"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و سوم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6

ارزیابی بیان نسبی ژن‌های دهایدرین، آکواپورین و *Ha-L1L* در ژنوتیپ‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) در شرایط تنش خشکی

Assessment of relative expression of *Dehydrin, Aquaporin and Ha-L1L* genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes under drought stress conditions

سودا حسنه[۱]، رضا درویش‌زاده[۲]، بابک عبدالهی[۳]، سینا بشارت[۴]، فائزه حسین‌پور[۵] و زهرا ابراهیمی‌پور[۶]

چکیده

حسنه، س.، ر. درویش‌زاده، ب. عبدالهی، س. بشارت، ف. حسین‌پور و ز. ابراهیمی‌پور. ۱۴۰۰. ارزیابی بیان نسبی ژن‌های دهایدرین، آکواپورین و *Ha-L1L* در ژنوتیپ‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) در شرایط تنش خشکی. **نشریه علوم زراعی ایران. ۲۳ (۱): ۲۹-۱۴.**

در این تحقیق اثر تنش خشکی بر بیان نسبی ژن‌های دهایدرین (*Dehydrin*)، آکواپورین (*Aquaporin*) و *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) در دو لاین [ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس)] آفتابگردان روغنی با حساسیت متفاوت به خشکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان تا مرحله هشت برگی در حد ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شده و بعد از آن تعدادی از گلدان‌های مربوط به هر لاین در همان وضعیت نگه‌داری شده (نمونه‌های شاهد) و تعدادی تحت تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) قرار داده شدند. نمونه‌برداری در سه زمان؛ هفت، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش انجام گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان بیان نسبی ژن دهایدرین، ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد که در حدود ۲/۹ برابر مقدار آن در همین ترکیب تیماری در ژنوتیپ LC1064C (حساس) بود. بیشترین میزان بیان نسبی ژن آکواپورین، ۱۴ روز بعد از اعمال تنش خشکی در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد. بررسی بیان نسبی ژن *Ha-L1L* نشان داد که در هفته اول در حالی که در شدت‌های مختلف تنش خشکی تغییراتی در بیان ژن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده نشد؛ در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) در شدت‌های مختلف تنش از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ۴۰ درصد، بیان ژن روند افزایشی داشت. در ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش بر عکس، عمده تغییرات در بیان نسبی ژن، در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که این ژن نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش خشکی داشته و میزان بیان ژن به عنوان تابعی از وضعیت آبی گیاه نیست. به‌نظر می‌رسد که این تنظیم کننده (*Ha-L1L*) در تنظیم مثبت ژن دهایدرین مشارکت نداشته و بلکه به صورت منفی آن را تنظیم نماید. در مجموع الگوی متفاوت بیان ژن‌ها در دو ژنوتیپ آفتابگردان نشان دهنده واکنش متفاوت آنها به تنش خشکی است. در صورت تایید تحمل لاین ENSAT254 در سطح مولکولی نسبت به تنش خشکی، می‌توان از این لاین برای تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بیان ژن، تنش خشکی و لاین متحمل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/ ۱۷ این مقاله مستخرج پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استاد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir).
۳- دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۵- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۶- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

مقدمه

آفتابگردان روغنی (*Helianthus annuus* L.) گیاهی یکساله سازگار با شرایط مختلف آب و هوایی بوده و به دلیل داشتن تحمل نسبی به تنش خشکی، قابلیت کشت در شرایط دیم و مقادیر مختلف آب آبیاری را دارد (Afkari Bajehbaj, 2010). در بین تنش‌های غیرزنده، دماهای بالا و پایین، خشکی، غرقابی، شوری و فلزات سنگین بیشترین محدودیت را بر رشد و تولید گیاهان زراعی ایجاد می‌کنند (Vaughan *et al.*, 2018).

در گیاهان، گروهی از پروتئین‌های آب‌دوست با عنوان (Late Embryogenesis Abundant proteins; LEAs) در مرحله انتهایی رسیدگی دانه که جنین بیشترین تحمل به پسابیدگی را دارد، تجمع می‌یابند. این پروتئین‌ها تحت تأثیر تنش کم‌آبی، دمای پایین و شوری در اندام‌های رویشی نیز انباشته می‌شوند که نشان دهنده نقش حفاظتی آنها در شرایط محدودیت آب است (Wise and Tunnacliffe, 2004). وجود پروتئین‌های LEA در گیاهان مختلف نشان دهنده توزیع گسترده آنها در سلسله گیاهی است (Allagulova *et al.*, 2003). این پروتئین‌ها بر اساس توالی در چند گروه طبقه‌بندی شده و در این گروه‌بندی، دهایدرین‌ها در گروه II یا خانواده D-11 قرار می‌گیرند (Rodriguez *et al.*, 2005). عملکرد ویژه دهایدرین‌ها را می‌توان به محل قرارگرفتن آنها در سیتوپلاسم و هسته نسبت داد (Allagulova *et al.*, 2003). ژن دهایدرین مورد استفاده در آزمایش اخیر (*HaDhn1*) یک ژن از زیرگروه D-11 از پروتئین‌های LEA است که با تحمل به تنش خشکی در آفتابگردان ارتباط دارد (Cellier *et al.*, 1998; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007).

رشد و توسعه گیاه به تنظیم دقیق وضعیت آب وابسته است. انتقال بین سلولی آب به شدت توسط میزان فعالیت کانال‌های آب که آکواپورین‌ها (Aquaporin) نامیده می‌شوند، کنترل می‌گردد. آکواپورین‌ها در سلول‌های محافظ روزنه در آفتابگردان در هنگام بسته شدن روزنه بیان می‌شوند (Sarda et al., 1997). آکواپورین‌ها کانال‌های کارکردی هستند که نقش مهمی در هموستازی آب داشته و در متابولیسم، تغذیه، انتقال پیام و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مشارکت دارند. بیان آکواپورین‌ها جهت برقراری تعادل در روابط آبی گیاه ضروری است. آکواپورین‌های (*Suntip7*) در سلول‌های محافظ روزنه آفتابگردان در هنگام بسته شدن روزنه‌ها بیان شده (Sarda *et al.*, 1999) و در وضعیت آبی گیاه دخالت مستقیم دارند (Sarda *et al.*, 1999; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007). افزایش بیان ژن آکواپورین در هنگام تنش کم‌آبی می‌تواند باعث افزایش نفوذپذیری آب از غشاء و تسهیل انتقال آب به داخل و خارج برگ‌ها شود (Vander Willingen *et al.*, 2004). نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که آکواپورین‌ها نقش مهمی در ترمیم اثرات مخرب ناشی از تنش کم‌آبی در گیاه آرابیدوپسیس دارند (Wang *et al.*, 2015a, b).

