فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۲، شماره ۵۴، خرداد و تیرماه ۱۴۰۲ صفحه: ۴۱۱-۴۲۲

مقاله پژوهشی

اثر تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های گروه *MYB* در طی مراحل اولیه رشد از دو ژنوتیپ (تجن و زاگرس) گندم نان

سعید نواب‌پور*، حوریه نجفی و سیدمجتبی ملائی

اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۳/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۸/۲۴)

چکیده

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سازگاری گیاه با تنش‌های غیرزنده باعث تغییر در بیان تعداد زیادی ژن‌های دفاعی و تنظیم‌کننده‌های آنها از جمله فاکتورهای رونویسی می‌شود. پروتئین‌های *MYB* یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی هستند که از اهمیت خاصی در تنظیم فرایندهای نمو و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند. در این مطالعه، سطح بیان هشت فاکتور رونویسی *MYB* از گندم نان در دو رقم تجن و زاگرس در پاسخ به تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل RT-PCR نشان داد تقریباً تمامی ژن‌های خانواده *MYB* از جمله ژن *TC282418*، *TaMYB80*، *PTTa00740*، *TaMYB33*، *TaMYBR3* به ترتیب با سطح بیان ۲/۴، ۳/۲، ۷/۱، ۶/۱، ۶/۶ نسبت به شاهد تحت تنش شدید در ژنوتیپ زاگرس که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت افزایش بیان داشتند. از طرفی رقم زاگرس که جزو ارقام متحمل به تنش خشکی است برای تمامی ژن‌های مورد بررسی افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم تجن داشت.

کلمات کلیدی: گندم، تنش خشکی، فاکتور رونویسی، بیان ژن، RT-PCR، پروتئین‌های MYB

مقدمه

با توجه به اهمیت گندم در اقتصاد کشور، کنترل عوامل خسارت‌زا به عملکرد این محصول استراتژیک توسط پژوهشگران اصلاح نبات امری ضروری به نظر می‌رسد. محصولات کشاورزی تحت شرایط انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند (Amjad *et al.*, 2008). تغییرات حاصل از تنش خشکی تولیدات کشاورزی را در مناطق گسترده‌ای از جهان از جمله ایران، با محدودیت‌هایی جدی مواجهه ساخته است (Hosseini *et al.*, 2018). تنش‌های محیطی از جمله خشکی اثرات نامطلوبی را بر روی رشد و عملکرد محصولات گیاهی می‌گذارند. عکس‌العمل و سازگاری گیاهان در برابر تغییر شرایط محیطی مستلزم تغییرات متعدد سیتولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی در گیاه است. به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی به منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب برنامه‌ریزی شده و هر یک از آن‌ها بیان گروه‌های خاصی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را سبب می‌شود. بیان ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی توسط سایر ژن‌های تنظیم‌کننده متعددی کنترل می‌شود که در نتیجه آن منجر به انطباق گیاه و تحمل در برابر تنش می‌شود (Galle *et*

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: s.navabpour@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

al., 2002; Nakashima, 2000). فاکتورهای رونویسی از مهم‌ترین ژن‌هایی هستند که با نقش تنظیم‌کنندگی در بیان ژن‌های عملکردی در مسیر پیام‌رسانی می‌توانند در تحمل گیاهان به تنش‌ها نقش کلیدی ایفا کنند. فاکتورهای 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 (Huang *et al*., 2015).

