

بررسی الگوی بیان ژنهای MYB در گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت دو تنش کوتاه مدت شوری و سرما با استفاده از راهکار RT-PCR کمی

مهدی رهایی^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، هوشنگ علیزاده^۳، محمد علی ملبویی^۴،
سیروس عبدمیشانی^۵، پیر شک^۶ و گنگ پینگ ژو^۷
۱، ۲، ۳، ۵، دانشجوی دکتری، استاد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ۶، ۷، استادان دانشگاه کوئینزلند استرالیا
(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۹ - تاریخ تصویب: ۸۸/۹/۱۱)

چکیده

رشد گیاهان به شدت تحت تأثیر تنش‌های محیطی چون، خشکی، شوری زیاد، درجه حرارت کم یا زیاد قرار می‌گیرد و بر این اساس شناسایی ژن‌هایی که در انطباق یا تحمل تنش نقش دارند و به‌خصوص ژن‌های تنظیم‌گر، بسیار ضروری است. پروتئین‌های MYB یک خانواده بزرگ از عوامل رونویسی هستند که از اهمیت خاصی در تنظیم فرآیندهای نموی و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان برخوردارند. مشخصه اصلی اعضای این خانواده، وجود یک دامین اتصال به DNA (دامین MYB) است که از لحاظ ساختاری حفاظت شده است. به‌منظور بررسی نقش این عوامل تنظیمی و الگوی بیان آنها در زمان تنش در گیاه گندم، تعدادی از قطعات ژنی MYB پس از آنالیز توالی، انتخاب و جهت آنالیز Real Time RT PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت استخراج RNA کل، گیاهچه‌های ۱۳ روزه گندم تحت دو شرایط تنش کوتاه مدت شوری ۲۰۰ میلی مولار و سرمای ۴°C به مدت ۰، ۶ ساعت و ۲۴ ساعت قرار گرفته و از ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی آنها به‌طور جداگانه، نمونه‌گیری گردید. آنالیز فیلوژنتیک تعدادی از این ژن‌ها به‌همراه توالی‌های مرجع از آرآیدوپسیس و برنج، آنها را در سه گروه مجزا قرار داد. همچنین آنالیز RT-PCR کمی، نشان داد که بیان اغلب ژن‌های انتخاب شده در پاسخ به تنش تغییر می‌کند و بر این اساس می‌توان آنها را به دستجات مختلفی بر اساس نوع تنش و نوع بافت تقسیم‌بندی نمود. نتایج حاصله از این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک منبع اطلاعاتی مفید، در پروژه‌های مرتبط با همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های MYB در گیاه گندم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، عامل رونویسی، MYB، qRT-PCR.

مقدمه

است (Rosenberg et al., 1993). این ملاحظات به‌شدت با کشاورزی (غذا)، اکولوژی و محیط‌زیست مرتبط می‌باشد که در این بین، زیست‌شناسی و به‌خصوص زیست‌شناسی گیاهی مهمترین نقش را ایفا می‌نماید و

با ورود به قرن بیست و یکم، استفاده پایدار و سالم از محیط‌زیست و منابع طبیعی و ملاحظات مرتبط با سلامت انسان از مهمترین موضوعات مورد دغدغه بشر

است که احتمالاً در تحمل تنش نقش دارند همچون چاپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئین‌های اواخر دوره جنین‌زایی (Late Embryogenesis Abundant Protein: LEA)، آنزیم‌های بیوسنتز اسمولیت‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و آنزیم‌های تغییر دهنده لیپیدهای غشایی. گروه دوم شامل عوامل پروتئینی درگیر در تنظیم بیان ژن و پیام‌رسانی در پاسخ به تنش غیرزنده می‌باشند که از این دسته می‌توان مواردی چون پروتئین‌کینازها، آنزیم‌های درگیر در متابولیسم فسفولیپیدها و عوامل رونویسی (Transcription Factor: TF) را نام برد (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2004; Maruyama et al., 2005). در واقع عوامل رونویسی، پروتئین‌هایی (*trans acting*) هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به توالی‌های خاصی از DNA (*cis acting*)، واقع در ناحیه پرموتورهای ژن‌های هدف آنها تقویت یا باز می‌دارند. تشخیص عملکردی عوامل رونویسی برای به‌دست آوردن تصویری کامل از شبکه‌های تنظیمی رونویسی کنترل‌کننده فرآیندهای نموی و فیزیولوژیکی، همچون رشد و تشکیل بافت‌ها و پاسخ به محرک‌های هورمونی یا محیطی، بسیار ضروری است (Riechmann et al., 2000; Gao et al., 2006; Caldana et al., 2005). 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 پرموتور ژن‌های هدف، کنترل کند (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2005). همچنین مشخص شده است که خانواده‌های زیادی از این عوامل، تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند که از جمله مهمترین آنها، پروتئین‌های bZIP (Uno et al., 2000)، WRKY (Martin & Paz-Ares, 1997)، DREB (Sakuma et al., 2004)، NAC (Xue et al., 2006; Novillo et al., 2004)، MYC (Tran et al., 2004)، MYB (Yamaguchi-Shinozaki & MYB, 2003) و MYB (Shinozaki, 2005; Abe et al., 2003) را می‌توان نام برد. پروتئین‌های MYB در واقع کلاس متنوعی از

با توجه به آنکه گیاهان تنها منبع تجدید شونده و همچنین مواد و انرژی سازنده را تشکیل می‌دهند، بنابراین زیست گیاهی قدرتمندترین ابزار برای استفاده مناسب از منابع گیاهی می‌باشد (Charlesworth et al., 2001; Bazzaz, 2001; Aharoni et al., 2001). گیاهان غالباً در معرض توده‌ای از شرایط تنش می‌باشند و این شرایط، آنها را از رسیدن به پتانسیل ژنتیکی کامل باز می‌دارد و تولیدات گیاهی را در پهنه جهانی محدود می‌سازد. در واقع تنش غیره زنده، علت اصلی کاهش زراعی جهان و کاهش متوسط عملکرد برای اغلب گیاهان زراعی تا بیش از ۵۰٪ می‌باشد (Bray, 2001). از جمله تنش‌های محیطی، کمبود آب در خاک، وجود املاح نمکی زیاد و درجه حرارت‌های کم و زیاد می‌باشند که به‌شدت رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bartels & Souer, 2004; Rizhsky et al., 2002). بدین لحاظ گیاهان از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ داده و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا متحمل می‌سازند (Thomashow, 1999; Shinozaki et al., 2003; Bray et al., 2000). این پاسخ مولکولی و بیوشیمیایی وظیفه‌ای بسیار پیچیده است که نه تنها به طول دوره تنش بستگی دارد بلکه به مراحل نموی و پارامترهای مرفولوژیکی-آناتومیکی گیاهان نیز وابسته است (Bartels & Souer, 2004; Rizhsky et al., 2002). به محض درک و تشخیص تغییرات درون سلولی، مسیرهای پیام‌رسانی (Signal Transduction) مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آنها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. فعالیت کامل همه این آبشارهای پیام‌رسانی القاء شده، منجر به انطباق گیاه و در نتیجه تحمل تنش در آن می‌شوند (Xiong & Zhu, 2001; Leonardis et al., 2007). فرآورده‌های این ژن‌ها نه تنها در حفاظت سلول از تنش عمل می‌نمایند بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama et al., 2004). بنابراین می‌توان فرآورده‌های این ژن‌ها را براساس نوع عملکرد آنها، به دو گروه طبقه‌بندی نمود: گروه اول شامل پروتئین‌هایی

رونویسی محسوب می‌شوند. به‌عنوان مثال، *ZM1* به‌طور مثبت، بیوسنتز فلاونوئید را با کنترل بیان ژن چالکون سنتتاز (CHS) تنظیم می‌کند (Paz-Ares et al., 1987) و *WER* یک تنظیم‌گر مثبت بیان *GL2* (Lee & Schiefelbein, 2001) می‌باشد. اما ژن MYB R2R3 می‌تواند، به‌عنوان تنظیم‌گر منفی نیز عمل نماید. به‌عنوان مثال، اورتولوگ *AMMYB305* گل میمون در آرآبیدوپسیس، یعنی *AtMYB4*، تجمع سیناپلی لاملات را با جلوگیری از بیان ژن سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) تنظیم می‌کند (Jin et al., 2000).

