DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

بررسی بیان ژنهای *NAC6* و *NAC10* تحت تنش خشکی در بافتهای برگ و بساک برنج تراریخت و غیر تراریخت رقم Nipponbare

کبری عرب[1]، رودابه راوش[2*] و بهروز شیران[2]

[1] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[2] ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۷

چکیده

پروتئینهای متصل شونده به عناصر پاسخ دهنده به تنش خشکی از اهمیت ویژه ای در بالا بردن مقاومت گیاه به تنش خشکی برخوردارند. در این تحقیق با هدف تعیین تفاوت بیان فاکتورهای رونویسی در بافتهای مختلف، بیان ژنهای کد کننده عوامل رونویسی NAC10 و NAC6 در برنج تحت تنش خشکی در بافتهای برگ و بساک مورد بررسی قرار گرفتند. بذور گیاه تراریخته برنج و غیر تراریخته رقم Nipponbare کشت شدند و از بافتهای برگ و بساک در مرحله میکروسپور جوان در زمانهای مختلف پس از قطع آبیاری، نمونه برداری صورت گرفت. آنالیز پروموتر انجام شد و دو فاکتورهای رونویسی از خانواده NAC انتخاب شدند. نتایج حاصل از real-time PCR نشان داد که ژنهای *NAC10* و *NAC6* در برنج، هر دو در بافتهای بساک و برگ بیان می‌شوند و بیان این ژنها تحت تنش خشکی به طور معنی داری افزایش یافته است که بیشترین مقدار بیان هر دو فاکتور رونویسی مربوط به بافت بساک بوده است، بیشترین مقدار بیانی *NAC10* مربوط به بساک گیاه غیر تراریخت در حدود ۷۰ برابر حالت کنترل بود و بیشترین مقدار بیانی *NAC6* مربوط به بساک گیاه تراریخت به مقدار ۶۰ برابر حالت کنترل و در هر دو مورد بیشترین بیان در زمان ۲۴ ساعت پس از شروع تنش رخ داده است. این نتایج حاکی از نقش مهم این فاکتورها در بافت بساک گیاه برنج در هنگام مواجه شدن با تنش خشکی می‌باشد.

واژه های کلیدی: آنالیز پروموتر، تنش خشکی، فاکتورهای رونویسی، بیان ژن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱ ، پست الکترونیکی: r.ravash@sku.ac.ir

مقدمه

تنشهای محیطی می توانند باعث القای مکانیسمهایی درون گیاه شوند که باعث آسیب به غشای سلولی، آسیب به مولکولهای DNA و پروتئین و کم شدن عملکرد گیاه می شود (۲). بررسی عوامل تنظیمی در پاسخ به تنشها حائز اهمیت می باشد. کنترل شروع رونویسی یک مکانیسم محوری است برای تعیین اینکه آیا یک ژن بیان می‌شود یا خیر و چه مقدار mRNA و در نتیجه، پروتئین تولید می-شود. پروموتر یک توالی است که رونویسی یک ژن را آغاز و تنظیم می‌کند. جایگاههای اتصال پروتئین در پروموتر، نماینده عناصر بسیار مهم هستند و پروتئینهای مسئول فاکتورهای رونویسی نامیده می‌شوند. فاکتورهای رونویسی NAC یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای مختص گیاهان می‌باشند (۲۳) که در مقاومت به شوری نقش دارند. آنها در پایین دست مسیرهای سیگنالینگ اکسین و اتیلن علاوه بر مسیر ABA عمل می‌کنند(۱۱). مشابه این پروتئینها پروتئینهای هسته‌ای DELLA هستند که در پاسخ به تنشهای محیطی ازجمله تنظیمات رشد، هنگام روبرو شدن با تنش شوری دخالت دارند (۳). فاکتورهای

