

مطالعه بیان ژن عامل رونویسی MYB در برخی ارقام گندم نان منطقه سیستان تحت شرایط تنش خشکی

لیلا فهمیده^{*۱}، محمدعلی دلارام پور^۳ و زیبا فولادوند^۴

- ۱- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
- ۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
- ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
- ۴- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی-ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵)

چکیده

تنش خشکی از جمله تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که به عنوان یکی از عوامل محدودکننده منابع غذایی، به شمار می‌رود. بروز پاسخ‌های گیاه جهت سازش با شرایط جدید همراه با تغییر الگوی بیانی برخی از ژن‌های عملکردی و تنظیمی می‌باشد. پروتئین‌های MYB یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی هستند که از اهمیت خاصی در تنظیم فرآیندهای نموی و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند. این تحقیق با هدف بررسی بیان ژن عامل رونویسی *TaMYB73* و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در ارقام گندم نان (هامون، هیرمند، کویر، بولانی و کراس بولانی) تحت شرایط تنش خشکی انجام شد. آزمایش فاکتوریل به صورت گلدانی و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. بعد از ۴۵ روز از کشت بذور (مرحله ۴ برگه)، تنش خشکی با سطوح مختلف آبیاری انجام شد. بعد از اعمال تنش، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان مورد تیمار جهت سنجش فعالیت آنزیم و بیان ژن صورت گرفت. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، الگوی بیان ژن مورد نظر با استفاده از روش Real-time PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *TaMYB73* و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل پراکسیداز در رقم هیرمند بیشتر از ارقام دیگر بود.

واژگان کلیدی: رقم مقاوم، رقم حساس، فنل اکسیداز، کاتالاز، *TaMYB73*، Real-time PCR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: l.fahmideh@uoz.ac.ir

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین غلات و منابع اصلی کالری و پروتئین است و به‌طور تقریبی ۸۵ و ۸۲ درصد جمعیت جهان به‌ترتیب جهت تأمین کالری و پروتئین، وابسته به گندم هستند (Chaves et al., 2013). کمبود آب یکی از شدیدترین تنش‌های زیست‌محیطی است که بر بهره‌وری محصول و کشاورزی پایدار در سراسر جهان تأثیرگذار بوده که منجر به پیامدهای عمده‌ای برای امنیت غذایی و اقتصاد مناطق مختلف جهان شده است (Thirumalaikumar et al., 2018).

تنش نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیکی بوده و از تأثیر عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود. به‌عبارت دیگر تنش عبارت است از قرار گرفتن موجود زنده تحت تأثیر شدتی از یک عامل محیطی که موجب افت ظاهری، بازده و یا ارزش آن می‌شود (Andarzian, 2010). در شرایط تنش شدید، تنفس، جذب گاز کربنیک، انتقال مواد فتوسنتزی و انتقال مواد خام در آوندهای چوبی به مقدار کمی افت کرده اما فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک افزایش می‌یابد. کاهش مواد فتوسنتزی و افزایش فعالیت آنزیم‌های مزبور می‌تواند نهایتاً سبب کمبود مواد غذایی و راندمان در گیاه گردد (Kouchaki and Alizadhe, 1986)؛ بنابراین تنش خشکی به‌عنوان یک محیط ناسازگار و پیچیده‌ترین تنش در مقیاس جهانی بر بسیاری از فعالیت‌های رشدی و متابولیکی در گونه‌های مختلف گیاهان اثر بسیار مهمی گذاشته (FAO, 2013) و عامل تحریک گیاه به پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014).

کم‌آبی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید در کشاورزی به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌حساب می‌آید (Asadi et al., 2020). در کشور ما خشکی از جمله تنش‌های مهم غیرزیستی است که عملکرد نهایی گندم را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد. اهمیت این مسئله زمانی بیشتر می‌شود که بیشتر نواحی کشت گندم کشور، در اقلیم خشک واقع شده‌اند. 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 بخش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و

پلی‌فنل اکسیداز در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (Agarwal and Pandey, 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ممکن است راهی برای تحمل گیاه به تنش‌های محیطی باشد (Abogadallah, 2010).

آنزیم کاتالاز نقش مهمی در محافظت سلول‌ها از تأثیرات پراکسید هیدروژن داشته و می‌تواند با خنثی‌سازی مقادیر زیاد پراکسید هیدروژن در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو اهمیت داشته باشد (Sairam and Saxena, 2000; Hong and Ji-Yan, 2007).

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تنش خشکی، از تولید بیش از حد اجزای خطی انتقال الکترون در واکنش مهر جلودگیری می‌کند (Thipyapong et al., 2004). این آنزیم با اکسید کردن ترکیبات فنلی مضر تولید شده طی تنش خشکی، باعث تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شود (Blum et al., 1981). همچنین پیشنهاد شده که این آنزیم‌ها به‌واسطه واکنش مهر که انرژی اضافی در شرایط تنش را خاموش‌سازی می‌نماید، ممکن است در مقابله با شرایط دشوار محیطی نقش ایفا نمایند (Akhtar and Mahmood, 2017). با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز افزایش می‌یابد (Gressel et al., 1994).

در مطالعه نعیمی و همکاران (Naeemi et al., 2018) که اثر تنش خشکی را بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوی پرولین و کربوهیدرات ۵ ژنوتیپ گندم دوروم (*Triticum L. turgidum*) در مرحله گیاهچه‌ای مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که افزایش تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)، افزایش میزان کربوهیدرات و محتوی پرولین و کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطوح تنش مورد مطالعه نسبت به سطح شاهد شد.

از جمله ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت مؤثر در برابر استرس‌های محیطی ژن‌های وابسته به خانواده عوامل رونویسی هستند. ژن‌های عوامل رونویسی بخش بزرگی از ژنوم همه یوکاریوت‌ها و از جمله گیاهان عالی را تشکیل داده است. در واقع عوامل رونویسی، پروتئین‌هایی هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به توالی‌های خاص از DNA واقع در ناحیه پیشبرهای

