



بررسی بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پنج ژنوتیپ گندم دوروم (*Triticum turgidum* L.) تحت تنش خشکی

طاهره نعیمی^۱، لیلا فهمیده^۲ و براتعلی فاخری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
۳- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۲۲
صفحه: ۲۰ تا ۲۸

چکیده

در راستای مواجهه با تنش‌ها به‌ویژه تنش خشکی، شناخت ژن‌های مقاومت در گیاهان و ساز و کار عمل این ژن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه، اثر سطوح تنش خشکی بر سطح بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برخی ژنوتیپ‌های گندم دوروم بررسی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل پنج سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و پنج ژنوتیپ گندم دوروم (شبرنگ، بهرننگ، کرخه، آریا و دنا) با سه تکرار انجام شد. ژنوتیپ‌ها به‌صورت گلدانی کشت شدند و تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای (چهار برگ) اعمال شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و اثرات متقابل تنش خشکی × ژنوتیپ برای سطوح تنش (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی) نسبت به سطح کنترل (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که سطوح تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح کنترل بیشترین اثر را بر میزان بیان ژن *NAC* و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز داشت. ژنوتیپ شبرنگ بیشترین میانگین نسبی بیان ژن *NAC* و میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را نشان داد. با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، با افزایش سطوح تنش خشکی میزان بیان ژن *NAC* و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، پنج ژنوتیپ گندم دوروم افزایش یافت و ژنوتیپ شبرنگ بیشترین بیان ژن *TaNAC2A* را در هنگام تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به نمونه کنترل داشت.

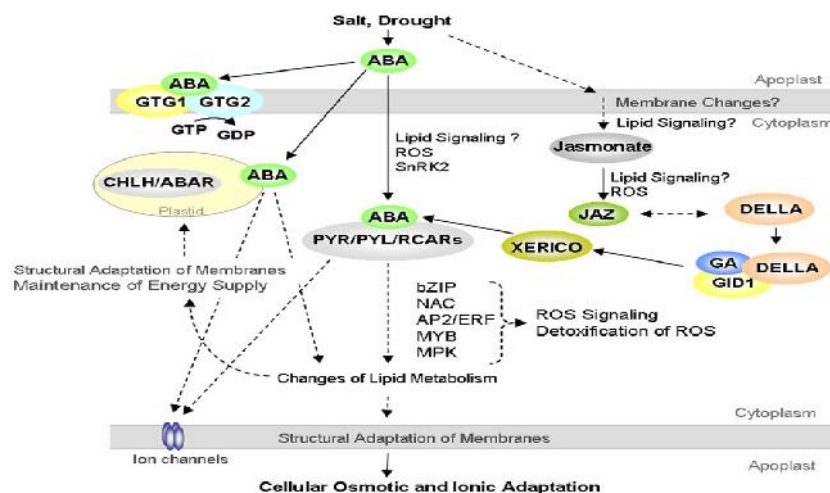
واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، روش Real Time PCR، ژنوتیپ شبرنگ، مرحله گیاهچه‌ای

مقدمه

باید سریع بوده و قادر به ارزیابی عملکرد گیاه در مراحل حساس رشدی و غربال کردن یک جمعیت بزرگ فقط با استفاده از تعداد محدودی مواد گیاهی باشد. مقاومت به خشکی نتیجه برهم‌کنش صفات مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است و بنابراین می‌توان از این اجزای مختلف به‌عنوان شاخص‌های گزینش برای غربال کردن تیپ ایده‌آل (ایدئوتیپ) گیاهی استفاده کرد. بجای یک صفت ساده باید ترکیبی از صفات مختلف که رابطه مستقیم با مقاومت به خشکی دارند به‌عنوان معیارهای گزینش مورد استفاده قرار گیرد (۱۷).

مطالعات اخیر در مورد گیاهان تراریخت نشان داده است که ژن‌های خانواده‌های مختلف از عوامل رونویسی (TFs) مانند: WRKY-MYB-NAC-bZIP-AP2/ERF هنگام ایجاد تنش‌های غیرزنده سبب ایجاد مکانیسم تحمل در گیاهان تراریخت می‌شوند (۲۸، ۱۷). پروتئین‌های *TaNAC2A* از عوامل رونویسی در گیاهان خاص می‌باشند که عملکردشان در رابطه با نمو گیاه و همچنین در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده است (شکل ۱).

خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی در سراسر جهان است (۳). یکی از معیارهای بررسی توانایی تحمل گیاهان به تنش خشکی، بررسی عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش خشکی با عملکرد آن‌ها در شرایط رطوبتی مطلوب است (۸). تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) می‌شود. در پاسخ به افزایش تولید ROS، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد (۱۱). تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۱۴). گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (۱). هر اقدامی برای اصلاح ژنتیکی مقاومت به خشکی با استفاده از تنوع ژنتیکی نیاز به یک روش ارزیابی یا غربال‌گری کارآمد دارد که



شکل ۱- ارتباط بین مسیرهای مختلف انتقال سیگنال گیاهان در پاسخ به تنش خشکی و شوری
Figure 1. Signal network of drought tolerance and salinity in plants

TaNAC2A در ژنوتیپ‌های گندم دوروم (شبرنگ، بهرنگ، کرخه، آریا و دنا) و بررسی میزان تغییرات آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز طی اعمال تنش خشکی بر ژنوتیپ‌های مذکور است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل پنج ژنوتیپ گندم دوروم (کرخه، آریا، دنا، شبرنگ و بهرنگ) و فاکتور دوم شامل سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بودند که سطح ۲۵ درصد به عنوان سطح شاهد در نظر گرفته شد.

بذور پنج ژنوتیپ گندم دوروم (کرخه، آریا و دنا) تهیه شده از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ژنوتیپ (شبرنگ و بهرنگ) تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل با هیپوکلریت سدیم ۲٪ ضدعفونی و به مدت پنج دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. ژنوتیپ‌ها در مدت ۷۲ ساعت و دمای ۲۵°C و تاریکی جوانه زدند. بعد از مشاهده ریشه‌چه بذور ریشه دار شده به گلدان‌هایی که به پنج قسمت مساوی تقسیم شده بود انتقال و سه بذر ریشه‌دار شده از هر ژنوتیپ در هر گلدان در عمق ۳ سانتی‌متری خاک کشت شدند (۲۵). گلدان‌هایی به گنجایش ۳۰۰۰ گرم خاک معمولی مزرعه که حاوی خاک، ماسه، و کود دامی با نسبت ۲:۱:۱ بودند برای این کار استفاده شدند (۱۶).

برای هر سطح تنش خشکی سه گلدان (تکرار) در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان‌ها یک روز در میان با آب معمولی انجام شد و به منظور جلوگیری از خروج آب زهکش، از گلدان بدون روزنه استفاده شد (۹). نگهداری گلدان‌ها در دمای ۲۵±۲ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت

اساس نامگذاری *TaNAC2A* با توجه به توالی مشخص شده‌ی NAM در گل اطلسی و ATAF1/2 در آرابیدوپسیس و پروتئین CUC2 می‌باشد. برای اولین بار cDNA کدکننده‌ی پروتئین *TaNAC2A* به عنوان یک ژن پاسخ‌گو به تنش کم‌آبی در آرابیدوپسیس گزارش شد (۳۰). با استفاده از یک روش غربالگری ترکیبی در مخمر، سه گروه همولوگ *SNAC* (*RD26.ANAC072- ANAC055- ANAC019*) مشخص شد که به توالی پروموتور ژن *ERD1* در ناحیه‌ی MYC ژن متصل است. این ژن‌ها توسط تنش‌های خشکی و شوری بیان می‌شوند، تجزیه و تحلیل ریزآرایه‌ی گیاهان تراریخت نشان داد که ژن‌های *SNAC* در هنگام تنش مانند ژن گلیکولاز در تنظیم ژن‌های بالای دست گیاهان تراریخت نقش دارند (۲۶). پایانه‌ی N- (N-terminal) پروتئین‌های *TaNAC2A*، یک ناحیه بزرگ همولوگ، که حاوی ناحیه (Domain) متصل به DNA به طول حدود ۱۵۰ اسید آمینه که در بردارنده ۵ منطقه‌ی حفاظت‌شده (A-E) می‌باشد. دمین اتصال به DNA (*NAC 019*) در آرابیدوپسیس توسط کریستالوگرافی اشعه‌ی X مشخص شده است (۶). در پژوهشی برای بررسی مکانیسم‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی و شوری ژن *TaNAC29* با استفاده از روش انتقال ژن از گندم نان به آرابیدوپسیس منتقل و نتایج Real Time PCR نشان داد که ژن *Ta NAC 29* نقش مهمی در فرآیند پیری گیاه به هنگام ایجاد تنش خشکی و شوری دارد (۱۴). در رونوشتی از ژن‌های تراریخت آرابیدوپسیس از گیاه برنج و همچنین از گیاه گندم مشخص شد در گیاه برنج گروه ارتولوگ *OsNAP* از خانواده عوامل رونویسی *NAC* سبب تخریب کلروفیل می‌شود. ژن *NAC* می‌تواند برای بدست آوردن تغییرات خاص در کنترل و انتقال مجدد مواد مغذی طول عمر گیاه را بالا ببرد (۲۲).

هدف از این مطالعه بررسی اثر پنج سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بر میزان بیان ژن

تاریکی انجام شد (۷). در مرحله چهار برگه عملیات تنک انجام شد و در پایان از هر ژنوتیپ یک گیاه در هر گلدان باقی ماند (۲۰، ۲۵).

