

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

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

مهدي رهابي<sup>۱</sup>، مسعود گماريان<sup>۲</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>۳</sup>، محمد علی ملبوسي<sup>۴</sup> و محمدرضا نقوی<sup>۵</sup>

### چکیده

رهابي، م.، گماريان، ه. علیزاده، م. ع. ملبوسي و م. ر. نقوی. ۱۳۹۰. تجزیه بیان عوامل رونویسی در شرایط تنش شوری بلندمدت در دو ژنوتیپ متحمل و حساس گندم با استفاده از روش نورترن بلاط معکوس. *علوم زراعي ايران*. ۱۳(۳): ۵۹۰-۵۸۰.

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

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

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

۱- استادیار دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: mrahaie@ut.ac.ir)

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

۳- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- استاد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتيك و زیست فناوري

۵- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

تنش‌های غیرزنده دارند (De Leonardis *et al.*, 2007).

بنابراین شناسایی ژن‌های جدید از جمله عوامل رونویسی، تعین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش شوری و درک بهتر از نقش کارکردی آنها در انطباق با تنش، اساس راهکارهای مهندسی بهتر را با هدف بهبود تحمل به تنش فراهم می‌آورد (Rabbani *et al.*, 2003).

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از گیاهان عمده زراعی جهان است و تنش‌های غیرزنده از جمله شوری و خشکی، از مهم‌ترین عوامل محیطی کاهش دهنده عملکرد این گیاه در بسیاری از مناطق محسوب می‌شوند. آزمایش‌های متعددی در خصوص بررسی و شناخت سازوکار پاسخ و تحمل گندم به عوامل نامساعد محیطی از طریق تجزیه الگوی بیان ژن‌های مختلف و از جمله عوامل تنظیم گر انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌ها در مقیاس وسیع در شرایط تنش شوری MYB (Kawaura *et al.*, 2008) و bZIP (Zhang *et al.*, 2009) (Rahaie *et al.*, 2010) و NAC (Xue *et al.*, 2006) در شرایط تنش غیرزنده، مطالعه تفاوت پاسخ ژنتیک‌های متحمل و حساس به تنش‌های غیرزنده سرما (De Leonardis *et al.*, 2007) و شوری (Mott and Wang, 2007) اشاره نمود.

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

## مقدمه

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

پروتئین‌هایی که نقش آنها در فرآیند حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر خسارت تنش به خوبی مشخص شده است عبارتند از: چاپرونها و پروتئین‌های تنظیم اسمزی (Tamura *et al.*, 2003) و کانال‌های یونی (Ward and Schroeder, 1994) که از تنش در گیاهان نقش دارند. در بین آنها، ترنسپورترها (Klein *et al.*, 2004) و پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان و سم زدایی (Bartels, 2001). بیان این پروتئین‌های عملکردی به شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود. مشخص شده است که بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در مسیر پیام‌رانی ناشی از تنش در گیاهان نقش دارند. در بین آنها، پروتئین‌های bZIP (عوامل اتصال به توالی Uno *et al.*, 2000) (Acid Response Element, ABRE MYB، bHLH، MYC و پروتئین‌های Yamaguchi-Shinazaki and Shinozaki, 2005) DREB، WRKY (Mare *et al.*, 2004) و اتصال به عنصر NAC (Novillo *et al.*, 2004) و (Xue *et al.*, 2006)، بارزترین نقش را در پاسخ به

(با حفظ نسبت مولی  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  برابر با ۱۵) به صورت تدریجی و با افزودن روزانه ۵۰ میلی مولار نمک (NaCl) به محلول اعمال گردید و پس از پنج روز غلظت آن به ۲۵۰ میلی مولار رسانده شد. گیاهچه‌ها به مدت ۱۲ روز در شوری ۲۵۰ میلی مولار نگهداری شده و سپس نسبت به جمع‌آوری قسمت‌های هوایی از گیاهان تحت تنش و شاهد بدون تنش اقدام شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، بلا فاصله در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای استخراج RNA در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

#### از زیبایی فنوتیپی

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

#### استخراج داده‌های توالی اختصاصی هر ژن برای تهیه کاوشنگر

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

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

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

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در سال ۱۳۸۷ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی به اجرا گذاشته شد. مواد گیاهی به کار رفته در این آزمایش عبارت بودند از گندم رقم ماهوتی به عنوان رقم متحمل و گندم رقم چینی بهاره به عنوان رقم حساس به شوری (Ghavami *et al.*, 2004). از محیط هیدروپونیک جهت اعمال تیمارهای تنش و کنترل (بدون اعمال تیمار نمک) استفاده شد. پس از کشت اولیه بذرها در ظروف پتری، گیاهچه‌های کوچک به محیط هو گلنده  $X 5/0$  در شرایط کنترل شده نوری (۱۶ ساعت نور در شباهنگ روز)، دمایی (۱۸ و ۲۴°C به ترتیب در شب و روز) و رطوبتی (۶۰ درصد) انتقال داده شده و در روز بعد، غلظت محلول هو گلنده  $X 10$  رسانده شد. گیاهچه‌ها به مدت ۷ روز در این شرایط نگه داشته شده و از روز هفتم، تیمار شوری شروع شد. تیمار شوری

## جدول ۱- EST‌های مورد استفاده در نورترن بلاط معکوس و اسامی اختصاری آنها

Table 1. ESTs in Reverse Northern Blot and their abbreviations

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

خالص‌سازی و تعیین توالی شد و به عنوان کاوشگر جهت آزمون نورترن بلاط معکوس استفاده گردید.

