فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۱، شماره ۲، صفحات ۲۳ – ۱۱
(تابستان ۱۳۹۴)

بیان عوامل نسخه‌برداری *MYB3R-2*، *ZFP252* و *AP37* و طول ریشه در برنج تحت تنش خشکی

مریم اکبرپور
دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی
واحد علوم و تحقیقات
دانشگاه آزاد اسلامی
تهران، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
art635@yahoo.com

رمضانعلی خاوری‌نژاد*
استاد گروه زیست‌شناسی
واحد علوم و تحقیقات
دانشگاه آزاد اسلامی
تهران، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
ra.khavarinejad@gmail.com
* مسول مکاتبات

علی مومنی
دانشیار مرکز تحقیقات برنج کشور
آمل، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
amoumeni@areo.ir

فرزانه نجفی
استادیار گروه علوم گیاهی
دانشکده علوم زیستی
دانشگاه خوارزمی
تهران، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
f_najafi@yahoo.com

چکیده برنج از مهمترین غلات کشورهای آسیایی است. به دلیل محدودیت آب استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم به کم آبی و مطالعه سازوکارهای تحمل به خشکی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در این پژوهش سه رقم برنج ایرانی ندا، آمل۳ و سنگ طارم تحت سه تیمار شاهد با سطح آبیاری مطلوب، مقدار آب قابل تبخیر خاک برابر با ۱، ۰/۵ (تنش ملایم) و ۰/۲ (تنش شدید) در شرایط گلخانه پرورش یافتند. طول ریشه و سطح بیان ژن برخی از عوامل رونویسی شامل *MYB3R-2*, *ZFP252* و *AP37* در مرحله رشد رویشی به روش ریل–تایم پی سی آر کمی در این ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. طول ریشه در رقم ندا افزایش معنی‌داری در مقایسه با رقم سنگ طارم در تنش خشکی ملایم و شدید نشان داد اما بین ارقام ندا و آمل ۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تنش خشکی ملایم در رقم ندا افزایش کمتر و معنی داری در سطح بیان *AP37* , *ZFP252* و *MYB3R-2* در مقایسه با رقم سنگ طارم و همچنین افزایش معنی‌دار کمتری در سطح بیان *ZFP252* و *AP37* در مقایسه با رقم آمل ۳ مشاهده شد. در وضعیت تنش شدید، رقم ندا افزایش کمتر و معنی‌داری در سطح بیان هر سه عامل نسخه‌برداری در مقایسه با رقم سنگ طارم نشان داد. بنابراین، رقم ندا احتمالاً به دلیل طول ریشه بیشتر در شرایط تنش خشکی رقم متحمل تر و کاندیدی جهت انتخاب علیه تنش خشکی است اما سازوکارهای مختلفی در واکنش به خشکی در سطح بیان ژن‌های پاسخ دهنده به این تنش در ارقام مختلف وجود دارد.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۳**
تاریخ دریافت: **۹۴/۰۲/۲۵**
تاریخ پذیرش: **۹۴/۰۵/۰۴**

واژه‌های کلیدی:
- **رطوبت خاک**
- **آب قابل تبخیر خاک**
- **رقم سنگ–طارم**
- **رقم آمل۳**
- **رقم ندا**

مقدمه در ایران برنج، پس از گندم دومین محصول زراعی غذایی است که در بیش از ۶۰۰ هزار هکتار از اراضی کشاورزی کشت می‌شود.[۶] خشکی و کمبود آب دو محدودیت غیرزیستی مهم در تولید برنج در ایران می باشند. تقریباً همه اراضی زیر کشت برنج در ایران تحت آبیاری قرار دارند و بیشتر ارقام برنج معطر و دارای کیفیت پخت عالی، به تنش خشکی حساس هستند، بنابراین کمبود آب شدیداً بر تولید برنج در کشور تأثیرگذار است.[۱۹] کمبود آب می‌تواند تولید برنج را ۱۳-۳۵٪ در اراضی در معرض خشکی کاهش دهد.[۳] برای افزایش کارایی استفاده از آب، برنامه‌هایی جهت بهبود مدیریت آبیاری در ایران انجام شده است اما اخیراً تلاش‌هایی نیز برای ارتقای ژنتیکی به منظور تحمل به خشکی در برنج ایرانی صورت گرفته است[۱۵].

مطالعات زیادی برای مشخص شدن سازوکارهای تحمل گیاهان به خشکی انجام گرفته است. گیاهان در برخورد با خشکی از سازوکارهای مختلفی مانند فرار از خشکی، اجتناب از خشکی و تنظیم اسمزی و نیز مقاومت به خشکی استفاده می‌کنند.[۲۳] برنج زمانی که در معرض تنش آبی واقع شود، به طور عمده رفتارهایی مشابه به اجتناب از خشکی از جمله رشد مداوم ریشه‌ها برای افزایش جذب آب[۷] و نیز انتقال علامت به بخش هوایی جهت تنظیم نرخ رشد و سازگاری به شرایط تنشی موجود اتخاذ می‌کند[۲۶]. بررسی‌ها در زمینه سازوکارهای تحمل تنش خشکی در گیاهان زراعی به نقش شبکه پیچیده‌ای از ژن‌های تنظیم‌کننده در پاسخ مقاومت به خشکی را آشکار کرده است[۳] که در چنین شبکه‌ای نقش ژن‌های عوامل نسخه‌برداری از جمله *bZIP*،*WRKY*،*AP2-EREBP*، *NAC* و *MYB* بسیار مهم است.[۱۲،۱۹،۲۷]

با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه عملکرد ارقام برنج ایرانی در مواجهه با تنش خشکی به ویژه چندین رقم معروف برنج مانند رقم سنگ طارم، رقم معطر سنتی و حساس به خشکی، رقم آمل۳، رقم پر محصول که از نظر ژنتیکی ارتقا یافته است، و رقم ندا، یک رقم پرمحصول مقاوم به خشکی که از نظر کیفیت ارتقا یافته و حاصل تلاقی بین ارقام سنگ طارم و آمل۳ است[۱۰،۹]، این مطالعه به منظور جمع‌آوری اطلاعاتی در مورد این ارقام جهت یافتن شیوه‌ای برای بهبود ژنتیکی و استفاده از آنها در رقم‌های حساس به خشکی و معروف برنج انجام گرفت.