مقدار آب در خاک خشک، با استفاده از محاسبات، نسبت به ظرفیت خاک مزرعه مشخص شد و برای تعیین مقادیر آب در هر گلدان از تیمارها، ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم خاک در داخل آون در درجه حرارت 103°C قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت، توزین و وزن خاک خشک تعیین شد. سپس خاک خشک شده در گلدانی ریخته و به آرامی و تا حد اشباع، آب به آن اضافه شد و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک گلدان توزین شد و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری شده در ظرفیت زراعی ۲۵ درصد تعیین شد و تیمارهای مختلف محاسبه شدند. اعمال تنش خشکی روی گیاهان ۴۵ روز پس از کشت صورت گرفت و ۲۰ روز پس از اعمال تنش نمونه برداری برگ و اندازه گیری صفات انجام شد (۲۰). نمونه برگی ژنوتیپ مورد بررسی تا زمان استخراج RNA در فریزر -80°C نگهداری شد (۲).

جداسازی RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA کل گیاه گندم دوروم با استفاده از کیت Total RNA isolation شرکت دنا زیست آسیا، مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28srRNA و 18srRNA روی ژل نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. جهت از بین بردن DNA ژنومی از DNase شرکت پیشگام استفاده شد.

طراحی آغازگرها

از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه *TaNAC2A* به همراه ژن 18srRNA بود. طراحی این آغازگرها به کمک داده های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

Table 1. The sequence of primers used in the Real-Time PCR reaction

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>TaNAC2A</i>	5'-ATCGGCAGCGGAGCGATT-3'	5'-AGGGGTGCGAAGCGGTAGAGG-3'
18srRNA	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'	5'-AGGGGTGCGAAGCGGTAGAGG-3'

پس از استخراج RNA، ساخت cDNA با استفاده از کیت Geneall، شرکت پیشگام انجام گرفت. بیان ژن ها با روش Real Time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real Time PCR set Corbett (3000) بررسی شد. بررسی کمی بیان نسبی ژن از طریق دستگاه Real TimePCR set Corbett (3000) انجام شد. تمام cDNAهای ساخته شده از طریق دستگاه Real Time PCR مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

در این آزمایش از Hot taq Evagreen mix (no Rox) (شرکت دنا زیست آسیا) استفاده شد. شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۱۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و طولی سازی ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰-۶۵ درجه و در نهایت طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد (۲) میزان و مواد لازم جهت انجام Real Time PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید. جهت تجزیه و تحلیل نسبت بیان ژن هدف (ژن *TaNAC2A*) در مقایسه با ژن کنترل 18 srRNA برای تمام تیمارها از روش 2^{-CT} استفاده شد. بیان نسبی PCR برای هر ژن از فرمول $Ratio = 2^{-CT}$ بدست آمد. همچنین جهت بررسی و تأیید عدم وجود آلودگی ژنومی از نمونه کنترل منفی (No RT Control) نیز استفاده شد. پس از بررسی میزان تکثیر از طریق Real Time PCR، تجزیه توسط نرم افزار دستگاه (Corbettresearch - RG3000) محاسبه شد و پس از

به دست آوردن چرخه آستانه و میزان دقیق غلظت، تجزیه داده ها از طریق فرمول $Ratio = 2^{-CT}$ و با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد محاسبه قرار گرفت.

استخراج عصاره آنزیمی

جهت استخراج عصاره آنزیمی، از بافر فسفات پتاسیمی ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ استفاده شد. ۲۰۰ میلی گرم بافت سبز برگ با ۴ میلی لیتر بافر استخراج عصاره آنزیمی در هاون چینی کاملاً ساییده شد و پس از عبور دادن از کاغذ صافی، به مدت ۱۵ دقیقه با دمای چهار درجه سانتیگراد با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از فاز رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیمی استفاده شد. روش سنجش میزان فعالیت آنزیمی آنزیم کاتالاز با روش بیور و سایزر (۴) اندازه گیری و میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز به روش یوشی مورا و همکاران (۳۱) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به PCR شیب دمایی

جهت تعیین دمای بهینه برای اتصال آغازگرهای ژن *TaNAC2A* و ژن مرجع 18 srRNA، گرادیان دمایی به طور جداگانه برای ژن اصلی و ژن مرجع در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج، دمای مناسب اتصال پرایمرها برای ژن *TaNAC2A* و همچنین ژن 18srRNA، ۵۹/۵ درجه سانتی گراد، انتخاب شد. وجود باند اختصاصی بر روی ژل پس

از انجام روش PCR با اندازه مورد نظر تاییدکننده درستی ساخت cDNA است.

