ارزیابی برخی صفات بیوشیمیایی و بیان دو ژن از خانواده *MYB* در دو رقم گندم تحت تنش خشکی

سعید نواب‌پور[۱،*] و حوریه نجفی[۲]

۱- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۶)

چکیده

تنش‌های محیطی از عوامل اصلی کاهش دهنده رشد و نمو و عملکرد گیاهان زراعی به‌شمار می‌آیند و همواره امنیت غذایی انسان‌ها را تهدید می‌کنند. این مطالعه به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی بر تغییرات صفات بیوشیمیایی و میزان بیان ژن‌های عوامل رونویسی *MYB* در دو رقم گندم (تجن و زاگرس)، تحت تنش خشکی انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. اعمال تیمار خشکی در سه سطح ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ٤ هفته پس از جوانه‌زنی انجام شد. ۲۰ روز پس از اعمال تنش نمونه‌برداری از برگ و ریشه به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها و برخی صفات بیوشیمیایی صورت گرفت. نتایج بررسی محتوای کلروفیل تحت تنش نشان داد که با افزایش شدت تنش در ژنوتیپ‌های مختلف محتوای کلروفیل a و b کاهش می‌یابد. میزان کاهش کلروفیل a و b در ژنوتیپ تجن در تنش شدید، بیشتر از ژنوتیپ زاگرس بود. همچنین محتوای TBARM تحت تنش شدید خشکی به‌طور معنی‌داری بیشتر از وضعیت تنش متوسط بود و این افزایش در ژنوتیپ تجن بیشتر از رقم زاگرس دیده شد. تجزیه و تحلیل RT-PCR نشان داد که ژن‌های خانواده *MYB* مورد مطالعه، تحت تنش خشکی افزایش بیان نشان می‌دهند. از طرفی رقم زاگرس که جزو ارقام متحمل به تنش خشکی می‌باشد برای تمامی ژن‌های مورد بررسی افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم تجن داشت که امکان استفاده از این رقم را در بحث برنامه‌های بهنژادی فراهم می‌کند. همچنین با توجه به اهمیت ژن‌های خانواده *MYB* طی تنش خشکی، از یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی و هرمی کردن ژن‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، تنش خشکی، گندم، صفات بیوشیمیایی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **s.navabpour@gau.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا و یکی از عمده‌ترین محصولات زراعی تأمین‌کننده غذای انسان در کشورهای مختلف به‌شمار می‌رود (Arzani, 2011). این گیاه منبع عمده تأمین کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت ایران است. به‌طوری که نیمی از پروتئین و ٦٥ درصد کالری دریافتی روزانه هر فرد را تشکیل می‌دهد. علاوه‌بر تأمین انرژی مورد نیاز روزانه، قسمت اعظم پروتئین، املاح و ویتامین‌های گروه B را نیز تأمین می‌کند. این گیاه دارای گونه‌های متعددی است، ولی بیش‌ترین سطح زیر کشت (۹۰ درصد) و بیش‌ترین میزان تولید (٩٤ درصد) مربوط به گونه *Triticum aestivum* L. یا گندم نان می‌باشد (Emam, 2011). افزایش روزافزون جمعیت کره زمین و نیاز به مواد غذایی بیشتر، محققان بخش کشاورزی را به تلاش در راستای بالا بردن عملکرد محصولات در واحد سطح واداشته است.

خشکی و شوری، از شایع‌ترین و مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در کاهش عملکرد و کیفیت گندم محسوب می‌شوند و رهیافت مقابله با این شرایط نامطلوب به‌عنوان چالشی مهم برای محققان کشاورزی و بهنژادگران محسوب می‌شود (Fahmideh *et al*., 2020; Nazari *Khakshoor et al*., 2020; Nezhadahmadi *et al*., 2013). کشور ما نیز از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه‌خشک دنیا قرار دارد و خشک‌سالی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است. این تصور که بتوان مشکلات ناشی از خشک‌سالی را با مدیریت صحیح آبیاری به‌طور کامل حل نمود، امری پیچیده است (Humai, 2012)، بنابراین توجه به مؤلفه‌های دیگر از جمله اصلاح مولکولی گیاهان امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

تنش خشکی اثرات منفی چند جانبه‌ای بر متابولیسم گیاهان ازجمله: انقباض سلولی، آسیب غشای سلولی، عملکرد مختل شده آنزیم‌های وابسته به غشاء، اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها از طریق تولید بیش‌ازحد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن دارد (Thirumalaikumar *et al*., 2018). گیاهان برای حفظ بقای خود، مکانیسم‌های مختلفی برای سازش با این تغییرات محیطی دارند که از آن جمله می‌توان به مکانیسم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی اشاره کرد.

نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهند که بسیاری از پروتئین‌های MYB در پاسخ و تطبیق به تنش غیرزیستی دخالت دارند (Ma *et al*., 2009). پروتئین‌های MYB یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های عوامل رونویسی در گیاهان را تشکیل می‌دهند و اهمیت خاصی در تنظیم فرایندهای نمو و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند (Riechmann *et al*., 2000). دومین اتصال MYB به DNA حاوی ۵۲ اسیدآمینه حفظ‌شده است. خانواده عوامل رونویسی MYB (Transcription factor: TF) شامل چهار زیرخانواده اصلی است که در تعداد تکرار دومین‌های اتصال به DNA متفاوت هستند. برخی از فرآیندهای مختلف رشد گیاه، مانند تشکیل سلول‌های اپیدرمی، کوتیکول، تریکوم و روزنه و همچنین پاسخ به مجموعه‌ای از تنش‌های محیطی از جمله خشکی توسط این خانواده از عوامل رونویسی تنظیم می‌شود (Dubos *et al*., 2010). همچنین برخی شواهد نشان می‌دهند که پروتئین MYB در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به‌ویژه در تنظیم سوخت‌وساز اولیه و ثانویه، کنترل توسعه سلول، چرخه سلول، سنتز هورمون و انتقال پیام دخالت دارند (Zhang *et al*., 2012b). اگرچه بیش از ٨٤ ژن MYB در گندم یافت شده است، تنها تعداد کمی از آن‌ها از نظر عملکردی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند (Mao *et al*., 2011; Xiong *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2012a, b; Zhao *et al*., 2017). بی و همکاران (Bi *et al*., 2016) در پژوهش خود نشان دادند که ژن *TaMYB31* توسط تنش خشکی القا می‌شود. در مطالعه ژائو و همکاران (Zhao *et al*., 2018) سه ژن TaMYB31s متفاوت طی تنش خشکی بیان شد. TaMYB31-B بالاترین سطح رونوشت را در همه بافت‌های مورد بررسی به‌ویژه در سنبله‌های نشان داد، در حالی که ژن *TaMYB31-A* و *TaMYB31-D* در بافت ریشه گندم کمتر بیان شدند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

نظر به اهمیت گندم در اقتصاد کشور کنترل عوامل خسارت‌زا به این محصول استراتژیک توسط بهنژادگران امری ضروری به نظر می‌رسد. در شرایط آب و هوایی خشک و نیمه‌خشک، گندم معمولاً در طول فصل رشد در معرض دوره‌های تنش خشکی قرار می‌گیرد؛ بنابراین تحقیق در مورد توسعه ارقام گندم متحمل در برابر خشک‌سالی به‌منظور گسترش دامنه رشد گندم به مناطق خشک یا نیمه‌خشک بسیار مهم است (Lobato *et al.*, 2009). کشور ما نیز از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه‌خشک دنیا قرار دارد و خشک‌سالی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است.

در این تحقیق با توجه به اهمیت مطرح‌شده گیاه گندم تلاش بر آن بود تا برخی از صفات بیوشیمیایی و بیان دو ژن از خانواده *MYB* طی تنش خشکی در گیاه گندم مورد بررسی قرار گیرد. امید است یافته‌های ما در تشخیص رقم متحمل به تنش خشکی مؤثر واقع شود.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. از بذور ارقام تجن و زاگرس که به‌ترتیب حساس و متحمل به تنش خشکی هستند در این مطالعه استفاده شد. جهت کشت بذور به‌مدت ۱۰ دقیقه با NaCl ۱ درصد استریلیزه و سپس با آب دیونیزه شستشو شدند. پس از شستشو بذور در پتری‌دیش قرار داده و برای جوانه‌زنی به ژرمیناتور منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی، از هر رقم ۳ نمونه جوانه‌زده انتخاب و در عمق ۳ سانتی‌متری خاک، درون گلدان کشت شدند (Maali *et al.*, 2007). بستر کشت در گلدان‌های ۱/۵ لیتری شامل: خاک، ماسه و زغال‌سنگ نارس (با نسبت ۳:۱:۱) بود. پس از کشت، گلدان‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۱ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Esfandiari *et al.*, 2011). اعمال تیمار خشکی در سه سطح ۴۰ (زیاد)، ۷۰ (متوسط) و ۱۰۰ درصد (شاهد) ظرفیت زراعی و ۴ هفته پس از جوانه‌زنی انجام شد (Rahimi *et al.*, 2019). بیست روز پس از اعمال تنش، نمونه‌برداری از برگ و ریشه به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها انجام شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخ‌زده با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر WAP مدل UV/vis2000S، در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری و میزان کلروفیل a و b از معادلات زیر محاسبه گردید:

معادله (۱) $\text{Chl. a (mgml-1)} = 12.25A663.6 - 2.55A646.6$

معادله (۲) $\text{Chl. b (mgml-1)} = 20.31A646.6 - 4.91A663.6$

برای اندازه‌گیری اکسیداسیون سلولی از روش هاگگ و همکاران (Hagege *et al.*, 1990) استفاده گردید. به‌طور خلاصه در این روش به ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (w/v ۱۵درصد) اضافه و پس از آن به محلول حاضر ۱۰ میلی‌لیتر استون افزوده و به‌شدت مخلوط شدند. محلول با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب کوچک حاصل از سانتریفیوژ با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو و پس از ورتکس مجدداً با همان دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (این مرحله چهار مرتبه تکرار شد). سپس به محلول ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک (w/v ۱ درصد) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیورتیک (w/v ۰/۶ درصد) افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در یخ متوقف و مقدار جذب محلول حاصل در طول‌موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری مدل (BT 600 BR-Technologies) ثبت شد.

استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی‌بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی در آزمایش استفاده شد. به‌منظور حذف DNA ژنومی تیمار دئوکسی‌ریبونوکلئاز طبق پروتکل پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام شد کیفیت RNA

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. همچنین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. علاوه‌بر این کیفیت RNA با توجه به شاخص A260/280 ارزیابی شد.

سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌ها از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبرگرین استفاده شد. به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *ACTIN* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها بود، استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار Primer3 و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR طراحی شدند. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودار منحنی ذوب، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت. بیان ژن‌ها به‌صورت نسبی و با استفاده از روش پیفاف (Pfaffl, 2001) محاسبه شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۲) که اثر شدت‌های مختلف تنش و اثر رقم بر روی همه صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل تنش × رقم به‌جز در رابطه با کلروفیل a و b برای سایر صفات از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار گردید.

جدول ۱- توالی آغازگرها ی مورد استفاده برای آنالیز qRT-PCR

Table 1. Sequence of primers used for qRT-PCR analysis

نام ژن Gene name	آغازگر پیشرو Primer F	آغازگر پسرو Primer R
TC326615	5´-TGCAGTTTGAAGAGTCATGGAATG-3´	5´-GCGCAGGAGCTTACGCAAC-3´
TC301150	5´-TACAACTCCTTTGGAAGCTGAAAC-3´	5´-CCAGCCTGATTGCATCATC-3´
Actin	5´-CAGCAACTGGGATGATATGG-3´	5´-ATTTCGCTTTCAGCAGTGGT-3'

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

Table 2. Analysis of variance of biochemical traits in a factorial design based on a completely random design

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات Mean square		
		اکسیداسیون سلولی Cellular oxidation	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b
تنش Stress	2	2643**	31.3**	28.3**
رقم Cultivar	1	332.1**	25.73**	14.7**
رقم × تنش Cultivar× stress	2	48.44**	0.32^{ns}	0.19^{ns}
خطا Error	12	5.86	0.21	0.40
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	–	2.87	5.29	5.31

^{ns}و**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

^{ns} and **: Non-significant and significant at 1% probability level, respectively

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

همچنین نتایج بررسی تغییرات محتوای کلروفیل ارقام مورد بررسی تحت تنش خشکی نشان داد (شکل ۱) که محتوای کلروفیل a و b با افزایش شدت تنش در ژنوتیپ‌های مختلف کاهش می‌یابد. میزان کاهش کلروفیل a و b در ژنوتیپ تجن (به‌ترتیب ٤/٨ و ۳/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) در تنش شدید بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود و نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نیز نشان داد که اختلاف آن نیز با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) می‌باشد. فتوسنتز در گندم یک ویژگی مهم برای تحمل به تنش‌های غیرزیستی، مانند خشکی است (Reynolds *et al*., 2005) افزایش فتوسنتز در شرایط ایده‌آل آبیاری، باعث بهبود عملکرد می‌شود و کمبود آب طی تنش خشکی و در نهایت عدم فتوسنتز کافی، عملکرد گندم را مختل کرده و پیر شدن بخش‌های مختلف گیاه را تسریع می‌کند (Liu *et al*., 2016). در همین راستا مطالعه شائو و همکاران (Shao *et al*., 2015) نشان داد که تنش باعث آسیب به بافت مزوفیلی گیاه شده که منجر به شکسته شدن سیستم‌های غشاء و فرآیندهای غشایی در کلروپلاست می‌شوند و در نتیجه باعث کاهش فتوسنتز می‌گردد (Shao *et al*., 2015). تأثیر تنش خشکی بر روی کلروفیل به ژنوتیپ گیاه و شرایط محیطی بستگی دارد. کاهش مقدار کلروفیل در اثر تنش خشکی می‌تواند به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و تجزیه رنگدانه‌های کلروفیل باشد. همچنین تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و در نتیجه تجزیه کلروفیل شود (Bouchemal *et al*., 2017)، همچنین فاروق و همکاران (Farooq *et al*., 2009) گزارش کردند که تنش خشکی منجر به بسته شدن روزنه‌ها در گیاهان می‌شود که این امر با تداخل در تبادل CO_2 باعث کاهش فتوسنتز و محتوای کلروفیل می‌شود. از آن‌جایی که تجزیه کلروفیل پاسخ عمومی به تنش است، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در میزان کلروفیل یکی از شاخص‌های مهم تنش محیطی است و تحمل گونه‌ها به تنش را توصیف می‌کند.

نتایج برای اثر متقابل تنش در رقم بر روی میزان اکسیداسیون سلولی نشان داد (شکل ۲) که شاخص سطح اکسیداسیون سلولی (Hu *et al*., 2012) (بر اساس محتوای Thiobarbituric Acid Reactive Material:TBARM) در تنش شدید خشکی به‌طور معنی‌داری بیشتر از شدت متوسط تنش بود و این افزایش در رقم تجن بیشتر از رقم زاگرس دیده شد. در هر یک از غلظت‌های سطوح تنش، محتوای TBARM در ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. افزایش متوسط محتوای TBARM در تنش متوسط نشان دهنده وقوع تنش اکسیداتیو متوسط است؛ در مقابل تحت شرایط تنش شدید میزان محتوای TBARM افزایش معنی‌داری به‌خصوص در رقم تجن نشان داد که نشان دهنده کاهش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و این نتیجه می‌تواند نشان دهنده آن باشد که تحت شرایط تنش متوسط رادیکال‌ها به‌طور مؤثرتری توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هضم می‌شوند. در همین راستا یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج پژوهش مظفری (Mozafari, 2014) در گندم و احمد و همکاران (Ahmed *et al*., 2013) در گیاه جو مطابقت داشت. از منظر مولکولی نقطه اشتراک اغلب تنش‌های زیستی و غیرزیستی، افزایش میزان واسطه‌های اکسیژن واکنش‌گر است. با توجه به تعداد زیاد این واسطه‌ها و روند سریع تبدیل آن‌ها به یکدیگر، ارزیابی جامع سطح اکسیداسیون سلولی ناشی از تأثیر این رادیکال‌ها واجد اهمیت زیادی است (Navabpour, 2013).

