دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ijrfpbgr.2018.115745.1278
جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۲۵۳-۲۴۴ (۱۳۹۷)

ارزیابی الگوی بیان ژن‌های *NAC2*، *MYB* و *CBF14* ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به شوری در آژیلوپس(*Aegilops*)

علی محمودی[۱]، علی اعلمی[۲*]، حسن حسنی کومله[۳]، مسعود اصفهانی[۴] و رضا شیرزادیان[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

پست الکترونیک: ali_aalami@guilan.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴

چکیده

تنش شوری یکی از اصلی‌ترین عوامل محیطی است که تولید و توزیع جغرافیایی گیاهان را در سراسر جهان محدود می‌کند. آژیلوپس یک جنس وحشی از خانواده گندمیان است که دارای ژن‌های مفید همانند تحمل به تنش‌های محیطی می‌باشد. در این آزمایش ژنوتیپ ۵۷۵ از گونه *Aegilops cylindrica* به‌عنوان مقاوم و ژنوتیپ ۶۷۵ از گونه *Aegilops crassa* به‌عنوان حساس که بر پایه آزمایش‌های پیشین در تنش شوری شناسایی شده بودند، استفاده شد. پس از جوانه‌زنی بذرها، گیاهچه‌ها در شرایط کنترل شده نوری و دمایی به‌محیط ماسه منتقل و آبیاری در دو شرایط نرمال و تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار با محلول هوگلند انجام گردید. نمونه‌برداری از بافت برگ در زمان‌های صفر، شش، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار شوری انجام شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA صحت آن با 18S rRNA تأیید و بیان ژن‌های سه عوامل رونویسی *CBF14*، *NAC2* و *MYB* از طریق Real Time-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که فاکتورهای رونویسی *NAC2* و *CBF14* ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری بالاترین میزان بیان را داشتند، ولی ژن *MYB* بیشترین بیان را ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش داشت. در مجموع بیان ژن‌های *CBF14*، *NAC2* و *MYB* در ژنوتیپ متحمل ۵۷۵ در مقایسه با ژنوتیپ ۶۷۵ در تمامی ساعات بیان نسبی بیشتری داشت. این نتایج نشان می‌دهد که سه ژن فوق نقش کلیدی و مهمی در اعطای تحمل به تنش شوری در ژنوتیپ متحمل دارند، بنابراین با توجه به‌قرابت ژنتیکی بالای آژیلوپس و گندم می‌توانند پس از آزمایش‌های تکمیلی به‌عنوان ژن‌های کاندیدا برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی گندم به‌کار روند.

واژه‌های کلیدی: آژیلوپس، تنش شوری، فاکتورهای رونویسی

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی بر سر راه کشاورزی کمبود منابع آب شیرین و با کیفیت برای آبیاری است. با توجه به توسعه کشاورزی فاریاب و اجتناب‌ناپذیر بودن استفاده از منابع آبی با کیفیت پائین و شور، تخریب زمین‌های زراعی مرغوب و گرایش به‌سمت شور و قلیا شدن خاک مسئله‌ساز خواهد بود (Kafi, *et al.*, 2003). بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از اراضی جهان متأثر از شوری هستند که ۳۹۷

میلیون هکتار از آن شور و ۴۳۴ میلیون هکتار شور و قلیا هستند، این سطح برابر شش درصد از کل اراضی جهان است (Fao, 2005).

در طول هزاران سال، گیاهانی که به‌عنوان خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی شناخته شده‌اند در معرض تنش‌های زنده و غیره زنده مانند سرما، خشکی، شوری، غرقابی و انواع آفات و بیماری‌ها بوده‌اند. بسیاری از گونه‌های متحمل، خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی هستند و در بسیاری موارد اجداد آنها نیز به‌شمار می‌روند (Jiang *et al*., 1994). آژیلوپس‌ها به‌عنوان اجداد وحشی گندم دارای گنجینه‌ای از ژن‌های ارزشمند برای انتقال به گونه‌های زراعی هستند. جنس آژیلوپس شامل ۱۱ گونه دیپلوئید، ۱۰ گونه تتراپلوئید و ۲ گونه هگزاپلوئید است که تنوع ژنتیکی بالایی را نشان می‌دهند و فرمول ژنتیکی آن شامل ژنوم‌های D، S، U، C، N و M است. بعضی از گونه‌های آژیلوپس حداقل در یکی از ژنوم‌های خود با گندم مشترک هستند که اجازه می‌دهد صفات مطلوب آنها به‌وسیله تلاقی‌های منظم و یا روش‌های نوترکیبی طبیعی به گندم انتقال پیدا کند (Schneider *et al*., 2008). در پژوهش اخیر با بهره‌گیری از روش‌های پیشرفته توالی‌یابی و نقشه‌برداری تشابه بالای ژنوم D گندم و آژیلوپس را گزارش کرده‌اند (Luo *et al*., 2017).

