دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

بررسی تغییرات بیان نسبی ژن‌های *SOS2*، *MYB-related* و *HD-ZIP* در آفتابگردان روغنی تحت تنش شوری

فائزه حسین‌پور[۱]، رضا درویش‌زاده[۲]، بابک عبدالهی مندولکانی[۲]، ناهید حبیبی[۱]، اسماعیل داردان[۳] و علی رنجبر[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۲- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
۳- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات-ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زراعت، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۴
صفحه: ۱۵۲ تا ۱۶۵

چکیده

فاکتورهای محیطی متعددی بر رشد و نمو و در نهایت تولید محصول در گیاهان تاثیر می‌گذارند. شوری از طریق عدم تعادل مواد معدنی (سمّیت عناصر یا کمبود آن‌ها)، تنش اسمزی و تنش اکسیداتیو تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این مطالعه با به کارگیری تکنولوژی PCR در زمان واقعی تغییرات سطوح ژن‌های *SOS2*، *MYB-related* و *HD-ZIP* در شرایط مختلف تنش شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر) در دو لاین مختلف آفتابگردان روغنی (AS5305 و 9CSA3) بررسی شد. نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان در مرحله ۸ برگی در چهار زمان ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری انجام شد. این ژن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی در انتقال سیگنال (*SOS2*) و به عنوان عوامل نسخه‌برداری (*MYB-related* و *HD-ZIP*) درگیر هستند. طبق نتایج حاصل، الگوی بیان هر سه ژن مورد بررسی در لاین‌های مورد مطالعه در پاسخ به تنش شوری متفاوت بود. مقایسه میزان بیان ژن‌ها در دو لاین نشان می‌دهد که در حالات مختلف مورد بررسی عمده افزایشِ بیان در لاین AS5305 اتفاق افتاده است؛ در جاییکه افزایش بیان در لاین 9CSA3 دیده می‌شود در مقامِ مقایسه در آنجا میزانِ افزایشِ بیان در لاین 9CSA3 (لاین حساس) کمتر از لاین AS5305 (لاین متحمل) می‌باشد. نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت این ژن‌ها در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش شوری می‌باشد. از طرف دیگر در این مطالعه با تأیید مقاومت لاین AS5305 به تنش شوری در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم به شوری در اصلاح نبات استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پی سی آر در زمان واقعی، تحمل به شوری، تغییرات ترانسکریپتوم، عوامل نسخه‌برداری، گیاهان دانه روغنی

مقدمه

دانه‌های روغنی از لحاظ تأمین انرژی مورد نیاز انسان در مقام دوم اهمیت قرار دارند (۲۱). آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) به عنوان یکی از مهمترین گیاهان دانه روغنی؛ گیاهی یکساله، دیپلوئید و بومی آمریکای شمالی است (۱۸). از نظر سطح زیرکشت و میزان تولید جهانی، بعد از سویا و پنبه در ردیف گیاهانی همچون کلزا و بادام زمینی قرار می‌گیرد (۳). تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که بر مقدار و کیفیت محصول گیاهان زراعی اثر منفی می‌گذارد. براساس آمار موجود شوری و خشکی وسیع‌ترین عوامل ایجاد کننده تنش در گیاهان در سطح جهان بوده (۲۴) و سطح گسترده‌ای از اراضی کره زمین (بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار) را در بر می‌گیرند (۳۲). در ایران حدود ۱۵ میلیون هکتار معادل ۱۰ درصد از مساحت کشور تحت تأثیر تنش شوری است. شوری ترکیبی از دو تنش اسمزی و یونی است (۵). تنش اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبگیری از بافت‌های گیاهی می‌شود و بدین دلیل به آن خشکی فیزیولوژیک نیز می‌گویند. از سوی دیگر، مسمومیّت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص بویژه سدیم ایجاد می‌گردد که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شود (۱۴،۳۰). از اثرات ثانویه تنش‌های اسمزی و یونی، افزایش تولید فرم‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی است که این فرم‌ها موجب آسیب اکسیداتیو به بسیاری از قسمت‌های سلول می‌گردند (۲۲). جمعیت جهان در سال ۸۰ میلیون نفر افزایش می‌یابد و سازمان خواربار جهانی پیش‌بینی کرده که برای از بین بردن گرسنگی در جهان لازم است میزان تولید محصولات کشاورزی در طی دو دهه آینده، ۶۰ درصد افزایش یابد. تولید گیاهان متحمل یکی از اساسی‌ترین راهکارها برای تولید در اراضی متأثر از تنش شوری است (۱۷). تحمل شوری در حقیقت توانایی گیاهان برای رشد و تکمیل چرخه‌ی زندگی در شرایط وجود غلظت بالایی از نمک‌های محلول در محیط ریزوسفر می‌باشد. یکی از ارکان تحمل، کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه تحت تنش شوری است که در نتیجه تجمع بعضی از یون‌های محلول و یا سازگارسازها مانند کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدهای آزاد (پرولین، گلایسین، بتائین و ...) اتفاق می‌افتد (۱۴).

آفتابگردان جز گیاهان نیمه حساس به شوری است (۱۱،۲۰). تنش شوری باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد و نمو آفتابگردان شده و میزان محصول را به شدت کاهش می‌دهد (۱۵). اگرچه ممکن است در پاسخ به یک تنش، الگوی بیان هزاران ژن تغییر یابد، لیکن برخی از این ژن‌ها در پاسخ به تنش و ایجاد مقاومت یا حساسیت گیاه نقشی کلیدی‌تر ایفا

می‌نمایند. در این میان پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA که نقش مرکزی را در تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند، در کانون توجه محققان می‌باشند. عوامل نسخه‌برداری مهم‌ترین دسته از پروتئین‌های متصل شونده به DNA به‌شمار می‌آیند. عوامل نسخه‌برداری نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌های زنده و غیرزنده از طریق فعال کردن و یا مهار رونویسی بر عهده دارند (۱۲،۲۳). این عوامل اغلب در بافت‌های خاص، در مرحله رشدی خاص و یا از طریق مسیرهای وابسته به یک محرک مثل تنش بیان می‌شوند و بیان ژن‌های پاسخ‌گو به تنش را به صورت مشارکتی و یا به صورت مستقل کنترل می‌نمایند. تحقیقات مختلفی در رابطه با نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های مختلف صورت گرفته است. عوامل نسخه‌برداریِ بسیاری متعلق به خانواده‌های AP2/EREBP، bZIP، MYB، WRKY و NAC گزارش شده که در واکنش گیاهان به عوامل مختلف تنش‌زا شرکت می‌کنند. تعدادی از عوامل نسخه‌برداری، که سطح بیان ژن‌های کدکننده آنها به طور مناسب تغییر نشان می‌دهد، در گیاهانِ مدل و زراعیِ تراریخته ظرفیت تحمل به خشکی، شوری و دمای کمتر از حد مطلوب را بالامی‌برند (۱۲).