هدف از این تحقیق، این بود که با توجه به نقش مهم خانواده MYB در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه، الگوی بیان این ژن‌ها در زمان تنش در گیاه گندم بررسی شود. برای این منظور تعدادی از قطعات ژنی کاندید MYB انتخاب و پس از آنالیز توالی و همچنین هم‌ریفی (Alignment) با ژن‌های MYB متناظر در گیاه آرآبیدوپسیس و برنج، مورد آنالیز RT-PCR کمی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: رقم‌های گندم SB169 (به‌عنوان رقم متحمل) و SB165 (به‌عنوان رقم حساس) که هر دو از تلاقی رقم‌های Babex و Seri M82 در CSIRO استرالیا به دست آمده‌اند و نتایج آزمایشات مزرعه‌ای و آزمایشگاهی متحمل و حساس بودن آنها را ثابت کرده‌اند. از سیستم هیدروپونیک جهت اعمال تیمار شوری و سرما استفاده شد. برای اعمال شوری و سرما، گیاهان سیزده روزه گندم را به مدت ۰، ۶ و ۲۴ ساعت، به‌طور جداگانه در معرض شوری ۲۰۰ mM (NaCl) و درجه حرارت ۴°C قرار داده و سپس نسبت به نمونه‌گیری از آنها اقدام گردید. از هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار ۵ بوته مورد نمونه‌برداری از قسمت‌های هوایی و ریشه قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، بلافاصله آنها را در نیتروژن مایع قرار داده و برای استخراج RNA کل در مرحله بعد، در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی (یوکاریوت‌ها) دخیل هستند. از مشخصه مهم این خانواده، داشتن یک دامین اتصال به DNA یعنی، دامین MYB می‌باشد که حفاظت شده است (Hailing & Martin, 1999). یک دامین MYB معمولاً مرکب از یک تا سه تکرار ناقص است که هر تکرار حاوی حدوداً ۵۲ آمینواسید است که یک کنفورماسیون Helix-Turn-Helix را به وجود می‌آورد که در شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرد. به‌عنوان مثال، دامین MYB عامل رونویسی c-MYB پستانداران که به‌خوبی شناسایی شده است مرکب از سه تکرار R1، R2 و R3 می‌باشد (Paz-Ares et al., 1987). به‌طور معمول، سه آمینواسید تریپتوفان که با فاصله منظم در هر تکرار MYB قرار دارند، در خوشه هیدروفوبیکی شرکت می‌کنند که به احتمال زیاد در تشخیص اختصاصی DNA شرکت دارند (Yanhui et al., 2006). پروتئین‌های MYB گیاهی به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند: MYB R2R3ها، که حاوی دو تکرار مجاور می‌باشند، MYB R1R2R3 با سه تکرار مجاور هم و یک گروه ناهمگن که در مجموع به‌عنوان پروتئین‌های مرتبط با MYB در نظر گرفته می‌شوند که معمولاً (اما نه همیشه) حاوی تنها یک تکرار MYB هستند (Yanhui et al., 2006). براساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که MYB R1 در تنظیم ساعت بیولوژیک (Schaffer et al., 1998; Schaffer et al., 2001) و پروتئین‌های چسبنده به DNA تلومری نقش دارد (Yu et al., 2000). MYB R1R2R3 در تشکیل سایکلین نوع B مؤثر است (Ito et al., 2001). MYB R2R3 بزرگترین و از لحاظ عملکردی متنوع‌ترین زیرخانواده است و نقش‌های مهمی را در تنظیم بیوسنتز آنتوسیانین (Rongmin et al., 2005)، تعیین شکل و ساختار سلولی بافت‌های مختلف گیاهی (Schaffer et al., 2001; Schaffer et al., 1998; Aharoni et al., 2001) و پاسخ به سیگنال جیبرلیک اسید بازی می‌کند (Gubler et al., 2002). ژن‌هایی از زیرگروه MYB R2R3 نیز در پاسخ به تنش (کم‌آبی) و اسید سالیسیلیک (مرتبط با بیماری‌زایی) در آرآبیدوپسیس شناسایی شده‌اند و اغلب، جزء ژن‌های تنظیم‌گر مثبت

دستورزی داده‌ها

از تجزیه داده‌های حاصل از میکروآرایه (Mott & Wang, 2007) و استفاده از The Assembled Tentative Sequences (TCs) واقع در بانک اطلاعاتی شاخص ژن گندم (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) به‌عنوان نقطه شروع برای انتخاب توالی‌های مناسب ژن‌های MYB و آنالیز بیوانفورماتیک بیشتر استفاده شد. گفتنی است که TC در واقع، یک توالی توافقی بین EST‌های یک ژن است که با هم‌ردیفی آنها به‌وجود آمده است. علاوه بر EST‌ها، TC‌ها شامل ET‌ها نیز می‌شوند که شامل رونوشت‌های پیش‌بینی شده (PT) و یا همسانه‌سازی شده‌اند. هم‌ردیفی جفتی (Pairwise Alignment) توالی و مقایسه این TC‌ها جهت جلوگیری از تکرار و همچنین انتخاب بهترین توالی استفاده شد. توالی‌های با ۹۸٪ تشابه، به‌عنوان توالی‌های یکسان در نظر گرفته شده و از تکرار آنها خودداری شد. جهت کسب اطلاع بیشتر راجع به این توالی‌ها و هم‌ردیفی با نمونه‌های معادل در برنج و آرابیدوپسیس، از نرم‌افزار BLASTX استفاده گردید. از طریق کاوش توالی‌ها در Prosite و بانک اطلاعاتی دامین در NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrps.cgi>)، وجود دامین حفاظت شده حاوی تکرار MYB، ثابت گردید. در نهایت از تعداد زیادی قطعات ژنی MYB، ۱۱ ژن جهت آنالیز qRT-PCR انتخاب گردید^۱.

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR کمی

RNA کل از بافت‌های ریشه و قسمت‌های هوایی گیاهان گندم با استفاده از کیت استخراج RNA گیاهی شرکت (Promega) استخراج گردید. جهت حذف DNA باقیمانده در نمونه‌های RNA، از DNase I (Invitrogen) استفاده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق تیمار شدند. سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت، همراه با یک واحد آنزیم Superscript III از شرکت Invitrogen و با استفاده از مخلوطی از آغازگرهای Oligo dT و تصادفی (۶ نوکلئوتیدی) سنتز

شد. جهت کنترل کیفیت RNA، نمونه‌های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و اسپکتروفتومتری، آزمایش شدند. RT-PCR کمی، جهت تکثیر رونوشت‌های ژن‌های MYB، با به‌کارگیری آغازگرهای موجود در جدول ۱ و با استفاده از سیستم تشخیص توالی (ABI Prism 7900 Applied Biosystem) و روش SYBR Green، مطابق با دستورالعمل‌های دستگاه شامل ۳ میکرولیتر از SYBR Mix (حاوی SYBR Green، Taq DNA پلیمرز و بافر PCR)، ۲ میکرولیتر از محلول حاوی جفت آغازگر (با غلظت هر کدام ۱ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر از محلول cDNA (غلظت ۱۰ نانوگرم/میکرولیتر) انجام شد.