گیاهان به‌طور طبیعی همواره در معرض تنش‌های محیطی متفاوت از قبیل شوری بالا، خشـــکی، سرما و غیره قرار دارند که سبب محدودیت رشد و کاهش چشگیر عملکرد در گیاهان زراعی می‌شوند. در مقابل گیاهان نیز طی تکامل سازوکارهای مناسبی برای مقابله با این عوامل نامساعد محیطی کسب کرده‌اند که ناشی از تغییرات ژنتیکی در آنها می‌باشد. از مهمترین ژن‌هایی که با تنظیم بیان ژن‌های عملکردی می‌توانند در تحمل گیاهان به تنش‌ها نقش کلیدی داشته باشند عوامل رونویسی یا TF(Transcription factor) می‌باشند (Huang *et al*., 2015). عوامل رونویسی پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به عناصر تنظیمی در ناحیه بالادست ژن‌های هدف همانند سویچی روشن و یا خاموش کردن این ژن‌ها را عهده‌دار هستند و بیان آنها را تنظیم می‌کنند. از عوامل مهم رونویسی که نقش آنها در تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی تاکنون در مطالعات متعدد گزارش شده است می‌توان به سه خانواده *NAC*، *CBF* و *MYB* اشاره نمود (De Leonardis *et al*., 2007; Yamaguchi-Shinazaki & Shinozaki, 2005; Huang *et al*., 2015). نام ژن *NAC* در اصل از نام سه پروتئین مشتق شده است: NAM (No apical meristem)، ATAF1-2 و CUC2 (Cup-shaped cotyledon) که شامل یک دمین اختصاصی، اتصال به DNA است (Aida *et al*., 1997). نقش *NAC*ها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اثبات شده است، همچنین دارای وظایف مهمی در توسعه گیاه هستند، برخی از آنها به‌عنوان اهدافی برای مهندسی ژنتیک در تحمل به تنش در گیاهان استفاده شده است (Nakashima et *al*., 2012; Puranik *et al*., 2012). تاکنون نقش مهم عوامل رونویسی CBF یا (C-repeat binding factor/ dehydration-responsive element binding) CBF/DREB در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه خشکی، شوری و سرما در گیاهان مشخص شده است. این ژن‌ها عوامل رونویسی هستند که به‌طور موقتی در مراحل اولیه تنش بیان می‌شوند و تظاهر ژن‌های هدف را فعال می‌نمایند (Jan *et al*., 2017). ژن‌های *CBF* زیادی از گونه‌های گندمیان شناسایی شده است، مانند چاودار (Jaglo *et al*. 2001)، برنج (Bevilacqua *et al*., 2015)، جو (Marozsán-Tóth *et al*., 2015) و گندم (Mohseni *et al*., 2012). فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ به تنش‌های محیطی *MYB* پروتئین‌هایی مشتمل بر یک، دو یا سه توالی تکراری ناقص (۵۱-۵۳ آمینو اسید) در دامنه اتصال به DNA هستند. این پروتئین‌ها، با توجه به‌تعداد تکرارها در دامنه *MYB*شان، پیش‌تر در سه زیرخانواده MYBR1R2R3، MYBR2R3 و *MYB*های مرتبط طبقه‌بندی شده‌اند (Chen *et al*., 2006). پروتئین‌های *MYB* نقش مهمی را در پاسخ

به تنش‌های محیطی در گیاه بازی می‌کنند. در آرابیدوپسیس ۱۵ ژن *MYB* گزارش شده که مرتبط با پاسخ‌گویی به تنش هستند (Dubos *et al*., 2010). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که *TaMYb1* در پاسخ گندم به تنش‌های غیرزنده دخیل است. میزان بیان این ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی اتیلن گلیکول (خشکی) و شوری به‌ویژه در بافت ریشه افزایش می‌یابد. همچنین میزان رونوشت این ژن در زمان شروع تیمار گیاه با ABA و پلی اتیلن گلیکول به کندی افزایش می‌یابد (Lee *et al*., 2007).

با توجه به توضیحات بالا، شناسایی ژن‌های جدید به‌ویژه عوامل رونویسی و تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش‌ها می‌تواند درک بهتری از نقش کارکردی آنها در انطباق با تنش‌ها ازجمله تنش شوری برای محققان فراهم کرده و بر این اساس راهکارهای مولکولی مناسبی را برای افزایش تحمل به تنش در گیاهان فراهم نمایند، ضمن اینکه آگاهی اندکی راجع به نقش عوامل رونویسی در آژیلوپس در پاسخ به تنش شوری وجود دارد. به‌همین دلیل در این تحقیق با توجه به نقش کلیدی سه عامل رونویسی *MYB*، *NAC2* و *CBF14* در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌های غیرزیستی الگوی بیان آنها در شرایط تنش شوری با روش Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن می‌تواند به‌عنوان یک بررسی پایه‌ای برای انتخاب ژن‌ها و راهبردهای مناسب برای استفاده در اصلاح مولکولی گندم استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار شوری