مواد و روش‌ها بذور برنج ارقام سنگ طارم، آمل۳ و ندا از معاونت مرکز تحقیقات برنج کشور در آمل، مازندران تهیه شد. بذرها ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس دو بار با آب مقطر شستشو داده شدند. به منظور آبنوشی، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و سپس در ظروف پتری جداگانه روی کاغذ صافی مرطوب شده با آب مقطر قرار گرفتند. درب ظروف پتری با پارافیلم مسدود شده و در در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بذرهای جوانه زده به لوله‌های پی‌وی‌سی[1] به بلندی ۱ متر و قطر ۱۰ سانتیمتر منتقل شدند. لوله‌ها از خاک با ترکیب خاک کشاورزی و ماسه (۱:۲) و به وزن تقریبی ۱ ± ۱۲ گرم پر شدند و خاک لوله‌ها با آب در حد اشباع آبیاری شد و پس از خارج شدن آب اضافی از انتهای لوله، همه لوله‌ها با ترازوی دیجیتال وزن و سپس در هر لوله پنج بذر جوانه‌زده کاشته شد. دمای گلخانه در طی روز ۲ ± ۲۸ و در شب ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. شرایط نور و تاریکی گلخانه ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت

[1] PVC pipe

تاریکی بود. در مرحله سه برگی گیاهچه‌ها و برای حذف رقابت بین گیاهان، از پنج گیاه در هر لوله، چهار گیاه خارج و تنها یک گیاه در هر لوله نگه داشته شد.

آزمایش در سه تیمار شامل شاهد یا مقدار آب قابل تبخیر خاک[1] برابر با ۱، ۰/۵ و ۲/۲ یعنی به ترتیب دارای ۵۰ و ۲۰٪ آب نسبت به آب اشباع در شرایط شاهد هر یک با چهار تکرار در قالب طرح بلوک‌های تصادفی طراحی و نمونه‌های گیاهی پس از رسیدن به مرحله ۵۰ و ۲۰٪ آب خاک نسبت به شاهد برداشت شدند. در این مدت شاهد دو بار در روز آبیاری و در حد اشباع نگه داشته شد. پس از ۳۵ روز از ابتدای بذرپاشی یعنی تقریباً در زمانی که گیاه رشد رویشی را تکمیل و آماده ورود به مرحله زایشی است، تنش خشکی روی تیمارها اعمال شد. در مدت زمان اعمال تنش خشکی، تنها تیمار شاهد مانند قبل و در حد اشباع آبیاری شد اما در مورد هر دو تیمار تحت خشکی آبیاری قطع و سطح خاک لوله‌ها به منظور جلوگیری از تبخیر خاک با استفاده از روکش‌های پلاستیکی پوشانده شد. همه تیمارها یک بار در انتهای روز تا زمان رسیدن به ۰/۵ و ۰/۲ مقدار آب قابل تبخیر خاک توزین شدند.[۱۳]

فرمول محاسبه مقدار آب قابل تبخیر خاک:

$$FTSW = \frac{WTn - WTn+1}{TTSW}$$

که در آن $WT_n - WT_{n+1}$، وزن واقعی ظرف (مقدار آب قابل تعرق خاک) در شرایط تنش آبی و n تعداد عملیات توزین است. عملیات توزین تا رسیدن تیمارها به ۵۰ و ۲۰٪ آب نسبت به شاهد ادامه یافت. در این مطالعه مقدار ۰/۵ و ۰/۲ آب قابل تبخیر خاک به ترتیب شرایط تنش خشکی ملایم و شدید در نظر گرفته شد. در مقدار آب قابل تبخیر خاک مورد نظر نمونه‌های ریشه و برگ برداشت شدند. تیمار خشکی ملایم تقریباً ۵۶ روز پس از اعمال خشکی حاصل شد و حدود ۱۰ روز پس از آن مرحله برداشت نمونه‌ها برای تنش خشکی شدید فرا رسید.

برای برداشت نمونه‌های ریشه، لوله‌ها به صورت طولی برش زده شدند و شستشوی سریع ریشه‌ها با فشار زیاد آب انجام شد. محدوده یقه گیاه تا انتهای ریشه با خط‌کش اندازه‌گیری و به عنوان طول ریشه یادداشت برداری شد. از یکی دو سانتی‌متر پایانی ریشه، نمونه‌ها برای آزمایش‌های بررسی بیان ژن‌ها در مرحله رویشی رشد برداشت و بلافاصله در ازت مایع در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند.

ریل-تایم پی.سی.آر کمی[2]

آر.ان.ای کل از نمونه‌های ریشه شاهد و تیمارها با استفاده از دستورالعمل استخراج آر.ان.ای. با ترایزول (ساخت پژوهشگاه ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان) استخراج شد.[۲] برای استخراج آر.ان.ای، ۱ میلی‌لیتر ترایزول به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافت پودر شده ریشه اضافه در در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه و پس ورتکس ۲ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای یخچال نگهداری و سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مخلوط پس از سانتریفیوژ دارای سه بخش بود که لایه بالایی محتوی آر.ان.ا به ظرف جدید منتقل و ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل به آن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس ۱۰ دقیقه در دمای یخچال نگهداری و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. آر.ان.ا پس از سانتریفیوژ به صورت ته نشست در دیواره‌ها رسوب می‌کند. پس از دور ریختن مایع رویی ته نشست‌ها با اتانول ۷۵٪ شسته شدند و با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ محلول در ۷۵۰۰

[1] Fraction of Transpirable soil Water (FTSW)