### استخراج RNA و آزمون نورترن بلاط معکوس

استخراج RNA کل از بافت هوایی با استفاده از کیت RNXplus (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل های مربوطه انجام گرفت. تهیه cDNA با استفاده از آغازگرهای dT Oligo و آنزیم Reverse Transcriptase (فرمتاز، ایران)، مطابق با روش توصیه شده در دستورالعمل آنزیم انجام گرفت. نورترن بلاط معکوس بر اساس دستورالعمل کیت dig DNA labeling شده در دستورالعمل آغازگر انجام شد. نورترن بلاط معکوس بر اساس دستورالعمل کیت dig DNA labeling کیت dig RNA labeling شرکت روش (Roche) و با اندکی تغییرات انجام شد. از ژن آلفاتوبولین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

### تجزیه داده‌ها

امتیازدهی به لکه‌ها با استفاده از نرم افزار (ver 1.10) TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd.) TotalLab برای اینکار میانگین تیرگی زمینه بلاط از میزان تیرگی مربوط به هر لکه کسر گردید. پس از آن، کل لکه‌ها بر اساس لکه آلفاتوبولین و با استفاده از نرم افزار، استاندارد (تبديل لگاریتمی؛ Log10) شدند. تجزیه و تحلیل (تجزیه واریانس) داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در دو تکرار و با دو عامل ژنتیک در دو سطح (متحمل و حساس) و محیط در دو سطح (کنترل و شوری ۱۲ روزه)، با

گردید (جدول ۱). برای هر EST یک اسم اختصاری انتخاب شد که در جدول یک ارائه شده‌اند.

### تهیه کاوشگر

به منظور تهیه کاوشگرهای ۵۰۰ جفت بازی (یا بیشتر) مورد نیاز برای آزمایش نورترن بلاط معکوس، در ابتدا گیاهچه‌های پنج روزه تا یک هفته‌ای گندم، تحت تیمار تنفس نمک (۲۵۰ میلی مولار) قرار گرفتند و پس از ۶ یا ۱۲ ساعت نسبت به جمع آوری نمونه‌ها از قسمت هوایی اقدام و بلا فاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در دمای -۸۰°C نگهداری شدند. طراحی آغازگر برای جداسازی قطعات ژنی (EST‌ها)، با استفاده از نرم افزار 3 Primer و با در نظر گرفتن پارامترهای لازم روی EST‌های انتخابی انجام شد. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX plus™ (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل های مربوطه انجام گرفت. رشتہ اول cDNA با استفاده از آغازگرهای MMV Reverse OligodT ۲۰۰ واحد از آنزیم Transcriptase (سیناژن، ایران) مطابق با پروتکل توصیه شده، ساخته شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq پلیمراز (سیناژن، ایران) بر اساس پروتکل بهینه شده در آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام شد. پس از PCR و الکتروفورز محصولات ژن، تک باندهای حاصله از ژل آگاروز جداسازی،

شد، نشان داد که غلظت  $\text{Na}^+$  در رقم ماهوتی به طور معنی داری کمتر از رقم چینی بهاره بود. اگرچه غلظت  $\text{K}^+$  در هر دو ژنوتیپ در شرایط تنفس شوری کاهش یافت، اما رقم ماهوتی سطح کمتری از  $\text{K}^+$  را در مقایسه با چینی بهاره نشان داد. نسبت  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  نیز به طور معنی داری در رقم متتحمل بیشتر از رقم حساس بود. در مجموع، وزن تر و خشک ماهوتی تحت شرایط تنفس بیشتر از رقم چینی بهاره بود (جدول ۲).

#### همدیفی توالی

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

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

#### نتایج

##### تفاوت‌های فنوتیپی

غلظت  $\text{Na}^+$  و  $\text{K}^+$  در ژنوتیپ‌های ماهوتی و چینی بهاره که در همان مرحله استخراج RNA اندازه گیری

جدول ۲- پاسخ فنوتیپی ژنوتیپ‌های متتحمل (ماهوتی) و حساس (چینی بهاره) گندم در تیمار ۲۵۰ میلی مولار نمک  
(a, b t-test  $P < 0.05$ )  
کلرور سدیم

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

ژنوتیپ‌های گندم Wheat genotypes	وزن تر Fresh weight (g)	وزن خشک Dry weight (g)	غلظت بون سدیم			نسبت پاتاسیم به سدیم $\text{K}^+/\text{Na}^+$
			غلظت بون سدیم $\text{Na}^+$ (mmol.gDW <sup>-1</sup> )	غلظت بون پاتاسیم $\text{K}^+$ (mmol.gDW <sup>-1</sup> )		
Mahouti ماهوتی	0.45a	0.061a	3.6986b	0.4231b	0.1143a	
Chinese spring چینی بهاره	0.15b	0.021b	8.6070a	0.4938a	0.0573b	

در اندام‌های هوایی در دو حالت بدون تنفس و تنفس شوری بلند مدت در دو رقم حساس (چینی بهاره) و متتحمل (ماهوتی)، از روش نورترن بلاست معکوس استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه الگوی بیان ژن‌های عوامل رونویسی مختلف در شرایط تنفس در دو رقم چینی بهاره و ماهوتی (به تفکیک هر ژن) در شکل یک نمایش داده شده است. تجزیه داده‌ها نشان داد که میزان بیان تمام عوامل رونویسی در شرایط تنفس در رقم ماهوتی بیشتر از رقم چینی بهاره بود ولی تغییر بیان تنها سه ژن bZIP5، bHLH2 و MYB3 بیشتر از دو برابر حالت شاهد بدون تنفس بود (جدول ۴).