HaL1L ژنی است که پروتئین شبه کوتیلدون برگی-۱ را در آفتابگردان کد می‌کند (Fambrini *et al.*, 2006). ژن کوتیلدون برگی-۱، تنظیم‌کننده‌ی ژن‌های پروتئین‌های LEA هستند. پروتئین‌های LEA در تحمل به خشکی و شوری دخالت دارند (Parcy *et al.*, 1997). بنابراین *HaL1L* ممکن است مستقیماً در تحمل به تنش خشکی یا از طریق تغییر در بیان دهایدرین‌ها طی دوره رشد رویشی دخالت داشته باشند (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007). در یک آزمایش بیان ژن‌های دهایدرین (*Dehydrin*)، آکواپورین (*Aquaporin*) و *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) و فروکتوز ۱ و ۶ بیس‌فسفاتاز در آفتابگردان در چهار رگه خویش آمیخته نوترکیب با واکنش متقابل به تنش خشکی و لاین‌های والدی آنها در شرایط تنش خشکی مطالعه شد (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007). نتایج نشان داد

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

که سطح بیان ژن آکواپورین در برگ‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در اثر تنش خشکی به صورت منفی تنظیم شده و با محتوای آب نسبی برگ ارتباط داشت. سطح رونویسی ژن دهایدرین در برگ‌های کلیه رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب مورد مطالعه در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت. بر اساس نتایج، گزارش شد که احتمالاً تجمع رونوشت ژن‌های دهایدرین و *Leafy cotyledon 1-like protein*، در فرآیندهای تحمل به تنش دخیل هستند (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007).

تلاش‌های زیادی برای شناسایی سازوکارهای تحمل به تنش خشکی در گیاهان از طریق رویکردهای مولکولی در حال انجام بوده و برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطح رونویسی شناسایی و گزارش شده‌اند (Du *et al.*, 2011). با شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی، می‌توان آن‌ها را از طریق مهندسی ژنتیک به گیاهان مورد نظر منتقل نمود (Abebe *et al.*, 2003). هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات بیان ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی در دو لاین متحمل و حساس به خشکی گیاه آفتابگردان بوده است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش اثر تنش خشکی بر بیان نسبی ژن‌های دهایدرین (*Dehydrin*)، آکواپورین (*Aquaporin*) و *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) در دو لاین [(ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس)] آفتابگردان روغنی که بر اساس نتایج تحقیقات پیشین انتخاب شدند (Soleimani *et al.*, 2018)، مورد ارزیابی قرار گرفت. بذر ژنوتیپ‌های آفتابگردان از موسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE; INRA) تهیه شد. بذرها در گلدان‌های استوانه‌ای پلاستیکی ۲۵ × ۳۰ سانتی‌متر حاوی دو نسبت خاک معمولی و یک نسبت ماسه کاشته شدند. گلدان‌ها در گلخانه با دمای۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و طول روز ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی به مدت شش هفته (تا مرحله شش تا هشت برگی بوته‌ها؛ V6-V8) نگه داشته شدند (Schneiter and Miller, 1981). گیاهان تا رسیدن به مرحله شش تا هشت برگی، بطور یکسان آبیاری و در وضعیت آبی نزدیک ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. بعد از آن، تنش خشکی با سطوح ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی اعمال شد (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007, 2009). نمونه‌برداری از برگ‌ها در سه زمان هفت، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی و همچنین از بوته‌های گیاهان شاهد (در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) انجام و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفته و به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول: دو ژنوتیپ آفتابگردان، فاکتور دوم: سه سطح تنش خشکی و فاکتور سوم: سه زمان نمونه‌برداری) با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

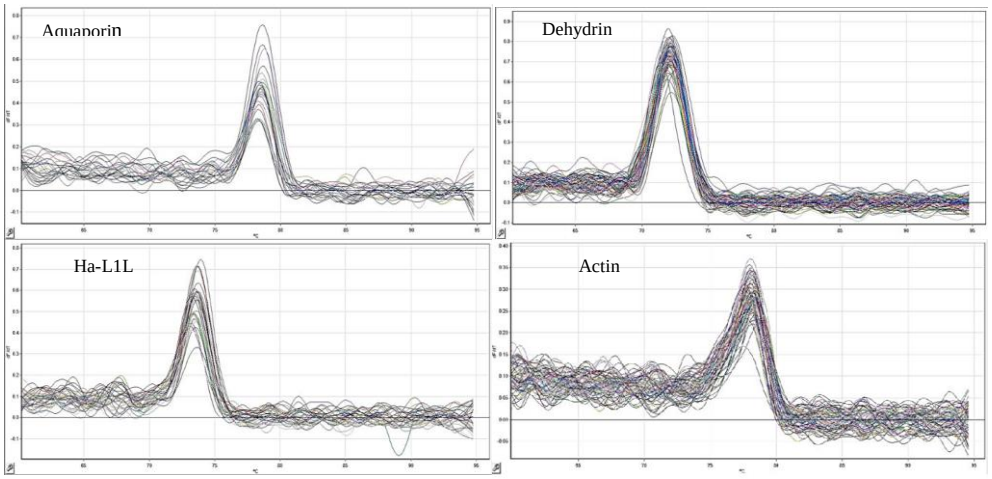
استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (شرکت سیناکلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (به روش اسپکتروفتومتری) و الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase برای حذف DNA ژنومی طبق دستورالعمل کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (#K1621, Thermo Scientific, USA) انجام شد. ساخت cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA کل و Oligo dT (Oligo dT18) به عنوان آغازگر عمومی توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس با نام تجاری RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) با استفاده از کیت Revert Aid First Strand

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

cDNA Synthesis طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای بررسی صحت سنتز cDNA واکنش کنترل منفی (RT–)، واکنش کنترل منفی بدون الگو (NTC) و واکنش کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

توالی آغازگرها برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه و همچنین توالی آغازگرهای ژن کنترل داخلی اکتین بر اساس روش پورمحمد کیانی و همکاران (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007) انتخاب شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با در نظر گرفتن سه تکرار زیستی (آزمایشی) و سه تکرار تکنیکی (سه واکنش از هر تکرار) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر، شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific آمریکا)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرومولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ میکروگرم) و چهار میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در دستگاه Rotor-Gene Q (کیاژن، آمریکا) با استفاده از برنامه ۱۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای اختصاصی اتصال آغازگر و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از اتمام چرخه‌ها PCR، منحنی تکثیر و ذوب برای هر ژن به دست آمد. اختصاصی بودن آغازگرها جهت انجام واکنش PCR، از وجود یک سیگنال تک پیکی در تجزیه منحنی ذوب فرآورده‌های تکثیر PCR تایید شد (شکل ۱). جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از RT-PCR در زمان واقعی از ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. سنجش تغییرات در بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارائه شده توسط لیواک و اشمیتگن (Livak and Schmittgen, 2001) انجام شد.



شکل ۱- منحنی‌های ذوب ژن‌های آکواپورین، دهایدرین، *Putative leafy cotyledon 1-like protein* و اکتین در واکنش QRT-PCR در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در شرایط تنش خشکی. محور افقی دما (درجه سانتی‌گراد) و محور عمودی نسبت dF به dT است (dF/dT) یا نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است که نشان دهنده میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می‌باشد

Fig. 1. Melting curves of *Aquaporin*, *Dehydrin*, *Putative leafy cotyledon 1-like protein* and *Actin* in QRT-PCR in sunflower genotypes under drought stress. X axis represent temperature (˚C) and Y axis represent the dF/dT. dF/dT is the derivative of the function fluorescence vs. temperature melting that represents the rate of the fluorescence variation in the reaction

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

جدول ۱- آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در واکنش QRT-PCR در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در شرایط تنش خشکی

Table 1. Oligonucleotide primers used in real time QRT-PCR in sunflower genotypes under drought stress condition