ژن *HD-Zip* به عنوان یک عامل نسخه‌برداری مهم در گیاهان، ژن کد کننده‌ی پروتئینی از خانواده پروتئین‌های هومئوباکس است که شامل هومئودُمین و دُمین زیپ لوسینی اضافی است. دُمین هومئوباکس شامل ۶۰ باقیمانده اسیدآمینه با توالی بسیار محافظت شده است که عمدتاً با DNA هدف ترکیب می‌شود. در دُمین زیپ لوسینی؛ ۳۵-۴۲ اسیدآمینه که نصف دُمین را شامل می‌شوند در تشکیل شکل دایمریک پروتئین میانجیگری می‌نمایند. HD-Zip در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش عمده دارد (۲۶). خانواده MYB یکی از بزرگترین و از لحاظ عملکردی متنوع‌ترین کلاس از پروتئین‌ها را شامل می‌شوند که در همه یوکاریوت‌ها حضور دارند. به طور کلی، بیشتر پروتئین‌های MYB به عنوان عوامل رونویسی عمل می‌کنند و به واسطه ۱) حضور تعداد متغیری از تکرارهای MYB حفاظت شده N–ترمینال (R) که عمدتاً در ارتباط با DNA باندینگ (اتصال به DNA) و اثرات متقابل پروتئین–پروتئین میانجیگری می‌نمایند و ۲) ناحیه متغیر C–ترمینال که مسئول تعدیل فعالیت تنظیمی پروتئین هست، مشخص می‌شوند. سلسله‌ی گیاهی حاوی زیرخانواده پروتئین MYB با دامنه MYB از نوع R2R3 هستند (۲۸). چندین عضو از خانواده MYB در Arabidopsis، برنج، ذرت، و سویا شناسایی شده است که در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی از جمله چرخه سلولی و مورفوژنز سلول، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (۲۸). SOS2 یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین با یک دُمین کاتالیتیک کینازیِ N–ترمینال و یک دُمین تنظیم کننده C–ترمینال را کُد می‌کند. این پروتئین در مسیر SOS در مشارکت با سایر پروتئین‌ها موجب تنظیم هومئوستازی یونی از طریق ۱) دفع Na^+ از سلول از طریق ناقلین غیرهمسوی متصل به غشای پلاسمایی Na^+/H^+ یا از طریق محدود نمودن ورود Na^+، ۲) استفاده از Na^+ برای تعادل اسمزی از طریق کده‌بندی Na^+ درون واکوئل توسط ناقلین غیر همسوی واقع در تونوپلاست و ۳) ترشح Na^+ می‌شود (۲). در این پژوهش تغییرات بیان نسبی دو عامل رونویسی *MYB* و *HD-ZIP* و ژن عملکردی *SOS2* با تکنیک Real time PCR در دو لاین آفتابگردان روغنی با واکنش متفاوت به شوری ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

دو لاین خالص آفتابگردان با واکنش متفاوت به تنش شوری از میان ۱۰۰ لاین انتخاب شدند (۱). لاین‌ها شامل AS5305 (متحمل به شوری) و 9CSA3 (حساس به شوری) (جدول ۱) در گلدان‌های پلاستیکی با دو نسبت خاک زراعی الک شده و یک نسبت ماسه در شرایط گلخانه در سال ۱۳۹۶ کاشته شدند. بذر لاین‌ها از مؤسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (INRA) تهیه شد. گیاهان در گلخانه با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و با فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی / نور به مدت ۶ هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند. در مرحلهٔ ۸ برگی گیاهان تحت سطوح مختلف شوری ناشی از NaCl شامل صفر، ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس‌برمتر قرار گرفتند. نمونه‌برداری از برگ‌ها در ۵ زمان ۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری با استفاده از ازت مایع انجام گرفت و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

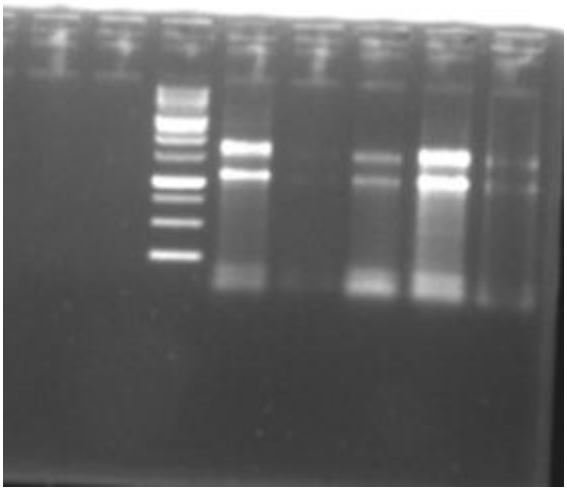
استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از پودر کردن بافت برگ در هاون چینی با استفاده از ازت مایع، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus™ (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده بر روی یخ انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتوفتومتر و ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید (شکل ۱). سنتز cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از کیت (Fermentas, Lithuania) LIFE SCIENCE#K1621 انجام گرفت. برای انجام این کار ابتدا ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بهمراه ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده به یک تیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری استریل ریخته شد سپس ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT به این مخلوط اضافه گردید. بعد از انجام سانتریفوژ پالسی، تیوب حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. پس از سرد کردن تیوب حاوی مواد بر روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کُند) انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، ۱ میکرولیتر آنزیم RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر dNTP Mix (۱۰ میلی‌مولار) به تیوب حاوی مواد اضافه گردید. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، تیوب حاوی مواد به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی صحت واکنش سنتز cDNA و آلودگی نداشتن به DNA ژنومی، انواع کنترل‌ها در واکنش طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت مذکور در نظر گرفته

شد. کنترل‌ها شامل موارد زیر بودند: ۱- کنترل منفی بدون آنزیم Reverse transcriptase که تمامی اجزای واکنش سنتز به جز آنزیم Reverse transcriptase استفاد شد و به منظور کنترل آلودگی با DNA ژنومی بود، ۲- کنترل منفی بدون الگو (Negative template control) که در این واکنش تمامی اجزای واکنش به جز RNA در نظر گرفته شد که برای کنترل نداشتن آلودگی در مواد واکنش بود، ۳- کنترل مثبت؛ سنتز cDNA با استفاده از RNA موش موجود در کیت که برای اطمینان از صحت انجام واکنش سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

