



## مطالعه بیان عوامل رونویسی MYB و WRKY، HD-ZIP، AP2-Domain در آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) تحت تنش خشکی

الهه اکبری<sup>۱</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۲\*</sup>، بابک عبدالهی<sup>۳</sup>، سینا بشارت<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی سابق 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. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۴. دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۰۹

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر بیان عوامل رونویسی MYB و WRKY، HD-ZIP، AP2-Domain در آفتابگردان روغنی، دو لاین با واکنش متفاوت انتخاب و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۶ کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۸ برگی از لحاظ وضعیت آبی در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. بعد از این مرحله تعدادی از گلدان‌ها در همان ظرفیت زراعی نگهداری شدند، اما به بقیه تنش خشکی ۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی اعمال شد. نمونه برداری از گیاهان یک و سه هفته بعد از اعمال تنش انجام گرفت. مطالعه بیان ژن‌های مذکور با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی انجام شد. مقایسات میانگین بیان عوامل رونویسی MYB و WRKY، AP2-Domain در دو لاین ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) نشان داد که بیان ژن‌ها یک هفته بعد از اعمال تنش در شدت تنش‌های مختلف محسوس نبوده اما در هفته سوم بعد از اعمال تنش در شدت تنش ۴۰ درصد میزان بیان ژن‌ها خصوصاً در لاین ENSAT254 افزایش یافته است. در رابطه با عامل رونویسی HD-ZIP میزان بیان یک هفته بعد از اعمال تنش در شدت تنش ۴۰ درصد در لاین ENSAT254 خیلی بیشتر از لاین LC1064C بود. میزان بیان در هفته سوم بعد از اعمال تنش در هر دو لاین در شدت تنش ۴۰ درصد افزایش یافت، هرچند افزایش بیان در لاین LC1064C اندکی بیشتر بود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد بیان زودهنگام عامل رونویسی HD-ZIP در افزایش مقاومت ژنوتیپ به تنش خشکی دخیل باشد. یافته‌های این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان برای تولید و توسعه ارقام متحمل به تنش خشکی مفید و فایده‌واقع شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش کم‌آبی، فاکتورهای رونویسی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

### مقدمه

در سال ۲۰۱۷ حدود ۲۶۵۳۳۰ هکتار و میزان محصول برداشت‌شده حدود ۴۷۷۶۳۰۰۰ تن برآورد شده است (FAO, 2017).

تنش‌های محیطی از قبیل تنش خشکی، شوری، دمای غیرمعمول، مسمومیت با فلزات سنگین، تابش UV از تهدیدات جدی برای رشد، سوخت‌وساز و بهره‌وری گیاهان

آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* L. گیاهی یک‌ساله، یک‌پایه، دولپه از تیره‌ی مرکبان (Composite) است. این جنس دارای گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید است که آفتابگردان زراعی جزو گونه‌های دیپلوئید با تعداد کروموزوم پایه  $n=17$  است. آفتابگردان عمدتاً به خاطر روغن خوراکی آن کشت می‌شود. سطح زیر کشت آفتابگردان

مختلف، پروتئین‌های WRKY (Mare et al., 2004) AP2-Domain (Aharoni et al., 2004) MYB، (Yamaguchi-Shinazaki, 2006) HD-ZIP (Javelle et al., 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. در مورد نقش عوامل رونویسی مختلف به‌طور همزمان، به‌عنوان ژن‌های تنظیم‌گر مهم در تنش خشکی تحقیقات اندکی صورت گرفته است. از طرفی از نظر مولکولی هم‌پوشانی بسیاری بین مسیرهای پاسخ به خشکی، شوری، سرما و مسیر ترانس‌اسی ABA در گیاهان وجود دارد (Zhang et al., 2009). در پژوهش حاضر، به‌منظور بررسی عوامل رونویسی دخیل در مقاومت آفتابگردان به تنش خشکی دو لاین با واکنش حساسیت متفاوت به خشکی انتخاب گردید و میزان بیان آن‌ها یک و سه هفته بعد از اعمال شدت‌های مختلف تنش خشکی با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در زمان واقعی (Real-time PCR) بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و اعمال تیمار تنش خشکی

بر اساس مطالعات پیشین دو لاین آفتابگردان روغنی ENSAT254 (لاین متحمل) و LC1064C (لاین حساس) با واکنش متفاوت به تنش خشکی انتخاب گردید (Soleimani et al., 2018). بذر لاین‌ها از موسسه ملی تحقیقات آگرونومی<sup>۱</sup> فرانسه تهیه شد. بذور در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و حاوی مخلوط دو نسبت خاک مزرعه و یک نسبت ماسه کشت شدند. در کف گلدان‌ها به مقدار مساوی، قبل از پر کردن با بستر کشت، مقداری سنگریزه جهت انجام زهکشی ریخته شد. گیاهان در شرایط کنترل‌شده در دمای روزانه حدود ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه حدود ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۱۰۰۰۰-۸۰۰۰ لوکس و فتوپریود تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت به مدت ۶ هفته تا مرحله ۶-۸ برگی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه پرورش یافتند. گیاهان تا رسیدن به مرحله ۶-۸ برگی به‌طور یکسان (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) آبیاری شدند و از این مرحله به بعد سطوح مختلف تنش خشکی ۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی اعمال شد

می‌باشند (Hasanuzzman et al., 2013, 2014). تنش خشکی بیشتر از سایر عوامل مانند گرما، سرما، فلزات سنگین؛ رشد و توزیع طبیعی پوشش‌های گیاهی را محدود می‌نماید (Athar and Ashraf, 2005). برحسب تعریف، مقاومت به خشکی (به‌عنوان یکی از تنش‌های اسموتیک) توانایی گونه‌ها یا ارقام از نظر رشد و تولید در شرایط کم‌آبی است. تأثیر یک دوره خشکی طولانی بر سوخت‌وساز گیاه به عوامل زیادی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به زمان وقوع تنش خشکی (مرتبط با دوره‌ی رشد گیاه)، ظرفیت نگهداری آب خاک و خصوصیات فیزیولوژیک گیاه اشاره کرد.

خشکی علاوه بر تنش اسمزی فرآیندهای اکسیداتیو را در سلول‌های گیاهی القا می‌کند که این فرآیندها با تولید ROSها (Reactive oxygen species) آغاز می‌شوند (Heidarvand and Amiri Maali, 2013). تجمع ROSها در سلول باعث فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی اختصاصی می‌شود که نتیجه آن تنظیم بیان ژن‌ها و تغییر در سنتز و فعالیت پروتئین‌ها است که در نهایت سلول را برای سازگاری با شرایط جدید آماده می‌کند (Dynowski et al., 2008; Lohar et al., 2007). بررسی و مطالعه‌ی بیان ژن‌ها متعاقب تنش و شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت و به‌خصوص ژن‌های تنظیم‌گر همچون عوامل رونویسی که نقش مهمی در فرآیند پاسخ به تنش در گیاهان بازی می‌کنند، مهم و حیاتی است. تحقیقات مرتبط با سازوکار تحمل به شرایط نامساعد محیطی در آفتابگردان در سطح مولکولی اطلاعات را افزایش داده و تولید ارقام متحمل به تنش‌های غیر زیستی از طریق بیوتکنولوژی را هموار می‌نماید (Rabbani et al., 2003).

