مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۸۸-۱۷۸

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

مطالعه بیان عوامل رونویسی WRKY و AP2Domain در آفتابگردان روغنی تحت تنش شوری

Study on the expression of transcription factors WRKY and AP2Domain in oily sunflower under salt stress

فائزه حسین پور[۱]، رضا درویش زاده [۲و۳*]، بابک عبدالهی مندولکانی[۴]

Faezeh Hoseinpour[1], Reza Darvishzadeh[2,3*], Babak Abdollahi Mandoulakani[4]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
۲- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.
۳- استاد پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه.
۴- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

[1]Former M.Sc. Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[3]Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۵)

چکیده

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) از مهم‌ترین منابع روغن گیاهی در جهان و ایران است. این گیاه جزء گیاهان نیمه مقاوم به شوری دسته‌بندی می‌شود، با این‌حال، عملکرد آن به شکل منفی تحت تاثیر شوری قرار می‌گیرد. عوامل رونویسی مولکول‌هایی هستند که نقش مهمی در درک و انتقال پیام تنش و نیز بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی دارند. در این مطالعه 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 و ۱٤ دسی زیمنس بر متر) در دو لاین مختلف آفتابگردان روغنی (AS5305 و 9CSA3) بررسی شد. نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان در مرحله ۸ برگی در پنج زمان ۰، ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ 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 به‌طوری 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) ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش به‌طور فاحش افزایش یافته است. نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت عوامل رونویسی AP2 Domain و WRKY در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش شوری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان،
بیان ژن،
مقاومت به شوری،
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) گیاهی یکساله، دیپلوئید و بومی آمریکای شمالی است (Lentz *et al.*, 2008). این گیاه زراعی جزء تیره‌ی Asteraceae می‌باشد. آفتابگردان از مهم‌ترین گیاهان صنعتی است و در جهان عمدتا برای استخراج روغن و مصارف آجیلی کشت می‌گردد. در بین گیاهان دانه روغنی، آفتابگردان از نظر سطح زیرکشت و میزان تولید جهانی، بعد از سویا و پنبه و در ردیف گیاهانی همچون کلزا و بادام زمینی قرار دارد (Cerboncini *et al.*, 2005). بر اساس آمار موجود شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی بوده (Sadat Noori *et al.*, 2011) و سطح گسترده‌ای از اراضی کره زمین (بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار) را در بر می گیرد (Witzel *et al.*, 2009). در ایران حدود ۱۵ میلیون هکتار معادل ۱۰ درصد از مساحت کشور تحت تاثیر تنش شوری است. شوری ترکیبی از دو تنش اسمزی و یونی است (Chinnusamy *et al.*, 2005). تنش اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبگیری از بافت‌های گیاهی می‌شود و بدین دلیل آن را خشکی فیزیولوژیک نیز می‌نامند. از سوی دیگر، مسمومیت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص بویژه سدیم ایجاد می‌گردد که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شوند. تنش اسمزی و یونی ایجاد شده توسط تنش شوری باعث افزایش تولید فرم‌های فعال اکسیژن (ROS: reactive oxygen species) در سلول‌های گیاهی شده و این فرم‌ها موجب آسیب اکسیداتیو به بسیاری از قسمت‌های سلول می‌گردند (Parida *et al.*, 2005).

جمعیت جهان در سال، ۸۰ میلیون نفر افزایش می‌یابد و سازمان خواربار جهانی پیش‌بینی کرده برای از بین بردن گرسنگی در جهان لازم است میزان تولید محصولات کشاورزی در طی دو دهه آینده، ٦٠ درصد افزایش یابد. تولید گیاهان متحمل به شوری یکی از اساسی‌ترین راهکارها برای تامین غذای بشر به حساب می‌آید (Kumar *et al.*, 2003). تحمل شوری در حقیقت توانایی گیاهان برای رشد و تکمیل چرخه زندگی در شرایط وجود غلظت بالایی از نمک‌های محلول می‌باشد. کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه تحت تنش شوری را می‌توان نتیجه تجمع بعضی از یون‌های محلول و یا تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدهای آزاد (پرولین، گلایسین، بتائین و ...) دانست.