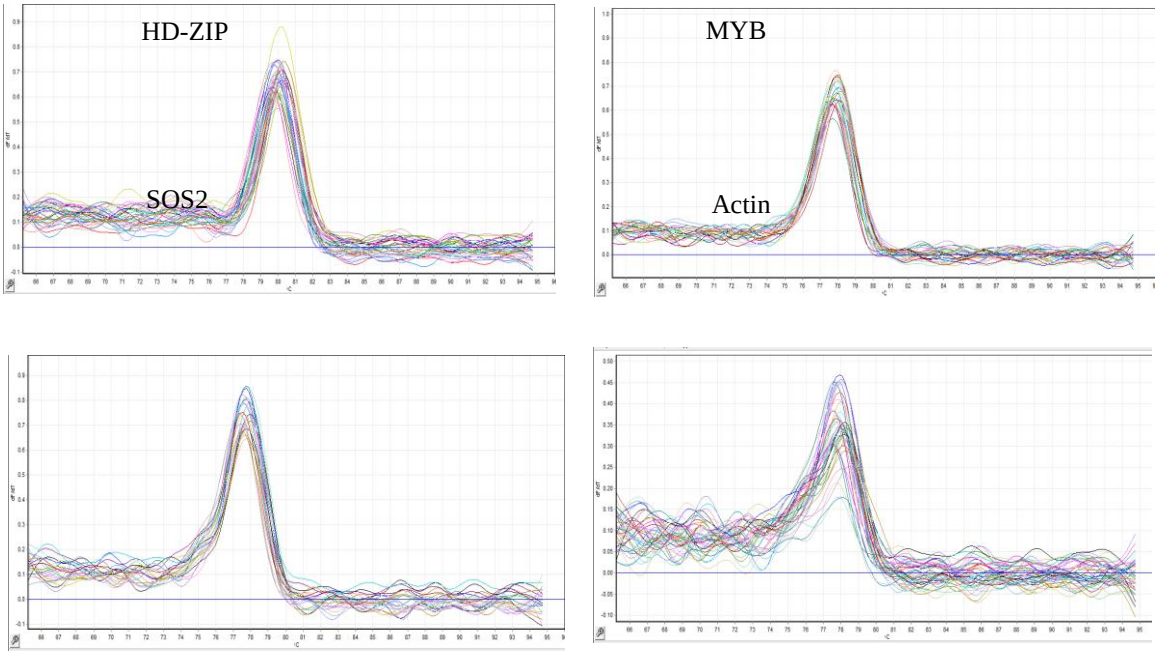
واکنش Real Time RT-PCR

جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های *HD-ZIP* و *MYB-related* از آغازگرهای طراحی شده توسط درویش‌زاده و همکاران (۶) استفاده شد (جدول ۲). برای مطالعه تغییرات بیان نسبی ژن *SOS2* ابتدا توالی کد کننده ژن از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 (https://primer3.ut.ee/)، Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) و Oligo analyzer (https://oligo-analyzer.software.informer.com/1.0/) طراحی شد (جدول ۲). واکنش با در نظر گرفتن ۳ تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر که شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرومولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ میکروگرم) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود، در دستگاه Rotor-Gene Q (کیاژن، آمریکا) با استفاده از برنامه‌ی دمایی ۱۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای مختص هر آغازگر و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از اتمام چرخه‌های PCR منحنی تکثیر و ذوب برای هر ژن به دست آمد. اختصاصی بودن آغازگرها جهت انجام واکنش PCR، با وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی ذوب فرآورده‌های تکثیر PCR تایید شدند (شکل ۲). جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از RT-PCR از ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. سنجش تغییرات بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارایه شده توسط لیواک و اشمیتگن (۱۹) انجام گرفت.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد برای RNA استخراج شده از تعدادی از نمونه‌ها. ستون اول خط کش مولکولی bp ۵۰ است که شامل باندهای bp ۵۰-۱۰۰۰ است (شرکت Fermentase).

Figure 1. Electrophoresis results on 1% agarose gel for the extracted RNA. The first column is a molecular ruler (ladder) of 50 bp containing bands of 50-1000 bp (Fermentase Company).



شکل ۲- منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد بررسی (*HD-ZIP*، *MYB*، *SOS2* و *Actin*) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی گیاهان آفتابگردان تحت تنش شوری. در نمودارها محور ایکس دما (درجه سانتی‌گراد) و محور ایگرگ نسبت dF به dT است (dF/dT). به بیان دیگر، نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است که نشان دهنده‌ی میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می‌باشد.

Figure 2. Melting curves of studied transcription factors (*HD-ZIP*, *MYB*, SOS2 and *Actin*) in real time polymerase chain reaction of sunflower plants under salt stress. In all curves, X axis represent temperature (℃) and Y axis represent the dF/dT ratio. dF/dT ratio is the derivative of the function 'fluorescence vs. Temperature melting' that represents the rate of the fluorescence variation in the reaction.

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

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

شماره لاین	نام لاین	منشاء لاین	تنش (دسی زیمنس بر متر)	اشتباه استاندارد± میانگین						
				قطر ساقه (سانتی‌متر)	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	عملکرد دانه (گرم)	Relative water content (RWC, %)	K^+/Na^+ دمبرگ
۷۱	AS5305	فرانسه (ASGROW)	۲	۱۷/۰۸ ± ۱/۵۵	۱۲۸/۶۰ ± ۲/۹۴	۱۷/۰۰ ± ۲/۱۷	۱۴/۷۰ ± ۲/۲۳	۴۰/۰۷ ± ۴/۵۶	۶۶/۳۰ ± ۵/۰۱	۴/۴۸ ± ۰/۴۵
			۸	۱۵/۷۴ ± ۰/۸۱	۱۱۳/۵۰ ± ۱۰/۶۰	۱۳/۳۰ ± ۱/۹۸	۱۱/۸۰ ± ۲/۰۵	۳۸/۸۹ ± ۴/۷۳	۷۱/۱۸ ± ۲/۷۳	۲/۵۶ ± ۰/۰۹
۲۴	9CSA3	فرانسه (Caussade semences)	۲	۱۰/۵۲ ± ۰/۴۸	۹۲/۰۰ ± ۹/۴۰	۱۱/۴۰ ± ۰/۶۸	۹/۲۰ ± ۰/۴۹	۲۳/۲۷ ± ۳/۹۴	۶۶/۱۲ ± ۷/۰۵	۲/۸۶ ± ۰/۰۸
			۸	۱۰/۰ ± ۰/۵۶	۶۸/۲۰ ± ۶/۸۶	۱۱/۴۰ ± ۱/۲۱	۱۰/۳۰ ± ۱/۲۷	۱۲/۶۰ ± ۰/۸۵	۷۹/۹۰ ± ۵/۱۶	۰/۹۸ ± ۰/۰۴

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

Table 2. Oligonucleotide primers used in the real time RT-PCR

نام توالی	عملکرد	توالی آغازگر (′3→′5)	دمای اتصال (ºC)	اندازه محصول (bp)
CX946945	HD-Zip transcription factor	F: GCAGCACATCGAGGACATCA R: GGATCGCACCTCGTGGTTT	۵۷	۵۶
CD848175	MYB-related transcription factor	F: CCGCCACACGCATTCTCT R: CGAGCGCAGCAGCATCTA	۶۰	۶۶
XM_022114947	SOS2 (CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 24)	F: GAGTTTGTCACTGGAGGCGA R: GGTACACACCCTTGGAGTGG	۶۰	۱۳۰
AF282624	*Helianthus annuus* Actin	F: TCAATGTTCCCGCCATGTAT R: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	۵۷	۶۰

Bp: base pair; ºC: The degree Celsius

الگوی آماری استفاده شده

تجزیه داده‌های حاصل از میزان بیان نسبی ژن‌ها به صورت فاکتوریل (فاکتور اول: ۲ لاین آفتابگردان، فاکتور دوم: ۵ سطح تنش شوری و فاکتور سوم: ۴ زمان نمونه‌برداری) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این آزمایش ۲×۵×۴×۳=۱۲۰ واحد آزمایشی (کرت) در نظر گرفته شد و نمونه‌برداری مربوط به زمان‌های مختلف از واحدهای مستقل انجام گرفت؛ در این صورت معمولاً همبستگی بین زمان‌های مختلف ایجاد نمی‌شود و بنابراین تجزیه‌ها به جای انجام به صورت طرح اندازه‌های تکرار شده (Repeated measurement) به صورت فاکتوریل انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام گرفت. نمودارها با Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی (*MYB*، *HD-ZIP* و *SOS2*) نشان می‌دهد که اثر ساده ژنوتیپ، تنش شوری و مدت زمان بعد از اعمال تنش شوری روی بیان نسبی ژن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq0.01$) معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). همچنین اثرات متقابل دو جانبهٔ ژنوتیپ × شوری، شوری × زمان و ژنوتیپ × زمان و اثر متقابل سه جانبهٔ ژنوتیپ × شوری × زمان بر روی بیان ژن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد ($p\leq0.01$) معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات بیان نسبی ژن‌های *MYB*، *HD-ZIP* و *SOS2* در لاین‌های آفتابگردان روغنی طی زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش شوری

