ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۱۱۴-۱۰۷

الگوی بیان ژن‌های *GmOSBP*، *CAT* و *GmBZIP* تحت تنش شوری در سویا (*Glycin max* L.)

Expression pattern of *GmOSBP, CAT* and *GmBZIP* genes under saline stress in soybean (*Glycin max* L.)

جعفر احمدی*[۱]، ولی اله سلیمانی[۱]

۱- به ترتیب دانشیار، کارشناس‌ارشد، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، ایران

Ahmadi J*[1], Soleimani V[1]

1. Associate Professor, MSc, Imam Khomeini International University, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۸- تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۸)

چکیده

ژن‌های *GmOSBP* و *GmBZIP* دارای نقش کلیدی در سیگنال‌دهی برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی تحت تنش و ژن کاتالاز دارای نقش مهارکنندگی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) هستند. این پژوهش جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های *GmOSBP*، *GmBZIP* و *CAT* در دو ژنوتیپ سویا Williams (متحمل) و L17 (حساس) تحت تنش شوری صفر (شاهد) و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl در مرحله پنج برگی انجام شد. از ژن خانه‌دار 18S rRNA در آزمون نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از مقادیر Ct نشان دهنده افزایش بیان هر سه ژن تحت تنش شوری بود. تحت تنش شوری افزایش بیان ژن *GmBZIP* در ژنوتیپ Williams دو برابر ژنوتیپ L17 بود و در ریشه نسبت به برگ بیان یک و نیم برابری نشان داد. همچنین تحت تنش شوری افزایش بیان ژن *GmOSBP* در ژنوتیپ L17 دو برابر ژنوتیپ Williams بوده و میزان بیان آن در برگ سه برابر ریشه بود. بیان ژن کاتالاز نیز تحت تنش شوری در ژنوتیپ L17 سه برابر Williams و نیز در ریشه بیشتر از برگ بود. با توجه به افزایش بیان این ژن‌ها تحت شوری در سویا، انتقال این ژن‌ها می‌تواند در راستای افزایش تحمل به شوری در گیاهان زراعی موثر باشد.

واژه‌های کلیدی

تنش شوری
سویا
CAT
QRT-PCR
cDNA

Archive of SID

مقدمه

پاسخ به شوری توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شوند که برخی از آن‌ها در فعالیت سلول‌های محافظ روزنه درگیر هستند (Sobhanian et al. 2011). در گیاهان مختلف همواره یک رابطه منفی بین غلظت سدیم در اندام‌های گیاه و میزان رشد گیاه وجود دارد (Schachtman and Munns 1992). نسبت پتاسیم به سدیم در گیاه به عنوان یک عامل مهم جهت تعیین میزان تحمل گیاه به شوری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ong 2006). افزایش غلظت یون Na^+ و کاهش K^+/Na^+ در پاسخ به تنش شوری در منابع متعددی گزارش شده است (Weimberg 1987; Tester and Davenport 2003). در ارقام دارای تحمل شوری میزان تجمع کمتر یون Na^+ و حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ در اندام‌های جوان گیاه به عنوان شاخصی جهت بهبودی تحمل گیاه به شوری استفاده می‌شود (Munns 2002; Wei et al. 2003). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داده که ژن *GmBZIP* متعلق به زیرخانواده AREB (Huang et al. 2010) و از عوامل رونویسی در سیگنال‌رسانی تنش‌های غیرزنده می‌باشد که در تنظیم پاسخ به تنش‌های مختلف در گیاهان نقش دارد (Gao 2011). این ژن با اسید آبسیزیک (ABA) فعال شده و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و مشخص شده که *GmBZIP1* در ریشه، ساقه و برگ سویا تحت شرایط تنش‌های مختلف مذکور بیان می‌شود، لذا افزایش بیان این ژن منجر به افزایش تحمل به تنش شوری می‌شود (Gao 2011). تحقیقات قبلی نشان داده که انتقال عامل رونویسی *bZIP* جدا شده از *Poncirus trifoliata* به توتون تحت تنش خشکی باعث افزایش بیان ژن *PtrABF* نسبت به نوع وحشی شد، که از طریق مهار ROS و بیان ژن‌های پاسخ به تنش و آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سطوح بالا، تحمل کم آبی در توتون را افزایش داد (Huang et al. 2010). علاوه بر این، در مطالعه‌ای ژن *GmBZIP1* برای بهبود صفت تحمل به خشکی در ارقام گندم چینی BS93 مورد استفاده قرار گرفت (Gao 2011). در مطالعه‌ای بر روی عکس‌العمل گندم در پاسخ به تنش شوری و خشکی با استفاده از تجزیه نتایج PCR در زمان واقعی، مشاهده شد که در هر دو تنش، ژنوتیپ‌هایی که دارای ژن *GmBZIP1* هستند در مقایسه با ژنوتیپ‌های غیرتراریخت، بیان بالایی داشته و به شوری و خشکی تحمل بیشتری را نشان دادند (Gao 2011). در مطالعه بر روی آرابیدوپسیس و برنج در واکنش به تنش‌های شوری، گرما، پراکسید هیدروژن و آبسیزیک اسید و سرما مشاهده شد که بیان *OsBZIP46* به شدت تحت تنش شوری، گرما، پراکسید هیدروژن و آبسزیک اسید القا شد اما تحت تنش سرما القا نشد. نتایج نشان داد که *OsBZIP46* یک تنظیم کننده مثبت سیگنال‌دهی ABA و تحمل به تنش شوری در برنج است (Tang et al. 2012). بیان بالای *GmBZIP1* در گیاهان تراریخت، نشان می‌دهد که *GmBZIP1* ممکن است یک منبع ژنتیکی با ارزش برای تحمل تنش باشد (Gao 2011).