اندازه محصول Product size (bp)	دمای اتصال Annealing temp. (°C)	شماره دسترسی Accession No.	توالی آغازگر (۵'→۳') Primer sequence (5'→3')	نام ژن Gene name
65	58	X95950	Forward: TCCACCTTGCTCTTCGTCTTC Reverse: TCTGCTGTCAATTTGGCGTAA	*Aquaporin*
73	59	X92647	Forward: TGAAGGAATTGTGTGAGGCGTAT Reverse: GGAGCCATGCAAACTTTTATTCTT	*Dehydrin (DHN)*
66	57	AJ863116	Forward: CGCAAAAGAAACGATCCAAGA Reverse: TCATTCGCTTCACCTGTCACA	*Putative leafy cotyledon1-like protein (Ha-L1L)*
60	57	AF282624	Forward: TCAATGTTCCCGCCATGTAT Reverse: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	*Helianthus annuus L. Actin*

Dehydrin (*DHN*) are stress proteins belong to the Group II Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. *Aquaporins* (*AQP*) are proteins that serve as channels in transfer of water. *Leafy cotyledon1* (*LEC1*) is a critical regulator required for normal development during the early and late phases of embryogenesis that is sufficient to induce embryonic development in vegetative cells. *LEC1* encodes a *HAP3* subunit of the CCAAT binding transcription factor

تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها به صورت فاکتوریل بر اساس طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. برای این منظور ابتدا نرمال بودن توزیع اشتباهات با روش شاپیرو-ویلک با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ بررسی شد. به دلیل نرمال نبودن توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه‌های آماری با روش ناپارامتری توسعه یافته توسط برونر و همکاران (Brunner *et al.*, 2002) انجام شد. نمودارها با Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند. در روش ناپارامتری توسعه یافته برونر و همکاران (Brunner *et al.*, 2002)، توزیع تجمعی هریک از تیمارها محاسبه شده ($Fi= Prob[X < x]$) و توزیع میانگین وزنی تجمعی تخمین زده می‌شود ($H(X_{ij})=(R_{ij}-0.5)/N$). N تعداد کل اعداد، X_{ij} مشاهده مربوط به تیمار i در تکرار j و R_{ij} رتبه مربوط به تیمار i در تکرار j می‌باشند. از بررسی اختلاف توزیع مربوط به هریک از تیمارها با میانگین توزیع‌های تجمعی (H) در رابطه با معنی‌دار بودن اثر تیمار نتیجه‌گیری می‌شود (Shah and Madden, 2004).

نتایج و بحث

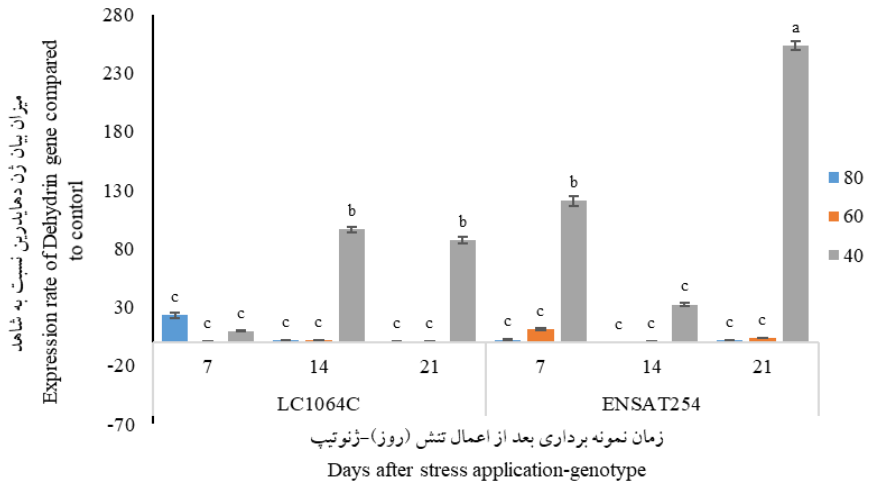
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی و زمان بعد از اعمال تنش روی بیان نسبی ژن دهایدرین در سطح احتمال پنج درصد و برهمکنش ژنوتیپ در زمان روی بیان نسبی این ژن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. این موضوع نشان می‌دهد که رتبه‌بندی میزان بیان نسبی ژن در ژنوتیپ‌ها از زمانی به زمان دیگر متفاوت است. همین نتایج در تجزیه واریانس بر اساس آماره تیپ ANOVA نیز مشاهده شد. در مواردی چون آزمایش اخیر که حجم نمونه قابل توجه است، تجزیه واریانس بر اساس آماره Wald بر ANOVA ارجحیت دارد (Shah and Madden, 2004). نتایج تجزیه واریانس تغییرات بیان نسبی ژن آکواپورین براساس آماره Wald نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان بیان نسبی ژن آکواپورین در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. برهمکنش دو جانبه ژنوتیپ در زمان و خشکی در زمان و برهمکنش سه جانبه ژنوتیپ در زمان در خشکی بر میزان بیان نسبی ژن آکواپورین در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

بود. تغییرات بیان نسبی ژن *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) براساس آماره‌ی Wald نشان داد که اثر اصلی خشکی و زمان بر میزان بیان نسبی ژن *Ha-L1L* در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. برهمکنش دوجانبه ژنوتیپ در زمان و برهمکنش سه جانبه ژنوتیپ در زمان در خشکی روی میزان بیان نسبی ژن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.

بیشترین میزان بیان نسبی ژن دهایدرین (DHN)، ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد که در حدود ۲/۹ برابر مقدار آن در همین ترکیب تیماری در ژنوتیپ LC1064C (حساس) بود. بعد از آن، بیشترین میزان بیان نسبی ژن دهایدرین در ۷ روز بعد از اعمال تنش خشکی مجددا در ژنوتیپ ENSAT254 در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که ۱۲/۶۹ برابر مقدار آن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) بود. روند تغییرات بیان نسبی ژن نشان می‌دهد که در هر دو ژنوتیپ، بیان نسبی ژن دهایدرین در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در همه زمان‌های مورد بررسی افزایش داشت، اما میزان افزایش در دو ژنوتیپ در زمان‌های متناظر به غیر از زمان ۱۴ روز بعد از اعمال تنش، در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) بسیار بیشتر از ژنوتیپ LC1064C (حساس) بود. در ۱۴ روز بعد از اعمال تنش، میزان افزایش بیان در ژنوتیپ LC1064C بیشتر از ژنوتیپ ENSAT254 بود. در ژنوتیپ LC1064C روند افزایش در بیان نسبی ژن در زمان‌های مختلف در ۴۰ درصد ظرفیت زراعی تقریباً به صورت سهمی رو به بالا بود که نقطه حداکثر تابع در ۱۴ روز بعد از اعمال تنش مشاهده شد، در حالی که در ژنوتیپ ENSAT254 روند افزایش در بیان نسبی ژن در زمان‌های مختلف در ۴۰ درصد ظرفیت زراعی تقریباً به صورت سهمی رو به پایین بود و نقطه حداقل تابع در ۱۴ روز بعد از اعمال تنش مشاهده شد. الگوی متفاوت بیان ژن در دو ژنوتیپ آفتابگردان نشان دهنده واکنش متفاوت دو ژنوتیپ به تنش خشکی می‌باشد (شکل ۲).