قرار گرفتند. نمونه‌های ۱۳ روزه گندم تحت دو شرایط تنش کوتاه‌مدت شوری قرار گرفتند و از ریشه‌ها و قسمت هوایی آن‌ها به‌طور جداگانه نمونه‌گیری شد و نتایج نشان داد که بیان اغلب ژن‌های انتخاب شده در پاسخ به تنش تغییر داشت (Rahaei et al., 2010). در مطالعه دیگری به‌منظور بررسی بیان ژن‌های متحمل به تنش غیرزنده ژن *TaMYB19* انتخاب و به گیاه آراییدوپسیس منتقل شد (عامل رونویسی MYB در دمین متصل به DNA دارای سه توالی همولوگ *A-TaMYB19*، *B-TaMYB19* و *D-TaMYB19* است). الگوهای بیان این سه ژن در شرایط نرمال مشابه بود اما در شرایط تنش غیرزنده در مرحله گیاهچه‌ای، بیان ژن *B-TaMYB19* گیاهان تراریخت نسبت به دو توالی همولوگ خود متفاوت بود (Zhang et al., 2014). در مطالعه تبارکی و همکاران (Tabaraki et al., 2017) میزان تظاهر ژن عامل رونویسی *TaMYB73* در برخی ارقام گندم نان (چمران ۲، کلک افغانی، سیستان، ارگ و افق) بعد از اعمال سطوح مختلف تنش خشکی با روش Real-time PCR بررسی شد و نتایج نشان داد که بیان این ژن در سطوح مختلف تنش خشکی و بین ارقام مورد بررسی متفاوت بود. رهایی و همکاران (Rahaei et al., 2010) بیان ژن‌های عوامل رونویسی (*MYB* و *NAC*) را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش خشکی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از حساس است. در پژوهش نعیمی و همکاران (Naeemi et al., 2018) مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تنش خشکی و رقم برای تغییرات بیان ژن *MYB* در ۵ ژنوتیپ گندم دورم نشان داد که بیشترین بیان ژن در بالاترین سطح تنش خشکی (سطح ۵ درصد خشکی) و مربوط به رقم شبرنگ بود. عرب و همکاران (Arab et al., 2020) بیان ژن‌های *MAD8* و *MYB93* را در دو بافت برگ و بساک گیاه برنج و تحت تنش خشکی در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و یک هفته پس از قطع آبیاری، مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های qRT-PCR نشان دهنده تغییرات بیان معنی‌دار این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی بود.

بریگل و کورتیس (Briggle and Curtis, 1987) یکی از راهکارهای اساسی غلبه بر مشکلات ناشی از تنش را انتخاب ارقام مقاوم و اصلاح ژنوتیپ‌های سازگار بیان کردند (Naghavi and Mardi, 2010). در این مطالعه برای اولین بار بیان نسبی ژن *TaMYB73*

ژن‌های هدف تنظیم می‌کنند (Riechmann et al., 2000). یک نمونه آن، پروتئین‌های Myeloblastosis هستند که یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی بوده و از اهمیت خاصی در تنظیم فرآیندهای نموی و پاسخ‌های گیاه در برابر عوامل غیرزنده برخوردار هستند (Rahaei et al., 2010). خانواده فاکتور رونویسی MYB نقش‌های زیادی را در فرآیندهای فیزیولوژیکی تحت شرایط نرمال و تنش، ایفا می‌نماید (Stracke et al., 2001).

پروتئین‌های MYB متعلق به زیر خانواده *R2R3-MYB* می‌باشد که اعضای آن شامل سه تکرار است. اعضای این زیر خانواده به ۲۳ زیرگروه تقسیم‌بندی می‌شوند. *R2R3-MYB* نقش اساسی در کنترل پروسه‌های گیاهی خاص، از جمله سوخت و ساز اولیه و ثانویه، فرآیندهای سلولی و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده دارد (Dubos et al., 2010). پروتئین *R3-MYB* در گندم نقش اساسی در تنظیم چرخه سلولی داشته و همچنین ژن *TaMYB2* که دارای سه توالی *TaMYB2A*، *TaMYB2B* و *TaMYB2D* می‌باشد نقش مؤثری در تحمل به تنش خشکی دارد (Cai et al., 2015; Dai et al., 2007). *MYB15* یکی از اعضای خانواده *R2R3 MYB* می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که این پروتئین هم در اندام‌های رویشی و هم در اندام‌های زایشی و بخصوص در سلول‌های نگهبان برگ گیاه آراییدوپسیس تحت تنش خشکی و شوری افزایش بیان می‌یابد (Dai et al., 2007).

بر اساس نتایج مطالعات جوادی و همکاران (Javadi et al., 2016) عوامل رونویسی *ABF3*، *HSFA2*، *DREB2A*، *DREB1A* و *bZIP* بیشترین تعداد ژن‌های کلیدی مربوط در پاسخ به تنش خشکی گیاه جو را در بین ژن‌های مؤثر دارا بودند که نشان‌دهنده اهمیت این عوامل رونویسی در مکانیسم تحمل به تنش خشکی می‌باشد. به‌طور کلی مناطق سیس-المنت (Cis-element) در نواحی پیش‌بر ژن‌های مرتبط به تنش‌های محیطی بر فاکتورهای رونویسی اثر گذاشته و با افزایش بیان این ژن‌ها سبب تحمل به تنش می‌گردند (Umezawa et al., 2006; Fowler and Thomashow, 2002; Agarwal and Jha, 2010).

به‌منظور بررسی نقش عوامل تنظیمی و الگوی بیان آن‌ها در زمان تنش غیرزنده در گیاه گندم، تعدادی از قطعات ژنی *MYB* پس از آنالیز توالی، انتخاب و جهت آنالیز Real-time PCR مورد استفاده

همچنین میزان تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در برابر سطوح مختلف تنش خشکی در ارقام گندم نان منطقه سیستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش خشکی: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. بذور ارقام گندم نان مورد استفاده شامل پنج رقم گندم نان منطقه سیستان (هامون، هیرمند، کویر، بولانی و کراس بولانی) بود که از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه گردیدند. پس از ضدعفونی کردن بذور با محلول هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر، در هر گلدان ۲۰ عدد بذر کاشته شد و عمل تنک کردن در مرحله ۴ برگی بر روی گلدان‌ها صورت گرفت و در نهایت تعداد ۳ بوته درون هر گلدان باقی ماند (Tarahomi et al., 2010). گلدان‌ها در آزمایشگاه پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تحت شرایط دمایی $25 \pm$ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری (Esfandiari et al., 2011) و یک روز در میان با آب معمولی، آبیاری می‌شدند. به منظور جلوگیری از خروج آب زهکش، از گلدان بدون روزنه استفاده شد (Gharbi et al., 2013).

