



## "مقاله پژوهشی"

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

فائزه حسین‌پور<sup>۱</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۲</sup>، بابک عبدالهی مندولکانی<sup>۳</sup>، ناهید حبیبی<sup>۱</sup>، اسماعیل داردان<sup>۳</sup> و علی رنجبر<sup>۴</sup>

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، (تویسته مسؤول: 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: ۱۶۵ 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 (سمیت عناصر یا کمبود آنها)، تنفس اسمزی و تنفس اکسیداتیو تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این مطالعه با به کارگیری تکنولوژی PCR در زمان واقعی تغییرات سطح ژن‌های *SOS2* و *MYB-related* در شرایط مختلف تنفس 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 تنفس شوری انجام شد. این ژن‌ها تحت تنفس‌های غیرزیستی در انتقال سیگنال (*SOS2*) و به عنوان عوامل نسخه‌برداری (*HD-ZIP* و *MYB-related*) درگیر هستند. طبق نتایج حاصل، الگوی بیان هر سه ژن مورد بررسی در لاین‌های مورد مطالعه در پاسخ به تنفس شوری متفاوت بود. مقایسه میزان بیان ژن‌ها در دو لاین نشان می‌دهد که در حالات مختلف مورد بررسی عمده افزایش بیان در لاین *AS5305* اتفاق افتاده است؛ در جاییکه افزایش بیان در لاین *9CSA3* دیده می‌شود در مقام مقایسه در آنچه میزان افزایش بیان در لاین *AS5305* (لاین حساس) کمتر از لاین *AS5305* (لاین متحمل) می‌باشد. نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت این ژن‌ها در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنفس شوری می‌باشد. از طرف دیگر در این مطالعه با تأیید مقاومت لاین *AS5305* به تنفس شوری در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم به شوری در اصلاح نبات استفاده نمود.

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

تولید فرم‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی است که این فرم‌ها موجب آسیب اکسیداتیو به بسیاری از قسمت‌های سلول می‌گرددن (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 تنفس شوری است (۱۷). تحمل شوری در حقیقت توانایی گیاهان برای رشد و تکمیل چرخه زندگی در شرایط وجود غلظت بالایی از نمک‌های محلول در محیط ریزوسفر می‌باشد. یکی از ارکان تحمل، کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه تحت تنفس شوری است که در نتیجه تجمع بعضی از یون‌های محلول و یا سازگارسازها مانند کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدهای آزاد (پروولین، گلایسین، بتائین و ...) اتفاق می‌افتد (۱۴).

آفتابگردان جز گیاهان نیمه حساس به شوری است (۱۱، ۲۰). تنفس 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 تنفس، الگوی بیان هزاران ژن تغییر یابد، لیکن برخی از این ژن‌ها در پاسخ به تنفس و ایجاد مقاومت یا حساسیت گیاه نقشی کلیدی‌تر ایفا

## 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، دیپلولئید 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). تنفس شوری یکی از مهم‌ترین تنفس‌های غیرزیستی است که بر مقدار و کیفیت محصول گیاهان زراعی اثر منفی می‌گذارد. براساس آمار موجود شوری و خشکی وسیع ترین عوامل ایجاد کننده تنفس در گیاهان در سطح جهان بوده (۲۴) و سطح گستره‌ای 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 تنفس شوری است. شوری ترکیبی از دو تنفس اسمزی و یونی است (۵). تنفس اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبگیری از بافت‌های گیاهی می‌شود و بدین دلیل به آن خشکی فیزیولوژیک نیز می‌گویند. از سوی دیگر، مسمومیت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص بویژه سدیم ایجاد می‌گردد که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شود (۱۴، ۳۰). از اثرات ثانویه تنفس‌های اسمزی و یونی، افزایش

استفاده از  $\text{Na}^+$  برای تعادل اسمزی از طریق کده‌بندی  $\text{Na}^+$  درون واکوئل توسط ناقلین غیر همسوی واقع در تونوپلاست و (۳) ترشح  $\text{Na}^+$  می‌شد (۲). در این پژوهش تغییرات بیان نسبی دو عامل رونویسی *MYB* و *HD-ZIP* و زن عملکردی *SOS2* با تکنیک Real time PCR در دو لاین آفتاگردان روغنی با واکنش متفاوت به شوری ارزیابی شده است.