ژن‌های *TaRPII36* (زیر واحد *T. aestivum RNA polymerase II 36 kDa*) و *TaRP 15* (زیر واحد *T. aestivum RNA polymerase I, II and III, 15 kDa*)، به‌عنوان ژن‌های مرجع، جهت محاسبه سطح بیان نسبی ژن‌های MYB، استفاده شدند. اختصاصی بودن آغازگرها جهت واکنش PCR با دو روش زیر تأیید شدند:

۱. وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیر شده PCR
 ۲. رؤیت یک باند تکی بروی ژل آگاروز (شکل ۱).
- سطح نسبی بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با ژن‌های کنترل مرجع، با استفاده از فرمول ارایه شده توسط Pfaffl (2001) محاسبه گردید:

Error! Objects cannot be created from editing field codes.

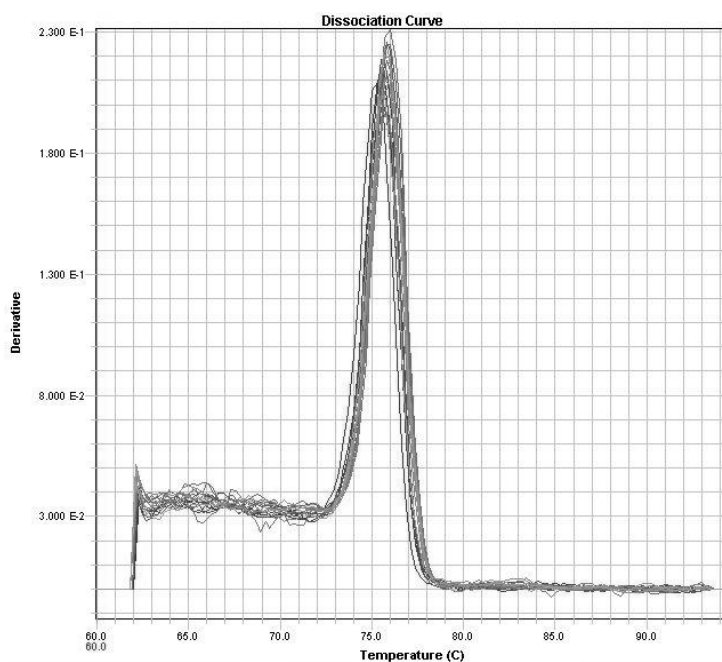
آنالیز هم‌ردیفی و روابط خویشاوندی

به‌منظور آنالیز روابط خویشاوندی و گروه‌بندی ژن‌های انتخاب شده و همچنین تعیین میزان تشابه ژن‌ها، در ابتدا با توالی‌های مربوط به دامین‌های اتصال به DNA یا دامین‌های MYB حاصل از ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی به توالی‌های پروتئینی استخراج و با استفاده از روش (Jeanmougin et al., 1998) (Multiplex Alignment) قرار گرفتند و سپس با استفاده از نرم افزار (Kumar et al., 2004) MEGA3 و بر اساس روش NJ

۱. در حال حاضر شماره ID این قطعات ژنی در بانک اطلاعاتی TaGI تغییر کرده است و شماره‌های جدید به‌صورت تیره (داخل پرانتز) در جدول ۱ آورده شده است. ولی از IDهای جدید در متن مقاله به لحاظ حفظ فرمت اولیه استفاده نگردیده است.

جدول ۱- توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR کمی

TC Number	5' → 3' آغازگر رفت	5' → 3' آغازگر برگشت
TC238371 (TC335859)	TCGGACTTCGTTGACAATACTC	CGAGTTCGTGCTTGGTTTAAG
TC238729 (TC277220)	GGTGTTCCTAAAGTCCCCAGTTAG	GGTATTGCGTGTAAGCGTGCTC
TC251032 (TC354050)	TTCCGTCAAAGCTTGAAAGTGC	TCAATGGAGGGAAAAGGGAGTAAC
TC256962 (TC326615)	TGCAGTTTGAAGAGTCATGGAATG	GCGCAGGAGCTTACGCAAC
TC253140 (TC282418)	TGGGCATGTCTGAAGCTAAG	CCTGGAAAGCCGATTGTC
TC270358 (TC301150)	TACAACCTCCTTTGGAAGCTGAAAC	CCAGCCTGATTGCATCATC
TC236359 (TC304281)	GGATGGAAACCAGCGACAC	TCTAAATCTGCGACAAACTCTGTATG
CJ613648 (BT008981)	ATCATGCATTTCTCCGAGTTC	CAGTTCGATCTCCCGTTCTC
TC236628 (TC280669)	GGACGCACATGAGGAAGAAG	GTCGTAAGCGACGTGGAGTC
TC269486 (TC282770)	AGCATTCCAAGTGGGCTCATG	GAATACAGAGTGGAAAGTGCCTTGC
TC251026 (TC300748)	AGACGCTTGTGTTCTCCTTGTACTG	CGGAAACTGTACAAATGTCACTGC



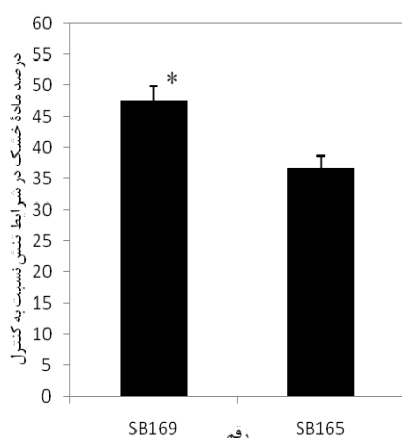
شکل ۱- نمونه‌ای از سیگنال‌های تک پیکی که در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیر شده PCR (تمام ژنهای MYB) به دست آمده است.

RARTF (Iida et al., 2005) معرفی شده‌اند، استفاده گردید. این توالی‌ها عبارت بودند از: *ATRI*، *WEREWOL*، *GLI*، *CAPRICE* و *CIRCADIAN*.
CLOCK ASSOCIATED

تجزیه آماری

به منظور تجزیه آماری و تعیین سطح معنی‌داری نتایج حاصل از آنالیز تفاوت سطوح بیان نسبی ژن‌ها در

(Neighbor-Joining)، دسته‌بندی شده و درخت روابط خویشاوندی تشکیل شد. از آزمون Bootstrap جهت تعیین و دقت برازش درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. همچنین جهت کسب اطلاع بیشتر، در گروه‌بندی این توالی‌ها از توالی‌های مرجع از آرآبیدوپسیس و برنج و همچنین توالی‌های مرجعی که به عنوان Query ژن‌های زیرخانواده MYB آرآبیدوپسیس در بانک اطلاعاتی



شکل ۲- درصد ماده خشک در دو رقم حساس (SB165) و متحمل (SB169) در شرایط تنش نسبت به حالت کنترل

آنالیز توالی دامین و روابط خویشاوندی

همردیفی دامین روی توالی‌های حفاظت شده ناحیه اتصال به DNA (دامین MYB) بر روی هشت عدد از این قطعات ژنی با استفاده از روش CLUSTAL W نشان داد که نمی‌توان نواحی کاملاً حفاظت شده‌ای را در بین تمام دامین‌ها، مشاهده نمود. به طوری که قطعات ژنی TC269486، TC236359، TC236628 و CJ613648 و MYB که هر یک حاوی دو دامین MYB می‌باشند دارای دو ناحیه حفاظت شده مشابه و قطعات ژنی TC270358 و TC238729 که حاوی یک دامین MYB می‌باشند، دارای دو ناحیه حفاظت شده دیگر در ناحیه دامین خود می‌باشند. همچنین به نظر می‌آید که TC251026 و TC251032 از لحاظ توالی ناحیه اتصال به DNA بسیار شبیه به یکدیگر باشند هرچند که نتایج

