



"مقاله پژوهشی"

بررسی الگوی بیان ژن‌های PMP3 و Dehydrin در لاین‌های AS5305 و 9CSA3 آفتابگردان روغنی تحت تنش شوری

ناهید حبیبی^۱، رضا درویش‌زاده^۲ و بابک عبدالهیی مندولکانی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه و استاد پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه،
(نویسنده مسوول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

۴- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۱

صفحه: ۲۲۵ تا ۲۳۷

چکیده

در این پژوهش تحمل لاین‌های آفتابگردان روغنی به تنش شوری در سطح مولکولی با بررسی بیان نسبی ژن‌های PMP3 و Dehydrin در سطوح مختلف شوری ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ ds/m (معادل ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۱۰ و ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl) در دو لاین AS5305 (لاین متحمل) و 9CSA3 (لاین حساس) آفتابگردان با استفاده از تکنولوژی real time PCR مطالعه شده است. نمونه برداری از برگ‌های آفتابگردان در مرحله ۸ برگی در پنج زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش انجام گرفت. نتایج تحقیق نشان داد در مراحل اولیه اعمال تنش شوری، بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در شوری کمتر از آن برای لاین 9CSA3 مشاهده شد (۸ در مقابل ۱۱ ds/m). در مراحل پیشرفته‌تر از اعمال تنش شوری (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) افزایش بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در شوری‌های پایین‌تر (۲ و ۵ ds/m) و در لاین 9CSA3 در شوری‌های نسبتاً شدیدتر (۵ و ۸ ds/m) مشاهده شد. در رابطه با ژن Dehydrin، افزایش بیان در مراحل اولیه تنش شوری فقط در لاین 9CSA3 مشاهده شد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری در شوری‌های شدیدتر (۱۴ ds/m) افزایش بیان در لاین AS5305 برابر بیشتر از لاین 9CSA3 بود. در مقابل در شوری‌های پایین‌تر ۵ و ۸ ds/m افزایش بیان ژن Dehydrin در لاین 9CSA3 در مقایسه با ژنوتیپ AS5305، بیشتر بود. بنابراین احتمالاً غلظت شدیدتر تنش شوری در مراحل پیشرفته و پیشرفته‌تر، بیان ژن Dehydrin را در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 القاء می‌نمایند. جمع‌بندی نتایج نشان می‌دهد الگوی بیان ژن‌ها در ۲ لاین مورد مطالعه متفاوت می‌باشد که ناشی از واکنش متفاوت آنها به تنش شوری است. این مسئله نشان‌دهنده درگیر بودن این ژن‌ها در تحمل به تنش شوری می‌باشد که در جهت اصلاح و توسعه گیاهان بالقوه متحمل می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بیان ژن، تنش شوری، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

مقدمه

غیراشباع فاقد کلسترول می‌باشد و بدین جهت از مرغوبیت بالایی برخوردار است. کنجاله حاصله بعد از روغن‌گیری دارای ۳۵ درصد پروتئین و ۱۸-۲۵ درصد کربوهیدرات است که به‌عنوان مکمل غذایی در برنامه‌های تغذیه دام و طیور استفاده می‌شود (۲۴).

بر پایه آمار موجود تنش شوری پس از خشکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی در سطح جهان بوده و بالغ بر ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های جهان تحت تأثیر تنش شوری قرار دارند (۲۱، ۲۳). شوری بر تمام فرایندهای اصلی گیاه مانند رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین، متابولیسم لیپید و انرژی تأثیر می‌گذارد و در نتیجه باعث کاهش عملکرد می‌شود. پاسخ به تنش شوری در گیاهان تحت تأثیر شدت تنش، نوع یون‌ها، عوامل مختلف محیطی و مرحله‌ی رشد و نمو گیاه است. گیاه تحت تنش شوری برای افزایش جذب آب، ناگزیر به جذب یون‌های سمی می‌گردد، این امر باعث انباشتگی یون‌های سدیم و کلر در اپوپلاست و به‌هم‌خوردن توازن اسمزی و بار الکتریکی در

آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* L. متعلق به تیره‌ی Asteraceae، یک گونه دیپلوئید با $2n=2x=34$ کروموزوم می‌باشد. بر اساس نتایج تجزیه DNA کلروپلاست آفتابگردان، زمان پیدایش این جنس بین ۴/۷۵-۲۲/۷ میلیون سال پیش می‌باشد و گونه‌های درون این جنس بین ۱/۷-۸/۲ میلیون سال پیش اشتقاق یافته‌اند (۳۲). به احتمال زیاد جنس *Helianthus* از مکزیک نشأت گرفته اما مهاجرت بعدی آن به مناطق دیگر از طریق آمریکای شمالی صورت گرفته است (۳۶). آفتابگردان به دلیل زیبایی گل (مصرف زینتی)، مصرف آجیلی و تولید روغن کشت می‌شود (۱۵). اولین نشانه استفاده از آفتابگردان به‌عنوان مواد غذایی مربوط به حق ثبت اختراع برای روغن‌گیری از دانه‌های آفتابگردان است که در سال ۱۷۱۶ به کشور انگلستان اعطا شد که از آن زمان آفتابگردان به‌عنوان منبع اصلی روغن خوراکی استفاده می‌شود (۱۲). روغن آفتابگردان به دلیل داشتن درصد بالایی از اسیدهای چرب

ژن در ساعات مختلف در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد. قاسمی عمران و همکاران (۱۱) بیان ژن SOS1 را در گیاه هالوفیت آلوروپوس تحت تیمار شوری ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش بررسی نمودند (۱۱). بیان ژن SOS1 در بافت برگ پس از ۶ ساعت افزایش یافت. در بافت گره و میانگره سطوح نسخه‌برداری ژن SOS1 در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به حداکثر مقدار خود رسید. ۳ و ۸ روز پس از اعمال تنش مقدار آن به تدریج کاهش یافت تا در نهایت ۱۷ روز پس از اعمال تنش نزدیک به بیان آن در گیاهان شاهد رسید. میزان بیان این ژن در بافت ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و در نهایت در سه روز بعد از اعمال تنش به حداکثر مقدار خود رسید و این میزان تا هشت روز بعد از تنش ادامه یافت پس از ۱۷ روز همچنان مقدار این ژن دو برابر گیاهان شاهد بود. شرقی و همکاران (۳۴) در مطالعه‌ای cDNA ژن حسگر کلسیم SOS3 از گیاه آرآیدوپسیس تالیانا را جداسازی و در ناقل Pbin61 و پایین‌دست پروموتور بیانی CaMV35S کلون نمودند (۳۴). پس از انتقال ناقل حاصل به آگروباکتریوم، گیاهان آرآیدوپسیس با استفاده از این سلول‌ها و به روش فلورال دیپ تراریخت شدند. بذره‌های گیاهان تراریخت شده جمع‌آوری و در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامپسین انتخاب شدند. از گیاهان انتخاب شده DNA استخراج شده و وجود ژن SOS3 انتقال یافته در ژنوم گیاهان تراریخت به وسیله PCR تایید شد. آزمون میزان تحمل به شوری گیاهان نسل دوم که در محیط‌هایی با درجات شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید کشت شده بود نشان داد که گیاهان تراریخت حاصل تحمل بیشتری نسبت به گیاهان وحشی در شرایط شوری دارند. در مطالعه فرزانه پهلگردی و همکاران (۹) برای بررسی بیان ژن P5CS تحت تنش شوری، رویان‌های رقم زرد زیتون بر روی محیط MS با غلظت ۱/۲ کشت شدند (۹). پس از ۴ هفته نیمی از گیاهچه‌ها به محیط MS با ۲۰۰ میلی‌مولار شوری انتقال یافتند و نیمی دیگر به‌عنوان شاهد در محیط MS بدون نمک باقی ماندند. پس از استخراج پروتئین از نمونه گیاهان شاهد و تحت تنش شوری، نتایج نشان داد که سطح بیان پرولین در گیاه زیتون تحت تنش، به مراتب از گیاه زیتون شاهد در شرایط غیرتنش بالاتر می‌باشد که این نتایج دلالت بر نقش مهم و کلیدی پرولین در رابطه با تحمل به تنش دارد. در پژوهشی طهماسبی و همکاران (۳۵) تغییرات در الگوی بیان ژن‌ها تحت تنش شوری و اکسیداتیو را در گیاه آرآیدوپسیس مورد بررسی قرار دادند (۳۵). جهت تعیین تفاوت معنی‌دار در بیان ژن‌ها بین شرایط کنترل و تنش از روش t-test استفاده شد. نتایج نشان داد که به ترتیب بیان ۱۷۲۱ و ۱۰۸۴ ژن پس از تنش شوری و اکسیداتیو در برگ افزایش یافته است. همچنین بیان ۸۳ ژن در هر دو تنش شوری و اکسیداتیو افزایش یافته بود که نشان‌دهنده ارتباط قوی بین پاسخ‌های تنش شوری و اکسیداتیو می‌باشد.