پروتئین‌های MYB یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتور رونویسی در گیاهان را تشکیل می‌دهند و اهمیت خاصی در تنظیم فرایندهای نمو و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند (Riechmann *et al*., 2000). پروتئین‌های MYB در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA بوده که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی دخیل هستند. از مشخصه مهم این خانواده، داشتن دومین حفاظت‌شده MYB است که در اتصال به DNA کاربرد دارد. دومین *MYB* معمولاً مرکب از یک تا سه تکرار ناقص است که هر تکرار حاوی ۵۲ آمینواسید است که یک کنفورماسیون Helix-Turn-Helix را به وجود می‌آورد که در شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرد. به عنوان مثال، در پستانداران به خوبی شناسایی شده است که دومین *MYB* فاکتور رونویسی *c-MYB* متشکل از سه تکرار R1، R2 و R3 است (Paz-Ares *et al*., 1987). پروتئین *MYB* در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به‌طور قابل توجهی در تنظیم سوخت‌وساز اولیه و ثانویه، کنترل توسعه سلول، چرخه سلول، مشارکت در دفاع و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف، سنتز هورمون و انتقال سیگنال دخالت دارد (Zhang *et al*., 2012). نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد که بسیاری از پروتئین‌های *MYB* در پاسخ وتطبیق به تنش غیرزیستی دخالت دارند (Ma *et al*., 2009). پروتئین‌های *MYB* نقش مهمی را در پاسخ به تنش‌های محیطی در گیاه ایفا می‌کنند. مطالعات قبلی‌نشان داده‌اند که ژن *TaMYb1* در پاسخ گندم به تنش‌های غیرزیستی دخیل است. میزان بیان این ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی‌اتیلن گلیکول (خشکی) و شوری به ویژه در بافت ریشه افزایش می‌یابد. همچنین میزان رونوشت این ژن در زمان شروع تیمار گیاه با ABA و پلی‌اتیلن گلیکول به کندی افزایش می‌یابد (Lee *et al*., 2007). به منظور بررسی بیان ژن های متحمل به تنش غیرزیستی ژن *TaMYB19* از عوامل رونویسی *MYB* در دومین متصل به DNA دارای سه توالی همولوگ *A-TaMYB19*، *B-TaMYB19* و *D-TaMYB19* انتخاب شد و به گیاه آرابیدوپسیس ترانسفورم شد. نتایج حاصله نشان داد که الگوهای بیان این سه ژن در شرایط نرمال مشابه بود اما در شرایط تنش‌زای غیرزیستی ژن *B-TaMYB19* بیان متفاوتی را در تحمل به تنش‌های متعدد طول رشد، در مرحله گیاهچه‌های گیاهان تراریخت نسبت به دو توالی همولوگ خود نشان داد (Zhang *et al*., 2014) که این امر نشان‌دهنده دخیل بودن این ژن طی تنش غیرزنده است. گندم تأمین‌کننده اصلی غذای مردم در کشور است و با توجه به وضعیت آب و هوایی کشور و نزولات کم جوی امکان بروز تنش خشکی زیاد است، لذا به کارگرفتن ارقامی اصلاح شده با توانایی بیان ژن‌های متحمل به تنش خشکی می‌تواند حائز اهمیت باشد که در این پژوهش به این امر پرداخته است. در این مطالعه ارزیابی الگوی افتراقی ژن‌های گروه *MYB* در پاسخ به تنش خشکی درگندم نان طی مراحل اولیه رشد در دو رقم زاگرس (متحمل) و تجن (حساس) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و اعمال تیمار تنش خشکی: از بذور رقم حساس تجن و رقم زاگرس متحمل به تنش خشکی در این مطالعه استفاده شد. ابتدا، بذور به ۴ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۱٪ استرلیزه و سپس با آب دیونیزه شستشو داده شدند. بذور در پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی قرار داده شد و برای جوانه‌زنی به ژرمیناتور منتقل شدند. پس از جوانه‌زدن، از هر رقم سه نمونه انتخاب و در عمق سه سانتی‌متری از خاک درون گلدان کشت شدند (Maali-Amiri *et al*., 2007). گیاهان در گلدان‌های ۱/۵ لیتری پر از مخلوط گلدانی (۳:۱:۱ خاک: ماسه:

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

پیت) در اتاق رشد با محیط کنترل‌شده کشت شدند.گلدان‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۱ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Esfandiari *et al.*, 2011). اعمال تیمار خشکی در سه سطح ۴۰٪ (زیاد)، ۷۰٪ (متوسط)، ۱۰۰٪ (شاهد) ظرفیت زراعی و چهار هفته پس از جوانه‌زنی انجام شد و ۲۰ روز پس از اعمال تنش نمونه‌برداری برگ و ریشه به منظور بررسی بیان ژن‌ها انجام شد(Amiri Deh Ahmadi *et al.*, 2010). نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cDNA ژن‌های TC282418، *TaMYB80*، *PTTa00740*، *TaMYB33*، *TaMYBR3*، *TaMYB73*، *TC335859*، *TC304281* با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت به این صورت که هر نمونه RNA بعد از تیمار DNaseI داخل تیوب جدید ریخته شد و به هر تیوب که حاوی ۱۱ میکرولیتر از محتویات مذکور در بالا بود، یک میکرولیتر آغازگر oligo dt به همراه ۰/۵ میکرولیتر ddH_2O افزوده شد تا حجم به ۱۲/۵ رسید. سپس دوباره در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار گرفت و به مدت پنج ثانیه در دستگاه sin down قرار داده شد. سپس ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor، ۴ ماکرولیتر بافر 5x ساخت cDNA، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار افزوده شد و در نهایت ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت برداری معکوس افزوده شده تا حجم به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش RT که پنج دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بررسی بیان ژن با روش Quantitative Real Time – PCR: جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌ها از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبرگرین که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد، استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *ACTIN* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها بود، به عنوان ژن مرجع استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز (جدول ۱) براساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR (Quantitative Real Time - PCR) طراحی شدند. از آنجایی که طول توالی محصولات بین ۱۳۲ و ۱۸۷ باز بود، دمای نقطه ذوب بین ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با توجه به درصد GC و طول باندها انتخاب شد. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودار منحنی ذوب، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت (Moloudi *et al.*, 2013).

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بالاترین میزان بیان ژن *TC282418* در ریشه رقم زاگرس تحت شرایط تنش شدید بدست آمد درحالیکه میزان بیان آن در برگ کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) پیدا کرد (شکل ۱). علاوه بر این، میزان بیان این ژن در برگ و ریشه رقم تجن در تنش شدید نسبت به تنش متوسط کاهش چشمگیری داشت. همچنین در ریشه رقم تجن و در شرایط تنش شدید بیان این ژن نسبت به شاهد کاهش بیان داشت. فاکتورهای رونویسی عموماً نقش واسطه در بیان ژن‌های پایین دستی برای ایجاد مقاوت به تنش‌های محیطی را دارند و کمترین افزایش بیان در آن‌ها منجر به بیان چندین برابر سایر ژن‌ها می‌شود. افزایش بیان این ژن در ریشه گندم تحت تنش خشکی در نتایج Chen و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است که با نتایج این مطالعه همسو است.