نتایج تجزیه واریانس بررسی بیان ژن *TaNAC2A* و آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس اثرات ژنوتیپ، سطوح خشکی و اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ مورد بررسی (۲۵ درصد

ظرفیت زراعی بدون تنش خشکی و ۲۰ درصد، ۱۵ درصد، ۱۰ درصد، پنج درصد ظرفیت زراعی تنش خشکی) در بیان ژن اصلی (*TaNAC2A*) و میزان آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در پنج ژنوتیپ گندم دوروم

Table 2. Results of analysis of variance effect of genotype and drought stress on *TaNAC2A* gene expression and catalase and ascorbate peroxidase enzymes in five durum wheat genotypes

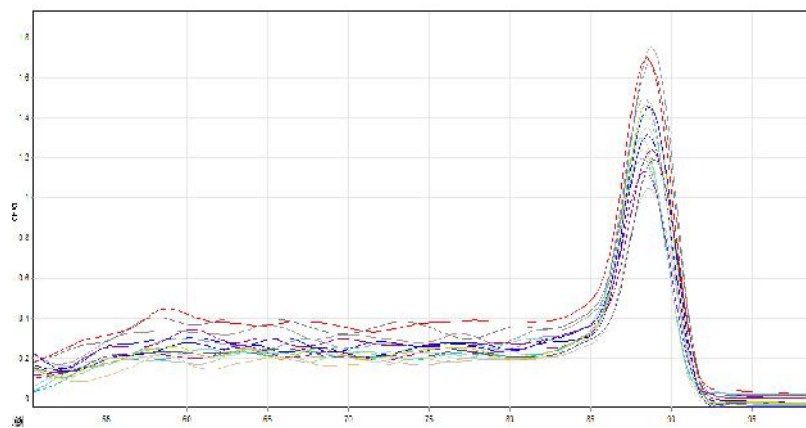
منابع تغییرات	درجه آزادی	بیان ژن <i>TaNAC2A</i>	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
بلوک	۲	۰/۰۰۹۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۴ ^{ns}
تنش	۴	۴/۳۳۶۲ ^{**}	۰/۱۸ ^{**}	۰/۰۷۹۶ ^{**}
ژنوتیپ	۴	۰/۱۶۰۴ ^{**}	۰/۰۷۸ ^{**}	۰/۰۰۶۱ ^{ns}
اثر متقابل تنش و ژنوتیپ	۱۶	۰/۱۰۰۵ ^{**}	۰/۰۸۸ ^{**}	۰/۰۱۸۸ ^{**}
خطا	۴۴	۰/۰۱۴۰	۰/۰۰۰۰۱۴	۰/۰۰۱۳
ضریب تغییرات	-	۱۱/۵۷۱	۵/۵۸	۲۳/۶۱۷

ns، * و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد

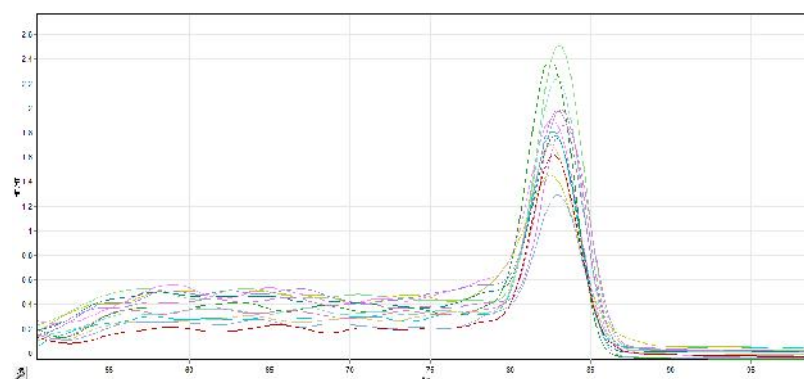
بیان نسبی ژن *TaNAC2A*

پس از اتمام فرآیند Real Time PCR با توجه به مشاهده منحنی‌های ذوب (شکل ۲ و ۳)، آغازگرها به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند و یک نمونه منفرد از cDNA را تکثیر نموده‌اند، عدم وجود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر عدم وجود پرایمر دایمر می‌باشد

و آغازگرها تقابلی باهم ندارند و واکنش دارای بازدهی مناسبی برای تعیین بیان نسبی ژن می‌باشد. شدت دمای ذوب (Tm) برای ژن *TaNAC2A* و ژن srRNA 18 به ترتیب ۸۸/۵ (شکل ۲) و ۸۴ درجه سانتی‌گراد (شکل ۳) دیده می‌شود. همچنین وجود پیک در یک دما برای تمامی تیمارها نشان از اختصاصی بودن محصول واکنش است.