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

رونویسی NAC (NAM, ATAF, CUC) یک خانواده ژنی مختص گیاه می‌باشند که نقش تعداد کمی از اعضای این خانواده در رشد و توسعه گیاه و همچنین تحمل گیاه به تنش شناسایی شده است. فاکتورهای رونویسی NAC شامل یک خانواده بزرگ پروتئینی هستند. پروتئینهای این خانواده دارای یک N–ترمینال متصل به DNA بسیار محافظت شده و یک دمین متغییر C–ترمینال می‌باشند (۷ و ۸). پروتئینهای NAC درگیاهان زمینهای وسیع هستند و تاکنون هیچ هومولوگی در سایر یوکاریوتها مشاهده نشده است (۲۴). گزارشات اولیه فاکتورهای رونویسی NAC مربوط به دخالت آنها در جنبه‌های مختلف رشد گیاهان بوده است. چندین مثال از این عوامل رونویسی در پتونیا (گل اطلسی)(۲۷)، NAM و CUC1-2 در آرابیدوپسیس (۴) نقش کنترل شکل‌گیری سلولهای مریستمی را بر عهده دارند. گزارش شده است که تعدادی از عوامل رونویسی NAC در تنظیم پیری، تقسیم سلولی و شکل‌گیری چوب در گیاهان نقش بسیار مهم و ضروری را ایفاء می‌کنند (۱۵، ۲۰ و ۳۰). پروتئینهای NAM، ATAF و CUC در پاسخ گیاه به پاتوژنها، عفونتهای ویروسی و پاسخ به محرک‌های ویروسی شرکت دارند (۱۷). علاوه بر این پروتئینهای این ژنها می‌توانند در اتصال با عنصر cis شامل موتیف CATGTG باشند (۲۹). به نظر می‌رسد که چندین ژن ازخانواده NAC در القای هورمون نقش دارند (۱۳). ژن *SNAC1* نیز از این خانواده در برنج در تحمل به تنش و پاسخ به تنش نیز شناسایی شده است (۱۴). از دیگر ژنهای این خانواده *OsNAC6* است که یکی از اعضای زیرخانواده ATAF می‌باشد (۱۶). این ژن هنگام تنش زیستی و تیمار جاسمونیک اسید القاء می‌شود، بیان بالای این ژن در برنج، باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش می‌شود (۲۲). آنالیز تک هیبریدی مخمر وجود ۱۲ پروتئین NAC که نماینده ترکیبات موتیف مختلف می‌باشد تأیید کرد که می‌تواند به جایگاه اتصال DNA متصل شود. مناطق پروموتر در ژنهای خانواده NAC القاء کننده آلومینیوم، در آنالیز پروموتر نشان داد که این مناطق شامل عناصر فعال cis هستند که مسئول پاسخ به اکسینها، سیتوکینینها، جیبرلینها، آبسیزیک اسید و اتیلن هستند. اطلاعات به دست آمده از این تحقیقات برای طراحی استراتژی استفاده از آلومینیوم به عنوان یک محرک زیستی رشد برای برنج و دیگر گیاهان بسیار مفید خواهد بود (۲۱). تعداد کمی از اعضای خانواده NAC در گیاهان ثابت کرده‌اند نقش مهمی در تنظیم رشد و توسعه گیاهان دارند(۹). بیان سه ژن خانواده NAC در آرابیدوپسیس، *ANACO19*، *ANACO55* و *ANACO72* در اثر تنش خشکی، شوری بالا و ABA القاء می‌شوند و این سه ژن بیان معنی‌داری را در تحمل به خشکی نشان می‌دهند (۲۹). درک مکانیزم پیچیده‌ای از خشکی و شوری برای تولید کشاورزی مهم است. در گیاه آرابیدوپسیس شناسایی عناصر تنظیمی ناحیه پروموتر نشان داده پروموتر ژنهای این ناحیه دارای گروههای مختلف عملکردی از جمله پاسخ به نور، پاسخ به تنشهای زیستی و غیر زیستی، پاسخ به فیتوهورمون، کنترل شبانه روزی و توسعه سلولی هستند. در همه ژنهای مورد بررسی عناصر تنظیمی TATA box و CAAT-box به عنوان عنصر رایج در ناحیه مرکزی پروموتر شناسایی شد. فاکتورهای رونویسی پروتئینهایی هستند که در اندامهای مختلف و در مراحل مختلف رشد در گیاهان وحیوانات وجود دارند. این پروتئینها با اتصال به عناصر تنظیمی cis در پروموتر در ژنهای هدف، سطوح بیان ژن را تنظیم می‌کنند، تا مراحل مختلف بیولوژیکی از قبیل رشد، تقسیم سلولی و پاسخ به تنشهای محیطی را کنترل کنند (۱۰). در برنج، ۲۰ ژن القاء کننده تنش در خانواده NAC شناسایی شدند که در مناطق پروموتر عناصر فعال cis در پاسخ به اسید آبسیزیک شناسایی شدند (۲۵).

در این تحقیق میزان بیان ژنهای مرتبط با فاکتورهای رونویسیNAC10 و NAC6 در تنش خشکی در دو گیاه غیر تراریخت و تراریخت، با هدف بررسی تأثیر پروموتر خارجی دارای جایگاه مرتبط با این عناصر تنظیمی، مورد اندازه‌گیری واقع شدند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

مواد و روشها

کشت گیاه و اعمال تنش: در این تحقیق بذور گیاه تراریخته برنج، رقم Nipponbare که در آنها ناحیه پروموتری ژن *S-like RNase* قبل از ژن *GUS* قرار گرفته است از مؤسسه CSIRO دریافت شدند (۱) و همراه با برنج غیر تراریخته رقم Nipponbare در دو تکرار، در دو شرایط کنترل و تنش خشکی در گلدانهای پلاستیکی در اتاقک کشت ایزوله در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۷۰ درصد در ۱۴ساعت روشنایی و ۱۰ساعت تاریکی در تشتهای پر آب کشت داده شدند. جهت ایجاد تنش در مرحله میکروسپور جوان گیاه برنج، قطع آبیاری صورت گرفت و نمونه برداری از اندامهای برگ و بساک این گیاه انجام شد. نمونه‌ها فورا در ازت مایع قرار گرفتند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. بساکها زیر دستگاه بینوکولار جدا شدند و سریعاً داخل ازت منتقل شدند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

همزمان با نمونه برداری گیاهان، چندین گلدان جهت تنش به مدت ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و ۷ روز بیرون از تشتهای آب قرار گرفت، و مقدار RWC آنها اندازه گیری شد و با RWC گیاه کنترل مقایسه شد تا تغییر در محتوی نسبی آب برگ در زمانهای تنش مشخص شود. برای اندازه گیری مقدار RWC به اندازه ۱۰ سانتیمتر از برگ انتهایی، نمونه برداری شد وزن اولیه آن اندازه گیری شد و نمونه برگ درون لوله‌های آزمایشی قرار گرفتند و با آب مقطر اشباع شدند و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴+ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، وزن تر آنها اندازه گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در آون گذاشته شد تا وزن خشک گیاه به دست آید و در نهایت میزان RWC با فرمول زیر تخمین زده شد (۲۶).

