مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۱۰۴-۹۵

مطالعه بیان ژن *MYB* رمز کننده عامل رونویسی تحت شرایط تنش خشکی در برخی ارقام گندم نان

Study of *MYB* gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars

حدیث تبارکی[۱]، لیلا فهمیده*[۲]، زیبا فولادوند[۳]

Hadis Tabaraki[1], Leila fahmideh[2*] and Ziba Fooladvand[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی،
۲- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
۳- مربی پژوهشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

1. M.Sc. Student, 2. Assistant Professor, Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
3. Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:
l.fahmideh@uoz.ac.ir or leila.fahmideh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱ - تاریخ پذیرش:۹۶/۵/۱۹)

چکیده

تنش خشکی از جمله مهمترین عوامل کاهش کمی و کیفی محصول در کشت گندم محسوب می-شود. در سال‌های گذشته در راستای مقابله با تنش‌ها به ویژه تنش خشکی، توجه پژوهشگران کشاورزی به شناخت ژن‌های مقاومت در گیاهان و شناخت ساز و کار عمل این ژن‌ها معطوف شده است. دسته بسیار مهمی از ژن‌ها که در فرآیند ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان نقش اساسی ایفا می کنند، ژن‌های کد کننده عوامل رونویسی می‌باشند. در این مطالعه، میزان تظاهر ژن عامل رونویسی *TaMYB73* در برخی ارقام گندم نان (چمران ۲، کلک افغانی، سیستان، ارگ و افق) بعد از اعمال تنش خشکی (پنج سطح: ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد خشکی) با روش Real-time PCR بررسی و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش خشکی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *TaMYB73* و میزان آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در رقم متحمل ارگ بیشتر از ارقام دیگر بود.

واژه‌های کلیدی

**ژن *TaMYB73*،
Real-time PCR،
گایاکول پراکسیداز،
کاتالاز،
ارقام مقاوم و حساس**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*) گیاهی تک لپه و یکساله از تیره غلات، زیر تیره گندمیان و از نظر کروموزومی به سه دسته: دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید تقسیم می‌شود. مهمترین گیاه زراعی است که ۳۱ درصد سطح زیرکشت غلات را به خود اختصاص داده است (Khodabande, 2010). تنش خشکی از عوامل محیطی می‌باشد که تولیدات گیاهان زراعی را در مناطق خشک و نیمه‌خشک تحت تأثیر قرار می‌دهد Allagulova *et al.* (2003). سرمدنیا و کوچکی (۱۹۹۰) بیان کردند که خشکی شایع‌ترین تنش محیطی است که تحت تأثیر آن، میزان تعرق از میزان جذب آب تجاوز می‌کند و میزان آب درون بافت‌ها و سلول‌های گیاهی به شدت کاهش و در نتیجه رشد کم شده و متوقف می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد، ژن‌های *NAM , ATAF, CUC* (*NAC*)در پاسخ به تنش خشکی و شوری بیان می‌شوند و عوامل رونویسی در تنظیم این ژن‌ها نقش دارند (Honghong *et al.* 2006) پروتئین‌های *MYB* (Myeloblastosis)در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی مسئول پاسخ به تنش‌های محیطی شامل سرما، شوری و خشکی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند (Jiangb *et al.* 2004).از مشخصه مهم آنها داشتن یک دامین حفاظت شده اتصال به DNA یعنی دامین *MYB* است. دامین *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 (Martin *et al.* 1997). دامین *MYB* که عامل رونویسی c-MYB پستانداران است به خوبی شناسایی و شامل سه تکرار R1، R2 و R3 می‌باشد (Paz-Ares *et al.* 1987). مشخص شده است که بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در مسیر پیام‌رسانی ناشی از تنش در گیاهان نقش دارند (Rahaie *et al.* 2011). در بین آنها، پروتئین‌های *Bzip* (عوامل اتصال به توالی Abscisic Acid Response Element, ABRE)، (Uno *et al.* 2000) *MYC*، *bHLH*، شبیه به پروتئین‌های *MYC* و *MYB* (Yamaguchi-Shinazaki and Shinozaki, 2005)، 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).