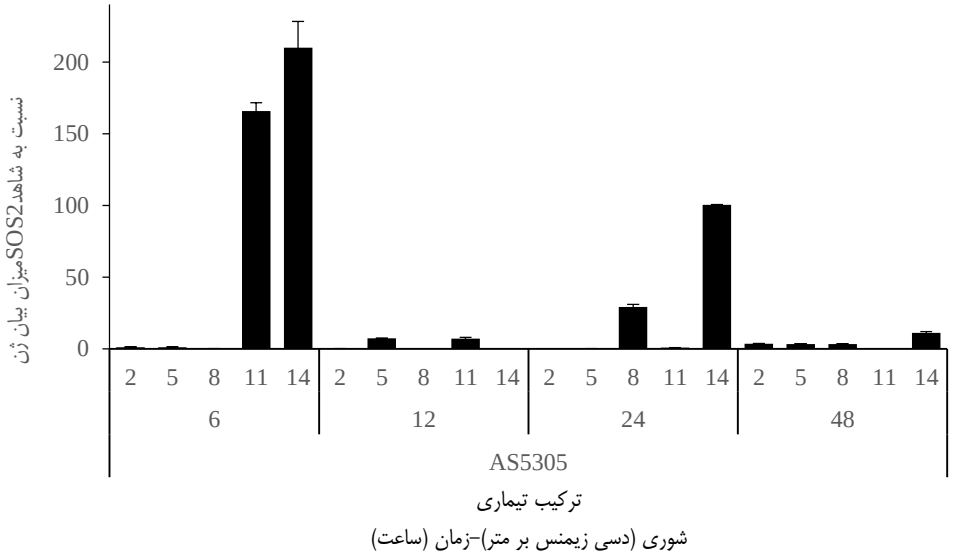
Table 3. Analysis of variance for transcript variations of MYB, HD-ZIP and SOS2 genes in the studied oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines at different times after applying salinity stress

منبع تغییرات	Degree of freedom (df)	Mean square (MS)		
		SOS2	*MYB-related*	*HD-ZIP*
شوری	۴	۸۱۳۵/۳۵**	۱۷۹/۰۱**	۱۷۰/۷۵**
ژنوتیپ	۱	۱۵۶۶۳/۳۸**	۲۲۰/۵۷**	۳۱۰/۴۴**
زمان	۳	۱۰۳۷۸/۸۸**	۲۵۳/۱۴**	۳۶۶/۳۸**
ژنوتیپ × شوری	۴	۵۶۶۸/۸۳**	۲۰۶/۵۷**	۱۲۰/۸۰**
زمان × شوری	۱۲	۴۹۶۹/۴۲**	۲۰۴/۰۸**	۲۳۹/۸۹**
ژنوتیپ × زمان	۳	۶۹۵۳/۵۴**	۱۴۱/۶۸**	۱۵۸/۹۶**
زمان × ژنوتیپ × شوری	۱۲	۳۲۴۰/۳۸**	۲۳۵/۶۹**	۲۲۵/۶۰**
اشتباه	۷۸	۹۶۹/۳۹	۹/۵۷	۳۰/۰۰
ضریب تغییرات (CV)		۲۰/۷۶	۱۶/۲۷	۱۶/۲۱

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

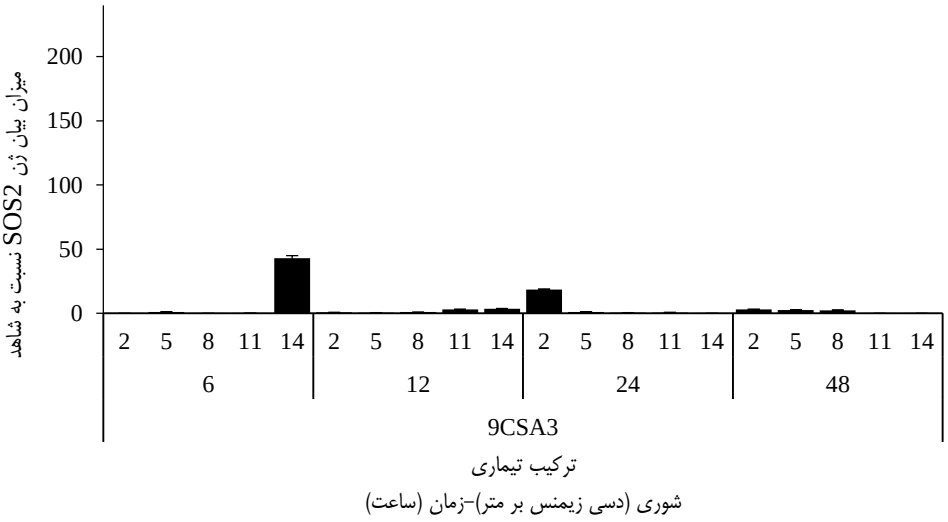
بررسی بیان ژن *SOS2*

بررسی الگوی بیان نسبی ژن SOS2 نشان داد در لاین AS5305 (لاین متحمل) در کوتاه مدت در شوری‌های ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر و در بلند مدت در شوری‌های ۸ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر نسبت به شاهد بیان ژن افزایش یافته است. در این لاین افزایش بیان در ۴۸ ساعت خصوصاً در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر نیز مشاهده شد (شکل ۳). در مقایسه روند افزایش بیان در زمان‌های مختلف از کوتاه مدت به بلند مدت کاهش در افزایش بیان مشاهده می‌شود. در لاین 9CSA3 افزایش بیان در کوتاه مدت در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر و در بلند مدت در شوری ۲ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۴). در مقایسه دو لاین مشاده می‌شود که عمده افزایش بیان در لاین AS5305 اتفاق افتاده است و در مقایسه میزان افزایش بیان در شوری و زمان متناظر در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 می‌باشد.



شکل ۳- الگوی بیان ژن *SOS2* در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی (لاین مقاوم) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 3. Expression profiling of *SOS2* 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.



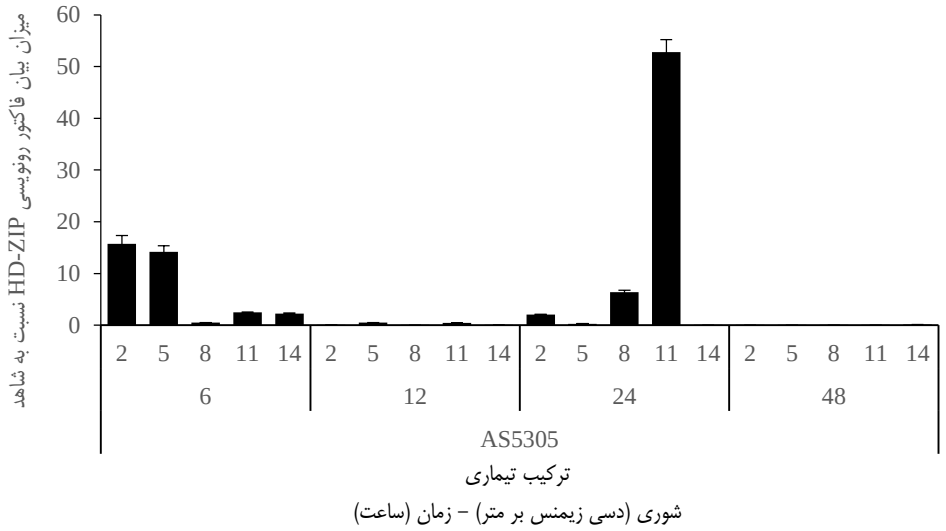
شکل ۴- الگوی بیان ژن *SOS2* در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 4. Expression profiling of *SOS2* 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.