[2] qRT-PCR

دور در دقیقه سانتریفیوژ و پس از یک مرحله دیگر شستشو باقی مانده اتانول دور ریخته شد. پس از خشک شدن ظروف زیر هود ۵۰ میکرولیتر آب عاری از آر.ان.از[1] به ته نشست‌ها اضافه و با انجام اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز کمیت و کیفیت آر.ان.ای. بررسی شد. یک میلی‌گرم از آر.ان.ای. استخراج شده با بافر از بین برنده دی.ان.ای ژنومی[2] در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه برای حذف آلودگی دی.ان.ای ژنومی تیمار شد (جدول ۱). اولین رشته سی.دی.ان.ای[3] با آر.ان.ای. قالب خالص و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج سی.دی.ان.ای (شرکت کیاژن) (جدول ۲) سنتز و با استفاده از آغازگرها تکثیر شد. مستر میکس نمونه ها جهت انجام ریل‌تایم پی.سی.آر. کمی طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز[4] (جدول ۳) تهیه شد. آغازگرها شامل موارد زیر بودند:

*OsMYB3R-2;*F:5′-CAGGGTTTCTATCTCGTTCC-3′,
R: 5′-ATTTCCAAGCCCTTACCAC-3′;
*OsZFP252;*F: 5′-GGTGGAGGCGGTTCTTGAGG-3′,
R:5′-CGTCGTAGTGGCATCGCTTGT-3′;
*OsAP37;*F:5′-ATGGCGCCCAGAGCAGCTAC-3′,
R:5′-CTAGTTCTCTACCGGCGGCG-3′;
βActin;F:5′-GAACTGGTATGGTCAAGGCTG-3′,
R: 5′-ACACGGAGCTCGTTGTAGAAG-3′.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[5] در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و سپس در ۴۰ چرخه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و پس از آن در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه دنبال شد. این عملیات برای هر نمونه با سه تکرار ادامه یافت. چرخه دمایی و تشخیصی فلوئورسانس با استفاده از دستگاه ریل-تایم پی.سی.آر کمی شرکت بایورَد[6] آمریکا انجام گرفت. پس از انجام آزمایش‌ها، میزان بیان ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ که در آن $\Delta\Delta CT=\Delta CT\ (sample)-\Delta CT(control)$ و $\Delta CT=CT(sample)-CT(reference)$ می‌باشد، محاسبه شد.

نتایج و بحث

طول ریشه در مرحله رویشی

افزایش قابل ملاحظه‌ای در طول ریشه در تیمارهای تنش خشکی ملایم و شدید در میان رقم‌ها وجود دارد. در رقم آمل۳، افزایش معنی‌داری در طول ریشه در تنش ملایم و شدید خشکی در مقایسه با شاهد وجود نداشت. رقم سنگ طارم افزایش معنی‌داری در طول ریشه بین شاهد و هر دو تیمار تنش خشکی ملایم و شدید نشان داد. در رقم ندا افزایش معنی‌دار در طول ریشه بین شاهد و هر یک از تیمارهای تنش خشکی ملایم و شدید و نیز بین تیمار تنش ملایم و تنش شدید مشاهده شد (جدول ۴).

رقم ندا در همه تیمارها بیشترین طول ریشه را در مقایسه با ارقام سنگ طارم و آمل ۳ نشان داد. در شاهد طول ریشه در رقم ندا بلندتر از طول ریشه در رقم سنگ طارم اندازه‌گیری شد و این تفاوت معنی‌دار بود. طول ریشه هیچ تفاوت معنی‌داری بین ارقام ندا و آمل۳ در شاهد نشان نداد. در تنش خشکی ملایم، رقم ندا افزایش معنی‌داری در طول ریشه در مقایسه با ارقام سنگ طارم و آمل۳ نشان داد اما هیچ تفاوت معنی‌داری در طول ریشه در تنش خشکی ملایم بین ارقام سنگ طارم و آمل۳ وجود نداشت. در تنش خشکی شدید، رقم ندا افزایش معنی‌داری در طول ریشه در مقایسه با رقم سنگ طارم نشان داد درحالی که در مقایسه با رقم آمل۳ چنین نتیجه‌ای حاصل نشد. تـفاوت‌ها در

[1] RNAase
[2] Qiagene, Germany
[3] cDNA
[4] thermo scientific (fermentase) USA
[5] PCR (polymerase chain reaction)
[6] Bio-Rad (USA)

جدول ۱) دستورالعمل حذف دی.ان.ای ژنومی

Table 1) Protocol of gDNA elimination

Component	volume/reaction
gDNA Wipeout Buffer, 7X	2 µl
Template RNA	up to 1µg
RNase-free water	variable
Total volume	14 µl

جدول ۲) آماده‌سازی مسترمیکس سنتز سی.دی.ان.ای.

Table 2) Master mix preparation for cDNA synthesis

Component	volume/reaction
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5X	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Template RNA (Entire gDNA elimination reaction)	14 µl
Total volume	20 µl

جدول ۳) دستورالعمل آماده سازی مسترمیکس واکنش ریل تایم پی.سی.آر.

Table 3) Protocol of Master mix preparation for qRT-PCR

Component	volume/reaction
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	12.5 µl
Forward Primer	0.3 µM
Reverse Primer	0.3 µM
CDNA	<500 ng
H_2O, nucleas- free	up to 25 µl
Total volume	25 µl

جدول ۴) طول ریشه در ارقام برنج در تیمارهای تنش خشکی

Table 4) Root length in rice cultivars under drought stress

	Root length (cm)		
Cultivars	FTSW = 1.0	FTSW = 0.5	FTSW = 0.2
Neda	41.3 ± 3 a	56.6 ± 3 b	60.5 ± 1 c
Amol3	39.0 ± 3 a	41.2 ± 2 a	49.5 ± 2 b
Sang-tarom	41.0 ± 2 a	50.0 ± 6 b	52.0 ± 6 b

مقادیر میانگین طول ریشه به صورت انحراف معیار ± میانگین می‌باشد.

تفاوت در حروف، تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر رقم در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد.

Each value is represented as mean ± SD.

Differences letter shows significant differences (P<0.05) between treatments in each cultivar.

طول ریشه بین ارقام سنگ طارم و آمل۳ در تنش خشکی شدید معنی‌دار نبود.