## مواد و روش‌ها

دو لاین خالص آفتاگردان 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  $3 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و با فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی / نور به مدت ۶ هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتدند. در مرحله ۸ برگی گیاهان تحت سطوح مختلف شوری ناشی از  $\text{NaCl}$  شامل صفر، ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زمینس بر متر قرار گرفتند. نمونه‌برداری از برگ‌ها در ۵ زمان،  $0$ ،  $12$ ،  $24$  و  $48$  ساعت بعد از اعمال تنش شوری با استفاده از ازت مایع انعام گرفت و به فریزر  $-80$  درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

## استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از پودر کردن یافت برگ در هاون چیزی با استفاده از ازت مایع، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus<sup>TM</sup> (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده بر روی بخ انعام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر و ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید (شکل ۱). سنتز cDNA تکرشارتی با استفاده از کیت (Fermentas, Lithuania) LIFE SCIENCE#K1621 (آغازگر الیگو dT به این انعام این کار ابتدا ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بهمراه ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده به یک تیوب  $0/0.2$  میلی‌لیتری استریل ریخته شد سپس ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT به این مخلوط اضافه گردید. بعد از انعام سانتریفیوژ پالسی، تیوب حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای  $65^\circ\text{C}$  قرار گرفت. پس از سرد کردن تیوب حاوی مواد بر روی بخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور گند) انجام گرفت. سپس  $4$  میکرولیتر بافر واکنش  $1/5X$  (واحد در میکرولیتر آنزیم RiboLock<sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor،  $1$  میکرولیتر آنزیم RevertAid<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase M-MuLV) واحد در میکرولیتر) و  $2$  میکرولیتر dNTP Mix ( $10$  میلی‌مolar) به تیوب حاوی مواد اضافه گردید. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، تیوب حاوی مواد به مدت یک ساعت در دمای  $42$  درجه سانتی‌گراد و به مدت  $5$  دقیقه در دمای  $72$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی صحت واکنش سنتز cDNA و آводگی نداشتن به DNA ژنومی، انواع کنترل‌ها در واکنش طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت مذکور در نظر گرفته

می‌نمایند. در این میان پروتئین‌های متصل شونده به DNA که نقش مرکزی را در تنظیم بیان زن‌ها ایفا می‌کنند، در کانون توجه محققان می‌باشد. عوامل نسخه‌برداری مهم‌ترین دسته از پروتئین‌های متصل شونده به DNA به شمار می‌أیند. عوامل نسخه‌برداری نقش مهمی در تنظیم بیان زن‌های پاسخ دهنده به تنش‌های زنده و غیرزنده از طریق فعلی کردن و یا مهار رونویسی بر عهده دارند (۱۲، ۱۳). این عوامل اغلب در بافت‌های خاص، در مرحله رشدی خاص و یا از طریق مسیرهای وابسته به یک محرك مثل تنش بیان می‌شوند و بیان زن‌های پاسخ‌گو به تنش را به صورت مشارکتی و یا به صورت مستقل کنترل می‌نمایند. تحقیقات مختلف صورت نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های مختلف صورت گرفته است. عوامل نسخه‌برداری سیاری متعلق به خانواده‌های AP2/EREBP، *MYB*, *bZIP* و *NAC* گزارش شده که در واکنش گیاهان به عوامل مختلف تنش‌زا شرکت می‌کنند. تعدادی از عوامل نسخه‌برداری، که سطح بیان زن‌های کدکننده آنها به طور مناسب تغییر نشان می‌دهد، در گیاهان مدل و زراعی ترازیخته ظرفیت تحمل به خشکی، شوری و دمای کمتر از حد مطلوب را بالا می‌برند (۱۴).

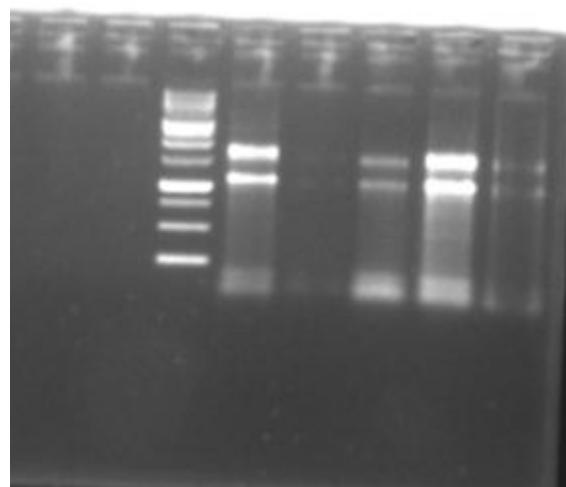
زن *HD-Zip* به عنوان یک عوامل نسخه‌برداری مهم در گیاهان، زن کد کننده‌ی پروتئینی از خانواده پروتئین‌های هومویباکس است که شامل هومویباکس و دُمین زیپ لوسینی اضافی است. دُمین هومویباکس شامل  $60$  باقیمانده اسید‌آمینه با توالی بسیار محافظت شده است که عمدتاً با Hef DNA ترکیب می‌شود. در دُمین زیپ لوسینی؛  $42-35$  اسید‌آمینه که نصف دُمین را شامل می‌شوند در تشکیل شکل دایمیریک پروتئین میانجیگری می‌نمایند. خانواده *MYB* یکی از بزرگترین و از لحاظ عملکردی متعدد ترین 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 مقابل پروتئین-پروتئین میانجیگری می‌نمایند و (۲) ناحیه متغیر C-ترمینال که مسئول تعديل فعالیت تنظیمی پروتئین هست، مشخص می‌شوند. سلسه‌ای گیاهی حاوی زیرخانواده پروتئین *MYB* با دامنه *R2R3* از نوع *MYB* هستند (۲۸). چندین عضو از خانواده *MYB* در *Arabidopsis*، برقج، ذرت، و سوبا شناسایی شده است که در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی از جمله چرخه سلولی و مورفوژنی سلول، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (۲۸). یک *SOS2* پروتئین کیناز سرین/ترنوزین با یک دُمین کاتالیتیک کینازی N-ترمینال و یک دُمین تنظیم کننده C-ترمینال را کَد می‌کند. این پروتئین در مسیر SOS در مشارکت با سایر پروتئین‌ها موجب تنظیم هوموستازی یونی از طریق (۱) دفع  $\text{Na}^+$  از سلول از طریق ناقلین غیر همسوی متصل به غشاء پلاسمایی  $\text{Na}^+/H^+$  یا از طریق محدود نمودن ورود  $\text{Na}^+$  (۲)،