برای تعیین تیمارهای مقادیر آب در هر گلدان ابتدا با استفاده از محاسبات مقدار آب در خاک خشک نسبت به ظرفیت مزرعه مشخص شد (رابطه ۱).

$$\text{وزن خشک} - \text{وزن خاک در حالت ظرفیت زراعی} = \text{درصد ظرفیت زراعی خاک} \times \text{وزن خشک}$$

سطوح مختلف آبیاری در پنج حالت مختلف شامل: شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)، سطح دوم آبیاری (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)، سطح سوم (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، سطح چهارم آبیاری (۲۵ درصد ظرفیت زراعی، تنش شدید) و سطح پنجم آبیاری (۱۵ درصد ظرفیت زراعی، تنش خیلی شدید) انجام شد. اعمال تنش خشکی روی گیاهان ۴۵ روز پس از کشت صورت گرفت و دو هفته پس از اعمال تنش، اندازه‌گیری صفات (آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز و بیان نسبی ژن TaMYB73) انجام شد. نمونه برگی ارقام مورد بررسی تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی TaMYB73 به همراه ژن خانه‌دار 18S استفاده شد. بدین منظور طراحی این آغازگرها بر اساس انتهای ۳' به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی NCBI National Center for Biotechnology Information و همچنین نرم‌افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج RNA و ساخت cDNA: در این مطالعه برای استخراج RNA مورد نظر از برگ ارقام گندم نان براساس دستورالعمل کیت Total RNA isolation شرکت دنارزیست آسیا انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ مشخص گردید. در این پژوهش برای تیمار RNA تام از آنزیم DNase1 شرکت پیشگام استفاده گردید. به طوری که مواد مورد استفاده در این پژوهش (جدول ۲) در داخل یک میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتری عاری از RNase ریخته شد. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه میکروتیوب‌ها در دمای 37°C قرار داده شدند. سپس ۱ میکرولیتر از EDTA ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 65°C قرار داده شد.

پس از استخراج RNA، ساخت cDNA با استفاده از کیت Geneall شرکت پیشگام انجام گرفت و برای ساخت cDNA از RNA تیمار شده با DNaseI استفاده شد (جدول ۳).

مطالعه بیان ژن مورد نظر با روش Real-time PCR و با استفاده از دستگاه Real-time PCR set Corbett (3000) و کیت EvaGreen انجام شد. تمام cDNAهای ساخته شده، از طریق دستگاه Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط واکنش برای هر نمونه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل: ۴ میکرولیتر مخلوط EvaGreen (Hot Taq Evagreen mix, no Rox) از شرکت دنارزیست آسیا، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشتی ($10 \mu\text{M}$)، ۱۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود. مراحل تکثیر به این شرح بود: واسرشت‌سازی اولیه ۱۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه (به صورت ۱۵ ثانیه واسرشت‌سازی در 95°C درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه اتصال در دمای $60-65^{\circ}\text{C}$ و در نهایت طول‌سازی نهایی در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

Table 1. Name and sequences of designed primers

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequences	طول ناحیه تکثیر (جفت‌باز) Amplicon length (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)
TaMYB73.FWD1	5'-GGATGGAAACCAGCGACAC-3'	229	61.5
TaMYB73.REV1	5'-TCTAAATCTGCGACAACTCTGTATG-3'		
18s.FWD2	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'	151	59.5
18s.REV2	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'		

جدول ۲- میزان مواد لازم جهت تیمار RNA با آنزیم DNaseI

Table 2. The amount of materials used for RNA treatment with DNaseI enzyme

اجزای واکنش Reagents	حجم مواد Volume
DNase (2 Unit/μl)	1 μl
Reverse Transcription 10X Buffer	1 μl
Total RNA (100 ng/μl)	7.5 μl
Nuclease free water	0.5 μl

جدول ۳- مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA

Table 3. Reagents and volume for cDNA synthesis.

اجزاء واکنش Reagents	حجم مواد Volume
Total RNA (100 ng/ul)	3 μl
Specific Primer (10 μM)	0.5 μl
dNTP (10 mM)	0.5 μl
RTase reaction buffer (10X)	1 μl
DTT (0/1 mM)	1 μl
HYPER Script TM Reverse Transcriptase (200u/μl)	0.5 μl
Zym ALL™ RNase inhibitor (40 u/μl)	0.5 μl
Nuclease free water	3 μl

مایع هموژن شد و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد (pH = ۷/۵) محتوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA اضافه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش برز و سایزر (Beers and Sizer, 1952) با کمی تغییرات، ابتدا ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH = ۷)، ۰/۱۵ میکرولیتر EDTA و ۵۴۹/۸۵ میکرولیتر آب مقطر در تیوپ ریخته شد و ۳۸۲/۵ میکرولیتر

تمامی واکنش‌های PCR در طی ۳ تکرار انجام گرفت و تجزیه داده‌های دستگاه Real-time PCR با نرم‌افزار SAS v.9.1 انجام شد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. برای هر نمونه سه تکرار زیستی برای ژن اختصاصی و ژن خانه‌دار 18S در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز: تهیه عصاره آنزیمی به روش Sairam و همکاران (Sairam et al., 2002) انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از نمونه برگ با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن

آب اکسیژنه به آن اضافه شد (۳۸۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه را در ۲/۵ سی سی آب مقطر ریخته که آب اکسیژنه ۰/۷۵ مولار به دست آید. سپس ۳۰ میکرولیتر در مخلوط واکنش ریخته شد تا آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار به دست آید) و بلافاصله در دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico USA UV-2100) با طول موج ۲۴۰ نانومتر میزان جذب آن ثبت گردید و پس از اسپری شدن زمان یک دقیقه دوباره میزان جذب یادداشت گردید.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش کار و میسرا (Kar and Mishra, 1976) اندازه گیری شد. بدین منظور، ابتدا ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر پیرو گالول اضافه گردید. تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico USA UV-2100) اندازه گیری شد. تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس تولید پورپور گالین محاسبه شد که ضریب خاموشی این تبدیل برابر با ۲/۷۴ لیتر بر میلی مول بر سانتی متر است.

داده ها و نرم افزارها: پس از اندازه گیری و به دست آوردن داده های مربوط به آنزیم پلی فنل اکسیداز و کاتالاز و داده های مولکولی، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با روش LSD) به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۳ تکرار با استفاده از نرم افزارهای SAS v.9.1 انجام شد، برای ترسیم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز: براساس نتایج جدول ۴، تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده تنش خشکی و ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل تنش خشکی بر میزان آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در شرایط کنترل و تیمار تنش خشکی در سطح یک درصد معنی دار شد. با توجه به شکل ۱ اثر متقابل رقم در تنش خشکی نشان داد که بیشترین میزان آنزیم کاتالاز در رقم هیرمند و بالاترین سطح تنش خشکی (۱۵ درصد ظرفیت زراعی) (۰/۰۷۲۵ Unit μg^{-1} Protein) و کمترین میزان