در گیاهان پراکسید هیدروژن نقش مهمی در تحریک هر دو پاسخ دفاعی و مرگ سلولی بازی می‌کند. آنزیم کاتالاز با حذف بخش عمده‌ای از پراکسید هیدروژن سلولی، تغییراتی در سطح و غلظت پراکسید هیدروژن می‌دهد (Vandenabeele et al. 2004). در مطالعه‌ای بر روی گیاه سویا در واکنش به تنش شوری، مشاهده شد که میزان بیان ژن کاتالاز، در مرحله گلدهی افزایش یافت (Tester and Davenport 2003). گزارش شد که ژن *GmOSBP* ممکن است در برخی از واکنش‌های فیزیولوژیکی برای پاسخ به تنش و رسیدگی کوتیلدون در دانه سویا درگیر و نقش داشته باشد (Li et al. 2007). همچنین پس از ۶ ساعت از شروع تنش شوری با کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار به گیاهچه سویا، مشاهده کردند که بیان ژن *GmOSBP* در ریشه و ساقه به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت، در حالی که بعد از ۲۴ ساعت سطح بیان در ساقه بیشتر از ریشه بود. همچنین بیان ژن *GmOSBP* در برگ بسیار افزایش نشان داد (Ong et al. 2006).

هدف از این تحقیق، بررسی الگوی بیان سه ژن *GmOSBP*، *CAT* و *GmBZIP* تحت تنش شوری در گیاهچه سویا با استفاده از PCR در زمان واقعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذور ژنوتیپ Williams (متحمل) و لاین L17 (حساس) از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. بذور تحت شرایط دمایی ۲± ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دو سطح نرمال و تنش شوری، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)