RWC= وزن اولیه – وزن خشک/وزن تر

مطالعات بیوانفورماتیکی: «آنالیز ناحیه پرموتری»: آنالیز ناحیه پرموتری با شماره دسترسی NC_029264.1 که به گیاهان تراریخت انتقال یافته بود، برای یافتن فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن توسط سایتهای plantRegMap (http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/) و همچنین MatInspector (https://www.genomatix.de/matinspector) صورت گرفت.

طراحی پرایمر برای ژن: برای طراحی پرایمر برای Real Time PCR (RT-PCR) ابتدا با وارد کردن نام ژن، توالی mRNA با فرمت FASTA از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) دریافت شد. توالی دریافتی در سایت Primer 3 وارد گردید و یکسری خصوصیات از قبیل مقدار GC مابین ۴۰ تا ۶۰، طول پرایمر بین ۲۰ تا ۲۳ همچنین اندازه محصول نهایی بین ۱۲۰ تا ۲۲۰ جفت باز مشخص گردید و جهت بررسی منحصر به فرد بودن محصول در RT-PCR، این پرایمرها وارد سایت Primer blast گردید و در این سایت گونه *Oryza sativa* و دیتابیس mRNA refseq انتخاب شد، تا تکثیر یک ناحیه واحدکه نشان دهنده گرفتن یک باند در PCR بود، تأیید گردد. (جدول ۱)

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در RT-PCR

	نام آغازگر	توالی آغازگر '3 - '5	دمای اتصال (°C)
1	NAC10 F	ACCCCATTCAACTGGTTCGA	56
	NAC10 R	CCTGCTTAGCCCACTAGGAAAC	
2	NAC6 F	GTGAATCGTCTTCCCACTGATG	55
	NAC6 R	TTCAACCCCACTGAAGAGAACT	
3	Actin1 F	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	58
	Actin1 R	ATCCAACCGGAGGATAGCATG	

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

استخراج RNA: RNA یک مولکول ناپایدار با نیمه عمر بسیار کوتاه وقابل استخراج از سلول و بافت می‌باشد. برای جداسازی RNA نیاز به مراقبت و احتیاط فراوانی می‌باشد چرا که مستعد تخریب شدن است. به منظور استخراج RNA کل، از محلول RNXTM-plus (شرکت سیناژن) استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میلی‌گرم بافتهای مختلف گیاه (برگ و بساک) در ازت مایع سابیده شد و پودر به دست آمده در یک میلی‌لیتر ماده RNXTM-plus همگن شد. سپس با افزودن کلروفورم فاز آبی که حاوی RNA کل بود از فاز آلی جداسازی و با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد و با اتانول شستشو داده شد و پلیت حاصله در آب DEPC حل گردید. برای خالص سازی RNA از کیت DNase (شرکت سیناژن) از بین بردن آلودگی از RNA استخراج شده، استفاده شد.

کمیت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتر با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندرف آلمان مشخص شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده، از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر 1X MOPS استفاده شد.

سنتز cDNA: سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت YTA(یکتا تجهیز آزما) صورت گرفت. بعد از اتمام چرخه، cDNA حاصل با ۲۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده به حجم رسانده شد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای مشخص شدن بهترین دما برای اتصال آغازگر، گرادیانت PCR گذاشته شد. بازه دمایی از ۵۴ تا ۶۲ درجه سانتی گراد برای نمونه‌ها در نظر گرفته شد و برنامه PCR اجرا شد. پس از تعیین بهترین دمای اتصال، PCR برای هر پرایمر برای گرفتن تک باند بر روی ژل انجام پذیرفت.

بررسی بیان ژن با استفاده از روش RT-PCR: میزان بیان ژنهای سنتز کننده فاکتورهای رونویسی با روش PCR کمّی مطالعه شد. PCR در زمان واقعی با دستگاه Rotor gene-Q با استفاده از مخلوط واکنش Takara حاوی SYBR® Green و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده طبق دستورالعمل کیت در پژوهشکده زیست فناوری صورت گرفت. این واکنش برای هر نمونه در ۲ تکرار تکنیکی انجام شد و از ژن خانه‌دار اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

برنامه واکنش شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس طی ۴۰ سیکل با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه ،۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه بود. الگویابی منحنی ذوب از ۶۲ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش صورت گرفت.

مقایسه‌های بیان داده‌های Real-time PCR با میزان رونویسی هر ژن خانه دار از طریق روش دلتا دلتا سی تی انجام گرفت (۱۲).

نتایج و بحث

آنالیز ناحیه پروموتری: آنالیز ناحیه پروموتری انتقال یافته به گیاه تراریخت با شماره دسترسی NC_029264.1 ، شماری از فاکتورهای رونویسی که در تنشهای مختلف زیستی و غیر زیستی نقش مهمی را ایفاء می‌کردند نشان داد. از جمله این فاکتورهای رونویسی، تعدادی TF (Transcription Factor) از خانواده NAC بودند که در این ناحیه پروموتری شناسایی شدند (جدول ۲ و ۳).

آنالیز ناحیه پروموتری در سایت plantRegMap اعضای مختلف عضو خانواده NAC را نشان داد که نتایج در جدول ۲ آورده شده است.