به طور معمول سه آمینواسید تریپتوفان که با فاصله منظم در هر تکرار *MYB* قرار دارند، در خوشه هیدروفوبیکی شرکت می‌کنند که به احتمال زیاد در تشخیص اختصاصی DNA شرکت دارند (Yanhui *et al.* 2006). سوپر خانواده *MYB* یکی از بزرگترین خانواده ژنی متعلق به ژن‌های عامل رونویسی است که در بیشتر گیاهان سبب کنترل تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. تا به حال بیش از ۱۰۰ عضو از این خانواده در آرابیدوپسیس و ۸۰ عضو دیگر در برنج و ۷۸ عضو در ذرت شناسایی شده است (Chen *et al.* 2005). نتایج پژوهش هوشیار دل و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که عوامل رونویسی، نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌های القا کننده مقاومت گیاه به بیماری ساقه سیاه دارد. پژوهش بر روی موتانت‌ها در برنج بیان‌گر این بود که مقاومت به تنش سرما به شدت بسته به بیان ژن *MYBs3* می‌باشد (Su *et al.* 2010). بر اساس گزارش حسین‌یار و همکاران (۲۰۱۱) خانواده بزرگ *MYB* در گندم برای سازگاری به تنش شوری نقش ویژه‌ای دارند. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی بیان ژن‌های عوامل رونویسی (NAC, MYB, WRKY, BHLH, BZIP)در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری، مشاهده کردند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است. از جمله ژن‌های درگیر در تحمل به تنش خشکی ژن *PvLEA-18* که پروتئین LEA (Late Embryogenesis Abundant) را کد می‌کند و متعلق به گروه ۳ از این خانواده ژنی است و بیان این ژن در بافت‌های رویشی در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد Colmenero-Flores et al., (1997). پس از این ژن، ژن *PvNCED* که هورمون ABA را کد می‌کرد، شناسایی شد (Qin et al., 1999). در سطح مولکولی، بسیاری از گروه‌های ژنی را شناسایی کردند که پروتئین های

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

تولیدی این گروه‌ها نقش مهمی در پاسخ به تنش خشکی ایفا می‌کنند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های انتقال سیگنال و دخیل در سازگاری به تنش از قبیل HSP، LEA و پرولین اشاره کرد (Shinozaki et al., 2003). پس از شناسایی ژن‌های تحمل به تنش خشکی، می‌توان آنها را از طریق مهندسی ژنتیک به گیاهان مورد نظر منتقل کرد (Abebe *et al*. 2003). تنش خشکی سبب القای بیان ژن *P5CS* و افزایش سطح پرولین در برگ‌ها و جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی گردید. در بسیاری از ژنوتیپ‌ها، بیان ژن *P5CS* همبستگی بالایی با سطح پرولین مشاهده گردید که این افزایش سبب مقاومت احتمالی در این ژنوتیپ‌ها می‌گردد (Garaghanipur) et al., 2014.

