ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۹
صفحه ۸۵-۷۷

ارزیابی تغییرات کمّی در میزان رونوشت دو ژن رمزکننده عوامل رونویسی دخیل در القاء بیان ژن‌های تحمل به تنش شوری در گیاهچه‌های گندم

فهیمه چرکزی[۱]، سیده ساناز رمضانپور[۲]، سعید نواب‌پور[۳]، حسن سلطانلو[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲،۳و۴- استادیاران گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramezanpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

شوری از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده می‌باشد که هرساله خسارت‌های زیادی به گیاهان زراعی در جهان به ویژه ایران وارد می‌نمایند. اکثر گیاهان زراعی به تنش شوری حساس هستند و نمی‌توانند در شرایط شوری بسیار حاد، زنده بمانند و در صورت زنده ماندن، مقدار محصول آنها اندک خواهد بود. مطالعات نشان می‌دهند، چندین ژن با فعالیت‌های مختلف در شرایط تنش شوری القا می‌شوند و فاکتورهای رونویسی مختلفی در تنظیم بیان این ژن‌ها شرکت می‌کنند. از اهداف این تحقیق بررسی الگوی بیان ژن‌هایی که محصول آنها فاکتورهای رونویسی لازم برای بیان ژن‌های تحمل به شوری تلقی می‌شوند، با استفاده از روش QRT-PCR می‌باشد. برای این تحقیق از گیاهچه‌های ۸ روزه رقم متحمل (کویر) و رقم حساس (فلات) گندم در تیمارهای ۰/۲۵-، ۰/۵-، ۰/۷۵-، ۱-، ۱/۲۵- و ۱/۵- مگاپاسکال تنش شوری القا شده با نمک کلرید سدیم همراه با تیمار آب مقطر به عنوان شاهد نمونه‌برداری انجام شد و پس از انجام مراحل آزمایشی بیان دو ژن Ta*DBP* و Ta*DREB2* متعلق به خانواده عوامل رونویسی AP2/EREBPs مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که بیان ژن Ta*DBP* در رقم متحمل کویر بیشتر از رقم حساس فلات است که نشان‌دهنده نقش محصول این ژن به عنوان عامل رونویسی در القاء راه‌انداز ژن‌های تحمل به تنش شوری و رونویسی از این ژن‌ها می‌باشد، در حالی که، بیان ژن Ta*DREB2* نشان می‌دهد که این ژن به عنوان فاکتور رونویسی بازدارنده در بیان ژن‌های دخیل در تحمل به تنش شوری در ارقام مورد بررسی عمل می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

گندم،
شوری،
بیان ژن،
عوامل رونویسی،
Ta*DBP*،
Ta*DREB2*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