مقایسه با ژن مرجع، از آزمون F (تجزیه واریانس) و در قالب آزمایش فاکتوریل و در سطح احتمال $P = 0/05$ استفاده گردید. مقایسه میانگین‌های سطوح بیان نسبی، با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج

در این مطالعه، ۱۱ قطعه ژنی حاوی تکرارهای MYB (دامین MYB) از طریق تجزیه آماری روی داده‌های میکروآرایه و شناسایی ESTهای مربوطه (TCs) از بانک اطلاعاتی انتخاب شدند. برای کسب اطمینان و همچنین به دست آوردن اطلاعات بیشتر راجع به این توالی‌ها از منظر عملکردی، با استفاده از برنامه BLASTX، همولوگ‌های این قطعات ژنی در ژنوم برنج و آرابیدوپسیس شناسایی شدند (جدول ۲) و روابط خویشاوندی این قطعات به همراه همولوگ‌های خود با تشکیل یک درخت فیلوژنتیک به دست آمد (شکل ۴). جهت تأیید و بررسی الگوی بیان این قطعات ژنی، گیاهان گندم به طور جداگانه تحت دو تنش کوتاه مدت شوری (۲۰۰mM) و سرما (۴°C)، مورد آنالیز RT-PCR کمی قرار گرفتند. اندازه‌گیری ماده خشک در دو رقم فوق (میانگین تمام تکرارها) و سپس تعیین درصد کاهش ماده خشک در شرایط تنش در دو رقم حساس و متحمل نسبت به حالت کنترل، نشان داد که این درصد کاهش، در رقم متحمل کمتر از رقم حساس بوده و از این لحاظ، صحت آزمایش در ارتباط با انتخاب این دو رقم به عنوان مواد آزمایشی را تأیید نمود (شکل ۲).

جدول ۲- نتایج بررسی همولوژی توالی (BLASTX) ژن‌های MYB بین گندم، برنج، آرابیدوپسیس

TC Number	Rice Gene ID	BLAST X E value	Arabidopsis Gene ID	BALST X E value
TC238371	OS06g0728700	1e-108	AT5G17300	9e-26
TC 238729	OS05g0491500	3e-127	AT2G01060	5e-58
TC251032	OS02g0680700	3e-106	AT5G52660	2e-86
TC256962	OS01g0187900	2e-61	AT3G16350	8e-15
TC253140	OS10g0561400	3e-99	AT5G47390	7e-46
TC270358	OS12g0105600	3e-46	AT2G38300	6e-31
TC236359	OS02g0624300	4e-95	ATMYB15/ATY19/MYB15	8e-66
CJ613648	OS06g0258000	1e-111	Myb43	2e-69
TC236628	OS05g0114700	2e-57	Myb111	1e-51
TC269486	Os12g0567300	9e-119	Myb59	7e-68
TC251026	OS06g0105800	5e-107	AT5G52660	4e-82

متحمل، تحت تنش کوتاه مدت شوری و سرما بر اساس دستورالعمل موجود در قسمت مواد و روش‌ها، قرار گرفتند. از این دو رقم، RNA کل از هر دو بخش هوایی و ریشه به صورت مجزا استخراج و سپس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، مورد آنالیز Real Time RT-PCR قرار گرفتند. شکل ۵ به صورت شماتیک، نتایج این آنالیز را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، بیان سه قطعه ژنی TC238371، TC251026 و TC251032 در هر دو شرایط تنش و در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس و در هر دو بافت هوایی و ریشه، افزایش یافته است. بنابراین می‌توان استنباط کرد که این قطعات ژنی، مرتبط با پاسخ به تنش در گیاه گندم هستند و صرف‌نظر از ژنوتیپ، در پاسخ به تنش در گیاه گندم بیان می‌شوند. برخی از قطعات ژنی فقط در یک ژنوتیپ، بیان‌شان تغییر و میزان آن افزایش یافت (TC238729 در بافت ریشه و در تنش سرما در رقم SB169). برخلاف این ژن‌ها، قطعات ژنی TC256962، TC269486 در تنش شوری و در بافت هوایی و قطعات ژنی TC270358، TC236359 و CJ613648 در تنش سرما و در بافت ریشه و در هر دو رقم حساس و مقاوم بیان‌شان کاهش یافت. در تنش سرما، بیان اغلب ژن‌ها در زمان تیمار ۶ ساعته، تغییر کرد و در زمان ۲۴ ساعت دوباره به حالت اولیه بازگشتند که این بدان معنی است که اغلب این ژن‌ها، در پاسخ به شوک سرما بیان و

هم‌ردیفی چندگانه در نواحی دیگر این قطعات (به سمت دامین فعال‌سازی رونویسی یا انتهای C)، شباهت و همولوژی کمتری را نشان داد. تفاوت بین این دو قطعه اخیر در ناحیه اتصال به DNA تنها در یک اسید آمینه بود (پرولین در TC251032 بوسیله گلوتامین در TC251026 جایگزین شده است) (شکل ۳).

همچنین به منظور تعیین روابط خویشاوندی این قطعات ژنی، درخت فیلوژنتیک، بر اساس توالی آمینواسیدی ناحیه اتصال به DNA، با به کارگیری نتایج حاصل از روش CLUSTAL W و با استفاده از نرم افزار MEGA3 ترسیم شد که در نتیجه آن قطعات ژنی به سه گروه مجزای MYB R1 و MYB R2R3 و MYB Related تقسیم‌بندی شدند. شکل ۴، نتایج گروه‌بندی این توالی‌ها را نشان می‌دهد. همچنان که در این شکل مشخص است، توالی‌های مرجعی که به عنوان Query ژن‌های زیرخانواده MYB آرآبیدوپسیس از بانک اطلاعاتی RARTF انتخاب شده بودند، در دو گروه اول قرار گرفتند که این نشان می‌داد که توالی‌های قرار گرفته در گروه سوم (MYB Related)، جدید و یا شباهتی با توالی‌های مرجع حاصل از آرآبیدوپسیس ندارند.

آنالیز بیان ژن

به منظور بررسی الگوی بیان این قطعات ژنی در شرایط تنش، گیاهچه‌های ۱۳ روزه گندم از دو رقم حساس و

```

TC236628 -----ADEERLISL 10
TC269486 --WTEQEDMQLVCTVRLFGERRWDFIAKVSGLNRTGKSCRLRWVNYLM-TPHEERLILEL 57
TC236359 --WTAEDMTLVAHIEQHGHSNWRALPKQAGLLRCGKSCRLRWINYLNFTSDEEEAIQL 58
CJ613648 GPWTAEDQKLVGFLTHGHYCWVRVVKLAGLLRCGKSCRLRWNTNYLD---EEQQLVIDL 57
TC251032 -----ESWT-----EQEHDKFLEA 14
TC251026 -----ESWT-----EPEHDKFEA 14
TC238729 -----RLRWT-----SDLHSRFVDA 15
TC270358 -----RLRWT-----PELHHCFVRA 15