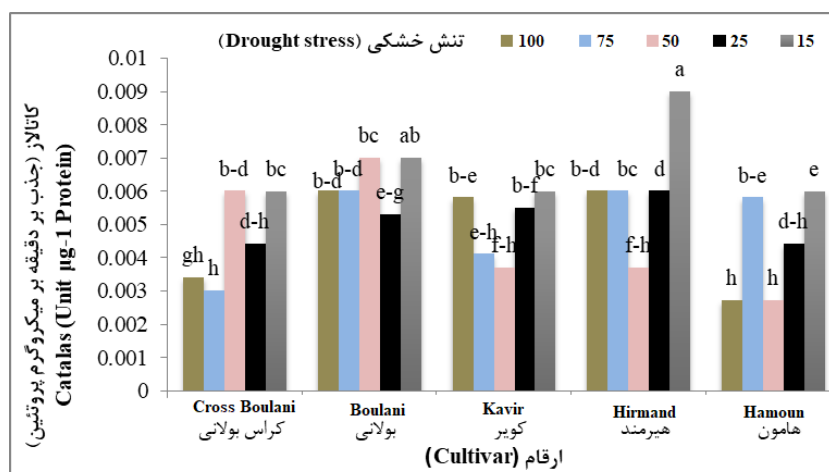
آنزیم در رقم هامون (۰/۰۰۲۷ Unit μg^{-1} Protein) در سطح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. یکی از راه های مقابله گیاهان به منظور کاهش آثار مخرب گونه های اکسیژن فعال، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان است (Sairam and Saxena, 2000; Hong and Ji-Yan, 2007). آنزیم های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در تجزیه پراکسید هیدروژن مشارکت می کنند (Reddy et al., 2004). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در تحقیقات متعددی که بر روی تنش های محیطی از جمله خشکی انجام شده، نشان داده شده است. شهاب و همکاران (Shehab et al., 2010) در تحقیقی نشان دادند که تنش خشکی سبب افزایش میزان آنزیم کاتالاز شد. همچنین نتایج حاصل از آزمایش خزاعی (Khazaei, 2002) نشان داد که اثر تنش خشکی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تمامی ارقام گندم نان مورد مطالعه گردید. در تحقیق انجام شده توسط تبارکی و همکاران (Tabaraki et al., 2017) که برخی ارقام گندم نان را در سطوح مختلف تنش خشکی مورد بررسی قرار داده بودند، بیشترین میزان آنزیم کاتالاز در رقم ارگ مشاهده شد، بنابراین نتایج مطالعه حاضر با نتایج محققین یاد شده همخوانی دارد.

نتایج مقایسه میانگین این مطالعه نشان داد که اثر متقابل رقم در سطوح رطوبتی معنی دار بود و رقم هیرمند در سطح ۵ درصد تنش از نظر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به سایر ارقام برتری داشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز اندازه گیری شده مربوط به رقم هیرمند در سطح ۱۵ درصد تنش خشکی بود که تفاوت معنی داری با رقم کراس بولانی و سایر ارقام در سطوح مختلف تنش خشکی داشت (شکل ۲). فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تنش های مختلف محیطی از جمله خشکی ارزیابی شده است. در پژوهشی شهریاری و همکاران (Shahriari et al., 2012) که بر روی تعدادی ارقام رایج گندم دوروم و نان در ایران صورت گرفت، مشاهده نمودند که میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارقام دوروم بسیار کمتر از میزان آن در ارقام گندم نان بود.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز

Table 4. Analysis of variance of catalase and polyphenol oxidase enzymes

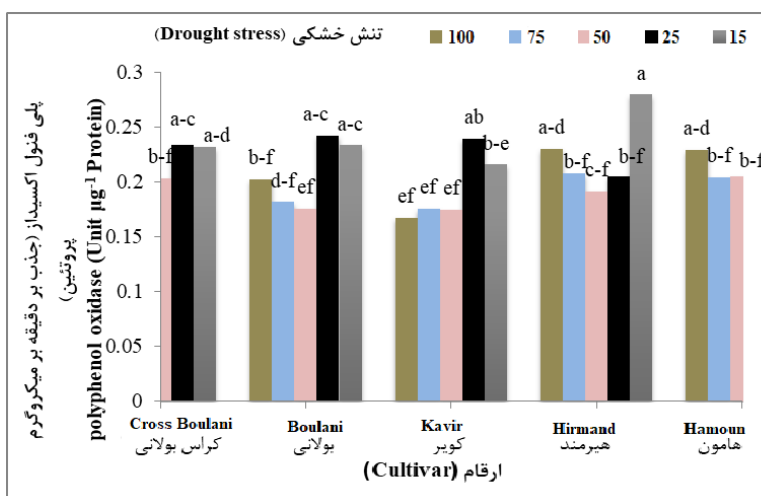
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F.	فعالیت آنزیم کاتالاز Catalase enzyme	فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase enzyme
بلوک Block	2	0.000062**	0.019**
تنش خشکی Drought stress	4	0.000015**	0.0069**
رقم Cultivar	4	0.000014**	0.0015*
اثر متقابل رقم × تنش خشکی Interaction (cultivar × drought stress)	16	0.0000046**	0.0014*
خطا Error	48	0.00000011	0.00066
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	19.68	12.29



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (Unit µg⁻¹ Protein) پنج رقم گندم نان تحت تنش خشکی
Figure 1. Catalase activity (Unit µg⁻¹ Protein) in five wheat cultivars under drought stress.

میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with same letters are not significant at 5% of probability level.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (Unit µg⁻¹ Protein) پنج رقم گندم نان تحت تنش خشکی
Figure 2. Polyphenol oxidase activity (Unit µg⁻¹ Protein) in five wheat cultivars under drought stress

میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

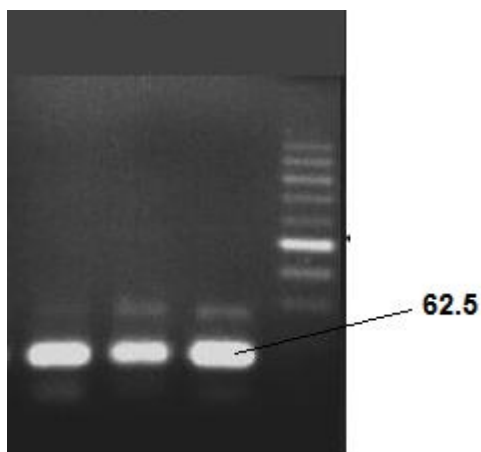
Means with same letters are not significant at 5% of probability level.