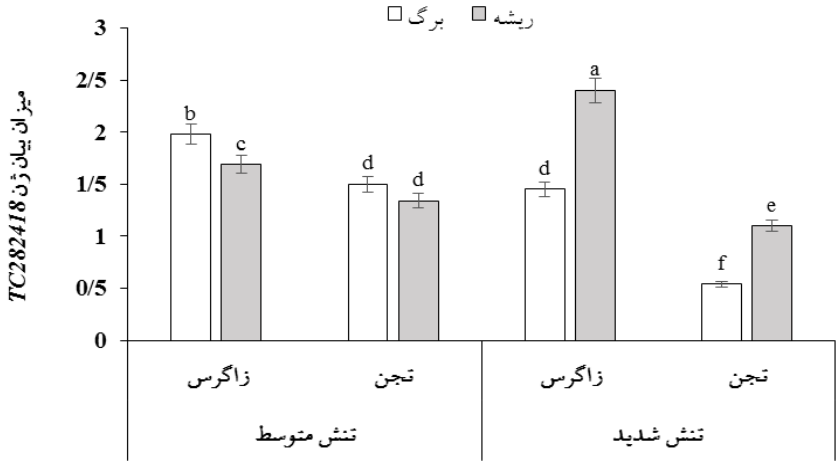
ژن *TC304281* در برگ رقم زاگراس نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد (شکل ۲) و با افزایش سطح تنش مقدار بیان آن افزایش یافت ولی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD با سطح تنش متوسط نداشت. ژن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

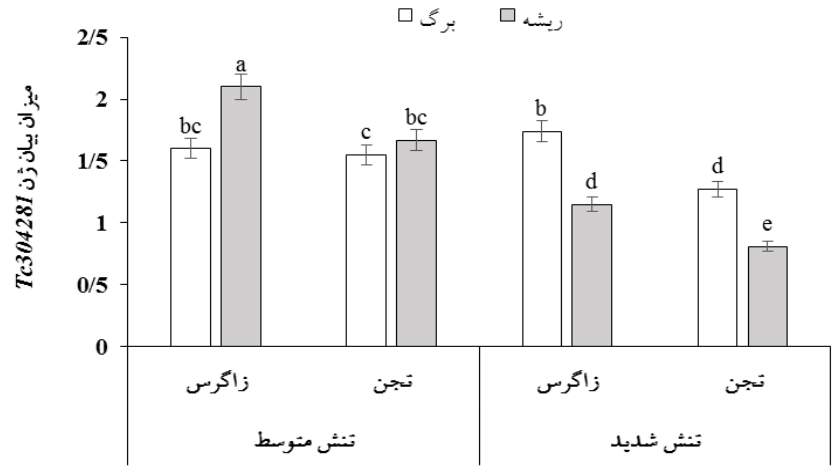
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

جدول ۱- توالی آغازگرها

نام آغازگر		توالی نوکلئوتیدی
TaMYB80	for	5´-GGTGTTTCTAAAGTCCCCAGTTAG-3´
	rev	5´-GGTATTGCGTGTAAGCGTCGTGCT-3´
TaMYB33	for	5´- TGGCACACACACCTCAAGAAG-3´
	rev	5´-TGGCGGACGACGAGATGG-3´
TaMYBR3	for	5- AGCAAGCCATGCTCAGAAAT - 3´
	rev	5- TGGAGGTAATGGTGGGTGAT -3´
PTTa00740	for	5-GACAAGTTCATCGAGGCGCTC-3´
	rev	5´-CTTCTGTGCATGGCTCCTGATC-3´
TaMYB73	for	5´-GGTGTTTCTAAAGTCCCCAGTTAG-3´
	rev	5´-GGTATTGCGTGTAAGCGTCGTGCT-3´
TC335859	for	5´- TCGGACTTCGTTGACAATACTC-3´
	rev	5´- CGAGTTCGTGCTTGGTTTAAG-3´
TC304281	for	5´-TGGGCATGTCGAAGCTAAG-3´
	rev	5´-CCTGGAAAGCCGATTGTC-3´
TC282418	for	5´- GGATGGAAACCAGCGACAC-3´
	rev	5´- TCTAAATCTGCGACAAACTCTGTATG-3´
Actin	for	5´-CAGCAACTGGGATGATATGG-3´



شکل ۱- میزان بیان ژن *TC282418* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی



شکل ۲- میزان بیان ژن *TC304281* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

TC304281 در برگ رقم تجن با وجود افزایش بیان نسبت به شاهد در هر دو سطح تنش، در شرایط تنش شدید بیان کمتری نسبت به تنش متوسط نشان داد. همچنین میزان بیان این ژن در ریشه در هردو رقم در سطح تنش متوسط نسبت به شاهد بیشترین افزایش بیان را نشان داد و کمترین میزان بیان آن هم تحت تنش شدید مشاهده شد. در همه شرایط رقم زاگراس بیان بیشتری نسبت به رقم تجن نشان داد.