ماهیت مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی عمدتاً کمی است، به عبارتی تعداد زیادی ژن باید القاء و مهار شوند تا پاسخ کارآمدی در برابر تنش‌های محیطی حاصل شود. عوامل رونویسی بیان همزمان تعداد زیادی ژن را کنترل می‌کنند. این عوامل نقطه‌ی تلفیق مسیرهای پیام‌رسانی هستند که پاسخ معمول گیاه به تنش را کنترل می‌کنند. عوامل رونویسی از اجزای کلیدی در کنترل بیان ژن در همهٔ بافت‌های زنده می‌باشند (Chew et al., 2013). حدود ۱۳۰۰ الی ۱۵۰۰ عامل رونویسی در گیاهان شناسایی شده است که برخی از آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Gof et al., 2013; Riechmann et al., 2000). از میان عوامل رونویسی

<sup>۱</sup>. Institut National de la Recherche Agronomique; INRA

اول: ۲ لاین آفتابگردان، فاکتور دوم: ۳ سطح تنش خشکی و فاکتور سوم: ۲ زمان نمونه برداری) با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد (شکل ۱). آزمایش بعد از تصادفی کردن نقشه‌ی طرح اجرا شد.

(Pormohammad Kiani et al., 2007; Darvishzadeh et al., 2010, 2011). نمونه برداری از گیاهان یک و سه هفته بعد از اعمال تنش انجام گرفت. بعد از نمونه برداری، نمونه‌های برگ‌ی در داخل نیتروژن مایع به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور

| زمان نمونه برداری<br>Smpling time | لاین متحمل Tolerant line   |    |     |    |     |    |
|-----------------------------------|----------------------------|----|-----|----|-----|----|
|                                   | تکرار Replication          |    |     |    |     |    |
|                                   | 1                          |    | 2   |    | 3   |    |
| اول<br>Frist                      | 100                        | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 |
|                                   | 100                        | 60 | 100 | 60 | 100 | 60 |
|                                   | 100                        | 40 | 100 | 40 | 100 | 40 |
| دوم<br>Second                     | 100                        | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 |
|                                   | 100                        | 60 | 100 | 60 | 100 | 60 |
|                                   | 100                        | 40 | 100 | 40 | 100 | 40 |
| زمان نمونه برداری<br>Smpling time | لاین حساس Susceptible line |    |     |    |     |    |
|                                   | تکرار Replication          |    |     |    |     |    |
|                                   | 1                          |    | 2   |    | 3   |    |
| اول<br>First                      | 100                        | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 |
|                                   | 100                        | 60 | 100 | 60 | 100 | 60 |
|                                   | 100                        | 40 | 100 | 40 | 100 | 40 |
| دوم<br>Second                     | 100                        | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 |
|                                   | 100                        | 60 | 100 | 60 | 100 | 60 |
|                                   | 100                        | 40 | 100 | 40 | 100 | 40 |

شکل ۱. شمای کلی از آزمایش بررسی تأثیر تنش خشکی بر میزان بیان عوامل نسخه برداری در ۲ لاین آفتابگردان روغنی؛ ۷ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش. به عنوان نمونه، واحد آزمایشی را نشان می‌دهد که در آن گیاه تحت تنش ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در کنار گیاه شاهد تحت شرایط ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی رشد می‌کند.

Fig. 1. General scheme of experiment to investigate the effect of drought stress on the expression level of transcription factors in 2 oilseed sunflower lines; 7 and 21 days after stress application. It shows, for example, an experimental unit in which the plant grows under 40% field capacity near to control plant under 100 field capacity conditions.

در ازت مایع خرد و هموژنیزه شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر بافر RNX-plus به لوله حاوی پودر نمونه اضافه شد و بعد از ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس کردن، یک میکرولیتر مرکاپتواتانول<sup>۱</sup> به لوله حاوی پودر و بافر RNX-plus اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد.

#### استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از محلول استخراج RNX-plus<sup>TM</sup> (شرکت سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده بر روی یخ انجام شد. به طور خلاصه ابتدا نمونه گیاهی به اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم

<sup>۱</sup>. Mercaptoethanol

### سنتز cDNA

قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase برای حذف DNA ژنومی طبق دستورالعمل موجود در کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA #K1621) انجام گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. بدین منظور در لوله استریل ۰/۲ میلی‌لیتری، به مقدار ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج‌شده (۲ میکروگرم) و ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT18) اضافه شد. پس از انجام یک سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۶۵ قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله حاوی مواد روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کند) انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش x5، 1 میکرولیتر آنزیم RiboLock™ RNase Inhibitor (۲۰ واحد در میکرومولار) و ۱ میکرومولار آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) به لوله حاوی مواد اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای °C ۴۲ و به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۷۲ قرار داده شد. برای بررسی صحت کیفیت cDNA سه واکنش: کنترل منفی -RT، کنترل منفی NTC (بدون الگو) و کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین جهت بررسی کیفیت cDNA، PCR با استفاده از آغازگرهای ژن‌ها روی cDNA انجام گرفت (شکل ۲b).

### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی (Real-time PCR)

برای انجام Real-time PCR از کیت Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) شرکت فرمنتاز استفاده شد. دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر با توجه به توالی آغازگرها و محصول حاصل از تکثیر ژن تعیین شد. Real-time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر از کیت Maxima SYBR

سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم<sup>۱</sup> به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ قرار داده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm 13000 سانتریفیوژ (Model: Velocity 14R, French) گردید. بعد از جدا کردن فاز رویی، هم‌حجم آن ایزوپروپانول<sup>۲</sup> اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm 12000 سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با اتانول ۷۵٪ شستشو و ۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به رسوب اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج‌شده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. ژل آگارز در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE<sup>۳</sup> یک برابر قرار گرفت و مقدار ۵ میکرولیتر RNA استخراج‌شده و ۶ میکرولیتر بافر بارگذاری<sup>۴</sup> (شامل ۹۸ میلی‌لیتر فرمامید<sup>۵</sup>، ۲ میلی‌لیتر EDTA<sup>۶</sup> نیم مولار با اسیدیته ۸، ۰/۰۲۵ گرم پودر گزین سیانول<sup>۷</sup> و ۰/۰۲۵ گرم بروموفنول بلو<sup>۸</sup>) مخلوط شده و در داخل چاهک ژل ریخته شد. الکتروفورز با ولتاژ ۷۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه انجام و عکس برداری از ژل با استفاده از دستگاه ژل داگ انجام گرفت. RNA استخراج‌شده حاوی rRNA، tRNA و mRNA است. rRNA حدود ۸۵ درصد RNA کل را تشکیل می‌دهد ولی میزان mRNA بسیار پایین و کمتر از ۵ درصد RNA کل است. وجود باندهای S ۵ rRNA، rRNA 18S و S ۲۸ rRNA دلیل بر صحت پروسه استخراج RNA است (شکل ۲a). کیفیت و غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ نیز مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نسبت OD<sup>۹</sup>260/OD<sup>۹</sup>۲۸۰ بررسی شد. نسبت‌های بین ۱/۸ تا ۲ به لحاظ کیفیت مناسب بوده و برای ادامه آزمایش استفاده شد. جهت بررسی الگوی بیان عوامل رونویسی (AP2-Domain، HD-ZIP، WRKY و MYB) تحت تنش خشکی در آفتابگردان از آغازگرهای طراحی شده توسط درویش‌زاده و همکاران (Darvishzadeh et al., 2008) استفاده شد (جدول ۱).