(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 و اسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و 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 آغازگرهای جهت انجام واکنش PCR با وجود تها 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 ۲<sup>-ΔΔCT</sup> ارایه شده توسط لیواک و اشمیتگن (۱۹) انجام گرفت.

شد. کنترل‌ها شامل موارد زیر بودند: ۱- کنترل منفی بدون آنزیم Reverse transcriptase که تمامی اجزای واکنش سنتز به جز آنزیم Reverse transcriptase استفاده 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.

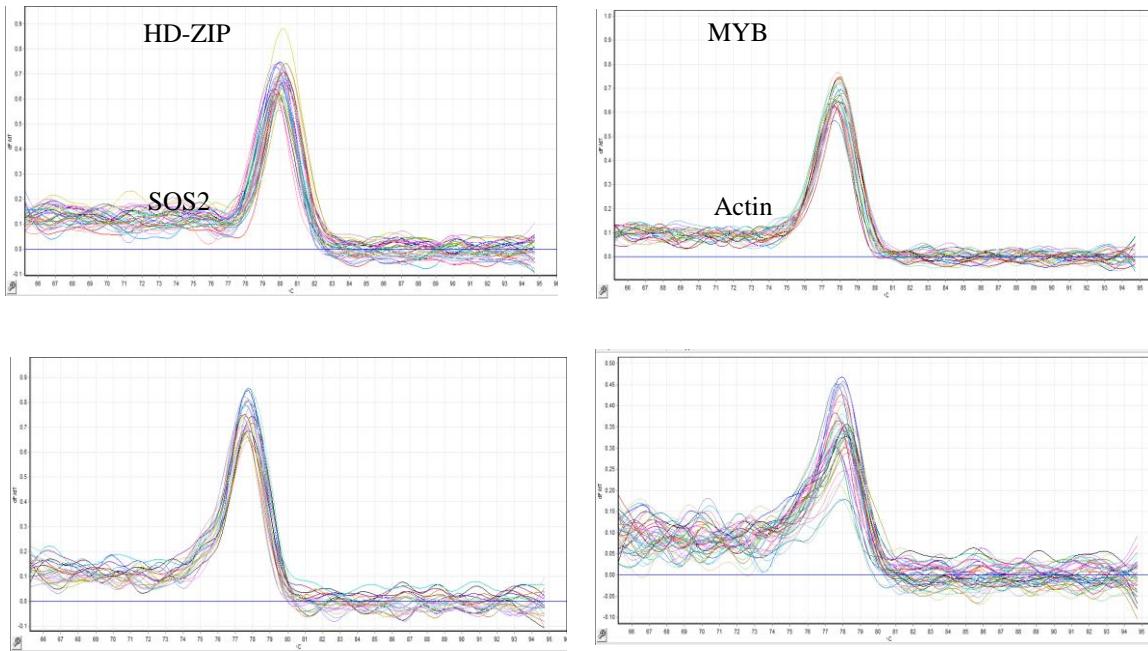
#### واکنش Real Time RT-PCR

جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های *MYB*- و *HD-ZIP* 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/>) Primer3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer3/>) Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Oligo analyzer (<https://oligo-analyzer.com/>) و (blast/ analyzer.software.informer.com/1.0/) طراحی شد



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

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- منحنی های ذوب ژن های مورد بررسی (*HD-ZIP*, *MYB*, *SOS2* و *Actin*) در واکنش زنجیره ای پلی مراز در زمان واقعی گیاهان آفاتابگردان تحت تنش شوری. در نمودارها محور ایکس دما (درجه سانتی گراد) و محور ایگرگ نسبت  $dF/dT$  به است (dF/dT). به بیان دیگر، نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است که نشان دهنده میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می باشد.