در این آزمایش از بذرهای دو ژنوتیپ ۵۷۵ از گونه *Ae. cylindrica* به‌عنوان مقاوم و ژنوتیپ ۶۷۵ از گونه *Ae. crassa* به‌عنوان ژنوتیپ حساس که بر پایه آزمایش‌های پیشین در تنش شوری شناسایی شده بودند، استفاده شد (Mahmoudi *et al*., 2014). بدین‌منظور بذرها در محلول ۱۰ درصد وایتکس تجاری به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از شستشو در آب مقطر استریل، بذرها در ظروف پتری حاوی کاغذ صافی به ژرمیناتور انتقال داده شدند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به محیط ماسه با زهکش مناسب منتقل و آبیاری با محلول هوگلند به‌مدت دو هفته انجام شد (Hoagland and Arnon, 1950). سپس تیمار با سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم انجام گردید و در ساعات صفر و ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ از برگ در مرحله سه برگی برای استخراج RNA نمونه‌گیری انجام شد و بلافاصله نمونه‌ها با نیتروژن مایع منجمد و به‌فریزر ۷۰°C- منتقل شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus ™ (سیناکلون- ایران) انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorph AG 22331) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شد. ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas انجام شد. پس از تهیه تیوب‌های حاوی cDNA به فریزر ۷۰- درجه سلیسیوس منتقل شدند. برای انجام واکنش PCR ابتدا رقیق‌سازی به نسبت ۵:۱ انجام و مقدار یک میکرولیتر برای واکنش PCR استفاده شد. برای بررسی کیفیت cDNA از آغازگرهای ژن RNA ریبوزومی 18S rRNA (Jain *et al*., 2006) استفاده شد.

بیان نسبی ژن‌ها با Real Time-PCR

واکنش qPCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر حاوی ۶/۲۵ میکرولیتر SYBR Green I PCR Master Mix (Fermentas)، نیم میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و معکوس و ۰/۸ میکرولیتر cDNA رقیق شده با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل Bio-Rad و نرم‌افزار™ CFX Manager انجام شد. اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در جدول یک مشاهده می‌شود. این آغازگرها عمدتا مربوط به گیاهان هم‌خانواده و برای 18S-rRNA از آرابیدوپسیس می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- لیست آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان نسبی ژن‌های عوامل رونویسی *MYB*، *NAC2* و *CBF14*

Primers	Forward	Reverce	Tm	Size	Ref.
CBF14	TGCCTCAACTTCGCCGACTC	CATGCCGCCGATCCAGTGCT	60	240	(Masoomi *et al*., 2015)
NAC2	CGAGTGGGAGAAGATGCAGC	TTGTCCACGATCTCCGACTC	60	165	(Masoomi *et al*., 2015)
MYB2	GGGCTGAAACGCACAGGCAAGA	CTGCTTGGCGTGCTTCTGC	55	314	(Yang *et al*., 2012)
18S-rRNA	ATGATAACTCGACGGATC	CTTGGATGTGGTAGC CGT	60	180	(Unfried *et al*., 1989)

چرخه دمایی و برنامه زنجیره‌ای پلیمرازی شامل مرحله واشرست سازی اولیه (دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه) و بعد تکثیر با ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه انجام شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها از ژن RNA ریبوزومی (18S rRNA) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. واکنش در دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام و داده‌ها براساس روش لیواک برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها تجزیه شد. برای این منظور مقدار Ct نرمال شده شاهد (تیمار نشده) از مقدار Ct نرمال شده نمونه تیمار شده کسر می‌شود (ΔΔCt). بیان نسبی ژن در هر نمونه از طریق رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak & Schmittgen, 2001).