۶. Ethylenediaminetetraacetic acid

۷. Xylene cyanol

۸. Bromophenol blue

۹. Optical density

۱. Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)

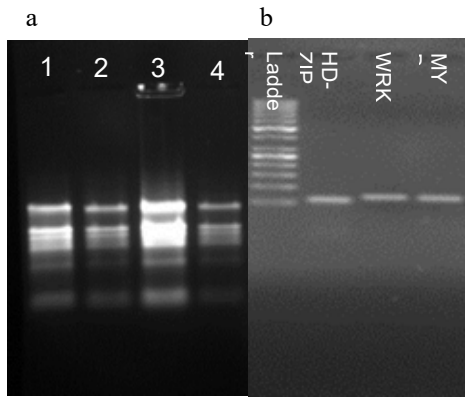
۲. Isopropanol (2-Propanol or Isopropyl alcohol)

۳. Tris/Borate/EDTA

۴. Loading buffer

۵. Formamide (Methanamide)

که به صورت مبسوط با ذکر جزئیات توسط شاه و مدین (Shah and Madden, 2004) تشریح شده است در نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد در نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام گرفت. نمودارها با Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند.



شکل ۲. نتایج الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد برای RNA استخراج شده از تعدادی از نمونه‌ها (a) و محصول PCR عوامل رونویسی MYB و WRKY، HD-ZIP روی cDNA سنتز شده (b). ستون اول در شکل b خط کش مولکولی 50 bp است که شامل باندهای 50-1000 bp است (شرکت Fermentase).

**Fig. 2. Electrophoresis results on 1% agarose gel for the extracted RNA (Figure a) and PCR product of HD-ZIP, WRKY and MYB transcription factors on the synthesized cDNA (Figure b). The first column in Figure b is a molecular ruler (ladder) of 50 bp containing bands of 50-1000 bp (Fermentase Company)**

### نتایج و بحث

تجزیه واریانس بر اساس آماره تیپ والد (Wald-type statistic) بر روی داده‌های بیان نشان می‌دهد که اثر تنش خشکی روی بیان نسبی همه عامل رونویسی مورد بررسی (MYB، WRKY، HD-ZIP، AP2-Domain)، اثر ژنوتیپ روی بیان نسبی AP2-Domain و MYB، اثر زمان بر روی بیان نسبی همه عامل رونویسی مورد بررسی (HD-ZIP، WRKY و MYB) به‌غیر از AP2-Domain معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل دوجانبه تنش خشکی × ژنوتیپ روی بیان نسبی WRKY، تنش خشکی × زمان روی بیان نسبی AP2-Domain و WRKY، اثر ژنوتیپ × مدت‌زمان پس از اعمال تنش خشکی روی بیان نسبی عامل رونویسی MYB

۰/۵، Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x) میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو<sup>۱</sup> (رفت) و پس رو<sup>۲</sup> (برگشت) (با غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در ۳ تکرار زیستی یا آزمایشی<sup>۳</sup> و ۲ تکرار تکنیکی<sup>۴</sup> در دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection- Qiagen مدل ۶۰۰۰ (شرکت کایژن، آمریکا) با استفاده از برنامه ۱۵ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (به‌منظور واسرشت سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال آغازگرها (جدول ۱) و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (به‌منظور بسط) انجام شد. پس از انجام Real-time PCR، منحنی ذوب با افزایش دما در هر ثانیه ۰/۵ درجه سانتی‌گراد از ۴۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای هر کدام از ژن‌ها رسم شد و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به هر ژن تأیید شد (شکل ۳). به‌منظور نرمال نمودن داده‌های حاصل از Real-time PCR از ژن اکتین به‌عنوان ژن کنترل داخلی (ژن خانه‌دار یا مرجع) استفاده شد (جدول ۱).

### تجزیه‌های آماری

برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن نسبت به شاهد ۱۰۰ ظرفیت زراعی از روش (Pffafi, 2001) به‌صورت زیر استفاده شد:

$$Ct \text{ (ژن خانه‌دار)} - Ct \text{ (ژن هدف تیمار)} = \Delta Ct_1 \text{ (نمونه تیمار)} \quad [1]$$

$$Ct \text{ (ژن خانه‌دار)} - Ct \text{ (ژن هدف شاهد)} = \Delta Ct_2 \text{ (نمونه شاهد)} \quad [2]$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2 \quad [3]$$

$$3^{-\Delta \Delta Ct} = \text{میزان بیان ژن} \quad [4]$$

در این روابط Ct چرخه آستانه<sup>۵</sup> است.

تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. به دلیل نرمال نبودن توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه آماری با روش ناپارامتری توسعه‌یافته توسط برونر و همکاران (Brunner et al., 2002)

4. Technical replicates

5. Threshold cycle

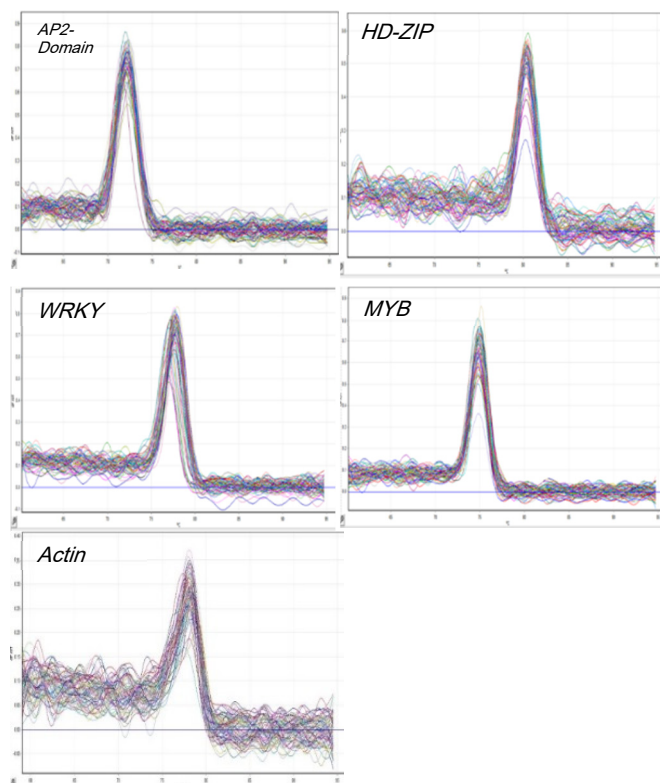
1. Forward primer

2. Reverse primer

3. Biological or experimental replicates

ارائه نشده است. در مواردی همچون آزمایش مذکور که حجم نمونه مورد مطالعه قابل توجه است، تجزیه واریانس بر اساس آماره تیپ والد بر آنوا ارجحیت دارد (Shah and Madden, 2004).