آفتابگردان جز گیاهان نیمه مقاوم به شوری است. تنش شوری باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد و نمو آفتابگردان می‌شود و میزان محصول را به شدت کاهش می‌دهد (Khatoon *et al.*, 2000). 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 مرکز توجه محققان می‌باشند. عوامل رونویسی پروتئین‌های متصل شونده به توالی‌های خاصی از DNA هستند که قادر به فعال کردن و یا مهار رونویسی می‌باشند. عوامل رونویسی مسئول تنظیم بیان ژن ها هستند و اغلب در بافت‌های خاص، در مرحله رشدی خاص و یا از طریق مسیرهای وابسته به یک محرک مثل تنش بیان می‌شوند. این عوامل رونویسی می‌توانند بیان ژن‌های پاسخ‌گو به تنش را به صورت مشارکتی و یا به صورت مستقل کنترل نمایند. از میان عوامل‌رونویسی مختلف، فاکتورهای نسخه‌برداری WRKY (Mare *et al.*, 2004) و AP2 Domain (Aharoni *et al.*, 2004) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. در مورد بررسی نقش عوامل رونویسی مختلف، به‌عنوان ژن‌های تنظیم‌گر مهم در تنش شوری، تحقیقات اندکی صورت گرفته است. شناسایی ژن‌های جدید از جمله عوامل‌رونویسی، تعیین الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری و درک بهتر از نقش کارکردی آن‌ها در انطباق با تنش، اساس راهکار اصلاح برای تحمل به تنش را فراهم می‌آورد (Rabbani *et al.*, 2003). در این پژوهش به منظور بررسی عوامل رونویسی دخیل در مقاومت به تنش شوری، دو لاین آفتابگردان با واکنش متفاوت به شوری انتخاب شدند و الگوی بیان دو عوامل رونویسی WRKY و AP2 Domain در آن‌ها با فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

مواد و روش‌ها

دو لاین خالص آفتابگردان با واکنش متفاوت به تنش شوری (جدول ۱) از میان ۱۰۰ لاین انتخاب شدند (Ahmadpour *et al.*, 2017). تغییرات بیان نسبی عوامل رونویسی در لاین ها شامل AS5305 (متحمل به شوری) و 9CSA3 (حساس به شوری) تحت سطوح مختلف تنش شوری ناشی از NaCl شامل صفر، ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱٤ دسی‌زیمنس‌برمتر به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹٦ بررسی گردید. بذر لاین‌ها از موسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (INRA; Institut national de la recherche agronomique) تهیه شد. بذور لاین‌ها در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با دو نسبت خاک زراعی الک شده و یک نسبت ماسه کاشته شدند. گیاهان در گلخانه‌ی با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ٦۵ درصد و با فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی/ نور به مدت ٦ هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند (Schneiter & Miller, 1981). تنش شوری در مرحله هشت برگی بر اساس نتایج مطالعات پیشین (Ahmadpour *et al.*, 2017) اعمال شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها در پنج زمان ۰، ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری با استفاده از ازت مایع (۱۹٦ °C-) 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 اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد تائید شد. سنتز cDNA تک رشته‌ای با استفاده از کیت LIFE SCIENCE#K1621 شرکت فرمنتاز (Fermentas Life Science) انجام شد. برای انجام این کار ابتدا پنج میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به همراه شش میکرولیتر RNA استخراج شده (۲ میکروگرم) به یک تیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری استریل ریخته شد سپس یک میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT18) به این مخلوط اضافه گردید. بعد از انجام سانتریفوژ پالسی، تیوپ حاوی مواد به مدت پنج دقیقه در دمای ٦۵°C قرار گرفت. پس از سرد کردن تیوپ حاوی مواد بر روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کُند) انجام گرفت. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکرولیتر آنزیم RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) و دو میکرولیتر dNTP Mix (۱۰ میلی‌مولار) به تیوپ حاوی مواد اضافه گردید. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، تیوپ حاوی مواد به مدت یک ساعت در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنج 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؛ که 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 زنجیره ای پلی مراز در زمان واقعی

جهت بررسی الگوی بیان نسبی عوامل رونویسی تحت تنش شوری در آفتابگردان از آغازگرهای طراحی شده توسط درویش زاده و همکاران (Darvishzadeh *et al.*, 2008) استفاده شد (جدول ۲). واکنش با در نظر گرفتن ۳ تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر که شامل ٦/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرومولار)، ۱/۲۵

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

میکرولیتر cDNA (۵۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و چهار میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection –Qiagen مدل ۶۰۰۰ (شرکت 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 PCR، با وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی ذوب فرآورده‌های تکثیر PCR تایید شدند. جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز در زمان واقعی از ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001) انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی انجام گرفت. برای آنالیز داده ها از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده شد. نمودارها با نرم افزار مایکروسافت اکسل ۲۰۱۹ رسم شدند.