```

```

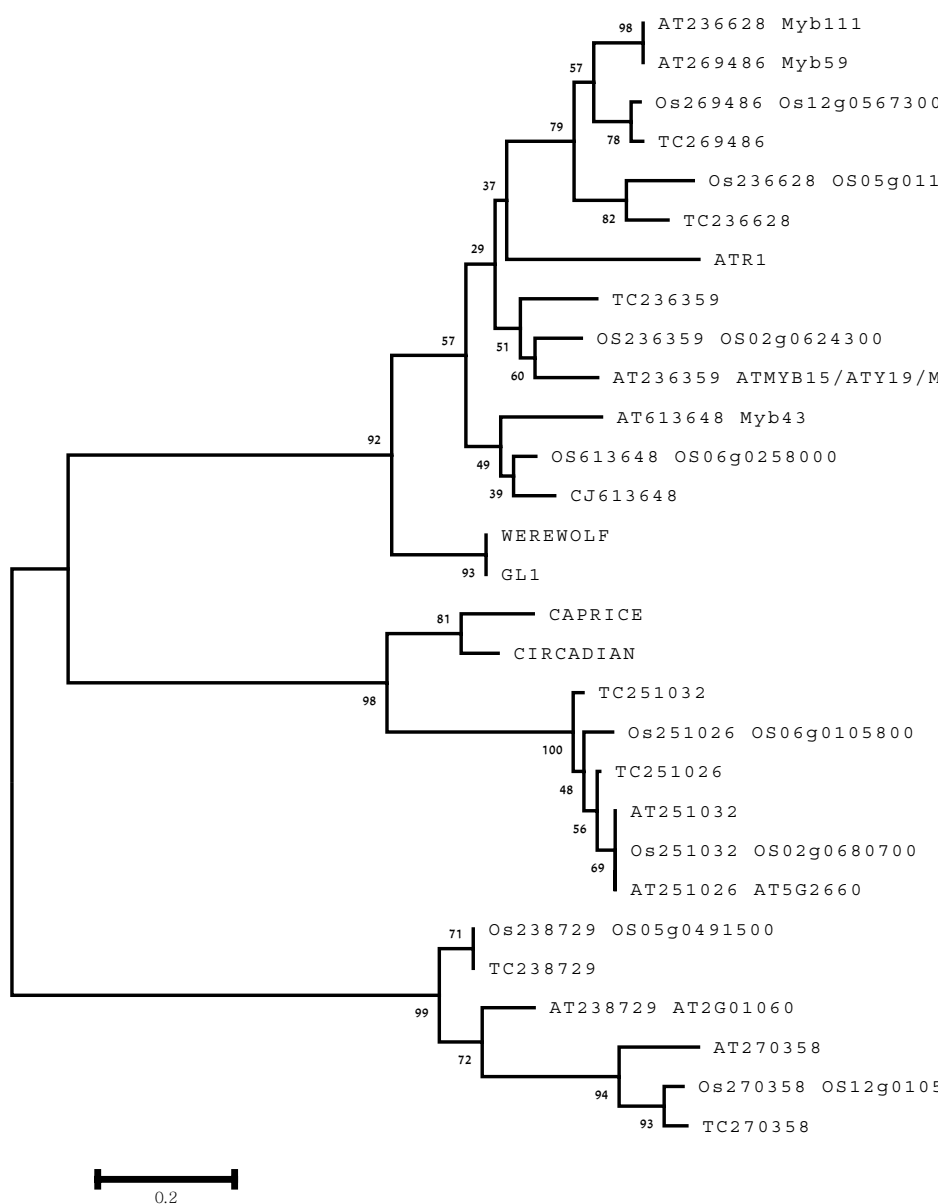
TC236628 HAEWGSRWSRIAR-----KLPGRTDNEIKNYWRTHM 41
TC269486 HARWGNRWSRIAR-----KLPGRTDNEIKNYWRTHM 88
TC236359 HAMLGNRWSRIAA-----KLPGRTDNEIKNYWHTL 89
CJ613648 HAQLGNRWSRIAA-----KLPGRTDNEIKNYWNTL 88
TC251032 LQLFDRDWKKIEA-----FVGSKTVIQIRSHAQKY- 44
TC251026 LQLFDRDWKKIEA-----FVGSKTVIQIRSHAQKY- 44
TC238729 IAQLGGPDRATPKGVLTVMGVPTITIVHVKSHLQKYR 52
TC270358 IHRLGGQDRATPKLVQLMNVRLGLSIGHVVKSHLQMYR 52

```

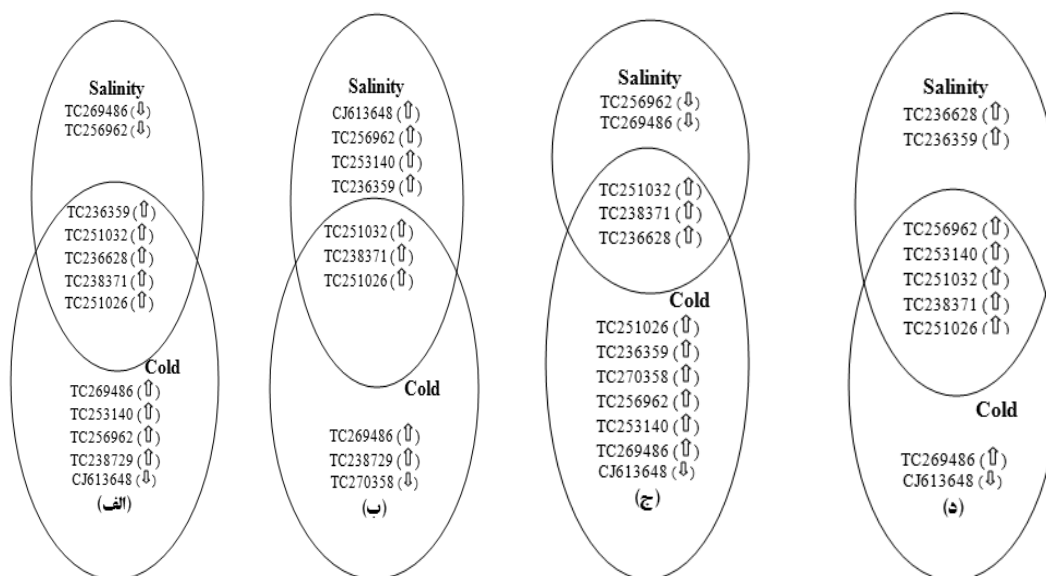
شکل ۳- هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی ناحیه دامین MYB بین هشت قطعه ژنی حاوی این دامین در گندم. نواحی داخل کادر، توالی‌های حفاظت شده را نشان می‌دهند.

می‌دهند؛ شامل، TC238371، TC251026 و TC251032 -۲ ژن‌هایی که در هر دو رقم و تنها در یک تنش کاهش بیان نشان می‌دهند؛ شامل، TC256962، TC269486 و CJ613648 -۳ ژن‌هایی که در یک تنش و تنها در یک رقم بیان‌شان تغییر می‌کند؛ شامل، TC238729 (SB169) -۴ ژن‌هایی که در یک تنش کاهش و در یک تنش افزایش را نشان می‌دهند؛ شامل، TC269486.

سپس به حالت اولیه باز می‌گردند، در حالی که در تنش شوری، بیان اغلب ژن‌ها در ۶ ساعت شروع و اغلب تا ۲۴ ساعت ادامه می‌یافت، یعنی ژن‌های انتخاب شده اغلب، به محرک شوری پاسخ می‌دهند. الگوی بیان برخی از این ژن‌ها در دو بافت هوایی و ریشه با هم تفاوت داشت. در کل می‌توان ژن‌های فوق را بر اساس الگوی بیان‌شان در چهار گروه کلی قرار داد: ۱- ژن‌هایی که در هر دو تنش کوتاه مدت و در هر دو رقم افزایش بیان نشان



شکل ۴- درخت روابط خویشاوندی بر اساس توالی دامین MYB گندم، برنج و آرابیدوپسیس و توالی‌های مرجع زیر خانواده‌های MYB آرابیدوپسیس (*WEREWOLF*, *GL1*, *CAPRICE* و *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED*). هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از روش CLUSTAL W و گروه‌بندی آنها با استفاده از روش Neighbor-Joining، قطعات ژنی MYB را در سه گروه اصلی قرار داد.