و اثر متقابل ۳ جانبه تنش خشکی × ژنوتیپ × مدت زمان روی بیان نسبی همه عامل رونویسی مورد بررسی (HD-ZIP, MYB و WRKY) به‌غیر از AP2-Domain معنی‌دار بود (جدول ۲). تجزیه واریانس بر اساس آماره تیپ آنوا (ANOVA-type statistic) نیز انجام گرفت که نتایج آن



شکل ۳. منحنی‌های ذوب عوامل رونویسی مورد بررسی (AP2-Domain, HD-ZIP, WRKY, MYB و Actin) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی گیاهان آفتابگردان تحت تنش خشکی. در نمودارها محور x دما (درجه‌ی سانتی‌گراد) و محور y نسبت dF/dT به dT است. به‌بیان دیگر، نسبت مشتق تابع فلورسانس در مقابل دمای ذوب است که نشان‌دهنده میزان تغییرات فلورسانس در واکنش است.

Fig. 3. Melting curves of studied transcription factors (AP2-Domain, HD-ZIP, WRKY, MYB and Actin) in real time polymerase chain reaction of sunflower plants under drought 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. آغازگرهای اولیگونوکلوئوتیدی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی گیاهان آفتابگردان تحت تنش خشکی

Table 1. Oligonucleotide primers used in real-time RT-PCR of sunflower plants under drought stress

| نام توالی<br>Name of sequence | عمل احتمالی<br>Putative function       | شماره دسترسی<br>Accession number | آغازگر پیش رو<br>Forward primer<br>5'→3' | آغازگر پس رو<br>Reverse primer<br>5'→3' | دمای اتصال<br>Annealing temp.<br>(°C) | اندازه محصول<br>Product size<br>(bp) |
|-------------------------------|--|----------------------------------|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| DH0AQA11Z<br>A10RM1           | AP2-domain                             | CX946549                         | CAAGAACTCGGCCAATTCGT                     | AGGAGTAGCAAGGCACCATCA                   | 56                                    | 59                                   |
| DH0AQA17Z<br>H04RM1           | ZIP-HD                                 | CX946945                         | GCAGCACATCGAGGACATCA                     | GGATCGCACCTCGTGGTTT                     | 57                                    | 56                                   |
| AJ412452                      | WRKY                                   | AJ412452                         | TTGGATTGAAGATGGTCATCTG<br>TGA            | CCCTATTCAATTCTTCCACC<br>AAA             | 54                                    | 67                                   |
| DH0AC002ZF<br>08F08FM1        | MYB-related<br>transcription<br>factor | CD848175                         | CGCCACACGCATTCTCT                        | CGAGCGCAGCAGCATCTA                      | 60                                    | 66                                   |
| AF282624                      | Actin                                  |                                  | TCAATGTTCCCGCCATGTAT                     | GACCACTGGCATAGAGGGA<br>AAG              | 57                                    | 60                                   |

جدول ۲- تجزیه واریانس تغییرات رونوشت عوامل رونویسی مورد بررسی (AP2-Domain, HD-ZIP, WRKY و MYB) در دو لاین ENSAT254 و LC1064C آفتابگردان روغنی تحت تنش خشکی در زمان‌های مختلف نمونه برداری

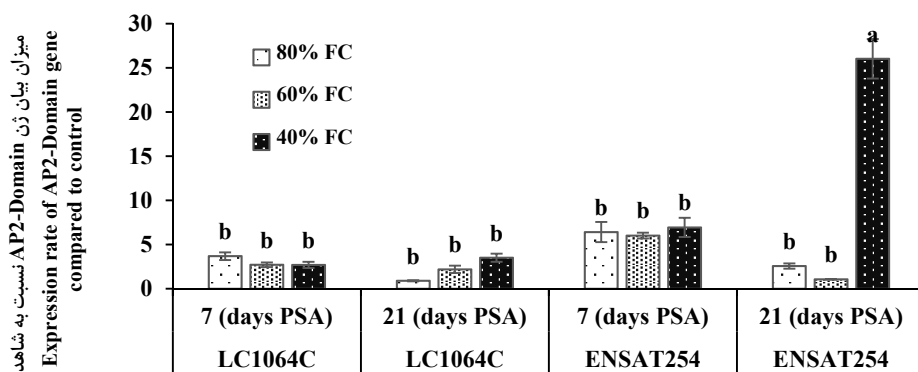
Table 2. Analysis of variance for transcriptome variations of studied transcription factors (AP2-Domain, HD-ZIP, WRKY, and MYB) in two oilseed sunflower lines (ENSAT254 and LC1064C) under drought stress at different sampling times

| S.O.V        | منابع تغییرات        | df <sub>N</sub> | df <sub>D</sub> | Wald type statistics / آماره تیپ Wald |                    |                    |                     |
|--------------|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|              |                      |                 |                 | AP2-Domain                            | HD-ZIP             | WRKY               | MYB                 |
| Drought (D)  | خشکی                 | 2               | 24              | 6.07*                                 | 22.52**            | 1.37**             | 67.43**             |
| Genotype (G) | ژنوتیپ               | 1               | 24              | 4.54*                                 | 0.07 <sup>ns</sup> | 2.87 <sup>ns</sup> | 3.19**              |
| Time (T)     | زمان                 | 1               | 24              | 1.27 <sup>ns</sup>                    | 7.25**             | 12.84**            | 32.29**             |
| D × G        | خشکی × ژنوتیپ        | 2               | 24              | 3.22 <sup>ns</sup>                    | 1.80 <sup>ns</sup> | 1.15**             | 56.45 <sup>ns</sup> |
| D × T        | خشکی × زمان          | 2               | 24              | 10.38**                               | 2.16 <sup>ns</sup> | 0.65**             | 27.43 <sup>ns</sup> |
| G × T        | ژنوتیپ × زمان        | 1               | 24              | 0.00 <sup>ns</sup>                    | 2.90 <sup>ns</sup> | 0.29 <sup>ns</sup> | 2.91**              |
| T × D × G    | زمان × خشکی × ژنوتیپ | 2               | 24              | 2.29 <sup>ns</sup>                    | 7.02*              | 9.56**             | 32.04**             |

S.O.V: Source of variation

روز بعد از اعمال تنش خشکی) تغییرات بیان ژن روند افزایشی نشان داد. بیشترین میزان بیان در هفته سوم نسبت به هفته اول در شدت تنش ۴۰ درصد مشاهده شد. درست است که در هر دو لاین میزان بیان در هفته سوم از نمونه برداری در شدت تنش ۴۰ درصد افزایش یافت اما میزان افزایش بیان در لاین ENSAT254 خیلی بیشتر از لاین LC1064C بود. نتایج نشان می‌دهد الگوی بیان ژن در ۲ ژنوتیپ متفاوت است که این حاکی از واکنش متفاوت ۲ ژنوتیپ به تنش خشکی است (شکل ۴).