در تحقیق مزبور بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۵ درصد) مشاهده شد. تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی مختلف گزارش شده است (Hernandez et al., 2000). در مطالعه نعیمی و همکاران (Naeemi et al., 2018) که ارقام گندم دوروم را در سطوح مختلف تنش خشکی بررسی کردند، ژنوتیپ شبرنگ در سطح ۵ درصد ظرفیت‌زراعی بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و ژنوتیپ کرخه در سطح ۲۰ درصد ظرفیت‌زراعی کمترین میزان فعالیت این آنزیم را به خود اختصاص داد که نتایج آن‌ها با نتایج حاصله از این تحقیق مطابقت دارد. همچنین در نتایج آن‌ها میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بین ژنوتیپ‌ها متفاوت بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در ژنوتیپ شبرنگ مشاهده شد. نتایج حاکی از آن است که تنش خشکی با بر هم زدن شرایط مطلوب، سبب بروز اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌گردند که همان‌گونه که قبلاً نیز ذکر شد، یکی از عوامل اصلی این اختلالات، تولید انواع اکسیژن‌فعال یا (ROS) می‌باشند. آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز در رابطه با واکنش مهلر (Mehler reaction) و احیای نوری اکسیژن توسط PSI عمل می‌کنند (Vaughn et al., 1988). بنابراین در شرایط تنش خشکی و کاهش فتوسنتز که واکنش مهلر یک مخزن غیرمخرب برای مصرف انرژی نورانی استفاده نشده در واکنش‌های فتوشیمی فراهم می‌کند، این آنزیم‌ها از این طریق می‌توانند سبب افزایش مقاومت در برابر تنش شوند (Biehler and Fock, 1996). اگرچه در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط تیپاپونگ و همکارانش (Thipyapong et al., 2004) بر روی گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد، خاموش‌سازی ژن کدکننده آنزیم پلی فنل اکسیداز سبب افزایش مقاومت به تنش خشکی گردید. نتایج تحقیق حاضر با نتایج محققان دیگر که گزارش کرده بودند فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تحت تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی در گیاهانی چون کاسنی

(Raesi et al., 2019)، بنگدانه (Zamani et al., 2013) و کنبج (Fazel et al., 2007) افزایش یافته است هم‌خوانی دارد. افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط خشکی به دلیل افزایش سوبسترای آن از جمله ترکیبات اکسیژن‌فعال هست که نشان دهنده نقش مهم این آنزیم جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. افزایش پلی فنل اکسیداز در محصولات مانند آرد گندم سبب تیره شدن رنگ آرد و کاهش کیفیت محصول می‌شود. در پژوهشی که بر روی تعدادی ارقام رایج گندم دوروم و نان در ایران صورت گرفت میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارقام دوروم بسیار کمتر از میزان آن در ارقام گندم نان گزارش شد (Yoshimura et al., 2000).

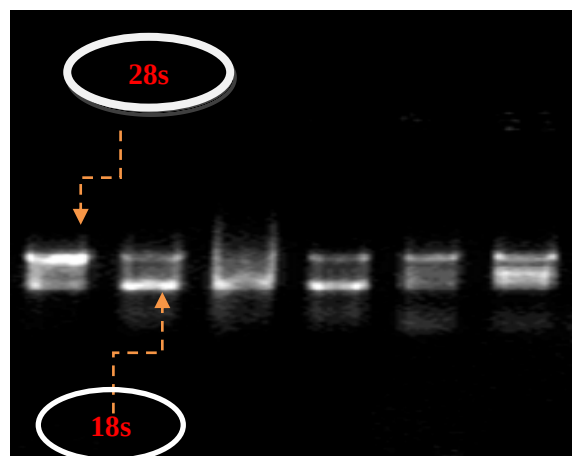
بعد از استخراج RNA کل جهت تأیید استخراج نمونه‌ها، روش‌های متعددی وجود دارد که یکی از متداول‌ترین روش‌ها، برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز بخشی از آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید می‌باشد. در نمونه‌های یوکاریوتی، RNA استخراج شده سالم و کامل باید دارای باندهای 18S rRNA و 28S rRNA واضح و مشخص بوده و شدت باند مرتبط با 28S rRNA تقریباً دو برابر باند ریبوزومی دیگر باشد. پس وجود باندهای 18S و 28S را می‌توان دلیلی بر صحت استخراج دانست (شکل ۳). گرادیانت دمایی ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای بررسی دمای اتصال آغازگر ژن TaMYB73 قرار داده شد که بهینه‌ترین دمای اتصال آغازگر مورد نظر ۶۲/۵ به‌دست آمد (شکل ۴). نتیجه حاصل از گرادیانت دمایی برای بررسی دمای اتصال آغازگر ژن 18S نشان داد که مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگر مورد نظر ۵۹ می‌باشد (شکل ۵).

از جمله خصوصیات و مزایای Real-time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرایند PCR انجام می‌شود. عدم وجود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر عدم وجود آغازگر دایمر می‌باشد. نتایج نشان داد که واکنش دارای بازدهی مناسبی برای تعیین کمیت بیان ژن می‌باشد (شکل ۶ و ۷).

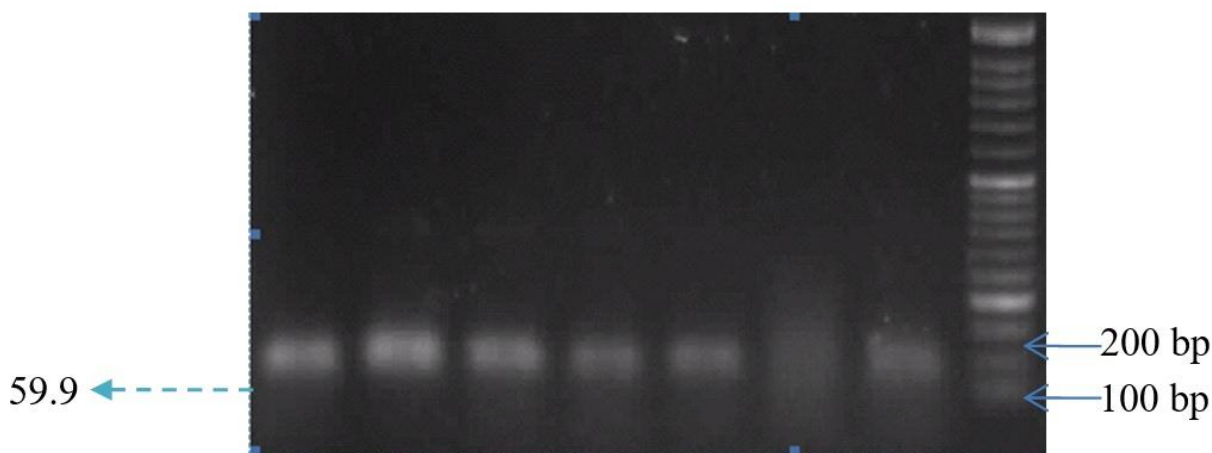


شکل ۴- نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای اتصال (°C) ژن *TaMYB73*. نشانگر استفاده شده ۱۰۰ bp است.