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 (°C) 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 مورفو‌لژیک 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

اشتباہ استاندارد $\pm$ میانگین											
شماره لاین	نام لاین	منشاء لاین	تنش (دسی زیمنس بر متر)	قطر ساقه (سانتی متر)	ارتفاع بوته (سانتی متر)	طول برگ (سانتی متر)	عرض برگ (سانتی متر)	عملکرد دانه (گرم)	Relative water content (RWC, %)	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> دمیرگ	
۷۱	AS5305	(ASGROW) فرانسه	۱۷/۰/۸ $\pm$ ۱/۵۵	۱۲۸/۶۰ $\pm$ ۲/۹۴	۱۷/۰/۰ $\pm$ ۲/۱۷	۴۰/۷۰ $\pm$ ۲/۲۳	۴۰/۰/۷ $\pm$ ۴/۵۶	۶۶/۳۰ $\pm$ ۵/۰۱	۴/۴۸ $\pm$ ۰/۴۵		
۷۴	9CSA3	(Caussade semences) فرانسه	۱۵/۷۴ $\pm$ ۰/۸۱	۱۱۳/۵۰ $\pm$ ۱۰/۶۰	۱۳/۳۰ $\pm$ ۱/۹۸	۱۱/۸۰ $\pm$ ۲/۰۵	۳۸/۸۹ $\pm$ ۴/۷۳	۷۱/۱۸ $\pm$ ۲/۷۳	۲/۵۶ $\pm$ ۰/۰۹		
۷۱	AS5305	(ASGROW) فرانسه	۱۰/۵۲ $\pm$ ۰/۴۸	۹۲/۰/۰ $\pm$ ۹/۴۰	۱۱/۴۰ $\pm$ ۰/۶۸	۹/۲۰ $\pm$ ۰/۴۹	۲۳/۲۷ $\pm$ ۳/۹۴	۶۶/۱۲ $\pm$ ۷/۰۵	۲/۸۶ $\pm$ ۰/۰۸		
۷۸	9CSA3	(Caussade semences) فرانسه	۱۰/۰ $\pm$ ۰/۵۶	۶۸/۲۰ $\pm$ ۶/۸۶	۱۱/۴۰ $\pm$ ۱/۲۱	۱۰/۳۰ $\pm$ ۱/۲۷	۱۲/۶۰ $\pm$ ۰/۸۵	۷۹/۹۰ $\pm$ ۵/۱۶	۰/۹۸ $\pm$ 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 (۵' → ۳')	دماي اتصال (°C)	اندازه محصول (bp) (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: GAGTTTGTCACTGGAGGCAG R: GGTACACACCCTGGAGTGG	۶۰	۱۳۰
AF282624	<i>Helianthus annuus</i> Actin	F: TCAATGTTCCGCCATGTAT R: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	۵۷	۶۰

Bp: base pair; °C: The degree Celsius

نرم افزار 9.4 SAS انجام گرفت. نمودارها با Excel رسم شدند.

### نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده های بیان نسبی ژن های مورد بررسی (*SOS2* و *HD-ZIP* و *MYB*) نشان می دهد که اثر ساده ژنوتیپ، تنش شوری و مدت زمان بعد از اعمال تنش شوری روی بیان نسبی ژن ها در سطح احتمال ۱ درصد ( $p \leq 0.01$ ) معنی دار می باشد (جدول ۳). همچنین اثرات مقابل دو جانبی ژنوتیپ  $\times$  شوری، شوری  $\times$  زمان و ژنوتیپ  $\times$  شوری  $\times$  زمان بر روی بیان ژن ها در سطح احتمال ۱ درصد ( $p \leq 0.01$ ) معنی دار می باشد (جدول ۳).

### الگوی آماری استفاده شده

تجزیه داده های حاصل از میزان بیان نسبی ژن ها به صورت فاکتوریل (فاکتور اول: ۲ لاین آفتاگردان، فاکتور دوم: ۵ سطح تنش شوری و فاکتور سوم: ۴ زمان نمونه برداری) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این آزمایش نمونه برداری مربوط به زمان های مختلف از واحدهای مستقل انجام گرفت؛ در این صورت معمولاً همبستگی بین زمان های مختلف ایجاد نمی شود و بنابراین تجزیه ها به جای انجام به صورت طرح اندازه های تکرار شده (Repeated measurement) به صورت فاکتوریل انجام گرفت. تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از

جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات بیان نسبی ژن های *MYB* و *HD-ZIP* در لاین های آفتاگردان روندی طی زمان های 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