Archive of SID
www.SID.ir

در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار کشت شد. تیمار تنش شوری صفر (شاهد) و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl در هر دو ژنوتیپ در مرحله پنج برگی به مدت هفت روز اعمال شد و جهت سازگار شدن گیاه به تنش شوری دو مرحله اول تنش با NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار شروع شد. جهت تعیین غلظت سدیم و پتاسیم و نیز بررسی الگوی بیان ژن‌های *GmOSBP*، *CAT* و *GmBZIP* از دو اندام برگ و ریشه به طور هم زمان و در مرحله پنج برگی گیاهچه‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها بلافاصله آن‌ها را در نیتروژن مایع قرار داده و برای استخراج RNA کل در دمای ۸۰- نگهداری شدند. جهت تعیین غلظت سدیم و پتاسیم در اندام‌ها، نمونه‌ها بلافاصله در فویل آلومینیومی پیچیده شده و در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شدند. جهت تعیین غلظت این عناصر، ۰/۱ گرم از نمونه‌ها سابیده شده را با ۱۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۰/۱ نرمال مخلوط و سپس به مدت دو ساعت در بن ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها با سرعت $g \times 1000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و ۰/۱ میلی لیتر از این مایع با نه میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و با دستگاه جذب اتمی فلیم فوتومتر ۳۱۰۰، مقادیر تراکم بهینه (OD) نمونه‌ها ثبت شد. با استفاده از فرمول خط رگرسیون حاصل از تراکم بهینه و غلظت بر حسب قسمت در میلیون (ppm) نمونه‌های استاندارد شده، مقادیر OD به ppm تبدیل شد. در نهایت شکل ستونی داده‌ها جهت بررسی، توسط برنامه Excel رسم شد (Hamada et al. 1994). با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus Solution (شرکت سیناکلون)، RNA استخراج و غلظت RNA با استفاده از نانودراپ (NanoDrop 1000 spectrophotometer) خوانده شد و کیفیت نمونه‌ها با ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای حذف DNA ژنومی و ساخت رشته اول cDNA از کیت (Quanti Tect, Reverse Transcription Kit, Cat. No. 205311) کمپانی کیاژن استفاده شد. برای حذف DNA ژنومی ابتدا یک میکروگرم از محلول RNA کل به درون یک تیوب ۰/۲ ml DEPC و اتوکلاو شده اضافه شد. این مرحله با استفاده از ترکیب (gDNA Wipeout ۲ µl، Template RNA ۱ µg) و رسانیدن حجم نهایی به ۱۴ µl (با RNAas-free water) انجام شد. سپس تیوب‌ها به مدت دو دقیقه در بن‌ماری در دمای ۴۲ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند. در ادامه مخلوط واکنش لازم برای مرحله رونویسی معکوس به صورت ترکیب (Quantiscript Reverse Transcriptase ۱ µl، Quantiscript RT Buffer 5x ۴ µl، RT Primer mix ۱ µl) تهیه شد. سپس RNA الگو از مرحله حذف DNA ژنومی (با حجم ۱۴ میکرولیتر) به هر تیوب که شامل مخلوط واکنش رونویسی معکوس بود، اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بعد به مدت سه دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA از RNAهای استخراج شده واکنش PCR با استفاده از آنزیم تک‌پلی‌مراز انجام شد. نتایج نشان داد که نمونه‌های RNA هیچ‌گونه باندی تکثیر نکردند که بیانگر عاری بودن RNAها از آلودگی بود. برای انجام PCR در زمان واقعی از cDNA تهیه شده استوک ۱۰ برابر رقیق شده، با غلظت ۵۰ نانوگرم تهیه شد. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از کیت [Bulk Cod. , SYBR [Premix Ex TagII (Tli RNaseH Plus)RR820L کمپانی تک آرا و با استفاده از دستگاه Real Time PCR BIORAD- مدل CFD-3120 ساخت کشور آمریکا انجام شد. از ژن خانه‌دار 18S rRNA برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد. طراحی توالی آغازگرها با استفاده از نرم افزار SoftBerry و Primer designing tool به صورت جدول (۱) انجام شد. آغازگرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون (سیناژن) سفارش داده شد. به منظور اطمینان از کارایی و عملکرد اختصاصی آغازگرها، واکنش PCR انجام شد. نهایتا واکنش PCR در زمان واقعی در دو اندام ریشه و برگ در دو تکرار تکنیکی و با استفاده از تکنیک سایبرگرین انجام شد. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از کیت [Ex TagII (Tli RNaseH Plus), Bulk. Cod. RR820L SYBR [Premix انجام گرفت. واکنش PCR با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه آغاز و با ۴۰ چرخه دو مرحله‌ای واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر و طویل شدن رشته در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (برای هر سه ژن مورد مطالعه)

Archive of SID

www.SID.ir

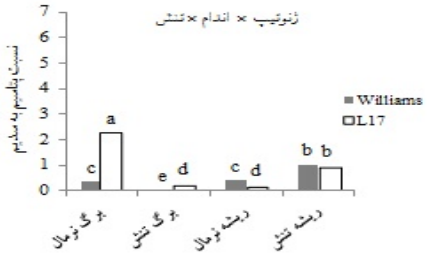
جدول۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در بررسی بیان ژن‌های *GmOSBP*، *CAT*، *GmBZIP* و *18srRNA* جهت qRT-PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر (´۳ ⟵ ´۵)	تعداد نوکلئوتید	اندازه قطعه bp	GC%
GmBZIP F	CAGTGGCGAGGCGCGGGGCC	۲۰	۱۲۰	٪۸۵
GmBZIP R	GAACCTCTCGAACTCGTTGT	۲۰		٪۵۰
GmOSBP F	GTCAACCATCGCCGCAAGCC	۲۰	۱۳۰	٪۶۵
GmOSBP R	CCATGCCACTCGATCCTCCC	۲۰		٪۶۵
CAT F	GCCAACCACAGCCATGCCACT	۲۱	۱۸۸	٪۶۲
CAT R	AGGACCAAGCGACCAACAGGC	۲۱		٪۶۲
18S rRNA F	TTTCGTCTACGTCGCATTT	۱۹	۱۴۸	٪۴۰
18S rRNA R	CGTGGAGCAAGTCGTGTAA	۱۹		٪۵۳