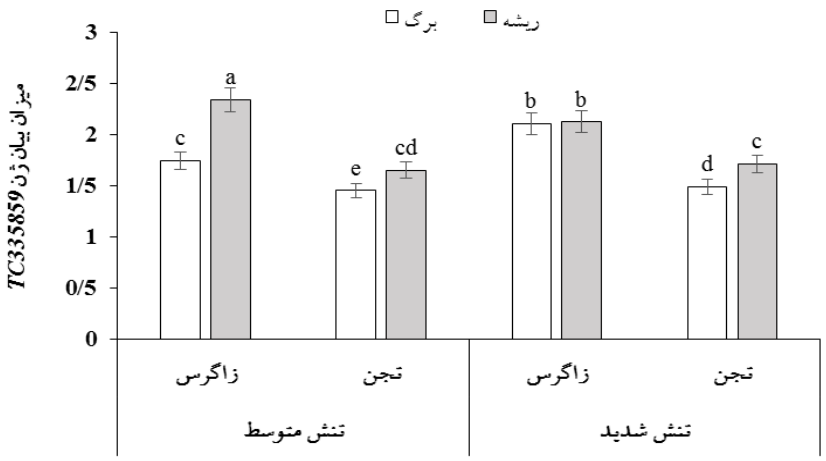
همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیشترین میزان بیان ژن *TC335859* در برگ تحت شرایط خشکی شدید و در رقم زاگرس مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با بیان این ژن در برگ رقم تجن در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD نشان داد. در ریشه در همه شرایط رقم زاگرس بیان بالاتری نسبت به رقم تجن داشت و بیشترین میزان بیان در رقم زاگرس در تنش متوسط مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD با سایر تیمارها نشان داد. کاهش بیان ژن‌ها در شرایط سطوح بالای تنش‌های محیطی معمولاً به دلیل فعالیت بالای ROSها است. ROSها می‌توانند شدیداً با بیومولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، دناتوره شدن پروتئین و جهش در امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (Esfandiari *et al*., 2007).

نتایج ارزیابی بیان ژن *TaMYB73* نسبت به شاهد، نشان داد که برگ رقم زاگرس بالاترین مقدار بیان (۲/۱۵ برابر) را نسبت به شاهد در شرایط تنش متوسط داشت و اختلاف آن با تنش شدید در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد (شکل ۴). میزان بیان این ژن در ریشه رقم زاگرس با افزایش شدت تنش افزایش بیان بیشتری نشان داد و در شرایط تنش شدید افزایش ۱/۸۷ برابری نسبت به شاهد از خود نشان داد. در رقم تجن هم در برگ و هم در ریشه میزان بیان این ژن نسبت به شاهد افزایش یافت ولی اختلاف بین دو سطح تنش برای بیان این ژن معنی‌دار نگردید. نتایج آنالیز بیان کمی (Rahaie *et al*., 2010) نشان داد، بیان اغلب ژن‌های انتخاب شده مانند ژن *MYB* در ریشه‌ها و قسمت هوایی گندم، در پاسخ به دو شرایط تنش کوتاه مدت شوری، افزایش می‌یابد که با نتایج حاصله از تحقیق حاضر که بیان ژن *TaMYB73* مورد مطالعه در سطوح مختلف تنش خشکی متفاوت بود و با افزایش تنش، بیان ژن هم افزایش داشت، مطابقت دارد. همچنین نعیمی (۱۳۹۵) بیان این ژن را تحت تنش خشکی در گیاهچه‌های گندم دوروم را بررسی کردند که نتایج حاکی از افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی بود و با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. He و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود با جداسازی فاکتور رونویسی TaMYB73 از گندم و انتقال آن به گیاه آرابیدوپسیس نشان دادند که بیش بیان این ژن مقاومت به شوری که یک تنش غیرزیستی است را در گیاه آرابیدوپسیس بهبود می‌بخشد.