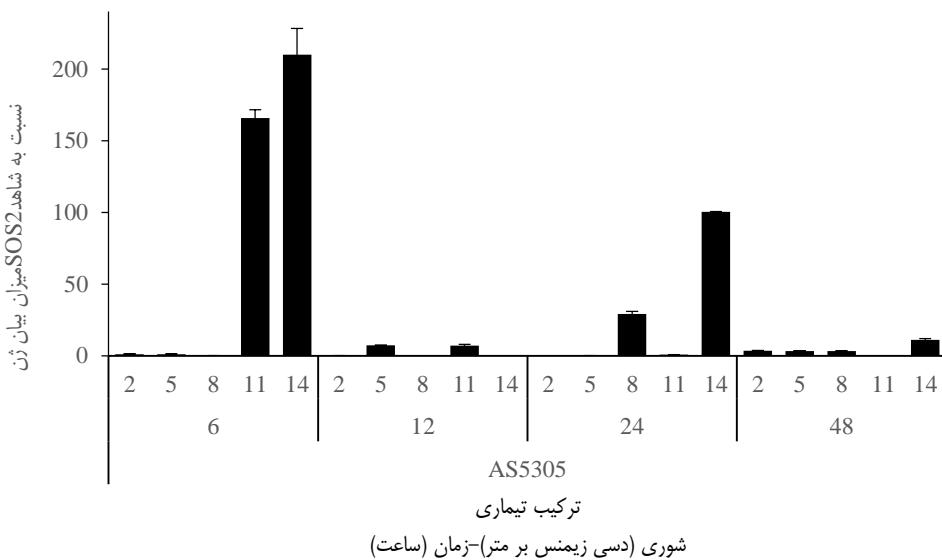
منبع تغییرات	Degree of freedom (df)	Mean square (MS)		
		<i>SOS2</i>	<i>MYB-related</i>	<i>HD-ZIP</i>
شوری	۴	۸۱۳۵/۳۵**	۱۷۹/۰۱**	۱۷۰/۷۵**
ژنوتیپ	۱	۱۵۶۶۳/۳۸**	۲۲۰/۰۷**	۳۱۰/۴۴**
زمان	۳	۱۰۳۷۸/۸۸**	۲۵۳/۱۴**	۳۶۶/۳۸**
ژنوتیپ $\times$ شوری	۴	۵۶۶۸/۸۷**	۲۰۶/۵۷**	۱۲۰/۸۱**
زمان $\times$ شوری	۱۲	۴۹۶۹/۴۲**	۲۰۴/۰۸**	۲۳۹/۸۹**
ژنوتیپ $\times$ زمان	۳	۶۹۵۳/۵۴**	۱۴۱/۶۸**	۱۵۸/۹۶**
زمان $\times$ ژنوتیپ $\times$ 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

\*\*\*: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

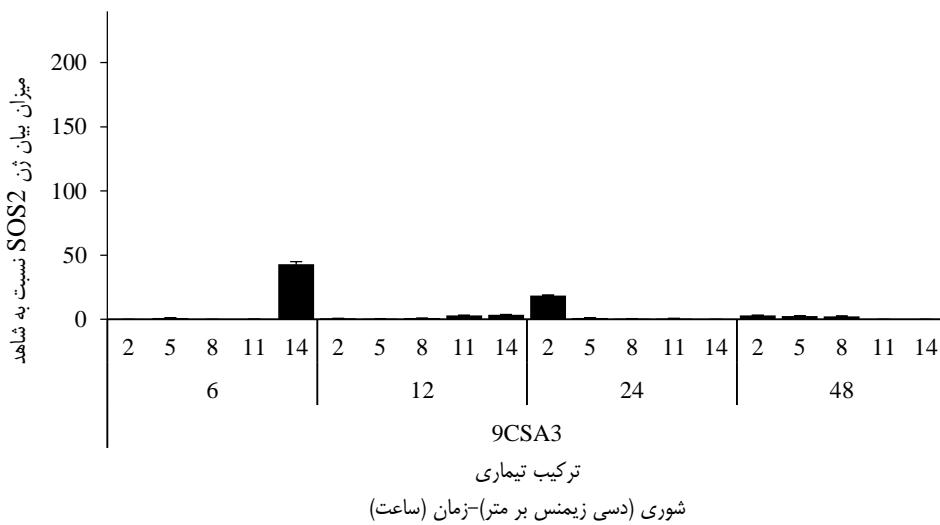
به بلند مدت کاهش در افزایش بیان مشاهده می شود. در لاین ۹CSA3 ۱۴ افزایش بیان در کوتاه مدت در شوری دسی زیمنس بر متر و در بلند مدت در شوری ۲ دسی زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۳). در مقایسه دو لاین مشاهده می شود که عمدۀ افزایش بیان در لاین AS5305 اتفاق افتاده است و در مقایسه میزان افزایش بیان در شوری و زمان متناظر در لاین AS5305 بیشتر از لاین ۹CSA3 می باشد.

### بورسی بیان ژن *SOS2*

بررسی الگوی بیان نسبی ژن *SOS2* نشان داد در لاین AS5305 (لاین متتحمل) در کوتاه مدت در شوری های ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر و در بلند مدت در شوری های ۸ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر نسبت به شاهد بیان ژن افزایش یافته است. در این لاین افزایش بیان در ۴۸ ساعت خصوصاً در شوری ۱۴ دسی زیمنس بر متر نیز مشاهده شد (شکل ۳). در مقایسه روند افزایش بیان در زمان های مختلف از کوتاه مدت



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.