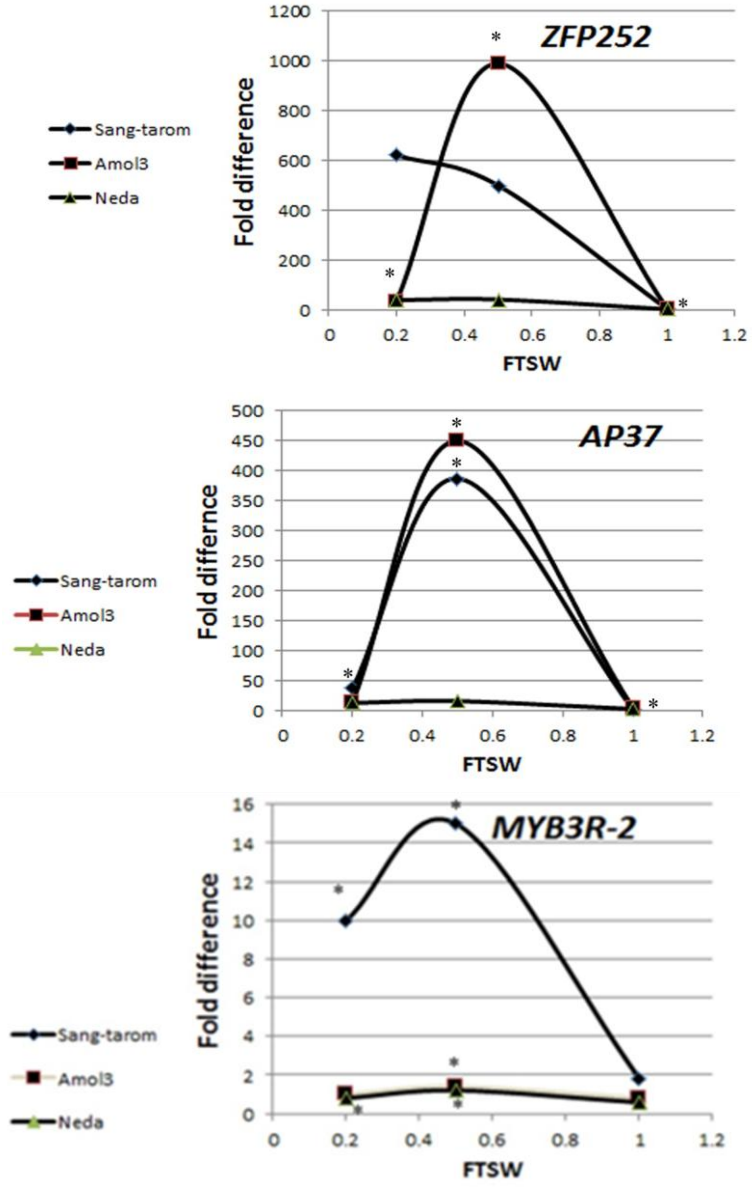
بیان عوامل نسخه‌برداری مرتبط با مقاومت به خشکی

در هر رقم در سطوح مختلف تنش خشکی تفاوت‌های معنی‌داری در سطح بیان سه عامل نسخه‌برداری مورد مطالعه به دست آمد. بیشترین افزایش در سطح بیان *MYB3R-2* و *AP37* در هر سه رقم برنج در تنش خشکی ملایم مشاهده شد و در مورد*ZFP252* الگوی بیان در تیمارها و بین ارقام متفاوت بود (شکل ۱). عامل نسخه‌برداری *MYB3R-2* در تیمار شاهد به ترتیب در ارقام سنگ طارم، ندا و آمل ۳ بیشترین سطح بیان را داشته است. در شاهد بین سنگ طارم و آمل ۳ و نیز بین سنگ طارم و ندا تفاوت‌های معنی‌داری در سطح بیان *MYB3R-2* مشاهده شد. تفاوت‌های معنی‌داری در شاهد در سطح بیان *ZFP252* و *AP37* اندازه‌گیری نشد. در تیمارهای تنش خشکی ملایم و تنش خشکی شدید در سطح بیان*MYB3R-2* در رقم سنگ طارم نسبت به رقم آمل ۳ و نیز بین ارقام سنگ طارم و ندا تفاوت‌های معنی داری اندازه‌گیری شد. نتایج تفاوت‌های معنی‌داری را در تیمار تنش خشکی ملایم و شدید در سطح بیان *ZFP252* و *AP37* بین رقم‌ها تایید کرد (شکل ۲).

تفاوت‌هایی در طول ریشه سه رقم برنج در سه رژیم آبیاری در فاز رویشی در این مطالعه مشاهده شد (شکل ۱). طول ریشه در رقم ندا افزایش معنی‌داری در مقایسه با رقم سنگ طارم در تنش خشکی ملایم و شدید نشان داد اما بین ارقام ندا و آمل ۳ هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج تایید کرد که تنش خشکی اثر تحریک‌کننده ای بر رشد ریشه در ارقام سنگ طارم، ندا و آمل ۳ داشته است. برخی شواهد اظهار داشته اند که حفظ رشد ریشه در شرایط پتانسیل آب کم در خاک نتیجه عملکرد افزایش آبسیزیک اسید در ریشه برای ممانعت از تولید اتیلن است که در واقع بازدارنده رشد در شرایط تنش است.[۲۹] ثابت شده است که در شرایط تنش، پیش‌سازهای بیوسنتز آبسیزیک اسید[1] در ریشه از طریق کاتابولیسم آبسیزیک اسید در بخش هوایی به منظور حفظ رشد ریشه فراهم می‌گردد.[۲۲]

پینهیرو و چاوز (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که کاهش در جذب خالص کربن در برگ در نتیجه کمبود آب گیاه با تغییری در تسهیم و تقسیم بندی فتواسیمیلیت‌ها[2] در کل گیاه همراه است و این مسأله به طور کلی باعث افزایش در نسبت ریشه به ساقه می‌شود که نتیجه کاهش رشد بخش هوایی و حفظ رشد ریشه در شرایط کمبود آب در خاک است و ریشه‌های بلندتر و سطح ریشه بیشتر باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی می‌شود. در این مطالعه بیان عوامل نسخه‌برداری*MYB3R-2* و *AP37* در هر سه رقم در تنش خشکی ملایم بیشتر از بیان این عوامل در تنش خشکی شدید است. در مورد *ZFP252* نیز در رقم آمل ۳ بالاترین میزان بیان این عامل رونویسی در تنش خشکی ملایم مشاهده شد اما در ارقام سنگ طارم و ندا سطح بیان *ZFP252* در تنش ملایم و شدید تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در مجموع افزایش کمتری در سطح بیان عوامل نسخه‌برداری در رقم ندا مشاهده شد. رقم ندا افزایش معنی‌داری در سطح بیان هر سه عامل نسخه‌برداری در هر دو تیمار تنش خشکی در مقایسه با شاهد نشان داد اما در رقم آمل ۳ این نتایج تنها در تیمار تنش خشکی ملایم بدست آمد. در تنش خشکی شدید نیز افزایش معنی‌داری در سطح بیان *ZFP252* و *AP37* در مقایسه با شاهد وجود داشت. رقم سنگ طارم نیز افزایش معنی‌داری در سطح بیان ,*AP37* *ZFP252* و *MYB3R-2* در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۱).