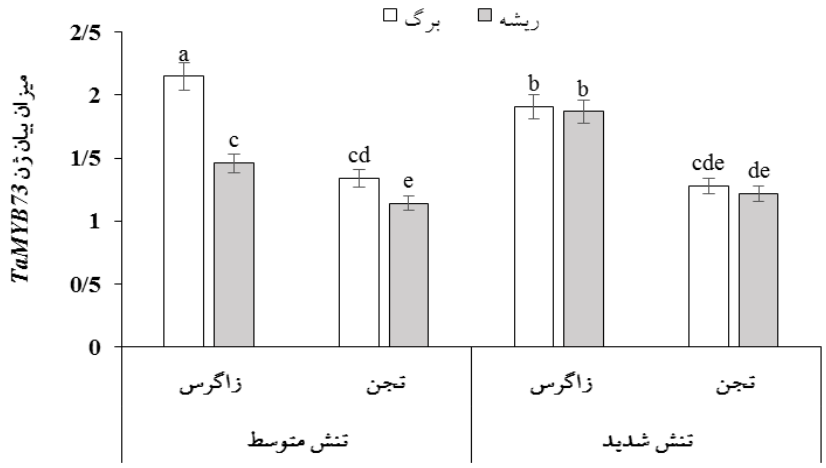
یک ژن *MYB* با نام *TaMYBsdu1* را به عنوان یکی از اعضای خانواده *MYB* گیاه گندم در بروز تحمل به تنش خشکی معرفی شد. بررسی ترادف پروتئینی *TaMYBsdu1* وجود اسیدهای آمینه گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید (دارای خاصیت اسیدی) را در ناحیه پایانه کربوکسیلی نشان داد، که بیانگر نقش احتمالی اسیدهای آمینه اسیدی در افزایش توانمندی ژن، جهت مقابله با تنش‌های محیطی است (Rahaie *et al*., 2010). دو همولوگ این ژن در آرابیدوپسیس تحت تنش‌های شوری و خشکی، عملکرد بیوشیمیایی متضادی نشان دادند. به گونه‌ای که یکی از آنها دچار افزایش بیان و دیگری دچار کاهش بیان شدند (Winter *et al*., 2007; Xiong *et al*., 2002). ژن *PTTa00740*– یکی از ژن‌های خانواده *1R-MYB* از زیر کلاس *R1/R2 type* *MYB* و از نوع فاکتور رونویسی LHY/CCA1-LIKE است. این گروه از مهمترین ژن‌ها در ایجاد تحمل به تنش‌های محیطی (به خصوص شوری و خشکی) در مسیر پاسخ به اسید آبسیزیک و همچنین دخیل در تنظیم سیکل شبانه‌روزی و رشد و توسعه سلولی هستند (Tabaraki *et al*., 2017).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

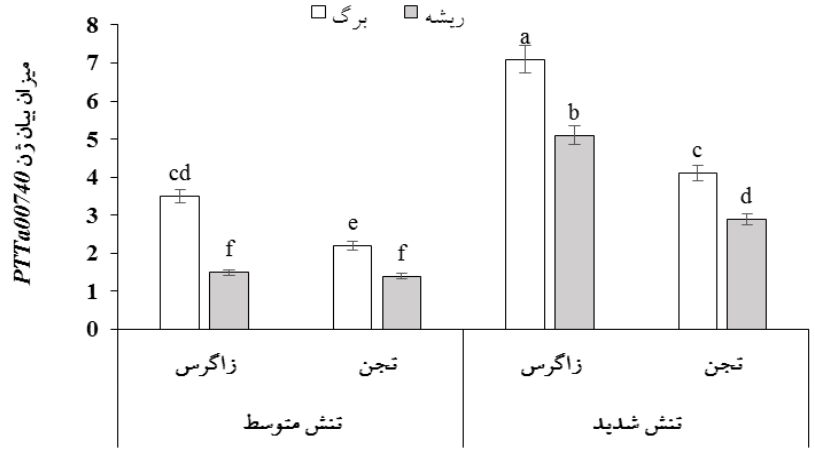
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]



شکل ۳- میزان بیان ژن *TC335859* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی



شکل ۴- میزان بیان ژن *TaMYB73* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی



شکل ۵- میزان بیان ژن *PTTa00740* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی

مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD با سایر تیمارها داشت. همچنین بیان پایین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

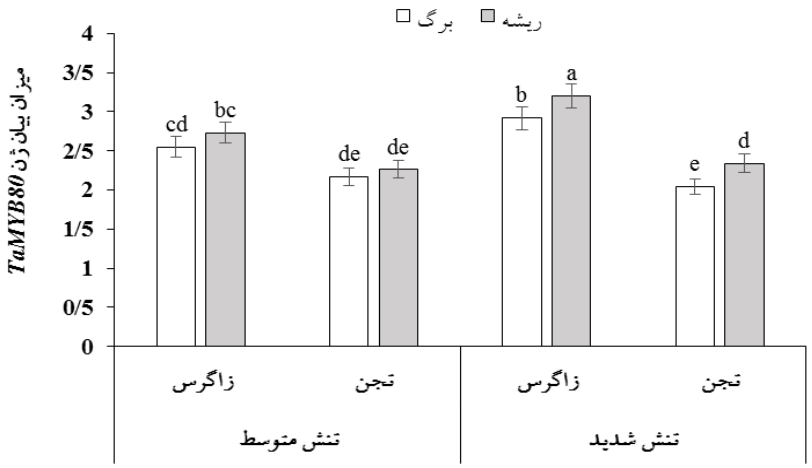
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود بیان ژن *PTTa00740* در هر دو شرایط تنش متوسط و شدید نسبت به شاهد افزایش بیان یافت در شرایط تنش شدید در هر دو رقم این افزایش بیان بسیار بیشتر بود. بیشترین بیان این ژن (۷/۱ برابر نسبت به شاهد) در برگ رقم زاگرس و در تنش شدید این ژن در ریشه رقم تجن (۱/۴ برابر نسبت به شاهد) در تنش متوسط دیده شد که اختلاف معنی‌داری با مقدار بیان آن در ریشه رقم زاگرس در شرایط مشابه در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD نداشت. نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن *PTTa00740* با استفاده از روش Real Time -PCR، تحت شرایط تنش خشکی و تیمار با هورمون آبسیزیک اسید با هدف بررسی القاپذیر بودن این ژن تنش‌های مذکور نشان داد که بیان ژن هدف در پاسخ به تنش خشکی در برگ‌ها افزایش داشت درحالیکه بیان آن در تیمار با آبسیزیک اسید کاهش پیدا کرد (رحمانی، ۱۳۹۲). این نتایج حاکی از نقش احتمالی ژن *PTTa00740* به عنوان یکی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و دخیل در بیوسنتز یا تجزیه فیتوهورمون آبسیزیک اسید است.