شکل ۵- گروه‌بندی الگوی بیان ژن‌های MYB که در دو تنش مختلف صرف‌نظر از زمان تنش (۶h یا ۲۴h) در اندام هوایی (الف) و ریشه (ب) ژنوتیپ متحمل SB169 و اندام هوایی (ج) و ریشه (د) رقم حساس SB165 افزایش (♂) و یا کاهش (♂) یافته‌اند.

یک تیمار خاص هستند. در مطالعه مذکور، گیاهان با هورمون‌های ABA، اتیلن، جیبرلیک اسید، جاسمونیک اسید، IAA، الیسیتور سالیسیلیک اسید و تنش‌های NaCl (۳۰۰ میلی‌مولار برای ۴ تا ۶ ساعت) یا CdCl₂ (۱۰۰ میلی‌مولار برای ۴ یا ۶ ساعت) تیمار شده بودند (Yu et al., 2000). در واقع نتایج این دو تحقیق نقش گسترده اعضای این خانواده ژنی در پاسخ به تنش را تأیید می‌کند. در تحقیق مذکور اکثر ژن‌های پاسخ دهنده به NaCl یا CdCl₂ از نوع R2R3 و تعداد کمتری از نوع MYB Related بودند و همچنین تعداد ژن‌های القاء شده بیشتر از بازداشته شده بودند (Yanhui et al., 2006). این نتایج با یافته‌های ما در این تحقیق مطابقت دارد. همچنین نتایج آنالیز بیان ژن در شرایط دو تنش شوری و سرما نشان داد که تعداد ژن‌های MYB که افزایش بیان داشتند، در رقم SB165 بیشتر از SB169 و در بافت ریشه بیشتر از قسمت هوایی است. دلیل این تفاوت می‌تواند این باشد که با توجه به اینکه رقم SB169 یک رقم متحمل به تنش است و در ارتباط با شوری تحمل بیشتری دارد (نسبت Na⁺/k⁺ کمتری در بافت هوایی خود نگه می‌دارد) لذا کمتر در سطح سلولی تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد و در مقایسه با رقم SB165 پاسخ محدودتری در سطح رونویسی نشان

بحث

عملکرد و بقاء گیاهان همیشه به‌واسطه تنش‌های مختلف محیطی در معرض تهدید می‌باشد و به این خاطر تحقیقات زیادی در ارتباط با تجزیه پاسخ گیاهان از نقطه نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی و ایجاد گیاهان مقاوم و یا متحمل به تنش انجام شده است. اما این مهم، نیازمند فهم عمیقی از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی زیربنای این پاسخ و تحمل در گیاه است. با توجه به نقش گیاه گندم در تغذیه جهانی و کشورمان، در این تحقیق سعی شد، پاسخ گیاه گندم به دو تنش کوتاه مدت شوری و سرما در سطح ژن‌های تنظیم‌گر و ترانسکریپتوم مورد آنالیز قرار گیرد. به این منظور ژن‌های خانواده MYB به‌عنوان یکی از مهمترین خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی انتخاب و مورد آنالیز قرار گرفتند و نشان داده شد که بیان اغلب ژن‌های MYB انتخاب شده در پاسخ به تنش، تغییر می‌کند. شبیه به نتایج حاصل در این مطالعه، در تحقیقی که در گیاه آرابیدوسیس با استفاده از Reverse Northern Dot Blots انجام شد، مشخص گردید که تنها تعداد اندکی از ژن‌های MYB آنالیز شده، به‌طور ثابت (Constitutive) در همه بافت‌ها و در همه تیمارها بیان می‌شوند و بقیه به‌صورت القایی (Inducible) یا مختص

آرابیدوپسیس، ناحیه پروموتور CAB است و تاکنون هم مشخص نشده است که آیا بیان این ژن به وسیله تنش محیطی تنظیم می‌شود یا خیر (Riechmann et al., 2000). در این مطالعه آنچنان‌که در دندروگرام فیلوژنتیکی (شکل ۴) پیداست دو قطعه ژنی TC251026 و TC251032 در گروه این توالی مرجع (CCA1) قرار گرفته‌اند ولی نمی‌توان به صورت قاطع استنباط کرد که عمل این دو قطعه با CCA1 مشابه است و افزایش بیان آنها باعث تأثیر بر سیکل سیرکادین و فیتوکروم در گیاه گندم و یا تأثیر بر ژن CAB می‌شود. هرچند که اثبات این مطلب به صورت دقیق، نیازمند طرح آزمایش‌های بیشتر بر روی این دو قطعه ژنی است. اما مشخص شده است که دو ژن *HvMCB1* و *HvMCB2* از جو که هر دو عامل رونویسی مرتبط با MYB هستند به نواحی خاصی از پروموتور CAB در گیاه جو و گندم متصل می‌شوند. این عوامل رونویسی دارای ویژگی‌های خاص فعال کننده‌های رونویسی هستند و برای بیان حداکثری ژن CAB (پروتئین‌های CAB فتوسیستم II) مورد نیاز می‌باشند، اما برای بیان مرتبط با نور و ساعت سیرکادین ضروری نیستند. رونویسی از هر دو ژن *HvMCB1* و *HvMCB2* تحت تأثیر عوامل محیطی تنظیم می‌شود (Churin et al., 2003). *CAPRICE* (CPC1) در تشکیل تارهای کشنده و تمایزیابی اپیدرمی، *GL1* در نمو کرک‌های سطح گیاه و *ATRI* در بیوسنتز تریپتوفان نقش دارد (Hailing & Martin, 1999). در ارتباط با مقایسه عملکرد این توالی‌های مرجع ذکر شده در فوق، بایستی ذکر شود که مشخص شده است که گرچه پروتئین‌های MYB ممکن است از لحاظ ساختاری بهم شبیه باشند و حتی ممکن است از لحاظ دامین اتصال به DNA تشابه داشته باشند که در نتیجه آن از لحاظ عملکردی همولوگ به حساب آیند؛ اما، ژن‌های هدف این پروتئین‌های چسبنده به DNA، ممکن است متفاوت باشند و دقیقاً نمی‌توان تعیین کرد که ژن‌های این پروتئین‌های مشابه، شبیه یکدیگرند. مثلاً، مشخص شده است که *ZmMYBCL1* (ZmMYBPL) و *PhMYBAN2*، دقیقاً ژن‌های هدف مشابهی را در ذرت و اطلسی (*Petunia*) تنظیم نمی‌کنند. در این حالت موتان‌های *an2* اطلسی در بیان برخی از ژن‌های ساختاری بیوسنتز