به مدت ۵۰ ثانیه ادامه یافت. در نهایت به منظور رسم منحنی ذوب میزان دما از ۵۰ درجه سانتی‌گراد طی ۹۰ چرخه ۱۰ ثانیه‌ای به ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسید. سپس میزان بیان ژن با روش تصحیح کارایی ΔΔCt[1] (Pfaffl 2001) محاسبه شد. داده‌های حاصل با استفاده از داده‌های ژن خانه‌دار 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی نرمال شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد. با استفاده از آزمون نرمالیتی اندرسون و دارلینق در نرم‌افزار Minitab از نرمال بودن داده‌ها اطمینان حاصل شد و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. در نهایت رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نسبت پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سه گانه ژنوتیپ × اندام × تنش و اهمیت آن، مقایسه میانگین نسبت Na^+/K^+ در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ انجام شد (شکل ۱). نسبت Na^+/K^+ در ژنوتیپ L17 در شرایط نرمال در برگ (کلاس a) بیشتر از ریشه (کلاس d) بود در حالی که این نسبت در همان شرایط در هر دو اندام ژنوتیپ Williams برابر و در کلاس c قرار گرفتند. در شرایط تنش شوری، نسبت K^+/Na^+ در برگ ژنوتیپ Williams کمتر از برگ ژنوتیپ L17 بود و به ترتیب در کلاس e و d قرار گرفتند، در حالی که این نسبت در اندام ریشه برای هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد و این افزایش در ژنوتیپ Williams نسبت به ژنوتیپ L17 کمی بیشتر بود ولیکن هر دو در گروه آماری b قرار گرفتند. این نتایج مشخص کرد که این نسبت در زمان وقوع تنش در گیاه در اندام برگ کاهش داشته ولیکن در اندام ریشه که نقش اساسی در تنظیم اسمزی و جذب آب دارد بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. در توافق با نتایج این آزمایش، Munns et al. (2002); Wei et al. (2003) نیز در آزمایش تنش شوری بر روی گیاهان گزارش کرده‌اند که حفظ نسبت بالای Na^+/K^+ به عنوان شاخصی جهت تحمل گیاه به شوری استفاده می‌شود.



شکل ۱- مقایسه نسبت پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) در تنش شوری برای اثر متقابل ژنوتیپ ×ا ندام × تنش در سطح احتمال یک درصد

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان ژن *GmBZIP* (جدول۲) اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ در منابع تغییر اصلی ژنوتیپ، اندام، تنش و اثرات متقابل دوگانه و سه گانه این عامل‌ها نشان داد. معنی‌دار بودن اثر متقابل ژنوتیپ × تنش و اندام × تنش دلالت بر عدم پاسخ یکسان دو ژنوتیپ Williams و L17 و نیز دو اندام ریشه و برگ نسبت به شرایط تنش شوری داشت. مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *GmBZIP* در دو ژنوتیپ Williams و L17 (شکل۲- الف) نشان داد که در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش میزان بیان این ژن در ژنوتیپ