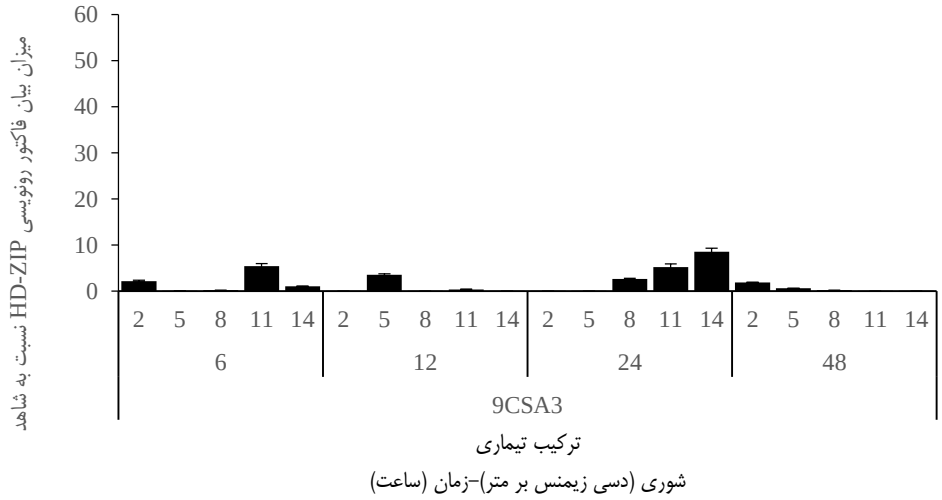
بررسی بیان ژن *HD-ZIP*

بررسی الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی HD-ZIP نشان داد که میزان بیان نسبی ژن در لاین AS5305 (لاین متحمل) نسبت به شاهد (عدم شوری یا زمان صفر) در زمان کوتاه (۶ ساعت بعد از اعمال تنش) در شوری‌های ۲، ۵، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر افزایش یافته است (شکل ۵). مقدار افزایش بیان نسبت به شاهد (شرایط نرمال) در شوری‌های ۲ و ۵ دسی زیمنس بسیار بیشتر از شوری‌های ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر می‌باشد. افزایش بیان در این لاین همچنین در زمان بیشتر (دیرتر) (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) در شوری‌های ۸ و ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر دیده شد (شکل ۵). در لاین 9CSA3 (لاین حساس) افزایش

بیان در شوری‌های ۲ و ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر دیده شد؛ منتها افزایش مقدار بیان در شوری ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر بیشتر از ۲ دسی‌زیمنس بر متر بود. در این لاین افزایش بیان همچنین در زمان بیشتر (دیرتر) (۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) در شوری ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر دیده شد (شکل ۶). در مقایسه دو لاین مشخص می‌شود در هر دو لاین در زمان کوتاه و بلند افزایش بیان در هر دو لاین دیده می‌شود ولی مقدار افزایش بیان در شوری‌های متناظر در غالب اوقات در لاین AS5305 بیشتر از 9CSA3 می‌باشد. تنها در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر افزایش مختصر در بیان ژن نسبت به شاهد در لاین 9CSA3 مشاهده شد در حالی که در این سطح شوری افزایشی در بیان ژن در لاین AS5305 مشاهده نشد.



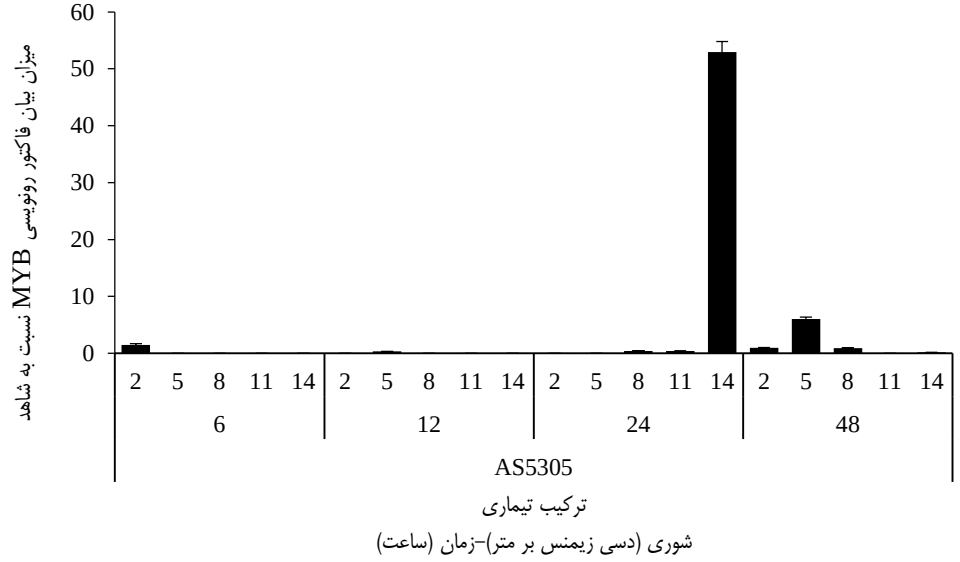
شکل ۵- الگوی بیان ژن نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی *HD-ZIP* در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی (لاین متحمل) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.
Figure 5. Expression profiling of *HD-ZIP* gene in AS5305 oily sunflower (*Helianthus annuus* 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 ۶- الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی *HD-ZIP* در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.
Figure 6. Expression profiling of *HD-ZIP* 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.