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه و گروهبندی ارقام مورد مطالعه (چمران ۲، کلک افغانی، سیستان، ارگ و افق) از نظر تنش خشکی و بررسی بیان ژن *MYB* در سطوح مختلف تنش خشکی و مقایسه نتایج مولکولی صفات در شرایط تنش خشکی با نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات فیزیولوژی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سطوح خشکی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل پنج رقم گندم نان منطقه سیستان چمران ۲(متحمل)، کلک افغانی (متحمل)، سیستان (حساس)، ارگ (متحمل) و افق (حساس) بود. بذور ارقام مورد مطالعه از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه شد. به منظور کشت گیاه، ابتدا در پتری دیش‌های مربوط به هر رقم یک کاغذ صافی برای حفظ رطوبت بذر قرار داده شد. بذور با فاصله‌ی منظم از هم برای سهولت در جوانه زنی در شرایط نرمال کشت داده شدند. بعد از مشاهده‌ی ریشه‌چه، بذور ریشه‌دار شده به گلدان‌هایی که هر یک به ۵ قسمت مساوی تقسیم شده بود، انتقال و ۳ بذر ریشه‌دار شده از هر رقم در هر گلدان و در عمق ۳ سانتی‌متری از خاک کشت شدند. گلدان‌ها در آزمایشگاه پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تحت شرایط دمایی۲ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ نور) نگهداری و یک روز در میان با آب معمولی مورد آبیاری قرار گرفتند. با استفاده از محاسبات، تعیین مقدار آب در خاک خشک نسبت به ظرفیت مزرعه مشخص و برای تعیین تیمارهای مقادیر آب در هر گلدان، ابتدا مقدار گرم خاک در داخل آون در درجه حرارت ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت، توزین و وزن خاک خشک تعیین شد. سپس خاک خشک شده در گلدانی ریخته شده و به آرامی و تا حد اشباع آب به آن اضافه شد و پس از خارج شدن کامل آب ثقلی گلدان توزین و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری شده در ظرفیت زراعی ۲۵ درصد تعیین و تیمارهای مختلف بر این اساس محاسبه شدند.

سپس در مرحله چهار برگی عملیات تنک انجام شد، سرانجام از هر رقم یک بوته در هر گلدان باقی ماند. اعمال تیمار مورد نظر روی گیاهان ۴۵ روز پس از کشت در مرحله پنجه‌زنی انجام شد. آبیاری تیمارها در ۵ سطح زیر انجام شدند:

سطح اول آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۲۵ درصد، سطح دوم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۲۰ درصد، سطح سوم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۱۵ درصد، سطح چهارم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۱۰ درصد و سطح پنجم آبیاری با درصد ظرفیت زراعی خاک ۵ درصد، نمونه‌برداری از گیاهان ۴۵ روز پس از تنش انجام شد.

طراحی آغازگرها

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاص*TaMYB73* به همراه ژن خانه‌دار *18s* استفاده شد. طراحی این آغازگرها بر اساس انتهای '۳ به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

جدول۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

Table1- Name and sequences of the primers.

Primer	Sequence of primer	PCR Product bp	Annealing °C
F: TaMYB73.FWD1	5'-GGATGGAAACCAGCGACAC	۲۲۹	۶۱/۵
R: TaMYB73.REV1	5'TCTAAATCTGCGACAAACTCTGTATG		
F: 18S.FWD2	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT	۱۵۱	۵۹/۵
R: 18S.REV2	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT		

جدول ۲- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشتی طراحی شده.

Table 2: Reagents and volume for cDNA synthesis reaction by reverse primers

Reagents اجزاء واکنش	Volume حجم مواد
Total RNA (**۱۰۰ نانوگرم**)	**۳ میکرولیتر**
Specific Primer (**۱۰ میکرومولار**)	**۰/۵ میکرولیتر**
dNTP (**۱۰ میلی‌مولار**)	**۰/۵ میکرولیتر**
RTase reaction buffer (10X)	**۱ میکرولیتر**
DTT (۰/۱ میلی‌مولار)	**۱ میکرولیتر**
HYPER Script TM Reverse Trans criptase 200u/µl	**۰/۵ میکرولیتر**
Zym ALL^{TM} RNase inhibitor	**۰/۵ میکرولیتر**
Nuclease free water	**۳ میکرولیتر**

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA با استفاده از کیت Total RNA isolation از گیاه گندم، با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت دنا زیست آسیا استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. از RNA تیمار شده با DNase1 برای ساخت cDNA استفاده شد.

