

ارزیابی تحمل خشکی در پانزده رقم کلزا (*Brassica napus*) و جداسازی و بررسی ویژگی های ژن عامل رونویسی MYC2 در یک رقم متحمل به خشکی کلزا

هومن راضی و معصومه علی اکبری

به ترتیب استادیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و

مقدمه

کلزا (*Brassica napus*) از مهم ترین گیاهان روغنی است که سطح زیر کشت و تولید آن در جهان در طی دو دهه اخیر به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. با این وجود در بسیاری از مناطق دنیا یکی از مشکلات زراعت کلزا تنش های محیطی و از جمله تنش خشکی است. یکی از رهیافت های مقابله با تنش خشکی، بهبود ژنتیکی گیاهان با هدف افزایش تحمل خشکی است. شناسایی ژنوتیپ های متحمل و حساس به خشکی و بررسی ژن های تنظیم کننده ی کلیدی موثر در تحمل خشکی اهمیت فوق العاده ای در بهبود ژنتیکی گیاهان دارد.

در گیاهان، میزان بیان بسیاری از ژنها، از طریق اتصال پروتئینهایی به نام عوامل رونویسی، به مکانهایی با توالی خاص که در نواحی پروموتوری آن ژنها قرار دارد، تنظیم می شود. بررسی گسترده ژنوم در سطح رونویسی، صدها ژن رمز کننده عوامل رونویسی که توسط تنشهای محیطی از جمله تنش شوری و خشکی، القا یا سرکوب می شوند را شناسایی کرده است. اکنون مشخص شده که بسیاری از این عوامل، برای مهندسی تحمل خشکی در گیاهان مدل مؤثر می باشند و افزایش بیان برخی عوامل رونویسی پاسخ دهنده به خشکی منجر به بیان ژنهای پایین دست و افزایش تحمل خشکی می شود. از مهم ترین آنها می توان به عوامل رونویسی خانواده MYC اشاره کرد. MYC2 یک عامل رونویسی کلیدی در مسیر وابسته به هورمون اسید آبسزیک در گیاه آرابیدوپسیس است که بیان آن در شرایط تنش رطوبتی و شوری افزایش می یابد و باعث افزایش تحمل به این تنش ها می شود. این پژوهش با هدف دستیابی به اهداف زیر انجام شد.

- بررسی صفات مورفولوژیک، عملکرد دانه و اجزای عملکرد پانزده رقم کلزا در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی
- شناسایی و معرفی ارقام متحمل و حساس به خشکی کلزا از میان ارقام مورد مطالعه
- جداسازی، همسانه سازی و توالی یابی ژن MYC2 در کلزا (*BnMYC2*).
- بررسی تغییرات بیان ژن *BnMYC2* در پاسخ به تنش خشکی.

مواد و روش‌ها

شناسایی ارقام حساس و متحمل به خشکی

آزمایش در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز واقع در فاصله ۱۶ کیلومتری شمال شرقی شیراز (۲۹° ۵۰' شمالی و ۵۲° ۴۶' شرقی، ارتفاع از سطح دریا ۱۸۱۰ متر) انجام شد. دو آزمایش جداگانه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. در این آزمایش‌ها از پانزده رقم کلزا (NK, RNX3621, RGS003, Modena, SLM046, Karun, Opera, Champlain, NK Karibik, NK Aviator, Octans, Licord, Okapi, NK Karibik, NK Aviator, Octans) استفاده شد. تفاوت دو آزمایش به لحاظ شرایط آبیاری بود. در یک آزمایش آبیاری مطلوب و پس از تخلیه تقریباً ۴۰ درصد رطوبت قابل استفاده خاک، آبیاری انجام شد. در آزمایش دیگر، آبیاری محدود بود و ارقام تحت تنش رطوبتی قرار گرفتند. در این شرایط آبیاری زمانی انجام می‌گرفت که تقریباً ۷۰ درصد رطوبت قابل استفاده خاک تخلیه شده باشد. شرایط متفاوت آبیاری، پس از سه بار آبیاری مشترک، بر دو آزمایش اعمال گردید. رطوبت خاک به روش وزنی قبل از آبیاری با نمونه‌گیری از عمق‌های ۳۰-۰ سانتی متر و ۶۰-۳۰ سانتی متر خاک مزرعه تعیین شد. هر واحد آزمایشی دارای ۶ ردیف ۵ متری بود. فاصله ردیف‌ها از یکدیگر ۳۰ سانتی متر و فاصله گیاهان روی یک ردیف ۱۵ سانتی متر در نظر گرفته شد و هر کرت به وسیله یک ردیف کشت نشده از کرت بعدی جدا گردید. تاریخ کاشت برای هر دو آزمایش ۲۰ مهر ۱۳۸۷ بود.