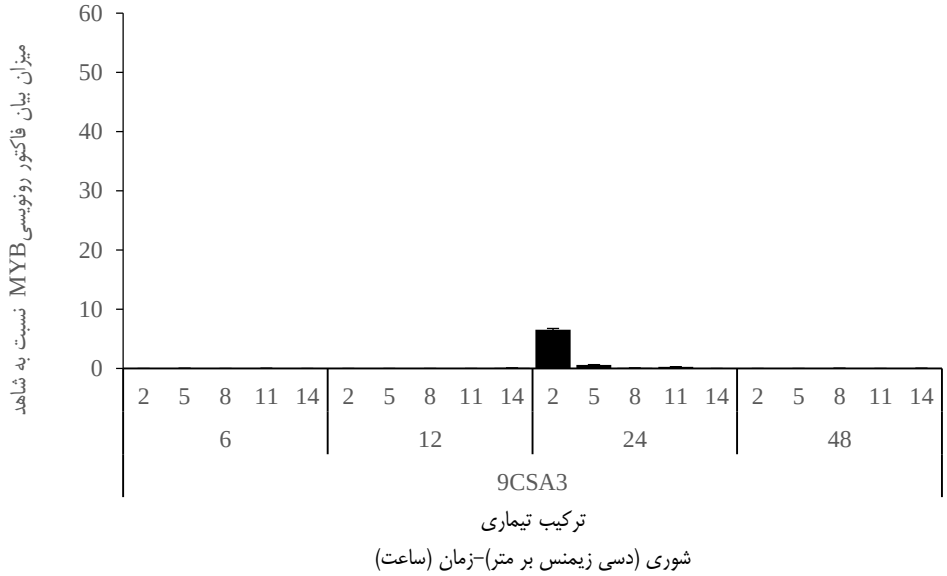
بررسی بیان ژن مرتبط با *MYB*

بررسی الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی مرتبط با MYB نشان داد میزان بیان نسبی ژن در لاین AS5305 (لاین مقاوم) در بلند مدت در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش در شوری ۱۴ و در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش در شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر افزایش یافت (شکل ۷). در مقایسه دو زمان افزایش بیان ژن در لاین در ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر بسیار بیشتر از ۵ دسی زیمنس بر متر بود. در لاین 9CSA3 (لاین حساس) افزایش بیان تنها ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش در ۲ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۸). مقایسه دو لاین نشان داد که عمده افزایش بیان ژن در لاین AS5305 رخ داده است و حتی مقدار افزایش بیان در لاین AS5305 بسیار بیشتر از 9CSA3 است.



شکل ۷– الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی *MYB-related* در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی (لاین مقاوم) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 7. Expression profiling of *MYB-related* 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 ۸– الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی *MYB-related* در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 6. Expression profiling of *MYB-related* 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.

در این مطالعه، بررسی بیان نسبی سه ژن *SOS2*، *MYB-related* و *HD-ZIP* تحت تنش شوری در ۲ لاین آفتابگردان روغنی در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تنش بررسی گردید. این ژن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی به‌ترتیب در انتقال سیگنال (۹، ۱۰) و به عنوان عوامل نسخه‌برداری (۹) درگیر هستند. طبق نتایج حاصل الگوی بیان هر سه ژن مورد بررسی (*SOS2*، *MYB-related* و *HD-ZIP*) در لاین‌های مورد مطالعه در پاسخ به تنش شوری متفاوت است. مقایسه دو لاین نشان می‌دهد که عمده افزایشِ بیان در لاین AS5305 اتفاق افتاده است و در جایی‌که افزایش بیان در لاین 9CSA3 نیز دیده می‌شود در مقامِ مقایسه، میزان افزایش بیان در شوری و زمان‌های متناظر در لاین AS5305 (لاین متحمل) بیشتر از لاین 9CSA3 (لاین حساس) می‌باشد. درکِ سیگنالِ تنش از محیط بیرونی اولین گامی است که توسط گیرنده‌هایی مانند کانال‌های یونی، هیستیدین کینازها، گیرنده‌هایی مانند کیناز (RLK) و G–پروتئین جفت شده با گیرنده‌ها (GPCR) آغاز می‌شود. سپس درکِ سیگنال با رهاسازی پیام رسان‌هایِ ثانویه مانند Ca^{2+}، ROS، نوکلئوتیدهای حلقوی و اینوزیتول فسفات (InsP) دنبال می‌شود. این پیام رسان‌های ثانویه به نوبه‌ی خود مسیرهای اصلی انتقال سیگنال یعنی CBL-CIPK (SOS وابسته به کلسیم)، CDPK (پروتئین‌های حسگر Ca^{2+}) و MAPK را فعال می‌کنند که منجر به فسفوریلاسیون و فعال‌سازی فاکتورهای نسخه‌برداری می‌شوند. فاکتورهای نسخه‌برداری به مناطق پروموتر ژن‌های پاسخ دهنده به تنش (از قبیل ژن-های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پاسخگو به آب کشیدگی، تنظیم کنندهٔ اسمز از قبیل پرولین، پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین‌زایی) متصل می‌شوند و بیان آنها را برای ایجاد پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی تنظیم می‌کنند (۹).

مسیر SOS وابسته به کلسیم اولین مسیرِ مشخص شدهٔ CBL-CIPK است که در هنگام تنش یونی فعال می‌شود. پروتئین‌های شبه کلسینورین B (CBL) پروتئین های حسگر Ca^{2+} هستند که با CIPK ها (پروتئین کیناز فعال کننده CBL) تعامل برقرار کرده و آنها را فعال می‌نمایند و مجموعه CBL-CIPK را تشکیل می‌دهند (۹). متعاقب تنش، سطح Ca^{2+} به طور گذرا افزایش می‌یابد و این افزایش توسط SOS3/CBL4 درک می‌شود (۱۶). در حضور Ca^{2+}، SOS3 به طور فیزیکی با SOS2/CIPK24 که کد کننده پروتئین کیناز سرین/ترئونین است، تعامل برقرار می‌کند (۷). در پیِ تعامل، SOS2 فسفوریله شده و SOS1 را در غشای پلاسما فعال می‌کند که به عنوان آنتی‌پورتر Na^{+}/H^{+} عمل می‌کند.

تنظیم رونویسیِ ژن‌های پاسخ دهنده به تنش از طریق فاکتورهای رونویسی، یا از مسیر وابسته به اسید آبسیزیک (ABA) یا مستقل از ABA صورت می‌گیرد (۹). به طور کلی، هر دو مسیر در هنگام تنش خشکی و شوری شرکت می‌کنند، در حالی که در پاسخ به تنش سرما فقط مسیر مستقل از ABA عمل می‌کند (۲۷). در مسیر وابسته به ABA، عناصر عمل کننده همسوِ (cis-acting) پاسخگو به ABA (ABRE)، در پروموتر تعدادی از ژن‌های پاسخگو به تنش وجود دارند. فاکتورهای رونویسی از قبیل MYB/MYC به موتیف MYBRS/MYCRS (توالی تشخص MYB/MYC) این ژن‌ها متصل شده و بدین ترتیب بیان این ژن‌ها را در پاسخ به تنش فعال می‌کنند (۹). عوامل رونویسی از قبیل HD-ZIP به طور مستقل از ABA در تنش خشکی و شوری درگیر می‌شوند (۹).