طرفین غشاها می‌شود. به هم خوردن توازن یونی و عدم توانایی گیاه در جذب یون‌های ضروری و انباشته شدن یون‌های مضر و ایجاد سمیت یونی باعث کاهش رشد و نمو گیاه می‌شود (۱۸، ۱۹). گیاه برای مقابله با تنش مکانیسم‌های مختلفی پیش رو می‌گیرد یکی از این مکانیسم‌ها افزایش بیان ژن‌های دخیل در تحمل می‌باشد (۳۸، ۳۹). بیان ژن فرآیندی است که توسط آن اطلاعات ذخیره شده در DNA، ساختار RNA و پروتئین‌ها را تعیین می‌کند. تجزیه و تحلیل بیان ژن جزء جدانشدنی مطالعات ژنومیک کاربردی در همه موجودات زنده است که شناخت بهتر فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی را فراهم می‌سازد (۱۶).

در گیاهان گروهی از پروتئین‌های آب‌دوست^۱ با عنوان LEA^۲ در آخرین مرحله رسیدگی دانه یعنی زمانی که جنین بیشترین تحمل به پسابدگی^۳ را دارد تجمع می‌یابد (۳، ۲۷). پروتئین‌های LEA بر اساس توالی در چند گروه طبقه‌بندی می‌شوند که دهیدرین‌ها در گروه II یا خانواده D-11 در این طبقه‌بندی قرار می‌گیرند (۳۷). این پروتئین‌ها تحت تأثیر تنش کم‌آبی، شوری و... در اندام‌های رویشی نیز انباشته می‌شوند که بیانگر نقش حفاظتی این گروه از پروتئین‌ها در شرایط تنش اسمزی است (۳۷). دهیدرین‌ها به‌عنوان چپرون‌ها در پایداری و زیکول‌ها، پروتئین‌ها و ساختارهای غشایی، تنظیم اسمزی و سم‌زدایی در گیاهان تحت تنش نقش ایفا می‌کنند، اما عملکرد دقیق آنها تاکنون مشخص نشده است (۳۷). تنوع خانواده ژنی دهیدرین‌ها و محل استقرار آنها بر روی کروموزوم‌های متفاوت در گونه‌های مختلف گیاهی بررسی و تاکنون چندین ژن دهیدرین مشخص شده است (۲۹).

غشاء پلاسمایی نقش مهمی در حفظ هومئوستازی سلول و انتقال سیگنال دارد. قرار گرفتن در معرض تنش‌های غیرزنده باعث افزایش نفوذپذیری غشاها و در نتیجه از بین رفتن الکترولیت‌های درون سلول می‌شود (۱۷). بنابراین، محافظت از غشاء پلاسمایی در هنگام قرارگرفتن در معرض تنش‌های غیرزنده مهم است. پروتئولپید غشاء پلاسمایی (PMP3) یک گروه از پلی‌پپتیدهای هیدروفوبیک (آبگریز) کوچک نقش مهمی در حفظ هومئوستازی یونی طی مواجهه با تنش شوری، خشکسالی، سرما و آسبیزیک‌اسید دارد (۱۰).

پژوهش‌های زیادی در رابطه با بررسی بیان ژن‌های دخیل در تنش صورت گرفته است. در مطالعه‌ای سعیدپور و همکاران (۳۱) بیان ژن NHX در گیاه گلرنگ تحت تنش شوری با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد (۳۱). بدین منظور گیاهچه‌های ۱۴ روزه رقم نیمه‌مقاوم PBR-321 گلرنگ با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید تیمار شدند. نمونه‌برداری از گیاهان شاهد و تحت تنش شوری ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش صورت گرفت. نتایج حاصل از آنالیز مولکولی، نشان داد میزان بیان ژن NHX در غلظت‌های بررسی شده در ساعات مختلف نمونه‌برداری در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است. حداکثر بیان

میکرولیتر بافر RNX-plus به تیوپ حاوی پودر نمونه اضافه شد و بعد از ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس کردن، یک میکرولیتر مرکاپتواتانول به تیوپ حاوی پودر و بافر RNX-plus اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ قرار داده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Model: Velocity 14R Benchtop Refrigerated Centrifuge, No. 6727037, Name: Tabletop Centrifuge, Voltage: 220v 50Hz, Power: 800w, French) گردید. بعد از جدا کردن فاز رویی، هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با الکل ۷۵٪ شستشو و ۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به رسوب اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتوفوتومتری نانودراپ^۱ و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد (۱۶). در اسپکتوفوتومتری نانودراپ میزان جذب نور با طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ بررسی گردید و نسبت‌های A260/A280 و A260/A230 جهت بررسی آلودگی‌های پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی و پروتئینی محاسبه شد. برای نمونه‌های RNA، نسبت A260/A230 باید بالاتر از ۲ و کمتر از ۲/۴ باشد. نسبت A260/A230 پایین‌تر نشان‌دهنده آلودگی به پلی‌فنل‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد. همچنین نسبت جذب A260/A280 می‌بایست در محدوده ۲ باشد. نسبت A260/A280 پایین‌تر از ۱/۸ به طور کلی نشان‌دهنده آلودگی به پروتئین‌ها می‌باشد. قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase برای حذف DNA ژنومی طبق دستورالعمل موجود در کیت RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis (Fermentas #K1621) انجام گرفت. برای ساخت cDNA از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. برای این منظور ابتدا در لوله استریل ۰/۲ میلی‌لیتری ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT₁₈) به محلول اضافه گردید و بعد از انجام یک سانتریفیوژ پالسی، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

گیاه آفتابگردان در گروه گیاهان نسبتاً متحمل به شوری قرار دارد (۱۲). عملکرد آفتابگردان در شوری حدود ۵ دسی‌زیمنس بر متر آسیبی نمی‌بیند، ولی شوری‌های بالاتر موجب کاهش عملکرد آن می‌شود (۴۸). در این پژوهش بیان ژن‌های Dehydrin و PMP3 در آفتابگردان روغنی تحت تنش شوری با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی^۱ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