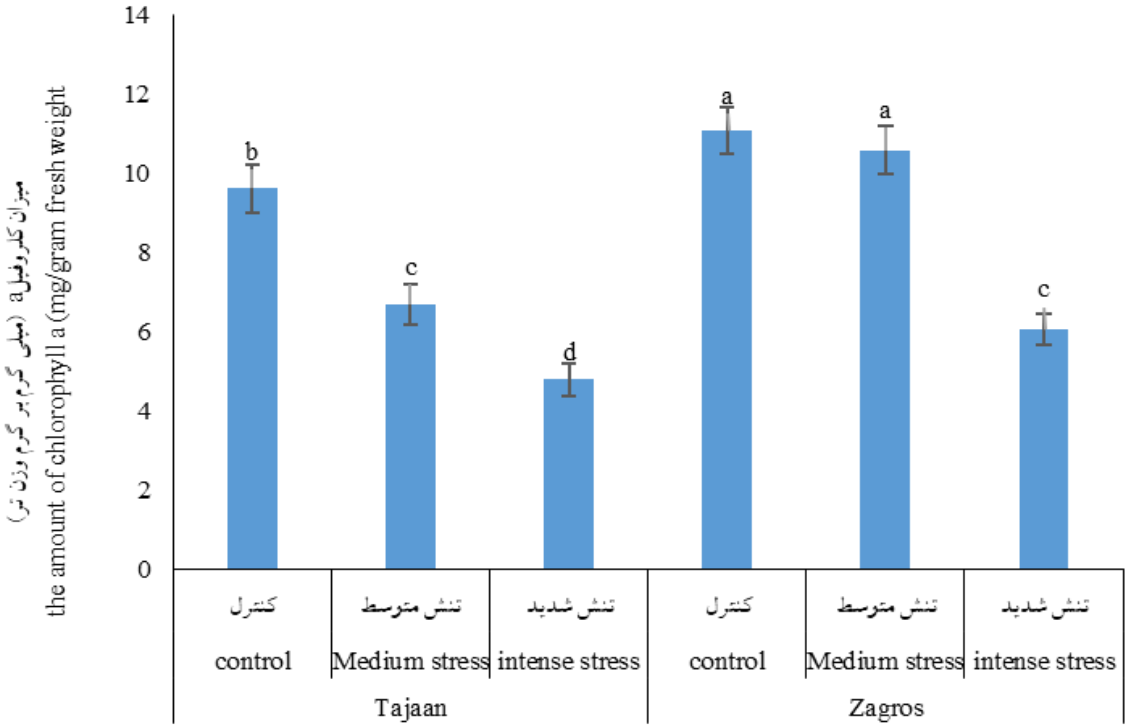
روسو و بیلینگو (Russo and Belligno, 2010) گزارش کردند که تنش خشکی باعث تنش اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. مالون‌دی‌آلدئید محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. از سطح پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان یک نشانه رادیکال آزاد مضر برای غشاء سلولی تحت شرایط تنش استفاده شده است (Ayala *et al*., 2014; Yang *et al*., 2017).

رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع کنند. این امر را به فعالیت

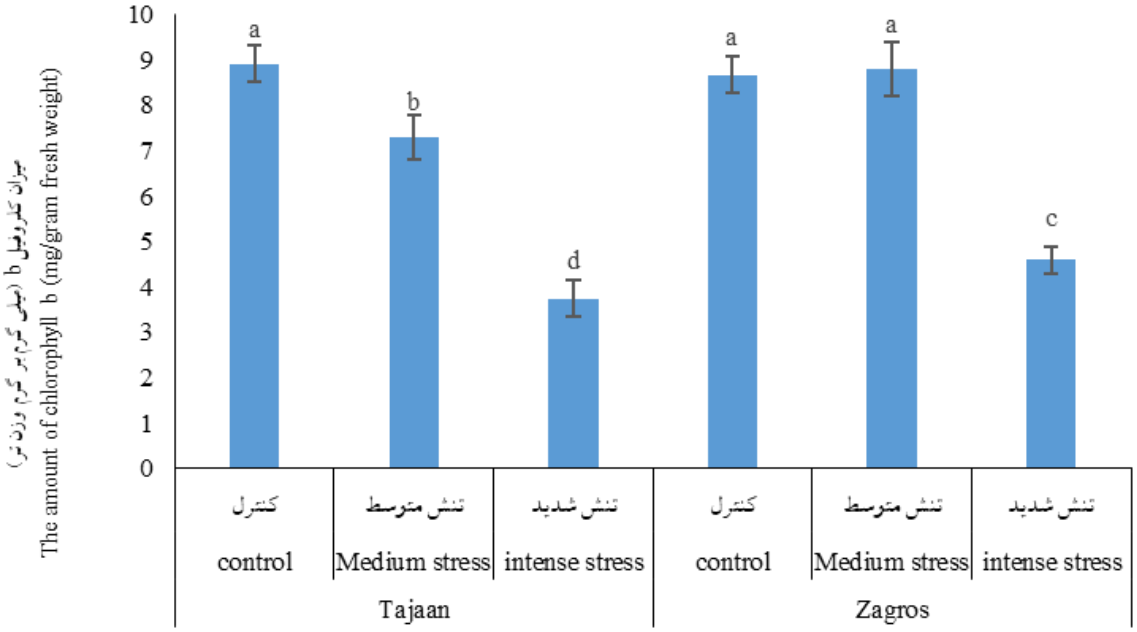
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت می‌دهند تا سطح H_2O_2 را کاهش دهد و بنابراین آسیب سلولی به غشاها را به حداقل برساند (Zhang *et al.*, 2008). اگرچه فرآیندهای تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) در شرایط نرمال آهسته است، اما تنش سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود (Kaur *et al.*,2012).

