

بررسی بیان ژنهای *NAC6* و *NAC10* تحت تنش خشکی در بافتهای برگ و بساک برنج

تراریخت و غیر تراریخت رقم *Nipponbare*

کبری عرب^۱، رودابه راوش^{۲*} و بهروز شیران^۲

^۱ ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

^۲ 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 *NAC6* و *NAC10* 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 پروموتور انجام شد و دو فاکتورهای رونویسی از خانواده *NAC* انتخاب شدند. نتایج حاصل از *real-time PCR* نشان داد که ژنهای *NAC6* و *NAC10* 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 پروموتور، تنش خشکی، فاکتورهای رونویسی، بیان ژن

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

مقدمه

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 تشتهای محیطی از جمله تنظیمات رشد، هنگام روبرو شدن با تنش شوری دخالت دارند (۳). فاکتورهای

تنشهای محیطی می‌توانند باعث القای مکانیسمهایی درون گیاه شوند که باعث آسیب به غشای سلولی، آسیب به مولکولهای *DNA* و پروتئین و کم شدن عملکرد گیاه می‌شود (۲). بررسی عوامل تنظیمی در پاسخ به تنشها حائز اهمیت می‌باشد. 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 می‌شود. پروموتور یک توالی است که رونویسی یک ژن را آغاز و تنظیم می‌کند. جایگاههای اتصال پروتئین در پروموتور،

پروموتور نشان داد که این مناطق شامل عناصر فعال *cis* هستند که مسئول پاسخ به اکسینها، سیتوکینینها، جیبرلینها، آبسزیک 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 آرآبیدوپسیس، *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 آرآبیدوپسیس شناسایی عناصر تنظیمی ناحیه پروموتور نشان داده پروموتور 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 پروموتور شناسایی شد. فاکتورهای رونویسی پروتئینهای هستند که در اندامهای مختلف و در مراحل مختلف رشد در گیاهان و حیوانات وجود دارند. این پروتئینها با اتصال به عناصر تنظیمی *cis* در پروموتور 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 پروموتور عناصر فعال *cis* در پاسخ به اسید آبسزیک شناسایی شدند (۲۵). در این تحقیق میزان بیان ژنهای مرتبط با فاکتورهای رونویسی *NAC10* و *NAC6* در تنش خشکی در دو گیاه غیر تراریخت و تراریخت، با هدف بررسی تأثیر پروموتور خارجی دارای جایگاه مرتبط با این عناصر تنظیمی، مورد اندازه‌گیری واقع شدند.

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 متغیر *C*-ترمینال می‌باشند (۷ و ۸). پروتئینهای *NAC* در گیاهان 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 آرآبیدوپسیس (۴) نقش کنترل شکل‌گیری سلولهای مرستمی 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 از خانواده *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 پروموتور در ژنهای خانواده *NAC* القاء کننده آلومینیوم، در آنالیز

مواد و روشها

درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، وزن تر آنها اندازه‌گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در آن گذاشته شد تا وزن خشک گیاه به دست آید و در نهایت میزان RWC با فرمول زیر تخمین زده شد (۲۶).

وزن خشک - وزن تر/وزن خشک - وزن اولیه = RWC

مطالعات بیوانفورماتیکی: «آنالیز ناحیه پرموتری»: آنالیز ناحیه پرموتری با شماره دسترسی [NC 029264.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/FASTA/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 [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 واحد که نشان دهنده گرفتن یک باندها در PCR بود، تأیید گردد. (جدول ۱)

کشت گیاه و اعمال تنش: در این تحقیق بذور گیاه تراریخته برنج، رقم Nipponbare که در آنها ناحیه پرموتری 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 سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد در ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت 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 فوراً در ازت مایع قرار گرفتند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بساکها زیر دستگاه بینوکولار جدا شدند و سریعاً داخل ازت منتقل شدند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری شد و با RWC گیاه کنترل مقایسه شد تا تغییر در محتوی نسبی آب برگ در زمانهای تنش مشخص شود. برای اندازه‌گیری مقدار RWC به اندازه ۱۰ سانتیمتر از برگ انتهایی، نمونه برداری شد وزن اولیه آن اندازه‌گیری شد و نمونه برگ درون لوله‌های آزمایشی قرار گرفتند و با آب مقطر اشباع شدند و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال +۴

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در RT-PCR

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

با استفاده از مخلوط واکنش Takara حاوی SYBR® Green و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده طبق دستورالعمل کیت در پژوهش‌کنده زیست فناوری صورت گرفت. این واکنش برای هر نمونه در ۲ تکرار تکنیکی انجام شد و از ژن‌خانه‌دار 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 ژن‌خانه‌دار از طریق روش دلتا دلتا سی تی انجام گرفت (۱۲).

نتایج و بحث

آنالیز ناحیه پرموتری: آنالیز ناحیه پرموتری 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 پرموتری شناسایی شدند (جدول ۲ و ۳).

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

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

استخراج RNA: یک مولکول ناپایدار با نیمه عمر بسیار کوتاه و قابل 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 ایندرف 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 سانتی‌گراد 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 کمی مطالعه شد. PCR در زمان واقعی با دستگاه Rotor gene-Q

جدول ۲- پیش بینی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی خانواده NAC بر روی پرموتر مورد نظر

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

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

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 پرموتر، نتایج پیش بینی در دو سایت موردنظر مقایسه شدند، NAC87، NAC30 به طور مشترک در هر دو سایت، برای این ناحیه پرموتری 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.

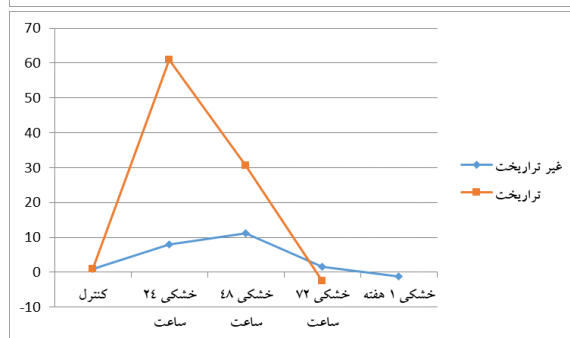
پس از قطع آبیاری در گیاهان، RWC در روزهای مختلف اندازه گیری شد و میزان آن در هر زمان انتخابی برای نمونه گیری به میزان ۱۰-۲۰ درصد نسبت به زمان قبل کاهش داشت.

ماتریسهای سنگین از کتابخانه MatInspector 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 ترازوی 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 تشخیص 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

جدول ۳- پیش‌بینی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی خانواد NAC بر روی پروموتور مورد نظر

نام ماتریس	توضیحات	از	تا	رشته	توالی °	امتیازدهی
<u>PSNACF</u>	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site II)	193	219	(+)	atttatagccggccTACGtatgtagg	0.757
<u>PSNACF</u>	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site I)	202	228	(-)	tatgccctctacatACGTaggccgg	0.785
<u>PSNACD</u>	NAC domain containing protein 103	307	335	(+)	caattaacaatattgcCAAGtttgaca	0.942
<u>PSNTMF</u>	NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1-LIKE 6 (NTL6/NTM1)	337	359	(-)	ctctagtaaatataTAAGaaatc	1
<u>PSPCDR</u>	Heterodimer of NAC-domain transcription factors GmNAC30 and GmNAC81	565	571	(-)	TGTGttg	1
<u>PSSWNS</u>	Secondary wall NAC binding elements	606	626	(-)	aactttgtgaaagtAAAGaat	0.943
<u>PSNACF</u>	NAC domain containing protein 87	663	689	(-)	agtttaCTTtagcattttattgt	0.765
<u>PSNACD</u>	NAC domain containing protein 16	964	992	(-)	aaacaaaagcatgagaCAAGgaactact	0.996
<u>PSNTMF</u>	NAC WITH TRANSMEMBRANE MOTIF 1-LIKE 8 (NTL8/NTM1-like 8)	984	1006	(+)	ttttgtttttctgaGGAaag	0.98
<u>PSSWNS</u>	NAC domain containing protein 71	988	1008	(-)	atctttctCAAGaaaaca	0.99
<u>PSNACF</u>	NAC domain containing protein 92 (NAC6)	987	1013	(-)	aatattatcttttctCAAGaaaacaa	0.774
<u>PSNACD</u>	NAC domain containing protein 16	987	1015	(-)	ataatttatcttttctCAAGaaaacaa	0.995
<u>PSNACF</u>	NAC domain containing protein 87	989	1015	(+)	gttttCTTGaggaaaagataaattat	0.777
<u>PSNACD</u>	NAC domain containing protein 38	1003	1031	(+)	aaagataattattttCACGcaataaa	0.831
<u>PSNACF</u>	Arabidopsis NAC domain containing protein 92 (ATNAC6)	1005	1031	(+)	agataaattattttCACGcaataaa	1
<u>PSNACF</u>	NAC domain containing protein 92 (NAC6)	1085	1111	(+)	gctagacatcgcatGCATGaaagtca	0.754
<u>PSNTMF</u>	NAC with transmembrane motif 1-like 8 (NTL8/NTM1-like 8)	1217	1239	(+)	cttccatgcccagaGAAGaaag	0.98
<u>PSNACF</u>	Wheat NAC-domain DNA binding factor (DNA binding site II)	1236	1262	(-)	aatgtttatgagtgGACGgtgccttt	0.752

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



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

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

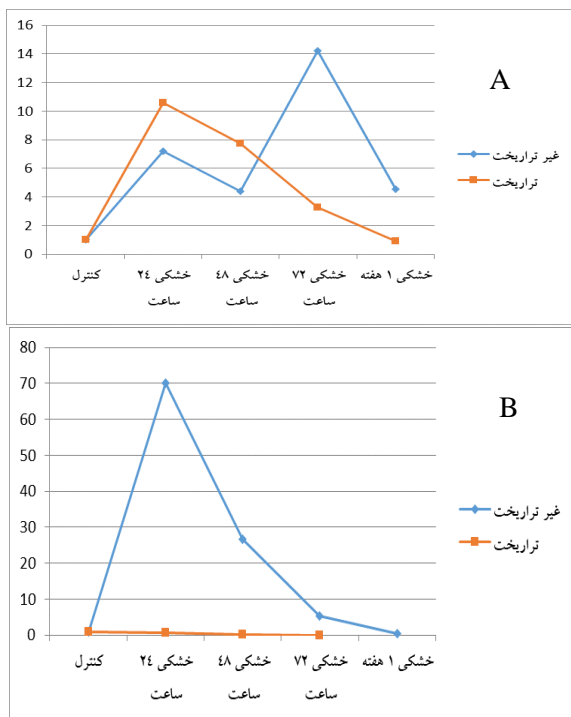
بررسی میزان بیان ژن مسئول فاکتور رونویسی NAC6 در بافت برگ و بساک: داده‌های حاصل از آنالیز RT-PCR میزان بیان فاکتور رونویسی NAC6 در بافت برگ (شکل ۱A) و بساک (شکل ۱B) در گیاهان تراریخت (transgene) و غیر تراریخت (np) را نشان داد.

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.

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 ترا ریخت نشان داد که حضور بیشتر پروموتور انتقال یافته در گیاه ترا ریخت، مرتبط با بیان بالاتر فاکتور رونویسی ای شد که جایگاه اتصال آن روی پروموتور 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 ترا ریخت و غیر ترا ریخت

این در حالی است که بیان این فاکتور رونویسی در بافت برگ گیاه ترا ریخت، در زمان‌های ۲۴ ساعت و یک هفته پس از شروع تنش، بیشتر از میزان بیان در نمونه غیر ترا ریخته بوده است. در مقابل میزان بیان ژن *NAC6* در بافت بساک در گیاه ترا ریخته 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 ترا ریخته بوده است. میزان بیان این فاکتور رونویسی در گیاه غیر ترا ریخت نیز در زمان‌های ۲۴ 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 پروموتور در آن وارد شده بود در زمان ۲۴ ساعت حدود ۸ برابر و در زمان ۴۸ ساعت حدود ۳ برابر بیشتر از گیاه غیر ترا ریخت بوده است. در مقایسه بافت برگ و بساک، افزایش بیان این فاکتور در دو بافت و در هر دو نمونه ترا ریخته و غیر ترا ریخته مشاهده شده است ولی در بافت بساک میزان بیان بالاتر از بیان در برگ بوده است. در مطالعات قبلی که با رنگ آمیزی هیستوشیمیایی، روی میزان فعالیت این پروموتور در بافت‌های مختلف ریشه، برگ و بساک، صورت گرفته است، بیشترین فعالیت پروموتور 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 ترا ریخته افزایش نشان می‌دهد (۱۸). چانگ و همکاران (۲۰۱۸) با انجام تحقیقی بر روی بافت ریشه برنج ترا ریخته 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 ترا ریخته هنگام مواجه شدن گیاه با تنش خشکی

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 به‌سزایی دارند (۱۲). همچنین تیرومالایی کومار و همکاران با تحقیق بر روی گیاه گوجه‌فرنگی نشان دادند که فاکتورهای رونویسی NAC در مقاومت گیاه نسبت به خشکی نقش به‌سزایی 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 پیش‌بینی جایگاههای اتصال فاکتورهای رونویسی اعضای مختلف خانواده NAC در دو سایت مختلف پیش‌بینی 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 پروموتور انتقال یافته در گیاهان تراریخت در مقابل گیاه غیر تراریخت، و عدم هماهنگی میزان بیان بین پروموتور و TF کاندید، احتمالاً پیش‌بینی سایت plantRegMap مبنی بر قرار گرفتن این TF بر روی این پروموتور صحیح نمی‌باشد، ولی پاسخ افزایشی بسیار بالای این TF نسبت به شرایط خشکی، در گیاهان غیر تراریخت تأیید شد. با بررسی کلی پیش‌بینی جایگاههای اتصال فاکتورهای رونویسی در سایت MatInspector خانواده‌های مختلف TF پیش‌بینی 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 پروموتور برای آن پیش‌بینی شده بود، انتخاب شد. نتایج حاصل از بررسی کمی، هماهنگی میزان

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 افزایشی 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 می‌باشد. نکته قابل توجه اینکه میزان بیان این فاکتور در بافت بساک به ترتیب بعد از ۴۸ ساعت تنش و ۷۲ ساعت 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 جایکه 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 رونویسی 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

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 می‌تواند به بیان بالای پروموتور 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 پروموتور -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 پروموتور بر سنتز ژنهای مسئول فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن جایگاه اشاره می‌کند.

بیان این فاکتور با افزایش میزان پروموتور مرتبط با آن را نشان داد. سایت Genomatix و قسمت MatInspector در این سایت (<http://www.genomatix.de/matinspector>)، برای آنالیز پروموتور و بررسی جایگاههای تنظیمی و عوامل رونویسی بر روی آن، پیشنهاد می‌شود. MatInspector 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 MatInspector اجازه آنالیز عمیق پروموتور و طراحی جایگاههای توالیهای تنظیمی را می‌دهد(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 و ۲۷۳ قرار گرفته‌اند (۱۷)، این منطقه شامل چهار عنصر فرضی وابسته به القای

منابع

- ۱- راوش، ر، شیران، ب، ابراهیمی، ا، هوشمند، س، دلفروس، ر، ۱۳۹۶، بررسی پروموتور ژن S-Like RNase در برنج
- ۲- 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.
- ۳- 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
- ۴- 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
- ۵- 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
- ۶- 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
- ۷- 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
- ۸- 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
- ۹- 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
- ۱۰- Gao, G, Zhong, Y, Guo, A, Zhu, Q, Tang, W, Zheng, W, Gu, X, Wei, L, Luo, J, 2006, DRTF:

- 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 *abil-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 adaptations 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

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

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

² Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty 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