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 شوری (ds/m)	قطر ساقه (میلی‌متر)			ارتفاع بوته (سانتی‌متر)			طول برگ (سانتی‌متر)			عرض برگ (سانتی‌متر)		
				Mean	Se	D	Mean	Se	D	Mean	Se	D	Mean	Se	D
۷۱	AS5305	فرانسه (ASGROW)	۲	۱۷/۰۸	۱/۵۵	۷/۸۵	۱۲۸/۶۰	۲/۹۴	۱۱/۷۴	۱۷/۰۰	۲/۱۷	۲۱/۷۶	۱۴/۷۰	۲/۲۳	۱۹/۷۳
			۸	۱۵/۷۴	۰/۸۱		۱۱۳/۵۰	۱۰/۶۰		۱۳/۳۰	۱/۹۸		۱۱/۸۰	۲/۰۵	
۲۴	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
			۸	۱۰/۳۰	۰/۵۶		۶۸/۲۰	۶/۸۶		۱۱/۴۰	۱/۲۱		۱۰/۳۰	۱/۲۷	

$D=\frac{\overline{X}_{Normal}-\overline{X}_{Biotic}}{\overline{X}_{Normal}}\times 100$, Se: standard error, dS/m: DeciSiemens per meter.

جدول ۱- ادامه

Table 1. Continued

شماره لاین	نام لاین	منشاء لاین	تنش شوری	عملکرد دانه (گرم)			محتوای نسبی آب برگ (درصد)			K^+/Na^+ دمبرگ		
				Mean	Se	D	Mean	Se	D	Mean	Se	D
۷۱	AS5305	فرانسه (ASGROW)	۲	۴۰/۰۷	۴/۵۶	۲/۹۴	۶۶/۳۰	۵/۰۱	−۷/۳۶	۴/۴۸	۰/۴۵	۴۲/۸۶
			۸	۳۸/۸۹	۴/۷۳		۷۱/۱۸	۲/۷۳		۲/۵۶	۰/۰۹	
۲۴	9CSA3	فرانسه (Caussade semences)	۲	۲۳/۲۷	۳/۹۴	۸۵/۴۵	۶۶/۱۲	۷/۰۵	−۷/۲۲	۲/۸۶	۰/۰۸	۶۵/۷۳
			۸	۱۲/۶۰	۰/۸۵		۷۹/۹۰	۵/۱۶		۰/۹۸	۰/۰۴	

$D=\frac{\overline{X}_{Normal}-\overline{X}_{Biotic}}{\overline{X}_{Normal}}\times 100$, Se: standard error, Na^+: sodium ion, K^+: potassium ion, dS/m: DeciSiemens per meter.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

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

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

نام توالی	شماره دسترسی در NCBI	توالی آغازگر (5′ →3′)	دمای‌اتصال (ºC)	اندازه محصول (bp)
AP2Domain transcription factor	CX946549	Forward: CAAGAACTCGGCCAATTCGT Reverse: AGGAGTAGCAAGGCACCATCA	٥٦	٥٩
WRKY transcription factor	AJ412452	Forward: TTGGATTGAAGATGTCATCTGTGA Reverse: CCCTATTCAATTCTTCCACCAAA	٥٤	٦٧
Helianthus annuus L. Actin	AF282624	Forward: TCAATGTTCCCGCCATGTAT Reverse: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	٥٧	٦٠