[1] ABA (abscisic acid)
[2] photoassimilates



شکل ۱) بیان عامل نسخه برداری *ZFP252*، *AP37* و *MYB3R-2* در ریشه ارقام سنگ طارم، آمل۳ و ندا

Figure 1) Expression level of *MYB3R-2*, *ZFP252* and *AP37 in* Sang-tarom, Amol3 and Neda roots

میزان بیان ژن عامل نسخه‌برداری با qRT-PCR تعیین و نسبت به شاهد نشان داده شده است. ستاره‌ها در ارقام سنگ طارم و ندا تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ را در سطح بیان ژن در تنش خشکی ملایم و شدید را با دو تیمار دیگر و در رقم آمل۳ تفاوت بیان ژن را در تنش خشکی ملایم با دو تیمار دیگر با آزمون توکی نشان می‌دهند.

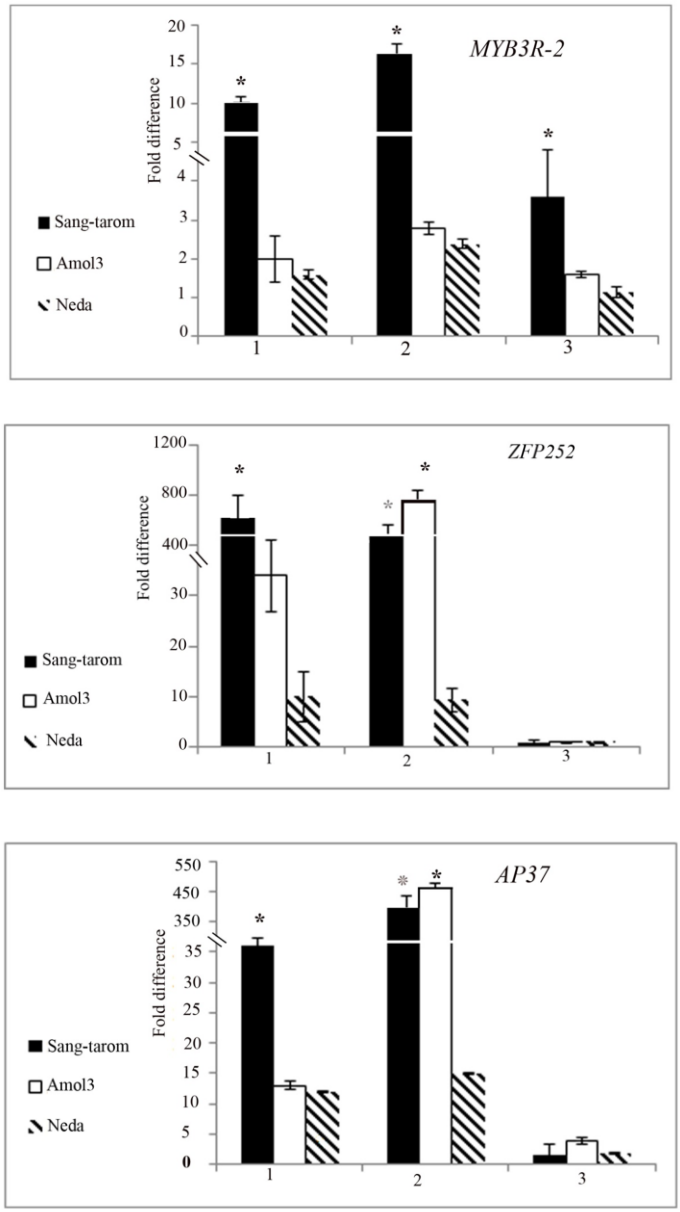
The gene expression level was determined by qRT-PCR and showed relative to control. The values are means ± SE of 3 independent experiments for 4 plants. Asterisks show significant differences (P<0.05) in the gene expression level in mild and severe drought stress treatments of Neda and Sang-tarom with compared to two other treatments and also show significant differences in Amol3 in mold drought stress with compared to tow other treatments by Tuky.

بررسی بیان عوامل نسخه‌برداری یافته های قابل توجهی در زمینه الگوی بیان *MYB3R-2, ZFP252,AP37* در شرایط تنش خشکی در سه رقم برنج نشان داد. در تنش خشکی ملایم در رقم ندا افزایش کمتر و معنی‌داری در سطح بیان *MYB3R-2, ZFP252* و *AP3* در مقایسه با رقم سنگ طارم مشاهده شد. رقم ندا همچنین افزایش کمتر و معنی‌داری در سطح بیان *ZFP252* و *AP3* و تغییرات غیرمعنی‌داری در سطح بیان *MYB3R-2* در مقایسه با رقم آمل ۳ نشان داد. در تنش خشکی ملایم در رقم ندا تفاوت‌ها در سطح بیان سه عامل نسخه برداری در مقایسه با رقم آمل ۳ معنی دار نبود اما افزایش کمتر و معنی‌داری در سطح بیان *MYB3R-2* در مقایسه با رقم سنگ طارم وجود داشت (شکل ۲).