آنالیز پروموتر مورد نظر در سایت MatInspecter نیز TF هایی از خانواده های مختلف مشخص کرد که لیست TFهای مرتبط با خانواده NAC در جدول ۳ نشان داده شده است (جدول ۳).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

جدول ۲- پیش بینی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی خانواد NAC بر روی پروموتر مورد نظر

p-value	توالی*	رشته	محل	نام
7.08E-06	GATAAATTATTTTTCACGCAA	+	1006-1026	NAC070
1.21E-05	TTGCGTGAAAAATAATTTATC	-	1006-1026	NAC101
1.27E-05	GATAAATTATTTTTCACGCAA	+	1006-1026	NAC033
2.22E-05	TTGCGTGAAAAATAATTTATC	-	1006-1026	NAC020
4.46E-05	AGACAAGGAACT	-	967-978	NAC030
4.66E-05	TAAATTATTTTTCACGCAA	+	1008-1026	NAC083
4.73E-05	**TACGTATGTAGGACG**	**+**	**208-222**	**NAC010**
6.17E-05	TTGCGTGAAAAATAATTTATC	-	1006-1026	NAC046
6.54E-05	CGTCCTACATACGTA	-	208-222	NAC076
6.56E-05	TTGCGTGAAAAATAATTTA	-	1008-1026	NAC083
7.25E-05	ATTTGCGTGAAAAATAATTTA	-	1008-1028	NAC070
8.54E-05	CTACGTATGTAGGACGGG	+	207-224	NAC094
8.97E-05	CGACGTCGGGCCCAATTCGC	-	36-55	NAC042
9.03E-05	CGTCCTACATACGTA	-	208-222	NAC007
9.97E-05	TAAATTATTTTTCACGCAA	+	1008-1026	NAC87

*آنالیز شده با استفاده از پایگاه داده plantRegMap (http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/)

ماتریسهای سنگین از کتابخانه MatInspecter در حال حاضر با MatDefine به وجود آمده اند، که ابزاری برای تعیین اتوماتیک و ارزیابی ماتریسهای سنگین حاصل از مجموعه ای از جایگاههای اتصال فاکتورهای رونویسی می‌باشد. MatDefine الگوریتمهای اصلی را در چندین جهات گسترش می‌دهد: ۱- اول یک توالی کوتاه مرکزی به شدت محافظت شده در توالیهای ورودی معمولی، تعریف شده است. ۲- بعد از آن هم ترازی جایگاههای اتصال در ابتدای موقعیت توالی مرکزی مشخص شده محکم شده. ۳- طول ماتریس سنگین به صورت اتوماتیکی از دوطرف توسط برش دادن بخشهای کمتر محافظت شده مشخص می‌شود.۴- تمام توالیهای به دست آمده برخلاف نتایج ماتریس، دوباره چک می‌شوند و توالیهایی با شباهتهای ماتریسی کمتر از ۰/۸ پذیرفته نمی‌شوند. ۵- این فرآیند تا زمانی که ماتریس، همه توالیهای باقیمانده را تشخص دهد ادامه دارد. اگر کمتر از ۵ توالی باقی بماند، ماتریسی تولید نمی‌شود.۶- ماتریس نهایی با کل ماتریسهای موجود در کتابخانه مقایسه می‌شود تا مشخص شود که آیا ماتریس جدید به یک جایگاه اتصال موجود در حال حاضر، شباهتی دارد یا نه. بدین منظور همه جایگاههای اتصال برای تولید ماتریس استفاده می‌شود. جهت انطباقهای جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی با کل ماتریسهای کتابخانه، جستجو انجام می‌گیرد. تعدادی از جایگاههای اتصال تشخیص داده شده توسط خانواده ماتریس مشابه، به عنوان یک معیار برای اندازه‌گیری میزان شباهت به ماتریسهای موجود استفاده می‌شود و برای کاربر به عنوان منبع اطلاعاتی نقش ایفاء می‌کند (۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز پروموتر، نتایج پیش بینی در دو سایت موردنظر مقایسه شدند، NAC87، NAC30 به طور مشترک در هر دو سایت، برای این ناحیه پروموتری پیش بینی شدند. از بین TF های متفاوت از خانواده NAC که نقش آنها در پاسخ به خشکی، قبلا گزارش شده بود (۷)، فاکتور NAC10 از نتایج جدول ۲ و فاکتور NAC6 که در چند محل در جدول ۳ پیش بینی شده بود، انتخاب شدند.

پس از قطع آبیاری در گیاهان، RWC در روزهای مختلف اندازه گیری شد و میزان آن در هر زمان انتخابی برای نمونه گیری به میزان ۱۰-۲۰ درصد نسبت به زمان قبل کاهش داشت.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

جدول ۳- پیش بینی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی خانواد NAC بر روی پروموتر مورد نظر