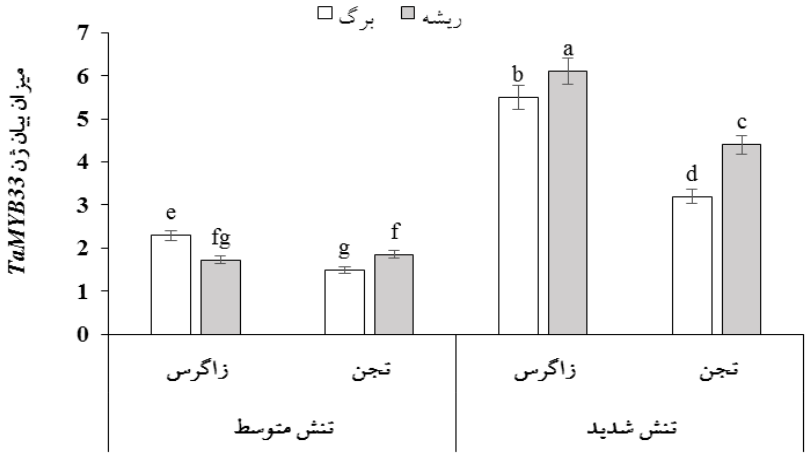
ارزیابی بیان ژن *TaMYB80* نسبت به شاهد نشان داد ریشه رقم زاگرس در تنش شدید بیشترین افزایش بیان (۳/۲ برابر) را نسبت به شاهد داشت و اختلاف آن با سایر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار بود (شکل ۶). افزایش بیان معنی‌دار بیان این ژن در شرایط تنش شدید نسبت به تنش متوسط هم در برگ و هم در ریشه رقم زاگرس قابل مشاهده بود ولی میزان بیان آن در رقم تجن هم در برگ و هم در ریشه در تنش شدید نسبت به تنش متوسط اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD نداشت. در مطابقت با نتایج ما، کیانی قلعه‌نو (۱۳۹۶) گزارش کرده‌اند که بیان این ژن در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری یافت و بین ارقام گندم نیز از نظر میزان بیان این ژن اختلاف وجود داشت.

نتایج ارزیابی بیان ژن *TaMYB33* نشان داد در شرایط تنش خشکی بیان این ژن نسبت به شاهد افزایش یافت و این افزایش بیان در شرایط تنش شدید هم در برگ و هم در ریشه برای هر دو رقم بیشتر بود (شکل ۷). همچنین افزایش بیان این ژن در تنش شدید در ریشه ارقام بیشتر از برگ بود و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD داشتند. مطالعه اخیر صورت گرفته روی خانواده بزرگ *MYB* برای شناسایی ژن‌های جدید مقاوم به تنش خشکی در گندم، *TaMYB33* به عنوان یک عضو جدید از زیر خانواده *R2R3MYB* در گندم کلون و به آرابیدوپسیس ترانسفورم شده و بررسی بیان این ژن تحت تنش خشکی در گیاه آرابیدوپسیس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این کار تأیید نمود که *TaMYB33* یک کاندیدای ژنی مناسب برای دستکاری ژنتیکی گیاه گندم تحت تنش‌های غیرزیستی بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، بیان ژن *TaMYB33* در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت. بنابراین، می توان استنباط کرد که به احتمال زیاد این ژن مرتبط با پاسخ به تنش خشکی در گندم است و مستقل از ژنوتیپ، در پاسخ به تنش خشکی در گندم بیان می‌شود. به عبارت دیگر این ژن به عنوان ژنی که باعث تحمل بیشتر رقم متحمل نسبت به حساس می‌شود، عمل نمی‌کند. در واقع ژن‌های که بیان آنها تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ متحمل تغییر می‌کند، احتمالاً در مسیرهای حفاظتی و تحمل گیاه به خشکی دخالت دارند. در صورتی که ژن‌هایی که در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش بیان نشان می‌دهند را می‌توان تنها پاسخ به تنش در نظر گرفت (Guo *et al.*, 2009). *TaMYB33* بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های غیرزیستی را تغییر می‌دهد. با تجزیه و تحلیل پروموتور *TaMYB33* در آرابیدوپسیس نشان داده شد که موتیف‌های مرتبط به پاسخ به تنش‌های غیرزیستی چون *MYB*، *ABRE* و تکرارهای غنی از TC در ناحیه پروموتور وجود دارد. علاوه بر این توالی‌های حاوی چندین عنصر پاسخ‌دهنده به فیتوهورمون‌ها در پروموتور این ژن وجود داشت. از جمله TGACG و CGTCA به ترتیب عنصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات و عنصر پاسخ‌دهنده به جاسمونیک اسید، GARE عنصر پاسخ‌دهنده به جیبرلیک-اسید و AuxRR-core و