هارب و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که در تنش خشکی ملایم ژن‌های *RD22* و *RD29* – از ژن‌های پاسخ به خشکی– نسبت به شاهد افزایش بیان و در شرایط خشکی قبل از نقطه پژمردگی کاهش بیان داشته‌اند و این درحالی است که سایر ژن‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی تغییری در سطح بیان خود در شرایط خشکی ملایم و خشکی قبل از نقطه پژمردگی نشان نداده‌اند. نتیجه بررسی حاضر که نشان‌دهنده بیان بالاتر *MYB3R-2* و *AP37* در هر سه رقم برنج در تنش خشکی ملایم و عدم تفاوت سطح بیان *ZFP252* در دو تیمار تنش ملایم و شدید در ارقام سنگ طارم و ندا است، مشابه نتایج مطالعه *هارب و همکاران (۲۰۱۰)* می‌باشد.[۸]

پژوهشگران دریافته‌اند که بیان بالای *MYB3R-2* مقاومت به خشکی، تنش سرما و تنش شوری را در آرابیدوپسیس[1] تراریخته افزایش می‌دهد. در این وضعیت تجمع بیشتر پرولین و اسمولیت‌های[2] سازگارکننده به تنش مانند قندهای محلول و پروتئین‌های ال.ای.ا[3] نیز افزایش می‌یابد.[۲۵] ثابت شده است که در گندم، بیان *MYB1* در شرایط کمبود اکسیژن، تنش خشکی و تنش شوری به ویژه در ریشه ها افزایش می‌یابد. بیان دو ژن *AtP5CS* که در سنتز پرولین دخالت دارد و ژن *AtZAT12* که یک عامل نسخه‌برداری انگشت روی C_2H_2 است و بیان آسکوربات پراکسیداز[4] را تنظیم می‌کند در لاین‌های آرابیدوپسیس تراریخته که *TaMYB33* گندم در آنها بیان شده است، القا می‌شوند..[۲۱] *زنگ و همکاران (۲۰۱۲)* ۶۰ ژن *MYB* گندم را مورد مطالعه قرار داده‌اند. آنها بیان داشته‌اند که از این ژن‌ها ۲۰ ژن به تیمارهای چندگانه تنش پاسخ می‌دهند که روابط بین مسیرهای هدایت سیگنالی مختلف را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی ثابت می‌کند.[۳۱] *دینلین و همکاران (۲۰۱۵)* نیز گزارش کرده‌اند که بیان *MYB3R-2* به افزایش شاخص میتوزی و چرخه سلولی کوتاه‌تر منجر می‌شود.[۵] نتایج این بررسی مشخص کرده است که بیان *MYB3R-2* در رقم سنگ طارم در شرایط شاهد و تیمارهای ملایم و شدید خشکی از ارقام دیگر در تیمارهای مشابه بیشتر است و احتمالاً *MYB3R-2* در سنگ طارم ذاتاً سطح بیان بالاتری دارد و این یکی از سازوکارهای اتخاذ شده در این رقم به منظور افزایش سرعت تکثیر سلولی در شرایط تنش است. از سوی دیگر با توجه به *گزارش لنکا و همکاران (۲۰۱۱)* مبنی بر افزایش سطح بیان ژن‌های *ZFP36*، *ZFP37*، *WEKY*، *MYB1* و *MYB305* در رقم حساس برنج نسبت به رقم مقاوم در تنش خشکی به نظر می رسد که افزایش بیشتر بیان این ژن‌ها در رقم حساس نسبت به رقم‌های مقاوم با بیان بیشتر ژن‌های مرتبط به آسیب‌های ناشی از تنش خشکی در ارتباط است.[۹] *ژو و همکاران (۲۰۰۸)* نشان دادند که برنج با افزایش بیان *ZFP252* مقاومت بیشتری به تنش خشـــکی و شوری

[1] arabidopsis
[2] asymilate
[3] Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA proteins)
[4] ascorbate peroxidase



شکل ۲) مقایسه بیان عوامل نسخه‌برداری *MYB3R-2*، *ZFP252* و *AP37* در ریشه سه رقم برنج تحت تنش خشکی

Figure 2) Gene expression patterns for four transcription factors, *MYB3R-2* as determined in three cultivars at different levels of drought stress

میزان بیان ژن عامل نسخه‌برداری با qRT-PCR تعیین و نسبت به سطح بیان آنها در شاهد نشان داده شده است. داده ها با استفاده از میزان بیان ژن بتا اکتین نرمال شدند. مقادیرSE ± میانگین از سه آزمایش مستقل برای ۴ گیاه (تکرار) می باشند. 1=FTSW=0.2، 2=FTSW=0.5 و 3=FTSW=1.0. ستاره‌های تیره نشان دهنده اختلاف معنی‌دار(P value<0.05) با دو رقم دیگر است.

The transcript levels were determined by quantitative RT-PCR and are presented as values relative to the levels measured in control (FTSW = 1.0) root. Data were normalized using the rice β-Actin gene transcript levels. Values are means ± SE of three independent experiments with four plants in every experiment. Dark asterisks mean significant differences ($P < 0.05$) with two other cultivars; grey asterisk means significant difference ($P < 0.05$) with Neda. *1* – Neda; *2* – Amol3; *3* – Sang-tarom.