مقدمه

زمانی که کیفیت آب آبیاری پایین باشد و سیستم مناسب زهکشی برای خارج نمودن نمک تجمع یافته در اثر آبیاری وجود نداشته باشد، تجمع نمک‌ها می‌تواند به سرعت به سطحی از شوری برسد که برای گونه‌های حساس زیان‌آور است. برآورد شده است که حدود یک سوم از اراضی آبی روی زمین، تحت تاثیر شوری می‌باشند (۲، ۲۷). پاسخ گیاهان به تنش شوری، تولید سیگنال‌هایی است که باعث بیان ژن‌های تحمل به شوری می‌شوند. برخی از این ژن‌ها در گیاهان به شوری بالا، پاسخ می‌دهند. اخیرا با کاربرد تکنولوژی ریزآرایه (میکروواری)[1]، ۲۱۳ ژن که در شرایط شوری زیاد بیان می‌شوند، شناخته شده‌اند و عمل محصولات این ژن‌ها با تعیین توالی پروتئین‌های حاصل از آنها قابل شناسایی است (۱۹، ۲۶). مطالعات مولکولی و ژنتیکی نشان می‌دهند که چندین ژن با فعالیت‌های مختلف در شرایط تنش‌های خشکی و شوری القا می‌شوند و فاکتورهای رونویسی[2] مختلف در تنظیم بیان این ژن‌ها شرکت می‌کنند که در نهایت محصولات حاصل از این ژن‌ها تحمل به تنش را ایجاد می‌نمایند. برخی عوامل غیرهمسوساز[3] که محصول ژن‌های دیگر می‌باشند با ایجاد پیوند با عناصر همسوساز[4] ناحیه راه‌انداز ژن تحمل، باعث القای رونویسی از این ژن‌ها به هنگام تنش می‌شوند. در گیاهان، یک فاکتور رونویسی می‌تواند بیان تعدادی از ژن‌های هدف را کنترل نماید. این امر از طریق اتصال این فاکتور رونویسی به عناصر همسوساز در راه‌انداز ژن‌های هدف امکانپذیر است که به آنها عوامل رونویسی تنظیم‌کننده اطلاق می‌شود (۲۶). به طور کلی فاکتورهای رونویسی متصل‌شونده به DNA، که با حضور بخش‌های ویژه متصل‌شونده به DNA مشخص می‌شوند، نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زنده و غیر زنده برعهده دارند. در مطالعات مولکولی متعدد، چندین سیستم تنظیم‌کننده رونویسی برای ژن‌هایی که با تنش القا می‌شوند، شناسایی شده است و چندین گروه از فاکتورهای رونویسی شناخته شده‌اند که باعث رونویسی از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش شوری می‌شوند (۲۴). عوامل رونویسی متصل شونده به عناصر همسوساز DRE[5] متعلق به خانواده عوامل رونویسی AP2/EREBPs[6] هستند. در حدود ۱۲۴ پروتئین متعلق به این خانواده در آرابیدوپسیس شناسایی شده است (۲۲). این پروتئین‌ها دارای ناحیه حفاظت‌شده ۵۹-۵۷ اسیدآمینه‌ای (ناحیه AP2) هستند که به عناصر همسوساز جعبه GCC در راه‌انداز بسیاری از ژن‌های *PR*[7] (۲۳) و موتیف DRE که در بیان ژن‌های مسئول از دست دادن آب دخیل هستند (۱۵)، متصل می‌شود. در گندم چندین ژن از خانواده *DREB*[8] شناسایی و مورد بررسی قرار گرفته است. ژن‌های *DREB* که تا کنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند را می‌توان بر اساس شباهت‌های عملکردی و یا توالی اسید آمینه آنها به گروه‌های متعددی تقسیم‌بندی نمود (۳). به طور کلی عوامل رونویسی متعلق به خانواده AP2/EREBPs یا همان *DREB* ها را می‌توان در سه گروه CBF1/DREB1B، CBF2/DREB1C و CBF3/DREB1A نامگذاری نمود (۹، ۱۵، ۱۶ و ۲۸). این ژن‌های عوامل رونویسی به صورت موقتی در مراحل اولیه تنش سرما بیان می‌شوند و تظاهر ژن‌های هدف را فعال می‌نمایند. عوامل رونویسی مشابهی نیز با نام DREB2A و DREB2B نیز توسط تنش‌های اسمزی فعال می‌شوند و بیان ژن‌های مسئول در شرایط تنش اسمزی را القا می‌نمایند (۱۵). یکی از عوامل رونویسی متصل‌شونده به ناحیه DRE در گندم (Ta*DREB1*) توسط تنش سرما به شدت بیان می‌شوند ولی پاسخ ضعیفی به تنش خشکی، شوری و اسیدآبسیزیک دارد (۲۵) همچنین بیان ژن *WCBF2* از دیگر اعضاء خانواده *DREB* ها به سرعت توسط دمای پایین و خشکی در گندم القا می‌شود (۱۴).

در این تحقیق الگوی تظاهر دو cDNA رمزکننده پروتئین‌های متصل‌شونده به ناحیه DRE راه‌انداز ژن‌های تحمل به تنش با نام

[1] Microarray
[2] Transcription factors
[3] *Trans*-acting
[4] *Cis*-acting

[5] Dehydration responsive element
[6] Ethylene-responsive element-binding factor
[7] Pathogen related
[8] Dehydration responsive element binding factor

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

Ta*DREB2*[9] و Ta*DBP*[10] از خانواده AP2/EREBPs در رقم متحمل و حساس به شوری در مرحله گیاهچه‌ای گندم در شرایط شوری حاصل از کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. این دو پروتئین با عناصر همسوساز DRE راه‌انداز ژن‌های تحمل به تنش‌های غیرزنده در تداخل هستند.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این آزمایش ارقام کویر (متحمل) و فلات (حساس) گندم انتخاب گردیدند. ابتدا کلیه بذرها، ظروف و محیط کار ضدعفونی شدند و محلول کلریدسدیم برای تیمارهای مختلف طبق فرمول ۱ تهیه شد (۵).