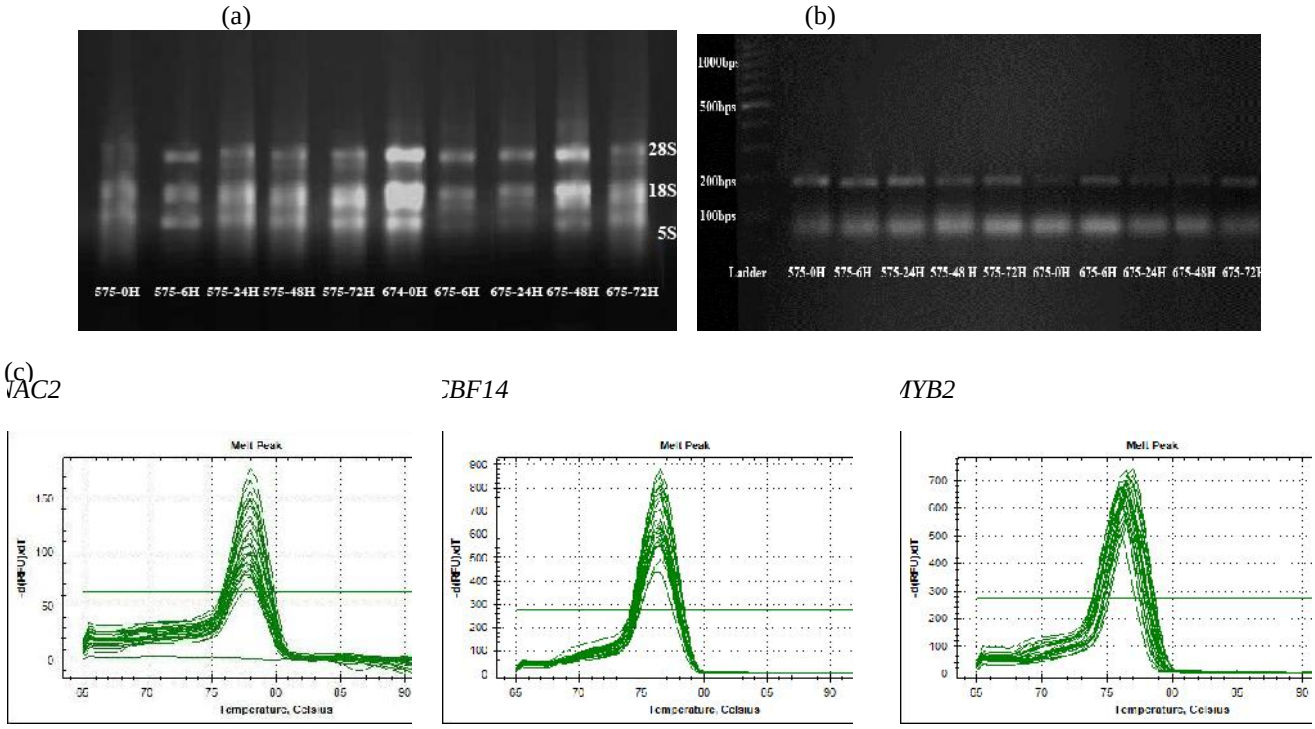
نتایج

بررسی کیفیت rRNA و cDNA

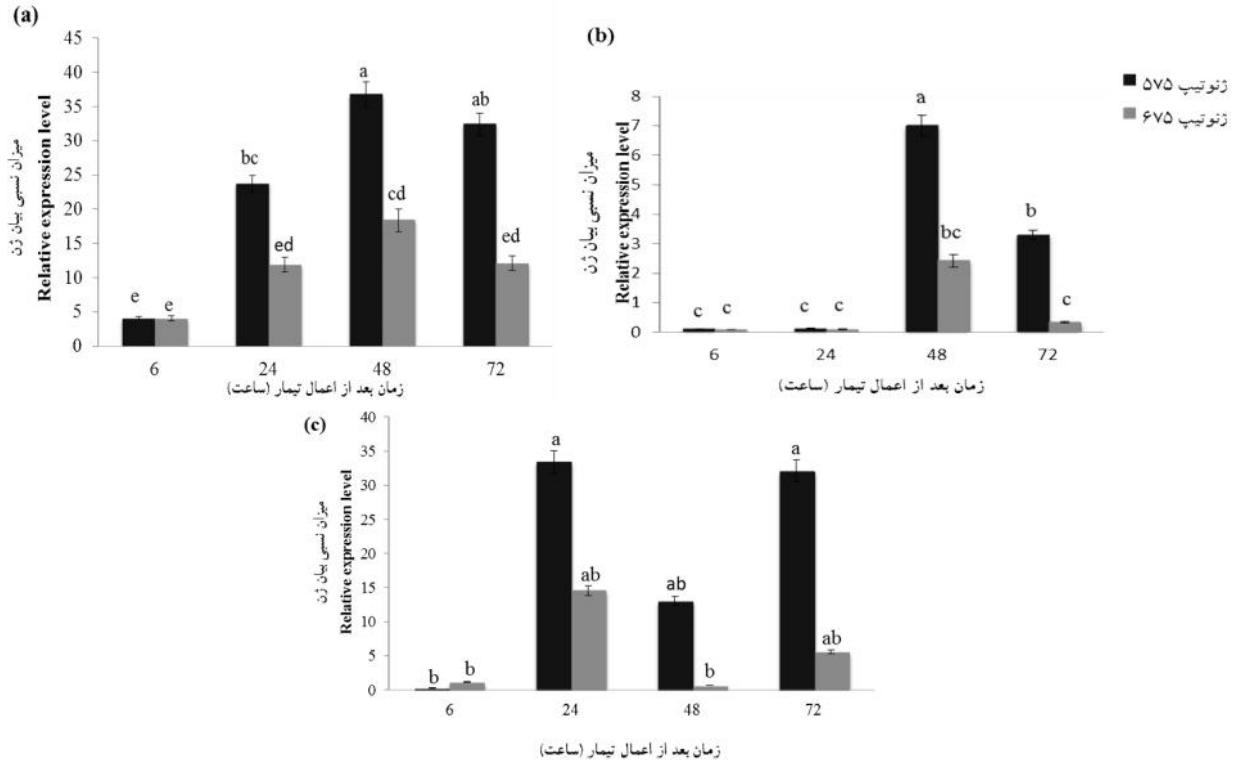
مشاهده باندهای 18S، 28S و 5S نشان از استخراج مناسب RNA است. نتایج ارزیابی کیفیت cDNA نیز با توجه به تشکیل باند تکثیر حدود 180bp متعلق به ژن 18S rRNA روی ژل آگاروز نشان از کیفیت مطلوب سنتز cDNA دارد (شکل۱- a,b). تولید تک پیک‌های منحنی ذوب طی فرایند Real Time-PCR دلالت بر تکثیر اختصاصی ژن‌های *CBF14*، *NAC2* و*MYB* مورد بررسی در پژوهش است (شکل۱- c).