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

#### جزئیات الگوی بیان

به منظور بررسی تغییر بیان ژن‌های عوامل رونویسی

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

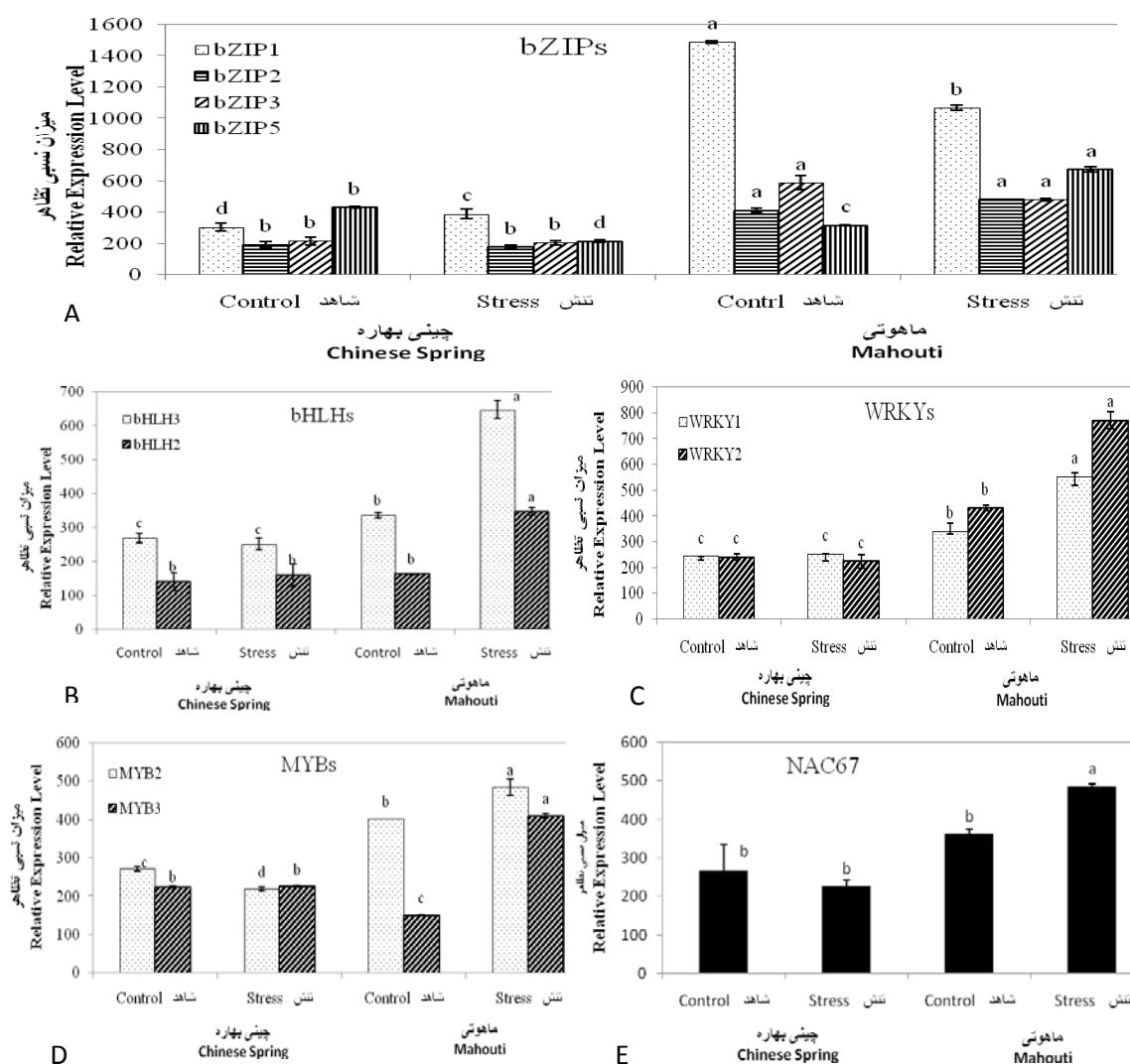
Table 3. The Annotated role of used selected genes in Reverse Northern Blot in stress tolerance or response