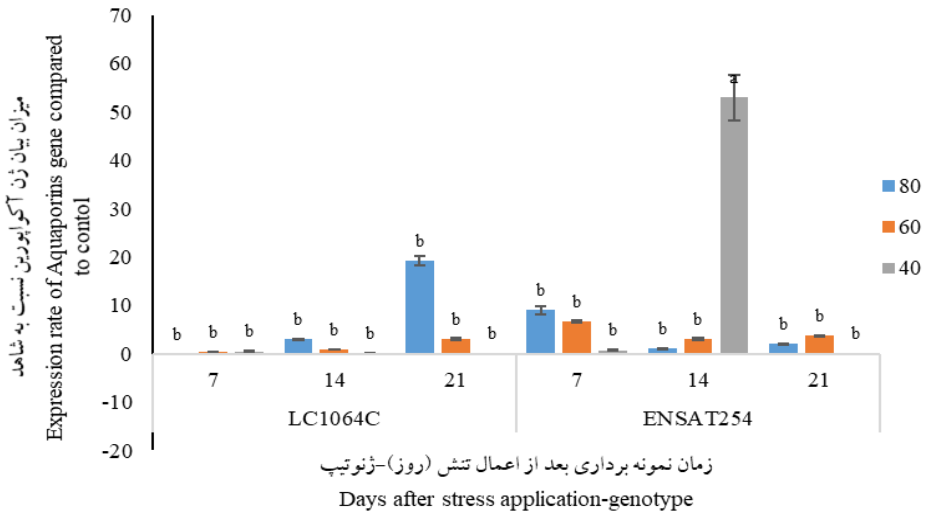
شکل ۲ – میزان بیان نسبی ژن دهایدرین (*DHN*) در ژنوتیپ‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان در تیمارهای تنش خشکی ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش. میله‌های عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده خطای استاندارد هستند

Fig. 4. Relative expression rate of *Dehydrin* (*DHN*) gene in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) sunflower genotypes at 80, 60 and 40% drought stress levels, 7, 14 and 21 days after stress application. Vertical lines on the columns show the standard error (SE)

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

بیشترین میزان بیان نسبی ژن در هفته دوم (۱۴ روز بعد از اعمال تنش خشکی) در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد. در این ترکیب تیماری تغییراتی در میزان بیان نسبی ژن آکواپورین در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده نشد. بعد از آن، بیشترین میزان بیان نسبی ژن آکواپورین در هفت روز بعد از اعمال تنش خشکی در ژنوتیپ ENSAT254 در دو تیمار ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی دیده شد که بیشتر از مقدار آن در ژنوتیپ LC1064C بودند، هرچند تفاوت آنها معنی‌دار نبود (شکل ۳).



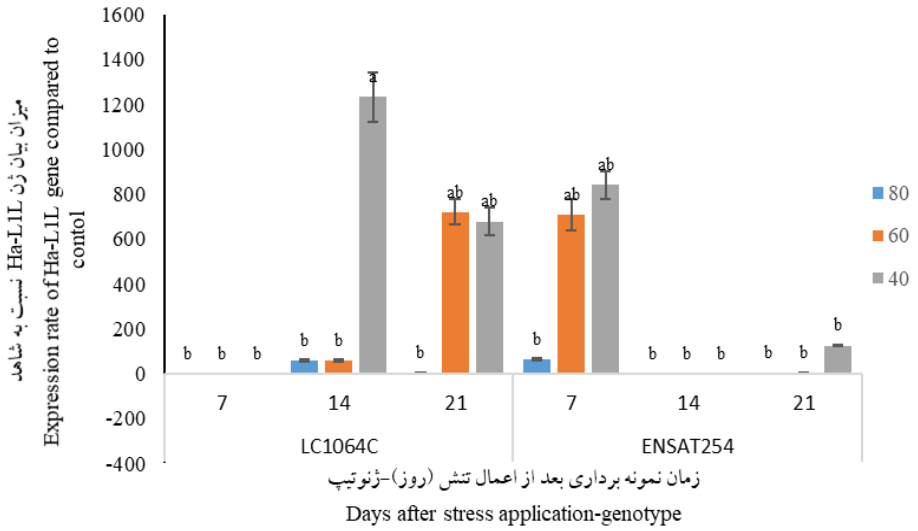
شکل ۳ – میزان بیان نسبی ژن آکواپورین (*AQP*) در ژنوتیپ‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان در تیمارهای تنش خشکی ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش. میله‌های عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده خطای استاندارد هستند

Fig. 3. Relative expression rate of *Aquaporins* (*AQP*) gene in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) sunflower genotypes at 80, 60 and 40% drought stress levels, 7, 14 and 21 days after stress application. Vertical lines on the columns show the standard error (SE)

بررسی بیان نسبی ژن *Putative leafy cotyledon 1-like protein* نشان داد که در هفته اول در حالی که در شدت‌های مختلف تنش خشکی تغییراتی در بیان ژن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده نشد، در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) در شدت‌های مختلف تنش از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ۴۰ درصد، بیان ژن روند افزایشی داشت، یعنی مقدار بیان در شدت تنش ۴۰ و ۶۰ درصد بیشتر از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی بود. در ۱۴ و ۲۱ بعد از اعمال تنش برعکس، عمده تغییرات در بیان نسبی ژن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده شد. به طوریکه در روز ۱۴ در حالی که تغییری در بیان ژن در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده نشد؛ در ژنوتیپ LC1064C بیان ژن به میزان زیادی افزایش داشت. در این ژنوتیپ اختلافی در افزایش بیان ژن بین دو شدت تنش ۶۰ و ۸۰ مشاهده نشد، ولی در هر دو شدت تنش، میزان بیان کمتر از ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بود. در ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی هرچند افزایشی در بیان ژن در ژنوتیپ ENSAT254 در شدت تنش ۴۰ درصد مشاهده شد، ولی میزان آن کمتر از افزایش بیان در ژنوتیپ LC1064C بود. الگوی

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

متفـاوت بیـان ژن در دو ژنوتیـپ حـاکی از واکـنش متفاوت دو ژنوتیپ به تنش خشکی می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴ – میزان بیان نسبی ژن *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) در ژنوتیپ‌های ENSAT254 (متحمل) و LC1064C (حساس) آفتابگردان در تیمارهای تنش خشکی ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش. میله‌های عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده خطای استاندارد هستند

Fig. 4. Relative expression rate of *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) gene in ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (sensitive) sunflower genotypes at 80, 60 and 40% drought stress levels, 7, 14 and 21 days after stress application. Vertical lines on the columns show the standard error (SE)