الف (a)



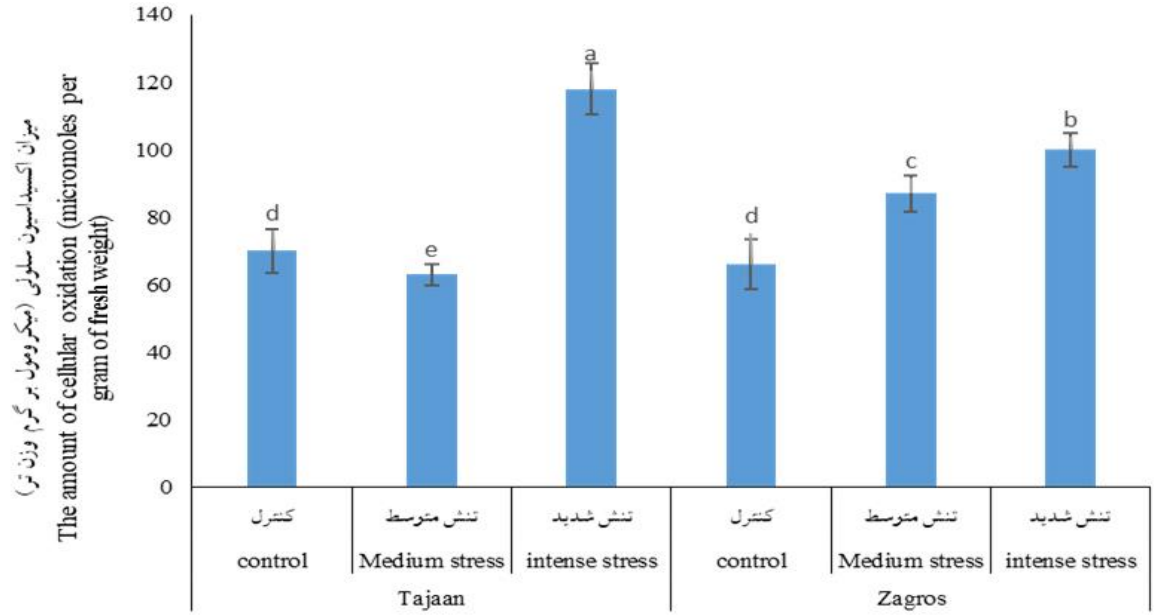
ب (b)



شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a (الف)، تغییرات میزان کلروفیل b (ب) طی تنش خشکی در برگ (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند از لحاظ آماری اختلاف ندارند (p=5%))

Figure 1. Changes in the amount of chlorophyll a (a), changes in the amount of chlorophyll b (b) during drought stress in leaves (Means that have at least one letter in common are not statistically different (p<0.05))

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]



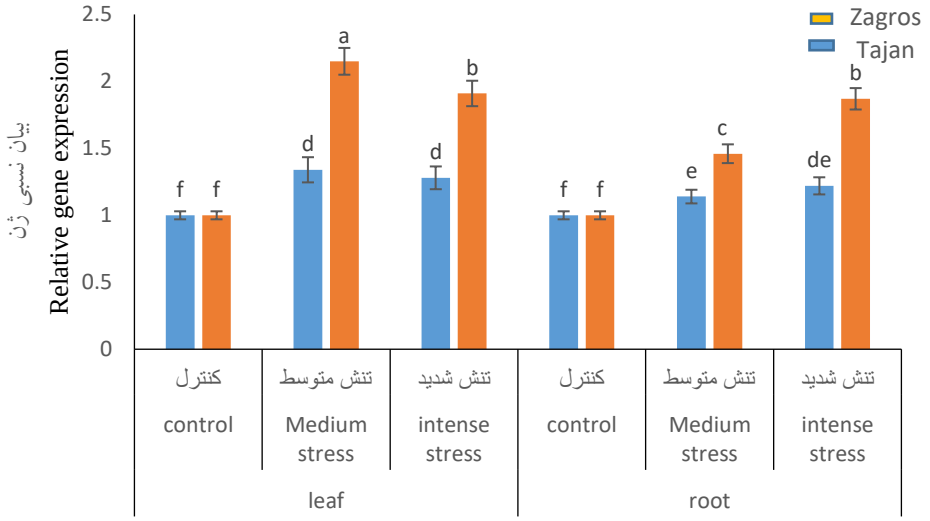
شکل ۲- تغییرات میزان اکسیداسیون سلولی طی تنش خشکی در برگ (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند از لحاظ آماری اختلاف ندارند ($p<0.05$))