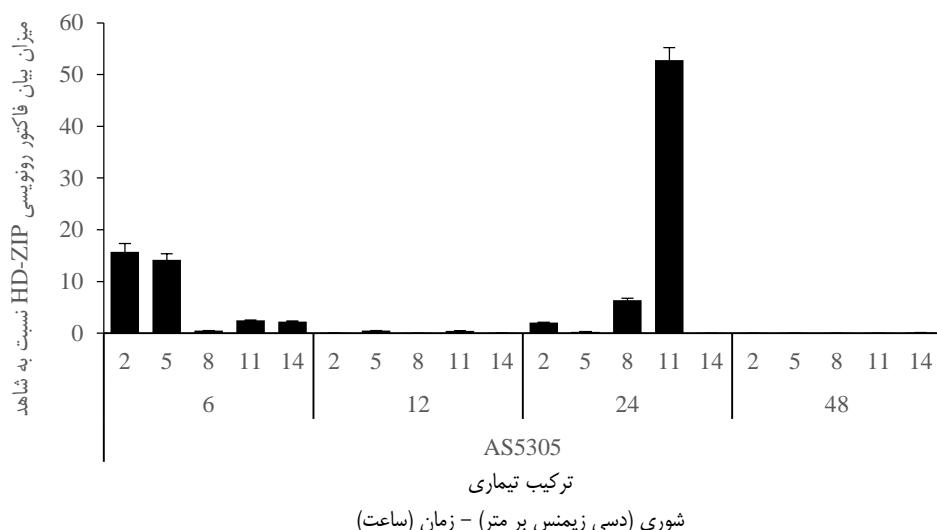
شکل ۴- الگوی بیان ژن *SOS2* در لاین *9CSA3* آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.  
Figure 4. Expression profiling of *SOS2* gene in *9CSA3* oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt sensitive line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress.

است (شکل ۵). مقدار افزایش بیان نسبت به شاهد (شرابیت نرمال) در شوری‌های ۲ و ۵ دسی‌زیمنس 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

**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 دسی‌زیمنس بر متر افزایش یافته

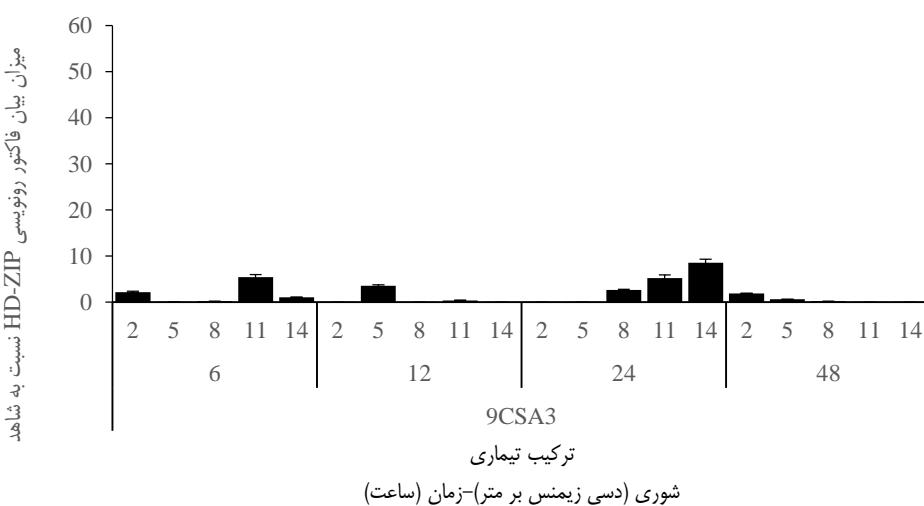
می‌شود ولی مقدار افزایش بیان در شوری‌های متناظر در غالب اوقات در لاین AS5305 بیشتر از 9CSA3 می‌باشد. تنها در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر افزایش مختصر در بیان ژن نسبت به شاهد در لاین 9CSA3 مشاهده شد در حالی که در این سطح شوری افزایشی در بیان ژن در لاین AS5305 مشاهده نشد.

بیان در شوری‌های ۲ و ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر دیده شد؛ متنها 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



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.



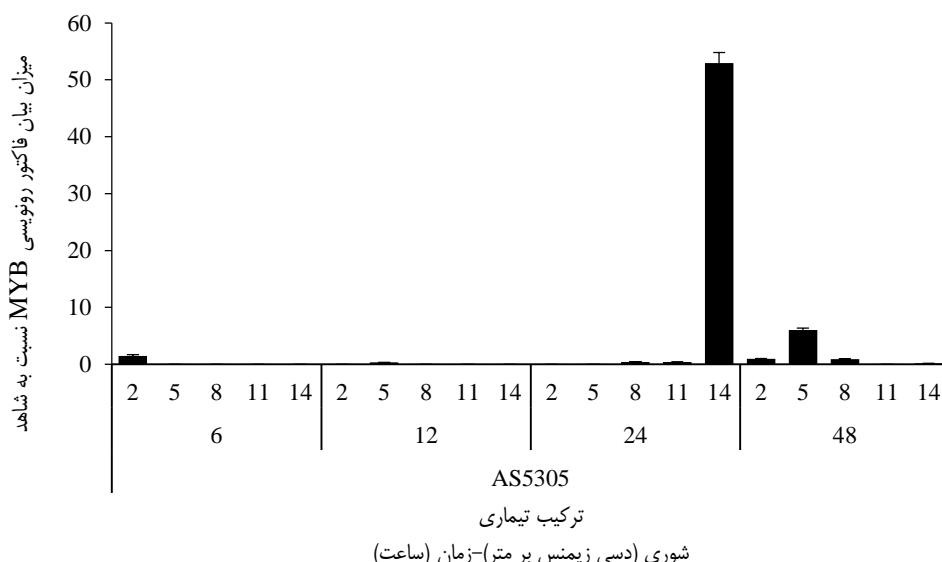
شکل ۶- الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) در زمان‌های (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