مقایسه میزان نسبی بیان ژن‌های *CBF14*، *NAC2* و *MYB*

میزان بیان سه ژن کاندیدا ***CBF14***، ***NAC2*** و ***MYB2***تحت تیمار شوری در مقابله با تنش، به‌روش Real Time-PCR بررسی شد. لازم به توضیح است که بیان دو ژن ***CBF14*** و ***NAC2*** قبلا در آژیلوپس تحت تنش سرما بررسی و توالی‌یابی شده (Masoomi *et al*., 2015) ولی *MYB* برای اولین بار در گیاه آژیلوپس بررسی شده و برای انتساب دقیق به یکی از اعضای خانواده مربوطه نیاز به توالی‌یابی دارد، بنابراین در این تحقیق از ذکر شماره برای آن خودداری شده است.



شکل ۱– باندهای **28S**، **18S** و **RNA 5S** مشاهده شده دلالت بر استخراج مطلوب **(a)**، صحت ساخت **cDNA** با استفاده از ژن **18SrRNA** روی ژل آگارز یک درصد **(b)**، منحنی ذوب و تکثیر مربوط به سه ژن ***NAC2***، ***CBF14*** و ***MYB*** **(c)**



شکل ۲– بیان نسبی عوامل رونویسی **(a)** ***NAC2***، **(b)** ***CBF14*** و **(c)** ***MYB*** در دو ژنوتیپ حساس و متحمل آژیلوپس (**۵۷۵** از ژنوتیپ ***Ae.cylindrica*** و **۶۷۵** از ژنوتیپ ***Ae. crassa***) در زمان‌های ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار شوری **۲۰۰** میلی‌مولار

نتایج مقایسه بیان ژن *NAC2* در ساعات مختلف پس از تنش شوری نشان داد در شش ساعت اول تفاوت معنی‌داری بین دو ژنوتیپ مشاهده نمی‌شود ولی به‌تدریج بیان ژن در هردو ژنوتیپ افزایش یافته، به‌طوری‌که در زمان ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداکثر میزان خود رسید. اما در ادامه (۷۲ ساعت) رونویسی از این ژن اندکی کاهش یافت. بیان این ژن در تمامی ساعات در ژنوتیپ مقاوم ۵۷۵ بیشتر از ۶۷۵ بود که احتمالا نمایانگر وجود سازوکارهای مناسب در این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ حساس و برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از تنش می‌باشد (شکل۲- a).

بیان ژن *CBF14* در زمان شش و ۲۴ ساعت پس از تیمار شوری در هر دو ژنوتیپ افزایش معنی‌داری نشان نداد، اما به‌تدریج در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار از افزایش معنی‌داری برخوردار بود که نشان‌دهنده تلاش گیاه برای مدیریت تنش است اما در زمان ۷۲ ساعت، مشابه ژن NAC2 بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت (شکل۲- b). اگرچه روند افزایش و یا کاهش بیان ژن در هر دو ژنوتیپ در ساعات مختلف مشابه بود ولی میزان بیان بین دو ژنوتیپ متفاوت بود، به‌طوری‌که در ژنوتیپ مقاوم ۵۷۵ در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به ژنوتیپ ۶۷۵ میزان بیان این ژن بیشتر بود؛ ضمن اینکه در مقایسه، ژنوتیپ مقاوم در ساعت ۴۸ افزایش بیان بیش از دو برابر را نسبت به ژنوتیپ حساس ۶۷۵ نشان داد که احتمالا بیانگر فعال شدن زودتر و قوی‌تر سازوکارهای دفاعی این ژنوتیپ در مواجه با تنش می‌باشد که فرصت کافی برای آمادگی و تطابق با شرایط محیطی نامساعد را برای ژنوتیپ متحمل فراهم می‌سازد.

البته در میزان بیان ژن *MYB* در ژنوتیپ‌های ۵۷۵ و ۶۷۵ در شش ساعت اول پس از اعمال تنش تغییری مشاهده نشد ولی سایر ساعات افزایش بیان بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد، اگرچه روند یکنواختی بین زمان‌ها دیده نمی‌شود اما در زمان ۲۴ ساعت افزایش قابل توجهی در هر دو ژنوتیپ مشاهده گردید ولی در ساعت ۴۸ کاهش بیان و دوباره در زمان ۷۲ افزایش بیان وجود داشت. همانطور که در دو ژن قبلی نیز مشاهده شد در مجموع ژنوتیپ ۵۷۵ نسبت به ژنوتیپ ۶۷۵ از بیان بیشتری برخوردار بود که احتمالا اهمیت و نقش کلیدی سه ژن کاندیدا را در اعطای تحمل به این ژنوتیپ نشان می‌دهد (شکل۲- c).