NCBI: National center for biotechnology information, bp: base pair, RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction. WRKY: The WRKY transcription factor family (pronounced 'worky') is a class of DNA-binding proteins and contain a WRKYGQK heptapeptide at the N-terminal end and a zinc-finger motif ($CX_{4-5}CX_{22-23}HXH$ or $CX_7CX_{23}HXC$) at the C-terminal end. WRKY protein domains interact with the (T/A)TGAC(T/A) cis-element, also called the W-box.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های بیان هر دو ژن WRKY و AP2 Domain نشان داد اثر مدت زمان بعد از اعمال تنش شوری، لاین و تنش شوری روی بیان ژن ها در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) بسیار معنی‌دار می‌باشد. هم چنین اثرات متقابل دو جانبه‌ی زمان × شوری، شوری × لاین و لاین × زمان و اثر متقابل سه جانبه‌ی زمان × شوری × لاین بر روی بیان ژن ها در سطح احتمال یک درصد ($P\leq0.01$) بسیار معنی‌دار می باشد (جدول ۳).

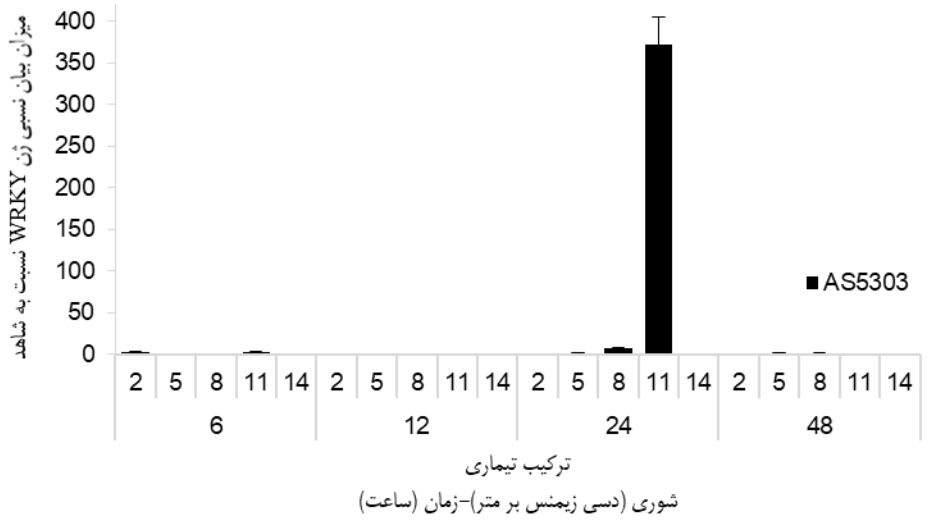
جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات رونوشت عوامل رونویسی AP2Domain و WRKY در لاین‌های آفتابگردان روغنی مورد مطالعه طی زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش شوری.

Table 3. Analysis of variance for transcription factors (WRKY, AP2 Domain) variations in studied oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes at different times after applying salinity stress.

منابع تغییرات	WRKY		AP2 Domain	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
لاین	١	١٠٤٠٦/٤٨**	١	٥٣٨/٣٥**
شوری	٤	١٠٠٠٩/٨٩**	٤	٦٧٩/١٩**
زمان	٣	١٠٢١٣/٩٧**	٣	٩٨١/٢١**
لاین × شوری	٤	٩٥٩٤/٦٥**	٤	٩٤٥/٤٩**
لاین × زمان	٣	١٠٤١٤/٧٩**	٣	١٠٥٤/٨٣**
شوری × زمان	١٢	٨٩٠٣/٦٠**	١٢	٩١٤/٨٧**
لاین × شوری × زمان	١٢	٨٨٩٣/٢٨**	١٢	٨٧٤/٨٣**
خطای آزمایشی	٧٩	٤٣/٢٠	٨٠	٤٧/٨٨

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]



شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی WRKY در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی (لاین متحمل) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱٤ دسی زیمنس بر متر) در زمان‌های ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری.