بدون هیچ گونه تغییر معنی‌داری در ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نسبت به تیپ وحشی داشته است. پروتئین‌های ال.ای.ا در برنج با افزایش بیان*ZFP252* بیشتر از تیپ وحشی بوده است. چنین نتیجه‌گیری شده است که*ZFP252* ممکن است تنظیم کننده بالادستی *OsDREB1A*، ژن کدکننده پروتئین DREB باشد. *ZFP252* می تواند در تجمع اسمولیت‌های سازگار کننده به تنش مانند پرولین آزاد، قندهای محلول و پروتئین‌های LEA که نقش محافظت کننده اسمزی دارند مشارکت داشته باشد.[۲۴] *زنگ و همکاران (۲۰۱۴)* نشان دادند که افزایش بیان برخی از عوامل نسخه‌برداری *ZFP* در آرابیدوپسیس موجب سرکوب بیان ژن‌های تنش اسموتیک ناشی از تنش خشکی و ژن‌های القا شونده با اکسین می‌شود اما انواع دیگری از *ZFP*ها با ساختار مشابه چه در صورت افزایش بیان و چه در صورت سرکوب و جهش در ژن، افزایش مقاومت به تنش خشکی و شوری نشان داده‌اند که به نقش دوگانه آنها می‌کند.[۲۸] در این مطالعه در هر سه رقم برنج در شرایط تنش افزایش بیان *ZFP252* مشاهده شده است که میزان بیان ژن در رقم آمل۳ از سایر ارقام بالاتر و در ندا میزان افزایش بیان کمتر از سایرین است. از آنجا که در مطالعات به نقش*ZFP*ها در افزایش فعالیت آنزیم‌های جاروب کننده گونه‌های اکسیژن فعال در شرایط تنش اکسیداتیو به عنوان اثر ثانویه تنش خشکی اشاره شده است[۳۱] و همچنین مشارکت *ZFP*ها در تنظیم کاهشی بیان ژن‌های مرتبط با آسیب‌های ناشی از تنش خشکی[۱۷] می‌توان به این جمع بندی دست یافت که احتمالا چنین مسیری در ارقام آمل۳ و سنگ طارم نسبت به ندا برای تحمل خشکی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. نتیجه جستجوی ما نشان داد که تا کنون *AP37* تنها توسط *اوه و همکاران (۲۰۰۹)* در خوشه برنج و تحت تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفته و افزایش بیان *AP37* باعث افزایش مقاومت گیاه برنج به تنش خشکی و شوری در مرحله رویشی، افزایش تولید دانه در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شاهد شده است[۱۶]. تا کنون گزارشی در زمینه بیان این ژن در ریشه برنج تحت تنش خشکی ارایه نشده است. با توجه به افزایش بیان ژن *AP37* در ریشه ارقام مورد مطالعه برنج تحت تنش خشکی مطالعه مفصل‌تری جهت بررسی سازوکار عمل این ژن و تغییرات ژن‌های پاسخ‌دهنده به آن توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی در مطالعه حاضر رقم ندا با توجه به طول ریشه بیشتر نسبت به دو رقم دیگر هم در شرایط شاهد و هم در شرایط تنش و با در نظر گرفتن نقش ریشه‌های طویل‌تر در تامین آب مورد نیاز در تنش خشکی، مقاومت بیشتری به تنش خشکی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که رقم ندا ذاتاً دارای ریشه‌های طویل‌تری در شرایط مطلوب آبی است اما از جنبه بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به خشکی افزایش کمتری در سطح بیان این عوامل نسخه‌برداری نسبت به دو رقم دیگر در ندا وجود دارد. پاسخ‌های مختلفی توسط گیاهان برای تحمل به تنش خشکی اتخاذ می شود و این سازوکارها حتی در ارقام گیاهی مقاوم به خشکی نیز متفاوت است.[۱۱] به نظر می‌رسد که در ارقام سنگ طارم و آمل ۳ افزایش بیان *MYB3R-2*، *ZFP252* و *AP37* از پاسخ‌های اصلی به تنش خشکی به شمار می روند اما احتمالاً رقم ندا مسیرهای دیگری را برای تحمل تنش خشکی فعال می کند. نتایج این مطالعه می‌تواند در زمینه بهبود ژنتیکی وانتخاب ارقام مقاوم به تنش خشکی دارای کاربرد باشد.

سپاسگزاری از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، معاونت مرکز تحقیقات برنج کشور در آمل و پژوهشگاه ژنتیک و زیست فناوری طبرستان سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Ahmadikhah, A Shojaeian, H Pahlevani, M H Mayyeipasand A (2014) Study on ethyl methane sulfonate (EMS)-induced variability in morphological traits of rice and identification of mutant lines with high yield potential. Journal of Plant Production Research 21(2):47-67[In Persian with English Abstract].
2. Box, M S Coustham, V Dean, C Mylne, J (2011) Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. Plant Methods 7(7): 1-10.
3. Christmann, A Weiler, E W Steudle, E Grill, E (2007) A hydraulic signal in root- to- shoot signaling of water shortage. The Plant Journal 52:167-174.
4. Degenkolb, T Do, P T Zuther, E Repsilber, D Walther, D Hincha, D K Kohl, K I (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. Plant Molecular Biology 69:133-153.
5. Deinlein, U Stephan, A B Horie, T Luo, W Xu, G Schroeder, J I (2015) Plant salt-tolerance mechanisms. Trends in Plant Science.1-9.
6. FAO. Iran Irrigated Crop Calendar. Aquastate (2006). www.fao.org.
7. Hadiarto, T Tran, L-S P (2011) Progress studies of drought- responsive genes in rice. Plant Cell Report 30: 297-310.
8. Harb, A Krishnan, A Ambavaram, M Pereira, A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveal early responses leading to acclimation in plant growth. Plant Physiology 154: 1254-1271.
9. Karami, N A Aalami, H Samizadeh, M Alahgholopour, M Rabiei, B (2013) Phenotypic and molecular evaluation of fragrance in Iranian rice genotypes. Iranian Journal of Crop Sciences 16(1): 12-24[In Persian with English Abstract].
10. Kholova, J Hash, C T Kumar, L Yadav, R S Kocova, M Vadez, V (2010) Terminal drought- tolerant pearl millet [*Pennisetum glucum* (L.) R. Br.] has high leaf ABA and limit transpiration at high vapor pressure deficit. Journal of Experimental Botany 6(15): 1431-1440.
11. Lenka, S k Katiyar, A Chinnusamy, V Bansal, K C (2011) Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in *Indica* rice genotypes with contrasting drought tolerance. Plant Biotechnology Journal 9: 315-327.
12. Luo, X Tang, L Zhu, Y (2013) Expression of wild soybean WRKY20 in Arabidopsis enhances drought tolerance and regulates ABA signaling. Journal of Experimental Botany 64 (8): 2155-2169.
13. Most Sharoni, A M Nuruzzaman, M Satoh, K.Moumeni, A Attia, K Venuprasad, R.Serraj, R Kumar, A Leung, H Rafiul Islam, A K M Kikuchi, S (2012) Comparative transcriptome analysis of *AP2/EREBP* gene family under normal and hormone treatments, and under two drought stresses in NILs setup by Ady Selection and IR64. Molecular Genetic Genomics 287: 1-19.
14. Moumeni, A Satoh, K Kondoh, H Asano, T Hosaka, A Venuprasad, P Serraj, R Kummar, A Leung, H Kikuchi, S (2011) Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought- tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. BMC Plant Biology 11: 2-17.
15. Moumeni, A (2013) Study on possibility of rice cultivation system from irrigation to aerobic condition in Mazandaran province. Electronic Journal of Crop Production 6 (4): 215-228[In Persian with English Abstract].
16. Oh, S- J Shickim, Y Wookwon, C Kyong, H Seo Jeong, J Kin, J – K (2009) Overexpression of the transcription factor *AP37* in rice improves grain yield under drought conditions. Plant Physiology 150: 1368-1379.
17. Paul, A Kumar, S (2015) An *A20/AN1-zinc finger domain containing protein* gene in tea is differentially expressed during winter dormancy and in response to abiotic stress and plant growth regulators. Plant Gene1: 1-7.
18. Pinheiro, C Chaves, M M (2011) Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? Journal of Experimental Botany 62: 869-882.
19. Priya, p Jain, M (2013) Rice SRTFDB: A database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis. Database 2013: 1-7.
20. Quan, R Hu, S Zhang, Z Zhang, H Zhang, Z Huang, R (2010) Overexpression of an ERF transcription factor *TSRF1* improves rice drought tolerance. Plant Biotechnology Journal 476-488.doi: 10.1111/j.1467-7652.2009…492.x
21. Rahaie, M Xue, G-P Schenk, P M (2013) The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. Abiotic stress-Plant Responses and Applications in Agriculture http://dx.doi.org/10.5772/54795.365-385.
22. Ren, H Gao, Z Chen, L Wei, k Liu, J Fan, Y Davis, W J Jia, W Zhang, J (2007) Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. Journal of Experimental Botany 58: 211-219.
23. Templeton, Bayot, R (2011) Aerobic rice- responding to water scarcity: An Impact assessment of the developing a system of temperate and tropical aerobic rice (STAR) in Asia project. CGIAR challenge program on water and food 47 pp. www.Water and Food.org.