[1] Efficiency adjusted ΔΔCt

Archive of SID
www.SID.ir

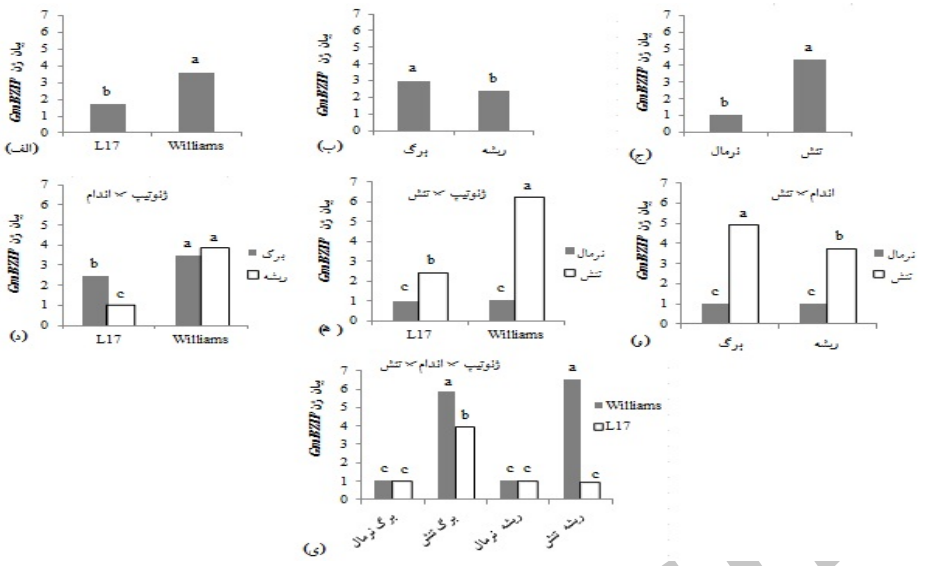
جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌های *GmBZIP*, *CAT*, *GmOSBP* و نسبت K^+/Na^+ در شرایط تنش شوری در دو ژنوتیپ متحمل Williams و حساس L17 سویا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)			
		GmBZIP	*CAT*	*GmOSBP*	K^+/Na^+
ژنوتیپ	۱	۱۴/۳۷۷**	۹/۶۳۳**	۲/۹۲۸**	۰/۸۹۳**
اندام	۱	۱/۴۲۹**	۰ /۳۹۵**	۱۰/۳۱۹**	۰/۰۳۱**
تنش	۱	۴۳/۶۱۰**	۴/۶۲۱**	۶/۶۷۱**	۰/۲۲۱**
ژنوتیپ × اندام	۱	۳/۲۷۵**	۱/۶۸۴**	۴/۲۵۹**	۱/۴۴۰**
ژنوتیپ × تنش	۱	۱۳/۹۷۱**	۹/۳۹۳**	۲/۳۳۹**	۰/۶۱۶**
اندام × تنش	۱	۱/۲۹۱**	۰/۳۹۷**	۱۰/۴۵۴**	۳/۴۴۱**
ژنوتیپ×اندام×تنش	۱	۳/۴۷۰**	۱/۷۰۵**	۴/۳۷۵**	۰/۸۱۰**
خطا	۸	۰/۰۵۷	۰/۰۲۷	۰/۰۲۷	.۰/۰۰۱
%C.V		۸/۹۳	۱۰/۵۳	۹/۷۳	۵/۴۹

* و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

Williams با مقدار برابر با ۳/۶۱۴ بیشتر از ژنوتیپ L17 (۱/۷۱۹) می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *GmBZIP* در دو اندام برگ و ریشه در مرحله پنج برگی (شکل۲- ب) مشخص شد که بیان این ژن در اندام برگ بیشتر از ریشه بوده و اختلاف بیان بین برگ (کلاس a) و ریشه (کلاس b) در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ معنی‌دار شد. در مجموع اندام‌ها و هر دو ژنوتیپ میزان بیان نسبی ژن *GmBZIP* در سطح تنش شوری چهار برابر سطح بدون تنش افزایش داشته است (شکل۲- ج) و در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار بود. با مقایسه میانگین بیان ژن *GmBZIP* در مورد اثر متقابل ژنوتیپ × اندام، سه کلاس a، b و c بدست آمد و بیان این ژن در برگ ژنوتیپ L17 دو و نیم برابر ریشه و در ژنوتیپ Williams در هر دو اندام تقریبا برابر بود (شکل۲- د). با توجه به نتایج مقایسه میانگین دانکن (شکل۲- ه) برای اثر متقابل ژنوتیپ × تنش، میزان بیان نسبی ژن *GmBZIP* در شرایط تنش شوری در ژنوتیپ Williams دو و نیم برابر ژنوتیپ L17 بود به طوری که بیان این ژن در ژنوتیپ Williams در کلاس a و در ژنوتیپ L17 در کلاس b قرار گرفت، در حالی که در شرایط بدون تنش میزان بیان این ژن بین دو ژنوتیپ تقریبا برابر بوده و در یک کلاس آماری (کلاس c) قرار گرفتند. در مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × اندام (شکل۲- و) در شرایط تنش شوری میزان بیان ژن *GmBZIP* در هر دو اندام ریشه و برگ نسبت به شرایط نرمال افزایش چهار برابری نشان داد و اندام ریشه و برگ تحت تنش نسبت به شرایط نرمال به ترتیب با بیشترین مقدار بیان به ترتیب در کلاس a و b قرار گرفتند. در حالی که در شرایط نرمال میزان بیان ژن در هر دو اندام تقریبا برابر بود. بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش (شکل۲- ی)، اندام برگ و ریشه ژنوتیپ Williams در شرایط تنش دارای بالاترین (کلاس a) میزان بیان ژن *GmBZIP* بود و پس از آن بیان ژن اندام برگ ژنوتیپ L17 در شرایط تنش در کلاس دوم (b) قرار گرفت. با توجه به افزایش بالاتر بیان ژن *GmBZIP* در تنش شوری در ژنوتیپ متحمل Williams نسبت به ژنوتیپ حساس L17 (یک و نیم برابر در برگ و شش و نیم برابر در ریشه) و نیز افزایش بیان در اندام ریشه نسبت به برگ، نتایج این تحقیق با نتایج Huang et al. (2010) در افزایش بیان ژن *GmBZIP* در تنش شوری در توتون تراریخت شده با ژن *GmBZIP*، با نتایج Gao et al. (2011) در مطالعه بر روی گندم چینی BS93 تراریخت شده با ژن *GmBZIP1* که به شدت توسط ABA، تنش‌های شوری و دمای پایین القا شده و در ریشه، ساقه و برگ تحت شرایط تنش‌های مذکور افزایش بیان داشت، و نیز با نتایج Tang et al. (2012) در مطالعه بر روی برنج تراریخت شده با ژن *OsBZIP46* که در تنش شوری افزایش بیان داشت، مطابقت دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