امتیازدهی	توالی*	رشته	تا	از	توضیحات	نام ماتریس
0.757	atttataggccggccTACGtatgtagg	(+)	219	193	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site II)	P$NACF
0.785	tatgcccgtcctacatACGTaggccgg	(-)	228	202	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site I)	P$NACF
0.942	caatttaacaatattgcCAAGttttgaca	(+)	335	307	NAC domain containing protein 103	P$NACD
1	ctctagtaaatataTAAGaaatc	(-)	359	337	NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1-LIKE 6 (NTL6/NTM1)	P$NTMF
1	TGTGttg	(-)	571	565	Heterodimer of NAC-domain transcription factors GmNAC30 and GmNAC81	P$PCDR
0.943	aactttgtgaaagtAAAGaat	(-)	626	606	Secondary wall NAC binding elements	P$SWNS
0.765	agtttaCTTTtagctcattttatttgt	(-)	689	663	NAC domain containing protein 87	P$NACF
0.996	aaacaaaaagcatgagaCAAGgaactact	(-)	992	964	NAC domain containing protein 16	P$NACD
0.98	tttttgtttttcttgaGGAAaag	(+)	1006	984	NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1-LIKE 8 (NTL8/NTM1-like 8)	P$NTMF
0.99	atcttttcctCAAGaaaaaca	(-)	1008	988	NAC domain containing protein 71	P$SWNS
0.774	**aatttatcttttcctCAAGaaaaacaa**	**(-)**	**1013**	**987**	**NAC domain containing protein 92 (NAC6)**	**P$NACF**
0.995	ataatttatcttttcctCAAGaaaaacaa	(-)	1015	987	NAC domain containing protein 16	P$NACD
0.777	gtttttCTTGaggaaaagataaattat	(+)	1015	989	NAC domain containing protein 87	P$NACF
0.831	aaagataaattatttttCACGcaaataaa	(+)	1031	1003	NAC domain containing protein 38	P$NACD
1	**agataaattatttttcACGCaaataaa**	**(+)**	**1031**	**1005**	**Arabidopsis NAC domain containing protein 92 (ATNAC6)**	**P$NACF**
0.754	**gctagacatcgcatgCATGaaagttca**	**(+)**	**1111**	**1085**	**NAC domain containing protein 92 (NAC6)**	**P$NACF**
0.98	cttccatgtccagaGAAGaaaag	(+)	1239	1217	NAC with transmembrane motif 1-like 8 (NTL8/NTM1-like 8)	P$NTMF
0.752	aatgttttatgagtgGACGgtgccttt	(-)	1262	1236	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site II)	P$NACF

* آنالیز شده توسط پایگاه داده MatInspector (https://www.genomatix.de/matinspector)

تکثیر اختصاصی ژنهای مسئول فاکتورهای رونویسی NAC10 و NAC6 و ژن Actin (به عنوان ژن خانه دار) با استفاده از cDNA و به وسیله PCR کمّی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نمودار ذوب در RT-PCR صورت گرفت و تکثیر اختصاصی محصول با حضور یک قله در نمودار برای هریک از پرایمرها تأیید گردید.

بررسی میزان بیان ژن مسئول **فاکتور رونویسی NAC6 در بافت برگ و بساک:** داده‌های حاصل از آنالیز RT-PCR میزان بیان فاکتور رونویسی NAC6 در بافت برگ (شکل ۱A) و بساک (شکل ۱B) در گیاهان تراریخت (transgene) و غیر تراریخت (np) را نشان داد.

آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن مسئول فاکتور رونویسی NAC6 در شرایط تنش در بافت برگ، در همه زمانها نسبت به شرایط کنترل، هم در گیاه برنج تراریخته و هم در گیاه غیر تراریخته افزایش بیان نشان داده است.

شکل ۱- تغییر بیان ژن *NAC6* در زمانهای مختلف تنش خشکی در بافت برگ (A) و بافت بساک (B) گیاه تراریخت و غیر تراریخت

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

این در حالی است که بیان این فاکتور رونویسی در بافت برگ گیاه تراریخت، در زمانهای ۲۴ ساعت و یک هفته پس از شروع تنش، بیشتر از میزان بیان در نمونه غیر تراریخته بوده است. در مقابل میزان بیان ژن *NAC6* در بافت بساک در گیاه تراریخته در ۲۴ ساعت اول روبرو شدن گیاه با تنش خشکی افزایش بیان ۶۱ برابر داشته است. پس از آن، بیشترین بیان مربوط به نمونه بساک ۴۸ ساعت تنش تراریخته بوده است. میزان بیان این فاکتور رونویسی در گیاه غیر تراریخت نیز در زمانهای۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از تنش افزایش معنی داری داشته است ولی در مقایسه بین دو گیاه، افزایش بیان این فاکتور در گیاهی که پرومورتر در آن وارد شده بود در زمان ۲۴ ساعت حدود ۸ برابر و در زمان ۴۸ ساعت حدود ۳ برابر بیشتر از گیاه غیر تراریخت بوده است. در مقایسه بافت برگ و بساک، افزایش بیان این فاکتور در دو بافت و در هر دو نمونه تراریخته و غیر تراریخته مشاهده شده است ولی در بافت بساک میزان بیان بالاتر از بیان دربرگ بوده است. در مطالعات قبلی که با رنگ آمیزی هیستوشیمیایی، روی میزان فعالیت این پروموتر در بافتهای مختلف ریشه، برگ و بساک، صورت گرفته است، بیشترین فعالیت پروموتر و رنگ پذیری در بافت بساک مشاهده شده است (۱)، که با نتایج این تحقیق، مطابقت دارد. لی و همکاران (۲۰۱۷) با انجام تحقیقی بر روی ریشه‌های گیاه برنج تحت تنش خشکی میزان بیان یکی از اعضای فاکتور رونویسی NAC6 به نام *OsNAC6* را مورد بررسی قرار دادند، بررسی داده‌ها نشان داد که میزان بیان این فاکتورها در ریشه‌ها در هنگام تنش خشکی به خصوص در برنج گونه تراریخته افزایش نشان می‌دهد (۱۸). چانگ و همکاران (۲۰۱۸) با انجام تحقیقی بر روی بافت ریشه برنج تراریخته میزان بیان ژنهای فاکتورهای رونویسی *OsNAC5*، *OsNAC6*، *OsNAC9* و *OsNAC10* را مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد که میزان بیان این فاکتورهای رونویسی در ریشه گیاه برنج تراریخته هنگام مواجه شدن گیاه با تنش خشکی افزایش یافته است (۶). لیئو و همکاران (۲۰۱۸) با تحقیقی بر روی گیاه دارویی *Scutellaria baicalensis* به نقش مهم فاکتورهای رونویسی NAC در متابولیتهای ثانویه پی بردند و با آنالیز داده‌های RT-PCR نشان دادند که میزان بیان فاکتور ژن *NAC6* در ریشه‌ها و برگهای این گیاه افزایش بیان داشته است (۱۹).

