دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

تأثیر تنش‌های خشکی، قارچ *Fusarium culmorum* و نماتد *Heterodera filipjevi* و اثرات متقابل آنها بر الگوی بیان ژن فاکتور رونویسی *NAC69-3* در گندم نان

مژگان ارکان[۱]، ندا میرآخورلی[۲]، لیلا شبانی[۳] و عبدالفتاح عامر دبابت[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران (نویسنده مسوول: neda.mirakhorli.54@gmail.com)
۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- دانشیار، مرکز بین‌المللی اصلاح ذرت و گندم (CIMMYT)، آنکارا، ترکیه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹
صفحه: ۴۲ تا ۵۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در شرایط مزرعه غلات دانه‌ریز از جمله گندم تحت تأثیر انواع عوامل محیطی مخرب نظیر تنش‌های غیرزیستی و زیستی قرار می‌گیرند که باعث کاهش شدید در عملکرد محصول می‌شود. در مواجه گیاه با این شرایط، فاکتورهای رونویسی از طریق فعال یا سرکوب کردن بیان ژن‌های درگیر در پاسخ‌های مقاومتی سبب ایجاد مقاومت گیاه در برابر انواع تنش‌ها می‌شوند. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی الگوی بیان ژن فاکتور رونویسی NAC69-3 در گیاه گندم در پاسخ به تنش های زیستی و غیر زیستی بود.

مواد و روش‌ها: جهت تعیین و انتخاب ژن‌های مرتبط با مقاومت در برابر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی، داده‌های ریزآرایه‌ی *Triticum aestivum* در سایت NCBI GEO بررسی و فاکتور رونویسی NAC69-3 برای تأیید آزمایشگاهی انتخاب گردید. به منظور بررسی الگوی بیان این ژن تنش‌های خشکی، قارچ *Fusarium culmorum* و نماتد *Heterodera filipjevi* و ترکیبات دوتایی و سه‌تایی آنها به صورت طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در دو رقم گندم SBP-CL16 (مقاوم به قارچ) و Silverstar (مقاوم به نماتد) اعمال گردید و نمونه برداری در سه زمان ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷ روز پس از اعمال تنش‌ها از بافت ریشه بود. پس ازاستخراج RNA وساخت cDNA، واکنش Real-time PCR جهت بررسی الگوی بیان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *NAC69-3* انجام شد.

یافته‌ها: دراین مطالعه افزایش معنی‌داری در میزان بیان نسبی ژن *NAC69-3*، در هر دو رقم گندم، در اکثر تیمارها نسبت به شاهد مشاهده شد. رقم مقاوم به قارچ (SBP-CL16) تحت تنش قارچ، افزایش بیان بیشتری نسبت به تنش نماتد نشان داد و در رقم مقاوم به نماتد (Silverstar) در تنش نماتد، افزایش بیان بیشتری مشاهده گردید. همچنین با اعمال همزمان تنش‌ها، ژن *NAC69-3* افزایش بیان بالاتری نسبت به اعمال هر تنش به صورت جداگانه داشت.

نتیجه گیری: فاکتورهای رونویسی NAC در اثر تنش‌های چندگانه القا می‌شوند، انتظار می رود دستکاری ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش چندگانه، بتواند فرصتی مناسب برای تولید گیاهانی متحمل به تنش‌های چندگانه با بازده بالا ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: عوامل مخرب غیرزیستی، عوامل بیماریزا، واکنش Real-time PCR

مقدمه

گندم (*T. aestivum* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی است که به عنوان یک منبع عمده در جهت تأمین کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت جهان شناخته می‌شود. در بین گونه‌های متعدد این گیاه، گونه‌ی *T. aestivum* یا گندم نان دارای بیشترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیشترین میزان تولید (۹۴ درصد) می‌باشد (۹). گیاهان در طول دوره رشد در معرض انواع تنش‌های زیستی (آفات و بیماری‌ها) و تنش‌های غیرزیستی (خشکی، شوری و گرما) قرار داشته که آنها را وادار به واکنش‌های فیزیولوژیک می‌نمایند (۴۳). تنش‌های محیطی موجب بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان، ازجمله، تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول، تغییر در سرعت رشد و عملکرد گیاهان می‌شوند (۳۵). بعد از عوامل بیماریزا، خشکی به عنوان دومین عامل اصلی کاهش‌دهنده‌ی رشد و عملکرد گیاهان مشخص شده است (۲). یکی از علل وقوع تنش خشکی هنگامی است که خروج آب از گیاه به واسطه‌ی فرآیند تعرق بیشتر از جذب آن از طریق ریشه باشد (۳۸). محصولات غلات مانند گندم در معرض بسیاری از عوامل بیماریزا و آفات از جمله نماتدهای انگلی (*Heterodera* spp.) تشکیل دهنده‌ی کیست قرار می‌گیرند که خسارات شدیدی به محصول حاصله وارد می‌نمایند. در حال حاضر، جنس *Heterodera* شامل بیش از ۹۰ گونه می‌باشد (۴۱) که از مهمترین گونه‌های اقتصادی در میان نماتدهای کیست غلات (CCN) گونه‌های *H. avenae*، *H. filipjevi* و *H. latipons* مشخص شده‌اند (۱). این نماتدها با تغذیه از ریشه‌ها، علائمی نظیر تورم بر روی ریشه، زردی، کم‌رشدی و باریک شدن برگ‌ها (علائمی شبیه به کمبود ازت)، کوتولگی بوته‌ها، کاهش پنجه‌دهی، کوچک شدن خوشه‌ها و کاهش عملکرد دانه ایجاد می‌نمایند (۲۰). اثبات شده است که نماتدهای *H. avenae* در مکان‌هایی که خشکی و کشت تک محصولی غلات همزمان رخ می‌دهد، از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت می‌باشند (۲۵). از دیگر بیماری‌های مهم غلات دانه‌ریز در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب جهان، بیماری فوزاریومی بلایت سنبله (FHB) می‌باشد که سالیانه خسارات فراوانی به این محصولات وارد می‌کند. FHB (Fusarium Head Blight) عمدتاً توسط دو عامل بیماریزا ایجاد می‌شود که قادر به آلوده کردن دانه‌ها با مایکوتوکسین‌ها می‌باشند شامل: قارچ *F. culmorum* Sacc و *F. graminearum* Schwabe (۲۹) و به دلیل بذرزاد و خاکزاد بودن عامل بیمارگر به‌عنوان توکسین‌های انسانی و حیوانی معرفی شده

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

است (۳۲). ازجمله خسارات بیماری، کاهش ۴۵-۲۶ درصد وزن هزار دانه (۴۶) و کاهش ۷۰-۳۰ درصد محصول (۲۱) می‌باشد که در اثر آلودگی شدید، خوشه‌ها سفید و عقیم و با تعداد کمی پنجه، بوته‌ها کوتاه، زودرس و مزارع مبتلا به صورت لکه‌ای زرد و کم‌رشد دیده می‌شوند (۱۸).