دو لاین خالص آفتابگردان روغنی (AS5305 و 9CSA3) با واکنش متفاوت به شوری از میان ۱۰۰ لاین انتخاب شدند (۱). مشخصات فیزیولوژیک و موفولوژیک ژنوتیپ‌ها در شرایط نرمال و تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر در جدول ۱ آمده است. ژنوتیپ‌ها در گلدان‌های پلاستیکی (با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر) در ترکیب بستر دو نسبت خاک معمولی و یک نسبت ماسه در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در ۳ تکرار کشت شدند. گیاهان در گلخانه با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی پرورش یافتند. در مرحله ۸ برگی ۵ سطح شوری از منبع NaCl شامل ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ ds/m (معادل ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۱۰ و ۱۴۰ میلی‌مولار بر لیتر NaCl) جداگانه به گیاهان اعمال شد. برای جلوگیری از وارد شدن شوک شدید یک‌باره به گیاه، اعمال تنش شوری در دو مرحله انجام گرفت. به این ترتیب که ۲۵۰ سی‌سی از محلول نمک، صبح و ۲۵۰ سی‌سی نیز بعد از ظهر همان روز اعمال گردید. کنترل مقدار شوری خاک گلدان‌ها به وسیله دستگاه EC سنج انجام می‌گرفت و در مواقع لازم تصحیح شوری با احتساب تیمار شوری مورد نظر انجام می‌شد. از آنجایی که تبخیر آب از خاک گلدان‌ها باعث انتقال نمک‌ها به سطح خاک می‌شود برای جلوگیری از این کار سعی می‌شد گلدان‌ها همیشه مرطوب نگهداری شوند (۲۰، ۱). نمونه‌برداری در پنج زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری انجام گرفت. بعد از نمونه‌برداری، برگ‌ها در ازت مایع به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plusTM شرکت سیناکلون (تهران، ایران)، مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام گرفت. به طور خلاصه، ابتدا نمونه گیاهی به اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در ازت مایع خرد و هموژنیزه شد. سپس ۶۰۰

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیک و مورفولوژیک دو لاین AS5305 و 9CSA3 آفتابگردان روغنی تحت شرایط نرمال و تنش شوری

Table 1. Morphological and physiological characteristics of AS5305 and 9CSA3 oily sunflower lines under normal and salt stress conditions

نام لاین	منشاء لاین	تنش شوری (دسی زیمنس بر متر)	قطر ساقه		ارتفاع بوته		طول برگ		عرض برگ		عملکرد دانه		RWC		K ⁺ /Na ⁺ دمیرگ	
			میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D	میانگین ± انحراف معیار	D
AS5305	فرانسه (ASGROW)	۲	۱۷/۰۸ ± ۱/۵۵	۷/۸۵	۱۲/۶۰ ± ۲/۹۴	۱۱/۷۴	۱۷/۰۰ ± ۲/۱۷	۲۱/۷۶	۱۴/۷۰ ± ۲/۲۳	۱۹/۷۳	۴۰/۰۷ ± ۴/۵۶	۲/۹۴	۶۶/۳۰ ± ۵/۰۱	-۷/۳۶	۴/۴۸ ± ۰/۴۵	۴۲/۸۶
		۸	۱۵/۷۴ ± ۰/۸۱	۱۱۳/۵۰ ± ۱۰/۶۰	۱۳/۳۰ ± ۱/۹۸	۱۱/۸۰ ± ۲/۰۵	۳/۸۹ ± ۴/۷۳	۷۱/۱۸ ± ۲/۷۳	۲/۵۶ ± ۰/۰۹							
9CSA3	فرانسه (Caussade semences)	۲	۱۰/۵۲ ± ۰/۴۸	۲/۰۹	۹۲/۰۰ ± ۹/۴۰	۲۵/۸۷	۱۱/۴۰ ± ۰/۶۸	۰/۰۰	۹/۲۰ ± ۰/۴۹	-۱۱/۹۶	۴۵/۸۵	۲۳/۲۷ ± ۲/۹۴	۶۶/۱۲ ± ۷/۰۵	-۷/۲۲	۲/۸۶ ± ۰/۰۸	۶۵/۷۳
		۸	۱۰/۳۰ ± ۰/۵۶	۶۸/۲۰ ± ۶/۸۶	۱۱/۴۰ ± ۱/۲۱	۱۰/۳۰ ± ۱/۲۷	۱۲/۶۰ ± ۰/۸۵	۷۰/۹۰ ± ۵/۱۶	۰/۹۸ ± ۰/۰۴							
		LSD	۲/۸۴۳۹	۲۱/۶۸۱۵	۴/۸۷۱۲	۴/۹۸۵۲	۱۰/۵۴۹۵	۱۵/۶۴۲	۰/۹۰۵۸							

RWC: Relative water content; Se: Standard error; LSD: Least significant difference

$$D = \frac{\bar{X}_{Normal} - \bar{X}_{Stress}}{\bar{X}_{Normal}} \times 100$$

جدول ۲- آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی

Table 2. Primers of oligonucleotide used in real time RT-PCR

نام توالی	توالی آغازگر (5' → 3')	شماره دسترسی به توالی	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)
PMP3	F: TCCGTTTCCTTCCACACACAT R: AGAACTCCATGCCAATAGCGT	XM_022153955.1	۵۹	۱۸۴
Dehydrin (dhn1)	F: TGAAGGAATTGTGTGAGGCGTAT R: GGAGCCATGCAAACCTTTATTCTT	X92647	۵۸	۷۳
<i>Helianthus annuus</i> L. Actin	F: TCAATGTTCCCGCATGTAT R: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	AF282624	۵۷	۶۰

PMP3: Plasma membrane proteolipid 3; Bp: base pair; °C: The degree Celsius

Real time PCR

توالی آغازگرها برای بررسی بیان ژن Dehydrin و همچنین توالی آغازگرهای ژن کنترل داخلی اکتین از مقاله پورمحمد کیانی و همکاران (۲۷) گرفته شدند (جدول ۲). در رابطه با ژن PMP3، در ابتدا توالی ناحیه کدکننده ژن PMP3 از بانک اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ذخیره‌سازی شد و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 (<https://www.oligo.net/>) طراحی گردید (جدول ۲). برای بررسی میزان اختصاصی بودن آغازگرها، Blast هر کدام از آغازگرها در برابر توالی‌های نوکلئوتیدی و ESTهای موجود در NCBI انجام گرفت (۴۱). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی از کیت Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) استفاده شد. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت) (جدول ۲)، ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز^۱ و ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA بود و واکنش‌ها در دستگاه Qiagen Rotor gene Q-Pure Detection مدل ۶۰۰۰ (شرکت کایزن، آمریکا) انجام گرفت. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌ها به این صورت بود: فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به الگو به مدت ۳۰ ثانیه که دمای این مرحله از چرخه بسته به ترکیب آغازگر متغیر بود و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی منحنی ذوب^۲ با افزایش دما از ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد (در هر ثانیه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد) برای هر کدام از ژن‌ها رسم شد و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تایید شد. از ژن Actin به عنوان ژن مرجع^۳ جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان استفاده شد.

تجزیه آماری

برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن‌ها از روش $\Delta\Delta CT$ به صورت زیر استفاده شد (۲۵).
 ΔCT (نمونه تیمار شده) = CT (ژن مورد نظر در نمونه) - CT (ژن نرمال کننده در همان نمونه).
 ΔCT (کنترل) = CT (ژن مورد نظر در نمونه شاهد) - CT (ژن نرمال کننده در نمونه شاهد).
 $\Delta\Delta CT$ = ΔCT (نمونه تیمار شده) - ΔCT (کنترل).
 میزان نسبی بیان ژن = $2^{-\Delta\Delta CT}$.