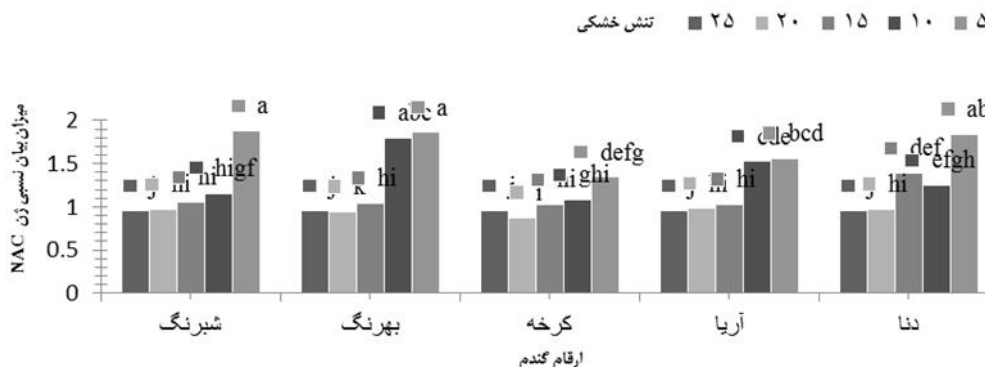
شکل ۲- منحنی ذوب ژن *TaNAC2A*. موقعیت پیک موجود نشان‌دهنده دمای ۸۸/۵ درجه سانتی‌گراد (Tm محصول ژن *TaNAC2A*)
Figure 2. *TaNAC2A* Melting Curve. Available courier position indicating a temperature of 5/88 °C (Tm of the NAC gene)



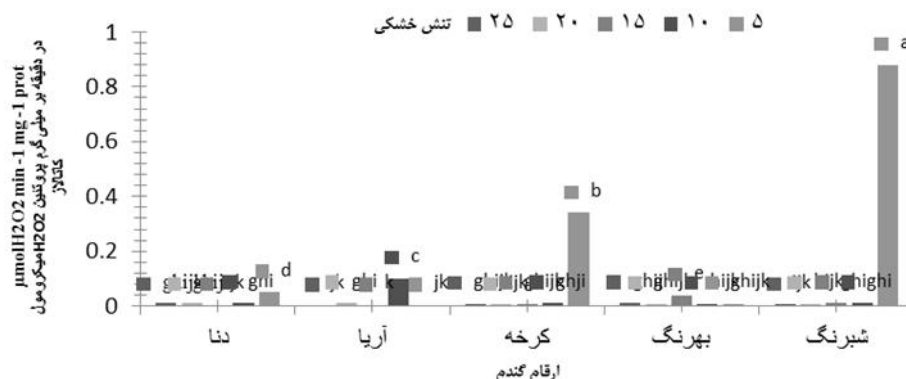
شکل ۳- منحنی ذوب ژن 18srRNA. موقعیت پیک موجود نشان دهنده دمای ۸۴ درجه سانتی گراد (Tm محصول ژن 18srRNA)
Figure 3. Melting curve of 18srRNA gene. Present peak location indicating temperature of 84 °C (Tm product of 18srRNA gene 18)

ظرفیت زراعی (نمونه کنترل) مشاهده شد (شکل ۴). با مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ‌های گندم دوروم، ژنوتیپ شبرنگ بیشترین میزان آنزیم کاتالاز را با مقدار ۰/۸۸ و ژنوتیپ کرخه کمترین میزان از این آنزیم را با مقدار ۰/۰۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میلی گرم پروتئین در سطح ۲۰ درصد ظرفیت زراعی به خود اختصاص داده است (شکل ۵).

بر اساس نتایج به دست آمده، با توجه به مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد بررسی بر بیان ژن *TaNAC2A*، بیشترین میزان بیان ژن *TaNAC2A* با میانگین ۱/۸۷۷ در ژنوتیپ شبرنگ و بهرنگ تحت تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (نمونه کنترل) و همچنین کمترین میزان بیان ژن *TaNAC2A* با میانگین ۰/۸۷۷ در ژنوتیپ کرخه و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح ۲۵ درصد



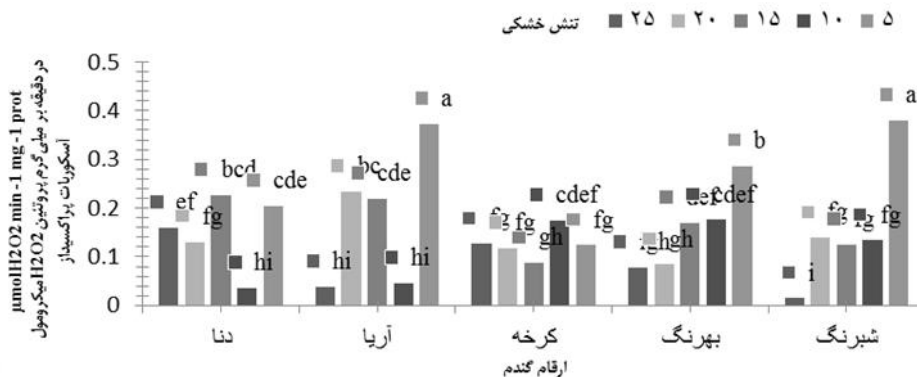
شکل ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر تنش بر میزان بیان ژن *TaNAC2A*
Figure 4. Comparison of the average effect of stress on *TaNAC2A* gene expression



شکل ۵- اثر متقابل پنج سطح تنش خشکی بر میزان آنزیم کاتالاز در پنج ژنوتیپ گندم دوروم
Figure 5. Effect of five levels of drought stress on catalase enzyme in five durum wheat genotypes

ترتیب ۰/۹۷۹، ۰/۹۷۸ و ژنوتیپ شبرنگ کمترین میزان ۰/۰۱۶ میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میلی گرم پروتئین را در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی داشت (شکل ۶).

اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ در آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد ژنوتیپ شبرنگ و آریا در سطح پنج درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز به



شکل ۶- اثر متقابل پنج سطح تنش خشکی بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۵ ژنوتیپ گندم دوروم
Figure 6. Interaction of five levels of drought stress on the amount of ascorbate peroxidase enzyme in 5 durum wheat

در یک پژوهش بازسازی شبکه ژنی درگیر و تصویر روشن تری از نحوه پاسخدهی گیاه جو به تنش خشکی و شناسایی ژنهای کلیدی مربوطه انجام شد. بدین منظور ژنهای کلیدی در بافت برگ از مقالات علمی گردآوری شد. در مجموع عوامل رونویسی بیشترین تعداد را بین ژنهای موثر دارا بودند که نشان دهنده اهمیتشان در مکانیسم تحمل به خشکی می باشد (۱۷). فاکتورهای رونویسی باعث پیچیدگی تنظیم رونویسی می گردند (۲۷). تقریباً ۷٪ ژنوم گیاهان به مناطق کدکننده فاکتورهای رونویسی با مناطق سیس-المنت در نواحی پروموتری ژنهای مرتبط به تنشهای محیطی برهم کنش دارند و با افزایش بیان این ژنها موجب تحمل به تنش می گردند (۱). نتایج سایر مطالعات نشان دادند که *TaNAC29* واقع در کروموزوم *2BS* نقش مهمی در فرآیند پیری و پاسخ به تنشهای غیرزیستی همچون خشکی و شوری، افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی و افزایش آسبیزیک اسید در گیاهانی مانند گندم و برنج دارد (۲۹). همچنین افت فعالیتهای مورفولوژیکی و القای پیری در گیاهان تراریخت آراییدوپسیس نیز گزارش شده و افزایش بیان ژن *TaNAC29* در پروتوپلاست هسته گندم فعالیت رونویسی آن را در مخمر ثابت می کند. از سویی H_2O_2 واسطه عوامل رونویسی متعددی می باشد که برنامه ریزی مجدد ترانسکرپتوم را القا کرده و سبب ایجاد موج ثانویه ای از واکنشها می شود که در پاسخهای بسیاری از جمله مکانسیمهای دفاعی دخیل هستند. عوامل رونویسی مرتبط با سیگنال دهی H_2O_2 از چندین خانواده مختلف هستند که شامل *ZAT*, *WRKY*, *DREB*, *bZIP* و *MYB* می باشند (۱۳). در آراییدوپسیس بسیاری از عوامل رونویسی خانواده *NAC* پیری برگ را کنترل می کنند. ۱۵ مورد از این عوامل مرتبط با پیری به وسیله H_2O_2 بیش بیان می شوند (۵). در پژوهشی به منظور بررسی مکانسیم تحمل به تنش خشکی در گیاه نخود، بیان

طی بررسیهای صورت گرفته در محیطهای کم آب و با آب کافی میزان حساسیت ژنوتیپ گندم به خشکی متفاوت بوده و این حساسیت به شدت تنش بستگی دارد (۲۴). با توجه به مشاهدات Ribaut و همکاران (۲۳) این واکنشها و سایر سازوکارها، گیاهان را در تحمل و سازگاری به تغییرات دما، رطوبت و ترکیبهای محیط کشت مقاوم می سازد. همچنین در بعضی گیاهان صفات ثانویه مؤثر در واکنش گیاه در شرایط کم آبی تشخیص داده شده است (۲۳). از آنجا که عملکرد صفات کمی با وراثت پذیری پایین می باشد، انتخاب بر اساس آن به تنهایی نمی تواند قابل اطمینان باشد همچنین انتخاب بر اساس صفات فیزیولوژیک آسان و دقیق بوده و توارث پذیری این صفات نسبتاً بالا است. بنابراین بازده ژنتیکی این صفات مطلوب بوده و انتخاب بر مبنای این صفات راه مطمئن و سریعی برای غربال جوامع گیاهی و بهبود عملکرد می باشد (۱۰) همچنین شاخصهای فیزیولوژیک دارای اهمیت حیاتی در بقاء و سازگاری گیاه به تنشهای محیطی هستند (۱۹). اطلاعات حاصل از بررسی بیان ژن *NAC* نشان داد که تیمار پنج درصد تنش خشکی بیشترین تأثیر را بر بیان ژن *NAC* داشته است. پیشرفت های تکنولوژیکی از قبیل توسعه سیستم حساس *Real Time PCR*، اندازه گیری کمی سریع و دقیق مقدارهای اندکی از mRNA را فراهم می کند (۱۵). Mittal و همکاران (۱۸) در آزمایشی توانایی دو ژنوتیپ حساس و متحمل گیاه کلزا (*Brassica. juncea* L) را در انطباق با محیطهای نمکی در مزرعه مورد آزمایش قرار دادند. بر اساس این آزمایش مشخص شد که بهبود عملکرد فعالیت ژنوتیپ مقاوم تحت تنش، مربوط به افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز (*CAT*) و آسکوربیت پراکسیداز (*APX*) بوده است (۱۸). طبق نتایج پژوهش حسن پور لسکوکلایه و همکاران (۱۲)، تنش خشکی در ارقام گندم دوروم سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (*CAT*) و کاهش آسکوربیت پراکسیداز (*APX*) شده است (۱۲).