می‌دهد. این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز دو رقم حساس (IR29) و مقاوم برنج (FL478) در تنش شوری مشابهت دارد که در طی آن میزان رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به شوری در رقم IR29 نسبت به FL478 بیشتر بود. لازم به ذکر است که از منظر فیزیولوژیک، تحمل به نمک در تک‌لپه‌ای‌ها معمولاً با توانایی گیاه برای دفع (Exclusion) Na^+ از بافت هوایی همراه است (Walia et al., 2005). در ارتباط با تفاوت بیان در دو اندام ریشه و هوایی، فرضیه‌ای که وجود دارد این است که احتمالاً ژن‌های پارالوگ (در یک گونه) که از مضاعف شدن ژنی به وجود آمده‌اند، الگوهای بیان مختلف و وابسته به بافت داشته باشند. مثلاً *ZmMybC1* در آلورون و برخی بافت‌های گل و *ZmMybP1* در بافت‌های سبزینه ای گیاه بیان می‌شوند. در این مثال ژن‌های پارالوگ که به احتمال زیاد از دو برابر شدن ژنی به وجود آمده‌اند، الگوهای بیان متفاوتی انتخاب کرده‌اند (Hailing & Martin, 1999). ریشه‌ها نقش مهمی در درک سیگنال تنش (Price et al., 1997) و انتقال آن به قسمت هوایی و انطباق گیاه به شرایط تنش دارند (Tardieu, 1996). بنابراین، این مسأله می‌تواند دلیلی باشد که چرا تعداد زیادی از ژن‌های MYB مورد آنالیز در این تحقیق، در ریشه فعالیت بیشتری نسبت به اندام هوایی داشتند. نتایج آنالیز توالی قطعات ژنی انتخاب شده در این تحقیق و آزمون هم‌ردیفی با استفاده از BLASTX و بانک اطلاعاتی آرابیدوپسیس (جدول ۲) نشان از شباهت زیاد عملکرد اغلب این قطعات ژنی (درگیر بودن در پاسخ به تنش شوری، سرما یا هر دو) با ژن‌های همولوگ در آرابیدوپسیس دارد. تجزیه فیلوژنتیک (شکل ۴) این قطعات ژنی همراه با توالی‌های مرجع از آرابیدوپسیس، در فهم عملکرد احتمالی این ژن‌ها می‌تواند مفید واقع شود. بر مبنای این توالی‌ها، در هر گروه از این طبقه-بندی، قطعات ژنی همراه با توالی مرجع موجود در آن گروه می‌توانند مسؤول یک عملکرد فیزیولوژیک در گیاه گندم باشند. در گیاه آرابیدوپسیس، *CCA1* در تنظیم سیکل سیرکادین و فیتوکروم نقش دارد (Mott & Wang, 2007). جزء چندین عوامل رونویسی مرتبط با MYB شناسایی شده در گیاهان است که تنها یک تکرار MYB دارد. جایگاه عمل این پروتئین در

آنزیمی شبیه به حالت Ubiquitination اما با تغییراتی انجام می‌شود.) *ICE1* منجر به افزایش MYB15 و کاهش بیان CBF3/DREB1A شود. لازم به ذکر است که واحد تنظیمی (Regulon) CBF/DREB1 باعث افزایش مقاومت به شوری، خشکی و درجه حرارت کم می‌شود. اما بیان کنترل نشده این ژن‌ها باعث ایجاد فنوتیپ کوتوله (قابل برگشت با بکارگیری جیبرلیک اسید) و کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Nelson et al., 2009). اگرچه قبلاً ذکر شد که مرتبط نمودن توالی با عملکرد در ژن‌های خانواده MYB مشکل است، اما از منظر تکاملی و بحث یکنسان بودن اجداد ژنی ژن‌های اورتولوگ، استفاده از راهکار ژنومیکس مقایسه‌ای (Comparative Genomics) و همردیفی توالی این قطعات ژنی با ژن‌های شناخته شده (به‌عنوان مثال در گیاه مدل *Arabidopsis*)، مؤثرترین و علمی‌ترین راه برای ژنوم‌های ناشناخته و یا کمتر شناخته شده‌ای (کاملاً مشخص نشده) چون گندم است و می‌تواند شروعی برای مطالعه بیشتر این ژن‌ها باشد. لازم به ذکر است که راهکار ژنومیکس عملکردی که در واقع، مطالعه رابطه ساختار ژنوم با عملکرد در بین گونه‌ها و سویه‌های مختلف بیولوژیک می‌باشد، راهکاری را ارائه می‌نماید که با اطلاعات حاصل از موجودات مدل می‌توان فرآیندهای عملکردی و تکاملی که به‌روزی ژنوم عمل نموده‌اند را شناسایی نمود (Filipski & Kumar, 2005). به‌هرحال با توجه به ماهیت این ژن‌ها (به‌عنوان عوامل رونویسی و نه یک ژن عملکردی)، اطلاعات بیشتر را می‌توان با مطالعه از طریق همسانسازی این قطعات و سپس انتقال آنها به گیاه گندم یا *Arabidopsis* و بررسی بیان آنها در شرایط محیطی مختلف، به‌دست آورد.

ژنومیکس مقایسه‌ای، راهکاری را در اختیار قرار می‌دهد که می‌توان با استفاده از آن، عملکرد ژن‌ها را در یک زمینه ژنتیکی مجهول تخمین زد. در این ارتباط بررسی بیان ژن و مقایسه آن با ژن‌های همولوگ شناخته شده در گیاهان دیگر، از ملزومات می‌باشد. از بین روش‌های معمول آنالیز بیان ژن، Real Time RT-PCR جزء مهمترین و دقیق‌ترین تکنیک‌های کاربردی محسوب می‌شود. در این مطالعه با استفاده از

آنتوسیانین تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند در حالی که موتان‌های *c1* ذرت، کاهش بیان همه ژن‌های ساختاری را نشان می‌دهند (Martin & Paz-Ares, 1997). در مورد دو قطعه TC251032 و TC251026 نیز می‌توان چنین استنباطی را داشت که چون در TC251032، پرولین بوسیله گلوتامین جایگزین شده است، لذا با توجه به ساختار فضایی پرولین و تأثیری که بر زنجیره پلی‌پپتیدی داشته و باعث پیچش آن می‌شود (Nelson & Cox, 2002)، به احتمال زیاد، جایگاه اثر دامین حاوی این اسید آمینه، یعنی دامین موجود در قطعه ژنی TC251032، بروی DNA تغییر خواهد کرد و این بدین مفهوم است که ژن‌های هدف این دو عامل رونویسی با هم تفاوت دارند، هرچند که شباهت زیادی در ناحیه اتصال به DNA داشته باشند. همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، قطعه ژنی TC236359، تشابه زیادی (e^{-66}) (E Value=۸) با ژن MYB15 در *Arabidopsis* دارد. این قطعه ژنی در پاسخ به تنش سرما و شوری در اندام هوایی افزایش بیان نشان می‌دهد. نتایج آزمایشات در *Arabidopsis* نشان می‌دهد که MYB15 یک تنظیم‌گر منفی ژن‌های CBF/DREB1 (ژن‌های دخیل در استرس سرما) می‌باشد که احتمالاً از طریق برهمکنش با ناحیه پروموتور این ژن‌ها عمل می‌کند. به‌نظر می‌آید این عامل رونویسی که به‌طور منفی از طریق شکل ساموئیل شده *ICE1* (پروتئین Inducer of CBF Expression) یک عامل رونویسی MYB Type bHLH است که بیان ژن-های CBF3/DREB1A را تنظیم می‌کند. این پروتئین در شرایط طبیعی وجود دارد، اما فعالیت آن نیازمند تغییرات پس از ترجمه، به‌عنوان مثال فسفره شدن است که به‌وسیله سرما القاء می‌شود. علاوه بر این، *ICE1* به‌طور منفی به‌وسیله پروتئین Higher Expression of Osmotically Responsive Genes 1 (*HOS1*) نوع پروتئین MYB R2R3 است، تنظیم می‌شود)، تنظیم شده و این تغییر در سایت ساموئیلیشن (Sumoylation) یک تغییر پس از ترجمه است که در فرآیندهای مختلف سلولی همچون انتقال هسته به سیتوپلاسم، تنظیم رونویسی، سرطان‌زایی، پایداری پروتئین، پاسخ به تنش و رشد در حین چرخه سلولی درگیر است. Sumoylation با استفاده از یک آبشار

این پروژه اولین تحقیق در زمینه آنالیز بیان ژن‌های MYB در گیاه گندم می‌باشد که به‌طور همزمان در دو تنش مختلف، گروهی از اعضای این خانواده با استفاده از روش دقیق qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بنابراین این تحقیق، می‌تواند به‌عنوان یک منبع مناسب اولیه برای مطالعه بیشتر بر روی این خانواده ژنی مهم باشد.