بیان ژن‌ها با روش Real time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen شرکت (Solis BioDyne) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real time PCR set Corbett (3000) بررسی شد. مخلوط واکنش برای هر نمونه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل ۴ میکرولیتر مخلوط EvaGreen، ۱ میکرولیتر آغازگر مستقیم، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی، ۱۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود. طبق برنامه: مرحله واسرشته سازی اولیه: ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۴۰ چرخه، مرحله واسرشته سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی-گراد، مرحله اتصال آغازگر: ۴۵ ثانیه در دمای ۶۱/۹ درجه سانتی-گراد، مرحله تکثیر: ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و منحنی ذوب با افزایش دما از ۵۰ تا ۹۹ درجه هر پنج ثانیه یک درجه بود.

تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت. تجزیه داده‌های دستگاه Real time PCR با نرم افزار SAS ver 9.1 انجام شد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ (Livake and schmittgen, 2001) محاسبه شد.

$\Delta\Delta Ct=$ (نمونه آزمایشی ΔCt - نمونه کنترل ΔCt)

$\Delta Ct=$ (ژن هدف ΔCt - ژن خانه‌دار ΔCt)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

برای هر نمونه سه تکرار برای ژن اختصاصی و سه تکرار برای ژن خانه دار18s House keeping gene در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

استخراج عصارهٔ آنزیمی

جهت استخراج عصاره آنزیمی از بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ استفاده شد. مقدار ۰/۲ گرم بافت سبز برگی با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج عصاره آنزیمی در هاون چینی به طور کامل ساییده شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس فاز رویی با سمپلر جدا شد.

اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز

آنزیم کاتالاز با روش بییر و سایزر (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در ۲/۸ سی‌سی بافرفسفات پتاسیم ریخته و ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی-مولار به آن اضافه و در طول موج ۲۴۰ نانومتر جذب اول و بعد از ۳۰ ثانیه جذب دوم خوانده شد. دستگاه با استفاده از بافر پتاسیم به عنوان محلول استاندارد صفر شد.

اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز

گایاکول پراکسیداز با روش فیلدینگ و هال (۱۹۷۸) اندازه‌گیری شد. ابتدا بافر فسفات پتاسیم با استفاده از گایاکول ۱ درصد در ۱۰۰ سی‌سی بافر فسفات پتاسیم حل شد سپس مقدار ۴۸۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۳ درصد با ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ترکیب شد و در طول موج ۴۷۰ نانومتر جذب اول و بعد از ۳۰ ثانیه جذب دوم خوانده شد. دستگاه با استفاده از بافر پتاسیم به عنوان محلول استاندارد صفر شد.

داده ها و نرم‌افزارها

پس از اندازه‌گیری و به‌دست آوردن داده‌های فیزیولوژیکی و مولکولی، تجزیه واریانس، مقایسه میانگین (با روش LSD) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS نسخه ۹/۱و اکسل انجام شد.

نتایج

با توجه به نقش مهم عوامل رونویسی در تنظیم پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های غیر زنده، لزوم بررسی بیان این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی در گندم نان زراعی اهمیت دارد. بنابراین در این مطالعه بیان ژن *MYB* به همراه میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در پنج رقم گندم نان منطقه سیستان تحت تنش خشکی بررسی شد تا با استفاده از روش‌های مولکولی و بررسی هم‌پوشانی نتایج مولکولی و فیزیولوژیکی بتوان مقایسه و گروهبندی ارقام مورد نظر را در سطوح مختلف تنش خشکی انجام داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌ها و همچنین نتایج تغییرات بیان ژن مورد مطالعه در زیر آورده شده است.

نتایج آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳ آورده شده است. تأثیر رقم در سطح یک درصد بر میزان آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود. با توجه به نمودار شکل۱، رقم ارگ بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۵۰) و رقم افق با مقدار ۰/۲۱ کمترین میزان را به خود اختصاص داد. بیشترین میزان گایاکول پراکسیداز اندازه‌گیری شده را رقم ارگ و افق به ترتیب با مقدار ۰/۱۴ و ۰/۱۳ به خود اختصاص دادند که تفاوت معنی‌داری با رقم کلک افغانی که کمترین میزان گایاکول پراکسیداز را دارا بود (۰/۰۸۳۵)، نشان دادند (شکل۱).