مکانیسم‌های دفاعی گیاهان برای تحمل این فشارهای محیطی شامل دریافت سیگنال، انتقال سیگنال از طریق مسیرهای وابسته به آبسزیک اسید (ABA) یا مستقل از ABA، بیان ژن پاسخ‌دهنده به تنش، فعال‌سازی منظم پاسخ‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌باشند (۳۰). خانواده‌های بزرگ فاکتور رونویسی NAC و عناصر cis در تعامل با آنها، در ناحیه پروموتر ژن‌های مختلف مرتبط با تنش به عنوان انتقال‌دهنده‌های مولکولی سیگنال تنشی عمل می‌کنند (۳۷) و از طریق سرکوب یا افزایش بیان این ژن‌ها، موجب مقاومت گیاه به هر دو نوع تنش زیستی و غیرزیستی می‌شوند (۵۳). ژن‌های خانواده NAC در تنظیم بسیاری از فرآیندهای گیاهی از جمله رشد و نمو دانه، گل، جنین، فیبر و در تشکیل مریستم رأس ساقه، پیری برگ، تقسیم سلولی، تشکیل دیواره‌های ثانویه و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کنند (۳۶،۴۲،۵،۱۴،۱۵،۴۰،۵۴،۳،۲۳). در این راستا، پژوهش حاضر با هدف بررسی الگوی بیان ژن فاکتور رونویسی *NAC69-3* تحت تنش‌هایی نظیر خشکی، قارچ *F. culmorum* و نماتد *H. filipjevi* و اثرات متقابل آنها در دو رقم گندم SBP-CL16 و Silverstar صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

بخش بیوانفورماتیک

در این پژوهش انتخاب فاکتور رونویسی مورد نظر و دستیابی به توالی آن، با استفاده از بانک داده‌های NCBI GEO (۶) صورت گرفت. به این منظور داده‌های ریزآرایه‌ی مربوط به تنش خشکی و شاهد گندم (GSE30436) و تنش فوزاریوم و شاهد گندم (GSE54556، GSE54552 و GSE43706) گردآوری شد و افزایش یا کاهش بیان ژن‌های موجود در نتایج حاصل از آنالیز GEO2R مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ژن *NAC69-3* (با سطح احتمال ۵ درصد) به عنوان یکی از ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت، شناسایی گردید. قابل توجه است که برای مقایسه‌ی میزان بیان نسبی ژن‌های برتر در حالت تنش نماتد و شاهد گندم، مجموعه داده‌ای (DataSet) یافت نشد.

بخش تأیید آزمایشگاهی

در پژوهش حاضر بذرهای دو رقم گندم نان (*T. aestivum*) به نام‌های SBP-CL16 (مقاوم به قارچ) و رقمSilverstar (مقاوم به نماتد) از مرکز سیمیت ترکیه، تهیه و ضدعفونی شدند. بذور به مدت ۳ تا ۴ روز در دستگاه انکوباتور با دمای ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد جوانه زده و سپس هر پنج عدد بذر در یک گلدان حاوی خاک استریل کاشته شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شدند. در روز هفتم پس از کشت، اعمال تنش‌های مورد نظر بر روی گیاهچه‌ها صورت گرفت.

جهت اعمال تنش خشکی، محاسبه‌ی ظرفیت زراعی خاک مورد نیاز است. به این منظور حجم مشخصی از آب به مخلوط خاک مورد استفاده در آزمایش اضافه شد، به اندازه‌ای که از کف گلدان خارج شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، میزان آب خارج شده از گلدان اندازه‌گیری شده و از میزان آب اولیه‌ی اضافه شده به گلدان کسر شد تا ظرفیت زراعی ۱۰۰ درصد بدست آید. بنابراین برای تنش خشکی ۴۰ درصد، در هر نوبت از آبیاری به هر گلدان به میزان ۶۰ درصد از ظرفیت زراعی کل آب افزوده شد. از طرفی جهت اعمال تنش نماتد *H. filipjevi*، سیست‌های نماتد از نمونه‌های خاک منطقه‌ی Kırsehir-Yerkoy در کشور ترکیه جمع‌آوری و استخراج شدند. سیست‌های نگهداری شده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، جهت تحریک برای خروج لاروهای مرحله‌ی ۲ (J2) از تخم، به دمای اتاق ۱۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس جهت اعمال تنش نماتد، ریشه‌های هر گیاهچه در معرض ۴۰۰ عدد لارو مرحله‌ی ۲ قرار گرفتند (۴). اما جهت آلوده‌سازی هر گیاهچه با قارچ، ابتدا ایزوله‌ی *F. culmorum* خالص‌سازی شده و به روش مولکولی بدست آمده در برنامه‌ی بیمارگرهای خاکزی (SBP) سیمیت شناسایی شد. سپس به مدت ۱۰ روز بر روی محیط آگار مصنوعی در دستگاه نور فلورسانس رشد داده شدند. اسپورها از سطح محیط خراشیده شدند و در آب مقطر استریل به حالت سوسپانسیون درآمده و یک میلی‌لیتر آب مقطر حاوی یک میلیون اسپور به وسیله‌ی سمپلر در قسمت طوقه‌ی هر گیاهچه تزریق شد (۷).

پس از اتمام مراحل تنش، طی سه مقطع زمانی شامل ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷ روز پس از اعمال تنش‌ها، از نمونه‌های بافت ریشه، نمونه‌برداری و تا زمان استخراج RNA (به وسیله‌ی کیت RNA-total شرکت دنا زیست آسیا) در دمای ۸۰- نگهداری شدند. تأیید کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل ۱/۲ درصد آگارز، بررسی کمی میزان RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و سنتز cDNA با استفاده از کیت مربوط به شرکت تاکارا PrimeScript^{TM} RT reagent Kit انجام و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آغازگرهای ژن *NAC69-3* و ژن خانه‌دار *ACTIN* (کنترل داخلی) با استفاده از سایت http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi طراحی (جدول ۱) و جهت بررسی صحت آنها، از نرم‌افزار Oligo7، OligoAnalyzer و سایت OligoCalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) استفاده شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای انجام Real-time PCR

Table 1. Oligonucleotid primers designed for Real-time PCR

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر (۳'- ۵')	طول قطعه تکثیر شده (bp)	دمای اتصال (°C)
ACTIN	Sense Primer	5'- GAAGCTGCAGGTATCCATGAGACC-3'	۱۵۱	۶۰
	Antisense Primer	5'- AGGCAGTGATCTCCTTGCTCATC-3'		
NAC69-3	Sense Primer	5'- AAACCCGCTCATCTACTCGC-3'	۱۵۶	۶۰
	Antisense Primer	5'- ATGCCGTTGTACCTATCGCC-3'		