مقایسه میانگین بیان ژن AP2-Domain در لاین ENSAT254 نشان داد که میزان بیان یک هفته بعد از اعمال تنش تغییرات محسوسی در شدت‌های مختلف تنش نداشت، اما در هفته‌ی سوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی) میزان بیان در تیمار ۴۰ درصد تنش خشکی نسبت به تیمارهای دیگر افزایش داشت (شکل ۴). در لاین LC1064C میزان بیان در هفته اول (۷ روز بعد از اعمال تنش) در شدت‌های مختلف تنش از ۸۰ تا ۴۰ درصد روند کاهشی نشان داد، اما در هفته سوم از اعمال تنش (۲۱



ترکیب تیماری ژنوتیپ-زمان نمونه برداری (روز)  
Genotype × Sampling time (day)

شکل ۴. الگوی بیان فاکتور رونویسی AP2-Domain در لاین‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان روغنی در سطوح تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) یک و سه هفته بعد از اعمال تنش. میله خطا (Error bar) در روی ستون‌ها انحراف استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. FC: ظرفیت زراعی (مفهوم ظرفیت زراعی) برای بیان ظرفیت نگهداری آب در خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد). PSA: بعد از اعمال تنش.

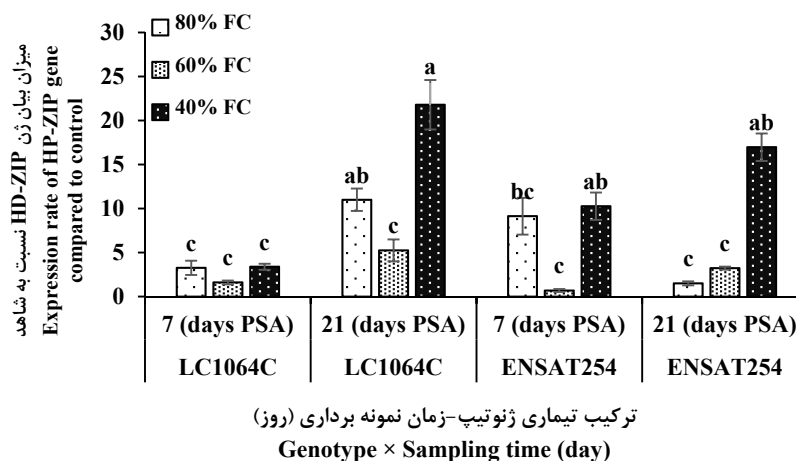
Fig. 4. Pattern of AP2-Domain transcription factor expression in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) oilseed sunflower lines at 80, 60 and 40% drought stress levels, one and three weeks post stress application. The vertical lines on the columns show the standard error (SE). FC: Field Capacity (The concept of field capacity is used to express the water holding capacity of soil). PSA: Post stress application

نسبی ژن در هفته اول نمونه‌برداری در تنش ۸۰ و ۴۰ درصد و کمترین میزان بیان در تنش ۶۰ درصد مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی) روندی مشابه با زمان نمونه‌برداری اول (۷ روز بعد از اعمال تنش خشکی) نشان داد به طوری که بیشترین میزان بیان در تنش ۴۰ و ۸۰ و کمترین میزان بیان در شدت تنش ۶۰ درصد مشاهده شد. در مقایسه دو زمان نمونه‌برداری، میزان بیان در تمام شدت تنش‌ها در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی) بیشتر شده است. در مقایسه دو لاین مورد مطالعه مشاهده شد میزان بیان در هفته اول نمونه‌برداری در شدت تنش ۴۰ درصد در لاین ENSAT254 خیلی بیشتر از لاین LC1064C بود. در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی) میزان بیان در هر دو لاین در شدت تنش ۴۰ درصد افزایش یافت، هرچند افزایش بیان در لاین LC1064C اندکی بیشتر بود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد بیان زودهنگام این عامل رونویسی در افزایش مقاومت ژنوتیپ به تنش خشکی مهم باشد (شکل ۵).

بیشترین میزان بیان نسبی فاکتور رونویسی HD-ZIP در لاین ENSAT254 در هفته اول بعد از اعمال تنش (۷ روز بعد از اعمال تنش) در تیمارهای ۸۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و کمترین مقدار در تنش ۶۰ درصد مشاهده شد (شکل ۵).

احتمالاً با افزایش بیان ژن در شدت تنش ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، یک سازگاری به تنش در ژنوتیپ ایجاد شده و بنابراین ژنوتیپ نیازی به افزایش بیان ژن در شدت تنش ۶۰ درصد ندیده است. با پیش رویی شدت تنش و سخت شدن شرایط، ژنوتیپ برای ایجاد تحمل بیشتر دوباره نیاز به افزایش بیان ژن پیدا کرده است؛ بنابراین سیستم زیستی می‌تواند گفت هوشمندانه عمل کرده است؛ چون افزایش هر نوع فرآورده‌ای برای مقابله با تنش به قیمت صرف بخشی از فرآورده‌های فتوسنتزی به‌جای استفاده از آن در تولید عملکرد نهایی است (Madhava Rao et al., 2006).

در این لاین (ENSAT254) بعد از ۳ هفته از اعمال تنش روند افزایشی در بیان نسبی ژن در شدت‌های مختلف تنش مشاهده شد. به طوری که بیشترین میزان بیان ژن در تنش ۴۰ درصد مشاهده شد. در لاین LC1064C بیشترین میزان بیان



شکل ۵. الگوی بیان فاکتور رونویسی HD-ZIP در لاین‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان روغنی در سطوح تنش خشکی (۸۰، ۶۰، ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) یک و سه هفته بعد از اعمال تنش. میله خطا (Error bar) در روی ستون‌ها انحراف استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. FC: ظرفیت زراعی. PSA: بعد از اعمال تنش.

**Fig. 5.** Pattern of HD-ZIP transcription factor expression in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) oilseed sunflower lines at 80, 60 and 40% drought stress levels, one and three weeks post stress application. The vertical lines on the columns show the standard error (SE). FC: Field capacity. PSA: Post stress application

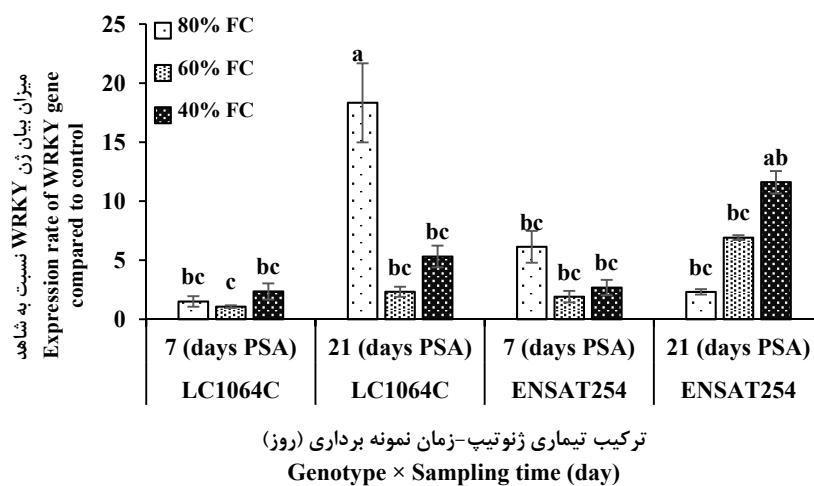


شاهد در شدت‌های مختلف تنش خصوصاً ۴۰ و ۶۰ درصد کاهش یافته است؛ اما در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش) میزان بیان نسبی ژن در شدت تنش ۴۰ درصد به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (شکل ۷). در لاین LC1064C نیز میزان بیان نسبی ژن در هفته اول در شدت تنش ۴۰ درصد کاهش اما در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش) در تنش‌های ۴۰ و ۶۰ درصد افزایش یافته است. درست است روند تغییرات بیان ژن در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه تا حدودی مشابه بود؛ اما شدت بیان در لاین ENSA254 بیشتر از لاین LC1064C بود (شکل ۷).