نتایج بررسی بیان ژن

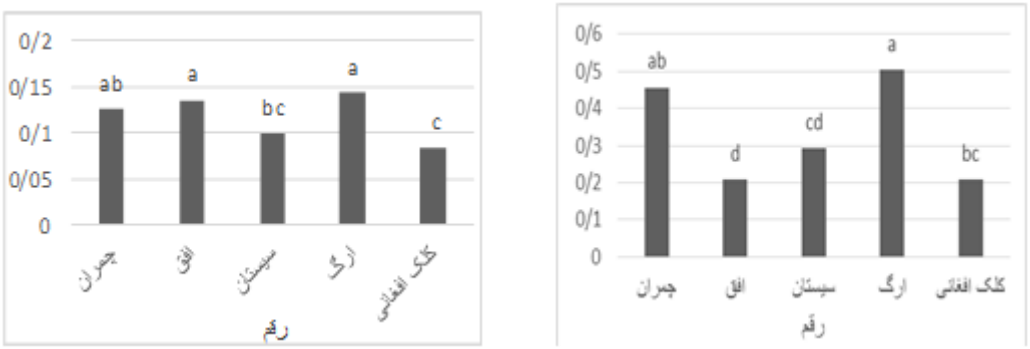
اثر رقم، خشکی و اثر متقابل رقم و خشکی در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). با توجه به جدول ۵، رقم ارگ در سطح خشکی پنج درصد با اختلاف معنی دار نسبت به سایر ارقام مورد مطالعه، بیشترین میزان بیان را نشان داد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

جدول۳- تجزیه واریانس میزان تغییرات فعالیت آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز.

Table 3. Analysis variance of catalase and guaiacol peroxidase change activity enzyme.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) کاتالاز	گایاکول پراکسیداز
بلوک	۲	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۵^{ns}
تنش خشکی	۴	^{ns}۰/۰۰۵۴	۰/۰۰۰۴^{ns}
رقم	۴	۰/۱۷۳**	۰/۰۰۷۷**
برهمکنش تنش و رقم	۱۶	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۰۳^{ns}
خطا	۴۰	۰/۰۲۴	۰/۰۰۱۴
CV	-	۹/۶۸	۱۲/۱۹



شکل ۱- میزان تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (راست) و گـایـاکـول پراکسیداز (چپ) در پنج رقم گندم نان تحت تنش خشکی.

Figure 1. Changes in Catalase (Right) and Guaiacol peroxidase (left) enzymes activity in five bread wheat cultivars under drought stress.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن عامل رونویسی *MYB* ارقـام گنـدم تحت تنش خشکی

Table 4. The results of analysis of variance for transcription factor *MYB* expression in wheat cultivars under drought stress

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) بیان ژنMYB
بلوک	۲	۰/۲۰۵۷۶ ^{ns}
تنش خشکی	۴	۵/۶۳۵۲۸**
رقم	۴	۴/۴۴۳۴۹**
برهمکنش تنش و رقم	۱۶	۷/۸۹۱۱۶**
خطا	۴۰	۰/۰۷۴۳۶
CV	-	۱۸/۶۸

جدول ۵- مقایسه میانگین **بیان** ژن عامل رونویسی *MYB* ارقام گندم تحت تنش خشکی

Table 5. Mean comparison of transcription factor *MYB* expression in wheat cultivars under drought stress

رقم	سطوح خشکی ۲۰	۱۵	۱۰	۵
چمران۲	۱/۰۵^{b}	۰/۰۹۳۳^{c}	۱/۰۸^{b}	۰/۰۰۷۳^{c}
افق	۰/۰۱۶۷^{c}	۰/۰۰۰۱^{c}	۰/۰۰۰۲^{c}	۰/۰۰۶^{c}
سیستان	۱/۴۲۶۷^{b}	۰/۰۰۵۰^{c}	۰/۰۰۰۹^{c}	۰/۰۳۷۷^{c}
ارگ	۰/۰۷۹۶^{c}	۰/۰۲۳۳^{c}	۰/۰۱^{c}	۷/۱۱۲۳^{a}
کلک افغانی	۰/۴۴۶۷^{c}	۰/۰۴۹۸^{c}	۰/۱۷۵۱^{c}	۰/۰۵^{c}