پس از سرد شدن لوله حاوی مواد روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کند) انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، ۱ میکرولیتر آنزیم RiboLockTM RNase Inhibitor (۲۰۰u/μl)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱ میکرولیتر آنزیم- M- RevertAidTM MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰u/μl) به لوله حاوی مواد اضافه شد و بلافاصله سانتی‌فیوژ پالسی انجام گرفت تا تمام محتویات لوله یکجا جمع شود. لوله حاوی مواد برای ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نگهداری لوله حاوی cDNA برای استفاده کمتر از یک هفته در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی مدت در ۸۰- درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بررسی صحت cDNA ساخته شده از سه واکنش کنترل منفی (-RT)، کنترل منفی بدون الگو (NTC) و کنترل مثبت (برای بررسی صحت سنتز cDNA) مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد. واکنش کنترل منفی (-RT) جهت تشخیص وجود آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراج شده است. در این واکنش تمام اجزای واکنش برای سنتز cDNA به جز آنزیم Reverse transcriptase مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه استفاده نکردن از آنزیم نباید در نمونه cDNA سنتز شده و در مرحله تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از این cDNA باندی مشاهده شود. وجود باند بیانگر وجود آلودگی DNA است. واکنش کنترل منفی بدون الگو (NTC) برای تشخیص آلودگی در اجزای واکنش است. در این واکنش تمام اجزای واکنش سنتز cDNA استفاده شده؛ منتها به جای استفاده از RNA استخراج شده از آب عاری از نوکلئاز استفاده می‌شود و مطابق پروتکل سنتز cDNA عمل می‌شود. در این واکنش چون به جای RNA از آب عاری از نوکلئاز استفاده شده است بنابراین cDNA سنتز نمی‌شود و در مرحله تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از این cDNA هیچ باندی نباید مشاهده شود. وجود باند نشانگر آلودگی اجزای واکنش خواهد بود. واکنش کنترل مثبت جهت بررسی صحت انجام واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) انجام شد. در این واکنش سنتز cDNA برطبق دستورالعمل کیت با استفاده از RNA موجود در کیت انجام شد. RNA موجود در کیت مربوط به ژن GAPDH^۱ به طول ۱/۳ کیلوباز می‌باشد. cDNA با استفاده از مواد موجود در کیت طبق پروتکل ساخته شد و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد. دوره‌های زمانی واکنش PCR جهت تکثیر ژن GAPDH شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه در یک چرخه، واسرشته‌سازی با همان دما به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه در ۳۵ سیکل انجام گردید. جهت بررسی کیفیت cDNA واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای ژن 18s rRNA، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

1- Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
3- Melting curve

2- Water nuclease free
4- Internal control/Reference or Housekeeping genes

تنش (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در سطح شوری‌های ۲ و ۵ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۱). در رابطه با لاین 9CSA3 بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در مراحل اولیه تنش (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در شوری ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر و در مراحل پیشرفته و پیشرفته‌تر تنش (۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در شوری‌های ۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۲).

در مقایسه‌ی دو لاین مورد مطالعه (AS5305 و 9CSA3)، در مراحل اولیه‌ی اعمال تنش شوری، بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در غلظت شوری کمتر از آن برای لاین 9CSA3 مشاهده شد (۸ دسی‌زیمنس بر متر در مقابل ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر). به‌عبارت دیگر، در مراحل اولیه‌ی تنش (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در غلظت شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد در حالی که در همین زمان (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) بیشترین میزان بیان ژن در لاین 9CSA3 در غلظت شوری ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد. در مراحل پیشرفته‌تر تنش (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) افزایش بیان ژن در لاین AS5305 مشاهده نشد. در مراحل پیشرفته‌تر تنش (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) افزایش بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در غلظت شوری‌های پایین‌تر؛ ۲ و ۵ دسی‌زیمنس بر متر و در لاین 9CSA3 در اکثر غلظت‌های شوری خصوصاً غلظت شوری‌های نسبتاً شدیدتر ۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد.

الگوی بیان متفاوت ژن در ۲ لاین مورد مطالعه (AS5305 و 9CSA3) می‌تواند ناشی از واکنش متفاوت آنها به تنش شوری باشد (جدول ۱). بنابراین احتمالاً در غلظت ملایم‌تری از تنش شوری تحریک بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در مقایسه با لاین 9CSA3 اتفاق می‌افتد در حالی که تحریک بیان همین ژن (PMP3) در لاین 9CSA3 در غلظت‌های بالاتری از نمک اتفاق می‌افتد. در مطالعات پیشین در گزینش اولیه ژنوتیپ‌ها (۱)، غلظت‌های بالاتر نمک (۱۱ دسی‌زیمنس بر متر و بالاتر از آن) استفاده نشده است و بنابراین با توجه به نتایج مطالعه اخیر و گزارشات متعدد در زمینه اثرات متقابل شوری در ژنوتیپ (۲)، بهتر است مورد اخیر در مطالعات آتی در نظر گرفته شود.

در این روابط CT^۱ چرخه آستانه می‌باشد. تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها به‌صورت فاکتوریل (فاکتور اول: شوری در ۵ سطح از منبع NaCl شامل ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ ds/m، فاکتور دوم: ژنوتیپ در ۲ سطح شامل لاین‌های AS5305 و 9CSA3، فاکتور سوم: زمان در ۴ سطح شامل ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. به‌دلیل نرمال نبودن توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه آماری با روش ناپارامتری توسعه‌یافته توسط برونر و همکاران (۵) که به‌صورت متوسط با ذکر جزئیات توسط شاه و مدین (۳۳) تشریح شده است در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. روش‌های ناپارامتری نیاز به فرض‌های نرمال بودن و مستقل بودن داده‌ها یا یکنواختی واریانس خطاها ندارند و در مقایسه با آماره‌های پارامتری به داده‌های پرت حساسیت کمتری دارند (۳۳). نمودارها با Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند. میله‌های خطا در نمودارهای اکسل برای نمایش تغییر داده‌ها و دقت اندازه‌گیری به‌کار برده می‌شوند. میله‌های خطا ضمناً می‌توانند اختلاف آماری بین میانگین‌ها را نشان دهند به این صورت که اگر در دو میانگینی میله‌های خطا همدیگر را پوشش دهند بین دو میانگین اختلاف آماری وجود ندارد (۷۶).

نتایج و بحث

بیان نسبی ژن PMP3

تجزیه واریانس بر اساس آماره والد^۲ نشان می‌دهد که اثر ساده ژنوتیپ و زمان بعد از اعمال تنش و نیز اثر متقابل دوجانبه شوری × زمان و اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ × شوری × زمان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) و اثر ساده شوری و اثر متقابل دوجانبه ژنوتیپ × زمان در سطح احتمال ۵ درصد ($p \leq 0.05$) بر روی بیان ژن PMP3 معنی‌دار می‌باشد. تجزیه واریانس بر اساس آماره آنوا تیپ (ANOVA-Type) نشان می‌دهد که اثر ساده زمان بعد از اعمال تنش در سطح احتمال ۱ درصد ($p \leq 0.01$) و اثر ساده ژنوتیپ و اثر متقابل دوجانبه شوری × زمان و ژنوتیپ × زمان در سطح احتمال ۵ درصد ($p \leq 0.05$) بر روی بیان ژن PMP3 معنی‌دار می‌باشد. در مواردی همچون آزمایش اخیر که حجم نمونه مورد مطالعه زیاد می‌باشد تجزیه واریانس بر اساس آماره آنوا تیپ بر آماره والد ارجحیت دارد (۳۳). بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در مراحل اولیه‌ی تنش (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در سطح شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر و در مراحل پیشرفته‌تر