از این آزمایش و نقش مهم بیان ژن‌های مقاوم به تنش خشکی در شرایط بحران کم آبی حاضر پیشنهاد می‌شود دیگر ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط تنش خشکی بررسی شوند. همچنین ژنوتیپ‌های شبرنگ و بهرنگ جهت انجام سایر آزمایشات مولکولی مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9618-37 انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

ژن TaNAC2A مورد ارزیابی قرار گرفت و بر این اساس دو کتابخانه cDNA از برگ نهال گیاه نخود فرآوری شده و یک ژن CarNAC3 از آن جدا شد. نتایج نشان داد که ژن CarNAC3 موجود، ۲۸۵ اسیدآمینه و یک دومین TaNAC2A دارد که در یک هسته متمرکز بوده و از فعالیت ترانس فعال در پایانه C- برخوردار است و باعث افزایش تحمل گیاه نخود در تنش‌های غیرزنده می‌شود (۲۱). همانطور که در نتایج این تحقیق مشاهده شد با افزایش سطوح تنش خشکی بر پنج ژنوتیپ گندم دوروم میزان بیان ژن NAC و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت و ژنوتیپ شبرنگ بیشترین بیان ژن نسبی را در هنگام تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به نمونه کنترل داشت. با توجه به نتایج حاصل

منابع

1. Agarwal, P., P.K. Agarwal, A.J. Joshi, S.K. Sopory and M.K. Reddy. 2010. Over expression of *PgDREB2A* transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Molecular Biology Reports*, 37: 1125-1135.
2. Amiri Deh Ahmadi, S.R., M. Parsa and A. Ganjeali. 2010. Effects of drought stress on morphological characteristics and yield components in different phenological stages of chickpea (*Cicer arietinum* L.) greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Research*, 8 (1): 166-157 (In Persian).
3. Arraudeau, M.A. 1989. Breeding strategies for drought resistance. In Baker, F. W. G. (ed.), *Drought resistance in cereals*. CAB International, UK, 125: 107-116.
4. Beers, G.R. and I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biology Chemical*, 195(1): 133-140.
5. Dynowski, M., G. Schaaf and D.J. Loque. 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H₂O₂. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 414: 53-61.
6. Ernst, H.A., A.N. Olsen, K. Skriver, S. Larsen and L.L. Leggio. 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Reports*, 5(3): 297-303.
7. Esfandiari, E.A., M.R. Shakiba, S.A. Mahboob, H. Alyari and S. Shahabivand. 2009. The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11: 1916-1922 (In Persian).
8. Fischer, R.A and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield response. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 897-912.
9. Gharbi, A., I. Rashid, A.S. Tarynzhad and Q. Chlbyyany. 2013. Salinity and drought tolerance of durum wheat lines under greenhouse conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*, 4(28): 393-410 (In Persian).
10. Golestani Araghi, S. and M.T. Assad. 1998. Evaluation of four screening techniques for drought resistance and their relationship to yield reduction ratio in wheat. *Euphytica*, 103: 293-299 (In Persian).
11. Gressel, J.Y. and D.M. Joel. 1994. Genetic engineering can help control parasitic weeds. In *Biology and Management of Orobanche*. Ed. By pieterse A.H., Verkleij, JAC and ter Borg. S.J. Royal Tropical Institute, Amsterdam, 406 pp.
12. Hassanpour Lescokelaye, K., J. Ahmadi, J. Daneshyan and S. Hatami. 2015. Changes in Chlorophyll, Protein and Antioxidant Enzymes on Durum Wheat under Drought Stress. *Journal of Crop Breeding*, 7(15): 76-87 (In Persian).
13. Huang, Q., Y. Wang, B. Li, J. Chang, M. Chen, K. Li and G. He. 2015. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. *BMC plant biology*, 15(1): 268.
14. Jiang, M. and J. Zhang. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42(11): 1265-1273.
15. Leu, D.J., J. Gregory McVerry, W. Ian O'Byrne, C. Kiili, L. Zawilinski, H. Everett Cacopardo, C. Kennedy and E. Forzani. 2011. The new literacy's of online reading comprehension: Expanding the literacy and learning curriculum. *Journal of Adolescent and Adult Literacy*, 55(1): 5-14.