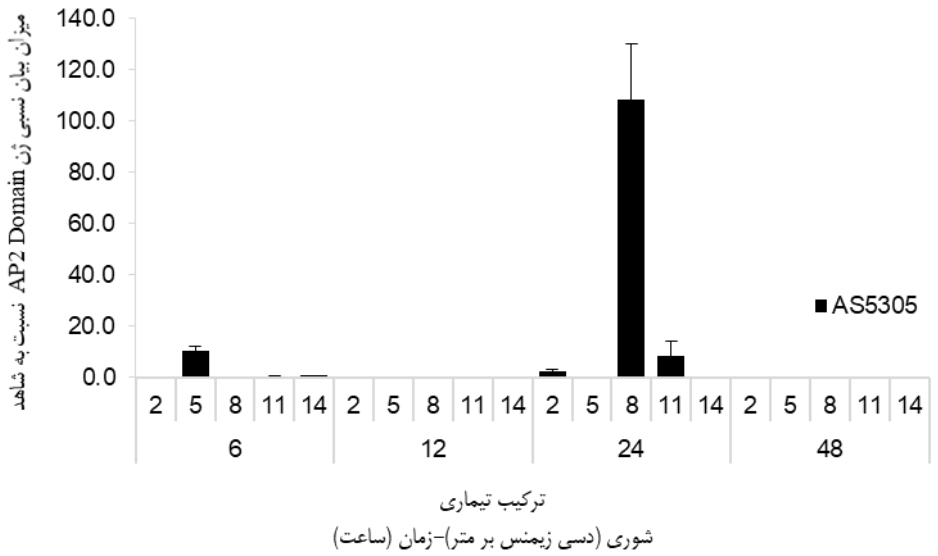
Figure 1. Relative expression of WRKY in AS5305 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt tolerant line) at five levels of salinity (2, 5, 8, 11 and 14 ds/m) at 6, 12, 24 and 48 hours after applying salinity stress.

شکل ۲- الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی WRKY در لاین 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱٤ دسی زیمنس بر متر) در زمان‌های (٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت) بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 2. Relative expression of WRKY in 9CSA3 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt susceptible 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.

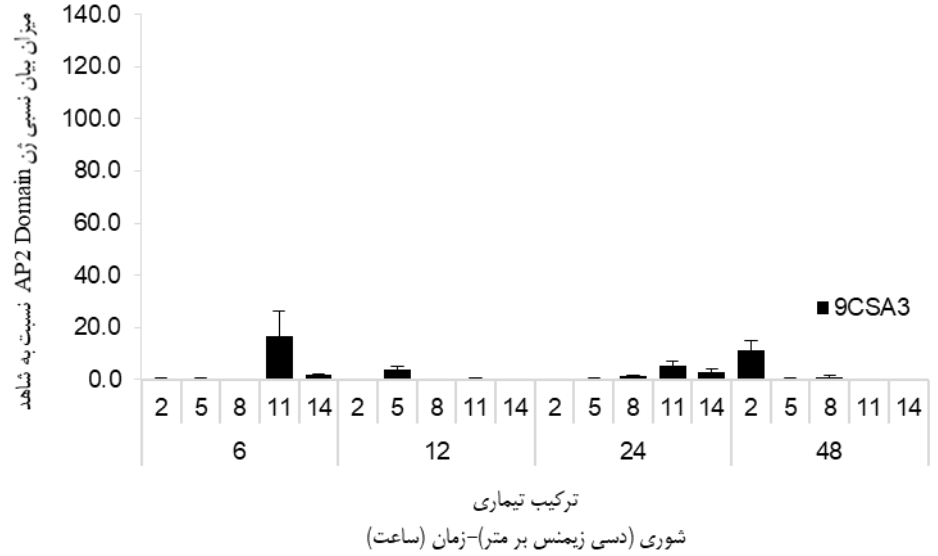
الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی WRKY در دو لاین AS5305 و 9CSA3 پس از اعمال تنش شوری نشان داد که میزان بیان این عامل رونویسی در لاینِ AS5305 (لاین متحمل) ۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوریِ ۱۱ دسی زیمنس بر متر در مقایسه با لاینِ 9CSA3 (لاین حساس) به طور فاحش افزایش یافته است (شکل ۱ و ۲).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]



شکل ۳- الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی AP2Domain در لاین AS5305 آفتابگردان روغنی (لاین متحمل) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱٤ دسی زیمنس بر متر) در زمان‌های ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 3. Relative expression of AP2Domain 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 ٤- الگوی بیان نسبی ژن کد کننده عامل رونویسی AP2Domain در لاینِ 9CSA3 آفتابگردان روغنی (لاین حساس) در ۵ سطح شوری (۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱٤ دسی زیمنس بر متر) در زمان‌های ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از اعمال تنش شوری.