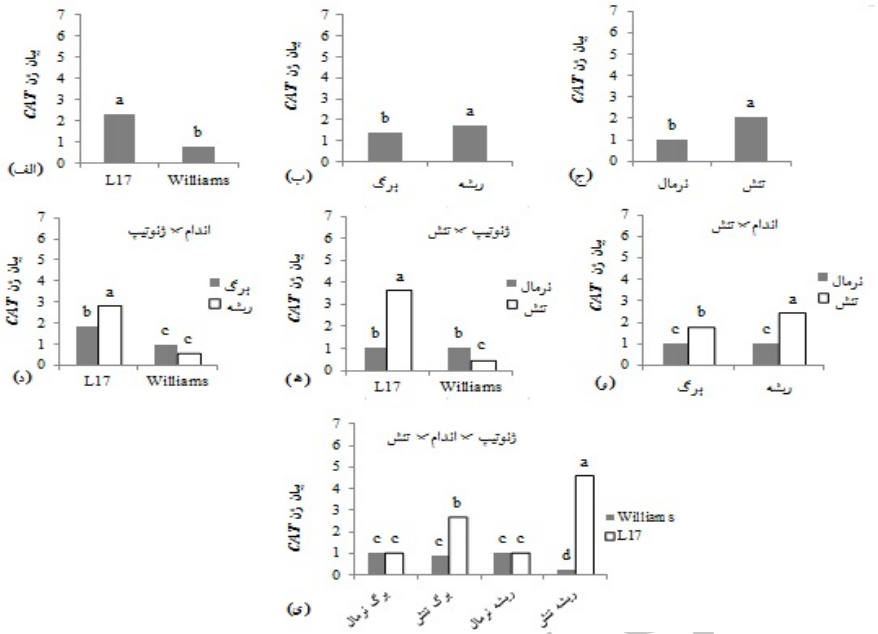


شکل۲- مقایسه میزان بیان ژن *GmBZIP* در الف) دو ژنوتیپ Williams و L17؛ ب) دو اندام ریشه و برگ؛ ج) دو سطح تنش و عدم تنش شوری؛ د) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام؛ ه) اثر متقابل ژنوتیپ × تنش؛ و) اثر متقابل اندام × تنش؛ ی) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس بیان ژن کاتالاز (جدول۲) هم اثرات اصلی و هم اثرات متقابل دوگانه و سه گانه سه عامل تنش، ژنوتیپ و اندام در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ معنی‌دار شدند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها، در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش بیان ژن کاتالاز در ژنوتیپ L17 نسبت به ژنوتیپ Williams بیشتر بوده و در دو گروه کلاس مختلف قرار گرفتند (شکل۳- الف). در مقایسه میانگین بیان نسبی ژن کاتالاز در دو اندام برگ و ریشه (شکل۳- ب) مشخص شد که بیان این ژن در اندام ریشه بیشتر از برگ بود و اختلاف بیان بین ریشه (کلاس a) و برگ (کلاس b) در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ معنی‌دار شد. در مجموع دو اندام و دو ژنوتیپ، ژن کاتالاز در سطح تنش شوری نسبت به سطح نرمال، دو برابر افزایش بیان نشان داد (شکل۳- ج). با مقایسه میانگین بیان ژن کاتالاز در اثر متقابل ژنوتیپ × اندام سه کلاس a، b و c بدست آمد، به طوری که بیان این ژن در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش در ریشه ژنوتیپ L17 نسبت به برگ ژنوتیپ Williams افزایش بیشتری یافته و در کلاس a قرار گرفت و این افزایش بیان حدود سه برابر نسبت به اندام برگ ژنوتیپ Williams بود. در حالی که افزایش بیان این ژن در ریشه ژنوتیپ Williams نسبت به برگ کم‌تر بوده و در کلاس c قرار گرفت (شکل۳- د). در مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش (شکل۳- ه) میزان بیان ژن کاتالاز در تنش شوری در ژنوتیپ L17 (کلاس a) هفت برابر بیشتر از ژنوتیپ Williams (کلاس c) مشاهده شد. در حالی که در شرایط بدون تنش هر دو ژنوتیپ بیان یکسانی نشان داده و در کلاس b قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × اندام (شکل۳- و) در مجموع دو ژنوتیپ نشان داد که اندام ریشه (با مقدار ۲/۴۰۲) نسبت به برگ (با مقدار ۱/۷۷۲) افزایش بیان یک و نیم برابری در شرایط تنش داشته و با داشتن اختلاف آماری معنی‌دار به ترتیب در کلاس a و b قرار گرفتند. در صورتی که بیان این ژن در شرایط بدون تنش در ریشه و برگ یکسان بوده و در کلاس c قرار گرفتند. با مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش (شکل۳- ی) افزایش بیان در ریشه ژنوتیپ L17 (کلاس a) در شرایط تنش بیشتر از ریشه ژنوتیپ Williams (کلاس d) بود. همچنین افزایش بیان تحت تنش شوری در برگ ژنوتیپ L17 سه برابر بیشتر از ژنوتیپ Williams شد و به ترتیب در کلاس آماری b و c قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج Tester and Davenport (2003) که تنش شوری باعث افزایش فعالیت ژن کاتالاز در سویا شده بود، مطابقت دارد.