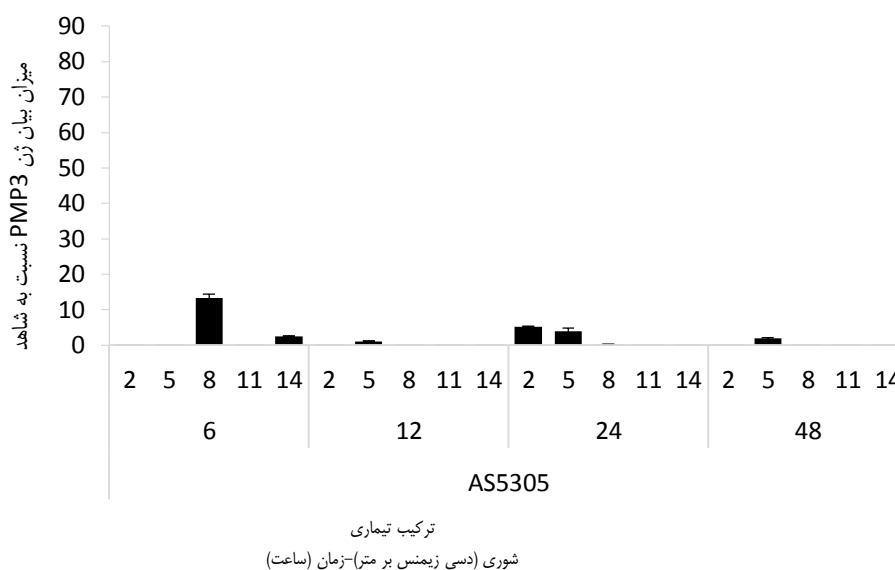
جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات رونوشت ژن‌های PMP3 و Dehydrin در لاین‌های آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) مورد مطالعه طی زمان‌های مختلف پس از اعمال سطوح تنش شوری

Table 3. Analysis of variance for transcript variations of PMP3 and Dehydrin genes in studied oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines at different times after applying salinity stress levels.

Wald type statistics								
منابع تغییرات	PMP3				Dehydrin			
	df _d	df _n	Chi-square	P-value	df _d	df _n	Chi-square	P-value
شوری	۷۷	۴	۱۲/۵۴	۰/۰۱۳۸	۸۰	۴	۹۰/۹۷	<۰/۰۰۰۱
ژنوتیپ	۷۷	۱	۱۲/۸۵	۰/۰۰۰۳	۸۰	۱	۱۶۴/۷۶	<۰/۰۰۰۱
زمان	۷۷	۳	۴۳/۸۸	<۰/۰۰۰۱	۸۰	۳	۲۶۳/۴۵	<۰/۰۰۰۱
ژنوتیپ × شوری	۷۷	۴	۴/۲۶	۰/۳۷۹۸	۸۰	۴	۲۹/۶۸	<۰/۰۰۰۱
شوری × زمان	۷۷	۱۲	۱۷۲/۳۸	<۰/۰۰۰۱	۸۰	۱۲	۲۹۷/۶۵	<۰/۰۰۰۱
زمان × ژنوتیپ	۷۷	۳	۱۰/۸۳	۰/۰۱۲۷	۸۰	۳	۶۵/۶۹	<۰/۰۰۰۱
زمان × ژنوتیپ × شوری	۷۷	۱۲	۱۴۶/۴۷	<۰/۰۰۰۱	۸۰	۱۲	۳۸۹/۹۶	<۰/۰۰۰۱

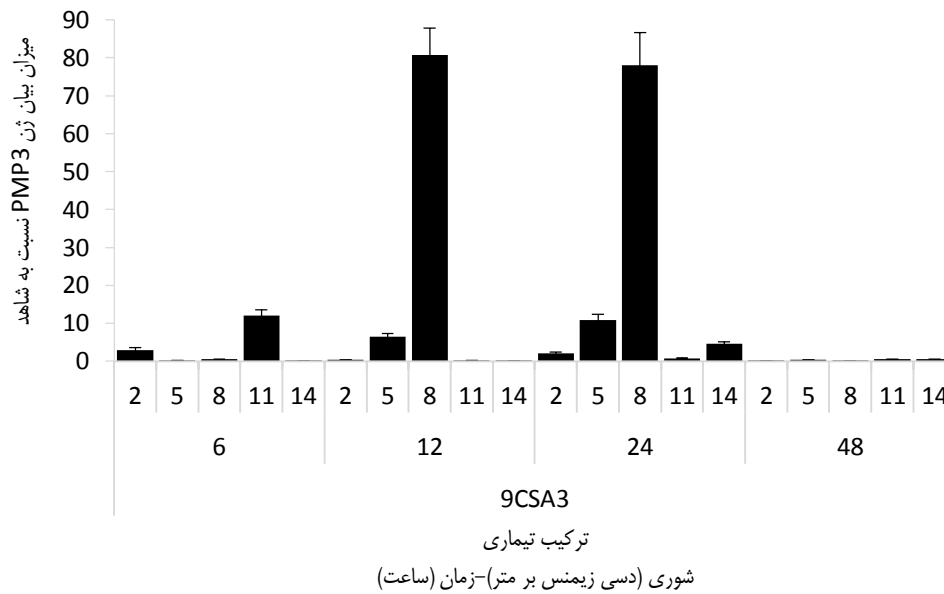
ANOVA-type statistics								
منابع تغییرات	PMP3				Dehydrin			
	df _N	df _D	F-value	P-value	df _N	df _D	F-value	P-value
شوری	۲/۹۷	۶/۱	۱/۵۴	۰/۳۹۷۱	۳/۶	۲۸/۱	۲۴/۶۹	<۰/۰۰۰۱
ژنوتیپ	۱	۶/۱	۱۲/۸۵	۰/۰۱۱۳	۱	۲۸/۱	۱۶۴/۷۶	<۰/۰۰۰۱
زمان	۲/۴۲	۶/۱	۱۲/۷۳	۰/۰۰۵۸۸	۲/۹۷	۲۸/۱	۹۷/۴۱	<۰/۰۰۰۱
ژنوتیپ × زمان	۲/۹۷	۶/۱	۱/۰۶	۰/۴۳۱۵	۳/۶	۲۸/۱	۸/۵۹	۰/۰۰۰۲
شوری × زمان	۴/۷	۶/۱	۴/۷۲	۰/۰۴۲۵	۸/۷	۲۸/۱	۱۹/۳۱	<۰/۰۰۰۱
ژنوتیپ × زمان	۲/۴۲	۶/۱	۵/۴۷	۰/۰۴۰۲	۲/۹۷	۲۸/۱	۲۰/۷۱	<۰/۰۰۰۱
زمان × ژنوتیپ × شوری	۴/۷	۶/۱	۳/۸۰	۰/۰۶۷۲	۸/۷	۲۸/۱	۱۷/۶۶	<۰/۰۰۰۱

df_N: Numerator degree of freedom; df_D: Denominator degree of freedom; P-value: Probability value.