Figure 4. Relative expression of AP2Domain in 9CSA3 oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) line (salt susceptible 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 الگوی بیان نسبی ژن کدکننده عامل رونویسی AP2 Domain نشان داد میزان بیان نسبی این عامل رونویسی در مراحل اولیه (٦ ساعت بعد از اعمال تنش شوری) در هر دو لاین اندکی افزایش یافته است، اما این افزایش بسته به ژنوتیپ در سطح شوری متفاوت دیده می شود؛ به طوری که افزایش بیان در لاین AS5305 (لاین مقاوم) در شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر اما در لاین 9CSA3 (لاین حساس) در سطح شوری ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر دیده شد. در مراحل پیشرفته از اعمال تنش شوری (۲٤ ساعت بعد از اعمال تنش) در شوری بالاتر (۸ و ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر و مخصوصا در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر)، یک افزایش فاحش در میزان بیان نسبی ژن در لاین AS5305 (لاین مقاوم) در مقایسه با لاین 9CSA3 (لاین حساس) مشاهده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

تحقیقات مختلفی در رابطه با نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های مختلف صورت گرفته است. احمدی و همکاران (Ahmadi *et al.*, 2015) در پژوهشی الگوی بیان ژن *GmBZIP* را در دو ژنوتیپ سویا؛ Williams (ژنوتیپ متحمل) و L17 (ژنوتیپ حساس) تحت تنش شوری صفر (شاهد) و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl در مرحله پنج برگی مورد مطالعه قرار دادند. تجزیه داده‌ها با استفاده از مقادیر Ct نشان داد که بیان این ژن تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. تحت تنش شوری میزان بیان ژن *GmBZIP* در ژنوتیپ متحمل دو برابر ژنوتیپ حساس بود و در ریشه نسبت به برگ بیان یک و نیم برابر بیشتر بود. Giacomelli و همکاران (Giacomelli *et al.*, 2010) نقش عوامل رونویسی را در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در آفتابگردان بررسی کردند. تجزیه نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی مشخص نمود که همبستگی مثبتی بین میزان بیان عوامل رونویسی WRKY و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود دارد. در آزمایشی نقش فاکتور رونویسی MYB در برنج در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی نتایج نشان داد که R2R3MYB و OsMYB2 موجب تحمل به شوری، خشکی و سرما در برنج می‌شود (Yang *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری، با به‌کارگیری فناوری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی میزان بیان پنج عامل رونویسی از خانواده‌ی bZIP در شرایط مختلف تنش اسمزی در آفتابگردان بررسی شد. در مطالعه ایشان از گیاهچه‌های کامل ٦، ١٢ و ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش اسمزی نمونه‌برداری شد. بررسی نتایج نشان داد از میان ژن‌های مورد بررسی، دو ژن bZ-497 و bZ-502 عوامل پاسخ‌گو به تنش خشکی هستند. در ژن bZ-497 افزایش بیان در ساعات اولیه تنش مشاهده شد و به عنوان ژن پاسخ‌گوی اولیه دسته‌بندی شد، در حالی که ژن bZ-502 دیر به تنش اسمزی پاسخ داد که احتمالا نشان می‌دهد این ژن در ایجاد پاسخ‌های پایدارتر در شرایط تنش اسمزی نقش دارد (Esmailzadeh Mianlengeh *et al.*, 2018). در آزمایشی مکانیسم مولکولی تحمل به سدیم در گیاه زینتی چند ساله‌ی هالوفیت *Iris lactea* مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه ایشان تجزیه و تحلیل سطح رونویسی mRNA نشان داد که ٢٤ ساعت بعد از اعمال تنش شوری میزان بیان عامل رونویسی IIWRKY1 به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. بررسی‌ها نشان داد که افزایش بیان این عامل رونویسی موجب تحمل به شوری در این گیاه هالوفیت می‌شود (Tang *et al.*, 2018). در تحقیقی تاثیر عوامل رونویسی AP2/ERF در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در کلزا بررسی گردید. نتایج نشان داد که AP2/ERF در پاسخ به تنش‌هایی مثل خشکی، شوری، گرما، سرما، نقش مهمی ایفا می‌کند و بیان زیرخانواده‌ی ERF در ساعات اولیه تنش در ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به شاهد به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند (Owji *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای نقش عوامل رونویسی WRKY11 و WRKY17 در تحمل به تنش‌های غیرزیستی در آرابیدوپسیس بررسی شد. در مطالعه ایشان مشخص شد که این عوامل رونویسی نه تنها در پاسخ‌های دفاعی گیاهان شرکت می‌کنند، بلکه موجب تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان نیز می‌شوند (Ali *et al.*, 2018). در پژوهش دیگری میزان بیان ژن *P5CS* در زیتون تحت تنش شوری بررسی گردید. نتایج به دست آمده از ایمونوبلاتینگ نشان داد که سطح بیان پرولین در گیاه زیتون تحت تنش، به مراتب بالاتر از بیان در زیتون تحت شرایط نرمال (شرایط غیر تنش؛ شاهد) می باشد که نشان دهنده‌ی نقش کلیدی پرولین در تحمل به تنش می‌باشد (Farzaneh Behelgardi *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای تغییرات بیان ژن *Rboh* تحت تاثیر خشکی در *C. colocynthis* و هندوانه زراعی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش بیان *Rboh* در هر دو گونه بود، اما در هندوانه وحشی سطح بیان بالاتر بود. این نتایج نشان دهنده‌ی نقش کلیدی *Rboh* در تحمل *C. colocynthis* در برابر تنش خشکی می‌باشد (Salahi *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیان نسبی هر دو عامل رونویسی مورد مطالعه WRKY و AP2 Domain در لاین AS5305 (لاین متحمل) در مقایسه با لاین 9CSA3 (لاین حساس) تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت عوامل رونویسی AP2 Domain و WRKY در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش شوری می‌باشد. با تایید