بـر اسـاس نتـایج حاصـل، سـطح بیـان نسـبی ژن دهایـدرین در ژنوتیـپ متحمـل (ENSAT254) در تیمار تنش خشکی شـدید (۴۰ درصـد ظرفیـت زراعـی) افزایش یافت. این نتـایج در توافـق بـا نتـایج قبلـی اسـت (Cellier *et al.*, 1998) کـه گـزارش شـده اسـت سـطح نسخه‌های ژن دهایدرین به مقدار بیشـتری در لایـن‌هـای آفتابگردان در شـرایط تـنش کـم‌آبـی تجمـع مـی‌یابنـد. سطح بیان بالای ژن دهایدرین در ژنوتیپ متحمل نشـان می‌دهد که دهایـدرین‌هـا نقـش مهمـی در تحمـل تـنش خشـکی دارنـد کـه ایـن موضـوع قـبلاً توسـط دیـور و همکاران (Dure *et al.*, 1989) نیز گـزارش شـده اسـت. در همـین راسـتا، نتـایج چنـدین آزمـایش کـه در آنهـا گیاهان با ژن دهایدرین تراریخت شده بودنـد نشـان داد که بیش بیان ژن دهایدرین تأثیر مثبت بر تحمل گیاهـان بـه تـنش‌هـا از جملـه سـرما، خشـکی و شـوری دارد (Singh *et al.*, 2019). گزارش شده است که بیش بیـان ژن *OsDHN1* بـرنج باعـث تحمـل بیشـتر گیـاه بـه تـنش خشـکی و شـوری مـی‌شـود (Singh *et al.*, 2019). لیـو همکاران (Liu *et al.*, 2015) نیز رابطه مثبت بین بیـان ژن *ShDHN* و تحمل به خشکی در *Solanum habrochaites* L. را گزارش کردند. پیشنهاد شده است که نحـوه تـاثیر دهایدرین‌ها احتمالاً از طریق پایدارسازی غشاء با عمل-کردن به عنوان چاپرون بـرای جلـوگیری از تجمـع و/یـا غیرفعال‌سازی پروتئین‌هـا در شـرایط تـنش کمبـود آب، انجام می‌شود. گزارش شده اسـت کـه دهایـدرین‌هـا بـا اسمولیت‌های سازگارساز به طور هم‌افزا عمل مـی‌کننـد. این عمل باعث حفاظت از سـاختار طبیعـی بیوپلیمرهـای ضروری مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک مـی‌شـود

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

که نتیجه آن پایدار شدن پروتوپلاسم سلول‌های گیاهی در شرایط تنش کمبود آب است. پایدارسازی می‌تواند به دلیل ماهیت فوق‌العاده آب‌دوستی دهایدرین‌ها باشد. در حقیقت دهایدرین‌ها قادر به ایجاد هاله‌ای از آب در اطراف مولکول‌های جزئی واسرشته‌شده مانند پروتئین‌ها شده و بدین ترتیب آنها را از واسرشته‌شدن بیشتر محافظت نموده و به آنها کمک می‌کنند تا به حالت تاخورده مناسب برگردند (Allagulova *et al.*, 2020). نتایج سنجش‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد که دهایدرین‌ها می‌توانند از طریق اتصال به فسفولیپیدهای آنیونی که توسط نیروهای الکترواستاتیک هدایت می‌شوند، از غشاءها در شرایط کم‌آبی محافظت نمایند (Eriksson and Harryson, 2011).

سطح بیان ژن آکواپورین در ژنوتیپ متحمل (ENSAT254) به طور محسوس در تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) ۱۴ روز بعد از اعمال تنش افزایش یافت. به طور مشابه مواردی وجود دارند که بیان ژن آکواپورین به وسیله تنش آبی به طور مثبت (Up-regulated) تنظیم می‌شود که نتیجه آن در مقدار بالای ضریب نفوذپذیری اسموتیک آب (Osmotic water permeability) و سهولت جریان (شار) آب (Water flux) دیده می‌شود (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1997). ساردا و همکاران (Sarda *et al.*, 1997) نشان دادند که در آفتابگردان نسخه‌های آکواپورین (*Suntip7*) زمانی که روزنه‌ها بسته می‌شوند، تجمع می‌یابند. همچنین تغییراتی در بیان ژن آکواپورین در سطح رونویسی در طی تنش‌های غیرزنده در گونه‌هایی مانند *Arabidopsis* (Jang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015a, b)، گندم (Huang *et al.*, 2014) و جو (Hove *et al.*, 2015) نیز گزارش شده است. در سلسله گیاهی به طور شگفت‌انگیزی تعداد زیادی از آکواپورین‌ها یافت شده و دامنه تعداد آنها از ۳۳ در ذرت (Chaumont *et al.*, 2001)، ۳۵ در آرابیدوپسیس (Johanson *et al.*, 2001) تا بیش از ۷۰ مورد در پنبه (Park *et al.*, 2010) گزارش شده است. زیاد بودن تعداد ایزوفرم‌های آکواپورین‌های گیاهی نشان می‌دهد که آنها نقش بسیار مهم و پیچیده‌ای در گیاهان دارند. خانواده پروتئینی آکواپورین در گیاهان به پنج زیر خانواده به نام‌های پروتئین‌های ذاتی غشای پلاسمایی (PIP)، پروتئین‌های ذاتی تونوپلاست (TIP)، پروتئین‌های ذاتی شبه NOD 26 (NIP)، پروتئین‌های اصلی ذاتی کوچک (SIPs) و پروتئین‌های ذاتی X طبقه‌بندی نشده (XIPs) طبقه‌بندی می‌شوند. آکواپورین‌ها نقش عمده‌ای در انتقال غیرفعال آب و بسیاری از املاح دیگر مانند دی‌اکسید کربن، NH_3، آنتیموان، آرسنیت، بور، فرمامید، گلیسرول، پراکسید هیدروژن، اسید لاکتیک، سیلیکون و اوره دارند. انتقال املاح از طریق آکواپورین‌ها بسیار انتخابی است و لزوماً همه آکواپورین‌ها در حمل و نقل آب نقش ندارند. عمدتاً PIP و TIP، به ترتیب قرار گرفته در غشاء پلاسمایی و غشاء واکوئلی، در انتقال آب نقش دارند. در مقابل، NIPها، SIPها و XIPها فعالیت حمل آب کمتری دارند و بیشتر به عنوان حمل کننده املاح هستند. لایه انتخابگری آکواپورین‌ها به دو انقباض موجود در منافذ نسبت داده می‌شود. اولین انقباض با دو موتیف NPA (Asparagine–proline–alanine) حفاظت شده و دومین انقباض با چهار اسیدآمینه که به عنوان منطقه معطر/آرژنین (ar/R) شناخته می‌شود، شکل گرفته است (Zargar *et al.*, 2017). بیان و فعالیت حمل و نقل آکواپورین‌ها به صورت هماهنگ در سطح رونویسی و پس از ترجمه تنظیم می‌شوند. هورمون‌هایی مانند GA3، ABA و براسینولیدها و تعدادی از عوامل محیطی مانند خشکی، شوری، سرما و تابش شدید آکواپورین‌ها را بیشتر در سطح رونویسی تنظیم می‌کنند. تنظیم پس از ترجمه آکواپورین‌ها که شامل فسفوریلاسیون و هترومریزه شدن است، بیشتر تحت تأثیر pH سیتوزولی و Ca^{2+}، فشار، شیب‌های املاح و دما

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

اتفاق می‌افتد. در شرایط تنش کمبود آب، تنظیم آکواپورین‌ها در هر دو سطح به گونه‌ای انجام می‌شود تا از اتلاف آب جلوگیری شده و سطح هیدرولیک سلول حفظ شود. ABA به عنوان یک عامل اصلی در پیام رسانی تنش خشکی نقش مهمی در تنظیم محتوا و فعالیت چندین PIP دارد. با این حال، پیشنهاد شده است که پاسخگویی ژن‌های PIP به تنش کمبود آب و ABA متفاوت است که نشان می‌دهد تنظیم ژن PIP شامل هر دو مسیر پیام رسانی وابسته به ABA و مستقل از ABA در طول کمبود آب می‌باشد. چندین آزمایش ساختاری-عملکردی در جهت درک مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مسئول تنظیم آکواپورین‌ها در شرایط تنش انجام شده است. ساختار بلوری آکواپورین‌ها در گیاه اسفناج SoPIP2;1 تغییرات ساختاری ناشی از دفسفوریلاسیون دو باقیمانده سرین محافظت شده را نشان داد که باعث بسته شدن کانال در شرایط تنش خشکی می‌شود. در چندین آزمایش که در آنها گیاهان با ژن آکواپورین تراریخت شده بودند، مشخص شد که بیش بیان برخی از PIPها و TIPها با کاهش میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای، تحمل به خشکی را احتمالاً با القای بسته‌شدن روزنه ضمن حفظ هیدرولیک آب در گیاه، افزایش می‌دهد (Zargar *et al.*, 2017).