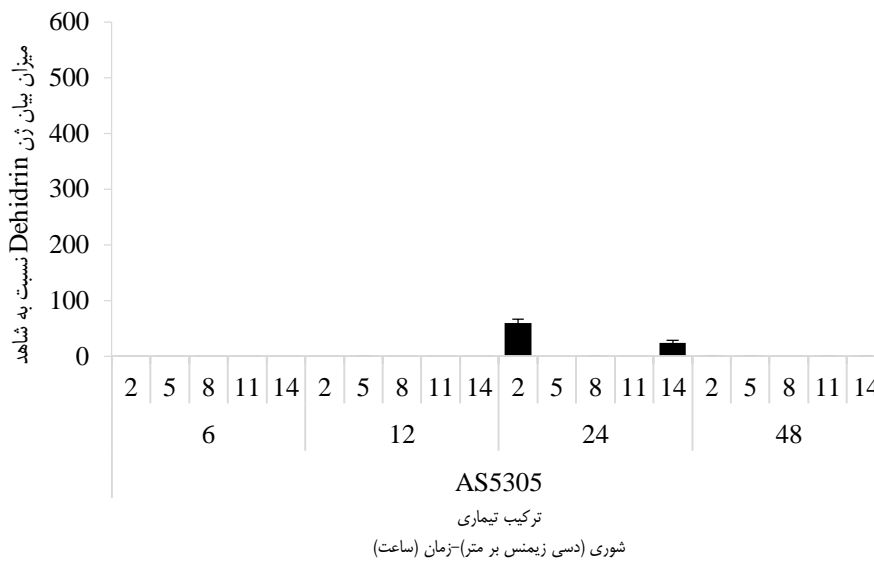
شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن PMP3 در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی در ۵ سطح شوری ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۴۸ ds/m در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری

Figure 1. Expression profiling of PMP3 gene in AS5305 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt tolerant line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress



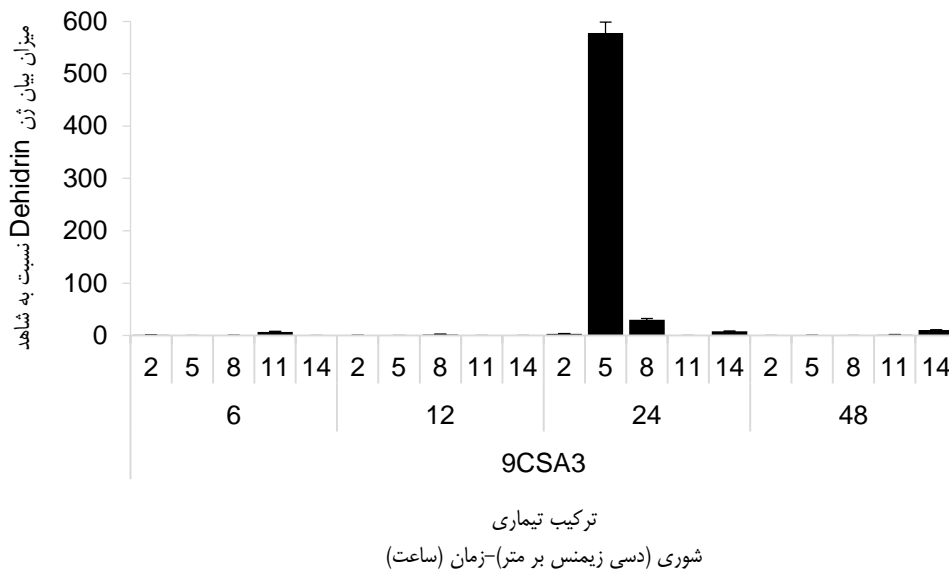
شکل ۲- الگوی بیان نسبی ژن PMP3 در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی در ۵ سطح شوری ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۴۸ ds/m در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری

Figure 2. Expression profiling of PMP3 gene in 9CSA3 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt sensitive line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress



شکل ۳- الگوی بیان نسبی ژن Dehydrin در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی در پنج سطح شوری ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۴۸ ds/m در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری

Figure 3. Expression profiling of Dehydrin gene in AS5305 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt tolerant line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress



شکل ۴- الگوی بیان نسبی ژن Dehydrin در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی در پنج سطح شوری ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۴۸ ds/m در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 4. Expression profiling of Dehydrin gene in 9CSA3 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt sensitive line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress.

غلظت پایین‌تر؛ ۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر، افزایش بیان ژن در لاین 9CSA3 در مقایسه با ژنوتیپ AS5305، بیشتر بود. همچون ژن PMP3، الگوی بیان متفاوت ژن Dehydrin در ۲ ژنوتیپ مورد مطالعه (9CSA3 و AS5305) می‌تواند ناشی از واکنش متفاوت آنها به تنش شوری باشد (جدول ۱). بر اساس نتایج، غلظت شدیدتر تنش شوری (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری، بیان ژن Dehydrin را در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 القاء می‌نمایند، در حالی که در مقایسه در همین مرحله در لاین 9CSA3 غلظت‌های پایین‌تر تنش شوری (۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) بیان ژن Dehydrin را القاء می‌نمایند.

طبق نتایج حاصل الگوی بیان هر دو ژن مورد بررسی (Dehydrin و PMP3) در لاین‌های مورد مطالعه در پاسخ به تنش شوری متفاوت است. معمولاً اثرات اولیه تنش شوری به دو صورت تنش یونی و تنش اسمزی بروز می‌نماید (۱۳). گیاهان هنگام مواجه شدن با تنش شوری مکانیسم‌های متعددی را برای فایق آمدن بر این مشکلات از طریق بیان نمودن ژن‌ها فعال می‌نمایند (۴۰). در این مطالعه، بررسی بیان نسبی ژن Dehydrin و PMP3 تحت تنش شوری در ۲ لاین آفتابگردان روغنی در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش بررسی گردید. این ژن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی به‌ترتیب در تنظیم اسمزی (۲۷) و حفظ تعادل یونی (۳۰) درگیر هستند. دو لاین آفتابگردان از میان ۱۰۰ لاین که واکنش آنها قبلاً تحت شرایط نرمال و تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر بررسی شده بود انتخاب شدند (۲۱). در انتخاب لاین‌ها عمدتاً میزان کاهش عملکرد در مقایسه‌ی دو شرایط نرمال و تنش شوری،

بیان نسبی ژن Dehydrin

نتایج جدول تجزیه واریانس بر اساس آماره آنوا تیپ نشان داد که اثر ساده شوری، ژنوتیپ و زمان بعد از اعمال تنش و نیز اثرات متقابل دوجانبه شوری × زمان، ژنوتیپ × شوری، و ژنوتیپ × زمان و اثرات سه‌جانبه ژنوتیپ × شوری × زمان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) بر روی بیان ژن Dehydrin معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

بیشترین میزان بیان نسبی ژن Dehydrin در لاین AS5305 در مراحل پیشرفته‌تر (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در سطح شوری ۲ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده گردید (شکل ۳).

در لاین 9CSA3 بیشترین میزان بیان نسبی ژن Dehydrin در مراحل اولیه تنش (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در غلظت شوری ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر، در مراحل پیشرفته (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در سطح شوری‌های ۵، ۸ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر و در مراحل پیشرفته‌تر (۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در سطح شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۴).

در مقایسه‌ی دو لاین مورد مطالعه (AS5305 و 9CSA3)، در مراحل اولیه تنش شوری (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) افزایش بیان نسبی ژن Dehydrin فقط در لاین 9CSA3 مشاهده شد. در زمان ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری، افزایش بیان نسبی ژن Dehydrin در هیچ‌کدام از لاین‌ها مشاهده نشد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری در غلظت شوری‌های شدیدتر (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) افزایش بیان ژن Dehydrin در لاین AS5305 ۱/۵ برابر بیشتر از لاین 9CSA3 بود. در مقابل در شوری‌های با

$$D = \frac{\bar{X}_{Normal} - \bar{X}_{Stress}}{\bar{X}_{Normal}} \times 100$$

در نظر گرفته شده است

(۲۰). با توجه به جدول ۱ لاین AS5305 در مقایسه با لاین 9CSA3 "میزان کاهش عملکرد" کمتری دارد و از این لحاظ لاین متحمل به تنش شوری است. از طرفی دو لاین از لحاظ "میزان کاهش محتوی نسبی آب برگ" در مقایسه دو شرایط نرمال و تنش شوری تفاوت فاحشی باهم ندارند. بنابراین احتمالاً هر دو لاین در مقابل تنش اسمزی متحمل هستند. بنابراین "میزان کاهش عملکرد" بیشتر لاین 9CSA3 در مقایسه با لاین AS5305 و بدین ترتیب کمی تحمل آن احتمالاً به دلیل تنش یونی یا تنش‌های دیگر از قبیل تنش اکسیداتیو باشد (۲۲).