نام ژن Gene	نام ژن همولوگ Homologue	نوع فعالیت مرتبط با تنفس Related role in stress	نام گیاه Plant	منبع Reference
bZIP1	<i>TaBFB</i> <i>HY5</i> پا <i>AtbZIP56</i>	1- <i>TaABF</i> mRNA accumulated together with <i>PKABA1</i> mRNA during wheat grain maturation and dormancy acquisition 2- <i>HY5</i> is necessary for response to light and acts as a positive regulator in photomorphogenesis by affecting the expression of downstream genes in response to a light signal	<i>TaABF</i> -۱ به همراه <i>PKABA1</i> در مرحله رسیدگی دانه گندم و خواب بذر، در پدر تجمع می‌یابد. برای پاسخ به نور ضروریست و به عنوان یک تنظیم‌گر مثبت در فتوmorphozنتر باثر بر ژن‌های پایین دست در پاسخ به سیگنال نور عمل می‌کند.	گندم Wheat آرایدوبیسیس Arabidopsis Johnson <i>et al.</i> 2002, Chang <i>et al.</i> , 2008
bZIP2	<i>HBP-1b</i> <i>TGA2</i>	1- <i>HBP-1b</i> in Wheat plant plays a role in regulation of histone genes (H3) transcription. 2- پیان <i>TGA2</i> به عنوان یک عامل رونویسی در آرایدوبیسیس و در پاسخ به پاتوزن افزایش می‌یابد و باعث افزایش و یا جلوگیری از یافتن ژن‌های پایین دست پاسخ به پاتوزن می‌شود	1- در گیاه گندم در تنظیم رونویسی ژن‌های هیستون (H3) نقش دارد 2- پیان <i>TGA2</i> به عنوان یک عامل رونویسی در آرایدوبیسیس و در پاسخ به پاتوزن افزایش می‌یابد و باعث افزایش و یا جلوگیری از یافتن ژن‌های پایین دست پاسخ به پاتوزن می‌شود	گندم Wheat آرایدوبیسیس Arabidopsis Johnson <i>et al.</i> , 2008, Jakoby <i>et al.</i> , 2002
bZIP3	<i>TaOBF1a</i>	This gene is un-regulated in cold and drought stresses specially in leaves and shows a high level of expression during cold stress	میزان یافتن ژن در اثر تنفس سرما و خشکی، بهخصوص در بافت برگ افزایش می‌یابد و با گذشت زمان و در تنفس سرمایی همچنان میزان یافتن آن در سطح بالا باقی می‌ماند	گندم Wheat Kobayashi <i>et al.</i> , 2008
bZIP5	<i>AtbZIP52</i>	It might play a role in vascular development	در فرا آیند نمو آوندی نقش دارند	آرایدوبیسیس Arabidopsis Jakoby <i>et al.</i> , 2002
bHLH2	<i>AtAIB</i>	<i>AtAIB</i> involves in ABA treatment and drought stress response and increases drought tolerance	<i>AtAIB</i> در فرا آیند پاسخ به تیمار ABA و تنفس خشکی دخیل است و باعث افزایش تحمل به خشکی می‌شود	آرایدوبیسیس Arabidopsis Li <i>et al.</i> , 2007
bHLH3	<i>AtAIB</i>	<i>AtAIB</i> involves in ABA treatment and drought stress response and increases drought tolerance	<i>AtAIB</i> در فرا آیند پاسخ به تیمار ABA و تنفس خشکی دخیل است و باعث افزایش تحمل به خشکی می‌شود	آرایدوبیسیس Arabidopsis Li <i>et al.</i> , 2007
WRKY1	<i>AtWRKY75</i>	یافتن ژن <i>AtWRKY75</i> در پاسخ به تیمار (خشکی، مانیپول) در پاسخ به تنفس کمبود فسفر در خاک، افزایش می‌یابد. همچنین یافتن ژن به عنوان تنظیم‌گر مثبت پاسخ‌های دفاعی در برابر عوامل پیماری‌زا عمل می‌کند	یافتن ژن <i>AtWRKY75</i> در پاسخ به تیمار (خشکی، مانیپول) در سرما و سرمه در بافت هوایی و ریشه افزایش، ولی در تنفس گرمایی کاهش می‌یابد. فروانی آن در ریشه و گل پیشر از سایر بافت‌ها است	آرایدوبیسیس Arabidopsis Encinas-Villarejo <i>et al.</i> , 2009
WRKY2	<i>AtWRKY33</i>	<i>AtWRKY33</i> is up-regulated in response to salt, Mannitol (drought) treatment and cold stress in shoot and root but in heat stress is down regulated. The abundance of its transcript in roots and flowers is more than other tissues	یافتن ژن <i>AtWRKY33</i> در پاسخ به تیمار نمک، مانیپول (خشکی)، سرمه در بافت هوایی و ریشه افزایش، ولی در تنفس گرمایی کاهش می‌یابد. فروانی آن در ریشه و گل پیشر از سایر بافت‌ها است	آرایدوبیسیس Arabidopsis Jiang <i>et al.</i> , 2009
MYB2	<i>TaMYB1</i> <i>AtMYB44</i>	1- <i>TaMYB1</i> involves in abiotic stresses responses in wheat. The expression of this gene in oxygen deficiency (flooding), PEG treatment (drought) and salt especially in root increases 2- میزان یافتن ژن <i>AtMYB44</i> در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرمه و ABA و بهخصوص در سلول‌های محافظ روزنه و بافت آوندی افزایش می‌یابد	1- در پاسخ گیاه گندم به تنفس ژن‌های غیرزندۀ دخیل است. میزان یافتن ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی اتلین گلیکول و نمک، بهخصوص در بافت ریشه افزایش می‌یابد 2- میزان یافتن ژن <i>AtMYB44</i> در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرمه و ABA و بهخصوص در سلول‌های محافظ روزنه و بافت آوندی افزایش می‌یابد	گندم Wheat آرایدوبیسیس Arabidopsis Lee <i>et al.</i> 2007, Jung <i>et al.</i> , 2008
MYB3	<i>AtMYB59</i>	نقش این ژن در مسیرهای سیگنالی هورمونی پاسخ به تنفس زنده و پاسخ دفاعی گیاه بر علیه عوامل بیماری‌زا است.	نقش این ژن در مسیرهای سیگنالی هورمونی پاسخ به تنفس زنده و پاسخ دفاعی گیاه بر علیه عوامل بیماری‌زا است.	آرایدوبیسیس Arabidopsis Libault <i>et al.</i> , 2007
NAC67	<i>TaNAC69</i> <i>AtNAC2</i>	1- Involved in response to drought, cold and ABA treatments in Wheat. It is up-regulated during mentioned stresses in root and leaves (it has an unknown role in cold stress) 2- دخیل در پاسخ به تنفس شوری، تیمار هورمون‌های ABA، ACC و NAA در آرایدوبیسیس	1- دخیل در پاسخ به تنفس خشکی، سرمه و تیمار ABA در گندم. در بافت برگ و ریشه (تیمار سرمه نامشخص) و در پاسخ به تیمارهای ذکر شده افزایش می‌یابد 2- دخیل در پاسخ به تنفس شوری، تیمار هورمون‌های ABA، ACC و NAA در آرایدوبیسیس	گندم Wheat آرایدوبیسیس Arabidopsis Xue <i>et al.</i> , 2006, He <i>et al.</i> , 2005

رقم ماهوتی کاهش بیان داشت. ژن های bZIP2 و bZIP3 تحت تأثیر تنش قرار نگرفته و بنابراین میزان بیان آنها در شرایط تنش در دو رقم نسبت به حالت کنترل، تغییری نداشت. در ارتباط با ژن bZIP5، در تنش شوری، میزان بیان آن در رقم چینی بهاره کاهش و در رقم ماهوتی افزایش یافت. یعنی این ژن بر عکس bZIP1 عمل کرد (جدول ۴).