بررسی کمی میزان بیان ژن‌های *NAC69*-3 و *ACTIN* از طریق تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-time PCR) و با استفاده از کیت YTA SYBR Green Qpcr MasterMix 2X با حجم واکنش ۱۰ میکرولیتر (سایبرگرین ۵ میکرولیتر، cDNA ۳ میکرولیتر، آغازگر رفت ۱ میکرولیتر و آغازگر برگشت ۱ میکرولیتر) انجام شد. بررسی کمی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q (مربوط به شرکت کیاژن) و بر اساس برنامه‌ی دمایی و زمانی خاص در هر چرخه انجام گرفت (جدول ۲). مطالعه‌ی حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار جهت کاهش خطا در نتایج (۲ تکرار بیولوژیک مربوط به مرحله‌ی کشت در اتاقک رشد و ۲ تکرار تکنیکال مربوط به Real-time PCR)، تحت ۵ تیمار شامل سه تنش خشکی، نماتد و قارچ (هر تنش دارای دو سطح تنش و عدم تنش)، ارقام (SBP-CL16 و Silverstar) و زمان نمونه‌برداری (۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از اعمال تنش) در آزمایشگاه دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شهرکرد انجام گرفت. برای تعیین تغییرات الگوی بیان نسبی ژن *NAC69*-3 در حالت تنش نسبت به حالت کنترل و همچنین برای نرمال‌سازی داده‌های سیکل آستانه‌ی (Ct) ژن *NAC69*-3 با داده‌های ژن کنترل داخلی (*ACTIN*) از روش دلتا دلتا سی تی ($2^{-[\Delta\Delta Ct]}$) استفاده شد (۱۷). سپس با کمک نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۶، تجزیه واریانس داده‌های نرمال با روش مدل خطی عمومی (GLM) انجام شد (جدول ۳).

جدول ۲- برنامه‌ی تناوب دمایی برای واکنش Real-time PCR

Table 2. Thermocycler program for Real-time PCR reaction

مرحله	زمان	دما (°C)
واسرشتگی اولیه (Primary denaturation)	۱۰ Min	۹۵ °C
واسرشتگی ثانویه (Secondary denaturation)	۱۵ Sec	۹۵ °C
اتصال (Annealing)	۳۰ Sec	۶۰ °C
تکثیر (Extension)	۳۰ Sec	۷۲ °C

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳ نشان داد که اثرات همه تیمارها بر میزان افزایش بیان ژن معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثرات متقابل به این معنی است که در پژوهش حاضر تیمارها به صورت مستقل از هم عمل نمی‌کنند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان ژن *NAC69-3* در دو رقم SBP-CL16 و Silverstar، تحت سه تیمار خشکی، نماتد و قارچ و اثرات متقابل آنها در سه زمان

Table 3. Analysis of variance of *NAC69-3* gene expression in two cultivars SBP-CL16 and Silverstar, under three drought treatments, nematode and fungus and their interactions at three times

منابع تغییر (تیمارها)	درجه آزادی	میانگین مربعات (واریانس)
خشکی	۱	۸۴۸۲/۹۵۷*
نماتد	۱	۳۳۹۹/۴۸۹ *
قارچ	۱	۱۰۰۹/۵۳۸*
رقم	۱	۷۰۰/۲۹۵*
زمان	۲	۱۲۹۴۷/۹۰۱*
خشکی×نماتد	۱	۲۴۸۹/۵۱۳*
خشکی×قارچ	۱	۲۱۴/۸۹۳*
خشکی×رقم	۱	۲۶۳۱/۳۰۲*
خشکی×زمان	۲	۱۱۵۹۵/۹۷۷*
نماتد×قارچ	۱	۸۶۳/۱۳۳*
نماتد×رقم	۱	۶۴۳۰/۹۱۵*
نماتد×زمان	۲	۳۷۳۶/۶۸۱*
قارچ×رقم	۱	۶۵۹۲/۱۷۳*
قارچ×زمان	۲	۱۶۵/۵۲۳*
رقم×زمان	۲	۱۲۳۵/۹۱۰*
خشکی×نماتد×قارچ	۱	۱۳۷/۳۴۷*
خشکی×نماتد×رقم	۱	۱۶۹۲/۹۳۲ *
خشکی× نماتد×زمان	۲	۲۰۱۱/۸۸۴*
خشکی×قارچ×رقم	۱	۲۷۶۰/۹۵۴*
خشکی×قارچ×زمان	۲	۳۷۹/۷۵۳*
خشکی×رقم×زمان	۲	۱۴۸۳/۲۹۹*
نماتد×قارچ×رقم	۱	۱۱۸/۶۶۴ *
نماتد×قارچ×زمان	۲	۴۹۳/۷۳۲*
نماتد×رقم×زمان	۲	۳۷۳۲/۴۸۴*
قارچ×رقم×زمان	۲	۴۵۵۹/۸۴۸*
خشکی×نماتد×قارچ×رقم	۱	۲۰۸۲/۰۷۱*
خشکی×نماتد×قارچ×زمان	۲	۴۹۶/۵۳۵*
خشکی×نماتد×رقم×زمان	۲	۵۲۷۱/۱۱۰ *
خشکی×قارچ×رقم×زمان	۲	۴۷۱۱/۵۹۷ *
نماتد×قارچ×رقم×زمان	۲	۵۸۹/۵۷۶*
خشکی×نماتد×قارچ×رقم×زمان	۲	۱۹۰/۷۹۵ *
خطای آزمایشی	۱۴۴	۶/۰۳۷
ضریب تغییرات (CV)		۱۸/۹۴

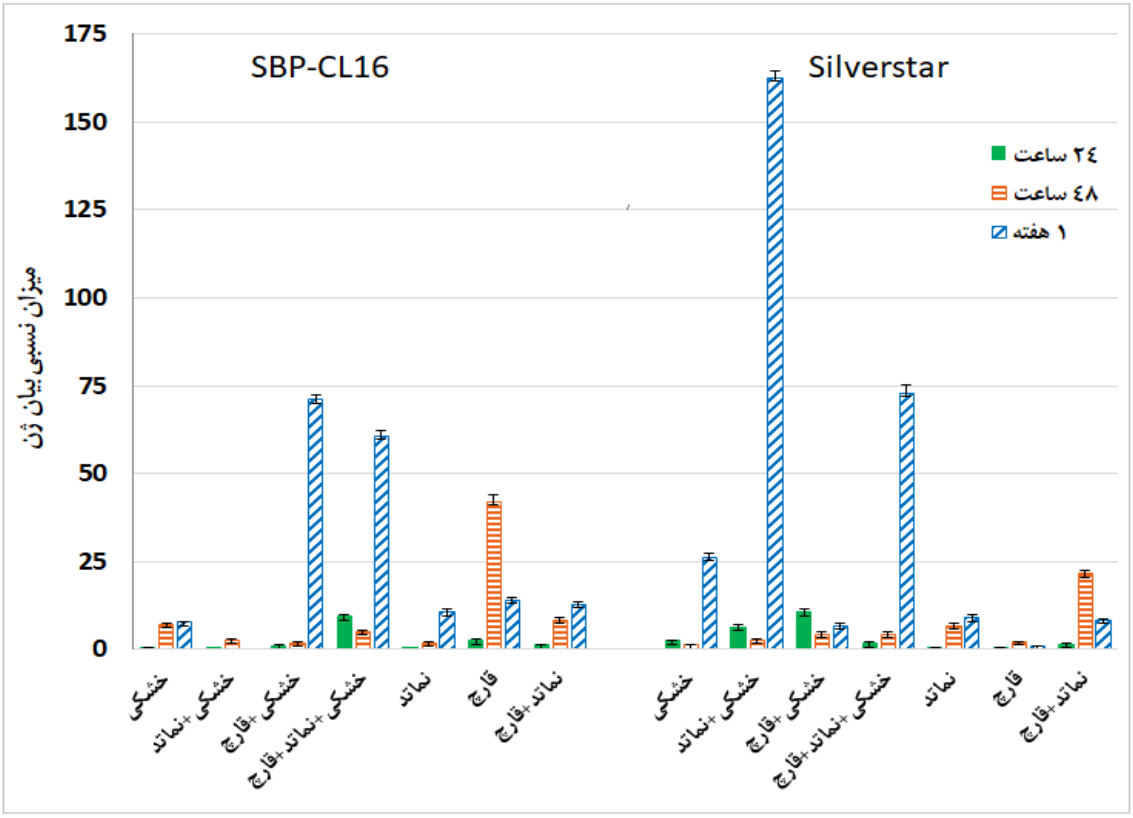
*: معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد؛ ns: غیرمعنی‌دار بودن