عوامل رونویسی گروهی از ژن‌ها هستند که در زمان القا تنش معمولاً قبل از ژن‌های عملکردی بیان می‌شوند. در مطالعه‌ای نقش عوامل رونویسی در پاسخ گیاهان به بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله می‌توان به مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2009) اشاره نمود که توانستند ژن GmERF3 که نوعی عامل رونویسی AP2/EFR است را از گیاه سویا به توتون منتقل نمایند و مشاهده نمودند که گیاه گیرنده مقاومت قابل توجهی نسبت به بیماری باکتریایی *Ralstonia solanacearum* و قارچی *Alternata alternaria* نشان داد.

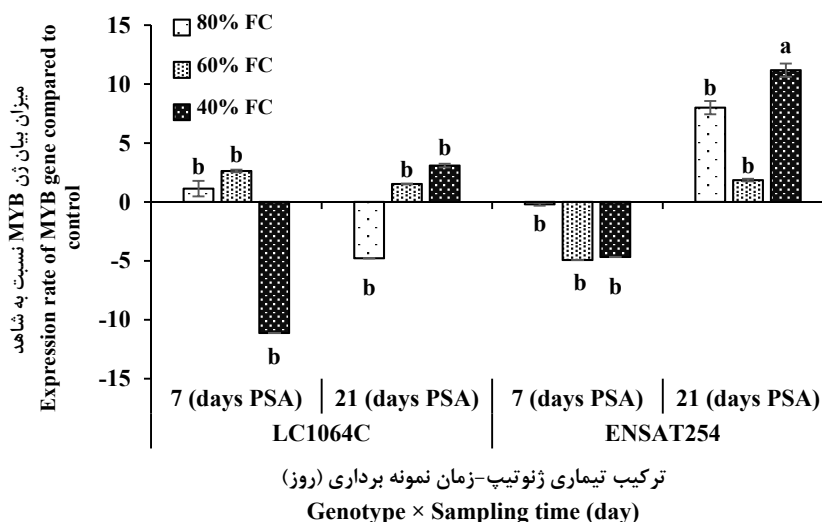
در رابطه با عامل رونویسی WRKY نتایج نشان داد که در لاین ENSAT254 با اعمال تنش خشکی میزان بیان نسبی فاکتور رونویسی WRKY در هفته اول (۷ روز بعد از اعمال تنش) در شدت‌های مختلف تنش روند کاهشی داشته است. به‌طوری‌که کمترین میزان بیان در شدت‌های تنش ۴۰ و ۶۰ و بیشترین میزان بیان در تنش ۸۰ مشاهده شد. در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش) بیشترین میزان بیان نسبی در شدت تنش ۴۰ درصد مشاهده شد. در لاین LC1064C در هفته اول (۷ روز بعد از اعمال تنش) میزان بیان نسبی ژن در شدت تنش ۸۰ درصد بیشتر از سایر تنش‌ها بود. در هفته سوم بعد از اعمال تنش روند افزایشی در میزان بیان ژن مشاهده شد. در مقایسه دو لاین ENSAT254 و LC1064C در زمان نمونه‌برداری دوم (۲۱ روز بعد از اعمال تنش) میزان بیان نسبی در تنش ۴۰ درصد در لاین ENSAT254 بسیار بیشتر از لاین LC1064C بود؛ بنابراین، شدت بیان بسته به ژنوتیپ و سطح تنش متفاوت است که ناشی از واکنش متفاوت لاین‌ها به تنش خشکی است (شکل ۶).

در رابطه با عامل رونویسی MYB نتایج نشان داد که در لاین ENSA254 با اعمال تنش خشکی میزان بیان نسبی در MYB در هفته اول (۷ روز بعد از اعمال تنش) نسبت به



شکل ۶. الگوی بیان فاکتور رونویسی WRKY در لاین‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان روغنی در سطوح تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) یک و سه هفته بعد از اعمال تنش. میل خطا (Error bar) در روی ستون‌ها انحراف استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. FC: ظرفیت زراعی. PSA: بعد از اعمال تنش.

Fig. 6. Pattern of WRKY transcription factor expression in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) oilseed sunflower lines at 80, 60 and 40% drought stress levels, one and three weeks post stress application. The vertical lines on the columns show the standard error (SE). FC: Field capacity. PSA: Post stress application.



شکل ۷. الگوی بیان فاکتور رونویسی *MYB* در سطوح تنش خشکی (۶۰، ۸۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در لاین‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان روغنی یک و سه هفته بعد از اعمال تنش. میله خطا (Error bar) در روی ستون‌ها انحراف استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. FC: ظرفیت زراعی. PSA: بعد از اعمال تنش. از میزان بیان نسبی ژن  $\text{Log}_2$  گرفته شده است (داده‌ها به  $\text{Log}_2$  بیان شده‌اند).

**Fig. 7.** Pattern of MYB transcription factor expression in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) oilseed sunflower lines at 80, 60 and 40% drought stress levels, one and three weeks post stress application. The vertical lines on the columns show the standard error (SE). FC: Field capacity. PSA: Post stress application. The relative gene expression was reported as  $\text{Log}_2$  fold change.

bZIP5 در تنش شوری در رقم چینی بهاره کاهش و در رقم ماهوتی افزایش یافت؛ اما در رابطه با ژن bZIP1 میزان بیان در رقم چینی بهاره افزایش و در رقم ماهوتی کاهش یافت. گیاکوملی و همکاران (Giacomelli et al., 2010) نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در آفتابگردان را بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها با آنالیز qRT-PCR مشخص شد که همبستگی مثبتی بین بیان عوامل رونویسی WRKY و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارد. در مطالعه دیگری (Esmailzadeh Mianlengh et al., 2018)، با به‌کارگیری تکنولوژی Real-time PCR میزان بیان پنج عامل رونویسی از خانواده‌ی bZIP در شرایط مختلف تنش اسمزی در آفتابگردان بررسی شد. در این مطالعه از گیاهچه‌های کامل ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش اسمزی نمونه‌برداری شد. بررسی نتایج نشان داد از میان ژن‌های موردبررسی، 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 به‌عنوان ژن پاسخ‌گوی اولیه دسته‌بندی شد

در پژوهش‌های و همکاران (Rahaii et al., 2012) روی دو ژنوتیپ گندم تحت تنش شوری بلندمدت مشاهده شد بیان هر دو ژن WRKY1 و WRKY2 در رقم ماهوتی (متحمل) در پاسخ به تنش افزایش یافت. مشاهده شد که اعمال تنش شوری در رقم چینی بهاره (حساس)، تأثیری بر سطح بیان این دو ژن نداشته و نسبت به شرایط غیر تنش سطح بیان ژن‌ها ثابت باقی ماند. محققین فوق نتیجه‌گیری کردند که این ژن‌ها چون منحصراً در رقم متحمل بیان شدند، بنابراین احتمالاً باعث افزایش تحمل رقم متحمل (ماهوتی) به تنش شوری می‌شوند. در رابطه با دو ژن MYB2 و MYB3 مشاهده شد در رقم ماهوتی (متحمل) سطح بیان هر دو ژن در شرایط تنش افزایش یافت، اما در رقم چینی بهاره (حساس) تنها MYB2 به تیمار شوری پاسخ داد و میزان بیان آن کاهش یافت. محققین فوق نتیجه‌گیری کردند که احتمالاً MYB3 ژنی است که اختصاصاً در رقم متحمل بیان می‌شود. بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌های خانواده bZIP نشان داد که از چهار عضو انتخابی این خانواده دو عضو bZIP در پاسخ به تنش شوری در گندم شرکت داشتند. میزان بیان