## خانواده bZIP

در این آزمایش، چهار ژن خانواده bZIP به عنوان کاندیدا در پاسخ به تنش مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه بیان این ژن ها در شرایط شاهد و تنش در دو رقم در شکل A-1 نشان داده شده است. محاسبه میزان بیان ژن های bZIP داد که ژن bZIP1 در زمان تنش در رقم چینی بهاره افزایش و بر عکس در



شکل ۱- بیان ژن های عوامل رونویسی از خانواده های (A) bZIP، (B) bHLHs، (C) WRKY، (D) MYB، (E) NAC67 در اندام هوایی ژنتیپ های گندم (ماهوتی و چینی بهاره) در پاسخ به تنش شوری بلندمدت. اعداد روی محور عمودی داده های اصلی هستند (بدون تغییر لگاریتمی)

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

## ژن در رقم ماهوتی و در تیمار تنفس افزایش یافت (شکل ۱-E).

به منظور شناسایی عوامل رونویسی که به طور معنی داری در دو ژنو تیپ متتحمل و حساس تفاوت بیان دارند، دو معیار شامل بیش از دو برابر افزایش بیان و  $P=0.05$  به طور توان در نظر گرفته شدند. این معیار برای هر دو ژنو تیپ ماهوتی و چینی بهاره به منظور شناسایی ژن هایی که پاسخ معنی داری به تیمار شوری می دهند مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس این معیار، سه ژن شامل bZIP5 (۲/۱۳۹۱ برابر)، bHLH2 (۲/۷۲۳۱ برابر) و MYB3 (۲/۱۳۵۱ برابر) در رقم ماهوتی و در شرایط تنفس، افزایش بیان داشتند، اما هیچ ژنی از لحاظ آماری در رقم چینی بهاره افزایش بیان نداشت (جدول ۴ و شکل ۲).

گروه بندی و تعیین پروفایل بیان ژن ها بر اساس نسبت های بیان در شرایط تنفس به غیر تنفس با استفاده از روش سلسله مراتبی، آنها را به دو گروه مجزا تقسیم بندی نمود (شکل ۳). گروه اول شامل دو ژن bZIP1 و bZIP3 بود و گروه دوم بقیه ژن ها را شامل شد.

آزمون تبدیل پذیری با هدف تعیین مهم ترین ژن افزایش و یا کاهش بیان یافته در زمان تنفس نشان داد که به ترتیب در دو رقم ماهوتی و چینی بهاره و در زمان تنفس، MYB3 و bZIP1 مهم ترین ژن های افزایش بیان یافته و bZIP1 و bZIP5 مهم ترین ژن های کاهش بیان یافته بودند.

## بحث

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

## bHLH

نتایج حاصل از نورترن بلاست معکوس نشان داد که دو عضو انتخابی این خانواده، یعنی bHLH2 و bHLH3 در پاسخ به تنفس تنها در رقم ماهوتی افزایش بیان داشته اند و تغییری در سطح بیان این فطعات ژنی، در رقم چینی بهاره و در پاسخ به تیمار تنفس به وجود نیامد. مفهوم این موضوع این است که این ژن ها تنها در رقم متتحمل بیان شده و به عنوان بخشی از ژن هایی که باعث تحمل بیشتر رقم متتحمل نسبت به حساس می شوند، عمل می نمایند. تفاوت الگوی بیان این دو ژن در شرایط بدون تنفس و تنفس در دو رقم در شکل ۱-B نشان داده شده است.

## WRKY

همان طور که در شکل ۱-C نشان داده شده، بیان هر دو عضو انتخابی این خانواده (WRKY1 و WRKY2) تنها در رقم ماهوتی و در پاسخ به تنفس افزایش یافت. نتایج بدست آمده نشان داد که اعمال تنفس شوری در رقم چینی بهاره، تأثیری بر سطح بیان این دو ژن نداشته و نسبت به شرایط غیر تنفس ثابت باقی ماند، بنابراین می توان نتیجه گرفت که این ژن ها منحصرآ در رقم متتحمل بیان شده و باعث افزایش تحمل رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره می شوند.

## MYB

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

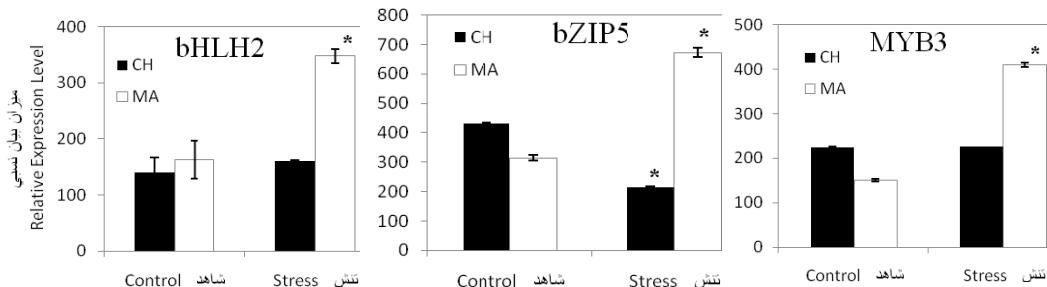
## NAC

در این آزمایش ژن NAC67 مورد تجزیه و تحلیل پروفیل بیان قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان این

جدول ۴- میزان بیان نسبی ژن‌ها در شرایط تنش نسبت به غیر تنش در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره. MN: رقم ماهوتی در شرایط غیر تنش، MS: رقم ماهوتی در شرایط تنش، CHN: رقم چینی بهاره در شرایط غیر تنش، CHS: رقم چینی بهاره در شرایط تنش. یک = عدم تغییر،  $>1$  = افزایش بیان و  $<1$  = کاهش بیان