مقایسه‌ی الگوی بیان نسبی ژن *NAC69-3* در دو رقم SBP-CL16 و Silverstar

میزان تغییرات الگوی بیان نسبی ژن *NAC69-3* تحت تنش‌های خشکی، نماتد، قارچ، خشکی-نماتد، خشکی-قارچ، نماتد-قارچ و خشکی-نماتد-قارچ در دو رقم Silverstar و SBP-CL16 در ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته پس از اعمال تنش‌ها در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج حاکی از افزایش میزان بیان ژن *NAC69-3* در دو رقم مقاوم به قارچ SBP-CL16 و مقاوم به نماتد Silverstar در اکثر تیمارها نسبت به شاهد در سه زمان نمونه‌برداری می‌باشد. با توجه به شکل ۱ می‌توان دریافت که در رقم SBP-CL16 بیشترین میزان نسبی بیان معنی‌دار نسبت به سایر تنش‌ها، در زمان یک هفته پس از اعمال تنش‌ها در تیمار خشکی-قارچ (۷۱/۱۶ برابر) و خشکی-نماتد-قارچ (۶۰/۷۶ برابر) و در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش‌ها در تنش قارچ (۴۱/۹۷ برابر) و کمترین میزان بیان، تحت تیمار خشکی-نماتد دیده شد. در رقم Silverstar بیشترین میزان نسبی بیان معنی‌دار در زمان یک هفته پس از اعمال تنش‌ها در تیمار خشکی-نماتد (۱۶۲/۸۲ برابر) و خشکی-نماتد-قارچ (۷۲/۹۴ برابر) و کمترین میزان بیان در تیمار قارچ دیده شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]



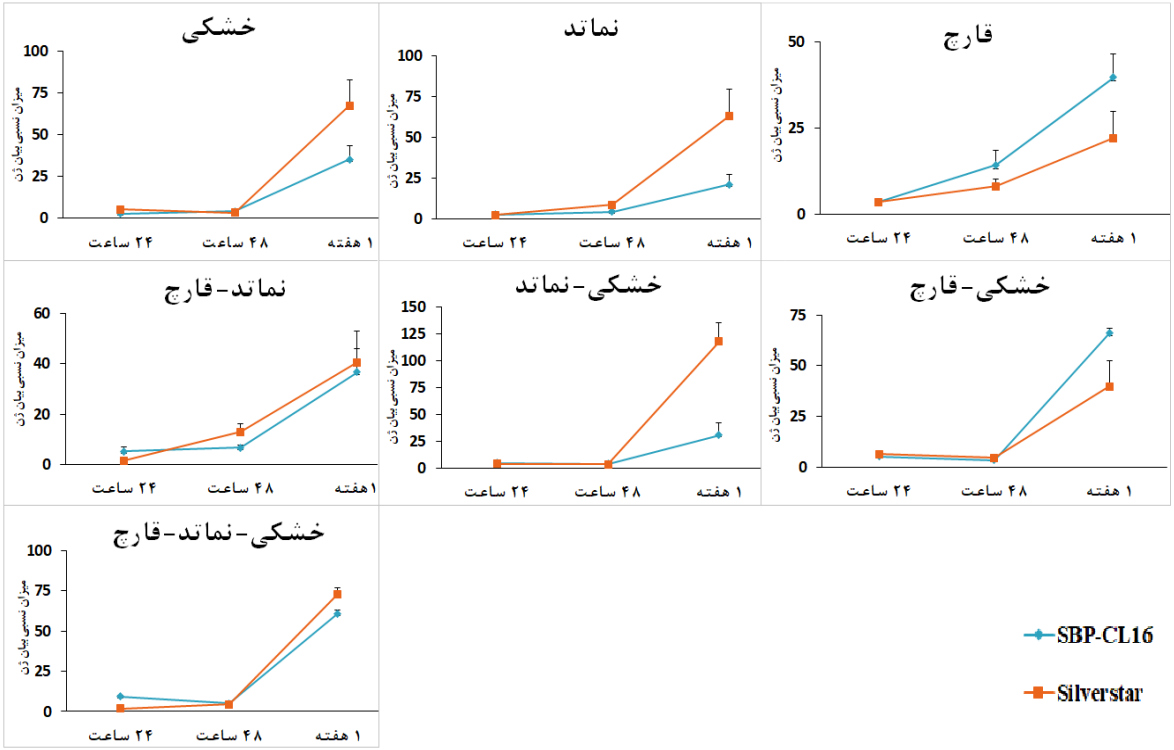
شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن *NAC69-3* در دو رقم SBP-CL16 و Siverstar در ۳ زمان نمونه‌برداری پس از اعمال تنش‌های جداگانه و ترکیبی در ریشه‌ی گندم نان

Figure 1. Gene expression pattern of *NAC69*-3 in two cultivars SBP–CL16 and Silverstar, at three sampling times after applying separate and combined stresses conditions in bread wheat root

مقایسه‌ی اثرات تنش‌های مختلف بر میزان بیان ژن *NAC69-3* در دو رقم SBP-CL16 و Silverstar

با توجه به شکل ۲، بیان ژن *NAC69-3* در هر دو رقم SBP-CL16 و Silverstar، تحت اعمال تنش‌های جداگانه و ترکیبی روند صعودی داشته به گونه‌ای که در زمان یک هفته بعد از اعمال تنش به طور معنی‌داری به بیشترین میزان خود رسید. با بررسی روند بیان تحت تنش‌های جداگانه می‌توان دریافت که بیشترین میزان بیان در رقم Silverstar، تحت تنش نماتد و خشکی و بیشترین میزان بیان در رقم SBP-CL16 تحت تنش قارچ مشاهده شد. در صورتیکه با بررسی روند بیان تحت تنش ترکیبی مشاهده شد که بیشترین میزان بیان در رقم Silverstar تحت تنش خشکی–نماتد، نماتد–قارچ و خشکی–نماتد–قارچ و بیشترین میزان بیان در رقم SBP-CL16 تحت تنش خشکی–قارچ دیده شد (شکل ۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]