در تحقیقی بیان ژن *SOS* در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس تحت تنش شوری بررسی گردید. طی این بررسی شش گیاه آرابیدوپسیس با ژن‌های *ATNHX1*, *SOS3*, *ATNHX1+SOS3*, *SOS1+SOS2+SOS3*, *SOS1*, *SOS2+SOS3* تراریخت و با آنالیز نودرن بلات نتیجهٔ تراریختی تایید شد. گیاهان تراریخت شده با ژن *ATNHX1* مقاومت قابل توجهی به شوری نشان نداند، ولی گیاهان تراریخت شده با ژن *SOS* تحمل بالایی نسبت به شوری نشان دادند (۳۴). در آزمایشی نقش عامل رونویسی MYB در برنج در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج نشان داد که *R2R3MYB* و *OsMYB2* موجب تحمل به شوری، خشکی و سرما در برنج می‌شود (۳۳). شناسایی ژن‌های عامل رونویسی MYB تحت تنش‌های غیرزیستی در ذرت توسط چن و همکاران (۴) انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ۲۲ ژن از خانواده MYB تحت تنش‌های غیرزیستی در ذرت القاء می‌شوند. بیش بیانِ ژن *ZmMYB30* در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس باعث افزایش مقاومت به شوری و همچنین افزایش بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی در گیاهان گردید. بیش بیان *MYB TFTaSIM* گندم در آرابیدوپسیس با فعال‌سازی ژن‌های *RD22* و *RD29A* پاسخگو به تنش، باعث تحمل گیاهان تراریخته به تنش شوری شد (۳۵). اخیراً، بیش بیان *OsMYB6* در برنج تراریخته باعث افزایش محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD شده و بدین ترتیب تحمل گیاهان تراریخته به خشکی و نمک را افزایش داد (۲۹). آنالیز ژنومی و ترنسکریپتومی عوامل رونویسی خانواده HD-ZIP و پاسخ آن‌ها به تنش غیر زیستی در گیاه چای توسط شن و همکاران (۲۶) انجام شد. در این مطالعه ۳۳ عامل رونویسی HD-Zip براساس پایگاه‌های اطلاعاتی ژنومی و ترنسکریپتومی گیاه چای انتخاب شده و دُمین های حفاظت شده و موتیف‌های عمومی این عامل رونویسی پیش گویی و آنالیز شد. نتایج حاصل از تجزیه پروفایل بیانی متفاوت ژن *Cshdz* نشان داد که بیان این ژن تحت تنش‌های غیر زیستی مختلف متفاوت بوده و ارتباط مستقیمی بین افزایش بیان این ژن با تحمل به تنش غیر زیستی در گیاه چای وجود دارد.

در یک بررسی با به کارگیری فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی تغییرات بیان دو عامل رونویسی WRKY و AP2Domain در شرایط مختلف تنش شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در دو لاین مختلف آفتابگردان روغنی (AS5305 و 9CSA3) بررسی شد. نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان در مرحله ۸ برگی در پنج

زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری انجام شد. نتایج تجزیه‌های آماری نشان داد الگوی بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی مورد مطالعه در لاین‌های مورد بررسی متفاوت است؛ به طوری که میزان بیان نسبی هر دو عامل رونویسی (WRKY و AP2Domain) در لاین AS5305 (لاین متحمل) نسبت به لاین 9CSA3 (لاین حساس) در شوری‌های شدید (به ترتیب در ۱۱ و ۸ دسی زیمنس بر متر) ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش به طور فاحش افزایش یافته است. محققین نتیجه‌گیری کردند که نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت عوامل رونویسی WRKY و AP2Domain در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش شوری می‌باشد (۱۳).

در پژوهش دیگری بررسی بیان نسبی ژن‌های *PMP3* و *Dehydrin* در سطوح مختلف شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ دسی زیمنس بر متر) در دو لاین AS5305 (لاین متحمل) و 9CSA3 (لاین حساس) آفتابگردان دانه روغنی با استفاده از تکنولوژی Real time PCR مطالعه شد. نمونه‌برداری 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 مراحلِ اولیه‌ی اعمال تنشِ شوری، بیشترین میزان بیانِ ژن *PMP3* در لاینِ 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*، افزایشِ بیان در مراحل اولیه‌ی تنش شوری فقط در لاین 9CSA3 مشاهده شد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری در شوری های شدیدتر (۱۴ ds/m) افزایش بیان در لاین AS5305 ۱/۵ 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. محققین فرضیه‌سازی کردند که احتمالاً غلظت شدیدتر تنش شوری در مراحل پیشرفته و پیشرفته‌تر، بیان ژن *Dehydrin* را در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 القاء می‌نمایند (۱۱).

تنش شوری مهمترین عامل محدود کننده میزان محصول گیاهان زراعی به شمار می‌رود. بنابراین تولید گیاهان مقاوم به شوری برای فراهم کردن نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. تحمل تنش غیر زنده در گیاهان یک ویژگی چند ژنی است، بنابراین، هدف‌گیری یک ژن منفرد ممکن است در انتقال سطح مطلوب تحمل به تنش بسیار کارآمد نباشد. بنابراین، هدف قرار دادن یک ژن فاکتور رونویسی که ژن‌های درگیر در مسیرهای مختلف تنش زا را تنظیم کند یک گزینه جالب به نظر می‌رسد (۳۱).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیان ژن درگیر در انتقال پیام (*SOS2*) و عوامل رونویسی *HD-ZIP* و *MYB-related* در AS5305 (لاین متحمل) در مقایسه با 9CSA3 (لاین حساس) تحت تنش شوری به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت این ژن‌ها در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش شوری می‌باشد. در میان تنش‌های غیرزنده، شوری مهمترین عامل محدود کننده میزان محصول گیاهان زراعی است. تولید گیاهان مقاوم به شوری جهت تامین نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از مهمترین چالش‌های جهانی است. تحمل تنش غیرزنده در گیاهان طبیعت پلی ژنتیک دارد. بنابراین، هدف گیری یک ژن منفرد ممکن است در انتقال سطح مطلوب تحمل به تنش بسیار کارآمد نباشد. در این راستا انتقال ژن فاکتور رونویسی از طریق مهندسی ژنتیک که ژن‌های درگیر در مسیرهای مختلف تنش زا را تنظیم کند یک گزینه جالب به نظر می‌رسد. از طرف دیگر در این مطالعه با تایید مقاومت لاین AS5305 به تنش شوری در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم به شوری در اصلاح نبات استفاده نمود.

منابع

1. Ahmadpour, S., O. Sofalian and R. Darvishzadeh. 2017. Genetic diversity of oily sunflower lines under normal and salt stress conditions using multivariate statistical analysis methods. Iranian Journal of Field Crop Science, 48(2): 399-411.
2. Behera, L.M. and P. Hembram. 2021. Advances on plant salinity stress responses in the post-genomic era: a review. Journal of Crop Science and Biotechnology, 24: 117-126.
3. Cerboncini, C., G. Beine, P.C. Binsfeld, B. Dresen, H. Peisker, A. Zerwas and H. Schnabl. 2002. Sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in a natural *Helianthus* gene pool. Helia, 25(36): 167-176.
4. Chen, Y. H., Y.Y. Cao, L.J. Wang, L.M. Li, J. Yang and M.X. Zou. 2018. Identification of MYB transcription factor genes and their expression during abiotic stresses in maize. Biologia Plantarum, 62(2): 222-230.
5. Chinnusamy, V., A. Jagendorf and J.K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45(2): 437-448.
6. Darvishzadeh, R., T. Hewezi, L. Gentzbittel and A. Sarrafi. 2007. Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower–*Phoma macdonaldii* interactions. Crop Protection, 27(3-5): 740-746.