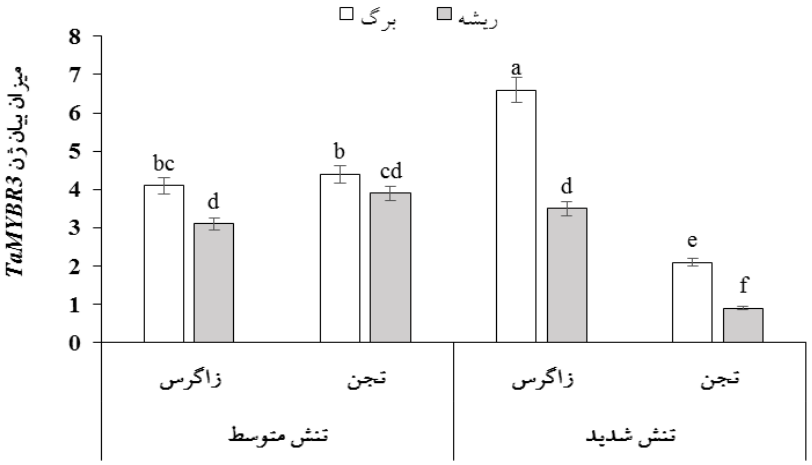
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]



شکل ۶- میزان بیان ژن *TaMYB80* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی



شکل ۷- میزان بیان ژن *TaMYB33* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی



شکل ۸- میزان بیان ژن *TaMYBR3* در بافت‌های ریشه و برگ ارقام گندم نان تحت تنش خشکی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

همچنین عنصر TGA که در پاسخ به هورمون اکسین نقش دارند است (Qin *et al*., 2012).

همانطور که در نتایج بیان ژن *TaMYBR3* مشاهده می‌شود بیشترین بیان این ژن در برگ رقم زاگرس مشاهده شد که افزایش ۶/۶ برابری نسبت به شاهد نشان داد و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (شکل ۸). در رقم زاگرس میزان بیان این ژن در ریشه در هر دو سطح تنش نسبت به شاهد افزایش بیان یافت و اختلاف بین سطح بیان این ژن در هر دو شرایط در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD معنی‌دار نشد. مقدار بیان این ژن در رقم تجن در شرایط خشکی شدید نسبت به خشکی متوسط بیان پایین‌تری داشت به طوریکه در ریشه مقدار بیان آن نسبت به شاهد کمتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD با سایر تیمارها داشت. گزارش شده است ژن *MYBS3* در القای بیان یک سری از ژن‌های سیستم ایمنی گیاه، از جمله *WRKY* (Pandey and Somssich, 2009) ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (دخیل در تنظیم اسیدیته سلول، مقابله با تنش اکسیداتیو و برقرار کننده ارتباطات بین سلولی) و ژن تری لوز فسفاتاز (تولیدکننده قند ذخیره‌ای ترهالوز، برای، حفاظت از آنزیم‌ها پروتئین و غشای پلاسمایی در تنش‌های شوری و خشکی) نقش مهمی دارد (Su *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

بطورکلی نتایج تأیید کرد تقریباً تمامی ژن‌های خانواده *MYB* که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت تحت تنش خشکی افزایش بیان نشان دادند. از طرفی رقم زاگرس که جز ارقام متحمل به تنش خشکی است برای تمامی ژن‌های مورد بررسی افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم تجن داشت. از جمله ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت در برابر استرس‌های محیطی ژن‌های وابسته به خانواده‌های عوامل رونویسی هستند. Yar Hussain و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می‌دهند، خانواده بزرگ MYBها از عوامل رونویسی هستند که در گندم برای سازگاری به تنش خشکی نقش دارند. پروتئین‌های MYB در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند که در تنظیم ژن‌های گیاهی پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی همچون خشکی دخیل هستند (Jiang *et al*., 2004). با توجه به نقش پروتئین‌های مختلف MYB که به عنوان فاکتور رونویسی بررسی بیان ژن‌های این خانواده در شناسایی ارقام متحمل به خشکی می‌تواند راه گشا باشد. سازگاری محصول با استرس‌های غیرزیستی باعث تغییر در بیان تعداد زیادی ژن حفاظت از استرس و تنظیم‌کننده‌های آنها از جمله فاکتورهای رونویسی *MYB* می‌شود، شناسایی ژن‌های جدید از جمله فاکتور رونویسی، تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش خشکی و درک بهتر از نقش کارکردی آنها در انطباق با تنش، اساس راهکارهای مهندسی بهتر را با هدف بهبود تحمل به تنش فراهم می آورد.

منابع

رحمانی، ا. (۱۳۹۲) جداسازی و بررسی بیان یکی از ژن‌های متعلق به خانواده MYB transcription factor در تنش خشکی و تیمار آبسیزیک اسید در دو رقم گندم زراعی کویر و شیراز. وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی.