صفات طول ساقه، تعدادشاخه فرعی در بوته، تعداد خورجین در بوته، تعداد دانه در خورجین، طول خورجین، وزن هزار دانه و تعداد روز تا گلدهی در هر کرت آزمایشی اندازه‌گیری شدند. پس از محاسبه عملکرد دانه در شرایط آبیاری مطلوب و آبیاری محدود، شاخص‌های کمی تحمل به خشکی شامل شاخص تحمل، شاخص متوسط بهره‌وری، شاخص حساسیت به تنش، شاخص میانگین هندسی بهره‌وری و شاخص تحمل به تنش و همچنین ضرایب همبستگی بین آنها محاسبه شدند. به منظور تعیین مناسب‌ترین شاخص و انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی و نمودار بای پلات استفاده شد.

در هر آزمایش تجزیه واریانس بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی برای همه صفات اندازه‌گیری شده انجام پذیرفت. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. جهت تعیین اثر آبیاری بر صفات اندازه‌گیری شده پس از انجام آزمون بارتلت و اطمینان از یکنواختی واریانس‌های خطای دو آزمایش، تجزیه مرکب بین دو آزمایش آبیاری مطلوب و تنش خشکی انجام شد. ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی در هر آزمایش جداگانه محاسبه گردید.

جداسازی یک قطعه از ژن MYC2 در کلزا (*BnMYC2*) و بررسی تغییرات بیان آن در پاسخ به

تنش خشکی

با توجه شباهت زیاد نواحی اگزونی ژن های آرآبیدوپسیس و کلزا با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژن MYC2 در آرآبیدوپسیس (*AtMYC2*) ارتولوگ آن *BnMYC2* در کلزا جداسازی شد. آغازگرهای طراحی شده در فاصله ۹۳۹ جفت بازی از یکدیگر در توالی ژن *AtMYC2* قرار داشتند. با استفاده از نمونه برگ رقم متحمل به خشکی، استخراج RNA، ساخت cDNA، واکنش زنجیره ای پلی مرارز، همسانه سازی قطعه تکثیر شده و توالی یابی آن انجام شد.

به منظور بررسی بیان ژن *BnMYC2*، از روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز نیمه کمی استفاده شد. تنش خشکی در مرحله ی سه برگی بوته های دو رقم حساس (زرغام) و متحمل (Karun) اعمال شد. نمونه گیری از بافت برگ در زمان های ۲۰ و ۴۰ دقیقه، ۱، ۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از شروع تنش (چهار روز بعد از قطع آبیاری) انجام شد. استخراج RNA از نمونه های هر دو رقم انجام شد. ساخت cDNA با میزان مساوی از RNA برای همه نمونه ها انجام شد. واکنش زنجیره ای پلی مرارز با استفاده از cDNA های ساخته شده و یک جفت پرایمر اختصاصی انجام و سپس قطعات تکثیر شده حاصل با الکتروفورز بر روی ژل آگارز با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

شناسایی ارقام حساس و متحمل به خشکی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس هر یک از آزمایش ها نشان داد که در هر دو شرایط مطلوب و تنش رطوبتی تفاوت معنی داری میان ارقام مورد بررسی برای همه صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی برای صفات مورد مطالعه است. تنش رطوبتی موجب کاهش معنی دار صفات ارتفاع گیاه، تعداد خورجین در بوته، تعداد دانه در خورجین، طول خورجین، وزن هزار دانه، تعداد روز تا گلدهی، عملکرد دانه و شاخص برداشت شد.

بیشترین تغییر مربوط به صفت عملکرد دانه (حدود ۲۶٪ کاهش) بود. کمترین تغییر نیز در صفت تعداد روز تا رسیدن (حدود ۰/۴۵ درصد کاهش) رخ داد. از مقایسه میانگین عملکرد دانه ارقام مختلف مشخص شد که در شرایط آبیاری مطلوب بیشترین عملکرد دانه با اختلاف معنی دار نسبت به سایر ارقام متعلق به رقم Karun با ۲۸۲۱/۵۰ کیلوگرم در هکتار بود. در شرایط تنش خشکی نیز مانند شرایط مطلوب بیشترین عملکرد دانه متعلق به رقم Karun با ۲۶۰۲/۵۰ کیلوگرم در هکتار بود. همچنین رقم Karun کمترین میزان افت عملکرد در شرایط تنش (۲۱۹ کیلوگرم در هکتار: ۸/۰۷ درصد) را به خود اختصاص داد. رقم زرغام بیشترین افت عملکرد در شرایط تنش (۸۹۲ کیلوگرم در هکتار: ۴۷/۱۳ درصد) را

نشان داد. در هر دو آزمایش آبیاری مطلوب و تنش کمبود آب، رقم Karun با اختلاف معنی داری نسبت به سایر ارقام دارای بیشترین میزان شاخص برداشت بود.