ABA با القای پیام رسانی از راه دور، بین ریشه‌ها و شاخساره به هماهنگ‌سازی رشد کمک می‌کند و سطح بیان PIP را تعدیل می‌کند. کمبود آب که در ابتدا توسط ریشه‌ها دریافت می‌شود، می‌تواند بر تنظیم حرکت آب در شاخساره تأثیر بگذارد. القای سنتز ABA ناشی از کمبود آب در ریشه‌ها منجر به کاهش بیان چندین ایزوفرم PIP و TIP در پارانشیم آوند چوبی می‌شود که این موضوع باعث کاهش نفوذپذیری اسمزی آب سلول‌ها می‌شود. این موضوع جریان آب به داخل برگ را کاهش می‌دهد که باعث کاهش پتانسیل آب برگ و به دنبال آن هدایت هیدرولیکی برگ و هدایت روزنه‌ای می‌شود. ABA همچنین از ریشه به برگ منتقل شده که باعث بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ABA می‌شود و باعث افزایش محتوای ABA در برگ‌ها می‌شود، از این رو ABA از طریق اثر بیوشیمیایی روی سلول‌های محافظ و اثر هیدرولیکی غیرمستقیم از طریق کاهش نفوذپذیری آب در بافت رگبرگ‌های برگ، باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. علاوه بر این، پیام رسانی ABA در سلول‌های محافظ روزنه باعث القای OST1/SnRK2.6 که یک پروتئین کیناز است، می‌شود. این پروتئین کیناز باعث فسفوریلاسیون PIP2 سیتوزولی در اسیدآمینه سرین در موقعیت ۱۲۱ (Ser-121) می‌شود که به نوبه خود نفوذپذیری سلول‌های محافظ را افزایش می‌دهد. نفوذپذیری به آب و احتمالاً پراکسیدهیدروژن، باعث بسته‌شدن روزنه شده و در نتیجه میزان تعرق کاهش می‌یابد. کاهش تعرق باعث تنظیم منفی آکوآپورین‌های ریشه می‌شود. تنظیم منفی آکوآپورین‌ها باعث کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه می‌شود که احتمالاً از طریق آزاد شدن فشار آوند چوبی است و در اثر آن، از دست دادن آب از طریق برگشت آب به خاک خشک در ریشه‌ها، کاهش می‌یابد. در ادامه، افزایش تعرق و ABA آوند آبکش ممکن است باعث افزایش و تحریک فعالیت آکواپورین‌های ریشه شود و بدین ترتیب باعث افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها شود (Zargar *et al.*, 2017).

ایزوفرم‌های خاص آکواپورین‌ها، بسته به نوع تنش و مدت زمان آن، تنظیم مثبت یا منفی دارند. پیشنهاد شده است که الگوی بیان آکواپورین‌های خاص می‌تواند در طول تیمار با تنش نوسان داشته باشد و بیان ژن در پاسخ به تنش کوتاه و طولانی مدت که با پاسخ‌های مختلف دفاعی همراه است، متفاوت است. نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داده است که در ابتدای واکنش به تنش، گیاهان برای صرفه جویی در محتوای آب، تجمع/ فعالیت آکواپورین‌ها را کاهش می‌دهند.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

در تنش طولانی مدت، تجمع یا فعالیت بیشتری از آکواپورین‌ها مشاهده می‌شود که باعث می‌شود کمبود آب موجود در گیاه پس از یک دوره تنش طولانی‌تر، جبران شود (Chaumont and Tyerman, 2014). نقش‌های مختلف آکواپورین‌های خاص در راهکارهای تحمل تنش غیرزنده را می‌توان در گیاهان تراریخته مشاهده کرد. افزایش یا کاهش سطح بیان ژن‌های خاص می‌تواند تأثیر مثبت یا منفی بر تحمل تنش در گیاه داشته باشد، در نتیجه باعث تغییر در هدایت هیدرولیکی ریشه، میزان تعرق، پتانسیل اسمزی سلولی و توانایی گیاه برای بازیابی پس از تنش کمبود آب می‌شود (Wang *et al.*, 2015a, b).

بیان متفاوت ژن *HaL1L* در دو ژنوتیپ آفتابگردان مورد بررسی و کاهش بیان آن در ژنوتیپ متحمل (ENSAT254) در مقایسه با ژنوتیپ حساس (LC1064C) در ۱۴ و ۲۱ بعد از اعمال تنش خشکی، حاکی از نقش این ژن در پاسخ به تنش خشکی در گیاه آفتابگردان است. نتایج مشابهی توسط (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007) نیز گزارش شده است. ایشان گزارش کردند که سطح بیان ژن در پاسخ به تنش خشکی به طور معنی‌داری کاهش یافت، در حالی که بعد از بازیابی گیاه سطح بیان ژن افزایش یافت. احتمالاً این ژن نقش مهمی در تحمل به تنش خشکی دارد. به هر حال، سطح ژن به عنوان تابعی از وضعیت آبی گیاه تجمع نیافت، بنابراین این تنظیم کننده ممکن است در تنظیم مثبت ژن دهایدرین مشارکت نکند، بلکه به صورت منفی آن را تنظیم نماید که این موضوع در تطابق با یافته‌های (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007) است. لازم است آزمایش‌های تکمیلی انجام شود تا نقش دقیق این ژن در تحمل تنش کم آبی و در تنظیم دهایدرین‌ها به عنوان عضوی از اعضای پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین زایی آفتابگردان روشن شود. *Leafy cotyledon1-like 1* به عنوان یک تنظیم کننده مهم مورد نیاز برای توسعه طبیعی طی مراحل اولیه و اواخر جنین‌زایی، برای القای رشد جنینی در سلول‌های رویشی کافی است. *Leafy cotyledon1-like 1* زیر واحد HAP3 از عامل رونویسی متصل شونده به CCAAT را رمزگذاری می‌کند. نشان داده شده است که زیر واحدهای HAP3 در Arabidopsis (AHAP3) بر اساس هویت توالی در حوزه مرکزی (ناحیه محافظت شده B)، به دو گروه تقسیم می‌شوند. LEC1 و زیر واحدهای مرتبط با آن، (L1L) LEC1-LIKE، تشکیل AHAP3 تیپ LEC1 را می‌دهند، در حالی که زیر واحدهای AHAP3 باقی‌مانده غیر از نوع LEC1 می‌باشند. مشابه LEC1، L1L عمدتاً در طول رشد بذر بیان می‌شود (Kwong *et al.*, 2003). بیان AtMYB44 و AtMYB77 در جهش‌یافته‌های fus3 (fusca3)، lec1 (Leafy cotyledon1) و abi3 (ABA-insensitive3) کاهش نشان داد. این جهش یافته‌ها در توسعه خواب و ایجاد تحمل به تنش خشکی در اواخر جنین زایی و بلوغ دانه نقص داشتند (Kirik *et al.*, 1998). در مجموع از لحاظ ترتیب زمانی به نظر می‌رسد که بیان ژن *Putative leafy cotyledon 1-like protein* با توجه به ماهیت تنظیم کنندگی آن بلافاصله بعد از درک و انتقال پیام تنش اتفاق می‌افتد. در پایین‌دست، بیان ژن‌های آکواپورین باعث تنظیم روابط آبی گیاه می‌شود. در کنار آن بیان ژن دهایدرین باعث محافظت ساختمانی پروتئین‌ها از جمله آکواپورین‌ها می‌شود. نتیجه این کار در کنار محصول سایر ژن‌هایی که مطالعه نشدند، تحمل گیاه به تنش خشکی می‌باشد. اخیراً اثر متقابل دهایدرین‌ها با آکواپورین‌ها نشان داده شده است (Hernandez-Sanchez *et al.*, 2019).