$$MPa = -ciRT \qquad \text{(فرمول ۱)}$$

در این فرمول c مولاریتی نمک کلرید سدیم، i عدد ثابت ۱/۸، R عدد ثابت ۰/۰۰۸۳۱۴ و T دمای آزمایش بر حسب کلوین می‌باشد. برای تیمار صفر یا شاهد نیز از آب مقطر استفاده گردید. کشت بذور در حوله‌های مرطوب با محلول کلرید سدیم دارای مقادیر مختلف فشار اسمزی (صفر، ۰/۲۵-، ۰/۵-، ۰/۷۵-، ۱-، ۱/۲۵- و ۱/۵- مگاپاسکال) انجام شد و در اتاقک رشد به مدّت ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها در روز هشتم انجام شد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج RNA از روش لیتیم‌کلراید (۱۸) استفاده گردید. تیمار DNase و ساخت cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. برای این منظور پس از مخلوط نمودن ۰/۵ µg آغازگر اُلیگودی‌تی همراه با ۵ µg از RNA (پس از تیمار با DNase) و آب دو بار تقطیر با حجم نهایی ۱۱ µl، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به هر واکنش ۴ µl بافر ساخت cDNA، ۱ mM مخلوط dNTP، ۲۰ واحد آنزیم بازدارنده RNase اضافه شد و حجم مخلوط با استفاده از آب دوبار تقطیر به ۱۹ µl رسانده شد. مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (RevertAid M-MuLV) به آن اضافه شد. مخلوط حاصل جهت فعال نمودن آنزیم به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت تا واکنش متوقف شد. از رقت ۱:۲۰ هر نمونه cDNA جهت انجام واکنش‌های کمّی استفاده شد. همچنین از دستگاه iQ5 شرکت BioRAD و کیت SYBR biopars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) به‌عنوان رنگ فلورسنت برای ارزیابی کمی استفاده گردید (۱). تمامی نمونه‌ها در ۳ تکرار تکنیکی و ۲ تکرار بیولوژیکی تکثیر شدند و مقادیر میانگین مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. طراحی آغازگرها از ناحیه ترجمه نشده ´۳ با استفاده از نرم‌افزار پرایمر۳[11] انجام گردید. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی در جدول ۱ ثبت شده است.

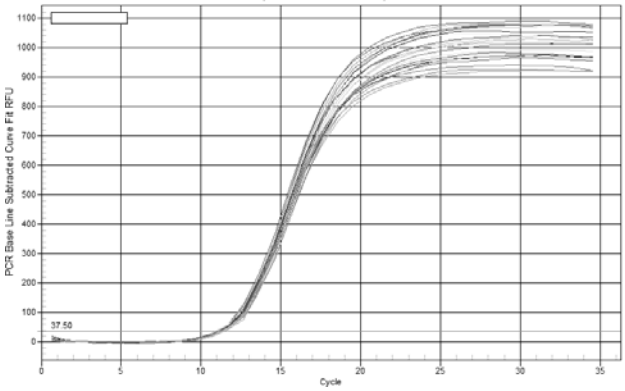
[9] Dehydration Responsive Element Binding Factor
[10] Dehydration Responsive Element Binding protein 2
[11] Primer 3

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش Real-time PCR

نام آغازگر		توالی آغازگر	شماره دسترسی در NCBI	طول محصول	درصد GC	دمای اتصال
Ta*DREB2*	FOR	5´- CGGAGATGCAGCTTCTTGATT-3´	DQ021908	۱۳۹	۴۷/۶۲	۶۱/۷۸
	REV	5´- TCACTTTGGACGAGCTGTGG-3´			۵۵	۶۲/۴۱
Ta*DBP*	FOR	5´- CTACTGTTCCGCCTGTCTCC-3´	DQ026517	۱۳۰	۶۰	۵۹/۸۷
	REV	5´- CCCCTCCCTTGTTCTTATCC-3´			۵۵	۵۹/۷۶
GAPDH	FOR	5´- TCACCACCGACTACATGACC-3´	EF592180	۱۲۱	۵۰	۶۰
	REV	5´- ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3´			۵۵	۶۰

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

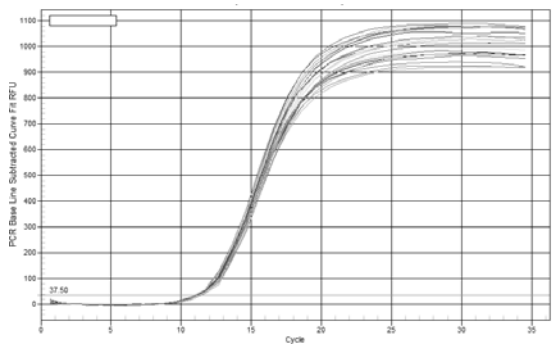
از ژن خانه‌دار *GAPDH*[12] به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. مهمترین خصوصیت ژن‌های مرجع، عدم تغییر در تعداد رونوشت آنها تحت شرایط آزمایش مورد نظر می‌باشد. نمونه‌ای از منحنی ترسیم شده برای ژن خانه‌دار در شکل ۱ نشان داده شده است که بیانگر ثابت بودن تظاهر ژن در آزمایش انجام شده می‌باشد.