در مجموع، در این تحقیق علاوه بر تأیید پاسخ این فاکتور رونویسی به شرایط تنش آبی در بافت برگ و بساک، بیان بالاتر این فاکتور در گیاه تراریخت نشان داد که حضور بیشتر پروموتر انتقال یافته در گیاه تراریخت، مرتبط با بیان بالاتر فاکتور رونویسی ای شد که جایگاه اتصال آن روی پروموتر پیش بینی شده بود.

بررسی بیان ژن مسئول **فاکتور رونویسی NAC10**: با آنالیز داده‌های RT-PCR میزان بیان ژن *NAC10* در بافت برگ (شکل ۲A) و بساک (شکل ۲B)دو بافت برگ و بساک مشخص گردید.

شکل ۲- تغییر بیان ژن *NAC10* در زمانهای مختلف تنش خشکی در بافت برگ (A) و بافت بساک (B) گیاه تراریخت و غیر تراریخت

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

آنالیز داده‌های RT-PCR نشان داد که بیان ژن *NAC10* در بافت برگ در گیاه غیر تراریخته در همه زمانهای تنش پاسخ افزایشی داشته است و بیشترین بیان را در ۷۲ ساعت (حدود ۱۴ برابر شرایط کنترل) و پس از آن در ۲۴ ساعت (حدود ۷ برابر شرایط کنترل) داشته است. بررسی بیان در برگ گیاه تراریخته نیز، پاسخ افزایش در حالت تنش نسبت به کنترل را نشان داد. در مقایسه برگ گیاهان تراریخته و غیر تراریخته، میزان بیان در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در برگ گیاهان تراریخته بیشتر از غیر تراریخته بوده است. در ۷۲ ساعت میزان بیان در برگ غیر تراریخته بالاتر از برگ تراریخته بوده است.

بیان قابل توجهی از این فاکتور در نمونه‌های بساک تراریخته دیده نشد، این در حالی بود که میزان بیان این فاکتور در بافت بساک نمونه غیر تراریخته در ۲۴ ساعت اول که گیاه با تنش خشکی مواجه شده بود، به میزان زیادی در حدود ۷۰ برابر شرایط کنترل، بالا رفته بود، که نشان دهنده نقش زیاد این فاکتور رونویسی در بافت بساک هنگام مواجه به شرایط خشکی می باشد. نکته قابل توجه اینکه میزان بیان این فاکتور در بافت بساک به ترتیب بعد از ۴۸ ساعت تنش و ۷۲ساعت تنش و در نهایت در ۷ روز تنش به کمترین میزان خود رسیده است. طبق تحقیقاتی که در این زمینه انجام گرفته شده است میزان بیان فاکتورهای رونویسی در ۲۴ ساعت اول مواجه شدن گیاه با تنش زیستی به بیشترین مقدار خود می‌رسند و بیان بالایی جهت مقاوم شدن گیاه در برابر تنش از خود نشان می‌دهند و با ادامه پیدا کردن تنش میزان بیان کمتر و کمتر می‌شود تا به جاییکه دیگر بیانی نخواهند داشت. در بافت بساک در گیاه تراریخت، بیان بسیار پایین این فاکتور در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش، مشاهده شده است. گزارشات مختلفی از نقش فاکتورهای رونویس خانواده NAC در خشکی وجود دارد به عنوان مثال هانگ و همکاران با انجام تحقیقی بر روی گیاه تراریخته برنج به بررسی بیان ژن *ONAC022* از خانواده NAC پرداختند آنالیز داده‌ها نشان داد که میزان بیان این ژن در گیاه تراریخته برنج هنگام مواجه شدن این گیاه با تنش شوری و تنش خشکی افزایش بیان داشته است، آنها نشان دادند که فاکتورهای رونویسی NAC در مقاوم کردن گیاه نسبت به تنش شوری و خشکی نقش به سزایی دارند (۱۲). همچنین تیرومالایی کومار و همکاران با تحقیق بر روی گیاه گوجه فرنگی نشان دادند که فاکتورهای رونویسی NAC در مقاومت گیاه نسبت به خشکی نقش به سزایی دارند (۲۸). تران و همکاران بر روی گیاه آرابیدوپسیس نقش فاکتورهای رونویسی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این فاکتورها بیان بالایی در هنگام مواجه شدن گیاه با تنش شوری و خشکی از خود نشان دادند (۲۹).