شکل ۲- اثرات تنش‌های خشکی، نماتد و قارچ و ترکیبات دوتایی و سه‌تایی آنها بر میزان بیان ژن *NAC69-3* در دو رقم SBP-CL16 و Silverstar در ریشه‌ی گندم نان

Figure 2. Effects of drought stresses, nematode, and Fungus and their combination conditions on the *NAC69-3* gene expression in two cultivars SBP-CL16 and Silverstar, in bread wheat root

پاسخ ایمنی در گیاهان آلوده به پاتوژن، شامل فعال‌شدن پاسخ‌های دفاعی متعدد از جمله بیان مجموعه‌ی بزرگ از ژن‌های مرتبط با دفاع می‌باشد که توسط انواع مختلف فاکتورهای رونویسی (TFs) تنظیم می‌شود (۴۴). یک ویژگی مشترک اعضای خانواده فاکتور رونویسی NAC این است که آنها حاوی یک دومین محافظت شده‌ی NAC (با تقریباً ۱۵۰-۱۶۰ اسیدهای آمینه) در انتهای N هستند که معمولاً به پنج زیر دومین A، B، C، D و E تقسیم می‌شود (۲۸) و همچنین حاوی یک دومین تنظیمی بسیار متغیر در انتهای C می‌باشند. انتهای C غنی از سرین، ترئونین، پرولین و برخی اسیدهای آمینه‌ی اسیدی است و می‌تواند بیان ژن‌های هدف پایین‌دست را فعال یا سرکوب کند (۲۷). عملکرد دومین NAC با محل‌یابی هسته‌ای، اتصال به DNA و تشکیل همودایمرها یا هترودایمرها با سایر پروتئین‌های حاوی دومین NAC همراه بوده است (۲۷) که از طریق تعامل با آنها به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهد (۴۸). نتایج بسیاری از گزارش‌ها نشان داد که اکثر اعضای خانواده‌ی NAC در پاسخ‌های تنش غیرزیستی مانند خشکی، شوری، سرما و غرقابی نقش دارند (۱۱،۲۶) اما برخی دیگر از آنها در هر دو پاسخ به تنش غیرزیستی و زیستی مانند آلودگی پاتوژنی شرکت می‌کنند (۱۹،۴۹،۵۰).

مثال‌های بسیاری وجود دارد که کاهش یا افزایش بیان ژن *NAC* بر دفاع گیاه تأثیر دارد. به عنوان مثال برخی از فاکتورهای رونویسی (OsNAC6 و غیره) در تنظیم پاسخ‌های دفاعی در برابر *Magnaporthe grisea* عمل می‌کنند (۲۴). OsNAC19 یک فاکتور رونویسی با دومین NAC می‌باشد که توسط ژن *OsNAC19* رمزگذاری می‌شود. بیان OsNAC19 در برگ‌های برنج تلقیح شده با نژاد ناسازگار ۱۳۱ *M. grisea* به شدت توسط آلودگی قارچ بلاست برنج افزایش یافت و همچنین این ژن در هنگام استفاده از متیل جاسمونیک اسید (MeJA) برونزاد نیز نسبت به ABA و اتیلن می‌تواند به طور مؤثرتری افزایش بیان یابد (۱۶). طبق نتایج مطالعات انجام شده، استفاده از مقاومت ژنتیکی در جهت تولید ارقام مقاوم، مؤثرترین روش کنترل پایدار بیماری فوزاریومی بلایت سنبله می‌باشد (۱۳). در این راستا بررسی‌های انجام شده بر روی TaNACL-D1 (فاکتور رونویسی مانند NAC در *T. aestivum*) نشان داد که TaNACL-D1 می‌تواند با *TaFROG* (ژن مقاوم به بیماری قارچ فوزاریوم در *T. aestivum*) تعامل داشته باشد و مقاومت گندم را در برابر بیماری FHB به طور مثبت افزایش دهد (۳۱). همچنین در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که در رقم گندم مقاوم به قارچ CBP-CL16، تحت تنش قارچ *F. culmorum* و یا تنش ترکیبی شامل خشکی-قارچ و خشکی-نماتد-قارچ، میزان بیان ژن *NAC69-3* افزایش چشمگیری یافته و در مقاومت این رقم نقش دارد.

جاسمونیک اسید (JA) یک فیتو هورمون کاملاً توصیف شده است که از نظر عملکردی در تنظیم پاسخ به تنش زیستی و جراحت نقش دارد. ژن‌های *NAC* پاسخ‌دهنده به

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

تنش (مربوط به گروه SNAC) در آرابیدوپسیس، مانند *RD26*، به جاسمونیک اسید پاسخ می‌دهند، پس از این‌رو، قابل قبول است که در نظر بگیریم، فاکتورهای SNAC پاسخ‌دهنده به جاسمونیک اسید ممکن است که در هر دو پاسخ تنش زیستی و غیرزیستی شرکت نمایند (۸).

نعیمی و همکاران (۲۲) مشاهده کردند که با افزایش سطوح تنش خشکی، میزان بیان ژن *NAC* در پنج ژنوتیپ گندم دوروم افزایش یافت و بیشترین میزان بیان ژن *TaNAC2A* در هنگام تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به نمونه‌ی کنترل، در ژنوتیپ شبرنگ دیده شد. همچنین به صورت مشابه در گزارشی جهت شناسایی ژن‌های مسئول ویژگی تحمل به خشکی بین ارقام گندم C306، WL711 و RIL bulks (Recombinant inbred line) از طریق تلفیق آنالیزهای QTL با آنالیزهای بیان، کتابخانه‌های انتخابی گیاهان متحمل به تنش خشکی (C306 و RIL bulks) افزایش بیان ژن‌هایی نظیر *NAC69-3*، *WLIP19*، *NAC2*، *WRKY71* و *WRKY45* را نشان دادند (۱۲). در ناحیه‌ی پروموتر ژن *TaNAC069* (بسیار همولوگ *TaNAC69* است) دو عنصر فعال پاسخ‌دهنده به کم‌آبی (DRE) و پاسخ‌دهنده به ABA (ABRE) شناسایی شد. پروتئین‌های متصل‌شونده به این عناصر فعال پاسخ‌دهنده به کم‌آبی، خانواده‌ی بزرگی از فاکتورهای رونویسی هستند که موجب بیان تعداد زیادی از ژن‌های عملکردی مسئول مقاومت در برابر تنش غیرزیستی در گیاهان می‌شوند (۳۹). همچنین به دلیل ماهیت آلوپلی‌پلوئید گندم هگزاپلوئید به احتمال زیاد ژن *TaNAC69* دارای چندین ژن همولوگ می‌باشد (*TaNAC69-1*، *TaNAC69-2*، *TaNAC69-3* و *TaNAC69-4*) که به دلیل شباهت بیش از ۹۵ درصد اسید آمینه در سطح توالی پروتئین کل ممکن است که عملکردهای بیولوژیکی یکسان یا مشابه داشته باشند (۱۶) و طبق نتایج تجریه و تحلیل داده‌های بیان افی‌متریکس (https://www.affymetrix.com/) در ریشه‌ی گندم، این ژن تحت شرایط بدون تنش به طور دائمی در سطح متوسط و بیش از ۱۰ برابر در طول تنش خشکی بیان می‌شود (۵۲). مشابه با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، تحت تنش خشکی، میزان بیان ژن *NAC69-3* نسبت به حالت شاهد در هر دو رقم مقاوم به قارچ (۷/۸۴ برابر) و مقاوم به نماتد (۲۶/۳۲ برابر) افزایش یافت. از طرفی نتایج حاصل از ارزیابی نقش ژن *TaNAC069* در گندم آلوده به *Puccinia triticina* با استفاده از سیستم خاموشی ژن BSMV-VIGS نشان داد که، این ژن از طریق تنظیم رونویسی ژن‌های خاص مقاومت در برابر بیماریزایی، مانند فعال‌سازی ژن‌های Pathogenesis-Related (Gene *PR*) یا مهار ژن‌های مربوط به پاکسازی انواع اکسیژن فعال (ROS)، نقش مثبتی در مقاومت گندم در برابر زنگ زدگی برگ (*Pt*) دارد. پس در نتیجه داده‌های بیان به وضوح نشان داد که بیان ژن‌های *TaNAC69-3* تحت تأثیر عوامل تنشی چندگانه نظیر خشکی، سرما، غلظت نمک زیاد و پاتوژن می‌باشند (۵۱).