راه‌انداز ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی، شوری و سرما (RDZ9A، COR78، LT178) دارای دو عنصر فعال سیس ABRE و DRE/CRT هستند که هر دو آن‌ها در القای بیان ژن طی تنش دخالت دارند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). حدود ۴۰ درصد ژن‌های القاشده با شوری و صد درصد ژن‌های القاشده با ABA به‌وسیله‌ی تنش خشکی نیز القا می‌شوند. این نتایج گویای وجود یک سامانه‌ی تنظیمی مشترک یا همپوشانی بین مسیرهای پیام‌رسانی تنش خشکی، شوری و ABA است (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

راه‌اندازهای مربوط به ژن‌های القاشده با ABA دارای توالی‌های تنظیمی هستند که به‌وسیله‌ی عوامل فعال ترانس در انتقال پیام ABA شناسایی می‌شوند. بین این توالی‌ها، (C/T)ACGTGGC یک عنصر پاسخ‌دهنده به ABA (ABRE) است که به‌عنوان عنصر تنظیمی اصلی سیس و کنترل وابسته به ABA بیان ژن‌ها، شناخته می‌شود (Hirayama and Shinozaki, 2010). این توالی به‌وسیله‌ی bZIPها که AREB (عامل متصل به ABA) (Uno et al., 2000) یا ABF (عامل متصل به ABRE) (Choi et al., 2000) نیز نامیده می‌شوند، شناسایی می‌شوند. با این اوصاف تمام ژن‌های القاشده با ABA در راه‌انداز خود حاوی موتیف ABRE نیستند. MYC و MYB دو عنصر تنظیمی سیس بشمار می‌روند که در تنظیم بیان ژن وابسته به ABA دخالت دارند. این عوامل نیز در پاسخ به تجمع درون‌زاد ABA (مرحله‌ی آخر پاسخ به تنش‌های محیطی) سنتز می‌شوند و تشدید بیان آن‌ها موجب تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو می‌شود (Abe et al., 2003). نقش عوامل رونویسی bZIPها در پیام‌رسانی تنش و ABA در تعدادی از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس (Uno et al., 2000; Choi et al., 2000)، برنج (Kobayashi et al., 2008)، جو (Casaretto and Ho, 2003)، گوجه‌فرنگی (Hsieh et al., 2010; Orellana et al., 2010)، سیب‌زمینی (García et al., 2011) بررسی شده است. بسته شدن روزنه طی خشکی یک پاسخ سازگار دهنده محسوب می‌شود که به‌وسیله‌ی ABA کنترل می‌شود.

بنابراین جمع‌بندی نتایج به همراه نتایج مطالعه اخیر حاکی از نقش مثبت عوامل رونویسی در القای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان از جمله آفتابگردان است.

در حالی که ژن bZ-502 دیر به تنش اسمزی پاسخ داد که احتمالاً نشان می‌دهد این ژن در ایجاد پاسخ‌های پایدارتر در شرایط تنش اسمزی نقش دارد (Esmailzadeh Mianlengheh et al., 2018).

در تعدادی از مطالعات سرکوب عوامل رونویسی در پاسخ به تنش همچون مطالعه اخیر دیده شده است (Janmohammadi and Mahfoozi, 2013). گزارش شده است سرکوب عوامل رونویسی دخیل در تنظیم بیان ژن‌های مقاومت به سرما کلید حفظ سطح بالای رونوشت ژن‌ها در شرایط تنش است (Agarwal et al., 2006; Gao et al., 2002; Novillo et al., 2004).

در برنج بیان OsWRKY78 به‌وسیله‌ی تنش شوری و استعمال خارجی اسید آسبیزیک (ABA) افزایش یافت؛ در حالی که بیان آن به‌وسیله جیبرلین (GA) و اعمال دمای پایین کاهش یافت و تحت تنش خشکی تغییراتی در بیان آن مشاهده نشد. در آرابیدوپسیس چهار ژن (AtWRKY25، AtWRKY40، AtWRKY28 و AtWRKY70) طی تنش اکسیداتیو و همچنین تنش اسمزی، شوری، گرما و سرما بیان شدند (Seki et al., 2002). ژن BhWRKY در *B. hygrometrica* قبل از القای بیان ژن BhGOIS1 به‌وسیله‌ی پسابیدگی با تیمار با ABA القا شد که این امر حاکی از دخالت ژن موردنظر در مسیر پیام‌رسانی وابسته به ABA برای تنظیم بیان ژن GOIS است (Wang et al., 2009). تشدید بیان ژن HvWRKY جو در Bahiagrass سبب بهبود در تحمل به تنش پسابیدگی شد (Xiong et al., 2010). در برنج تشدید بیان OsWRKY11 سبب ارتقای تحمل به تنش خشکی و گرما شد. در حالی که تشدید بیان OsWRKY72 و OsWRKY45 موجب افزایش تحمل به شوری و خشکی شد. تشدید بیان OsWRKY8 فقط تحمل به شوری را بهبود بخشید (Qiu and Yu, 2009). افزایش بیان ژن‌های GmWRKY و GmWRKY13 سویا نیز موجب افزایش تحمل به تنش خشکی و شوری شد. همچنین بیان ژن‌های OsWRKY8 و OsWRKY بیان ژن‌های آرابیدوپسیس به ترتیب موجب افزایش تحمل به تنش خشکی و اسمزی شد. ژن HvWRKY38 جو که با ژن AtWRKY40 آرابیدوپسیس و ژن OsWRKY71 برنج همولوگ است تحت تنش دمای پایین، خشکی و پسابیدگی تغییر بیان نشان داد.

### نتیجه‌گیری نهایی

طبق این نتایج، فاکتورهای رونویسی AP2-Domain، HD-ZIP، WRKY و MYB به‌ویژه بالقوه AP2-Domain و MYB در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به تنش خشکی نقش دارند. از طرف دیگر با توجه به تأیید مقاومت لاین مقاوم (ENSAT254) در سطح مولکولی، می‌توان از این لاین در تولید رقم مقاوم به تنش خشکی در آفتابگردان روغنی استفاده کرد. افزایش بیان ژن‌های دخیل در مقاومت و دست‌کاری‌های مولکولی ژن‌های مقاومت برای افزایش تأثیر آن‌ها در برابر تنش خشکی، استفاده تجاری از مهندسی ژنتیک را در گیاهان فراهم می‌کند (Mohamadian et al., 2014).

### تشکر و قدردانی

از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش و همچنین از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به خاطر در اختیار قرار دادن بذور لاین‌های خالص آفتابگردان روغنی تشکر و قدردانی می‌شود. از داوران محترم بی‌نام به خاطر ارائه نظرات ارزنده جهت بهبود سطح علمی مقاله سپاسگزاری می‌شود.