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

بحث

از آنجایی که گندم یکی از محصولات استراتژیک کشت شده در مناطق نیمه‌خشک محسوب می شود، مطالعه ساز و کار مقاومت آن به تنش خشکی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است (Zhang *et al.* 2012). آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز همانند چرخه گلوتاتیون آسکوربات و پراکسی ردوکسین قادرند پراکسید هیدروژن را تجزیه و به آب تبدیل نمایند (Reddy *et al.* 2004). کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم‌ها در این مورد است (Mittler, 2002). این آنزیم پراکسید هیدروژن حاصل از بتااکسیداسیون اسیدهای چرب و افزایش گلی کولات اکسیداز را در پراکسی زوم جمع‌آوری می‌کند (Morita *et al.* 1994). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز در سیتوسول فعالیت داشته و از گلوتاتیون به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند (Dixon *et al.* 1998). افزایش فعالیت این آنزیم به همراه سایر واکنش‌های دفاعی در سیتوسول کمک شایانی به پایداری در این بخش کرده است.

کاتالاز سلول‌ها را از تأثیرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. در شرایط عادی حضور کاتالاز در سلول‌ها، می‌تواند تأثیر مهمی در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو داشته باشد. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل می‌کند (Nayyar and Gupta, 2006;Sairam and Saxena, 2000). تولید گونه‌های فعال اکسیژن از مهمترین عوامل آسیب‌رسان به سیستم‌های فتوسنتزی در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی است. یکی از راه‌های مقابله گیاهان به‌منظور کاهش آثار مخرب گونه‌های اکسیژن فعال، تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدان است که در این میان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن به‌شمار می‌آیند (Sairam and Saxena, 2000; Hong and Ji-Yan, 2007). عناصر ریز مغذی مانند روی در بیان ژن‌های سنتزکننده پروتئین‌ها و آنزیم آنتی اکسیدان مؤثرند و کوفاکتور افزایش فعالیت این آنزیم‌ها محسوب می‌شود (Bagci *et al.* 2007: Grewal and Wiliams, 2000). امیری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ در پژوهشی روی گیاه دارویی زیره سبز اعلام کردند که محلول‌پاشی آهن و روی توأم با تنش خشکی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شد. در این مطالعه میزان آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در رقم متحمل ارگ بیشترین مقدار را نشان داد.

از جمله ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت مؤثر در برابر استرس‌های محیطی ژن‌های وابسته به خانواده عوامل رونویسی هستند. روبیو و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که پروتئین mbc1 که توسط ژن *MYBs3* بیان می‌شود با باند شدن به منطقه‌ای به نام GATA یک غیر فعال‌کننده بیان هورمون جیبرلین در دانه‌های جو می‌شود. در آرابیدوپسیس دو ژن عامل رونویسی از نوع GATA به نام GNC و GNL/CGA1 سبب مهار بیان جیبرلین از طریق افزایش اثر دلا پروتئین می‌شوند (Richter *et al.* 2010). پژوهش بر روی موتانت‌ها در برنج بیان‌گر این بود که مقاومت به تنش سرما به شدت بسته به بیان ژن *MYBs3* می‌باشد (Su *et al.* 2010). در این گیاهان افزایش دلاپروتئین و به طبع آن کاهش میزان جیبرلین سبب بروز مقاومت در برابر تنش سرما می‌شود. در گیاهان رونوشت ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی از جمله خانواده *MYB* به هنگام بروز تنش‌های غیر زنده افزایش می‌یابد. اعضای این خانواده دارای نقش‌های متعددی هستند. به عنوان مثال *AtMYB60* در آرابیدوپسیس در مقابله با تنش خشکی، منجر به بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و یا *OsMYB4* در برنج سبب افزایش ساخت اسمولیت‌ها همچون گلوکز، فروکتوز و پرولین می‌شود. حسین‌یار و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می‌دهند برخی در مواجه با تنش طولانی مدت واکنش نشان می‌دهند و خانواده بزرگ *MYB*ها در گندم برای سازگاری به تنش شوری نقش دارند. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه بیان ژن‌های عوامل رونویسی(NAC, MYB, WRKY, BHLH, BZIP)را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری مورد بحث قرار دادند و مشاهده کردند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است.