گیاهانی با بیان بیش از حد ژن‌های *NAC*، ممکن است گاهاً به تنش‌های مختلف پاسخ متضاد داشته باشند (۳۷). به عنوان مثال در پژوهشی مشابه با نتایج این پژوهش مطالعات حاضر دیده شد که گیاهان آرابیدوپسیس مقاوم به خشکی که بیش از حد *ATAF1* را بیان می‌کنند، نسبت به ABA، تنش اکسیداتیو، شوری زیاد و قارچ نکروتروفیک *Botrytis cinerea* بسیار حساس بودند (۴۷) به گونه‌ای که در مطالعه‌ی حاضر تحت تنش خشکی، افزایش بیان ژن (۲۶/۳۲ برابر) در رقم گندم Silverstar دیده شد در حالی‌که با قرار گرفتن گیاه در معرض تنش قارچ از میزان بیان ژن کاهش و حساسیت این رقم به قارچ افزایش یافت. *ATAF1* و همولوگ آن *HvNAC6* در جو به طور مثبت مقاومت در برابر نفوذ قارچ بیوتروفیک *Blumeria graminis* F.sp. *hordei* (Bgh) را افزایش می‌دهد، اما مقاومت در برابر سایر عوامل بیماریزا مانند *Pseudomonas syringae*، *Botrytis cinerea* و *Alternaria brassicicola* را کاهش می‌دهد (۱۰،۴۵). همچنین در نتایج حاصل از پژوهش حاضر، افزایش بیان ژن *NAC69-3* در اثر تیمار قارچ *F. culmorum* موجب پاسخ‌های مقاومتی و افزایش مقاومت به قارچ در رقم گندم CBP-CL16 گردید، در صورتیکه با کاهش میزان بیان این ژن در اثر تیمار نماتد *H. filipjevi* و یا تیمار همزمان تنش نماتد–قارچ، میزان حساسیت این رقم به تنش نماتد افزایش یافت. این در حالی بود که رقم گندم Silverstar در اثر اعمال تنش‌های پاتوژنی، پاسخ مقاومتی متفاوتی نشان داد و با افزایش یافتن میزان بیان ژن در اثر اعمال تنش نماتد نسبت به تنش قارچی، مقاومت این رقم به تنش نماتد افزایش یافت. قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش همزمان خشکی و عفونت پاتوژنی به دلیل توانایی ذاتی گیاهان در القای استراتژی‌های منحصر به فرد اختصاصی، می‌تواند منجر به تحمل به هر دو تنش شود. برعکس، همچنین می‌تواند به دلیل توانمندی ضعیف شده‌ی گیاهان به دلیل تشدید صدمات ناشی از یک تنش از سوی دیگر موجب حساسیت بیشتر به هر دو تنش شود (۳۳). تحت این شرایط، ترکیبی از تنش‌های چندگانه الگوی بی‌نظیری از بیان ژن را ایجاد می‌کند که از الگوی بیان هر تنش به صورت جداگانه، متمایز است (۳۴). در مطالعه‌ی حاضر بر روی الگوی بیان ژن *NAC69-3*، می‌توان دریافت که رقم گندم Silverstar تحت تنش سه‌گانه‌ی خشکی–نماتد–قارچ، افزایش بیان چشمگیری (۷۲/۹۴ برابر) در مقایسه با تیمار هر تنش به صورت جداگانه نشان داد. الگوی بیان ژن در این مطالعه، نتایج ریزآرایه‌ی بخش NCBI GEO مبنی بر افزایش بیان ژن *NAC60-3* در ارقام متحمل به خشکی و مقاوم به پاتوژن را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که این ژن در ایجاد تحمل به خشکی و مقاومت در برابر عوامل بیماریزای *F. culmorum* و *H. filipjevi* در ارقام گندم SBP-CL16 و Silverstar نقش دارد.

گیاه گندم از با ارزش‌ترین محصولات غله‌ای دنیا می‌باشد و همین‌طور به دلیل سازگاری بالا، اکثرا در مناطق خشک با بارندگی اندک و متغییر کشت می‌شود. بنابراین پژوهش‌هایی در زمینه‌های شناسایی ژن‌های دخیل در پاسخ گیاه به

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

تنش‌های زیستی و غیرزیستی به منظور دستکاری گیاه گندم با هدف بهبود عملکرد و افزایش تحمل به تنش‌های منفرد یا چندگانه بسیار اهمیت دارد. نتایج الگوی بیان نسبی ژن *NAC69-3* در پژوهش حاضر نشان داد که در بافت ریشه‌ی گندم، در هر دو رقم مقاوم به قارچ و مقاوم به نماتد، میزان بیان ژن مورد نظر تحت تنش ترکیبی خشکی-پاتوژن در زمان یک هفته بعد از اعمال تنش، نسبت به سایر تیمارها بسیار بیشتر بوده است. به این ترتیب، افزایش مطالعات مولکولی در مورد فاکتورهای رونویسی NAC تحت شرایط مختلف تنشی، موجب روشن شدن مکانیسم‌های تنظیم دقیق در گیاهان شده که توسط پروتئین‌های NAC کنترل می‌شود و این از مزایای اقتصادی برای تولید محصولات کشاورزی می‌باشد.