همچنانچه در مقدمه بیان شد تنوع خانواده ژنی دهیدرین‌ها و محل استقرار آنها بر روی کروموزوم‌های متفاوت متنوع بوده و تاکنون چندین ژن دهیدرین در بین و درون گونه‌های گیاهی مشخص شده است. بنابراین احتمالاً لاین AS5305 که علی‌رغم متحمل بودن به تنش اسمزی تغییرات بیان محسوسی برخلاف لاین 9CSA3 برای ژن dh1 نشان نمی‌دهد از ژن دهیدرین دیگری غیر از مورد اخیر (dh1) برای تنظیم تنش اسمزی و حفظ محتوای نسبی آب استفاده می‌نماید (۳). این در حالی است که ژن dh1 در لاین 9CSA3 افزایش بیان نشان می‌دهد. بنابراین لازم است بررسی‌های بیشتر در این زمینه صورت گیرد تا موضوع کامل روشن شود.

مطابق جدول ۱، میزان کاهش نسبت پتاسیم به سدیم در دو لاین در مقایسه‌ی دو شرایط نرمال و تنش شوری متفاوت است و از این نظر لاین AS5305 در مقایسه با لاین 9CSA3 افت نسبت پتاسیم به سدیم کمتری دارد؛ به عبارتی در حفظ تعادل یونی موفق‌تر بوده است. همچنانچه گفته شد در ارزیابی اولیه این لاین‌ها شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر استفاده شده است. در لاین AS5305 به محض درک تنش شوری (۶ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) بیان ژن PMP3 افزایش یافته است. احتمالاً این افزایش بیان "زود هنگام" که مساله‌ای تجربه شده در مقاومت به تنش‌های زیستی است (۲۶،۱۴) در حفظ یکپارچگی غشاء و ایجاد تعادل یونی مؤثر بوده که بدین ترتیب "کاهش کم عملکرد در شرایط تنش در مقایسه با شرایط نرمال" لاین AS5305 را تا حدودی توجیه می‌نماید. در حالی که در لاین 9CSA3 افزایش بیان ژن دیر هنگام صورت گرفته است که احتمالاً تا آن زمان غشاء آسیب دیده و افزایش بیان دیر هنگام نتوانسته است گیاه را در غلبه بر تنش یاری نماید و بنابراین افت عملکرد بیشتر در این لاین دیده می‌شود. حتی احتمالاً افزایش بیان به قیمت استفاده از عملکرد بوده و خود باعث کم شدن آن شده است (۲۸). البته لازم است بررسی‌های تکمیلی قبل از استنتاج نتایج قوی انجام گیرد چرا که شوری یک صفت پیچیده بوده و ژن‌های زیادی در ایجاد تحمل دخیل هستند و تحمل برآیند همکاری مجموعه آن‌هاست.

نتایج این تحقیق نشان داد در مراحل اولیه‌ی اعمال تنش شوری، بیشترین میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 (۸ دسی‌زیمنس بر متر در مقابل ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر). در مراحل پیشرفته‌ی اعمال تنش شوری (۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) بر خلاف لاین 9CSA3 افزایشی در میزان بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 مشاهده نشد. در مراحل پیشرفته‌تر از اعمال تنش شوری (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) افزایش بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در شوری‌های پایین‌تر (۲ و ۵ دسی‌زیمنس بر متر) و در لاین 9CSA3 در شوری‌های نسبتاً شدیدتر (۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) مشاهده شد. بنابراین احتمالاً تحریک بیان ژن PMP3 در لاین AS5305 در مقایسه با لاین 9CSA3 در غلظت ملایم‌تری از تنش شوری اتفاق می‌افتد در حالی که تحریک بیان ژن (PMP3) در لاین 9CSA3 در غلظت‌های بالاتری از نمک اتفاق می‌افتد. در رابطه با ژن Dehydrin، افزایش بیان در مراحل اولیه‌ی تنش شوری فقط در لاین 9CSA3 مشاهده شد. در زمان ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش شوری افزایش بیان در هیچکدام از لاین‌ها مشاهده نشد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری در شوری‌های شدیدتر (۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) افزایش بیان در لاین AS5305 ۱/۵ برابر بیشتر از لاین 9CSA3 بود. در مقابل در شوری‌های پایین‌تر ۵ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر افزایش بیان ژن در لاین 9CSA3 در مقایسه با ژنوتیپ AS5305، بیشتر بود. بنابراین احتمالاً غلظت شدیدتر تنش شوری در مراحل پیشرفته و پیشرفته‌تر، بیان ژن Dehydrin را در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 القاء می‌نماید. جمع‌بندی نتایج نشان می‌دهد الگوی بیان ژن‌ها در ۲ لاین مورد مطالعه متفاوت می‌باشد که ناشی از واکنش متفاوت آنها به تنش شوری است. این مسئله نشان دهنده درگیر بودن این ژن‌ها در تحمل به تنش شوری می‌باشد که در درک پایه‌های مولکولی تنش شوری و مکانیسم تحمل، جهت اصلاح و مهندسی ژنتیک مقاومت در برابر تنش و تولید گیاهان مقاوم کمک می‌کند. در ادامه در نظر هست تجزیه بیان ژن در لاین‌های با واکنش متفاوت در هر دو بافت ریشه و برگ با روش توالی‌یابی RNA (RNA Sequencing) و cDNA-AFLP (۳۹) انجام گیرد تا شبکه ژنی درگیر در تحمل شناسایی شود. همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های عامل تحمل به ارقام حساس و بررسی تحمل تراریخته‌ها در سطح مولکولی در تایید نقش ژن‌ها در تحمل کمک اساسی خواهد نمود.