نعیمی، ط. (۱۳۹۵) بررسی الگوی بیان ژن‌های *NAC* و *MYB* تحت تنش خشکی در ارقام گندم دوروم. وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

کیانی قلعه‌نو، ف. (۱۳۹۶) بررسی الگوی بیان ژن‌های *NAC* و *MYB* تحت تنش خشکی در ارقام پرتوتابی شده گندم. وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

Amiri Deh Ahmadi, S. R., Parsa, M. and Ganjeali, A. (2010) Effects of drought stress on morphological characteristics and yield components in different phenological stages of chickpea (*Cicer arietinum* L.) greenhouse conditions. JAR 8: 166-157.

Amjad, H., Shazia, N., Tahira, I., Hina, S. and Ahsanul, M. (2008) Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. Pakistan Journal Botany 40: 1043-1051.

Chen, R., Ni, Z., Nie, X., Qin, Y., Dong, G. and Sun, Q. (2005) Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science 169: 1146-1154.

Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M. and Shekari, F. (2011) The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms on wheat seedling. Fresenius Environmental Bulletin 20: 2021-2036.

Esfandiari, E., Shekari, F. and Esfndiari, M. (2007) The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 35: 48-56.

Galle, A., Csiszar, J., Tari, I. and Erdei, L. (2002) Changes in water and chlorophyll fluorescence parameters under osmotic stress in wheat cultivars. Acta Biologica Szegediensis 46: 85-86.

Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R. K., Graner, A. and Valkoun, J. (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. Journal of Experimental Botany 60: 3531-3544.

He, Y., Li, W., Lv, J., Jia, Y., Wang, M. and Xia, G. (2011) Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, TaMYB73, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 63: 1511-1522.

Hosseini, S. Z., Ismaili, A. and Sohrabi, S. S. (2018) Evaluation of drought tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under water deficit stress conditions. Plant Genetic Researches 5: 5572 (In Persian).

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.

Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X. and Peterson, T. (2004) Ordered origin of the typical two - and three -repeat Myb, genes.Gene 326: 13-22.

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: 375385.

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.

Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Yur'Eva, N. O., Pchelkin, V. P., Tsydendambaev, V. D., Vereshchagin, A. G., Deryabin, A. N., Trunova, T. I., Los, D. A. and Nosov, A. M. (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the desaturase gene from cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiology 54: 600-606.

Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S. and Sadeghipour, H. (2013) Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. Journal of Plant Molecular Breeding 1: 58-64.

Nakashima, K. (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration-and high-salinity responsive gene expression. Plant Molecular Biology 42: 657-665.

Pandey, S. H. and Somssich, I. (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiology 150: 1648-1655.

Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A. and Saedler, H. (1987) The regulatory clocus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO Journal 6: 3553.

Qin, Y., Wang, M., Tian, Y., He, W., Han, L. and Xia, G. (2012) Over-expression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in Arabidopsis. Molecular Biology Reports 39: 7183-7192.

Rahaie, M., Xue, G. P., Naghavi, M. R. and Alizadeh, H. (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 29: 835-844.

Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. et al. (2000) Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105-2110.

Su, Ch., Wang, Y., Hsieh, T., Lu, Ch., Tseng, T. and Yu, S. (2010) A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. American Society of Plant Biologists 153: 145-158.

Tabaraki, H., Fahmideh, L. and Fooladvan, Z. (2017) Study of MYB gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars. EJBGE 6: 95-104.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. and Provart, N. J. (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS One 2: 718-730.

Xiong, L., Schumaker, K. and Zhu, J. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The Plant Cell 14: 165-183.

Yar Hussain, M., Heydariyan, Z., neazaei, A. and Ramezani, L. (2011) Examined the expression levels of two genes encoding the transcription factors related -MYB family in two varieties of wheat under salt stress. National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. (In Farsi with English abstract).

Zhang, L., Liu, G., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X. and Kong, X. (2014) Characterization of a wheat R2R3-MYB transcription factor gene, TaMYB19, involved in enhanced abiotic stresses in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology 55: 1802-1812.

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]

The effect of drought stress on the expression level of MYB group genes during the early growth stages of two genotypes (Tajne and Zagros) of bread wheat

Saied Nawabpour *, Hoorieh Najafi and Seyed Mojtabi Molai

Plant Breeding and Plant Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
(Received: 25/05/2022, Accepted: 15/11/2022)

Abstract

Drought is one of the most important abiotic stresses that affects the growth and development of plants. Adaptation of the plants to abiotic stresses causes changes in the expression of a large number of defense genes and their regulators, including transcription factors. MYB proteins are a large family of transcription factors that are of particular importance in regulating developmental processes and defense responses in plants. In this study, the expression level of eight MYB transcription factors from bread wheat in Tajen and Zagros cultivars was investigated in response to drought stress. RT-PCR analysis showed that almost all genes of the MYB family, including TC282418, TaMYB80, PTTa00740, TaMYB33, TaMYBR3, were expressed with 2.4, 3.2, 7.1, 6.1, and 6.6 respectively, had an increased expression compared to the control under severe stress in the Zagros genotype that was examined in this research. On the other hand, the Zagros variety, which is one of the drought stress-tolerant varieties, had a higher expression increase than the Tajen variety for all the studied genes.

Keywords: Wheat, Drought stress, Transcription factor, Gene expression, RT-PCR, MYB proteins

Corresponding author, Email: s.navabpour@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.25.5]