Figure 4. The result of PCR to determine the optimum annealing temperature (°C) of the *MYB73* gene. The ladder is 100 bp.

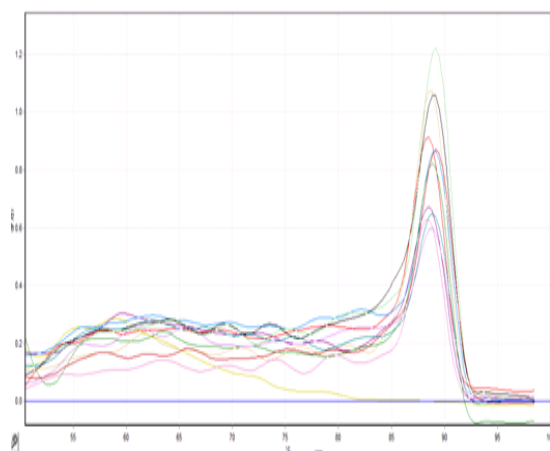


شکل ۳- RNA استخراج شده از برگ گیاه گندم
Figure 3. RNA extracted from wheat leaf



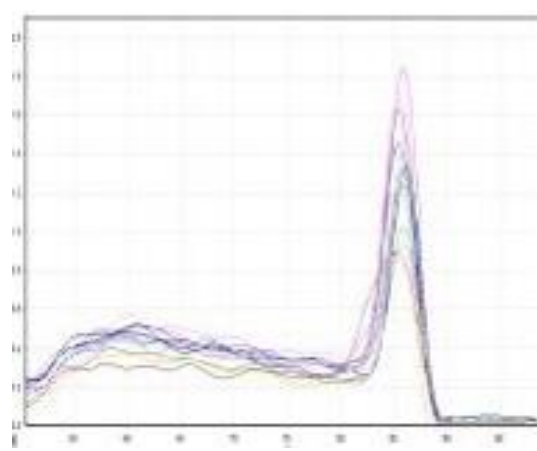
شکل ۵- نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای اتصال (°C) ژن 18srRNA. نشانگر ۱۰۰ bp می‌باشد.

Figure 5. The result of PCR to determine the optimum annealing temperature (°C) of 18srRNA gene. The ladder is 100 bp.



شکل ۷- منحنی ذوب ژن 18srRNA گیاه گندم

Figure 7. 18srRNA gene melting curve of wheat plant



شکل ۶- منحنی ذوب ژن *TaMYB73* گیاه گندم

Figure 6. *TaMYB73* gene melting curve of wheat plant

نتایج بررسی بیان نسبی ژن *TaMYB73* با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس اثر خشکی، ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ در خشکی در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۵). نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی در ژنوتیپ در شکل ۸ آورده شده است. بیشترین میزان بیان نسبی ژن *TaMYB73* در ژنوتیپ هیرمند در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۵ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین میزان بیان ژن مذکور در تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در سطح ملایم تنش خشکی مشاهده شد.

خانواده عامل رونویسی MYB نقش‌های زیادی را در فرآیندهای فیزیولوژیکی تحت شرایط نرمال و تنش، ایفا می‌نماید (Stracke et al., 2001; Cai et al., 2015). برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می‌دهند و برخی در مواجهه با تنش طولانی مدت واکنش نشان می‌دهند. خانواده بزرگ MYBها در گندم برای سازگاری به تنش شوری و خشکی نقش دارند (Tabaraki et al., 2017). نتایج پژوهشی نشان داد که بیان ژن *OsMYB48-1* به شدت توسط ABA، H₂O₂، PEG و روش‌های کم‌آبی القا شده است. بنابراین براساس الگوی القایی خاص *OsMYB48-1* در مقایسه با پروتئین MYB، نقش ویژه‌ای در پاسخ به تنش‌های بی‌رویه در برنج ایفا می‌کند.

نتایج بیان ژن‌های عوامل رونویسی (*MYB*، *NAC*، *BZIP*، *BHLH* و *WRKY*) 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). نتایج مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2014) که ژن *TaMYB19* (از عوامل رونویسی MYB) را به گیاه آراییدوپسیس منتقل کرده بودند، نشان داد که الگوهای بیان در شرایط نرمال مشابه، اما در شرایط تنش‌های غیرزنده (از قبیل، شوری، خشکی و گرما) ژن *B-TaMYB19* بیان متفاوتی را در تحمل به

تنش نسبت به دو توالی همولوگ از خود نشان داد. نتایج حاصله با نتایج تبارکی و همکاران (Tabaraki et al., 2017) که ۵ ژنوتیپ گندم نان را در شرایط تنش خشکی و براساس تغییر میزان بیان ژن *TaMYB73* مورد بررسی قرار داده بودند، مطابقت دارد. در نتایج آن‌ها میزان بیان ژن مذکور در سطح شدید تنش خشکی بیشترین مقدار را داشت و در نتیجه با افزایش تنش، بیان ژن هم افزایش یافت و رقم ارگ به‌عنوان بهترین رقم تحت شرایط آزمایش معرفی شد.

نتایج آنالیز RT-PCR کمی در تحقیقات رهایی و همکاران (Rahaei et al., 2010) نشان داد بیان اغلب ژن‌های انتخاب شده مانند ژن MYB در ریشه‌ها و قسمت هوایی نمونه‌های ۱۳ روزه گندم، هنگام پاسخ به شرایط تنش کوتاه مدت شوری، افزایش می‌یابد. این نتایج، با نتایج حاصل از تحقیق حاضر برای ژن *TaMYB73* در سطوح مختلف تنش خشکی متفاوت بود. یار حسین و همکاران (Yar Hussain et al., 2011) گزارش کردند که برخی از عوامل رونویسی سریعاً پس از بروز تنش محیطی افزایش بیان نشان می‌دهند و برخی در مواجهه با تنش طولانی مدت واکنش نشان می‌دهند و خانواده بزرگ MYB در گندم برای سازگاری به تنش شوری نقش دارند. نعیمی و همکاران (Naeemi et al., 2019) در پژوهش خود به این نتیجه رسید که بیشترین میزان بیان ژن *TaMYB73* وقتی گیاهچه‌های گندم در دورم مورد بررسی تحت تأثیر تنش خشکی و به‌خصوص در بالاترین سطح تنش خشکی قرار گرفتند افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان این ژن در رقم شبرنگ مشاهده شد. در این مطالعه نیز تغییرات بیان ژن در شرایط تنش خشکی در پنج رقم گندم نان مورد مطالعه نشان دهنده‌ی القای بیان ژن *TaMYB73* در سطوح تنش خشکی بود که با پژوهش‌های انجام شده قبلی مطابقت دارد.