تشکر و قدردانی

از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه به‌خاطر فراهم‌نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش و همچنین از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به‌خاطر در اختیار قراردادن بذور لاین‌های خالص آفتابگردان روغنی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ahmadpour, S., R. Darvishzadeh and O. Sofalian. 2018. Selection indices for yield improvement of sunflower under normal and salt stress conditions. *Journal of Crop Breeding*, 10(25): 91-100 (In Persian).
2. Ahmadpour, S., R. Darvishzadeh, O Sofalian and H Hatamzadeh. 2019. Evaluation of Yield Stability of Sunflower Inbred Lines under Salt Stress Conditions. *Journal of Crop Breeding*, 11 (30): 1-10 (In Persian).
3. Allagulova, Ch.R., F.R. Gimalov, F.M. Shakirova and V.A. Vakhitov. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Mascow)*, 68: 945-951.
4. Asia Khaton, M., S. Qureshi and M.K. Hssain. 2000. Effect of salinity on some yield parameters of sunflower. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4: 382-384.
5. Brunner, E., S. Domhof and F. Langer. 2002. *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiment*. New York: Wiley.
6. Compton, M.E. 2000. Statistical analysis of plant tissue culture data. In *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2nd ed. Edited by R.N. Trigiano and D.J. Gray. CRC Press, Routledge, 61-72 pp.
7. Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 37: 217-242.
8. Demir, M. and A. Ozturk. 2003. Effect of different soil salinity levels on germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27: 224-227.
9. Farzaneh Behelgardi, M., N. Motamed, F. Rastgar Jazzi and H. Ebrahimzadeh. 2014. Increase of *P5CS* gene expression in olive plantlets under salinity stress. *Journal of Cellular and Molecular Research*, 27(1): 119-124.
10. Fu, J., D.F. Zhang, Y.H. Liu, S. Ying, Y.S. Shi, Y.C. Song and T.Y. Wang. 2012. Isolation and characterization of maize PMP3 genes involved in salt stress tolerance. *PloS one*, 7(2): e31101.
11. Ghasemi Omran, V., A. Bagheri, G.H. Nematzadeh, A. Mirshamsi and N. Babaeian Jelodar. 2012. Evaluation the expression pattern of *ALSOS1* and *AlNHX* genes under NaCl stress in halophyte grass *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. *Crop Biotechnology*, 2(2): 27-37.
12. Gonzalez, S., P. Vereijken and J.M. Vereijken. 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2173-2191.
13. Gupta, B. and B. Huang. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomic*, 18 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.
14. Hammond-Kosack, K.E. and J.E. Parker. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion Biotechnology*, 14: 177-193.
15. Hatami Maleki, H., R. Darvishzadeh and Z. Mohseni. 2014. Evaluation of genetic diversity and classification of advanced sunflower lines using ISSR Markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6: 33-44.
16. Jain, M., A. Nijhawan, A.K. Tyagi and J.P. Khurana. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2): 646-651.
17. Lyons, J. 2012. *Low temperature stress in crop plants: the role of the membrane*. Elsevier.
18. Mahajan S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2): 139-158.
19. Moon, A., G. Bauw, E. Prinsen, M. Van Montagu and D. Van der Straeten. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salt in roots of salt-sensitive and salt-tolerant indica rice varieties. *Plant Physiol*, 107: 177- 186.
20. Morsali Aghajari, F., R. Darvishzadeh, Gh.H. Gholami. 2020. The effect of salt stress on morphological traits and electrophoresis pattern of proteins in recombinant inbred lines population of oilseed sunflower derived from PAC2 × RHA266 cross. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 13(2): 583-600.
21. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*, 25: 239-250.
22. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
23. Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167: 645-663.

24. Onemli F. and T. Gucer. 2010. Response to drought of some wild species of *Helianthus* at seedling growth stage. *Helia*, 33(53): 45- 54.
25. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids Research*, 29(9): 45-45.
26. Paknia, R., R. Darvishzadeh, F. Shahriari, S. Malekzadeh and N. Boroukanlou. 2020. Expression pattern of genes associated with resistance to *Sclerotinia* basal stem rot disease in oil seed sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Iranian Journal of Field Crop Sciences*, 51(1): 77-89 (In Persian).
27. Poormohammad, Kiani, S., P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel and A. Sarrafi. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 114(2): 193-207.
28. Ranjbar, Gh. and A. Anagholi. 2018. Concepts of Salt Stress and Plant Response. Agricultural Education and Extension Press, Tehran, Iran, 148 pp.
29. Rodriguez, E.M., J.T. Svensson, M. Maatrasi, D.W. Choi and T.J. Close. 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 852-858.
30. Saadia, M., A. Jamil, M. Ashraf and N.A. Akram 2013. Comparative study of SOS2 and a novel PMP3-1 gene expression in two sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines differing in salt tolerance. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 170: 980-987.
31. Saeid Pour, A., H.R. Kavousi, Q. Mohammadi Nezhad and S. Khosravi. 2015. Gene Expression Analysis of NHX to Salinity stress in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Agricultural Biotechnology Journal*, 6(4): 91-100 (In Persian).
32. Schilling, E.E. and C.B. Heiser. 1997. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon*, 30(2): 393-403.
33. Shah, D.A. and L.V. Madden. 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology*, 94(1): 33-43.
34. Sharghi, L., F. Mahmoodi Kordi and M. Ahmadabadi. 2013. Improving salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* via overexpression of a calcium sensor gene. *Journal of Cellular and Molecular Research*, 28(4): 551-559.
35. Tahmasebi A., E. Ebrahimie, M. Ebrahimie and M. Jafarzadeh. 2011. Study of the modulations of gene expression pattern during salinity and oxidative stresses by analysis of microarray data in *Arabidopsis*. 7th National Conference on Biotechnology of Iran; 2011 Sep 12-14; Tehran, Iran. (In Persian).
36. Wills, D.M. and J.M. Burke. 2006. Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, 97(4): 403-408.
37. Wise, M.J. and A. Tunnacliffe. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9: 13-17.
38. Yousefi Rad, S., H. Soltanloo, S.S. Ramezanpour and K. Zaynali Nezhad. 2019. The study of SOS genes expression in mutant barley root under salt stress. *Journal of Crop Breeding*, 11(29): 1-8 (In Persian).
39. Zare, F., G.A. Ranjbar, A.R. Tarang and H. Najafi Zarrini. 2017. Identification of Up-regulated Transcripts in Salt Tolerant Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivar using the cDNA-AFLP Technique. *Journal of Crop Breeding*, 9(23): 125-137 (In Persian).
40. Zhu J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6: 66-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Studying the Expression Pattern of *PMP3* and *Dehydrin* Genes in AS5305 and 9CSA3 Oily Sunflower Lines under Salt Stress

Nahid Habibi¹, Reza Darvishzadeh^{2,3} and Babak Abdollahi Mandoulakani⁴

1- Graduated M.Sc. Student, In Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia

2 and 3- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University and Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia,
(Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia

Received: January 31, 2020 Accepted: August 1, 2020

Abstract

In this study, the tolerance of sunflower lines was investigated to salinity stress at the molecular level by studying the expression of *PMP3* and *Dehydrin* genes in two oilseed sunflower lines [AS5305 (tolerant) and 9CSA3 (susceptible)] under different levels of salinity; 2, 5, 8, 11 and 14 dS/m (equivalent to 20, 50, 80, 110 and 140 mM NaCl) using real time PCR technique. Sampling of sunflower leaves was performed in 8-leaf stage at five time intervals; 0, 6, 12, 24 and 48 hours after stress application. The results of the study showed that in the early stages of salinity stress, the highest expression of *PMP3* gene in AS5305 line was observed at salinity level lower than that for 9CSA3 line (8 vs 11 ds/m). In more advanced stages of salinity stress (24 hours after stress application), the increased expression level of *PMP3* gene in AS5305 line was observed at low salt intensity (2 and 5 dS/m) whereas in the case of 9CSA3 line it was observed at more severe salt intensity (5 and 8 dS/m). In relation to *Dehydrin* gene, an increase in the expression level at the early stages was observed only in 9CSA3 line. In the advanced stages at more severe salinity stress (14 ds/m), the increased expression level of *Dehydrin* gene was 1.5 times higher in AS5305 line than that in 9CSA3 line. In contrast, at low salt intensity (5 and 8 dS/m), the increased expression level of *Dehydrin* gene was greater in 9CSA3 line than that in AS5305 line. Therefore, the higher concentrations of salinity stress in advanced and more advanced stages of salinity stress may induce more the expression level of *Dehydrin* gene in AS5305 line than that in 9CSA3 line. Totaly the results show that the pattern of expression of studied genes in two investigated lines is different, which is due to their different response to salinity stress. This suggests that these genes are potentially involved in tolerance to salinity stress, which can be useful in breeding and development of plants potentially resistance to stress.

Keywords: Gene Expression, Real Time PCR, Salinity Stress, Sunflower