در بررسی پیش بینی جایگاههای اتصال فاکتورهای رونویسی اعضای مختلف خانواده NAC در دو سایت مختلف پیش بینی شدند. آنالیز توالی cis در برنج توسط محققان دیگری نیز صورت گرفته است و ۱۴۰ مورد فاکتور رونویسی NAC یا ژنهای *NAC-like* (*ONAC*) را نشان داده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک خانواده NAC نشان داده که این خانواده به ۵ گروه با نقشهای متفاوت تقسیم می‌شوند(۹). بر مبنای مقایسه میزان بیان ژن *NAC10* در شرایط افزایش حضور پروموتر انتقال یافته در گیاهان تراریخت در مقابل گیاه غیر تراریخت، و عدم هماهنگی میزان بیان بین پروموتر و TF کاندید، احتمالاً پیش بینی سایت plantRegMap مبنی بر قرار گرفتن این TF بر روی این پروموتر صحیح نمی باشد، ولی پاسخ افزایشی بسیار بالای این TF نسبت به شرایط خشکی، در گیاهان غیر تراریخت تأیید شد. با بررسی کلی پیش بینی جایگاههای اتصال فاکتورهای رونویسی در سایت MatInspector خانواده های مختلف TF پیش بینی شد، و در ادامه در این تحقیق خانواده NAC مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت و در بین اعضای این خانواده NAC6 که چندین جایگاه بر روی پروموتر برای آن پیش بینی شده بود، انتخاب شد. نتایج حاصل از بررسی کمّی، هماهنگی میزان

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

بیان این فاکتور با افزایش میزان پروموتر مرتبط با آن را نشان داد. سایت Genomatix و قسمت MatInspector در این سایت (http://www.genomatix.de/matinspector html.)، برای آنالیز پروموتر و بررسی جایگاههای تنظیمی و عوامل رونویسی بر روی آن، پیشنهاد می شود. MatInspecter توسط کارتاریوس و همکاران ارائه شده که جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی و خانواده ماتریس را در توالیهای نوکلئوتیدی شناسایی می‌کند. تعدادی از برنامه‌ها بر اساس MatInspecter اجازه آنالیز عمیق پروموتر و طراحی جایگاههای توالیهای تنظیمی را می-دهد(۵).

کیم و همکاران (2004) با آزمایشی نشان دادند تمام عناصر مهم تنظیمی cis مورد نیاز برای نسخه برداری گرده خاص در بالادست بین نوکلئوتیدهای ۱۵۸ و۲۷۳ قرار گرفته‌اند (۱۷)، این منطقه شامل چهار عنصر فرضی وابسته به القای جیبرلین (جعبه پیریمیدین CCTTTT و TTTTTTCC) و بیان بافت اختصاصی گرده خاص (AGAA و GTGA) می‌باشد. در تحقیق حاضر نیز، چهارعنصر AGAA در جایگاه اتصال فاکتور رونویسی NAC6 (جدول ۳) مشاهده شد که می تواند به بیان بالای پروموتر مدنظر این تحقیق در بساک گیاه مرتبط باشد

بسیاری از ژنهای *NAC* در پاسخ به شوری و خشکی در گیاهان دخالت دارند، در تحقیق حاضر بیان بالای این فاکتورهای رونویسی در بساک تحت تنش خشکی نشان دهنده فعالیت بافت-اختصاصی این ژنها تحت شرایط تنش بود. همچنین با حضور پروموتر -که جایگاه فاکتور رونویسی NAC6 بر روی آن واقع بود- در گیاه تراریخت، بیان ژن *NAC6*، حدود ۶ برابر بیشتر از گیاه غیر تراریخت شد که به تأثیر ورود پروموتر بر سنتز ژنهای مسئول فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن جایگاه اشاره می کند.

منابع

۱- راوش، ر، شیران، ب، ابراهیمی، ا، هوشمند، س، دلفروس، ر، ۱۳۹۶، بررسی پروموتر ژن S-Like RNase در برنج تراریخت، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۹ (۴)، ۶۵-۸۰

2- Abnosi, MH, Amirjani, M, Mahdiyeh, M, Moradipoor, H, 2015, Biochemical and Cellular Response of *Catharanthus roseus* Callus Cells to Cadmium Toxicity, Journal of Genetic Resources, 1 (2): 101-114.

3- Achard, P, Gong, F, Cheminant, S, Alioua, M, Hedden, P, Genschik, P, 2008, The cold-inducible CBF1 factor–dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism, The Plant Cell, 20, 2117-2129

4- Aida, M, Ishida, T, Fukaki, H, Fujisawa, H, Tasaka, M, 1997, Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant, The Plant Cell, 9, 841-857

5- Cartharius, K, Frech, K, Grote, K, Klocke, B, Haltmeier, M, Klingenhoff, A, Frisch, M, Bayerlein, M, Werner, T, 2005, MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, Bioinformatics, 21, 2933-2942

6- Chung, PJ, Jung, H, Do Choi, Y, Kim, J-K, 2018, Genome-wide analyses of direct target genes of four rice NAC-domain transcription factors involved in drought tolerance, BMC genomics, 19, 40

7- Duval, M, Hsieh, T-F, Kim, SY, Thomas, TL, 2002, Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily, Plant molecular biology, 50, 237-248

8- Ernst, HA, Olsen, AN, Skriver, K, Larsen, S, Leggio, LL, 2004, Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors, EMBO reports, 5, 297-303

9- Fang, Y, You, J, Xie, K, Xie, W, Xiong, L, 2008, Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice, Molecular Genetics and Genomics, 280, 547-563