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.

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 دسی زیمنس بر متر مشاهده شد (شکل ۸). مقایسه دو لاین نشان داد که عمدۀ افزایش بیان ژن در لاین AS5305 رخ داده است و حتی مقدار افزایش بیان در لاین AS5305 بسیار بیشتر از 9CSA3 است.

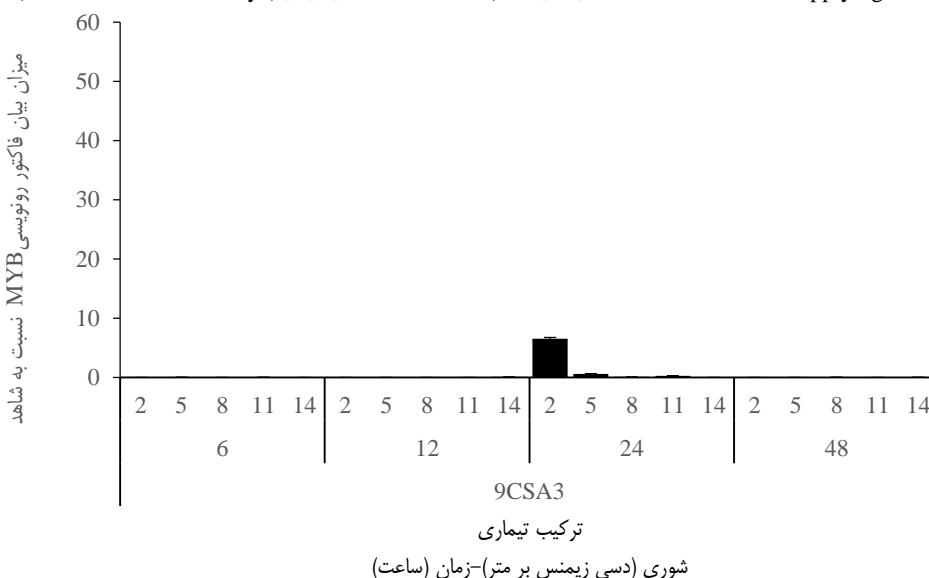
#### بررسی بیان ژن مرتبط با *MYB*

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 دسی زیمنس بر متر افزایش یافت (شکل ۷). در مقایسه دو زمان افزایش بیان ژن در لاین در ۱۴ دسی زیمنس



شکل ۷- الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی *MYB-related* در لاین AS5305 آفتتابگردان روغنی (لاین مقاوم) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس 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 آفتتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس 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.

به ABA (ABRE)، در پرموتر تعدادی از ژن‌های پاسخگو به تنش وجود دارند. فاکتورهای رونویسی از قبیل MYB/MYC به موتیف MYBRS/MYCRS (تولی) تشخّص MYB/MYC (MYB) 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 تاریخته آرابیدوپسیس تحت تنش شوری بررسی گردید. طی این بررسی شش گیاه آرابیدوپسیس با ژن‌های *ATNHX1*, *SOS3*, *ATNHX1+SOS3*, *SOS1+SOS2+SOS3*, *SOS1*, *SOS2+SOS3* تاریخت و با آنالیز نورن بلات تیجهٔ تاریختی تایید شد. گیاهان تاریخت شده با ژن *ATNHX1* مقاومت قبل توجهی به شوری نشان ندادند، ولی گیاهان تاریخت شده با ژن *SOS* تحمل بالای نسبت به شوری نشان دادند (۳۴). در آزمایش نقش عامل رونویسی MYB در برج در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج نشان داد که سرما در برج 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 بیان ژن *ZmMYB30* در گیاهان تاریخت 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 تاریخته به تنش شوری شد (۳۵). اخیراً، بیش بیان *OsMYB6* در برج تاریخته باعث افزایش محتوای پرولین و فعلیت آنزیم‌های *CAT* و *SOD* شده و بدین ترتیب تحمل گیاهان تاریخته به خشکی و نمک را افزایش داد (۲۹). آنالیز ژنومی و تنسکرپتومی عوامل رونویسی خانواده HD-ZIP و پاسخ آن‌ها به تنش غیرزیستی در گیاه چای توسط شن و همکاران (۲۶) انجام شد. در این مطالعه ۳۳ عامل رونویسی HD-Zip (۲۶) انجام شد. در این مطالعه ۳۳ عامل رونویسی *Cshdz* براساس پایگاه‌های اطلاعاتی ژنومی و تنسکرپتومی گیاه چای انتخاب شده و دُمین‌های حافظت شده و موتیف‌های عمومی این عامل رونویسی پیش‌گویی و آنالیز شد. نتایج حاصل از تجزیه پروتئین بیانی متفاوت ژن *Cshdz* نشان داد که بیان این ژن تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف متفاوت بوده و ارتباط مستقیمی بین افزایش بیان این ژن با تحمل به تنش غیرزیستی 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 آفتباگردن رونگی (AS5305 و 9CSA3) بررسی شد. نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان در مرحله ۸ برگی در پنج