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

مقاومت لاین AS5305 به تنش شوری در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم به شوری در اصلاح نباتات متداول استفاده نمود که البته نیاز به بررسی های بیشتر دارد. از طرفی امروزه با استفاده از مهندسی ژنتیک، امکان انتقال ژن‌های مطلوب، بدون همراهی هیچ ژن نامطلوبی، به گیاهان میسر شده است. بنابراین تولید گیاهان تراریخته یکی از روش‌های نوین و امیدبخش برای مدیریت بهینه تنش‌های محیطی و بیماری‌های گیاهی است تا تولید محصولات کشاورزی برای تامین نیازهای غذایی جمعیت روز افزون جهان افزایش یابد و کشاورزی پایدار برقرار گردد. برای اصلاح گیاهان به تنش‌های مختلف، به ویژه تنش‌های غیرزنده، قدم اول شناسایی ژن‌های پاسخ‌گو به آن تنش می‌باشد. در این میان عوامل رونویسی به عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های ژنی، بسیار حائز اهمیت هستند و شناخت عوامل رونویسی پاسخ‌گو در هر تنش می‌تواند مسیرهای اصلاح برای بهبود تحمل به تنش را هموارتر نماید. از آن‌جایی که عوامل رونویسی بیان چندین ژن پایین دست را تنظیم می‌کنند، بنابراین دست‌ورزی ژن‌های عوامل رونویسی برای ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی از جمله شوری بسیار کارآمدتر از دست‌ورزی سایر ژن‌هاست.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر هادی علیپور عضو هیات علمی محترم گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه ارومیه به خاطر ارایه پیشنهادات ارزنده در تجزیه و تحلیل داده‌ها و از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش و همچنین از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به خاطر در اختیار قراردادن بذور لاین‌های آفتابگردان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G. & Pereira, A. (2004). The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(9), 2463-2480.

Ahmadi, J. & Soleimani V. (2015). Expression pattern of GmOSBP, CAT and GmbZIP genes under saline stress in soybean (*Glycin max* L.). *Modern Genetics Journal*, 10(1), 107-114.

Ahmadpour, S., Sofalian, O. & Darvishzadeh, R. (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.

Ali, M.A., Azeem, F., Nawaz, M.A., Acet, T., Abbas, A., Imran, Q.M., Shah, K.H., Rehman, H.M., Chung, G., Yang, S.H. & Bohlmann, H. (2018). Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, 226, 12-21.