در شرایط آبیاری مطلوب همبستگی مثبت و معنی داری بین عملکرد دانه و تعداد خورجین در بوته، وزن هزار دانه و شاخص برداشت مشاهده شد. در شرایط تنش رطوبتی عملکرد دانه همبستگی مثبت و معنی داری با شاخص برداشت، تعداد خورجین در بوته و تعداد دانه در خورجین نشان داد. شاخص‌های میانگین هندسی بهره وری (GMP)، میانگین بهره‌وری (MP) و شاخص تحمل به تنش (STI) به عنوان مناسب‌ترین شاخص‌ها جهت گزینش ژنوتیپ‌های دارای عملکرد مطلوب در شرایط آبیاری نرمال و تنش شناخته شدند.

از نظر شاخص‌های تحمل خشکی بیشترین مقادیر شاخص‌های تحمل به تنش (STI)، میانگین بهره وری (MP) و میانگین هندسی بهره وری (GMP) و کمترین میزان شاخص حساسیت به تنش (SSI) متعلق به رقم Karun بود. همچنین بیشترین مقادیر شاخص‌های تحمل (TOL) و حساسیت به تنش (SSI) متعلق به ارقام زرفام و طلایه بود. بنابراین در بین ارقام مورد بررسی، رقم Karun ($Y_p=2821/50$ و $Y_s=2602/50$ کیلوگرم در هکتار) به عنوان متحمل‌ترین رقم به خشکی و رقم زرفام ($Y_p=2338/20$ و $Y_s=1446/50$ کیلوگرم در هکتار) به عنوان حساس‌ترین رقم به خشکی معرفی می‌شوند.

جداسازی ژن MYC2 از کلزا (*BnMYC2*)

پس از استخراج RNA از برگ گیاه از روی آن cDNA ساخته شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از توالی ژن MYC2 در آرکیدوپسیس و با انجام واکنش PCR وجود ژن مورد نظر در گیاه کلزا مورد ارزیابی قرار گرفت. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که قطعه جداسازی شده از *BnMYC2* یک قطعه به طول حدود ۱۰۰۰ جفت باز می‌باشد که با توجه به فاصله آغازگرها در ژن *AtMYC2* (۹۳۹ جفت باز) قابل انتظار بود.

ترادف نوکلئوتیدی مورد نظر در شکل ۱ آورده شده است. طول این قطعه ۹۶۰ جفت باز بود. این توالی با شماره دسترسی HF674727 در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) به ثبت رسید. پس از تعیین ترادف قطعه‌ی جداسازی شده، جستجوی BLASTn در سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) نشان داد که ترادف مورد نظر درصد همانندی بسیار بالایی (۹۹-۱۰۰ درصد) با توالی‌های cds مربوط به MYC در *Brassica oleracea* و MYC2 در *Arabidopsis thaliana* دارد که نشان دهنده صحت جداسازی و همانند سازی است.

بررسی تغییرات بیان ژن *BnMYC2* در پاسخ به تنش خشکی با آزمون PCR نیمه کمی

بررسی تغییرات بیان ژن *BnMYC2* در رقم متحمل Karun و رقم حساس زرفام کلزا انجام شد. فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۳۶ جفت باز انجام گرفت. به منظور استاندارد سازی واکنش PCR نیمه کمی از ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