بحث

بسیاری از اعضای خانواده فاکتورهای رونویسی *NAC*، نه تنها نقش مهمی در فرایندهای رشد و نمو گیاه به‌عهده دارند بلکه در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و افزایش تحمل گیاهان به اینگونه تنش‌ها نیز اثرگذار می‌باشند (Nakashima *et al*., 2012). الگوی بیان ژن *TaNAC2* (از گندم) در پاسخ به خشکسالی، شوری، سرما و تنش ABA در آرابیدوپسیس تراریخته دخالت دارد (Mao *et al*., 2012). *TaNAC4* یک فاکتور رونویسی *NAC* دیگری را در گندم کدگذاری می‌کند که با *OsNAC4* برنج همسانی بالایی دارد و در تنش زیستی و غیرزیستی در گندم افزایش می یابد (Wu *et al*., 2008). Rahaie و همکاران (2011) نشان داده‌اند *NAC67* که یکی از اعضای خانواده *NAC* است در طول تیمار استرس شوری افزایش می‌یابد و پروتئین کد شده همولوگ بسیار نزدیکی به گندم دارد. نتایج بررسی‌های Ohnishi و همکاران (2005) نشان داد که ژن-های متعلق به زیرخانواده *ATAF* مرتبط به واکنش به تنش-ها هستند. *OsNAC6* دارای شش عنصر پاسخ به آبسیزیک-اسید است که در محدوده ۵۰۰ نوکلئوتید بالادست مکان آغاز رونویسی قرار دارد که این نشان‌دهنده دخالت *OsNAC6* در سیگنالیگ پاسخ به تنش‌های وابسته به آبسیزیک‌اسید است. این ژن نیز همانند دیگر ژن‌های مربوط به عامل‌های رونویسی، دارای یک ناحیه به شدت حفاظت شده است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که این عامل رونویسی به مناطق ABRE پروموتری ژن‌های هدف اتصال می‌یابند. بیان عوامل رونویسی *NAC* تحت تنش‌های مختلف موجب فعال شدن مسیر انتقال پیام فیتوهورمون‌هایی مانند سالیسیلیک اسید، جیبرلیک اسید و اتیلن در گیاه شده که در نهایت موجب حفظ هموستازی سلولی می‌شود (Puranik *et al*., 2012). مطالعات کل ژنوم آرابیدوپسیس نشان داده

است که بسیاری از ژن‌های *NAC* بوسیله حداقل یکی از تنش‌های غیرزنده از قبیل شوری، خشکی، سرما یا ABA القا می‌شوند (Jensen *et al*., 2010).

بنابراین با توجه به اهمیت NAC در تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی در این تحقیق، بیان این ژن در تنش شوری مطالعه شد. آغازگرهای این ژن به‌صورت اختصاصی و براساس نواحی حفاظت‌شده ژن‌های این خانواده در گیاهان آرابیدوپسیس و برنج طراحی شدند. در مطالعه‌ای روی برنج، *OsNAC6* پس از تیمار شوری در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش بیان داشتند (Ohnishi *et al*., 2005) که با الگوی بیان این ژن در گیاه آژیلوپس تطابق داشت (شکل 4-a).

تمام پروتئین‌های *CBF* (C-repeat binding factors) دارای یک ناحیه حفاظت‌شده برای اتصال DNA به‌نام (Ethylene-responsive element EREBP/AP2 binding factor) هستند که از ۵۸ آمینواسید تشکیل شده است و در خانواده بزرگی از ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی گیاهی وجود دارد (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). این عامل‌های رونویسی به‌کمک این ناحیه حفاظت‌شده قادرند به توالی‌های تنظیمی در ناحیه پروموتری ژن‌های مرتبط با تنش همانند *Cor15A, Cor6.6, kin1, rd17, rd29A* اتصال یابند و موجب بیان آنها و بالطبع باعث افزایش تحمل گیاه به تنش غیر زنده شوند. عناصر تنظیمی CRT/DRE در پروموتر چندین ژن واکنش‌گر به سرما و همچنین اثر فعال‌کنندگی آنها در گیاه آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است (Gilmour *et al*., 2004). بیان ژن *OsDREB1A* پنج ساعت پس از اعمال تیمار شوری و *OsDREB2A* ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی و شوری در برنج القا می‌شود. در این تحقیق بیان این ژن در اثر شوری افزایش داشت که بیانگر سازوکارهای مشابه تحمل در گیاهان، به‌ویژه غلات دارد.

پروتئین *MYB* در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به‌طور قابل توجهی، در تنظیم سوخت‌وساز اولیه و ثانویه، کنترل توسعه سلول، چرخه سلول، مشارکت در دفاع و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده مختلف، سنتز هورمون و انتقال سیگنال دخالت دارد (Zhang *et al*., 2012). شواهد زیادی نشان می‌دهد که بسیاری از پروتئین-های *MYB* در پاسخ و تطبیق به تنش غیرزنده دخالت دارند. برای نمونه نقش پروتئین‌های *MYB* در تحمل به تنش سرمایی توسط بیان بالای *OsMYB4*، *OsMYB3R-2* و *OsMYBS3* در آرابیدوپسیس و برنج در مرحله گیاهچه‌ای نشان داده شده است (Ma *et al*., 2009). بیان بالای *OsMYB2* منجر به تجمع بیشتر قندهای محلول و پرولین شده و باعث کم شدن تجمع MDA و H_2O_2 می‌شود. این تغییرات متابولیک در طول بیان *OsMYB2* به گیاه اجازه می‌دهد تا تنظیم اسمزی مؤثرتری انجام دهد و آسیب اکسیداتیو کمتری در طول تنش شوری ببیند (Yang *et al*., 2012). در ارتباط با تغییر ترانسکریپتوم ارقام متحمل گندم در شرایط تنش شوری بلندمدت که با استفاده از ریزآرایه انجام شد، مشخص گردید که *TaMYB1* ازجمله ژن‌هایی بود که افزایش بیان داشت و میزان این افزایش ۳۴ برابر بیشتر از حالت شاهد (بدون تنش) بود. تجزیه عملکرد همولوگ این ژن در آرابیدوپسیس در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرما و ABA به‌ویژه در سلول‌های محافظ روزنه و بافت آوندی افزایش یافت. همچنین گیاهان تراریخته حاصل از آن، تحمل بیشتری به تنش‌های ذکرشده نشان دادند (Jung *et al*., 2008).