7. Gao, H., F. Brandizzi, C. Benning and R.M. Larkin. 2008. A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 16398-16403.
8. Giacomelli, J.I., K.F. Ribichich, C.A. Dezar and R.L. Chan. 2010. Expression analyses indicate the involvement of sunflower WRKY transcription factors in stress responses, and phylogenetic reconstructions reveal the existence of a novel clade in the Asteraceae. Plant Science, 178(4): 398-410.
9. Goel, P., M. Bhuria, R. Sinha, T.R. Sharma and A.K. Singh. 2019. Promising Transcription Factors for Salt and Drought Tolerance in Plants. In: Singh S., Upadhyay S., Pandey A., Kumar S. (eds) Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0690-1_2
10. Gupta, B. and B. Huang. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. International Journal of Genomics, 2014: Article ID 701596, 18 pages. https://doi.org/10.1155/2014/701596.
11. Habibi, N., R. Darvishzadeh and B. Abdollahi Mandoulakani. 2020. Studying the expression pattern of PMP3 and Dehydrin genes in AS5305 and 9CSA3 oily sunflower lines under salt stress. Journal of Crop Breeding, 12(35): 225-237. URL: http://jcb.sanru.ac.ir/article-1-1105-fa.html
12. Hoang, X., N. Thu, N. Thao and L.S. Tran. 2014. Transcription factors in abiotic stress responses: their potentials in crop improvement. In: Ahmad, P., M. Wani, M. Azooz, L.S. Phan Tran. (eds), Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. Springer, New York, NY. Pp. 337-366. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8824-8_14.
13. Hoseinpour, F., R. Darvishzadeh and B. Abdollahi. 2019. Study on the expression of transcription factors WRKY and AP2Domain in oily sunflower under salt stress. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 8(2): 178-188.
14. Khan, W.D., M. Tanveer, R. Shaukat, M. Ali and F. Pirdad. 2020. An Overview of Salinity Tolerance Mechanism in Plants. In: Hasanuzzaman M., & M. Tanveer. (eds), Salt and Drought Stress Tolerance in Plants. Signaling and Communication in Plants. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_1
15. Khatoon, A., M.S. Qureshi and M.K. Hussain. 2000. Effect of salinity on some yield parameters of sunflower (*Helianthus annuus* L.). International Journal of Agriculture & Biology, 2(4): 382-384.
16. Kolukisaoglu, U., S. Weinl, D. Blazevic, O. Batistic and J. Kudla. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. Plant Physiology, 134: 43-58
17. Kumar, S.G., A.M. Reddy and C. Sudhakar. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Science, 165(6): 1245-1251.
18. Lentz, D. L., M.D. Pohl, J.L. Alvarado, S. Tarighat, and R. Bye. 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(17): 6232-6237.
19. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402-408.
20. Morsali Aghajari, F., R. Darvishzadeh, H. Hatami Maleki, E. Gholinezhad and A. Kalantar. 2019. Selection of salinity tolerant lines of sunflower using some physiological characteristics. Journal of Crop Breeding, 11(31): 185-195. URL: http://jcb.sanru.ac.ir/article-1-899-fa.html
21. Nasimi, A. 2005. An reportation on oil drainage industries and herbal oil situation with emphasis on cotton oil seeds in Iran. Islamic Parliament Research Center of the Islamic Republic of IRAN. Report Number 7445. file:///C:/Users/WINDOW~1/AppData/Local/Temp/7445.pdf.
22. Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(3): 324-349.
23. Rashid, M., S. Ejaz and K.H. Shah. 2020. Regulatory role of transcription factors in abiotic stress responses in plants. In: Hasanuzzaman, M. (ed), Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_19
24. Sadat Noori, S.A., L. Ferdosizadeh, A. Izadi-Darbandi, M. Mortazavian, S. Mohammad and S. Saghafi. 2011. Effects of salinity and laser radiation on proline accumulation in seeds of spring wheat. Plant Physiology & Breeding, 1(2): 11-20.
25. Schneiter, A.A. and J.F. Miller. 1981. Description of sunflower growth stages. Crop Science, 21: 901–903.
26. Shen, W., H. Li, R. Teng, Y. Wang, W. Wang and J. Zhuang. 2019. Genomic and transcriptomic analyses of HD-Zip family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). Genomics, 111(5): 1142-1151.
27. Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58: 221-227.

28. Sujit, Roy. 2016. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. Plant Signaling & Behavior, 11: 1, e1117723.
29. Tang, J., Q. Liu, H. Yuan, Y. Zhang and S. Huang. 2018. Molecular analysis of a novel alkaline metal salt (NaCl)-responsive WRKY transcription factor gene IlWRKY1 from the halophyte *Iris lactea* var. chinensis. International Biodeterioration & Biodegradation, 127: 139-145.
30. Van Zelm, E., Y. Zhang and C. Testerink. 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. Annu Rev Plant Biol, 71: 403-433.
31. Wani S.H., V. Kumar, T. Khare, R. Guddimalli, M. Parveda, K. Solymosi, P. Suprasanna and P.B. Kavi Kishor. 2020. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. Planta, 251: 76. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03366-6.
32. Witzel, K., A. Weidner, G.K. Surabhi, A. Börner and H.P. Mock. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. Journal of Experimental Botany, 60(12): 3545-3557.
33. Yang, A., X. Dai and W.H. Zhang. 2012. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. Journal of Experimental Botany, 63(7): 2541-2556.
34. Yang, Q., Z.Z. Chen, X.F. Zhou, H.B. Yin, X. Li, X.F. Xin, X.H. Hong, J.K. Zhu and Z. Gong. 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Molecular Plant, 2(1): 22-31.
35. Yu, T.F., Z.S. Xu, J.K. Guo, Y.X. Wang, B. Abernathy, J.D. Fu, X. Chen, Y.B. Zhou, M. Chen, X.G. Ye and Y.Z. Ma. 2017. Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene SeCspA. Scientific Reports, 7: 44050.

Evaluation of Relative Changes in the Expression Level of *SOS2*, *MYB-related* and *HD-ZIP* Genes in Oil Seed Sunflower Lines under Salinity Stress

Faezeh Hoseinpour[1], Reza Darvishzadeh[2], Babak Abdollahi Mandoulakani[2], Nahid Habibi[1], Esmael Dardan[3] and Ali Ranjbar[4]

1- Graduated M.Sc. Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University
2- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University (Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
3- PhD Student of Plant Breeding-Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University
4- Graduated M.Sc. Student in Agronomy, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University
Received: May 5, 2021 Accepted: July 26, 2021

Abstract

Numerous environmental factors affect the growth and development of crop plants. Salinity affects crop production through mineral imbalance (toxicity or deficiency of elements), osmotic and oxidative stresses. In this study, using real-time PCR technology, changes expression levels of *SOS2*, *MYB-related* and *HD-ZIP* genes were evaluated under different salinity stress conditions (2, 5, 8, 11 and 14 dS/m) in two different oil seed sunflower lines (AS5305 and 9CSA3). Leaf sampling was performed at 8-leaf stage at four times; 6, 12, 24 and 48 hours after salinity stress application. *SOS2* involve in signal transduction and *MYB-related* and *HD-ZIP* act as transcription factors under abiotic stresses. According to the results, the expression pattern of all three genes is different in the studied lines in response to salinity stress. Comparison of the two lines shows that the major increase in expression occurred in line AS5305, and where an increase in expression in line 9CSA3 is seen, in comparison, the rate of increase in corresponding times and salinity is higher in line AS5305 (tolerant line) than that in line 9CSA3 (sensitive line). The results indicate the positive role of these genes in the mechanism of sunflower resistance to salinity stress. On the other hand, in this study, by confirming the resistance of AS5305 line to salinity stress at the molecular level, it is possible to potentially use this line in the production of salinity-resistant hybrid cultivars in plant breeding programs.

Keywords: Oil seed crops, Real-time PCR, Salinity tolerance, Transcriptomic changes, Transcription factors