تکنولوژی DNA نو ترکیب از طریق همسانه سازی و انتقال ژن‌های مؤثر نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی داشته است. از آنجاکه ژنتیک تحمل به اکثر تنش‌های غیر زیستی پلی ژنیک است و تعداد زیادی ژن در کنترل آن‌ها دخالت دارند انتقال و بیان یک ژن عملکردی قادر به ایجاد تغییرات کامل در پاسخ گیاه به تنش‌ها و ایجاد مقاومت در سطح مطلوب در گیاه نیست. عوامل رونویسی که در تنظیم مسیرهای انتقال پیام و بیان ژن‌ها دخالت دارند در گروه ژن‌های تنظیمی گروه‌بندی می‌شوند و کاندیدای مناسب برای انتقال و افزایش مقاومت گیاهان می‌باشند. این عوامل با عناصر تنظیمی سیس موجود در ناحیه راه‌انداز ژن‌های زیادی که در پاسخ به تنش‌ها مؤثرند برهمکنش نشان داده و سبب تنظیم بیان آن‌ها می‌شوند؛ بنابراین یافته‌های تحقیق حاضر می‌تواند در برنامه‌های اصلاح مولکولی آفتابگردان برای تولید و توسعه ارقام مقاوم به تنش خشکی مفید و فایده‌آمیز بوده و راه را برای کاهش خسارات ناشی از این تنش در آفتابگردان هموار نماید.

### منابع

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 15, 63-78.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fuji, H., Zheng, X., Zhu, J. K., 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 37636-37645.
- 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, 2463-2480.
- Athar, H.R. Ashraf, M., 2005. Photosynthesis under drought stress. In: Pessarakli, M. (ed.), *Handbook of Photosynthesis*. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, pp. 793-804.
- Brunner, E., Domhof, S., Langer, F., 2002. *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiment*. New York: Wiley.
- Casaretto, J. Ho, T.H., 2003. The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *Plant Cell*. 15, 271-284.
- Chew, W., Hrmova, M., Lopato, S., 2013. Role of homeodomain leucine zipper (HD-ZIP) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 8122-8147.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 1723-1730.

- Darvishzadeh, R., Pirzad, A., Hatami Maleki, H., Poormohammad Kiani S., Sarrafi A. 2010. Evaluation of the reaction of sunflower inbred lines and their F1 hybrids to drought conditions using various stress tolerance indices. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 8, 1037-1046.
- Darvishzadeh, R., Pirzad, A., Bernousi, I., Abdollahi Mandoulakani, B., Azizi, H., Akhondi, N., Poormohammad Kiani S., Sarrafi A. 2011. Genetic properties of drought tolerance indices in sunflower, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. 61, 593-601.
- 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, 740-746.
- Dynowski, M., Schaaf, G., Loque, D., 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 414, 53-61.
- Esmailzadeh Mianlengheh, 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. [In Persian with English summary].
- FAO. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy. Available from: <http://www.faostat.fao.org/>
- Gao, M. J., Allard, G., Byass, L., Flanagan, A. M., Singh, J., 2002. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*. 49, 459-471.
- 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.
- Hasanuzzaman, M., Mahabub Alam, M., Nahar, K., Al-Mahmud, J. K., Fujita, M., 2014. Exogenous Salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Australian Journal of Crop Science*. 8, 631-639.
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., 2013. Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. *Ecotoxicology*. 22, 584-596.
- Heidarvand, L., Amiri Maali, R., 2013. Physiobiochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*. 170, 459-469.
- Hirayama, T., Shinozaki, K., 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*. 61, 1041-1052.
- Hossain, M.A., Cho, J.-I., Han, M., Ahn, C.-H., Jeon, J.-S., An, G., Park, P.B., 2010. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. *Journal of Plant Physiology*. 167, 1512-1520.
- Hsieh, T.H., Li, C.W., Su, R.C., Cheng, C.P., Sanjaya Tsai, Y.C., Chan, M.T., 2010. A tomato bZIP transcription factor, SlAREB, is involved in water deficit and salt stress response. *Planta*. 231, 1459-1473.
- Janmohammadi, M. Mahfoozi, S., 2013. Regulatory network of gene expression during the development of frost tolerance in plants. *Current Opinion in Agriculture*. 2, 11-19.
- Javelle, M., Klein-Cosson, C., Vernoud, V., Boltz, V., Maher, C., Timmermans, M., Rogowsky, P., 2011. Genome-wide characterisation of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. *Plant Physiology*. 157, 790-80
- Kobayashi, F., Takumi, S., Nakamura, C., 2008. Increased freezing tolerance in an ABA-hypersensitive mutant of common wheat. *Journal of Plant Physiology*. 165, 224-32
- Lohar, D.P., Haridas, S., Gantt, J.S., 2007. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist*. 173, 39-49.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy, K. 2006. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer Netherlands.

- 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, 399-416.
- Mohamadian Farsani, A., Hatami Maleki. H., Darvishzadeh, R., Hoshyardel, F., 2014. Study of changes in the phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein (TLP) genes in sunflower genotypes in response to fungal isolates associated with the black stem disease. *Crop Biotechnology*. 7, 15-23. [In Persian].
- Muñiz García, M. N., País, S. M., Téllez-Iñón, M. T., Capiati, D. A., 2011. Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is up-regulated during tuber development and by abiotic stress. *Planta*. 233, 661-674.
- Novillo, F., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Salinas, J., 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 101, 3985-3990.
- Orellana, S., Yanez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., Gonzalez, E., Ruiz-Lara, S., Casaretto J. A., 2010. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance, and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell and Environment*. 33, 2191-2208.
- Pffafi, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29, e45-e45.
- Poormohammad Kiani, S., Grieu, P., Maury, P., Hewezi, T., Gentzbittel, L., and Sarrafi, A. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 114, 193-207.
- Qiu, Y. Yu, D., 2009. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Environmental and Experimental Botany*. 65: 35-47.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., 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, 1755-1767.
- Rahaii, M., Gomarian, M., Alizadeh, H., Melbobi, M. A., Naghavi, M. R., 2012. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 13, 580-595. [In Persian with English summary].
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Creelman, R., 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 290, 2105-2110.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct. Integr. Genomics*. 2, 282-291.
- Xiong, X., 2010. Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). *Molecular Breeding*. 25, 419-432.
- Shah, D.A. Madden, L.V., 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiment. *Phytopathology*. 94, 33-43.
- Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 58, 221-7.
- Soleimani, G.A., Darvishzadeh, R., Ebrahimi, A., Bihamta, M.R., 2018. Identification of SSR and retrotransposon-based molecular markers linked to morphological characters in oily sunflower under natural and water-limited states. *Journal of Genetics*. 97, 189-203.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America. 97, 11632-11637.
- Wang, Z., Zhu, Y., Wang, L., Liu, X., Liu, Y., Phillips, J., Deng, X., 2009. A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolS1) promoter. *Planta*. 230, 1155–1166.
- Wang, H. H., Hao, J. J., Chen, X. J., Hao, Z. N., Wang, X., Lou, Y. G., Peng, Y. L., Guo, Z. J., 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Molecular Biology*. 65, 799–815
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Biology*. 57, 781-803.
- Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., Ma, Y., 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 60, 3781-3796.