نتایج تجزیه واریانس ژن *GmOSBP* در جدول ۲ ارائه شده است و همانطور که مشاهده می‌شود تمام منابع تغییرات در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۱ معنی‌دار شدند. بر اساس مقایسه میانگین بیان ژن *GmOSBP*، در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش میزان بیان ژن

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه میزان بیان ژن *CAT* در الف) دو ژنوتیپ Williams و L17؛ ب) دو اندام ریشه و برگ؛ ج) دو سطح تنش و عدم تنش شوری؛ د) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام؛ ه) اثر متقابل ژنوتیپ × تنش؛ و) اثر متقابل اندام × تنش؛ ی) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش.

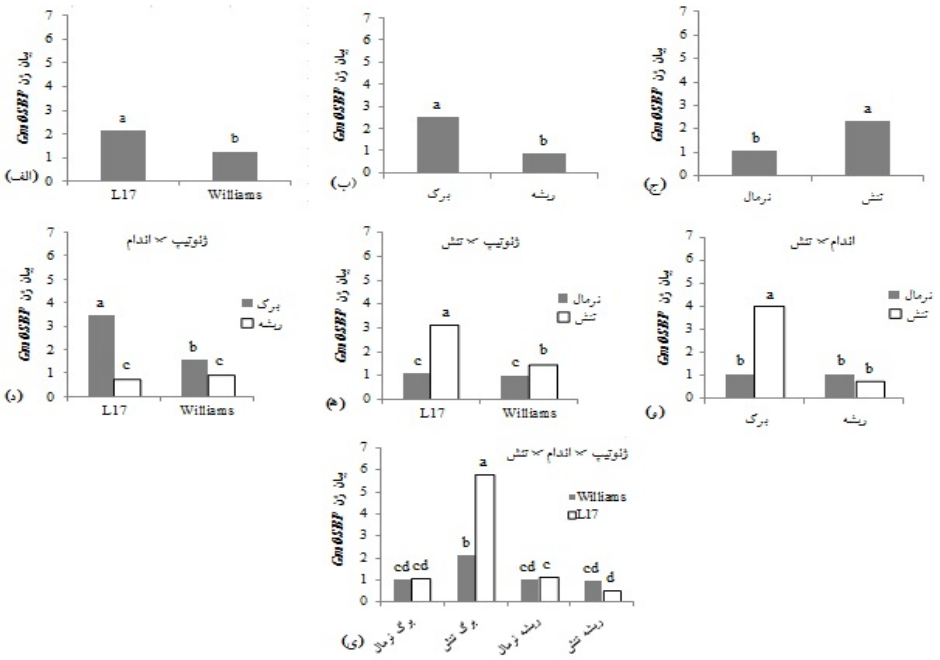
در ژنوتیپ L17 نسبت به ژنوتیپ Williams بیشتر بوده و در دو کلاس آماری مختلف قرار گرفتند (شکل۴- الف). مقایسه میانگین بیان ژن در دو اندام برگ و ریشه (شکل۴- ب) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد به طوری که میزان بیان ژن در اندام برگ نسبت به ریشه افزایش نشان داد. همچنین در مجموع اندام‌ها و ارقام میزان بیان ژن در سطح تنش شوری نسبت به سطح نرمال دو برابر افزایش بیان نشان داد (شکل۴- ج). مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × اندام نشان داد که بیان ژن *GmOSBP* در برگ نسبت به ریشه در هر دو ژنوتیپ افزایش داشته و این افزایش در ژنوتیپ L17 چهار برابر و در ژنوتیپ Williams یک و نیم برابر بود (شکل۴- د). در مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش سه کلاس a، b و c بدست آمد (شکل۴- ه). در این مقایسه میزان بیان ژن *GmOSBP* در تنش شوری در ژنوتیپ L17 (کلاس a)، دو برابر بیشتر از ژنوتیپ Williams (کلاس b) مشاهده شد. در حالی که در شرایط نرمال هر دو ژنوتیپ بیان تقریبا یکسانی نشان داده و در کلاس آماری c قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × اندام (شکل۴- و) در مجموع دو ژنوتیپ نشان داد که در شرایط تنش شوری اندام برگ (با مقدار ۳/۹۵۰) نسبت به ریشه (با مقدار ۰/۷۲۷) افزایش بیان پنج برابری داشته و در کلاس a قرار گرفت و اندام ریشه در شرایط تنش شوری بدون اختلاف آماری با ریشه و برگ شرایط نرمال در کلاس b قرار گرفتند. با مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش (شکل۴- ی) افزایش بیان در برگ ژنوتیپ L17 (کلاس a) در شرایط تنش سه برابر برگ ژنوتیپ Williams (کلاس b) بود. اما افزایش بیان تحت تنش شوری در ریشه ژنوتیپ Williams دو برابر بیشتر از ژنوتیپ L17 بود. در توافق با نتایج این آزمایش، Ong et al. (2006); Li et al. (2007) نیز در آزمایش تنش شوری بر روی گیاهچه سویا گزارش کرده‌اند که بیان ژن *GmOSBP* در ریشه و برگ افزایش یافت.