سپاسگزاری

از زحمات بی‌دریغ ناصر سولم و شازیا ایرم، دانشجویان دکترای دانشگاه کوئینزلند، در کمک به انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

این راهکار به مطالعه گروهی از ژن‌های MYB پرداخته شد که در نتیجه آن مشخص شد که بیان اغلب ژن‌های MYB مورد مطالعه، تحت تأثیر تنش تغییر می‌کند. اگرچه در قسمت بحث سعی شد با استفاده از راهکار مقایسه‌ای و استفاده از اطلاعات حاصل از ژنوم آرابیدوپسیس و برنج، عملکرد قطعات ژنی مورد مطالعه و دلایل افزایش یا کاهش بیان آنها توضیح داده شود، اما به‌دلیل تنوع عملکرد اعضای این خانواده ژنی و همچنین تنوع ژن‌های تحت کنترل این عوامل رونویسی و به‌دلیل ماهیت متغیر دامین‌های MYB (همان‌طور که شرح داده شد)، نیاز است که مطالعه بیشتری در این خصوص و در زمینه همسانه‌سازی این ژن‌ها و انتقال آنها به گیاه مدل آرابیدوپسیس یا گندم و آنالیز بیان آنها در زمان تنش، صورت گیرد.

REFERENCES

1. Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis *AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15, 63–78.
2. Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X. & Zhu, J. K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem*, 281, 37636-37645.
3. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N. & Mohammed, A. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and application. *Microbiol Molec Biol Rev*, 67(4), 657-685.
4. Aharoni, A., De Vos, C. H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J. N. M. & O'Connell, A. P. (2001). The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.*, 28, 319–332.
5. Bartels, D. & Souer, E. (2004). Molecular responses of higher plants to dehydration. in H. Hirt, K. Shinozaki (Eds.), *Plant Responses to Abiotic Stress*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, (pp. 9–38).
6. Bazzaz, F. A. (2001). Plant biology in the future. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(10), 5441-5445.
7. Bray, E. et al. (2000). Responses to abiotic stresses. In B. Buchanan, et al. (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. pp. 1158-1203.
8. Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses, In W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. (pp. 158–1249).
9. Caldana, C., Scheible, W-R., Mueller-Roeber, B. & Ruzicic, S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*, 3, 7.
10. Charlesworth, D., Charlesworth, B. & McVean, G. A. (2001). Genome sequences and evolutionary biology, a two-way interaction. *Trends Ecol Evol*, 16(5), 235-242.
11. Churin, Y., Adam, E., Kozma-Bognar, L. & Borner, T. (2003) Characterization of two Myb-like transcription factors binding to *CAB* promoters in wheat and barley. *Plant Mol Biol*, 52, 447-462.
12. Filipowski, A. & Kumar, S. (2005). Comparative genomics in eukaryotes. In T. R. Gregory (Eds.). *The Evolution of the Genome*. (pp. 521–583). Elsevier, San Diego.
13. Gao, G., Zhong, Y. F., Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Tang, W., Zheng, W. M., Gu, X. C., Wei, L. P. & Luo, J. C. (2006). DRTF: a database of rice transcription factors. *Bioinformatics*, 22, 1286-1287.
14. Gubler, F., Chandler, P. M., White, R. G., Llewellyn, D. J. & Jacobsen, J. V. (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of *SLN1* and *GAMYB* expression. *Plant Physiol.*, 129, 191–200.
15. Hailing, J. & Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol*, 41, 577–585.
16. Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell*, 18(1), 1–12.

17. Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A. & Shinozaki, K. (2005). RARTF: Database and Tools for Complete Sets of Arabidopsis Transcription Factors. *DNA Res*, 12, 247–256.
18. Ito, M., Araki, S. & Matsunaga, S. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell*, 13, 1891–1905.
19. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, 23, 403–405.
20. Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. & Martin, C. (2000). Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *EMBO J*, 19, 6150–6161.
21. Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150–163.
22. Lee, M. M. & Schiefelbein, J. (2001). Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in Arabidopsis. *Development*, 128, 1539–1546.
23. 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 Sci*, 172, 1005–1016.
24. Mare, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E., Stanca, A. M. & Cattivelli, L. (2004) *HvWRKY38*: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. *Plant Mol Biol*, 55, 399–416.
25. Martin, C. & Paz-Ares, M. Y. B. (1997). Transcription factors in plants. *Trends Genet*, 13, 67–73.
26. 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 J*, 38(6), 982–93.
27. Mott, I. W. & Wang, R. R.-C. (2007). Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Sci*, 173, 327–339.
28. 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. *JARQ*, 39, 221–229.
29. Nelson, J., Saibo, M., Lourenço, T. & M. M. Oliveira. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annal Bot*, 103(4), 609–623.
30. Nelson, D. L. & M. M. Cox. (2002). *Leninger principles of biochemistry*. (3rd ed). Aieej publication, Vol. 1, 2, pp 131-143. (In Farsi).
31. Novillo, F., Alonso, J. M., 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. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 101, 3985–3990.
32. Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. & Saedler, H. (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, 6, 3553–3558.
33. Pfaffl, M. W. (2001) A mathematical model for relative quantification of real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res*, 29 (9), 2002–2007.
34. Price, A. H., Tomos, A. D. & Virk, D. S. (1997). Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.). I: a hydroponic screen. *Theor Appl Genet*, 95, 132–142.
35. Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. & et al. (2000). Arabidopsis transcription factors: Genomewide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290, 2105–2110.
36. Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.*, 130, 1143–1151.
37. Rongmin, C., Zhongfu, N., Xiuling, N., Yuxiang, Q., Guoqing, D. & Qixin, S. (2005). Isolation and characterization of genes encoding Myb transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 169, 1146–1154.
38. Rosenberg, A. A., Fogarty, M. J. & Sissenwine, M. P. (1993). Achieving sustainable use of renewable resources. *Science*, 262, 828–829.
39. 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.
40. Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. & Wisman, E. (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13, 113–123.

41. Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I. A. & Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyls mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93, 1219–1229.
42. Shinozaki, K. & et al. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 6, 410–417.
43. Tardieu, F. (1996). Drought perception by plants Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regul*, 20, 93–104.
44. Thomashow, W. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Mol Biol*, 50, 571–599.
45. Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., 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. *Plant Cell*, 16, 2481–2498.
46. 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 pathways under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 97, 11632–11637.
47. Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., Zeng, L., Wanamaker, S. I., Mandal, J., Xu, Cui, J., X. & Close, T. J. (2005). Comparative Transcriptional Profiling of Two Contrasting Rice Genotypes under Salinity Stress during the Vegetative Growth Stage. *Plant Physiol*, 139, 822–835.
48. Xiong, L. & Zhu, J. K. (2001). Abiotic stress signalling transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol Plant*, 112, 152–166.
49. Xue, G. P., Bower, N. I., McIntyre, C. L., Riding, G. A., Kazan, K. & Shorter, R. (2006). *TaNAC69* from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognises two consensus DNA-binding sequences. *Func Plant Biol*, 33(1), 43–57.
50. Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, 10, 88–94.
51. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., Xing-Wang, D., Zhangliang, C., Hongya, G. & Li-Jia, Q. (2006). The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol*, 60, 107–124.
52. Yu, E. Y., Kim, S. E., Kim, J. H., Ko, J. H., Cho, M. H. & Chung, I. K.. (2000). Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein *RTBP1*. *Biol Chem*, 275, 24208–24214.