شکل ۱- منحنی تکثیر ژن خانه‌دار *GAPDH* در تیمارهای مختلف آزمایشی
(در این منحنی محور افقی بیانگر تعداد چرخه PCR و محور عمودی شدت نور فلورسنت ساطع شده می‌باشد)

از آنجایی که اختصاصی عمل نمودن آغازگرها در روش QRT-PCR از اهمیت بالایی برخوردار است، به همین منظور در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آنها اطمینان حاصل نمود. در صورت مشاهده تنها یک پیک در حدود درجه حرارت ذوب آغازگر مورد بررسی می‌توان به اختصاصی عمل نمودن آغازگر مطمئن بود، ولی وجود بیش از یک پیک در منحنی رسم شده بیانگر تکثیر قطعات غیر اختصاصی همراه با قطعه هدف می‌باشد که در این صورت می‌بایست آغازگرهای دیگری طراحی نمود (شکل ۲).

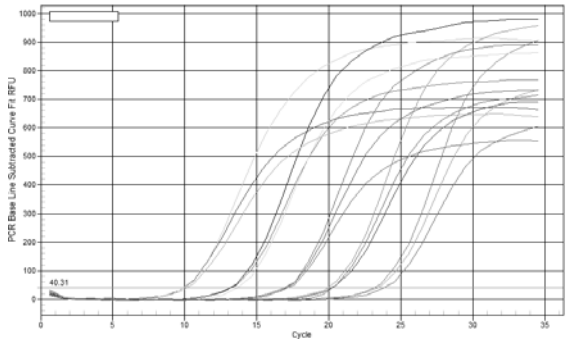
[12] *Glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase*



شکل ۲- منحنی ذوب آغازگر اختصاصی و آغازگر ژن خانه‌دار
(در این منحنی محور افقی بیانگر دما بر حسب درجه سانتی‌گراد و محور عمودی شدت نور فلورسنت ساطع شده می‌باشد، پیک سمت چپ برای آغازگر ژن خانه‌دار و پیک سمت راست متعلق به آغازگر اختصاصی است)

کنترل کارایی واکنش

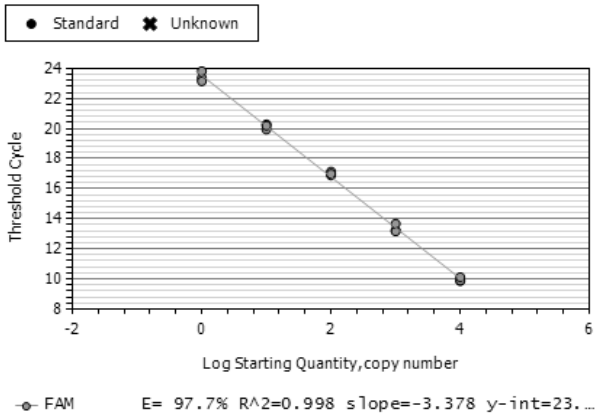
از آنجایی‌که در ارزیابی‌های نسبی از کارایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت محاسبه نسبت افزایش یا کاهش بیان ژن در تیمارهای مختلف استفاده می‌شود، بنابراین کنترل کارایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در این روش ضروری به‌نظر می‌رسد. برای این‌منظور از سری‌های رقت استفاده شد. برای تهیه سری‌های رقت ابتدا مقادیر مساوی از cDNA نمونه‌های مورد بررسی در هر واکنش با یکدیگر مخلوط شدند. سپس مخلوط cDNA به نسبت ۱:۱۰، ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰ رقیق شده و برای آغازگر اختصاصی و آغازگر ژن مرجع استفاده گردید و بدین طریق کارایی تکثیر ژن اختصاصی و ژن مرجع ارزیابی شد. در شکل ۳ منحنی سری‌های غلظت و در شکل ۴ منحنی رگرسیون سری‌های غلظت جهت محاسبه کارایی واکنش نشان داده شده است. این منحنی‌ها توسط نرم‌افزار iQ5 ترسیم می‌شوند.



شکل ۳- منحنی مربوط به نمونه‌های سری غلظت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

(در این منحنی محور افقی بیانگر تعداد چرخه PCR و محور عمودی شدت نور فلورسنت ساطع شده می‌باشد)



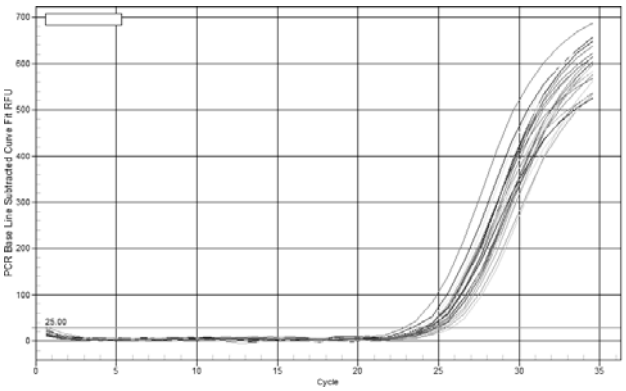
شکل ۴- پلات مقادیر C_T در برابر تعداد نسخه سری غلظت‌های ۱۰X جهت محاسبه کارایی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
(در این منحنی محور افقی بیانگر لگاریتم مقدار cDNA در شروع واکنش و محور عمودی چرخه آستانه می‌باشد که در آن نور فلورسنت توسط دستگاه قابل ردیابی بوده است).