منابع

1. Akar, T., M. Caliskan, J.M. Nicol, S.U. ranbey, E. Sahin, S. Yazar, M. William and H.J. Braun. 2009. Molecular characterization of Cereal Cyst Nematode diagnostic markers Cre1 and Cre3 in some winter wheat germplasm and their potential use against *Heterodera filipjevi*. Field Crops Research, 114(2): 320-323.
2. Biglouei, M., M. Assimi and A. Akbarzadeh. 2010. Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of Virginia (flue-cured) tobacco type. Plant, Soil and Environment, 56(2): 67-75.
3. Breeze, E., E. Harrison, S. McHattie, L. Hughes, R. Hickman, C. Hill, S. Kiddle, Y-S. Kim, Ch.A. Penfold, D. Jenkins, C. Zhang, K. Morris, C. Jenner, S. Jackson, B. Thomas, A. Tabrett, R. Legaie, J.D. Moore, D.L. Wild, S. Ott, D. Rand, J. Beynon, K. Denby, A. Mead and V. Buchanan-Wollaston. 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. Plant Cell, 23(3): 873-894.
4. Dababat, A.A., S. Pariyar, J. Nicol, G. Erginbas Orakci, M. Goll, C. Watrin, E. Duveiller and H.J. Braun. 2014. Influence of thiabendazole seed treatment on the integrated control of *Heterodera filipjevi* on six wheat genotypes with different levels of genetic resistance under controlled conditions. Nematropica, 44(1): 25-30.
5. Duval, M., T.F. Hsieh, S.Y. Kim and T.L. Thomas. 2002. Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. Plant Molecular Biology, 50(2): 237-248.
6. Edgar, R., M. Domrachev and A.E. Lash. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Research, 30(1): 207-210.
7. Erginbas-Orakci, G., G. Poole, J.M. Nicol, T. Paulitz, A.A. Dababat and K. Campbell. 2016. Assessment of inoculation methods to identify resistance to *Fusarium* crown rot in wheat. Journal of Plant Diseases and Protection, 123(1): 19-27.
8. Fujita, M., Y. Fujita, K. Maruyama, M. Seki, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, L-S.P. Tran, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. The Plant Journal, 39(6): 863-876.
9. Halim, G., Y. Emam and E. Shakeri. 2018. Evaluation of yield, yield components, and stress tolerance indices in bread wheat cultivars at post-anthesis irrigation cut-off. Journal of Crop Production and Processing, 7(4): 121-134 (In Persian).
10. Jensen, M.K., J.H. Rung, P.L. Gregersen, T. Gjetting, A.T. Fuglsang, M. Hansen, N. Joehnk, M.F. Lyngkjaer and D.B. Collinge. 2007. The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology, 65(1-2): 137-150.
11. Jeong, J.S., Y.S. Kim, K.H. Baek, H. Jung, S.H. Ha, Y.D. Choi, M. Kim, C. Reuzeau and J.K. Kim. 2010. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. Plant Physiology, 153(1): 185-197.
12. Kadam, S., K. Singh, S. Shukla, S. Goel, P. Vikram, V. Pawar, K. Gaikwad, R. Khanna-Chopra and N. Singh. 2012. Genomic associations for drought tolerance on the short arm of wheat chromosome 4B. Functional & Integrative Genomics, 12(3): 447-464.
13. Khodarahmi, M., M. Dehghan and A. omrani. 2020. Genetic analysis of resistance to wheat *Fusarium* Head Blight in Morvarid (resistant) × Falat (sensitive) cross. Journal of Crop Breeding, 12(34): 62-70 (In Persian).
14. Kim, Y.S., S.G. Kim, J.E. Park, H.Y. Park, M.H. Lim, N.H. Chua and C.M. Park. 2006. A membrane - bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 18(11): 3132-3144.
15. Ko, J.H., S.H. Yang, A.H. Park, O. Lerouxel and K.H. Han. 2007. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively Regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 50(6): 1035-1048.
16. Lin, R., W. Zhao, X. Meng, M. Wang and Y. Peng. 2007. Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. Plant Science, 172(1): 120-130.
17. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25(4): 402-408.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

18. Mansoori, B., A.A. Ravanlu, K. Noorullahi, N. Azadbakht, H. Jafari and M. Qalandar. 2002. Common wheat crown rot disease in Western Azerbaijan, Ilam, Lorestan, Zanjan and Markazi provinces. Articles abstract of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Razi University of Kermanshah, Iran, 41 pp (In Persian).
19. Mauch-Mani, B. and V. Flors. 2009. The ATAF1 transcription factor: at the convergence point of ABA-dependent plant defense against biotic and abiotic stresses. Cell Research, 19(12): 1322-1323.
20. McDonald, A. and J. Nicol. 2005. Nematode parasites of cereals. In: Luc, M., R.A. Sikora and J. Bridge (eds.) Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI publishing, France. 131-191 pp.
21. Mcknight, T. and J. Hart. 1966. Some field observation on Crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum*. Queensland Journal Agriculture Animal Science, 23(1): 373-378.
22. Naeemi, T., L. Fahmideh, and B.A. Fakheri. 2020. Assessment of *TaNAC2A* gene expression and ascorbate peroxidase, catalase enzymes of five Durum wheat genotypes (*Triticum turgidum* L.) under drought stress. Journal of Crop Breeding, 12(33): 20-28 (In Persian).
23. Nakashima, K., H. Takasaki, J. Mizoi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1819(2): 97-103.
24. Nakashima, K., L.S.P. Tran, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama, D. Todaka, Y. Ito, N. Hayashi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. The Plant Journal, 51(4): 617-630.
25. Nicol, J.M. and R. Rivoal. 2008. Global knowledge and its application for the integrated control and management of nematodes on wheat. In: Ciancio, A. and K.G. Mukerji (eds.) Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. 243-287 pp., Springer, Netherlands.
26. Nuruzzaman, M., A.M. Sharoni, K. Satoh, A. Moumeni, R. Venuprasad, R. Serraj, A. Kumar, H. Leung, K. Attia and S. Kikuchi. 2012. Comprehensive gene expression analysis of the NAC gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near-isogenic lines (NILs) generated from crossing A day Selection (drought tolerant) and IR64. Molecular Genetics and Genomics, 287(1): 389-410.
27. Olsen, A.N., H.A. Ernst, L.L. Leggio and K. Skriver. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends in plant science, 10(2): 79-87.
28. Ooka, H., K. Satoh, K. Doi, T. Nagata, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, N. Osato, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Suzuki, K. Kojima, Y. Takahara, K. Yamamoto and S. Kikuchi. 2003. Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Research, 10(6): 239-247.
29. Parry, D.W., P. Jenkinson and L. Mcleod. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals, a review. Plant Pathology, 44(2): 207-238.
30. Pérez-Clemente, R.M., V. Vives, S.I. Zandalinas, M.F. López-Climent, V. Muñoz and A. Gómez-Cadenas. 2013. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. BioMed Research International, 2013(12): 654120.
31. Perochon, A., A. Kahla, M. Vranić, J. Jia, K.B. Malla, M. Craze, E. Wallington and F.M. Doohan. 2019. A wheat NAC interacts with an orphan protein and enhances Fusarium head blight disease resistance. Plant Biotechnology Journal, 17(10): 1892-1904.
32. Placenta, C.M., J.P.F. D'Mello and A.M.C. Macdonald. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. Animal Feed Science and Technology, 78(1-2): 21-37.
33. Ramegowda, V. and M. Senthil-Kumar. 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. Journal of Plant Physiology, 176(2015): 47-54.
34. Rasmussen, S., P. Barah, M.C. Suarez-Rodriguez, S. Bressendorff, P. Friis, P. Costantino, A.M. Bones, H.B. Nielsen and J. Mundy. 2013. Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 161(4): 1783-1794.
35. Reddy, A.R., K.V. Chaitanya and M. Vivekanandan. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161(11): 1189-1202.
36. Sablowski, R.W. and E.M. Meyerowitz. 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/pistillata*. Cell, 92(1): 93-103.
37. Shao, H., H. Wang and X. Tang. 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. Front Plant Science, 6(1): 902.
38. Shepherd, A., S. McGinn and G. Wyseure. 2002. Simulation of the effect of water shortage on the yields of winter wheat in North-East England. Ecological Modelling, 147(1): 41-52.
39. Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks areinvolved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58(2): 221-227.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