Figure 2.Changes in cellular oxidation during drought stress in leaves(Means that have at least one letter in common are not statistically different ($p<0.05$)

نتایج ارزیابی بیان ژن *TC326615* نسبت به شاهد (شکل۳)، نشان داد که برگ رقم زاگرس بالاترین مقدار بیان (۲/۱۵) را نسبت به شاهد در شرایط تنش متوسط داشت و اختلاف آن با تنش شدید و سایر تیمارها در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. بافت ریشه رقم زاگرس طی تنش شدید بیشترین بیان ژن را دارا بود و اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار شد. کمترین میزان بیان نسبی ژن در شرایط کنترل در ریشه برای رقم زاگرس با مقدار (۰/۸۱) به‌دست آمد که اختلاف آن با شرایط مشابه در رقم تجن معنی‌دار نبود ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می‌دهند و برخی در مواجه با تنش طولانی‌مدت واکنش نشان می‌دهند. خانواده بزرگ *MYB*ها در گندم برای سازگاری به تنش شوری و خشکی نقش دارند (Tabaraki *et al.*, 2017) نتایج بیان ژن‌های عوامل رونویسی *MYB* در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری نشان داد که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است (Rahaei *et al.*, 2010).

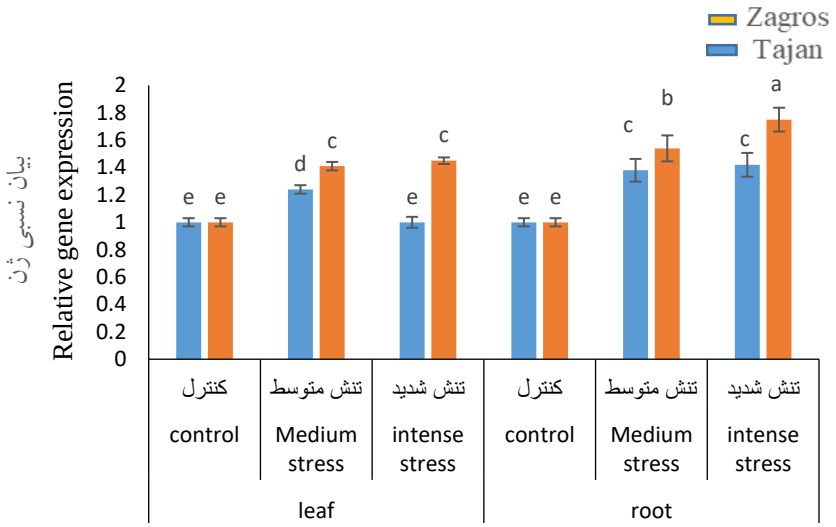
بررسی بیان ژن *TC301150* نشان داد (شکل ٤) که بین ارقام، اختلاف معنی‌داری از نظر بیان ژن در سطوح مختلف تنش وجود دارد. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *TC301150* در ریشه رقم زاگرس طی تنش شدید با مقدار ۱/۷۵ بود که اختلاف معنی‌داری با شرایط مشابه در رقم تجن داشت. در برگ هم بیشترین مقدار بیان ژن طی تنش شدید برای رقم زاگرس به‌دست آمد و اختلاف معنی‌داری با رقم تجن طی تنش شدید و سایز تیمارها در شرایط دیگر تنش نشان داد. نعیمی و همکاران (Naeemi *et al.*, 2019) بیان این ژن را تحت تنش خشکی در گیاهچه‌های گندم دوروم بررسی کردند که نتایج حاکی از افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی بود و با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. تبارکی و همکاران (Tabaraki *et al.*, 2017) نیز نشان دادند که بیان ژن *MYB* در سطح تنش خشکی پنج درصد، بیشترین مقدار را داشت و با افزایش سطوح تنش بیان ژن نیز افزایش می‌یابد. کمترین میزان بیان ژن برای رقم تجن در شرایط کنترل در برگ به‌دست آمد که اختلاف آن با شرایط مشابه در رقم زاگرس معنی‌دار شد.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *TC326615* تحت سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم

Figure 3. *TC326615* gene expression changes under different drought stress levels in different wheat genotypes



شکل ٤- تغییرات بیان ژن *TC301150* تحت سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم

Figure 4. *TC301150* gene expression changes under different drought stress levels in different wheat genotypes

محتوای کلروفیل یکی از عوامل کلیدی در تعیین سرعت فتوسنتز و تولید ماده خشک و جزء شاخص‌های مورد بررسی برای تحمل به تنش یاد می‌شود، نتایج این پژوهش نشان داد که رقم زاگرس وضعیت بهتری طی تنش خشکی برای این صفت نشان می‌دهد. همچنین میزان اکسیداسیون سلولی که شاخصی از میزان تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد در رقم زاگرس افزایش کمتری طی تنش داشت.