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

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

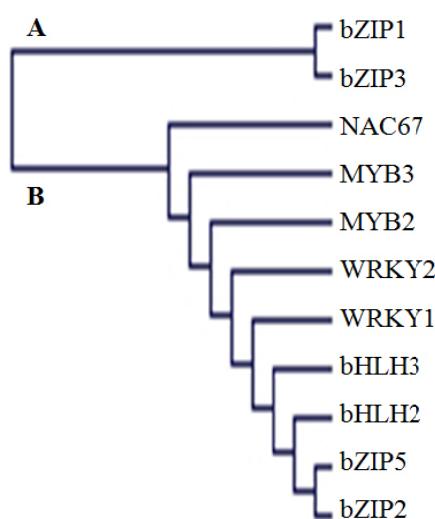


شکل ۲- سه ژن bHLH2، bZIP5 و MYB3 که در اندام هوایی ژنتیپ‌های گندم و در پاسخ به تنفس شوری به طور متفاوت بیان می‌شوند. \* تفاوت بین شاهد و تنفس شوری بلند مدت ( $P < 0.05$ ) (اعداد روی محور عمودی، اعداد اصلی هستند)

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

ماهوتی کاهش بیان داشت. تجزیه توالی این قطعه ژنی با استفاده از BLASTX نشان داد که از لحاظ توالی با دو ژن *TaABF* از گندم ( $E\text{ Value}=6e^{-5}$ ) و *HY5* یا ژن *AtbZIP56* ( $E\text{ Value}=1e^{-20}$ ) از گیاه‌آراییدوپسیس مشابهت دارد. نتایج سایر آزمایشات نشان داده‌اند که *TaABF* به همراه *PKABA1* (یک پروتئین کیناز القاء شونده به وسیله ABA) در حین رسیدگی گندم و

گروه متنوعی از عوامل رونویسی در گیاهان هستند که با داشتن یک ناحیه اتصال به DNA و یک موتیف با ساختار زیپ لوسینی، تنظیم فرآیندهای متنوعی از جمله پاسخ به تنفس زنده و غیرزنده و رسیدگی بذر و نمو گل را بر عهده دارند (Jakoby *et al.* 2002). از دو عضوی که تغییر بیان داشتند یکی bZIP1 بود که در پاسخ به تنفس شوری در رقم چینی بهاره افزایش و در رقم



شکل ۳- گروه‌بندی سلسله مراتبی یازده ژن بر اساس الگوی بیان آنها. حروف A و B روی خوش‌های ژنی دارای الگوی بیان مشابه را نشان می‌دهند

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

آرابیدوپسیس، در تنظیم فرآیند پیامرسانی ABA نقش داشته و در پاسخ به تیمار ABA و تنش خشکی دخیل و باعث افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود ( Li *et al.*, 2007 ). بنابراین، با توجه به شباهت زیاد bHLH3 با این ژن ( $E\text{ Value}=2e^{-51}$ ) و نتایج حاصله از بررسی نورترن بلات معکوس مبنی بر افزایش بیان آن، این افزایش بیان می‌تواند گویای نقش آن در پاسخ به تنش غیرزنده در گندم باشد.

در این تحقیق دو عضو خانواده MYB ( MYB2 و MYB3 ) در گندم رقم ماهوتی و در پاسخ به تنش افزایش بیان داشتند، ولی در رقم چینی بهاره تنها MYB2 کاهش بیان را نشان داد. تجزیه توالی و نتایج BLASTX و GO نشان داد که MYB2 در واقع قسمتی از ژن *TaMYB1* ( $E\text{ Value}=6e^{-155}$ ) است. نتایج مطالعات قبلی نشان داده اند که *TaMYB1* در پاسخ گندم به تنش‌های غیرزنده دخیل است. میزان بیان این ژن در شرایط کمبود اکسیژن (غرقابی)، تیمار پلی‌اتیلن گلیکول (خشکی) و شوری بهخصوص در بافت ریشه افزایش می‌یابد. همچنین میزان رونوشت این ژن در زمان شروع تیمار گیاه با ABA و پلی‌اتیلن گلیکول به کندی افزایش می‌یابد ( Lee *et al.*, 2007 ). در آزمایشی که توسط مات و ونگ ( Mott and Wang, 2007 ) در ارتباط با تغییر ترانسکرپتوم ارقام متحمل گندم در شرایط تنش شوری بلند مدت با استفاده از ریزآرایه انجام گرفت، مشخص شد که *TaMYB1* از جمله ژن‌هایی بود که افزایش بیان داشتند و میزان این افزایش ۳۴ برابر بیشتر از حالت شاهد ( بدون تنش ) بود. لازم به ذکر است که این ژن روی گروه همولوگ L6 قرار دارد. تجزیه عملکرد همولوگ این ژن ( MYB2 ) در گیاه آرابیدوپسیس یعنی *AtMYB44* ( $Value=1e^{-59}$ ) نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در آرابیدوپسیس در پاسخ به تیمارهای خشکی، شوری، سرما و ABA و بهخصوص در سلولهای محافظت روزنه و بافت آوندی افزایش می‌یابد. همچنین گیاهان ترازیخته حاصل از آن،