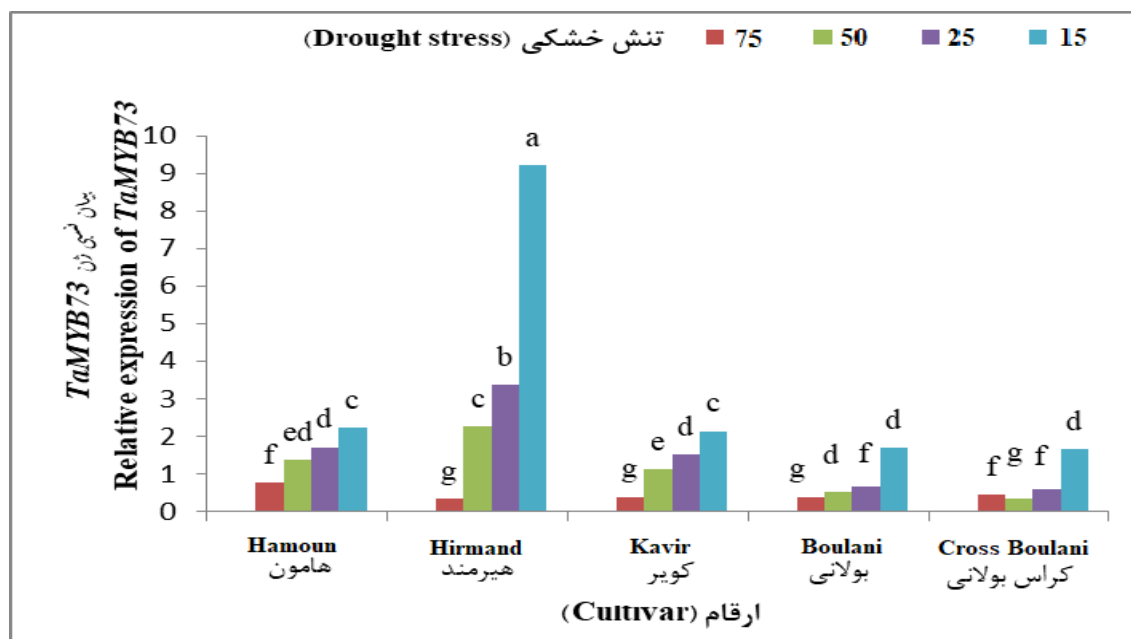
جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن *TaMYB73*

Table 5. Analysis of the variance of *TaMYB73* gene expression

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	$\Delta\Delta CT$
بلوک Block	2	0.0287*
تنش خشکی Drought stress	4	2.357**
رقم Genotype	4	1.872**
اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی Interaction (Genotype × Drought stress)	16	0.636**
خطا Error	48	0.14
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	2.348

* و **: به ترتیب تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively percent.



شکل ۸- میزان بیان ژن *TaMYB73* (Fold change) پنج رقم گندم نان تحت شرایط تنش خشکی

Figure 8. *TaMYB73* gene expression (Fold change) of five wheat cultivars under drought stress conditions

میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with same letters are not significant at 5% of probability level.

سطح شاهد، میزان بیان نسبی ژن *TaMYB73* افزایش یافت؛ به‌طوری که بیان ژن در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۵ درصد ظرفیت زراعی) و در رقم هیرمند بیشترین

براساس نتایج حاصل از این مطالعه که بر روی پنج رقم گندم نان منطقه سیستان تحت تنش خشکی انجام شد، مشاهده شد که با افزایش سطوح تنش خشکی نسبت به

سایر آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی) روی رقم هیرمند انجام شود.

سپاسگزاری

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 می شود.

مقدار بود. همچنین با افزایش تنش خشکی مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز نیز در ارقام مورد مطالعه افزایش نشان داد و بیشترین مقدار این آنزیم ها در رقم هیرمند مشاهده شد. لذا براساس نتایج حاصل از بررسی بیان ژن TaMYB73 و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در بین ارقام مورد بررسی، رقم هیرمند به تنش خشکی عکس العمل بهتری نشان داد. لذا پیشنهاد می شود به منظور اطمینان بیشتر به نتایج بدست آمده از این تحقیق، سایر آزمایش های تکمیلی (مثل ارزیابی فعالیت

References

- Abogadallah, G.M. (2010). Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling and Behavior*, **5(4)**: 369-374 (In Persian).
- Agarwal, P.K. and Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum*, **54**: 201-212.
- Agarwal, S. and Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biology Plants*, **48**: 555-560.
- Akhtar, W. and Mahmood, T. (2017). Response of rice polyphenol oxidase promoter to drought and salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, **49(1)**: 29-23.
- Andarzian, B. (2010). Study and comparison of wheat and Barley Yield under limited Irrigation conditions in Ahwaz climatic conditions. M.Sc. Thesis. Ahvaz University of Shahid Chamran, Ahvaz, Iran (In Persian).
- Arab, K., Ravash, R. and Shiran, B. (2020). Evaluation of MYB93 and MAD8 genes in transgenic and non-tansgenic Rice. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 33-42 (In Persian).
- Asadi, A.A., Valizadeh, M., Mohammadi, S.A. and Khodarahmi, M. (2020). Genetic analysis of response to water deficit stress based on physiological traits in Wheat. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 1-20 (In Persian).
- Beers, G.R. and Sizer, I.V. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, **195**: 133-140.
- Biehler, K. and Fock, H. (1996). Evidence for the contribution of the Myeloperoxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**: 265-272.
- Blum, A., Gozlan, G. and Mayer, J. (1981). The manifestation of dehydration avoidance in wheat breeding germplasm. *Crop Science*. **21(4)**: 495-499.
- Briggle, L.W. and Curtis, B.C. (1987). *Wheat worldwide*. In *Wheat and Wheat Improvement*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, USA.
- Cai, H., Tian, S., Dong, H. and Guo, C. (2015). Pleiotropic effects of TaMYB3R1 on plant development and response to osmotic stress in transgenic Arabidopsis. *Journal of Gene*, **558**: 227-234.
- Chaves, M.S., Martinelli, J.A., Wesp-Guterres, C., Graichen, F.A.S., Brammer, S.P., Scagliusi, S.M. and Consoli, L. (2013). The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. *Food Security*, **5**: 157-176.
- Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y. and Chong, K. (2007). Overexpression of an R1R2R3MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, **143**: 1739-1751.