تجزیه داده‌ها

منحنی داده‌ها در این روش به صورت سیگموئیدی[13] (در صورت استفاده از مقیاس خطی) می‌باشد که در آن میزان فلورسنت در مقابل تعداد چرخه پلات می‌شود (شکل ۵). از سیکل آستانه[14] (C_T) جهت برآورد مقدار اولیه مولکول هدف در هر نمونه استفاده می‌شود و سیکل آستانه سیکلی است که در آن اولین افزایش قابل تشخیص در فلورسنت اتفاق می‌افتد. پس از بررسی نتایج و بدست آوردن اعداد در نرم‌افزار iQ5، از نرم‌افزار REST[15] جهت محاسبه مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف تنش خشکی و شوری استفاده شد. در این نرم‌افزار از فرمول زیر جهت محاسبه نسبت تظاهر استفاده می‌شود (۲۲).

$$Ratio= (E_{target})^{\Delta CPtarget(control-sample)}/(E_{ref})^{\Delta CPref(control-sample)}$$

بر اساس این فرمول نسبت بیان ژن هدف بر اساس کارایی تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (E) و تفاوت نقطه تقاطع Δ (ΔCP) نمونه ناشناخته نسبت به شاهد محاسبه می‌شود. به‌همین دلیل است که کنترل کارایی واکنش از اهمیت بالایی برخوردار است و در صورتی که کارایی توسط سری‌های غلظت محاسبه نشود نرم‌افزار عدد ۲ را جایگزین خواهد نمود.



شکل ۵- منحنی تکثیر ژن اختصاصی Ta*DREB2* در نمونه‌های مورد آزمایش
(در این منحنی محور افقی بیانگر تعداد چرخه PCR و محور عمودی شدت نور فلورسنت ساطع شده می‌باشد)

نتایج

بررسی بیان ژن Ta*DBP*

در رقم متحمل کویر و در ابتدای شروع تنش شوری یعنی در تیمار ۰/۲۵- مگاپاسکال افزایش معنی‌داری در میزان بیان این ژن مشاهده شد. در تیمار ۱- مگاپاسکال بیان این ژن به حداکثر مقدار خود در مقایسه با تیمار شاهد رسیده است. در رقم حساس فلات میزان بیان این ژن تغییرات معنی‌داری در مقایسه با تیمار کنترل و همچنین در مقایسه تیمارها با یکدیگر نشان نداده است (شکل ۶). محصولات این ژن به‌عنوان فاکتور رونویسی متصل‌شونده به نواحی DRE موجود در راه‌انداز ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش عمل می‌نمایند. فاکتورهای رونویسی DBP یکی از اعضای جدید زیرخانواده DREB می‌باشد که طبق نتایج تحقیق انجام شده در پنبه میزان رونوشت‌های این ژن در شرایط تنش شوری افزایش می‌یابد (۱۰).

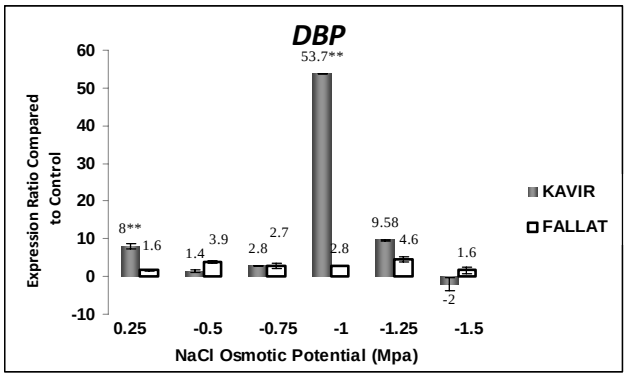
[13] Sigmoidal-shaped
[14] Threshold cycle
[15] Relative Expression Software Tools

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

با توجه به بررسی تظاهر این ژن در رقم متحمل کویر، مشاهده شد که میزان بیان این ژن در ابتدا و اواسط تیمار شوری افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشته است و در تیمار ۱- مگاپاسکال به حداکثر میزان بیان رسیده است. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیشترین تعداد رونوشت‌های این ژن در تیمار متوسط شوری (۱- مگاپاسکال) تجمع می‌یابند. در حالی‌که در رقم حساس فلات از ابتدای شروع تنش شوری تا اواخر دوره تنش، میزان بیان این ژن در مقایسه با تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداده است.