Cerboncini, C., Beine, G., Binsfeld, P. C., Dresen, B., Peisker, H., Zerwas, A. & Schnabl, H. 2002. Sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in a natural *Helianthus* gene pool. *Helia*, 25(36), 167-176.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J.K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2), 437-448.

Darvishzadeh, R., Hewezi, T., Gentzbittel, L. & Sarrafi, A. (2008). Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower–*Phoma macdonaldii* interactions. *Crop Protection*, 27(3-5), 740-746.

Esmailzadeh Mianlengeh, Z., Soltani Najafabadi, M., Saidi, A. & Askari H. (2018). Monitoring response of a few bZip transcription factors in response to osmotic stress in sunflower. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(2), e1422.

Farzaneh Behelgardi, M., Motamed, N., Rastgar Jazzi, F. & Ebrahimzadeh H. (2014). Increase of P5CS gene expression in olive plantlets under salinity stress. *Journal of Molecular and Cellular Research*, 27(1), 119-124.

Giacomelli, J. I., Ribichich, K. F., Dezar, C. A. & Chan, R. L. (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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

Khatoon, A., Qureshi, M.S. & Hussain, M.K. (2000). Effect of salinity on some yield parameters of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 2(4), 382-384.

Kumar, S.G., Reddy, A.M. & Sudhakar, C. (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.

Lentz, D.L., Pohl, M.D., Alvarado, J.L., Tarighat, S. & Bye, R. (2008). Sunflower (*Helianthus annuus L.*) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6232-6237.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Mare, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E. & Cattivelli, L. (2004). Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology*, 55(3), 399-416.

Owji, H., Hajiebrahimi, A., Seradj, H. & Hemmati, S. (2017). Identification and functional prediction of stress responsive AP2/ERF transcription factors in *Brassica napus* by genome-wide analysis. *Computational Biology and Chemistry*, *71(3)*, 32-56.

Parida, A.K. & Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.

Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 133(4), 1755-1767.

Sadat Noori, S.A., Ferdosizadeh, L., Izadi-Darbandi, A., Mortazavian, M., Mohammad, S. & Saghafi, S. (2011). Effects of salinity and laser radiation on proline accumulation in seeds of spring wheat. *Plant Physiology & Breeding*, 1(2), 11-20.

Salahi, N., Soleimani, Z., Safipour Afshar, A. & Saeid Nematpour, F. (2017). Comparative expression of Rboh gene in *Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis* under drought stress. *Journal of Molecular and Cellular Research*, 29(4), 399-408.

Schneiter, A.A. & Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21, 901–903.

Tang, J., Liu, Q., Yuan, H., Zhang, Y. & Huang, S. (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.

Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G. K., Börner, A. & Mock, H. P. (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.

Yang, A., Dai, X. & Zhang, W. H. (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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6] [Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

Study on the expression of transcription factors WRKY and AP2Domain in oily sunflower under salt stress

Faezeh Hoseinpour[1], Reza Darvishzadeh[2,3*], Babak Abdollahi Mandoulakani[4]

[1]Former M.Sc. Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[3]Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding Author, Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.8.6]

ABSTRACT

Sunflower is one of the most important sources of plant oil in the world and in Iran. This plant is classified as semi-resistant to salt stress; however, its performance is negatively affected by salinity. Transcription factors are molecules that play an important role in the understanding and transmission of stress messages as well as many physiological processes. In this study, using real time polymerase chain reaction technology, transcript variations of two transcription factors WRKY and AP2Domain were examined in two oily sunflower lines; AS5305 (salt tolerant line) and 9CSA3 (salt susceptible line) at different salinity levels (2, 5, 8, 11, 14 ds/m). Sampling from leaves of plants was performed at 8-leaf stage in 0, 6, 12, 24, 48 hours after applying stress. The results of statistical analysis showed that the gene expression pattern of studied transcription factors was different in sunflower lines. So that, the rate of expression of both studied transcription factors (WRKY and AP2Domain) was significantly more in tolerant line (AS5305) than susceptible one in sever salt stress level (11 and 8 ds/m, respectively) 24 hours after applying stress. The results indicate the positive role of AP2Domain and WRKY transcription factors in the resistance mechanism of sunflower to salt stress.

Keyword: Gene expression, real time polymerase chain reaction, salt resistance, sunflower.