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر در خصوص بیان ژن نشان داد که دو ژن خانواده *MYB* مورد بررسی، تحت تنش خشکی با افزایش بیان روبرو می‌شوند. از طرفی رقم زاگرس که جزء ارقام متحمل به تنش خشکی می‌باشد، از نظر دو ژن مورد بررسی، افزایش بیان بیشتری نسبت به رقم تجن داشت. گیاهان هنگامی‌که در معرض کمبود آب قرار می‌گیرند، تغییرات مورفولوژیکی که سبب ایجاد تغییرات دیواره سلولی، مانند تغییر در سلولز و همی سلولز، پکتین

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

و سنتز لیگنین در پاسخ به آن از خود نشان می‌دهند. با توجه به نقش پروتئین‌های مختلف *MYB* که به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی سنتز لیگنین، زایلن و بیوسنتز سلولز مؤثر هستند، نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد تحمل به تنش خشکی را می‌توان انتظار داشت؛ بنابراین بررسی بیان ژن‌های این خانواده در شناسایی ارقام متحمل نسبت به تنش خشکی می‌تواند راهگشا باشد. همچنین شناسایی ژن‌های جدید از جمله عوامل رونویسی *MYB*، تعیین الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی و درک بهتر نقش کارکردی آن‌ها در انطباق با تنش، امکان رسیدن به راهکاری سریع‌تر با هدف بهبود تحمل به تنش خشکی را فراهم می‌آورد.

References

Ahmed, I.M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D. and Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 49-60.

Arzani, A. (2011). *Breeding Field Crops, 4th Edition*. Isfahan University of Technology Publications, Isfahan, Iran (In Persian).

Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014:** 360438.

Bi, H., Luang, S., Li, Y., Bazanova, N., Morran, S., Song, Z., Perera, M.A., Hrmova, M., Borisjuk, N. and Lopato, S. (2016). Identification and characterization of wheat drought-responsive MYB transcription factors involved in the regulation of cuticle biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **67(18):** 5363-5380.

Bouchemal, K., Bouldjadj, R., Belbekri, M.N., Ykhlef, N. and Djekoun, A. (2017). Differences in antioxidant enzyme activities and oxidative markers in ten wheat (*Triticum durum Desf*.) genotypes in response to drought, heat and paraquat stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **63:** 710-722.

Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **15(10):** 573-581.

Emam, Y. (2013). *Cereal Cultivation*. Shiraz University Press, Shiraz, IR (In Persian).

Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M. and Shekari, F. (2011). The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Fresenius Environmental Bulletin*, **20(8a):** 2021-2026.

Fahmideh, L., Delarampoor, M.A. and Fooladvand, Z. (2020). Study of MYB transcription factor gene expression in some bread wheat cultivars of Sistan region, Iran. *Plant Genetic Researches*, **7(1):** 181-196 (In Persian).

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, **29:** 185-212.

Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, **1:** 86-89.

Hu, R., Sun, K., S.u, X., Pan, Y.X., Zhang, Y.F. and Wang, X.P. (2012). Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophils: Salsola passerina Bunge and *Chenopodium album* L. *Journal of Hazardous Materials*, **205:** 131-138.

Humai, M. (2012). *The Reaction of Plants to Salinity*. National Irrigation and Drainage Committee of Iran Publication, Tehran, IR (In Persian).

Kaur, G., Singh, H.P., Batish, D.R. and Kumar, R.K. (2012). Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. *Journal of Environmental Biology*, **33(2):** 265.

Liu, Y., Liang, H., Lv, X., Liu, D., Wen, X. and Liao, Y. (2016). Effect of polyamines on the grain filling of wheat under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **100:** 113-129.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]

[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

Lobato, A.K.S., Luz, L.M., Costa, R.C.L., Santos Filho, B.G., Meirelles, A.C.S., Oliveira Neto, C.F., Laughinghouse IV, H., Neto, M.A.M., Alves, G.A.R., Lopes, M.J.S. and Neves, H.K.B. (2009). Silicon exercises influence on nitrogen compounds in pepper subjected to water deficit. *Research Journal of Biological Sciences*, **4(9):** 1048-1055.

Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I.V., Yur'Eva, N.O., Pchelkin, V.P., Tsydendambaev, V.D., Vereshchagin, A.G., Deryabin, A.N., Trunova, T.I., Los, D.A. and Nosov, A.M. (2007). Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the Δ12-desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, **54:** 600-606.

Mao, X., Jia, D., Li, A., Zhang, H., Tian, S., Zhang, X., Jia, J. and Jing, R. (2011). Transgenic expression of TaMYB2A confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in Arabidopsis. *Functional & Integrative Genomics*, **11:** 445-465.

Mozafari, A. (2014). Evaluation the effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on SOD, MDA and Proline content in two wheat cultivar. *20th World Congress of Soil Science*. June 8-13, Jeju, Korea.

Naeemi, T., Fahmideh, L. and Fakheri, B. (2019). The effect of drought stress on *MYB* gene expression and osmotic regulator levels of five durum wheat genotypes (*Triticum turgidum* L.). *Nova Biologica Reperta*, **6:** 217-228 (In Persian).

Navabpour, S. (2013). Induced genes expression pattern in response to drought stress in rapeseed (*Brassica napus*). *Seed and Plant Journal*, **29(3):** 535-549 (In Persian).

Nazari Khakshoor, E., Azadi, A., Fourozesh, P., Etminan, A. and Majidi Hervan, E. (2022). Prioritization and identification of candidate genes associated with root traits under salinity stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Researches*, **9(1):** 71-84 (In Persian).