بررسی بیان ژن Ta*DREB2*

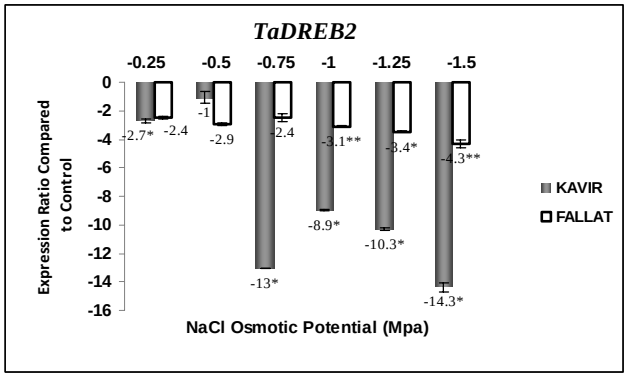
در بررسی بیان این ژن در رقم متحمل کویر، میزان بیان به‌طور کلی در اکثر تیمارها کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمار کنترل داشته است. در ابتدای تیمار شوری میزان کاهش در بیان این ژن بسیار چشمگیر نبود اما با روند افزایشی تنش شوری میزان کاهش در بیان این ژن در مقایسه با تیمار کنترل چشمگیر است. در رقم حساس فلات میزان بیان ژن از ابتدای تنش شوری در تیمار ۰/۲۵- مگاپاسکال شروع به کاهش داشته است، به‌طوری که تا تیمار ۰/۷۵- مگاپاسکال کاهش بیان ژن تقریبا ثابت بود. اما در ادامه با روند افزایشی تنش شوری کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمار کنترل در تیمارهای بعدی مشاهده شده است (شکل ۷). همانطور که مشاهده می‌شود در دو رقم متحمل و حساس میزان بیان این ژن طی تیمارهای مختلف تنش شوری کاهش یافته است.



شکل ۶- مقایسه تظاهر کمی تظاهر ژن Ta*DBP* در رقم متحمل کویر و رقم حساس فلات

میله‌ها بر اساس مقادیر استاندارد در سیکل‌های آستانه رسم شده است و بیانگر دقت اندازه‌گیری در ۳ تکرار مختلف می‌باشد.

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۷- مقایسه تظاهر کمی تظاهر ژن Ta*DREB2* در رقم متحمل کویر و رقم حساس فلات

میله‌ها بر اساس مقادیر استاندارد در سیکل‌های آستانه رسم شده است و بیانگر دقت اندازه‌گیری در ۳ تکرار مختلف می‌باشد.

** ، * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و ۵ درصد

بحث

در این تحقیق بیان دو عامل رونویسی متعلق به خانواده AP2/EREBP ها در گندم مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن Ta*DBP* توسط تیمارهای شوری ابتدایی و متوسط در رقم متحمل افزایش یافته است، ولی بیان ژن Ta*DREB2* کاهش معنی‌داری در تیمارهای مختلف شوری در هر دو رقم به ویژه رقم متحمل نشان داده است. در مطالعه انجام شده روی الگوی بیان دو ژن رمزکننده پروتئین‌های متصل شونده به عناصر DRE در راه‌انداز ژن‌های تحمل به تنش‌های غیرزنده در ذرت نیز نتایج تقریباً مشابهی ارائه شده است (۱۲). در این بررسی بیان ژن *DBF1* در شروع تنش شوری در ذرت افزایش متوسطی نشان داده است و با افزایش شدت تنش به بالاترین میزان خود رسیده است که با نتایج تحقیق حاضر در مورد ژن Ta*DBP* منطبق می‌باشد، ولی بیان ژن *DBF2* توسط تنش خشکی تغییرات معنی‌داری نشان نداده بود. بنابراین محققین اذعان نمودند که *DBF1* می‌تواند تظاهر راه‌انداز یکی از ژن‌های تحمل به تنش‌های غیرزنده را القا نماید و فعالیت آن پس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

از تیمار با تنش افزایش می‌یابد. در مقابل ژن *DBF2* تأثیر منفی بر فعالیت راه‌انداز ژن تحمل دارد و نقش منفی را در تنظیم بیان ژن‌های تحمل به تنش‌های غیرزنده ایفا می‌نماید. از آنجایی که در تحقیق حاضر بیان ژن Ta*DREB2* در شرایط تنش شوری کاهش نشان داده بود می‌توان بیان داشت که الگوی بیان ژن‌ها در گیاهان مختلف و تحت تأثیر تنش‌های مختلف از روند کاملاً یکسانی برخوردار نیست هر چند که کاهش بیان این ژن در شرایط تنش شوری می‌تواند خود دلیلی بر نقش منفی ژن Ta*DRB2* بر فعالیت راه‌انداز ژن تحمل باشد، همچنانکه در گیاه ذرت دیده شده است. این دو ژن نیز همانند ژن‌های *DBF1* و *DBF2* در ذرت متعلق به خانواده AP2/EREBP هستند که با نام متفاوتی ارائه شده‌اند. افزایش بیان ژن Ta*DBP* می‌تواند گواهی بر نقش مثبت این ژن در القاء حداقل یکی از ژن‌های تحمل به تنش شوری در گیاه گندم و ارقام مورد بررسی باشد، در حالی که ژن Ta*DREB2* تأثیر منفی بر القاء بیان ژن‌های تحمل دارد و در هر دو رقم مورد بررسی بیان آن در شرایط آزمایش انجام شده کاهش معنی‌داری نشان داده است.