40. Sperotto, R.A., F.K. Ricachenevsky, G.L. Duarte, T. Boff, K.L. Lopes, E.R. Sperb, M.A. Grusak and J.P. Fett. 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. Planta, 230(1): 985-1002.
41. Subbotin, S.A., M. Mundo-Ocampo and J.G. Baldwin. 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). In: Hunt, D.J. and R.N. Perry (eds.) Nematology Monographs and Perspectives. Brill, Netherlands. 512 pp.
42. Takada, S., K. Hibara, T. Ishida and M. Tasaka. 2001. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. Development, 128(7): 1127-1135.
43. Tas, S. and B. Tas. 2007. Some physiological responses of drought stress in wheat genotypes with different ploidy in Turkiye. World Journal of Agriculture and Science, 3(2): 178-183.
44. Van Loon, L.C., M. Rep and C.M. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, 44(1): 135-162.
45. Wang, X., B.M.V.S. Basnayake, H. Zhang, G. Li, W. Li, N. Virk, T. Mengiste and F. Song. 2009. The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. International Society for Molecular Plant-Microbe Interaction, 22(10): 1227-1238.
46. Wilcoxson, R.D., R.H. Bush and E.A. Ozmon. 1992. *Fusarium* head blight resistance in spring wheat cultivars. Plant Disease, 76(7): 658-661.
47. Wu, Y., Z. Deng, J. Lai, Y. Zhang, C. Yang, B. Yin, Q. Zhao, L. Zhang, Y. Li, C. Yang and Q. Xie. 2009. Dual function of *Arabidopsis ATAF1* in abiotic and biotic stress responses. Cell Research, 19(1): 1279-1290.
48. Wu, D., Y. Sun, H. Wang, H. Shi, M. Su, H. Shan, T. Li and Q. Li. 2018. The *SlNAC8* gene of the halophyte *Suaeda liaotungensis* enhances drought and salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Gene, 662(1): 10-20.
49. Xia, N., G. Zhang, X.Y. Liu, L. Deng, G.L. Cai, Y. Zhang, X.J. Wang, J. Zhao, L.L. Huang and Z.S. Kang. 2010b. Characterization of a novel wheat *NAC* transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. Molecular Biology Reports, 37(1): 3703-3712.
50. Xia, N., G. Zhang, Y.F. Sun, L. Zhu, L.S. Xu, X.M. Chen, B. Liu, Y.T. Yu, X.J. Wang, L.L. Huang and Z.S. Kang. 2010a. *TaNAC8*, a novel *NAC* transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74(5-6): 394-402.
51. Xue, G.P., H.M. Way, T. Richardson, J. Drenth, P.A. Joyce and C.L. McIntyre. 2011. Overexpression of *TaNAC69* leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. Molecular Plant, 4(4): 697-712.
52. Xue, G.P., N.I. Bower, C.L. McIntyre, G.A. Riding, K. Kazan and R. Shorter. 2006. TaNAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences. Functional Plant Biology, 33(1): 43-57.
53. Zhang, X.M., Q. Zhang, C.L. Pei, X. Li, X. Huang, C.Y. Cheng, X. Wang, L.L. Huang and Z. Kang. 2018. TaNAC2 is a negative regulator in the wheat-stripe rust fungus interaction at the early stage. Physiological and Molecular Plant Pathology, 102(1): 144-153.
54. Zhong, R., C. Lee and Z.H. Ye. 2010. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switchesin *Arabidopsis*. Molecular Plant, 3(6): 1087-1103.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]

The Effect of Drought Stresses, *Fusarium Culmorum* and *Heterodera Filipjevi* and their Interactions on the Expression Pattern of Transcription Factor Gene *NAC69-3* in Bread Wheat

Mozhgan Arkan[1], Neda Mirakhorli[2], Leila Shabani[3] and Abdelfatah Amer Dababat[4]

1- M.Sc. Student in Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, (Corresponding author: neda.mirakhorli.54@gmail.com)
3- Associate Professor, Department of biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4- Associate Professor, International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), Ankara, Turkey
Received: 6 October 2021 Accepted: 9 January 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Small grain cereals such as wheat, are affected by types of destructive environmental factors such as abiotic and biotic stresses that severely reduce crop yields. To cope with these conditions, transcription factors cause plant resistance to these stresses by activating or suppressing the expression of genes involved in the resistance responses. In the present study, the transcription factor *NAC69-3* gene expression pattern was investigated.

Material and Methods: To determine and select resistance genes to biotic and abiotic stresses, *Triticum aestivum* microarray data at the NCBI GEO site were reviewed and the NAC69-3 transcription factor was selected for laboratory confirmation. two wheat cultivars SBP-CL16 (resistant to fungus) and Silverstar (resistant to nematode) were under drought, *Fusarium culmorum,* and *Heterodera filipjevi,* and their simultaneous stress conditions. sampling was performed three times 24 h, 48 h, and 7 days after stress. Real-time PCR reactions were performed using specific primers of the *NAC69*-3 gene to investigate the expression pattern.

Results: This study showed a significant increase in the *NAC69*-3 gene relative expression at most treatments compared to the control in both wheat cultivars. Fungus-resistant cultivar (SBP-CL16) under fungus stress showed a higher increase in expression than nematode stress, while in nematode-resistant cultivar (Silverstar) high expression was observed under nematode stress conditions. Also, under simultaneous stresses conditions, *the C69*-3 gene has a higher expression level than the application of each stress separately.

Conclusion: NAC transcription factors are usually induced by multiple stresses, so maybe manipulation of these multiple stress-responsive genes will provide the opportunity to produce the multiple stress tolerance plants with high yields.

Keywords: Destructive abiotic factors, Pathogens, Real-time PCR reaction

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.41.42]