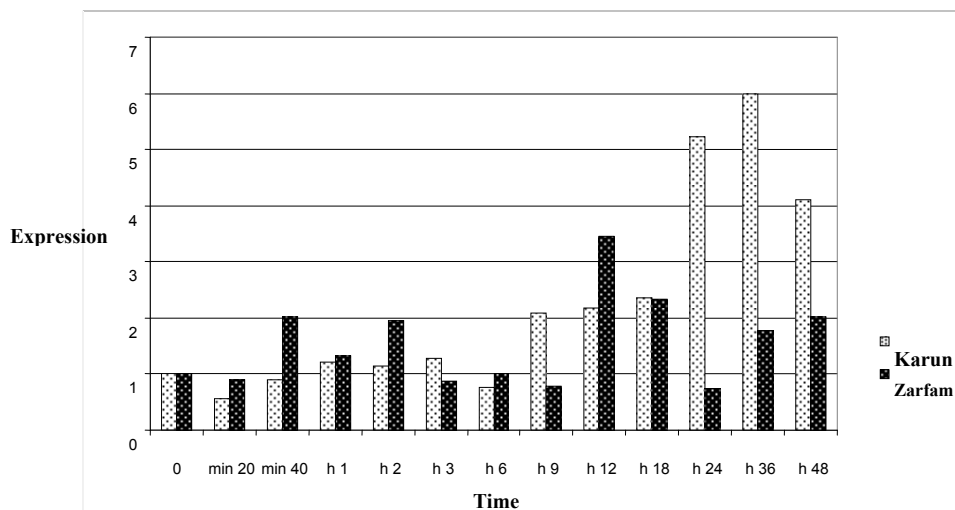
بعد از واکنش PCR، الکتروفورز ژل آگارز در شرایط یکسان برای نمونه‌های کلزای Karun و زرفام که برای مدت زمان ۲۰ دقیقه، ۴۰ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۶ ساعت، ۹ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۳۶ ساعت و ۴۸ ساعت تحت شرایط تیمار تنش خشکی قرار داشتند و همچنین یک نمونه بدون تنش رطوبتی از هر رقم، انجام شد. نتایج نشان داد که بالاترین سطح بیان ژن *BnMYC2* در رقم متحمل Karun ۳۶ ساعت بعد از اعمال تنش و در رقم حساس زرفام ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش رخ داده است (شکل ۲). میزان بیان ژن در رقم Karun در ۳۶ ساعت بعد از اعمال تنش نزدیک به شش

HF674727: *Brassica napus* partial mRNA for transcription factor *MYC2* (*myc2* gene), cultivar Karun

```
TTGGTTTCGATGACGCAGAGCTTCGCTTGCGGTTCTGGATTGGCGGGTAAAGCGTTATCGACAGGTAACGTAG
TTTGGGTTTATGGGTCGGATCAGTTATCCGGATCGGGTTGTGAGCGGGCGAAGCAAGGAGGAGTGTGTTGGGAT
GCAAACCATCGCGTGTATCCCTTCGGCGAACGGAGTTGTTGAACTCGGGTCAACGGAGCAGATCCCAACCAAGT
TCGGATCTTATGAGCAAGGTGCGAGTACTTTTCAATTTTCGACGTTGGTGCTGGAGATTTACCGGGTCTTAACT
GGAACCTTGACCCGACTCAAGGCGAAAACGATCCGTCTATATGGATTAATGACCCGATTGGAGCACCCGAGCC
GGGTAACGGAGCTCCGAGCTCTTTCTCCAAGCTTTTTGCCAAGTCGATCCAGTTTGAAAATGGTGGTAGTTCA
AGCACCATCATCGGAAACCCGAATCCGGATTCCGCTCCAAGCCCGGTTTCATTCCCAGACCCAGAATCCAAAAT
TCAGCAACAATTTCTCCCCCGAATTAATTTCTCCACGTCGAGCACCACCTTGGTGAAACCCAGACCCCGAGA
GATATTGAGCTTCGGCAATGAGGATAAACGGAGCTCCATGAACCCGGATCCGAGTTCCAATTCGGGTCAGACT
CAGTTAGAGAATAACACAAAGAAGTTCATAGATGACAAGGTTCTATCTTTTCGGAACCCGGCGGAGGAGAATCCG
ATCACTCCGACCTAGAAGCCTTCATCGTGAAAGAAATCCCGGAGAAACGTCCCAAGAAACGCGGAAGAAAACC
GGCAACGGTAGAGAAGAGCCGCTTAACCACGTCGAAGCGGAGAGACAGAGACGGGAGAAACTAAACCAGCGA
TTCTACGCGTTACGTGCGGTTGTACCAAACGTCTCCAAAATGGACAAAGCTTCTTGCTCGGAGACGCAATCG
CTTACATCAAC
```

شکل ۱- ترادف ۹۶۰ نوکلئوتیدی مربوط به قطعه‌ی جداسازی شده‌ی ژن *BnMYC2* از رقم Karun

برابر میزان بیان در حالت عدم وجود تنش بود. این در حالی است که میزان بیان در رقم زرفام در شرایط تنش نسبت به شرایط مطلوب تنها حدود سه و نیم برابر افزایش یافت. شاید بتوان افزایش بیشتر بیان این ژن در شرایط تنش در رقم متحمل را نشانه‌ای از دخالت آن در ایجاد تحمل تنش خشکی قلمداد کرد.



شکل ۲- نمودار سطح بیان ژن BnMYC2 در دو رقم Karun و زرفام. محور افقی زمان‌های مختلف از صفر تا ۴۸ ساعت پس از تنش را نشان می‌دهد. محور عمودی مقادیر استاندارد شده‌ی میزان بیان ژن که از کمی‌سازی تصویر ژل واکنش PCR نیمه کمی با برنامه Total Lab به دست آمده‌اند.

کلمات کلیدی: تنش خشکی، MYC2، کلزا