- 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.
- Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M. and Shekari, F. (2011). The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms on wheat seedling. *Fresenius Environmental Bulletin*, **20**(8): 2021-2036.
- FAO. (2013). FAO Statistical Database (FAOSTAT), Web site at URL: <http://www.faostat.fao.org/sit/339/default.aspx>. Accessed 09 June 2014
- Fazeli, F., Ghorbanli, M. and Niknam, V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, **51**(1): 98-103.
- Fowler, S. and Thomashow, M.F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, **14**: 1675-1690.
- Gharbi, A., Rashidin, A., Tarynzhad, S. and Chlbyyany, Q. (2013). Salinity and drought tolerance of durum wheat lines under greenhouse conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*, **4**(28): 393-410 (In Persian).
- Ghasemi Pirbalouti, A., Samani, M.R., Hashemi, M. and Zeinali, H. (2014). Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. *Plant Growth Regulation*, **72**: 289-301.
- Gressel, J., Galun, E., Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M. (1994). *Genetic Controls of Photooxidant Tolerance*. CRC Press Inc. Boca Raton USA.
- Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisumsativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environment*, **23**: 853-862.
- Hong, W. and Ji-Yan, J. (2007). Effects of zinc deficiency and drought stress on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea mays* L.). *Agricultural Science in China*, **6**(8): 988 -995.
- Javadi, S.M., Shabr, Z.S., Pour Abed, A. and Ghadiri, S. (2016). Reconstruction and analysis of drought tolerance gene networks in *Hordeum vulgare* leaf. *The First International Conference and the 9th National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran*. May 3rd to 5th, Tehran (In Persian).
- Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, **57**(2): 315-319.
- Khazaei, B. (2002). Effect of drought stress on yield and physiological characteristic of resistant and susceptible wheat cultivars and introduction of the most appropriate drought resistance indices. Ph.D. Thesis, Ferdowsi University, Mashhad, Iran (In Persian).
- Kouchaki, A. and Alizadhe, A. (1986). *Crop Production in Dry Regions*. Astan Qods Razavi Press, Mashhad, IR (In Persian).
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta(CT)}$ method. *Methods*, **25**(4): 402-408.
- Naemi, 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).
- Naemi, T., Fahmideh, L. and Fakheri, B.A. (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).
- Naghavi, M.R. and Mardi, M. (2010). Characterization of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii*. *Journal of Molecular Biology Biotechnology*, **18**: 93-96.

- Raesi, R., Fakheri, B. and Mahdinezhad, N.** (2019). Evaluation of the effect of *Glomus fasciolaria* on some morphological characteristics, photosynthetic pigments and antioxidant activity of Chicory (*Cichorium intybus* L.) under drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, **12**(2): 459-505.
- 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.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M.** (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, **161**(11): 1189-1202.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.L.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**: 2105-2110.
- Sairam, R.K. and Saxena G.C.** (2000). Oxidative stress and antioxidant in wheat genotype: possible mechanism of water stress tolerance. *Agronomy and Crop Sciences*, **184**(1): 55-61.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava. G.C.** (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, **163**: 1037-1046.
- Shahriari, P., Mirshams Kakhaki, A. and Amini, M.** (2012). Molecular detection of enzyme polyphenol oxidase in a number of common wheat varieties in Iran marker by STS. *Iran's Third National Conference on Agricultural Biotechnology of Plant, Animal and Industrial*. Mashhad, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (In Persian).
- Shهاب, G.G., Ahmed, O.K. and El-Beltagi, H.S.** (2010). Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **38**: 139-148.
- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Biotechnology*, **4**: 447-456.
- 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).
- Tarahomi, P., Lahooti, D. and Abbasi, P.** (2010). Effects of drought stress on soluble sugars, chlorophyll and potassium *S. leriifolia* (*Salvia leriifolia* Benth). *Journal of Biological Sciences*, **3**(2): 1-7 (In Persian).
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W. and Steffens, J.C.** (2004). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Science*, **167**(4): 693-703.
- Thirumalaikumar, V.P., Devkar, V., Mehterov, N., Ali, S., Ozgur, R., Turkan, I. and Balazadeh, S.** (2018). NAC transcription factor JU NGBRUNNEN 1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, **16**: 354-366.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozoki, K. and Shinozoki, K.** (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**: 113-122.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. and Duke, S.O.** (1988). Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum*, **72**: 659-665.
- Yar Hussain, M., Heydariyan, Z., Nezaei, A. and Ramezani, L.** (2011). Examined the expression levels of two genes encoding the transcription factors related-MYB family in two varieties of wheat under salt stress. *National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran, Tehran, Iran* (In Persian).
- Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S.** (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, **123**: 223-233.

- Zamani, Z., Niakan, M. and Ghorban-Ali, M.** (2013). Influence of exogenous putrescine on phenolic compounds, antioxidant enzymes activity and nitrate reductase in seed germination under drought stress. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, **8(3)**: 78-90.
- Zhang, L., Liu, G., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X. and Kong, X.** (2014). Characterization of a wheat *R2R3-MYB* transcription factor gene, *TaMYB19*, involved in enhanced abiotic stresses in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, **55**: 1802-1812.

Study of *MYB* Transcription Factor Gene Expression in Some Bread Wheat Cultivars of Sistan Region, Iran

Leila Fahmideh^{1,2,*}, Mohammad Ali Delarampoor³ and Ziba Fooladvand⁴

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

4- Ph.D. Student, Department of Biology-Molecular Genetics, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: January 5, 2020 – Accepted: September 5, 2020)

Abstract

Drought, an abiotic stress, considered as one of the factors limiting food resources. The plant responses to adaptive to such a condition are accompanied with changes in the expression pattern of some functional as well as regulatory genes. The *MYB* proteins include a big family of transcription factors which are highly important in regulating development process and immunizing responses of plants. This research was conducted to evaluate the expression of *TaMYB73* transcription factor and catalase and polyphenol peroxidase enzymes activity in bread wheat cultivars (Hamoon, Hirmand, Kavir, Bolani, and Cross Bolani) under drought stress conditions. Factorial experiment was conducted in pot based on a completely randomized block design with three replications. Following 45 days from seed planting (four- leaf stage), drought stress was done at five levels of different irrigation and then the leaves of treated plants were sampled to measure of enzyme activity and gene expression. After RNA extraction and cDNA synthesis, the gene expression pattern was evaluated using Real-time PCR and data analysis was performed via $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. The results showed that *TaMYB73* gene expression level as well as the catalase and polyphenol peroxidase enzymes activities corresponding to the Hirmand cultivar was higher than the other cultivars.

Keywords: Resistant cultivars, Sensitive cultivar, Polyphenol oxidase, Catalase, *TaMYB73*, Real-Time PCR

* Corresponding Author, E-mail: l.fahmideh@uoz.ac.ir