به طور کلی عوامل رونویسی می‌توانند به عنوان محرک و یا بازدارنده ژن‌های پایین دست خود عمل نمایند و این امر در گیاهان دیگر و شرایط متفاوت دیگری نیز تأیید شده است. به عنوان مثال، در تحقیق انجام شده توسط دلسرت و همکاران (۲۰۰۵) نیز نقش بازدارندگی عامل رونویسی ATAF2 در بیان ژن‌های مقاومت به بیماری فوزاریوم در گیاه آرابیدوپسیس مطالعه و تأیید گردیده است. در تحقیق یادشده افزایش بیان ژن *ATAF2* منجر به افزایش حساسیت نسبت به قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* گردید و در نتیجه محققین اذعان داشتند که عامل رونویسی ATAF2 به عنوان بازدارنده‌ای برای پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی در گیاه آرابیدوپسیس عمل می‌نماید (۶). از آنجایی که مکانیزم معمول در کنترل بیان ژن، تنظیم رونویسی توسط فسفریله شدن و دِفسفریله شدن عوامل اختصاصی است، احتمال می‌رود تفاوت در عمل عوامل رونویسی به دلیل ترکیب اسیدآمینه‌ای آنها نیز باشد. عوامل رونویسی که در ترکیب آنها درصد بالایی دنباله سرین وجود داشته باشد دارای عملکرد بالاتری هستند زیرا این دنباله‌ها به عنوان جایگاه‌های مفروض برای فسفریله شدن عمل می‌کنند. بنابراین القاء راه‌انداز یک ژن به عناصر همسوساز متعدد و همکاری بین آنها بستگی دارد (۱۲).

ژن‌های متعددی متعلق به خانواده AP2/EREBP در گیاهان مختلف جداسازی و بررسی شده‌اند و به نقش متفاوت آنها در چرخه زندگی گیاه، در رشد و نمو گیاه (۴، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷) و در پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده (۸، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۲۸، ۲۹) اشاره شده است. به طور کلی القا یا فعالیت محرک و اختصاصی عوامل رونویسی می‌تواند مقدار نسبی عامل رونویسی موجود در سلول را تنظیم نماید و بیانگر اتصال عوامل مختلف به یک عنصر همسوساز باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که Ta*DREB2* و Ta*DBP* به عنوان محرک مشترکی برای القاء ژن‌های تحمل به شوری محسوب نمی‌شوند زیرا Ta*DBP* توسط تنش‌های کم و متوسط القا می‌شود ولی بیان Ta*DREB2* کاهش معنی‌داری نشان داد. در تحقیقات محققین دیگر (۸، ۱۹) روی گیاه آرابیدوپسیس تأثیر بازدارندگی و یا فعال‌کنندگی برخی عوامل رونویسی در القا بیان ژن‌های درگیر در تحمل به تنش‌های غیرزنده اثبات شده است.

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عوامل رونویسی می‌توانند نقش متفاوتی در کنترل رونویسی از یک ژن را برعهده داشته باشند. برخی از عوامل رونویسی نقش القایی در فعال‌سازی راه‌اندازهای دارای عوامل همسوساز دارند و برخی دیگر بازدارنده عمل راه‌اندازها هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن Ta*DREB2* به عنوان ژن بالادست در القاء ژن‌های تحمل به شوری در گیاهچه‌های گندم ارقام مورد مطالعه محسوب نمی‌شود و احتمالاً ژن‌های دیگری به عنوان ژن‌های بالادست در پاسخ به تنش شوری در شرایط آزمایش عمل می‌نمایند. ولی ژن Ta*DBP* می‌توان به عنوان ژن بالادست فعال در القا تحمل به تنش شوری در گیاهچه‌های گندم مورد بررسی تلقی شود. لازم به ذکر است که شباهت توالی ژن‌های متعلق به خانواده AP2/EREBP محدود به توالی سازنده حوزه AP2 می‌باشد و در خارج از این ناحیه شباهت توالی بین ژن‌های مختلف متعلق به این خانواده ژنی وجود ندارد (۱۲)، بنابراین همانطور که در این تحقیق نیز به آن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

اشاره شده است طراحی آغازگر بر اساس ناحیه خارج از حوزه AP2 (ناحیه ترجمه نشده انتهای ۳) می‌تواند ما را از اختصاصی عمل نمودن آغازگرهای مورد بررسی مطمئن نماید و در مورد گیاهانی مثل گندم که هر روزه توالی‌های بیشماری از آن در بانک‌های اطلاعاتی به ثبت می‌رسد، توجه به این نکته مهم می‌تواند در ارائه نتایج معتبر و ثابت کمک نماید.