10- Gao, G, Zhong, Y, Guo, A, Zhu, Q, Tang, W, Zheng, W, Gu, X, Wei, L, Luo, J, 2006, DRTF:

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

a database of rice transcription factors, Bioinformatics, 22, 1286-1287

11- He, XJ, Mu, RL, Cao, WH, Zhang, ZG, Zhang, JS, Chen, SY, 2005, AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development, The Plant Journal, 44, 903-916

12- Hong, Y, Zhang, H, Huang, L, Li, D, Song, F, 2016, Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improves drought and salt tolerance in rice, Frontiers in plant science, 7, 4

13- Hoth, S, Morgante, M, Sanchez, J-P, Hanafey, MK, Tingey, SV, Chua, N-H, 2002, Genome-wide gene expression profiling in Arabidopsis thaliana reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the abi1-1 mutant, Journal of cell science, 115, 4891-4900

14- Hu, H, Dai, M, Yao, J, Xiao, B, Li, X, Zhang, Q, Xiong, L, 2006, Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice, Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 12987-12992

15- Ishida, T, Aida, M, Takada, S, Tasaka, M, 2000, Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in Arabidopsis thaliana, Plant and Cell Physiology, 41, 60-67

16- Kikuchi, K, Ueguchi-Tanaka, M, Yoshida, K, Nagato, Y, Matsusoka, M, Hirano, H-Y, 2000 Molecular analysis of the NAC gene family in rice, Molecular and General Genetics MGG, 262, 1047-1051

17- Kim, YJ, Lee, SH, Park, KY, 2004, A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco, FEBS letters, 578, 229-235

18- Lee, DK, Chung, PJ, Jeong, JS, Jang, G, Bang, SW, Jung, H, Kim, YS, Ha, SH, Choi, YD, Kim, JK, 2017, The rice Os NAC 6 transcription factor orchestrates multiple molecular mechanisms involving root structural adaptions and nicotianamine biosynthesis for drought tolerance, Plant biotechnology journal, 15, 754-764

19- Liu, J, Chen, T-Y, Yuan, Y, Zhou, J-H, Zhao, Y-Y, Huang, L-Q, 2018, Bioinformatics and expression analysis of NAC transcription factor genes in Scutellaria baicalensis World, Journal of Traditional Chinese Medicine, 4, 37

20- Mitsuda, N, Iwase, A, Yamamoto, H, Yoshida, M, Seki, M, Shinozaki, K, Ohme-Takagi, M, 2007, NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis, The Plant Cell, 19, 270-280

21- Moreno-Alvarado, M, García-Morales, S, Trejo-Téllez, LI, Hidalgo-Contreras, JV, Gómez-Merino, FC, 2017, Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice, Frontiers in plant science, 8, 73

22- Nakashima, K, Ito, Y, Yamaguchi-Shinozaki, K, 2009, Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses, Plant physiology, 149, 88-95

23- Olsen, AN, Ernst, HA, Leggio, LL, Skriver, K, 2005, NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse, Trends in plant science, 10, 79-87

24- Riechmann, JL, 2002, Transcriptional regulation, a genomic overview The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists, 1

25- Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K, 2000, Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways, Current opinion in plant biology, 3, 217-223

26- Siddique, M., Hamid, A. and Islam, M. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41.

27- Souer, E, van Houwelingen, A, Kloos, D, Mol, J, Koes, R, 1996, The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries, Cell, 85, 159-170

28- Thirumalaikumar, VP, Devkar, V, Mehterov, N, Ali, S, Ozgur, R, Turkan, I, Mueller□Roeber, B, Balazadeh, S, 2018, NAC transcription factor JUNGBRUNNEN 1 enhances drought tolerance in tomato, Plant biotechnology journal, 16, 354-366

29- Tran, L-SP, Nakashima, K, Sakuma, Y, Simpson, SD, Fujita, Y, Maruyama, K, Fujita, M, Seki, M, Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K, 2004, Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.1.5

transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter, The Plant Cell, 16, 2481-2498

30- Zhang, JZ, 2003, Overexpression analysis of plant transcription factors, Current opinion in plant biology, 6, 430-440

Evaluation of *NAC10* and *NAC6* gene expression under drought stress in leaf and anther tissues on transgenic and non-transgenic rice of Nipponbare variety

Arab K.[1], Ravash R.[2]* and shiran B.[2]

[1] Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Facult

y of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, I.R. of Iran.

Abstract

Proteins attached to the elements responded to drought stress by specializing in enhancing the ability to withstand drought stress. In this study with the aim of evaluate different expression of TFs in different tissue, the expression of genes encoding NAC10 and NAC6 transcription factors in rice under drought stress in leaf and anther tissues were estimated. Transgenic and non-transgenic rice seeds of Nipponbare variety were cultivated. Leaf and anther tissues on young microspore stage were sampled at several times after Stop irrigation. Promoter analysis for finding transcription binding sites has done by two web sites, then two TFs from NAC family were selected. Real-time PCR showed that *NAC10* and *NAC6* are expressed in both anther and leaf tissues. Under drought stress, the highest expression of both transcription factors was in anther tissue after 24h stress, the highest expression of *NAC10* was in non-transgenic plants, about 70 times more than control and the highest expression of *NAC6* was in transgenic plant about 60 times more than control condition. These results indicate the important role of these factors in anther tissue of rice, response to drought stress.

Key words: Promoter analysis, Drought, Transcription factors, Gene expression