16. Maali-Amiri, R., I.V. Goldenkova-Pavlova, V. Pchelkin, V.D. Tsydendambaev, A.G. Vereshchagin, A.N. Deryabin, T.I. Trunova, D.A. Los and A.M. Nosov. 2007. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the 12-desaturase gene from cyano bacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54: 678-685.
17. Mitra J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, 80: 758-763.
18. Mittal, S.N. and V. Kumari. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiology Biochemical*, 54: 17-26.
19. Mohammadi, R., R. Haghparast, M. Aghaee-Sarbarze and A.V. Abdollahi. 2006. An evaluation of drought tolerance in advanced durum wheat genotypes based on physiologic characteristics and other related indices. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 37: 561-567 (In Persian).
20. Naeemi, T., L. Fahmideh and B.A. Fakheri. 2018. The impact of drought stress on antioxidant enzymes activities, containing of proline and carbohydrate in some genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* L.) at seedling stage. *Journal of Crop Breeding*, 10(26): 22-31 (In Persian).
21. Peng, H., H.Y. Cheng, C. Chen, W. Yu, N. Yang, W. Gao and H. Ma. 2009. A NAC transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum* L.), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. *Journal of plant physiology*, 166(17): 1934-1945.
22. Pereira-Santana, A., L.D. Alcaraz, E. Castaño, L. Sanchez-Calderon, F. Sanchez-Teyer and L. Rodriguez-Zapata. 2015. Comparative genomics of NAC transcriptional factors in angiosperms: implications for the adaptation and diversification of flowering plants. *PIOS ONE*, 10(11): e0141866.
23. Ribaut, J.M., C. Jiang and D. Hoisington. 2002. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. *Crop Science*, 42: 557-565.
24. Srmdnya, G. and A.S. Small. 1990. Publication Jihad Mashhad University (Translation). *Crop Physiology*, 467 pp.
25. Tabaraki, H., L. Fahmideh and Z. Foladvand. 2017. Study of *MYB* gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 6(1): 95-104 (In Persian).
26. Tran, T.S., A.L. Kolodkin and R. Bharadwaj. 2007. Semaphoring regulation of cellular morphology. *Annu. Rev. Cell Dev. Journal plant of Biology*, 23: 263-292.
27. Uauy, C., A. Distelfeld, T. Fahima, A. Blechl and J.A. Dubcovsky. 2006. NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 314(5803): 1298-1301.
28. Vinocur, B. and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2): 123-132.
29. Wang, W., B. Vinocur and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1): 1-14.
30. Yamaguchi-Shinozaki, K., M. Koizumi, S. Urao and K. Shinozaki. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3): 217-224.
31. Yoshimura, K., Y. Yabute, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxides isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123: 223-233.

Assessment of *TaNAC2A* Gene Expression and Ascorbate Peroxidase, Catalase Enzymes of Five Durum Wheat Genotypes (*Triticum turgidum* L.) Under Drought Stress

Tahereh Naeemi¹, Leila Fahmideh² and Barat Ali Fakheri³

1- Graduated M.Sc. Student, of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol

2- Associate Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol,
(Corresponding author: l.fahmideh@uoz.ac.ir)

3- Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol

Received: January 22, 2018

Accepted: November 13, 2019

Abstract

To deal with stresses, especially drought stress, identification of resistance genes in plants and understanding their functions is very important. In this study, we investigated the effects of drought stress on expression of *TaNAC2A* gene as well as on the activity of ascorbate peroxidase and catalase in some of the durum wheat genotypes. The experiment was conducted in factorial based on randomized complete block design with five drought stress levels (5, 10, 15, 20 and 25% of field capacity) and five durum wheat genotypes (Shabrang, Behrang, Karkhe, Arya and Dena) in three replications. The genotypes were planted in pots and different levels of drought stress were induced at seedling stage (four leaves). Variance analysis showed that the effects of genotype, drought stress and drought stress×genotype interaction were significantly different compare with the control (25% FC). Drought stress of 5% field capacity had the greatest influence on *TaNAC2A* expression as well as catalase and ascorbate peroxidase enzymes activity. The level of *TaNAC2A* expression and the activity of catalase and glycol peroxidase enzymes in Shabrang genotype were higher than that in other genotypes. Interestingly, with increasing drought stress levels, the *TaNAC2A* expression and antioxidant activity of catalase and ascorbate peroxidase was increased in all tested genotypes. Moreover Shabrang genotype had the highest *TaNAC2A* gene expression during drought stress of 5% field capacity compared with the control.

Keywords: Drought stress, Real Time PCR method, Seedling stage, Shabrang genotype