در این مطالعه تغییرات بیان ژن *TaMYB73* در شرایط تنش خشکی در پنج رقم گندم نشاندهنده‌ی القای بیان این ژن در

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

سطوح تنش خشکی بود که با پژوهش‌های انجام شده مطابقت دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن *MYB* در سطح خشکی پنج درصد بیشترین مقدار را داشت و در نتیجه با افزایش تنش، بیان ژن هم افزایش داشت. . مطالعات نشان می‌دهد، فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش خشکی و شوری بیان می‌شوند و عوامل رونویسی در تنظیم ژن‌های خشکی نقش دارند (Honghong *et al*. 2006) پروتئین‌های *MYB* در واقع کلاس متنوعی از پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی مسئول پاسخ به تنش‌های محیطی شامل سرما، شوری و خشکی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند Jiangb (*et al*. 2004). در نتیجه رقم ارگ بیشترین و افق کمترین مقدار بیان ژن را دارا بود. طبق پژوهش‌های انجام شده با افزایش تنش خشکی مقدار آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز افزایش پیدا می‌کند و افزایش این نوع از آنزیم‌ها مقاومت گیاه را سبب می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه، بیشترین تغییرات میان فعالیت آنزیم‌های فوق در رقم ارگ مشاهده شد. در نتیجه با توجه به هم پوشانی نتایج مولکولی و فیزیولوژیکی، رقم ارگ به عنوان بهترین رقم تحت شرایط این آزمایش معرفی می‌شود.

منابع

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. Plant Physiology 13: 1748-1755.

Allagulova ChR, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry (Mascow) 68: 945-951.

Amiri Nejad M, Akbari GhA, Baghizadeh A, AllahDadi A, Shahbaz D, Naimi D. 2015. Effect of drought stress and MhlvlPashy iron and zinc on some biochemical traits Cuminum. Journal of Crops 17 (4): 855-866. (In Farsi with English abstract).

Bagci SA, Ekiz H, Yilmaz A, Cakmak I. 2007. Effects of zinc deficiency and water stress on grain yield of field-grown Wheat cultivars in central Anatolia. Agronomy and Crop Science 193(3): 198-206.

Beers GR, Sizer IV. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry 195(1): 133-140.

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

Colmenero-Flores JM, Campos F, Garciarrubio A, Covarrubias AA. 1997. Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. Plant Molecular Biology 35: 393-405.

De Leonardis AM, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo AM. 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.

Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology 1: 258–266.

Fielding JL, Hall J. 1978. A biochemical and cytochemical Study of peroxidase a activity in root Journal of Experimental Botany Bot 29: 98 – 989.

Garaghanipur N, Shiran B, Khodambashie M, Molaie AR. 2014. Study of Proline accumulation and gene expression of P5CS in leaves and flower buds of common bean cultivars under drought stress. Journal of Agricultural Biotechnology 6(4):129-142

Grewal HS, and Wiliams, R. 2000. Zinc nutrition affects alfalfa response to water stress and excessive moisture. Plant Nutrition 23(7): 942- 962.

Hong W, Ji-Yan J. 2007. Effects of zinc deficiency and drought stress on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (Zea mays L.). Agricultural Science in China 6(8): 988-995.

Honghong Hu, Mingqiu Dai, Jialing Yao, Benze Xiao, Xianghua Li, Qifa Zhang, Lizhong Xiongm. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Agricultural Science in China 12987–12992.

Hoshyardel F, Hatami Malki H, Darvishzadeh R, Jafari M. 2015. Study of Expression of transcription factor Associated with Resistance to Black Stem Disease in sSunflower 3(2):78-95.

Jiang C, Gu J, Chopra S, Gu X, Peterson T. 2004. Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

genes.Gene 326:13-22.

Khodabande N. 2010. Cultivation of crops. Tehran University Press. (In Farsi with English abstract).

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2 ΔΔ C (T) Method. Methods 25(4): 402–408. (Zea mays L.). Agricultural Science in China, 6(8): 988-995. (In Farsi with English abstract).

Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H. 1987. The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO Journal 6(12), p.3553.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascarbate specific peroxidases in spinach Chloroplasts. Plant cell physiology 22(5): 867-880.

Novillo F, Alonso JM, Ecker J R, Salinas J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 3985–3990.

Martin C, Paz-Ares MY. 1997. BTranscription factors in plants. TrendsGenetics 13, pp. 67–73.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7:405–410.

Morita S, Tasake M, Fujisawa H, Ushimaru T, Tsuji H. 1994. A cDNA clone encoding a rice catalase isozyme. Plant Physiol 105: 1015-1016.

Qin X, Zeevaart JAD. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. PNAS 96: 15354-15361.

Rahaie M, Xue G-P, Naghavi M R, Alizadeh H, Schenk PM. 2011. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. Iranian Crop Sciences. 13(3): 580-595. (In Farsi with English abstract).

Reddy AR, Chiatanya KV, Vivekanandan M. 2004. Draught induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J Plant Physiol 161(11):1189–1202.

Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B, Rosolowski M, Ammerpohl O. 2012. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. Nature Genetics 44(12):1316-20

Sairam RK, Saxena GC. 2000. Oxidative stress and antioxidant in wheat genotype: Possible mechanism of water stress tolerance. Agronomy and Crop Sciences 184(1): 55-61.

Shinozaki K, Yamagushi-Shinozaki M, Seki M. 2003. Regulatory network of geneexpression in the drought and cold stress responses. Current Opinion Plant Biology 6: 410–417.

Srmdnya Gh, small A. 1990. Crop Physiology. Publications University of Mashhad 467 p. (In Farsi with English abstract).

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 11632–11637.

Xue GP, Bower NI, McIntyre CL, Riding GA, Kazan K, Shorter R. 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. Function Plant Biology 33: 43–57.

Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S. 2006. The MYB transcription factor super family of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant molecular biology 60 (1), pp.107-124

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

Yar Hussain M, Heydariyan z, neazaei A , 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]

Study of *MYB* gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars

Hadis Tabaraki[1], Leila fahmideh[2*] and Ziba Fooladvand[3]

1. M.Sc. Student, 2. Assistant Professor, Department of plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
3. Assistant of Agriculture and Biotechnology Research Institute, university of Zabol. Iran

*Corresponding Author: leila.fahmideh@yahoo.com , l.fahmideh@uoz.ac.ir

Abstract

Drought stress is one of the most important factors reducing wheat quality and quantity. In the past years research on stress, especially drought stress, has focused on plant resistance genes and their mechanism of action. This research has revealed that a majority of the genes that have important roles in biotic and abiotic stress resistence encode transcription factors. In this survey, the level of expression of the *TaMYB73* gene, a gene whose product is involved in transcription in several wheat cultivars (cultivars Chamran2, Afghani calk, Sistan, Arg and Ofogh) was studied under five draught conditions (5, 10, 15, 20 and 25 drought percent) by real-time PCR. Catalase and glycol peroxidase enzyme levels were also measured in drought conditions. The results show that *TaMYB73* gene expression levels and catalase and glycol peroxidase enzyme activity in the Arg cultivar was higher than in the other cultivars. Arg may thus be considered as resistant cultivar.

Key words: *TaMYB73* gene, Real-time PCR, resistant and sensitive cultivars, glycol peroxidase and catalase

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.3.5]