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

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

تنظیم رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش از طریق فاکتورهای رونویسی، یا از مسیر وابسته به اسید آسپیزیک (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 همسو (cis-acting) پاسخگو

فرضیه سازی کردند که احتمالاً غلظت شدیدتر تنفس شوری در مراحل پیشرفته و پیشرفته تر، بیان ژن *Dehydrin* را در لاین AS5305 بیشتر از لاین 9CSA3 (۱۱). تنفس شوری مهمترین عامل محدود کننده میزان محصول گیاهان زراعی به شمار می رود. بنابراین تولید گیاهان مقاوم به شوری برای فراهم کردن نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. تحمل تنفس غیر زنده در گیاهان یک ویژگی چند ژنی است، بنابراین، هدف گیری یک ژن منفرد ممکن است در انتقال سطح مطلوب تحمل به تنفس بسیار کارآمد نباشد. بنابراین، هدف قرار دادن یک ژن فاکتور رونویسی که ژن های درگیر در مسیرهای مختلف تنفس زا را تنظیم کند یک گزینه جالب به نظر می رسد (۳۱).

#### نتیجه گیری

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

زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنفس شوری انجام شد. نتایج تجزیه های آماری نشان داد الگوی بیان ژن های کد کننده عوامل رونویسی مورد مطالعه در لاین های مورد بررسی متفاوت است؛ به طوری که میزان بیان نسی هر دو عامل رونویسی (WRKY و AP2Domain) در لاین AS5305 (لاین متحمل) نسبت به لاین 9CSA3 (لاین حساس) در شوری های شدید (به ترتیب در ۱۱ و ۸ دسی زیمنس بر متر) ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنفس به طور فاحش افزایش یافته است. محققین نتیجه گیری کردند که نتایج نشان دهنده نقش مثبت عوامل رونویسی WRKY و AP2Domain در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنفس شوری می باشد (۱۳).

در پژوهش دیگری بررسی بیان نسی ژن های *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. نمونه برداری از برگ های آفتابگردان در مرحله ۸ برگی در پنج زمان صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنفس انجام گرفت. نتایج تحقیق نشان داد در مراحل اولیه اعمال تنفس شوری، بیشترین میزان بیان ژن *PMP3* در لاین AS5305 در شوری کمتر از آن برای لاین 9CSA3 مشاهده شد (۸ در مقابله (ds/m ۱۱)). در مراحل پیشرفته تر از اعمال تنفس شوری (۲۴) ساعت بعد از اعمال تنفس افزایش بیان ژن *PMP3* در لاین AS5305 در شوری های پایین تر (ds/m ۵ و ۲) و در لاین 9CSA3 در شوری های نسبتاً شدیدتر (۵ و ۸ ds/m) مشاهده شد. در رابطه با ژن *Dehydrin* افزایش بیان در مراحل اولیه تنفس شوری فقط در لاین 9CSA3 مشاهده شد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنفس شوری در شوری های شدیدتر (ds/m ۱۴) افزایش بیان در لاین ۱/۵ AS5305 برابر بیشتر از لاین 9CSA3 بود. در مقابله در شوری های پایین تر (ds/m ۵ و ۸) افزایش بیان ژن *Dehydrin* در لاین 9CSA3 در مقایسه با ژنوتیپ AS5305، بیشتر بود. محققین

#### منابع

- Ahmadvour, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chinnusamy, V., A. Jagendorf and J.K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45(2): 437-448.
- 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](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](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](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](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. Saghaei. 2011. Effects of salinity and laser radiation on proline accumulation in seeds of spring wheat. *Plant Physiology & Breeding*, 1(2): 11-20.
25. Schnieder, 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 IIWRKY1 from the halophyte *Iris lactea* var. chinensis. *International Biodegradation & 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<sup>1</sup>, Reza Darvishzadeh<sup>2</sup>, Babak Abdollahi Mandoulakani<sup>2</sup>, Nahid Habibi<sup>1</sup>, Esmael Dardan<sup>3</sup> and Ali Ranjbar<sup>4</sup>

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