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد بیشترین میزان بیان نسبی ژن دهایدرین در آفتابگردان، ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی در سطح تنش ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد که حدوداً ۲/۹ برابر مقدار آن در همین ترکیب تیماری در ژنوتیپ LC1064C (حساس) بود. بیشترین میزان بیان نسبی ژن آکواپورین، ۱۴ روز بعد از اعمال تنش خشکی در سطح تنش ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) مشاهده شد. نتایج تحقیق تایید کننده نقش مثبت ژن‌های دهیدرین و آکواپورین در تحمل به تنش خشکی در آفتابگردان است. بررسی بیان نسبی ژن *Putative leafy cotyledon 1-like protein* نشان داد که در هفته اول در حالی که در شدت‌های مختلف تنش خشکی تغییراتی در بیان ژن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده نشد، در ژنوتیپ ENSAT254 (متحمل) در شدت‌های مختلف تنش از ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ۴۰ درصد، بیان ژن روند افزایشی داشت. در ۱۴ و ۲۱ بعد از اعمال تنش بر عکس، عمده تغییرات در بیان نسبی ژن در ژنوتیپ LC1064C (حساس) مشاهده شد. احتمالاً این ژن نقش مهمی در تحمل به تنش خشکی دارد. به هر حال، سطح ژن به عنوان تابعی از وضعیت آبی گیاه تجمع نیافت، بنابراین این تنظیم کننده ممکن است در تنظیم مثبت ژن دهایدرین مشارکت نداشته باشد، بلکه به صورت منفی آن را تنظیم نماید. در ادامه این آزمایش لازم است تجزیه بیان ژن در لاین‌های حساس و متحمل در ریشه و برگ با روش توالی‌یابی RNA (RNA Sequencing) انجام گیرد تا شبکه ژنی درگیر در تحمل به تنش خشکی شناسایی شود. همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های عامل تحمل به خشکی به ارقام حساس و بررسی تحمل گیاهان تراریخته در سطح مولکولی یا ویرایش توالی ژن‌های درگیر در لاین‌های حساس با استفاده از تکنولوژی نوظهور CRISPR/Cas9، به تأیید نقش ژن‌ها در تحمل به تنش کمک اساسی خواهد نمود.

سپاسگزاری

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 بذر لاین‌های خالص آفتابگردان روغنی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Abebe, T., A. C. Guenzi, B. Martin and J. C. Cushman. 2003. Tolerance of mannitol accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. Plant Physiol. 13: 1748-1755.

Afkari Bajehbaj, A. 2010. Effects of water limitation on grain and oil yields of sunflower cultivars. Int. J. Food Agric. Environ. 8(1): 98-101.

Allagulova, Ch. R., F. R. Gimalov, F. M. Shakirova and V. A. Vakhitov. 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry (Mascow), 68: 945-951.

Allagulova, C., A. Avalbaev, K. Fedorova and F. Shakirova. 2020. Methyl jasmonate alleviates water stress-induced damages by promoting dehydrins accumulation in wheat plants. Plant Physiol. Biochem. 155: 676-682.

Brunner, E., S. Domhof, F. Langer. 2002. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiment. Wiley, New York.

Cellier, F., G. Conejero, J. C. Breitler and F. Casse. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. Plant Physiol. 116: 319–328.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

Chaumont, F. and S. D. Tyerman. 2014. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. Plant Physiol. 164:1600-1618.

Chaumont, F., F. Barrieu, E. Wojcik, M. J. Chrispeels and R. Jung. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. Plant Physiol. 125: 1206-1215.

Darko, E., B. Vegh, R. Khalil, T. Marcek, G. Szalai, M. Pal and T. Janda. 2019. Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions. PloS One, 14: e0226151.

Du, J. B., S. Yuan, Y. E. Chen, X. Sun, Z. W. Zhang, F. Xu, M. Yuan, J. Shang and H. H. Lin. 2011. Comparative expression analysis of dehydrins between two barley varieties, wild barley and Tibetan hull-less barley associated with different stress resistance. Acta Physiologiae Plantarum, 33: 567-574.

Dure III, L., M. Crouch, J. Harada, T-H.D. Ho, J. Mundy, R. Quatrano, T. Thomas and Z. R. Sung. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. 12: 475–486.

Eriksson, S. K. and P. Harryson. 2011. Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function. *In:* Lüttge, U., Beck, E. and Bartels, D. (Eds). Plant Desiccation Tolerance. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 215. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19106-0_14.

Fambrini, M., C. Durante, G. Cionini, C. Geri, L. Giorgetti, V. Michelotti, M. Salvini and C. Pugliesi. 2006. Characterization of leafy cotyledon1-Like gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. Dev. Genes Evol. 216: 253–264.

Golparvar, A. R., M. R. Ghanadha, A. A. Zali and A. Ahmadi. 2002. Determination of the best selection criteria to improve yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in drought stress condition. Seed Plant Improv. J. 18(2): 144-155. (In Persian with English abstract).

Hernández-Sánchez, I. E., I. Maruri-López, E. P. Molphe-Balch, A. Becerra-Flora, F. Jaimes-Miranda and J. F. Jiménez-Bremont. 2019. Evidence for in vivo interactions between dehydrins and the aquaporin AtPIP2B. Biochem. Biophys. Res. Commun.

Hove, R. M., M. Ziemann and M. Bhave. 2015. Identification and expression analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) aquaporin gene family. PLoS One, doi:10.1371/journal.pone.0128025.

Huang, C., S. Zhou, W. Hu, X. Deng, S. Wei, G. Yang and G. He. 2014. The wheat aquaporin gene TaAQP7 confers tolerance to cold stress in transgenic tobacco. Zeitschrift fur Naturforschung C. A J. Biosci. 69: 142-148.

Jang, J. Y., D. G. Kim, Y. O. Kim, J. S. Kim and H. Kang. 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 54: 713-725.

Johanson, U., M. Karlsson, I. Johansson, S. Gustavsson, S. Sjövall, L. Fraysse, A. R. Weig and P. Kjellbom. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. Plant Physiol. 126:1358-1369.

Kirik, V., K. Kolle, S. Misera and H. Baumlein. 1998. Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective *Arabidopsis* mutants. Plant Mol. Biol. 37: 819-827.

Kovacs, D., E. Kalmar, Z. Torok and P. Tompa. 2008. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. Plant Physiol. 147(1): 381e390.