Nezhadahmadi, A., Hossain-Prodhan, Z. and Faruq, G.(2013). Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*, **1:** 610-721.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, **29(9):** 45-45.

Rahaei, M., Xue, G.P., Naghavi, M.R., Alizadeh, H. and Schenk, P.M. (2010). A *MYB* gene from wheat (Triticum aestivum L.) is up -regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt -tolerant and sensitive genotypes. *Plant Cell Reports*, **29:** 835-844.

Rahimi, Z., Hosseinpanahi, F. and Siosemardeh, A. (2019). Effects of drought stress on antioxidant enzymes activity and some physiological traits of drought resistant and susceptible cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Wheat Research*, **2(1):** 69-86 (In Persian).

Reynolds, M.P., Mujeeb-Kazi, A. and Sawkins, M. (2005). Prospects for utilizing plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought-and salinity-prone environments. *Annals of Applied Biology*, **146(2):** 239-259.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R. and Creelman, R. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290(5499):** 2105-2110.

Russo, M.A. and Belligno, A. (2010). Different availabilities of reduced nitrogen: Effects on oxidative stress in chicory plants, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **22(4):** 250-258.

Shao, R.X., Xin, L.F., Zheng, H.F., Li, L.L., Ran, W.L., Mao, J. and Yang, Q.H. (2015). Changes in chloroplast ultrastructure in leaves of drought-stressed maize inbred lines. *Photosynthetica*, **54(1):** 74-80.

Tabaraki, H., Fahmideh, L. and Fooladvand, Z. (2017). Study of *MYB* gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars. *Journal of Genetic Engineering and Biosafety*, **6:** 95-104 (In Persian).

Thirumalaikumar, V.P., Devkar, V., Mehterov, N., Ali, S., Ozgur, R., Turkan, I. and Balazadeh, S. (2018). NAC transcription factor JUNGBRUNNEN 1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, **16:** 354-366.

Xiong, H., Li, J., Liu, P., Duan, J., Zhao, Y., Guo, X., Li, Y., Zhang, H., Ali, J. and Li, Z. (2014). Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PloS one*, **9(3):** e92913.

Yang, H., Zhao, L., Zhao, S., Wang, J. and Shi, H. (2017). Biochemical and transcriptomic analyses of drought stress responses of LY1306 tobacco strain. *Scientific Reports*, **7:** 1-10.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

Zhang, C., Luo, L., Xu, W., Ledwith, V. (2008). Use of local Moran's I and GIS to identify pollution hotspots of Pb in urban soils of Galway, Ireland. *Science of The Total Environment*, **398:** 212-221.

Zhang, L., Zhao, G., Jia, J., Liu, X. and Kong, X. (2012a). Molecular characterization of 60 isolated wheat *MYB* genes and analysis of their expression during abiotic stress. *Journal Experimental Botany*, **63:** 203-214.

Zhang, L., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X. and Kong, X. (2012b). A wheat R2R3-MYB gene, TaMYB30-B, improves drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **63(16):** 5873-5885.

Zhao, Y., Cheng, X., Liu, X., Wu, H., Bi, H. and Xu, H. (2018). The wheat MYB transcription factor TaMYB31 is involved in drought stress responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, **9:** 1426.

Zhao, Y., Tian, X., Li, Y., Zhang, L., Guan, P., Kou, X., Wang, X., Xin, M., Hu, Z., Yao, Y. and Ni, Z. (2017). Molecular and functional characterization of wheat ARGOS genes influencing plant growth and stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 170.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]

[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

Evaluation of Some Biochemical Traits and Expression of Two Genes from the *MYB* Family in Two Wheat Cultivars Under Drought Stress

Saeid Navabpour[1,*] and Horeyeh Najafi[2]

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: November 27, 2022 – Accepted: February 15, 2023)

Abstract

Environmental stress is one of the main factors that reduce the growth and performance of crops and threatening human food security. This study was conducted in order to investigate the effect of drought stress on the changes in biochemical traits and the level of expression of a MYB transcription factor gene in two wheat cultivars (Tajan and Zagros), under drought stress. The experiment was conducted as a factorial based on a completely randomized design with 3 replications. Drought treatments were applied at three levels of 40, 70 and 100% of field capacity 4 weeks after germination. Twenty days after the application of stress, leaves and roots were sampled in order to investigate the expression of MYB genes and measuring some biochemical traits. The results of examining the chlorophyll content under stress showed that the content of chlorophyll a and b decreased with increasing of stress intensity in different genotypes. The rate of reduction of chlorophyll a and b in Tajan genotype under severe stress was higher than Zagros genotype. Also, TBARM content under severe drought stress was significantly higher than moderate stress condition and this increase was seen in Tajen genotype more than Zagros genotype. qRT-PCR analysis showed that the *MYB* genes showed an increase in expression under drought stress. Furthermore, Zagros genotype, which is considered as a tolerant cultivar to drought stress, had a higher MYB expression level than Tajan cultivar for both genes, suggesting this cultivar for future breeding programs, also considering the importance *MYB* family genes during drought stress, the results can be used in molecular breeding and pyramiding breeding projects.

Keywords: Gene expression, Drought stress, Wheat, Biochemical traits

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1401.9.2.10.3]
[DOI: 10.22034/pgr.9.2.10]

* **Corresponding Author, E-mail: s.navabpour@gau.ac.ir**