با توجه به اینکه افزایش بیان هر سه ژن *GmOSBP*، *CAT* و *GmBZIP* منجر به افزایش تحمل تحت شوری می‌شود، شاید بتوان انتقال این ژن‌ها را در راستای افزایش تحمل به شوری در ارقام سویای با عملکرد بالا یا سایر گیاهان زراعی مناسب و موثر ارزیابی کرد.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این تحقیق از محل اعتبارات طرح پژوهشی به شماره ۱۱۴۴۶ دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) پرداخت شده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴- مقایسه میزان بیان ژن *GmOSBP* در الف) دو ژنوتیپ Williams و L17؛ ب) دو اندام ریشه و برگ؛ ج) دو سطح تنش و عدم تنش شوری؛ د) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام؛ ه) اثر متقابل ژنوتیپ × تنش؛ و) اثر متقابل اندام × تنش؛ ی) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش.

منابع

Gao SQ, Chen M, Xu ZS, Zhao CP, Li L, Xu HJ, Tang YM, Zhao X, Ma YZ (2011) The soybean *GmBZIP*1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. Plant Molecular Biology 75:537-553.

Hamada AM, and ELenany AE (1994). Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. Biologia Plantarum 36:75-81.

Huang XS, Liu JH, Chen XJ (2010) Overexpression of *PtrABF* gene, a *bzip* transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. BMC Plant Biology 10:230.

Li DY, Inoue H, Takahashi M, Shiraiwa TK, Takahara H (2007) Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an *OSBP* (oxysterol-binding protein) homologue from soybean. Gene 407:12-20.

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25:239- 250.

Ong JQ, Mei XR, Fujiyama H (2006) Adequate internal water status of NaCl salinized rice shoots enhanced selective calcium and potassium absorption. Soil Science and Plant Nutrition 52:300-304.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29: e45.

Sobhanian H, Aghaei K, Komatsu S (2011) Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerant crops. Journal of Proteomics 74:1323-1337.

Schachtman DP, Munns R (1992) Sodium accumulation in leaves for *Triticum* species that differ in salt tolerance. Australian Journal of Plant Physiology 19:331-340.

Tang N, Zhang H, Li X, Xiao J, Xiong L (2012) Constitutive activation of transcription factor Os*GmBZIP*46 improves drought tolerance in rice. Plant Physiology 158: 1755-1768.

Tester M, Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91:503-527.

Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in Arabidopsis thaliana. Plant Journal 39:45-58.

Wei G, Ji S, Lu Y, Feng J, Li J, Shi Y, Fu Q, Liu D, Luo J, Zhu Y (2003) Isolation and analysis of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. Nucleic Acids Research 31:2534-2543.

Weimberg R (1987) Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. Physiologia Plantarum 70:387-388.

Archive of SID