با توجه به مطالعات بالا، نقش کلیدی ژنهای کدکننده عوامل رونویسی همانند ژن‌های *CBF*، *NAC* و *MYB* تحت تنش‌های غیر زنده به‌ویژه شوری مشخص شدند. مسیر بیان این ژن‌ها به کمک یک سامانه مدیریت می‌شود، به‌طوری که در مراحل اولیه پاسخ گیاه به تنش‌ها مورد نیازند و در مدت کوتاهی بعد از تنش القا می‌شوند، در حالی که ژن‌هایی که طی هموستازی و بهبود مورد نیازند دیرتر القا می‌شوند. در این تحقیق سطح رونویسی این سه ژن در شرایط تحمل به تنش در ژنوتیپ متحمل ۵۷۵ افزایش یافت که بیانگر اهمیت و نقش کلیدی این ژن‌ها در تنظیم و فعال‌سازی ژن‌های دفاعی در تحمل به تنش دارد. از آنجایی که آژیلوپس

به‌عنوان یکی از اجداد گندم نان، گنجینه‌ای از ژن‌های مفید را در خود جا داده است و با توجه به قرابت ژنتیکی بالا با گندم می‌توانند به‌عنوان والد بخشنده ژن‌های تحمل به‌تنش‌ها در تلاقی‌ها و برنامه‌های اصلاحی گندم به‌کار روند؛ ضمن اینکه به‌کمک روش‌های مولکولی امکان جداسازی، همسانه‌سازی و انتقال این ژن‌ها به گندم و حتی سایر غلات می‌باشد. ازاین‌رو یافته‌های این تحقیق می‌تواند پس از آزمایش‌های تکمیلی در اصلاح گندم برای تحمل به تنش‌های غیر زنده به‌ویژه شوری قابل استفاده باشد.

منابع مورد استفاده

-Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M., 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. Plant Cell, 9: 841-857.

Bevilacqua, C.B., Basu, S., Pereira, A., Tseng, T.M., Zimmer, P.D. and Burgos, N.R., 2015. Analysis of stress-responsive gene expression in cultivated and weedy rice differing in cold stress tolerance. Public Library of Science One, 10: 100-132.

-Chen, Y., Yang, X. and He, K., 2006. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant Molecular Biology, 60: 107-124.

- De Leonardis, A.M., Marone, D., Mazzucotelli, E., Neffar, F., Rizza, F., Di Fonzo, N., Cattivelli, L. and Mastrangelo, A.M., 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 science, 172: 1005-1016.

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

- FAO. 2005. Global Forest Resources Assessment 2005. Progress towards sustainable forest management. Vol. 147 of FAO Forestry Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

–Gilmour, S.J., Fowler, S.G. and Thomashow, M.F., 2004. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. Plant Molecular Biology, 54 (5):767-781.

– Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif. University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.

Huang, Q., Wang, Y., Li, B., Chang, J., Chen, M., Li, K., Yang, G. and He, G. 2015. *TaNAC29*, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. BMC Plant Biology, 15: 268.

- Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T. and Thomashow, M.F., 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in brassica napus and other plant species. Plant Physiology, 127: 910-917.

-Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P., 2006. Validation of hous-keeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quatitiative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 345: 646-651.

-Jan, A.U., Hadi, F., Midrar, U., Ayaz, A. and Khaista, R., 2017. Role of CBF/DREB Gene expression in abiotic stress tolerance. International Journal of Horticulture and Agriculture, 2 :1-12.

-Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C. and Skriver, K., 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. Biochem Journal, 426: 183-196.

- Jiang, J., Friebe, B. and Gill, B.S., 1993. Recent advances in alien gene transfer in wheat. Euphytica, 73: 199-212.

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

-Kafi, M.B., Kamkar, A.M. and Damghani, M., 2003. Crop responses to growth environment. Ferdowsi University Publishers, Mashhad, 297p (in Persion).

-Lee, T.G., Jang, C.S., Kim, J.Y., Kim, D.S., Park, J.H., Kim, D.Y. and Seo, Y.W., 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.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2< sup>− ΔΔCT</sup> Method. Methods, 25 :402-408.

transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta, 1819: 97-103.

-Ohnishi, T., Sugahara, S., Yamada, T., Kikuchi, K., Yoshiba, Y., Hirano, H.Y. and Tsutsumi, N., 2005. *OsNAC6*, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. Genes Genet. Syst., 80: 135-s139.

-Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H., 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell, 7:173–182.

-Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S. and Prasad, M., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in Plant Science, 17: 369-381.

-Rahaie, M., Gomarian, M., Alizadeh, H., Malboobi, M.A. and Naghavi, M.R., 2011. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat (*Triticum aestivum L.*) genotypes using Reverse Northern Blot. Iranian Journal of Crop Science, 3(51): 580-595. (in Persian)

-Schneider, A., Molnar, I. and Mornar-Lang, M., 2008. utilisation of *Aegilops (goatgrass)* species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica, 163: 1-19.