خواب بذر، در بذر تجمع یافته و میزان این عامل رونویسی در شروع خواب، به طور موقت افزایش می‌یابد. اما بر خلاف *PKABA1*، *TaABF* به طور اختصاصی در بذر بیان می‌شود و در پاسخ به تنش یا تیمار ABA در بافت‌های رویشی افزایش نمی‌یابد ( Johnson *et al.*, 2002 ). اما نقش همولوگ آن در آرابیدوپسیس یعنی *HY5* که از زیرگروه H خانواده bZIP‌ها می‌باشد ( Jakoby *et al.*, 2002 ) و تشابه بیشتری نیز با آن دارد، تنظیم مورفوژنز در پاسخ به نور است. وجود این ژن برای پاسخ به نور ضروری است و به عنوان یک تنظیم گر مثبت در فتومورفوژنز، با اثر برابر ژن‌های پایین‌دست در پاسخ به پیام نور، عمل می‌کند. این عامل رونویسی اثر نور و مسیرهای هورمونی را با هم تلفیق می‌کند. در غیاب این عامل رونویسی، بیان صدھا ژن به وسیله نور UV-B و آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد ( Chang *et al.*, 2008 ). *bZIP5* ( *TaMYB1* ) شونده به وسیله تنش شوری در رقم متحمل بود. این ژن مشابه ژن *AtMYB52* است ( $E\text{ value}=2e^{-12}$ ) ( Jakoby *et al.*, 2002 ). ژن، توسعه سیستم آوندی است ( Jakoby *et al.*, 2002 ). خانواده bHLH، گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که با دارا بودن ناحیه bHLH قابل تشخیص بوده و در گیاهان عملکردهای متفاوتی شامل بیوسنتز آنتوسبیانین ها، فرآیند سیگنالی فیتوکروم، تشکیل میوه، نمو نهنج و اپیدرم و همچنین پاسخ به تنش را بر عهده دارند ( Li *et al.*, 2007 ). در آزمایش حاضر از خانواده bHLH دو عضو انتخاب شد که هر دو در پاسخ به تنش شوری و در گندم رقم ماهوتی، افزایش بیان داشتند. در تعیین همولوژی توالی و تعیین پروتئین همولوگ در بانک اطلاعاتی آرابیدوپسیس و گندم با استفاده از *BLASTX*، مشخص شد که ژن ۹۴ bHLH در گندم با *E* Value بسیار پایین ( $1e^{-85}$  برای *bHLH2* و  $5e^{-102}$  برای *bHLH3*) می‌تواند به عنوان همولوگ آنها در نظر گرفته شود. همچنین عضو همولوگ دیگر برای *bHLH3* و در گیاه آرابیدوپسیس، ژن *ATAIB* در *AtAIB* می‌باشد.

ژن می‌تواند کاندیدای مناسبی برای معرفی به عنوان ژن تحمل به تنش شوری باشد، هرچند که کسب اطمینان بیشتر در این خصوص، مستلزم تجزیه عملکرد، از طریق انتقال این ژن و یا استفاده از سازوکارهای خاموش کردن ژن است. مقایسه نسبت بیان ژن‌ها در شرایط تنش به غیر تنش بین رقم ماهوتی و چینی بهاره (جدول ۴) نشان داد که میزان بیان تمام ژن‌ها به جز bZIP1 و bZIP3 در شرایط تنش در رقم ماهوتی بیشتر از رقم چینی بهاره بوده است و احتمالاً تحمل بیشتر رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره به تنش نیز به همین علت می‌تواند باشد، هر چند که میزان این تغییر بین ۱ تا ۲ برابر حالت شاهد بوده است.

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

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

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

مقاومت بیشتری به تنش‌های ذکر شده نشان دادند (Jung et al., 2008). آزمون همولوژی بر MYB3 که در MYB R2R3 است، نشان داد که همولوژی مناسبی بین این قطعه ژنی و ژن‌های AtMYB59 در آرابیدوپسیس (E value=4e<sup>-60</sup>) وجود دارد. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که بیان AtMYB59 در پاسخ به فیتوهورمون‌های SA، JA و اتیلن، به خصوص در بافت برگ و ساقه افزایش می‌یابد، ولی میزان بیان آن در ریشه و گل آذین کمتر است و این به مفهوم نقش این ژن در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی پاسخ به تنش‌های زنده و پاسخ دفاعی گیاه بر علیه عوامل بیماریزا است (Libault et al., 2007).

در خصوص تفاوت دو رقم متتحمل و حساس در سطح رونوشت و میزان آن، همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، تعداد ژنهایی که میزان بیان آنها در شرایط تنش نسبت به حالت شاهد کاهش یافته است، در گندم رقم ماهوتی (bZIP3 و bZIP1) کمتر از رقم چینی بهاره (bZIP2، bZIP5، bZIP3، bHLH3، bHLH2، WRKY2، MYB2 و NAC67) بوده است. همچنین تنها بیان سه ژن bZIP5، bZIP2 و MYB3 در شرایط تنش در رقم ماهوتی، بیش از دو برابر حالت شاهد بدون تنش بوده است و در واقع، این ژن‌ها را می‌توان به عنوان ژن‌های افزایش بیان یافته واقعی معرفی نمود. در مقایسه نسبت بیان ژن‌های مطالعه شده در شرایط تنش به غیر تنش در رقم ماهوتی نسبت به چینی بهاره (جدول ۴)، bZIP5 بیشترین میزان (۴۳۱۲۷) را به خود اختصاص داد. نتایج همچنین نشان داد که بیان این ژن فقط در رقم ماهوتی افزایش می‌یابد و علاوه بر اینکه میزان بیان آن در شرایط تنش در رقم ماهوتی به بیش از دو برابر حالت شاهد می‌رسد، میزان بیان آن در شرایط تنش نیز بسیار شدیدتر از رقم چینی بهاره است (۳/۱۳۹۷). با توجه به اینکه تجزیه آماری داده‌ها نیز وجود تفاوت آماری زیادی بین تیمار شاهد (c) و تنش (a) در ارتباط با این ژن نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که این

برای تجزیه عملکرد بیشتر در شرایط تنفس مورد  
توجه قرار گیرد.