24. Xu, D-Q Huang, J Gua, S-Q Yang, X Bao, Y-M Tang, H-J Zhang, H-S (2008) Overexpression of a TFIII A-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). FEBS Letters 5824: 1037-1043.
25. Yang, L Zheng, B Mao, C Qi, X Liu, F Wu, P (2004) Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. Molecular Genetic Genomics 272: 433-442.
26. Yoo, CY Pence, H E Jin, J B Miura, K Gosney, M J Hasegawa, P M Mickelbart, M V (2010) The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. The Plant Cell 22: 4128-4141.
27. Yu, L Chen, X Wang, Z Wang, S Wang, Y Zhu, Q Li, S Xiang, C (2013) Arabidopsis enhanced drought tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11 confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty. Journal of Plant Physiology 162: 1378-1391.
28. Zhang, H Liu, Y Wen, F Yao, D Wang, L Guo, J Ni, L Zhang, A Tan, M Jiang, M (2014) A novel rice $C_2 H_2$ type- zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid- induced antioxidant defense and oxidative stress tolerance in rice. Journal of Experimental Botany 1-15. doi: 10:1093/jxb/eru313.
29. Zheng, J Zhao, J Zhang, J Fu, J Gou, M Dong, Z Hou, W Huang, Q Wang, G (2006) Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid. Plant Science 170 (6):1125-1132.
30. Zheng, X Chen, B Lu, G Han, B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. Biochemiacal and Biophysical Research Communications 379: 985-989.
31. Zheng, Y Huang, Y Xian, W Wang, J Liao, H (2012) Identification and expression analysis of the *Glycin max CYP707A* Gene family in response to drought and salt stresses. Annals of Botany 110:743-75.

Analysis of transcription factors expression patterns; *ZFP252*, *MYB3R-2* and *AP37* and root length in rice under drought stress

Agroecology Journal
Vol. 11, No. 2 (11-23)
Summer, 2015

Maryam Akbarpour
PhD student
Department of Biology
Science and Research Branch
Islamic Azad University
Tehran, Iran
Email ✉:
art635@yahoo.com

Ramezanali Khavari-Nejad
Professor, Department of Biology
Science and Research Branch
Islamic Azad University
Tehran, Iran
Email ✉:
ra.khavarinejad@gmail.com
(corresponding author)

Ali Moumeni
Associate Professor
Rice Research Institute
Amol, Iran
Email ✉:
amoumeni@areo.ir

Farzaneh Najafi
Assistant Professor
Department of Plant Sciences
Faculty of Biological Sciences,
Kharazmi University
Tehran, Iran
Email ✉:
f_najafi@yahoo.com

Received: 15 May 2015 **Accepted:** 26 July 2015

ABSTRACT Rice is one of the most important crops in Asian countries, because of limitation in water resources, the studies on plant tolerance mechanisms to drought stress and the use of tolerant genotypes are going to be more considered. In current research, three Iranian rice cultivars named Neda, Amol3, and Sang-tarom with different responses to drought stress were used. The rice seedlings were grown in three treatments including control (Fraction of Transpirable Soil Water=1.0), mild drought stress (FTSW=0.5) and severe drought stress (FTSW=0.2) in glasshouse. The root length and the expression levels of three transcription factors, *ZFP252*, *MYB3R-2* and *AP37* were investigated in vegetative stage of growth by qRT-PCR. Neda showed significant increase ($P<0.05$) in root length with compared to Sang-tarom in mild and severe drought stress but there were not any significant differences between Neda and Amol3. Neda had less significant increases ($P<0.05$) in expression levels of *ZFP252*, *MYB3R-2* and *AP37* with compared to Sang-tarom in mild drought stress and also less significant increases in expression levels of *ZFP252* and *AP37* with compared to Amol3.In severe drought stress (FTSW=0.2), Neda showed less significant expression levels of all three transcription factors with compared to Sang-tarom. Neda is probably more tolerant line and also a candidate for selection against drought stress due to longer roots but there are different mechanisms in responses to drought stress in genes expression levels in different rice lines.

Keywords:
- Amol3 cultivar
- drought stress tolerance
- Neda cultivar
- Sang-tarom cultivar
- soil water