-Unfried, I., Stocker, U. and Gruendler, P., 1989. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from Arabidopsis thaliana Co10. Nucleic Acids Research, 17: 7513.

-Wu, H., Ni, Z., Yao, Y., Guo, G. and Sun, Q., 2008. Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat *(Triticum aestivem L.)*. Progress in Natural Science, 18: 697-705.

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

-Yang, A., Dai, X., and Zhang, W.H. 2012. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. Journal Experimental Botany, 63: 2541-2556.

-Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X. and Kong, X., 2012. Molecular characterization of 60 isolated wheat *MYB* genes and analysis of their expression during abiotic stress. Journal Experimental Botany, 63: 203-214.

Luo, M.C., Gu, Y.Q., Puiu, D., Wang, H., Twardziok, S.O., Deal, K.R., Huo, N., Zhu, T., Wang, L., Wang, Y., McGuire, P.E., Liu, S., Long, H., Ramasamy, R.K., Rodriguez, J.C., Van Sonny, L., Yuan, L., Wang, Z., Xia, Z., Xiao, L., Anderson, O.D., Ouyang, S., Liang, Y., Zimin, A. V., Pertea, G., Qi, P., Bennetzen, J.L., Dai, X., Dawson, M.W., Müller, H.G., Kugler, K., Rivarola-Duarte, L., Spannagl, M., Mayer, K.F.X., Lu, F.H., Bevan, M.W., Leroy, P., Li, P., You, F.M., Sun, Q., Liu, Z., Lyons, E., Wicker, T., Salzberg, S.L., Devos, K.M. and Dvoák, J., 2017. Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. Nature, 551: 498–502.

- Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., Guo, J., Liu, Y., Chen, N., Xiao, J., Zhang, D., Xu, Z., Zhang, X. and Chong, K., 2009. Enhanced tolerance to chilling stress in OsMYB3R-2 transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. Plant Physiology, 150: 244-256.

-Mahmoudi, A., Aalami, A., Hasani, H., Esfehani, M. and Shirzadiyan, R., 2014. Evaluation of physiological and morphological traits of some *Aegilops* genotypes under stress conditions. 1st International and 13th Iranian Crop Science Congress 3rd Iraninan Seed Science 26-28 August. 2014.

- Mao, X., Zhang, Qian, H., Li, X., Zhao, A.G. and Jing, R., 2012. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 462:1-14.

-Marozsán-Tóth, Z., Vashegyi, I., Galiba, G. and Tóth, B., 2015. The cold response of CBF genes in barley is regulated by distinct signaling mechanisms. Journal of Plant Physiology, 181: 42–49.

- Masoomi-Aladizgeh, F., Aalami, A., Esfehani, M., Aghaei, M.J. and Mozaffari, K., 2015. Identification of *CBF14* and *NAC2* Genes in *Aegilops tauschii* Associated with Resistance to Freezing Stress. Applied Biochemistry and Biotechnology 176: 1059-1070.

-Mohseni, S., Che, H., Djillali, Z., Dumont, E., Nankeu, J. and Danyluk, J., 2012. Wheat CBF gene family: identification of polymorphisms in the CBF coding sequence. Genome, 55: 865–881.

Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-shinozaki, K., 2012. NAC

Assessment of *NAC2*, *MYB* and *CBF14* genes expression in susceptible and resistant *Aegilops* genotypes to salinity

A. Mahmoudi[1], A. Aalami[2*], H. Hasani Komleh[3], M. Esfehani[4] and R. Shirzadian[5]

1- Former M.Sc. student of Biotechnology, Dep. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Dep. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R.Iran. Email: ali_aalami@guilan.ac.ir
3-Assist. Prof., Dep. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R.Iran.
4- Prof., Dep. of Agronomy and plant breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R.Iran
5- Assist. Prof., Dep. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R.Iran.

Received: 06.10.2017 Accepted: 25.06.2018

Abstract

Salinity is one of the main environmental factors limiting production and distribution of plants worldwide. *Aegilops* is a wild species from grasses family with useful genes such as environmental stress tolerance. Two genotypes, 575 from *Aegilop cylindrica* as resistant and 675 from *Aegilop crassa* as sensitive to salinity were used base on previous experiments in salinity stress. After seed germination, the seedlings were transferred to a sandy environment under controlled light and temperature conditions and irrigation was performed under two normal conditions and 200 mM salinity with Hoagland solution. Leaf tissue samples were taken at 0, 6, 24, 48 and 72 hours after salinity treatments. After extracting the RNA and the cDNA synthesis, its accuracy was verified by *18S rRNA*. The expression of the three transcription factors of *CBF14*, *NAC2* and *MYB* was investigated by using Real Time-PCR. Results showed that *NAC2* and *CBF14* transcription factors had the highest expression at 48 hours after salinity stress, but the *MYB* gene had the highest expression at 24 hours after stress. Overall, the expression of *CBF14*, *NAC2*, and *MYB* genes in the 575 genotype compared with genotype 675 was in higher level in all hours. The results showed that the three mentioned genes play important role in salt tolerance in the tolerant genotype, therefore, considering the high genetic similarity between *Aegilops* and wheat, the genes can be as candidate genes for using in wheat breeding programs.

Keywords *Aegilops*, Real-time PCR, Salinity stress, Transcription factors