پاسخ کوتاه‌مدت گیاه ذکر کرده‌اند، می‌باشد.  
همچنین مشخص شد که در آینده، یکی از ژن‌های  
مورد مطالعه (bZIP5) می‌تواند کاندیدای مناسبی

## References

## منابع مورد استفاده

- Bartels, D. 2001.** Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 284–286.
- Chang, C-S. J., Y-H. Li, L-T. Chen, W-C. Chen, W-P. Hsieh, J. Shin, W-N. Jane, S-J. Chou, G. Choi, J-M. Hu, S. Somerville and S-H. Wu. 2008.** *LZFL*, a *HY5*-regulated transcriptional factor, functions in *Arabidopsis* de-etiolation. *Plant J.* 54: 205–219.
- De Leonardis, A. M., D. Marone, E. Mazzucotelli, F. Neffar, F. Rizza, N. Di Fonzo, L. Cattivelli, A. and M. Mastrangelo. 2007.** Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Sci.* 172: 1005–1016.
- Encinas-Villarejo, S., A. M. Maldonado, F. Amil-Ruiz, B. d. I. Santos, F. Romero, F. Pliego-Alfaro, J. M. oz-Blanco and J. L. Caballero. 2009.** Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria ananassa*) *FaWRKYI* and *Arabidopsis AtWRKY75* proteins in resistance. *J. Exp. Bot.* 60(11): 3043–3065.
- Ghavami, F., M. A. Malboobi, M. R. Ghannadha, B. Yazdi Samadi, J. Mozaffari and J. Aghaiee. 2004.** The study of Iranian tolerant wheat varieties response to salinity stress in germination and seedling stage. *Iran. J. of Agric.* 35: 453–464. (In Persian with English abstract).
- He, X-J., R-L. Mu, W-H. Cao, Z-G. Zhang, J-S. Zhang and S-Y. Chen. 2005.** *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* 44: 903–916.
- Jakoby, M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. Vicente-Carabajosa, J. Tiedemann, T. Koj and F. Parcy. 2002.** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7: 106–111.
- Jiang, Y. and M. K. Deyholos. 2009.** Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible *WRKY25* and *WRKY33* transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* 69: 91–105.
- Johnson, C., A. Mhatre and J. Arias. 2008.** *NPR1* preferentially binds to the DNA-inactive form of *Arabidopsis* TGA2. *Biochimica Biophysica Acta*, 1779: 583–589.
- Johnson, R. R., R. L. Wagner, S. D. Verhey and M. K. Walker-Simmons. 2002.** The abscisic acid-responsive kinase *PKABA1* interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, *TaABF*, and phosphorylates *TaABF* peptide sequences. *Plant Physiol.* 130: 837–846.
- Jung, C., J. S. Seo, S. W. Han, Y. J. Koo, C. H. Kim, S. I. Song, B. H. Nahm, Y. D. Choi and J-J. Cheong. 2008.** Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 623–635.

- Kawaura, K., K. Mochida and Y. Ogihara.** 2008. Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Func. Integr. Genomics*, 8: 277–86.
- Klein, M., M. Geisler, S.J. Suh, H.U. Kolukisaoglu, L. Azevedo, S. Plaza, M. D. Curtis, A. Richter, B. Weder, B. Schulz and E. Martinoia.** 2004. Disruption of *AtMRP4*, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J.* 39: 219–236.
- Kobayashi, F., E. Maeta, A. Terashima, K. Kawaura, Y. Ogihara and S. Takumi.** 2008. Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat. *J. Exp. Bot.* 59(4): 891–905.
- Lee, T. G., C. S. Janga, J. Y. Kima, D. S. Kimb, J. H. Parka, D. Y. Kima and Y. W. Seo.** 2007. A Myb transcription factor (*TaMyb1*) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 129: 375–385.
- Li, H., J. Sun, Y. Xu, H. Jiang, X. Wu and C. Li.** 2007. The bHLH-type transcription factor *AtAIB* positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 65: 655–665.
- Libault, M., J. Wan, T. Czechowski, M. Udvardi and G. Stacey.** 2007. Identification of 118 arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 900–911.
- Mare, C., E. Mazzucotelli, C. Crosatti, E. Francia, A. M. Stanca and L. Cattivelli.** 2004. *HvWRKY38*: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. *Plant Mol. Biol.* 55: 399–416.
- Mott, I. W. and R. R. C. Wang.** 2007. Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Sci.* 173: 327–339.
- Munns, R. and R. A. James.** 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid Wheat. *Plant Soil.* 253: 201–218.
- Novillo, F., J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. Salinas,** 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 3985–3990.
- Rabbani, M. A., K. Maruyama, H. Abe, M. Ayub Khan, K. Katsura, Y. Ito, K. Yoshiwara, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA Gel-Blot analyses. *Plant Physiol.* 133: 1755–1767.
- Rahaie, M., G-P. Xue, M. R. Naghavi, H. Alizadeh and P. M. Schenk.** 2010. A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes. *Plant Cell Rep.* 29(8): 835–44.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush.** 2003. TM4: a free, open-source system for

- microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2): 374–8.
- Tamura, T., K. Hara, Y. Yamaguchi, N. Koizumi and H. Sano. 2003. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131: 454–462.
- Uno, Y., T. Furihata, H. Abe, R. Yoshida, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000.** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97: 11632–11637.
- Ward, J. M. and J. I. Schroeder. 1994.**  $\text{Ca}^{2+}$ -activated vacuolar  $\text{K}^+$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by slow vacuolar channels implicated in stomatal closing. *Plant Cell*, 6: 669–683.
- Xue, G. P., N. I. Bower, C. L. McIntyre, G. A. Riding, K. Kazan and R. Shorter. 2006.** *TaNAC69* from the NAC super family of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences. *Func. Plant Biol.* 33: 43–57.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki, 2005.** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10: 88–94.
- Zhang, Yi, G. Zhang, N. Xia, X-J. Wang, L-L. Huang and Z-S. Kang. 2009.** Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73: 88–94.

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

**Rahaie, M.<sup>1</sup>, M. Gomarian<sup>2</sup>, H. Alizadeh<sup>3</sup>, M. A. Malboobi<sup>4</sup>, M. R. Naghavi<sup>5</sup>**

### ABSTRACT

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

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

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

---

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

1- Assistant Prof., University of Tehran, Tehran, Iran  
(Corresponding author) (Email: mrahaie@ut.ac.ir)

2- Assistant Prof., Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

3- Assistant Prof., Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran

4- Prof., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

5- Prof., Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran