



الگوی بیان ژن‌های *OSBP*، *CAT* و *BZIP* در ارقام حساس و متحمل به خشکی سویا با استفاده از PCR در زمان واقعی

جعفر احمدی^{۱*}، ولی اله سلیمانی^۲

^۱ دانشیار، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

^۲ کارشناس ارشد، آزمایشگاه ژنومیکس دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۰

چکیده

در شرایط تنش خشکی، سیستم علامت دهنده موجب القای ژن‌های مشخصی در مقابل اثرات زیان‌آور تنش‌های محیطی می‌شود. ژن *BZIP* از فاکتورهای رونویسی در سیگنال‌رسانی تنش‌های غیرزنده بوده و در تنظیم پاسخ به تنش‌های مختلف در گیاهان نقش دارد. این ژن با ABA فعال شده و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. ژن *OSBP* دارای نقش کلیدی در سیگنال‌دهی برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی در پاسخ به تنش می‌باشد. کاتالاز (*CAT*) از سری آنزیم‌های احیاکننده است که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز و از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کند. در این تحقیق دو رقم سویا Williams (متحمل) و L17 (حساس) در شرایط گلخانه‌ای کشت شدند. تیمار تنش خشکی از مرحله دو برگگی به مدت ۷ روز اعمال شد. استخراج RNA کل از برگ و ریشه در دو سطح شاهد و تنش صورت گرفت و سپس ساخت cDNA جهت استفاده در Real Time PCR انجام شد. از ژن خانه‌دار *18S rRNA* برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از منحنی‌های Ct نشان دهنده افزایش بیان ژن *BZIP* در تنش خشکی بود و این افزایش در رقم متحمل Williams حدود دو برابر رقم حساس L17 و در ریشه بیشتر از برگ بود. اختلاف بیان ژن *OSBP* تحت تنش خشکی بین دو رقم Williams و L17 معنی‌دار نگردید. بیان ژن کاتالاز در تنش خشکی در رقم Williams حدود دو برابر رقم L17 و همچنین در ریشه بیشتر از برگ بود. با توجه به اینکه افزایش بیان این ژن‌ها منجر به افزایش تحمل خشکی می‌شود، انتقال این ژن‌ها در راستای افزایش تحمل به خشکی در ژنوتیپ‌های پرمولکرد سویا مناسب و موثر ارزیابی گردید.

کلمات کلیدی: *qRT-PCR*، تنش، *OSBP*، *CAT*، *BZIP*، سویا

مقدمه

مسیرهای پیام رسانی^۱ مختلفی به منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آنها بیان دسته‌ای از ژن-های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند (Xiong & Zhu, 2001; Leonardis *et al.*, 2007) فرآورده‌های این ژن‌ها نه تنها در حفاظت سلول از تنش عمل می‌نمایند، بلکه در تنظیم ژن-های درگیر در پیام رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama *et al.*, 2004). فرآورده‌های این ژن‌ها را می‌توان براساس نوع عملکرد آنها به دو گروه طبقه‌بندی نمود. گروه اول شامل پروتئین‌هایی نظیر چاپرون‌ها، پروتئین-های کانال آبی، پروتئین‌های اواخر دوره جینین-زایی^۲ (LEA)، آنزیم‌های بیوستنز اسمولیت‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی لیپیدهای غشایی است که در تحمل به تنش نقش دارند. گروه دوم شامل عوامل پروتئینی درگیر در تنظیم بیان ژن و پیام رسانی در پاسخ به تنش غیرزنده می‌باشند که از این دسته می‌توان کینازها، آنزیم‌های درگیر در متابولیسم فسفولیپیدها و عوامل رونویسی^۳ (TF) را نام برد (Yamaguchi and Shinozaki, 2005; Maruyama *et al.*, 2004) عوامل رونویسی، پروتئین‌هایی (*trans acting*) هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به توالی‌های خاصی از DNA (*cis acting*) واقع در ناحیه پروموتور ژن‌های هدف، آنها را تقویت یا باز

تنش خشکی از محدودیت‌های اساسی بهره‌وری و عملکرد محصول و تنش عمده محیط زیست در کشاورزی جهان است (Ashraf, 2009; Cattivelli *et al.*, 2007; Ashraf *et al.*, 2011). کمبود آب می‌تواند بر جنبه‌های گوناگون فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی گیاه سویا تاثیر منفی بگذارد و این به نوبه خود بر گره‌بندی، تثبیت نیتروژن، رشد و عملکرد سویا اثر گذار بوده و منجر به کاهش رشد و عملکرد محصول می‌شود (Ashraf *et al.*, 2011). بنابراین، بهبود ژنتیکی برای تحمل خشکی یکی از راهکارهای اقتصادی برای افزایش ثبات در تولید محصولات از جمله سویا است (Nevo and Chen, 2010). در شرایط پسابیدگی گیاهان پس از بروز تنش در سطح مولکولی، سیستم علامت دهنده موجب القای ژن‌های مشخصی در مقابل اثرات زیان‌آور تنش‌های محیطی می‌شود که محصولات برخی از این ژن‌ها در محافظت از گیاه شرکت کرده و موجب حفظ ساختار سلولی می‌شوند (Bartels and Sunkars, 2005; Suprunova *et al.*, 2004). بدین لحاظ گیاهان از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا متحمل می‌سازند (Thomashow, 1999; Bray *et al.*, 2000; Shinozaki *et al.*, 2003) به محض بروز تغییرات درون سلولی،

1 - Signal Transduction

2 - Late embryogenesis abundant

3 - Transcription Factor

اکسیدانت در سطوح بالا، تحمل کم آبی در توتون و تنباکو را افزایش داد (Huang *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای با تکنیک لکه‌گذاری سادرن مشخص شد که تنها یک نسخه از *BZIP* در ژنوم سویا موجود است (Gao *et al.*, 2011). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که *GmBZIP1* متعلق به زیرخانواده‌های AREB از خانواده *BZIP* است و بیشتر با *AtABF2* و *OsTRAB1* مرتبط است (Gao *et al.*, 2011). بیان ژن *GmBZIP1* به شدت توسط *ABA*، تنش خشکی، نمک بالا و دمای پایین القا شده و مشخص شده *GmBZIP1* در ریشه، ساقه و برگ سویا تحت شرایط تنش-های مختلف مذکور بیان می‌شود (Gao *et al.*, 2011). آنزیم کاتالاز که هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها وجود دارد، در حفاظت سلول‌ها از اثرات سمی پراکسید نقش داشته و باعث کاتالیز تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. در آزمایشی با اعمال تنش خشکی بر گیاه سویا در مرحله گلدهی، نتیجه گرفتند که میزان بیان ژن کاتالاز افزایش یافت، همچنین میزان کلروفیل برگ با میزان بیان ژن کاتالاز همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داد (Mazandarani *et al.*, 2012). ژن *OSBP* نقش کلیدی در سیگنال‌دهی در برخی واکنش‌های فیزیولوژیک برای پاسخ به تنش دارد. طبق بررسی‌ها، ژن *GmOSBP* ممکن است در برخی از واکنش‌های فیزیولوژیکی برای پاسخ به تنش در سویا درگیر و نقش داشته باشد. در آزمایشی

می‌دارند. ژن‌های عوامل رونویسی، بخش قابل توجهی از ژنوم‌های همه یوکاریوت‌ها و از جمله گیاهان آلی را تشکیل می‌دهند (Riechmann *et al.*, 2000) مشخص شده است که در گیاهان، یک عامل رونویسی می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌ها را از طریق اتصال اختصاصی به عنصر *cis-acting* در ناحیه پرموتر ژن‌های هدف، کنترل کند (Nakashima and Shinozaki, 2005). خانواده‌های زیادی از این عوامل، تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها، پروتئین‌های *BZIP* (Uno *et al.*, 2000)، *WRKY* (Martin and Paz-Ares, 1997)، *DREB* (Sakuma *et al.*, 2006)، *NAC* (Xue *et al.*, 2006) و *MYC* (Yamaguchi and MYB *et al.*, 2006) را می‌توان نام برد. (Shinozaki, 2005)

ژن *BZIP* از فاکتورهای رونویسی در سیگنال‌رسانی تنش‌های غیرزنده بوده و در تنظیم پاسخ به تنش‌های مختلف در گیاهان نقش دارد. این ژن با *ABA* فعال شده و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود، لذا افزایش بیان این ژن منجر به افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود. در مطالعه‌ای انتقال عامل رونویسی *BZIP* جدا شده از *Poncirus trifoliata* به توتون و تنباکو باعث افزایش بیان ژن *PtrABF* تحت تنش خشکی نسبت به نوع وحشی گردید، بطوری که این ژن از طریق مهار گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS) و بیان ژن‌های پاسخ به تنش و آنزیم‌های آنتی

1- Reactive oxygen species

برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

جهت سنجش محتوی آب نسبی برگ، نمونه برگ در هر تکرار برداشت و بلافاصله وزن تر برگ‌ها اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین وزن تورژسانسی، برگ‌ها به مدت ۱۲ ساعت در شدت نور کم (برای آنکه کاهش وزنی در اثر فعالیت تنفسی رخ ندهد) در داخل آب مقطر قرار داده شدند و پس از اندازه‌گیری وزن برگ‌ها در این شرایط، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. مقدار RWC از رابطه زیر بدست آمد. در این رابطه Wf وزن تازه برگ، Wt وزن تورژسانس برگ و Wd وزن خشک برگ می‌باشد (Ritchie and Nguyen, 1990).

$$\%RWC = [(Wf - Wd) / (Wt - Wd)] \times 100$$

با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus Solution (شرکت سیناکلون)، RNA استخراج و جهت تعیین غلظت RNA با استفاده از نانودراپ (NanoDrop 1000 spectrophotometer) جذب هر نمونه در طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. برای حذف DNA ژنومی و سنتز رشته اول cDNA از کیت (Quanti Tect, Reverse Transcription Kit, Cat. No. 205311) کمپانی کیاژن استفاده گردید. برای حذف DNA ژنومی ابتدا یک میکروگرم از محلول RNA کل به درون یک میکروتیوب DEPC ۰/۲ml و اتوکلاو شده اضافه شد. این

پس از ۶ ساعت از شروع تنش شوری با کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار به گیاهچه سویا، مشاهده کردند که بیان ژن *OSBP* در ریشه و ساقه به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت، در حالی که بعد از ۲۴ ساعت سطح بیان در ساقه بیشتر از ریشه بود. همچنین بیان ژن *OSBP* در برگ بسیار افزایش نشان داد (Li et al., 2007).

هدف از این تحقیق، بررسی الگوی بیان سه ژن *OSBP*، *CAT* و *BZIP* در شرایط تنش خشکی در گیاهچه سویا با استفاده از PCR در زمان واقعی بود.

مواد و روش‌ها

بذور رقم Williams (متحمل به خشکی) و لاین L17 (حساس به خشکی) از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذور تحت شرایط دمایی 2 ± 30 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و 2 ± 20 درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی در دو سطح نرمال و تنش خشکی، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) کشت گردید. مدت زمان اعمال تنش خشکی از مرحله دو برگی به مدت ۷ روز بود و با مشاهده لوله‌ای شدن برگ‌ها در روز هفتم، جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های *OSBP*، *CAT* و *BZIP* از اندام برگ و ریشه نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از جمع آوری نمونه‌ها بلافاصله آن‌ها را در نیتروژن مایع قرار داده و

صورت جدول ۱ طراحی شدند. آغازگرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون (سیناژن)، سفارش داده شد. به منظور اطمینان از کارایی و عملکرد اختصاصی آغازگرها، واکنش PCR انجام شد. نهایتاً واکنش PCR در زمان واقعی در دو اندام ریشه و برگ در ۲ تکرار تکنیکی و با استفاده از تکنیک سایبرگرین انجام گردید. واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از کیت Bulk. Cod. Ex TagII (Tli RNaseH Plus)RR820L SYBR [Premix به شرح زیر انجام گرفت. برای هر واکنش PCR، سایبرگرین به مقدار ۱۰ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول از هر یک به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، cDNA رقیق شده به مقدار ۲ میکرولیتر و در نهایت با آب استریل و دوبار تقطیر شده به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به منظور اجتناب از بروز هر گونه اختلاف در تهیه واکنش بین تیمارهای مختلف، همواره محلول مادری با حجم متناسب با تعداد واکنش‌ها تهیه شد و در چاهک‌های پلیت مخصوص PCR در زمان واقعی تقسیم گردید و بعد از اضافه کردن cDNA از تیمارهای مختلف به آن‌ها، روی پلیت با چسب شفاف مخصوص پوشانده شد. پس از آن پلیت با استفاده از میکروسانتریفیوژ مدل Lab Net ساخت کره، رسوب داده شده و در دستگاه PCR در زمان واقعی قرار گرفت.

مرحله با استفاده از ترکیب (gDNA Wipeout ۲μl، ۱μg Template RNA و رسانیدن حجم نهائی به ۱۴μl (با RNAas-free water) انجام شد. سپس تیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در ادامه مخلوط واکنش لازم برای مرحله رونویسی معکوس به صورت ترکیب (Quantiscript ۱μl Reverse Transcriptase، ۱μl RT Primer mix، ۵x RT Buffer ۱μl) تهیه شد. سپس RNA الگو از مرحله حذف DNA ژنومی (با حجم ۱۴ میکرولیتر) به هر تیوب که شامل مخلوط واکنش رونویسی معکوس بود، اضافه شد تا به حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر رسید. تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۴۲ درجه سانتیگراد و بعد به مدت ۳ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. برای انجام PCR در زمان واقعی از cDNA تهیه شده به عنوان استوک ۱۰ برابر رقیق شده، تهیه شد. واکنش Real time PCR با استفاده از کیت [Bulk. Cod. RR820L (Tli RNaseH Plus) SYBR [Premix Ex TagII کمپانی تک آرا و با استفاده از دستگاه BIO-RAD- RT-PCR مدل CFD-3120 ساخت کشور آمریکا انجام گردید. از ژن خانه‌دار *18S rRNA* برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد.

توالی آغازگرها با استفاده از نرم افزار SoftBerry و Primer designing tool به

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت qRT-PCR.

Table 1- List of primers used for qRT-PCR.

نام آغازگر Primer Name	توالی آغازگر (3' → 5')	تعداد نوکلئوتید Number of nucleotide	اندازه قطعه Fragment Size (bp)
<i>GM-BZIP F</i>	CAGTGGCGAGGCGCGGGGCC	20	120
<i>GM-BZIP R</i>	GAACCTCTCGAACTCGTTGT	20	
<i>OSBP F</i>	GTCAACCATCGCCGCAAGCC	20	130
<i>OSBP R</i>	CCATGCCACTCGATCCTCCC	20	
<i>CAT F</i>	GCCAACCACAGCCATGCCACT	21	188
<i>CAT R</i>	AGGACCAAGCGACCAACAGGC	21	
<i>18S rRNA F</i>	TTTCGTCTACGTCGCATTT	19	148
<i>18S rRNA R</i>	CGTGGAGCAAGTCGTGTAA	19	

مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. میزان همبستگی بین میزان بیان ژن‌ها نیز به کمک نرم افزار SPSS محاسبه شد. در نهایت رسم نمودارها با نرم افزار EXCEL انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر تنش خشکی بر روابط آبی گیاه

نتایج تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ^۲ (RWC)، نشان داد، که میزان RWC بین دو رقم Williams و L17 بعد از ۷ روز تنش خشکی در سطح ۰.۵٪ اختلاف معنی‌داری دارند. در شرایط تنش رقم Williams محتوای نسبی آب برگ (۷۰ درصد) خود را در سطح بالاتری نسبت به ژنوتیپ L17 (۶۸ درصد) نگه داشت و از این لحاظ محتمل‌تر بودن این رقم نسبت به لاین L17 در برابر تنش خشکی منطقی بود. RWC در واقع

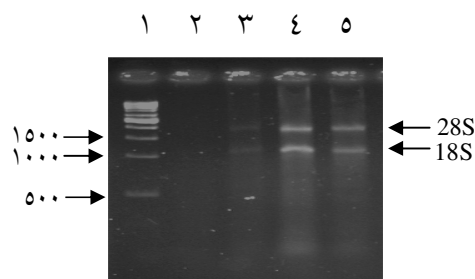
واکنش PCR با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C و به مدت ۳ دقیقه آغاز و با ۴۰ چرخه دو مرحله‌ای واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر و طویل شدن رشته در دمای ۶۰ °C به مدت ۵۰ ثانیه ادامه یافت. در نهایت به منظور رسم منحنی ذوب میزان دما از ۵۰ درجه سانتی‌گراد طی ۹۰ چرخه-ی ۱۰ ثانیه‌ای به ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسید. سپس میزان بیان ژن با روش تصحیح کارایی $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffi, 2001) محاسبه شد. داده‌های حاصل با استفاده از داده‌های ژن خانه‌دار *18S rRNA* به عنوان کنترل داخلی نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد. پس از بدست آوردن حد آستانه (CT) مربوط به هر ژنوتیپ بیان‌های مربوط به هر نمونه محاسبه گردید. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس و

2-Relative water content

1-Efficiency adjusted $\Delta\Delta Ct$

متحمل قدرت حفظ آب بیشتری در مقایسه با رقم حساس به خشکی دارا می‌باشد. استخراج RNA از برگ و ریشه ژنوتیپ‌های Williams و L17 انجام گرفت و بعد از غلظت‌سنجی نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ، کیفیت نمونه‌ها با ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). وجود احتمالی آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA استخراج شده در انجام واکنش PCR در زمان واقعی اختلال ایجاد می‌کند، زیرا آنزیم DNA- پلی‌مراز می‌تواند DNA ژنومی را نیز علاوه بر محصول رونویسی معکوس الگو قرار داده و تکثیر نماید. لذا حذف آلودگی DNA ژنومی به وسیله تیمار نمونه‌ها با آنزیم DNaseI انجام گرفت. سپس سنتز cDNA انجام شده و برای مقایسه الگوی بیان ژن‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت.

به عنوان شاخصی برای نشان دادن آسیب‌های ناشی از تنش خشکی معرفی شده است (Farooq *et al.*, 2009) و ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین شاخص RWC با میزان عملکرد گندم تحت تنش خشکی در شرایط گلخانه‌ای گزارش شده است (Khakwani *et al.*, 2011)، لذا از این صفت می‌توان به عنوان یکی از بهترین شاخص‌های ترازمندی آب در گیاه جهت گزینش ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش بهره برد (Vaezi *et al.*, 2010). نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج گزارش‌های اخیر در مورد کاهش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش مطابقت دارد (Dedio, 1975; Altinkut *et al.*, 2001; Vaezi *et al.*, 2010) همچنین نتایج مطالعات والتوویچ و همکاران (Valentovic *et al.*, 2006) بر روی دو رقم حساس و متحمل ذرت نشان داد که رقم



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ برای کیفیت RNA استخراج شده. ۱: خط کش وزن مولکولی DNA، ۱Kb؛ ۲: RNA برگ و ۳: RNA ریشه.

Figure 1- Image of %1.5 agarose gel electrophoresis for the quality of extracted RNA.

در سطح احتمال $P \leq 0.01$ در منابع تغییر ژنوتیپ، اندام، تنش، ژنوتیپ × تنش، اندام × تنش و

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان ژن *BZIP* (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری را

Williams و L17 (شکل ۲-ا) نشان داد که در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش میزان بیان این ژن در رقم Williams با مقدار برابر با ۳/۰۹۹ بیشتر از لاین L17 (۱/۹۴۶) می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال $P \leq 0.01$ بین دو رقم معنی‌دار بود.

ژنوتیپ × اندام × تنش نشان داد. اما اثر متقابل ژنوتیپ × اندام اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. معنی‌دار بودن اثر متقابل ژنوتیپ × تنش و اندام × تنش دلالت بر عدم پاسخ یکسان دو ژنوتیپ Williams و L17 و نیز دو اندام برگ و ریشه نسبت به شرایط تنش خشکی دارد. مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *BZIP* در دو رقم

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان ژن‌های *BZIP*, *CAT*, *OSBP* در شرایط تنش خشکی مربوط به دو اندام ریشه و برگ در دو رقم Williams (متحمل) و L17 (حساس) سویا.

Table 2- Variance analysis of the expression *OSBP*, *CAT* and *BZIP* genes in drought condition for root and leaf in two soybean cultivars Williams (tolerant) and L17 (susceptible).

میانگین مربعات Mean Square			درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of Variation
<i>OSBP</i>	<i>CAT</i>	<i>BZIP</i>		
0.023 ^{ns}	0.778**	5.322**	1	ژنوتیپ (Genotype)
0.005 ^{ns}	15.224**	2.081**	1	اندام (Organs)
32.234**	55.149**	33.942**	1	تنش (Stress)
33.843**	3.813**	0.103 ^{ns}	1	ژنوتیپ × اندام
0.027 ^{ns}	6.122**	5.719**	1	ژنوتیپ × تنش
0.004 ^{ns}	15.573**	2.053**	1	اندام × تنش
33.588**	3.718**	1.095**	1	ژنوتیپ × اندام × تنش
0.083	0.047	0.052	8	خطا (Error)
11.66	7.50	9.06		%C.V

^{ns} و **: به ترتیب نشان دهنده غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

(گروه b) در سطح احتمال $P \leq 0.01$ معنی‌دار شد. همان طوری که از نتایج مشخص است (شکل ۲-ا) در مجموع اندام‌ها و هر دو رقم میزان بیان نسبی ژن *BZIP* در سطح تنش خشکی چهار

میانگین بیان نسبی این ژن در دو اندام برگ و ریشه (شکل ۲-ب) مقایسه شد و مشخص شد که بیان این ژن در اندام ریشه بیشتر از برگ بوده و اختلاف بیان ژن بین ریشه (گروه a) و برگ

تنباکوی تراریخت با ژن *BZIP* که در تنش خشکی افزایش بیان داشت و نیز با نتایج گائو و همکاران (۲۰۱۱) که *GmBZIP* به شدت توسط ABA، تنش‌های خشکی، نمک بالا و دمای پایین القا شده و نیز در ریشه، ساقه و برگ تحت شرایط تنش‌های مذکور افزایش بیان داشت، مطابقت دارد. نتایج تجزیه واریانس ژن کاتالاز در جدول (۲) ارائه شده است و همانطور که مشاهده می‌شود هم اثرات اصلی و هم اثرات متقابل دوگانه و سه گانه این ژن در سطح احتمال $P \leq 0/01$ معنی‌دار شد. بر اساس مقایسه میانگین-ها، در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش بیان ژن کاتالاز در رقم Williams نسبت به لاین L17 بیشتر بوده و در دو گروه آماری مختلف قرار گرفتند (شکل ۳-۱). مقایسه میانگین بیان ژن کاتالاز در دو اندام برگ و ریشه (شکل ۳-۲) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد به طوری که در اندام ریشه نسبت به برگ افزایش بیان دو برابر بود.

همچنین در مجموع اندام‌ها و ارقام در سطح تنش خشکی نسبت به سطح نرمال، ژن کاتالاز حدوداً ۴/۵ برابر افزایش بیان نشان داد (شکل ۳-۲). با معنی‌داری اثر متقابل رقم \times اندام و مقایسه میانگین بیان ژن کاتالاز، سه کلاس a، b و c بدست آمد (شکل ۳-۳). بیان این ژن در مجموع دو شرایط تنش و عدم تنش در ریشه رقم Williams نسبت به لاین L17 افزایش بیشتری یافته و در کلاس a قرار گرفت و این افزایش بیان

برابر سطح بدون تنش افزایش داشته است و در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار بود. با توجه به نتایج مقایسه میانگین دانکن (شکل ۲-۲) برای اثر متقابل رقم \times تنش، میزان بیان نسبی ژن *BZIP* در شرایط تنش خشکی در رقم Williams دو برابر لاین L17 بود. بطوری که بیان ژن رقم Williams در گروه a و لاین L17 در گروه b قرار گرفت، در حالی که در شرایط بدون تنش میزان بیان ژن بین دو رقم تقریباً برابر بوده و در یک گروه آماری (گروه c) قرار گرفتند. در مقایسه میانگین اثر متقابل تنش \times اندام (شکل ۱-۱) در شرایط تنش خشکی میزان بیان ژن *BZIP* در هر دو اندام ریشه و برگ نسبت به شرایط نرمال افزایش نشان داد و اندام ریشه و برگ تحت تنش نسبت به شرایط نرمال به ترتیب با بیشترین مقدار بیان به ترتیب در گروه a و b قرار گرفتند. در حالی که در شرایط نرمال میزان بیان ژن در هر دو اندام تقریباً برابر بود. بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ \times اندام \times تنش (شکل ۱-۲)، اندام ریشه رقم Williams در شرایط تنش دارای بالاترین (گروه a) میزان بیان ژن *BZIP* بوده و پس از آن بیان ژن اندام برگ رقم Williams در شرایط تنش در گروه دوم (b) قرار گرفت. با توجه به افزایش بیان ژن *BZIP* در تنش خشکی در رقم متحمل Williams نسبت به رقم حساس L17 (دو برابر) و نیز افزایش بیان در اندام ریشه نسبت به برگ، نتایج این تحقیق با نتایج هوانگ و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه بر روی توتون و

حاصل از این آزمایش با نتایج مازندرانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت کاتالاز در سویا شده بود، مطابقت دارد. تجزیه واریانس ژن *OSBP* در آزمایش تنش خشکی در جدول (۲) ارائه شده است و همانطور که مشاهده می شود فقط اثر اصلی تنش و اثرات متقابل ژنوتیپ × اندام و ژنوتیپ × اندام × تنش در سطح احتمال $P \leq 0.01$ معنی دار شد. بر این اساس مقایسه میانگین ها انجام رفت. نتایج حاصل از میزان بیان ژن *OSBP* در مجموع ارقام و اندام-ها نشان داد که در شرایط تنش خشکی افزایش بیان حدوداً چهار برابر شرایط بدون تنش (شکل ۴-ا) بود. در مقایسه میانگین بیان ژن *OSBP* برای اثر متقابل رقم × اندام (شکل ۴-ب)، اندام ریشه لاین *L17* چهار برابر اندام ریشه رقم *Williams* و برعکس اندام برگ رقم *Williams* نسبت به لاین *L17* چهار برابر بیان داشتند.

در مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه ژنوتیپ × اندام × تنش خشکی دو کلاس بدست آمد (شکل ۴-ج)، به طوری که کلاس *a* مربوط به مقدار بیان یکسان برگ رقم *Williams* و ریشه رقم *L17* در شرایط تنش خشکی بود. در این شرایط میزان بیان ژن *OSBP* در برگ رقم *Williams* تقریباً با مقدار بیان این ژن در ریشه رقم *L17* برابری داشت. در توافق با نتایج این آزمایش، لی و همکاران (۲۰۰۷) نیز در آزمایش تنش شوری بر روی گیاهچه سویا گزارش کرده-

حدود بیش از دو برابر نسبت به اندام برگ رقم *Williams* بود. در حالی که افزایش بیان این ژن در ریشه لاین *L17* نسبت به برگ کم تر بوده و در کلاس *b* قرار گرفت. در مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش سه کلاس *a*، *b* و *c* بدست آمد (شکل ۳-ع). در این مقایسه میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در تنش خشکی در رقم *Williams* (گروه *a*)، $1/5$ برابر بیشتر از رقم *L17* (گروه *b*) مشاهده گردید. در حالی که در شرایط بدون تنش هر دو رقم بیان حدوداً یکسانی نشان داده و در گروه آماری *c* قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × اندام (شکل ۳-ف) در مجموع دو رقم نشان داد که اندام ریشه نسبت به برگ افزایش بیان $2/5$ برابری با مقدار $6/705$ در ریشه نسبت به برگ در شرایط تنش داشته و در کلاس *a* قرار گرفت و اندام برگ با مقدار $2/781$ در کلاس *b* قرار گرفت. در صورتی که بیان این ژن در شرایط بدون تنش در ریشه و برگ یکسان بوده و در کلاس *c* قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × اندام × تنش در سطح احتمال یک درصد انجام شد (شکل ۳-گ) و چهار کلاس بدست آمد. افزایش بیان در ریشه رقم *Williams* در شرایط تنش دو برابر ریشه رقم *L17* بوده و در کلاس *a* و میزان بیان در ریشه *L17* در کلاس *b* قرار گرفت. همچنین افزایش بیان تحت تنش خشکی در برگ رقم *Williams* بیشتر از لاین *L17* بود، ولیکن هر دو بدون اختلاف آماری معنی دار در گروه *c* قرار گرفتند. نتایج

سپاسگزاری

اند که بیان ژن *OSBP* در ریشه و برگ به طور

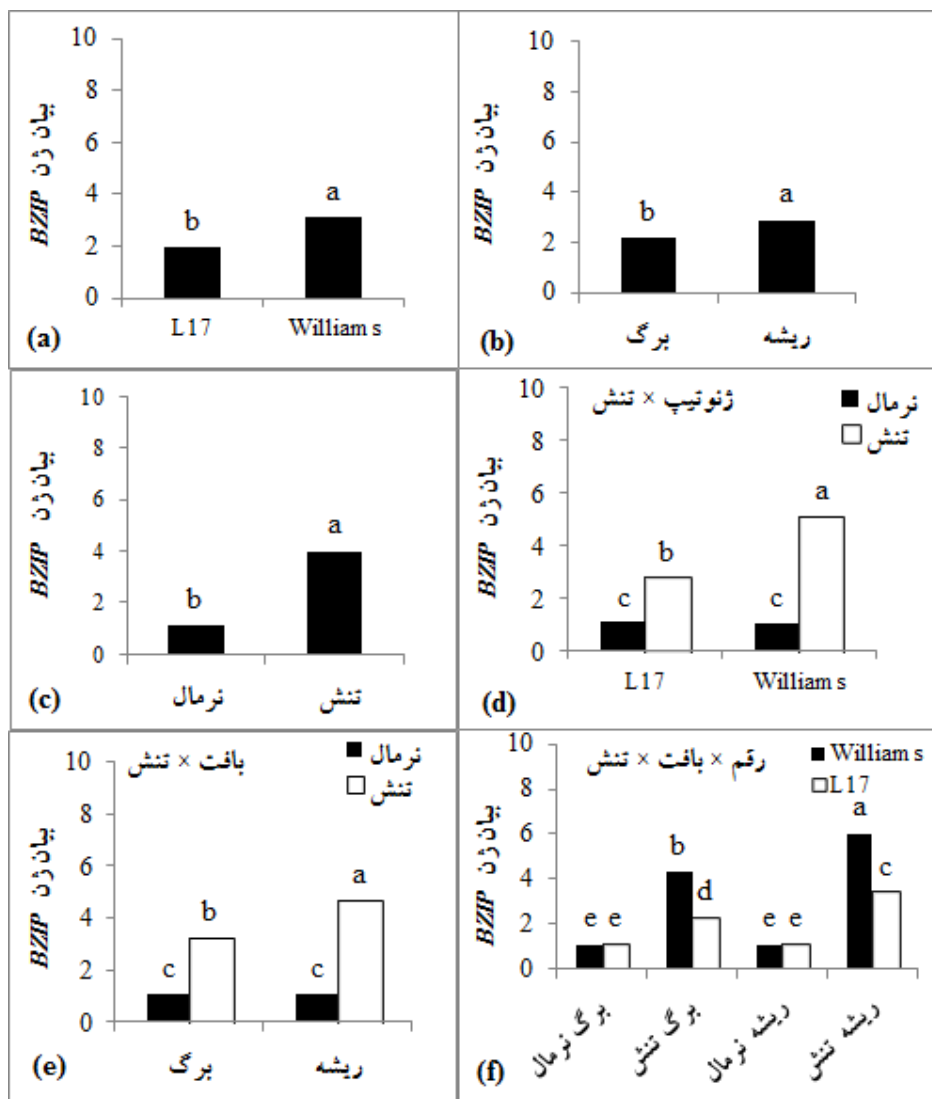
قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت.

هزینه اجرای این تحقیق از محل اعتبارات

طرح‌های پژوهشی دانشگاه بین المللی امام

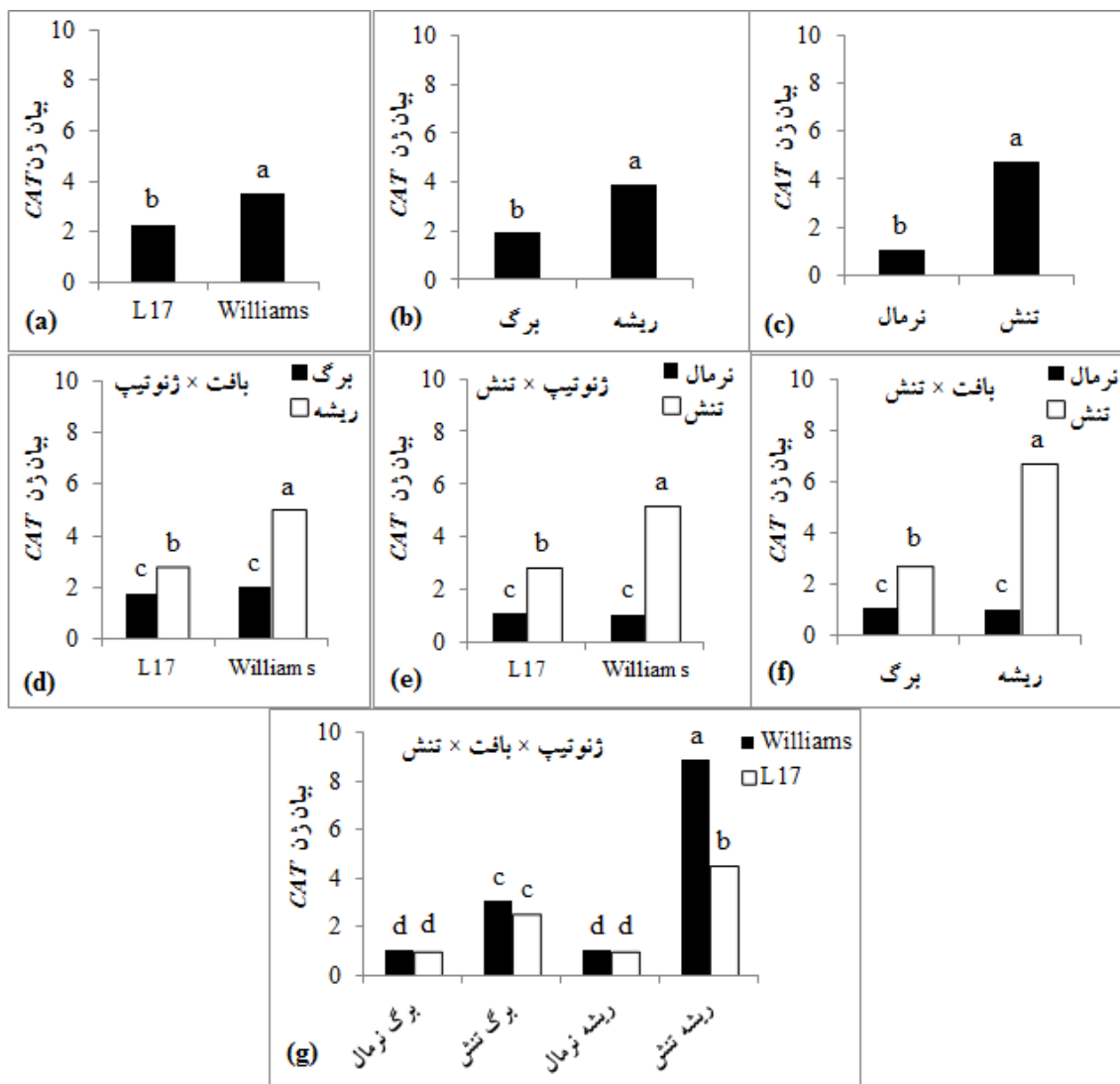
خمینی (ره) با شماره طرح ۱۱۴۴۶ پرداخت شده

است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.



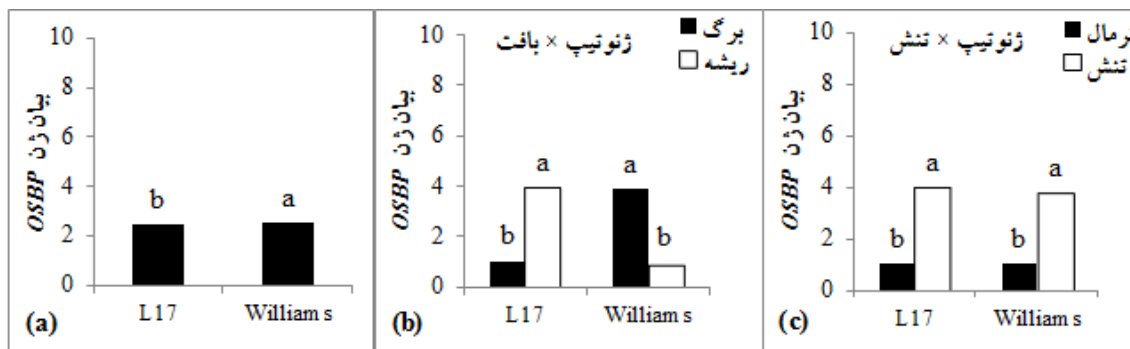
شکل ۲- مقایسه میزان بیان ژن *BZIP* در (a) دو رقم *Williams* و *L17*، (b) دو اندام ریشه و برگ، (c) دو سطح تنش و عدم تنش خشکی، (d) اثر متقابل ژنوتیپ × تنش، (e) اثر متقابل اندام × تنش و (f) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش.

Figure 2- The comparison of *BZIP* gene expression in (a) two cultivars Williams and L17, (b) two organs root and leaf, (c) stress and non-drought stress, (d) genotype × stress, (e) stress × organs, (f) genotype × organs × stress.



شکل ۳- مقایسه میزان بیان ژن کاتالاز (*CAT*) در (a) دو رقم Williams و L17، (b) دو اندام ریشه و برگ، (c) دو سطح تنش و عدم تنش خشکی، (d) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام، (e) اثر متقابل ژنوتیپ × تنش، (f) اثر متقابل اندام × تنش و (g) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام × تنش.

Figure 3- The comparison of *CAT* gene expression in (a) two cultivars Williams and L17, (b) two organs root and leaf, (c) stress and non-drought stress, (d) genotype × organs, (e) genotype × stress, (f) organs × stress, (g) genotype × organs × stress.



شکل ۴- میزان بیان ژن *OSBP* در (a) دو رقم *L17* و *Williams*، (b) اثر متقابل ژنوتیپ × اندام، (c) ژنوتیپ × اندام × تنش.

Figure 4- The *OSBP* gene expression in (a) two cultivars *Williams* and *L17*, (b) genotype × organs, (c) genotype × organs × stress.

منابع

- Altinkut A, Kazan K, Ipekci Z, Gozukirmizi N (2001). Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and wheat. *Euphytica* 121: 81-86.
- Ashraf M, Akram NA, Al-Qurainy F, Foolad MR (2011). Chapter five – Drought Tolerance: Roles of Organic Osmolytes, Growth Regulators, and Mineral Nutrients. *Advances in Agronomy* 111: 249-296.
- Ashraf M (2009). Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* 28: 169-183.
- Bartels D, Sunkars R (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 24: 23–58.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000). Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones, eds) pp. 1158-1203.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Mare, Tondelli A, Stanca AM (2007). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105: 1-14.
- Dedio W (1975). Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Canadian Journal of Plant Science* 55: 369-378.
- Farooq MWA, Kobayashi N, Fujita D and Basra SM (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Gao SQ, Chen M, Xu ZS, Zhao CP, Li L, Xu HJ, Tang YM, Zhao X, Ma YZ (2011). The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 75: 537-553.
- Huang XS, Liu JH, Chen XJ (2010). Over expression of *PtrABF* gene, a *bzip* transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in

- tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology* 10: 230.
- Khakwani AA, Dennett MD, Munir M (2011). Drought tolerance screening of wheat varieties by inducing water stress conditions. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 33: 135-142.
- Leonardis A M D, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Fonzo N D, Cattivelli L & Mastrangelo A M (2007). Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science* 172: 1005–1016.
- Li DY, Inoue H, Takahashi M, Shiraiwa TK, Takahara H (2007). Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an *OSBP* (oxysterol-binding protein)-homologue from soybean. *Gene* 407: 12-20.
- Martin C & Paz-Ares MYB (1997). Transcription factors in plants. *Trends in Genetics* 13: 67–73.
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal* 38: 982–993.
- Mazandarani A, Rahim Malek M, Navvabpur S, Ramazanpur SS (2012). Catalase gene expression under drought stress at flowering stage in soybean cultivars. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Congress. Sept. 3-5, 2012. Ferdowsi University Mashhad, Iran. pp. 312.
- Nakashima K & Yamaguchi-Shinozaki K (2005). Molecular studies on stress-responsive gene expression in Arabidopsis and improvement of stress tolerance in crop plants by regulon biotechnology. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39: 221–229.
- Nevo E, Chen G (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant Cell & Environment* 33: 670-685.
- Novillo F, Alonso JM, Ecker J R & Salinas J (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3985–3990.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha R R & *et al* (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Ritchie SW, and Nguyen HT (1990). Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor. DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292–1309.
- Shinozaki K & *et al* (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410–417.
- Suprunova A, Krugman T, Fahima T, Chen G, Shams I, Korol A & Nevo E (2004). Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* 27: 1297-1308.
- Thomashow WF (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Molecular Biology* 50: 571–599.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-

- dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11632-11637.
- Vaezi B, Bavei V, Shiran B (2010). Screening of barley genotypes for drought tolerance by agro-physiological traits in field condition. *African Journal of Agricultural Research* 5: 881-892.
- Valentovic P, Luxova M, Kolarovic L, Gasparikova O (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil* 4: 186–191.
- Xiong, L. & Zhu, J. K. (2001). Abiotic stress signaling transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiology Plant* 112: 152–166.
- Xue GP, Bower NI, McIntyre CL, Riding GA, Kazan K & Shorter R (2006). TaNAC69 from the NAC super family of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences. *Functional Plant Biology* 33: 43–57.
- Yamaguchi-Shinazaki K. & Shinozaki K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10: 88–94.

The Expression Profile of *OSBP*, *CAT* and *BZIP* Genes in Drought Tolerant and Susceptible Soybean Cultivars Using Real Time PCR

Ahmadi J.^{*1}, Soleimani V.²

¹ Associate Professor of Imam Khomeini International university, Qazvin, Iran.

² M. Sc., Genomics Laboratory of Imam Khomeini International university, Qazvin, Iran.

Abstract

Under drought stress, a signaling system induces expression of specific genes to alleviate the harmful effects of drought stress. *BZIP* gene is a transcription factor in the signaling of abiotic stress and plays a role in the regulation responses to different stresses in plants and activated by ABA and closing the stomata. *OSBP* gene plays a key role in the signaling in several physiological reactions in response to stress. Catalase enzyme is series of anti-oxidant, which catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen molecules. Two soybean cultivars, Williams (tolerant to drought) and L17 (susceptible to drought) were cultured in the greenhouse conditions. Drought stress treatment was performed at two-leaf stage for 7 days. Total RNA was extracted from leaves and roots of both control and stressed plants. Then cDNA was synthesized and used for Real time PCR. To normalize data the housekeeping gene 18SrRNA was used. Data analysis based on Ct curves showed that the expression of *BZIP* gene increased under drought stress in both leaf and root. The *BZIP* gene expression in Williams was two-fold greater than L17 cultivar. Also its expression was higher in root than leaf. *OSBP* gene expression differences were not significant between Williams and L17. The expression of *CAT* gene in Williams was two-fold greater than L17, and its expression was higher in root than leaf. According to increasing of drought tolerance through the expression of these genes, it can be concluded that transferring of these genes may enhance drought tolerance in high yield soybean genotypes.

Keywords: *qRT-PCR*, *Stress*, *OSBP*, *CAT*, *BZIP*, *soybean*.

* Corresponding Author: Ahmadi J.

Tel: 09123128278

Email: njahmadi910@yahoo.com