form of Arabidopsis TGA2. Biochimica Biophysica Acta, 1779: 583–589.

Johnson, R. R., R. L. Wagner, S. D. Verhey and M. K. Walker-Simmons. 2002. The abscisic acid-responsive kinase *PKABA1* interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, *TaABF*, and phosphorylates *TaABF* peptide sequences. Plant Physiol. 130: 837–846.

Jung, C., J. S. Seo, S. W. Han, Y. J. Koo, C. H. Kim, S. I. Song, B. H. Nahm, Y. D. Choi and J-J. Cheong. 2008. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis. Plant Physiol. 146: 623–635.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Klein, M., M. Geisler, S.J. Suh, H.U. Kolukisaoglu, L. Azevedo, S. Plaza, M. D. Curtis, A. Richter, B. Weder, B. Schulz and E. Martinoia. 2004. Disruption of *AtMRP4*, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. Plant J. 39: 219–236.

Kobayashi, F., E. Maeta, A. Terashima, K. Kawaura, Y. Ogihara and S. Takumi. 2008. Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat. J. Exp. Bot. 59(4): 891–905.

Lee, T. G., C. S. Janga, J. Y. Kima, D. S. Kimb, J. H. Parka, D. Y. Kima and Y. W. Seo. 2007. A Myb transcription factor (*TaMyb1*) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses. Physiologia Plantarum, 129: 375–385.

Li, H., J. Sun, Y. Xu, H. Jiang, X. Wu and C. Li. 2007. The bHLH-type transcription factor *AtAIB* positively regulates ABA response in Arabidopsis. Plant Mol. Biol. 65: 655–665.

Libault, M., J. Wan, T. Czechowski, M. Udvardi and G. Stacey. 2007. Identification of 118 arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 900–911.

Mare, C., E. Mazzucotelli, C. Crosatti, E. Francia, A. M. Stanca and L. Cattivelli. 2004. *HvWRKY38*: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. Plant Mol. Biol. 55: 399–416.

Mott, I. W. and R. R. C. Wang. 2007. Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. Plant Sci. 173: 327–339.

Munns, R. and R. A. James. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid Wheat. Plant Soil. 253: 201–218.

Novillo, F., J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. Salinas, 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101: 3985–3990.

Rabbani, M. A., K. Maruyama, H. Abe, M. Ayub Khan, K. Katsura, Y. Ito, K. Yoshiwara, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA Gel-Blot analyses. Plant Physiol. 133: 1755–1767.

Rahaie, M., G-P. Xue, M. R. Naghavi, H. Alizadeh and P. M. Schenk. 2010. A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes. Plant Cell Rep. 29(8): 835-44.

Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush. 2003. TM4: a free, open-source system for

Archive of SID

www.SID.ir

microarray data management and analysis. Biotechniques, 34(2): 374–8.

Tamura, T., K. Hara, Y. Yamaguchi, N. Koizumi and H. Sano. 2003. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. Plant Physiol. 131: 454–462.

Uno, Y., T. Furihata, H. Abe, R. Yoshida, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97: 11632–11637.

Ward, J. M. and J. I. Schroeder. 1994. Ca^{2+}-activated vacuolar K+ channels and Ca2+-induced Ca2+ release by slow vacuolar channels implicated in stomatal closing. Plant Cell, 6: 669–683.

Xue, G. P., N. I. Bower, C. L. McIntyre, G. A. Riding, K. Kazan and R. Shorter. 2006. *TaNAC69* from the NAC super family of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences. Func. Plant Biol. 33: 43–57.

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

Zhang, Yi, G. Zhang, N. Xia, X-J. Wang, L-L. Huang and Z-S. Kang. 2009. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. Physiol. Mol. Plant Pathol. 73: 88–94.

Archive of SID

www.SID.ir

The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique

Rahaie, M.[1], M. Gomarian [2], H. Alizadeh[3], M. A. Malboobi[4], M. R. Naghavi[5]

ABSTRACT

Rahaie,.M, M. Gomarian, H. Alizadeh, M. A. Malboobi, M. R. Naghavi. 2011. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. **Iranian Journal of Crop Sciences. 13 (3): 580-595. (In Persian).**

Soil salinity is a serious problem in agricultural production systems, particularly where the majority of crop plants have a low level of salt tolerance. The identification of genes whose expression enables plants to adapt or tolerate to salt stress conditions is essential for breeding programs, however little is known about the role of different transcription factors as important regulatory genes in salt stress, specially under long term salinity stress. To elucidate the role of these regulatory factors in response to long term salt stress in two wheat genotypes; Chinese Spring (susceptible) and Mahouti (tolerant), eleven transcription factor genes from different families (bZIP, bHLH, WRKY, MYB and NAC) were analyzed by reverse northern bolt under control and stress (250 mM NaCl) conditions. The results showed that the selected genes were affected by salinity in both genotypes and were up- or down-regulated and the variation of expression ratio in Mahouti variety was higher than Chinese Spring. The expression of three transcription factor genes (bHLH2, bZIP5 and MYB3) varied more than two-folds in response to salt stress. These genes were significantly up-regulated only in tolerant genotype, var. Mahouti, indicating that these genes may potentially regulate a long term plant response to salt stress in wheat, and can be considered as suitable candidates for further genetic analysis. It is concluded that the transcription factors can be involved in long term salt stress response of wheat plant, in contrary to general view which distinguishes their contributions only for a short term response to salt stress.

Key words: Gene expression, Long term salinity, Reverse northern blot, Transcription factor and Wheat.

Received: May, 2010 **Accepted: December, 2010**

1- Assistant Prof., University of Tehran, Tehran, Iran
(Corresponding author) (Email: mrahaie@ut.ac.ir)
2- Assistant Prof., Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
3- Assistant Prof., Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
4- Prof., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
5- Prof., Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran

Archive of SID
www.SID.ir