Kwong, R. W., A. Q. Bui and H. Lee. 2003. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. The Plant Cell, 15(1): 5-18.

Liu, H., C. Yu, H. Li, B. Ouyang, T. Wang, and J. Zhang. 2015. Overexpression of *ShDHN*, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. Plant Sci. 231: 198-211.

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.

Parcy, F., C. Valon, A. Kohara, S. Misera and J. Giraudat. 1997. The abscisic acid Insensitive3, Fusca3 and Leafy Cotyledon1 genes act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. Plant Cell, 9: 1265–1277.

Park, W., B. E. Scheffler, P. J. Bauer and B. T. Campbell. 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). BMC Plant Biol.

Poormohammad Kiani, S., P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel and A. Sarrafi. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. 114(2): 193-207.

Rodriguez, E. M., J. T. Svensson, M. Maatrasi, D. W. Choi and T. J. Close. 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. Theor. Appl. Genet. 110: 852- 858.

Sarda, X., D. Tousch, K. Ferrare, E. Legrand, J. M. Dupuis, F. Casse- Delbart and T. Lamaze. 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. Plant J., 12: 1103–1111.

Sarda, X., D. Tousch, K. Ferrare, F. Cellier, C. Alcon, J. M. Dupuis, F. Casse and T. Lamaze. 1999. Characterization of closely related d-TIP gene encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. Plant Mol. Biol. 40:179–191.

Schneiter, A. A. and J. F. Miller. 1981. Description of sunflower growth stages 1. Crop Sci. 21(6): 901-903.

Shah, D. A. and L. V. Madden. 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. Phytopathology, 94(1): 33-43.

Singh, P. K., D. Srivastava, P. Tiwari, M. Tiwari, G. Verma and D. Chakrabarty. 2019. Drought tolerance in plants: molecular mechanism and regulation of signaling molecules. *In:* Plant Signaling Molecules. Woodhead Publishing.

Soleimani, G. A., R. Darvishzadeh, A. Ebrahimi and M. R. Bihamta. 2018. Identification of SSR and retrotransposon-based molecular markers linked to morphological characters in oily sunflower under natural

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

and water-limited states. J. Genet. 97: 189-203.

Vander Willigen, C., N. W. Pammenter, S. G. Mundree and J. M. Farrant. 2004. Mechanical stabilization of desiccated vegetative tissues of the resurrection grass *Eragrostis nindensis*: does a TIP3;1 and/or compartmentalization of subcellular components and metabolites play a role? J. Exp. Bot. 55: 651–661.

Vaughan, M. M., A. Block, S. A. Christensen, L. H. Allen and E. A. Schmelz. 2018. The effects of climate change associated abiotic stresses on maize phytochemical defenses. Phytochem. Rev., 17: 37-49.

Wang, X., H. Cai, Y. Li, Y. Zhu, W. Ji, X. Bai, D. Zhu and X. Sun. 2015a. Ectopic overexpression of a novel *Glycine soja* stress-induced plasma membrane intrinsic protein increases sensitivity to salt and dehydration in transgenic Arabidopsis thaliana plants. J. Plant Res. 128: 103-113.

Wang, L., Q. Li, Q. Lei, C. Feng, Y. Gao, X. Zheng, Y. Zhao, Z. Wang and J. Kong. 2015b. MzPIP2;1: an aquaporin involved in radial water movement in both water uptake and transportation, altered the drought and salt tolerance of transgenic Arabidopsis. Plos One, doi:10.1371/ journal.pone.0142446.

Wise, M. J. and A. Tunnacliffe. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci. 9: 13-17.

Yamada, S., T. Komori, P. N. Myers, S. Kuwata, T. Kubo and H. Imaseki, H. 1997. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. Plant Cell Physiol. 38: 1226–1231.

Yamaguchi-Shinozaki, K., M. Koizumi, S. Urao and K. Shinozaki. 1992. Molecular cloning of 9 cDNA that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana* sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. Plant Cell Physiol. 33: 217–224.

Zargar, S. M., P. Nagar, R. Deshmukh, M. Nazir, A. A. Wani, K. Z. Masoodi, G. K. Agrawal, R. Rakwal. 2017. Aquaporins as potential drought tolerance inducing proteins: Toward instigating stress tolerance. J. Proteomics. 169: 233-238.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]

Assessment of relative expression of *Dehydrin, Aquaporin and Ha-L1L* genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes under drought stress conditions

Sevda Hasaneh, S.[1], R. Darvishzadeh[2], B. Abdollahi[3], S. Besharat[4], F. Hoseinpour[5], Z. Ebrahimipour[6]

ABSTRACT

Sevda Hasaneh, S., R. Darvishzadeh, B. Abdollahi, S. Besharat, F. Hoseinpour, Z. Ebrahimipou. 2022. Assessment of relative expression of *Dehydrin, Aquaporin and Ha-L1L* genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes under drought stress conditions. **Iranian Journal of Crop Sciences. 23(1): 14-29. (In Persian).**

The effect of drought stress on the relative expression of *Aquaporin*, *Dehydrin*, *Putative leafy cotyledon 1-like protein* (*Ha-L1L*) genes in two sunflower lines [ENSAT254 (tolerant) and LC1064C (susceptible)] was investigated using real time PCR technique. The lines with different response to drought stress were planted using completely randomized design with three replications in greenhouse of faculty of agriculture and natural resources of Urmia University, Iran, in 2018. Plants were kept at 100% of field capacity until 8 leaf stage. After this stage, some pots were kept at the same field capacity but some other were irrigated to reach 80%, 60% and 40% of field capacity. Samples were taken atone, two and three weeks after application of drought stress. The highest relative expression of Dehydrin gene was observed 21 days after drought stress at the stress level of 40% of field capacity in ENSAT254 (tolerant genotype), which is approximately 2.9 times more than that in LC1064C (susceptible genotype) under the same treatment. The highest relative expression of Aquaporin gene was observed in ENSAT254 genotype 14 days after application of drought stress at the stress level of 40% of field capacity. A study of the relative expression of the Putative leafy cotyledon 1-like protein gene showed that in the first week, while any changes in the expression of gene was not observed in LC1064C (susceptible genotype) at any drought stress intensities, in the ENSAT254 (tolerant genotype) the expression of gene had increasing trend across different drought stress intensities, from 80% to 40% of field capacity. Fourteen and 21 days after application of drought stress, major changes in the relative expression of the gene was observed in the LC1064C (susceptible genotype). This implies that this gene may play an essential role in drought tolerance. However, it is not a function of plant water status; therefore, this regulator may not participate in the positive regulation of the Dehydrin gene, but may regulate it negatively. Totally, the different pattern of gene expression in the two genotypes suggests that they responded differently to drought stress. Should the drought tolerance of ENSAT254 be confirmed at the molecular level, this line can be potentially used in the production of drought tolerant hybrid cultivars.

Key words: Drought stress, Drought tolerant line, Gene expression and Sunflower.

Received: May, 2020 Accepted: January, 2021

1. Former MSc Student, Urmia University, Urmia, Iran
2. Professor, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding author) (Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
3. Associate Prof., Urmia University, Urmia, Iran
4. Associate Prof., Urmia University, Urmia, Iran
5. Former MSc Student, Urmia University, Urmia, Iran
6. Former MSc Student, Urmia University, Urmia, Iran

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1400.23.1.2.6]