منابع

۱. رمضانپور، س.س. ۱۳۸٦. بررسی الگوی کمّی تظاهر ژن‌های گندم در شرایط تنش سرما. رساله دکتری، دانشگاه تهران، ۲۲۴ صفحه.

۲. کافی، م. زند، ا.، کامکار، ب.، شریفی، ح. و گلدانی، م. ۱۳۷۹. فیزیولوژی گیاهی. جلد دوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳٦٦ صفحه.

3. Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell, 7: 1099-1111.

4. Chuck, G., Meeley, R.B. and Hake, S. 1998. The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. Genes Dev. 12: 1145-1154.

5. Coons, M. J., Kuehl, R. O. and Simons, N. R. 1990. Tolerance of ten lettuce cultivars to high temperature combined with NaCl during germination. J. Americ. Soc. Hort. Sci., 115: 1004-1007

6. Delessert Ch., Kazan K., Wilson I.W., Van Der Straeten D., Manners J., Dennis E.S. and Dolferus R. 2005. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. The Plant Journal 43: 745–757

7. Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P. and Smyth, D.R. 1996. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and oral organ growth. Plant Cell (8): 155-168.

8. Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. 2000. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. Plant Cell (12): 393-404.

9. Gilmour, S.J., Zarka D.G. and Stockinger, E.J. 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as on early step in cold-induced *cor* gene expression. Plant J. (16): 433-442.

10. Huang, B. O. and Liu, J-Y. 2006. Cloning and functional analysis of the novel gene GhDBP3 encoding a DRE-binding transcription factor from Gossypium hirsutum. Biochimica et Biophysica Acta. 1759: 263–269.

11. Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Van Montagu, M. and Okamuro, J.K. 1994. Control of Arabidopsis ¯ower and seed development by the homeotic gene APETALA2. Plant Cell (6): 1211-1225.

12. Kizis D. and Pages A. 2002. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. The Plant Journal, 30(6): 679-689.

13. Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. and Fischer, R.L. 1996. The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the ¯oral homeotic gene APETALA2. Plant Cell (8): 137-153.

14. Kume, S., Kobayashi, F., Ishibashi, M., Ohno, R., Nakamura, C. and Takumi, S. 2005. Differential and coordinated expression of *Cbf* and *Cor*/*Lea* genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. Genes Genet Syst 80:185–197

15. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell (10): 1391-1406.

16. Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M. and Salinas, J. 1999. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. Plant Physiol. 119: 463-470.

17. Moose, S.P. and Sisco, P.H. 1996. Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. Genes Dev. 10, 3018-3027.

18. Naito, S., Hirai, M. Y., Chino, M and Komeda, Y. 1994. Expression of a soybean (*Glycin max [L.]* Merr.) Seed storage protein gene in transgenic Arabidopsis thaliana and its response to response to nutritional stress and to abscisic acid mutations, plant physiology. 104: 497-503.

19. Nakashima, K., Yamaguchi, K. and Shinazaki, K. 2005. Molecular studies on stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* and improvement of stress tolerance in crop plant by regulon biotechnology. JARQ. 39: 221-299.

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

21. Ohta, M., Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. 2000. Three ethyleneresponsive transcripton factors in tobacco with distinct transactivation functions. Plant J. 22 (1): 29-38.

22. Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wide comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acid Research, 30(9): e36

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

23. Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman B.K. and Yu, G. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science, 290: 2105-2110.

24. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 998–1009.

25. Shen, Y.G., Zhang, W.K., He, S.J., Zhang, J.S., Liu, Q. and Chen, S.Y. 2003. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Theor Appl Genet 106:923–930

26. Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Seki, M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Plant Biology. 6: 410–417.

27. Siadat, H., Bybordi, M. and Malakouti, M.J. Salt-affected soils of Iran: A country report. 1997. International symposium on "Sustainable Management of Salt Affected Soils in the Arid Ecosystem". Cairo. Egypt.

28. Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. and Thomashow, F.M. 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cisacting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water de®cit. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 94: 1035-1040.

29. Zhou, J., Tang, X. and Martin, G.B. 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. EMBO J. 16: 3207-3218.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.9.6]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]