

Study of expression of telomerase gene in oily sunflower under drought stress

Faezeh Hoseinpour

M.Sc., Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran. Email: faeze_hoseinpor@yahoo.com

Reza Darvishzadeh

* Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran. Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

Maryam Parvini Kohneh Shahri

Assistant Professor, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran. Email: m.parvini@iaurmia.ac.ir.com

Abstract

Objective

Drought is the most common environmental stress, which approximately limits production in 25 percent of the world's land. Drought stress causes changes in plant morphology, physiology and profile of genes expressions. One of the effects of oxidative stress due to drought stress is damage to telomeric DNA. The predominant mechanism of telomere conservation in most eukaryotes is dependent on telomerase activity, which prevents shortening of the chromosome end. In the present study the expression of telomerase gene has been investigated in two sunflower tolerant and susceptible genotypes using real time PCR technique.

Materials and methods

The inbred lines; ENSAT254 and LC1064C were planted in a completely randomized design with three replications in the greenhouse. The plants were kept at 100% crop capacity up to 8 leaf stage in terms of hydration. After this stage, a

number of pots were kept at the same capacity, but some others were kept at 80%, 60% and 40% crop capacity. Leaf samples were taken at two times; 7 and 21 days after stress application. RNA was extracted from leaf samples using RNX-plus™ extraction solution (Sinaclone Co., Iran) and real time PCR was conducted using specific telomerase gene primers. Analysis of variance and mean comparison were performed using SAS 9.4 software. Charts were drawn with Excel 2016.

Results

The results of the mean comparisons showed that the expression of the genes encoding the telomerase enzyme in the sensitive and resistant genotypes of sunflower is different, so that the expression of the gene encoding telomerase enzyme in the resistant genotype (ENSAT254) increased significantly compared to the sensitive one (LC1064C).

Conclusions

Since telomerase plays an essential role in maintaining genome integrity and stability of cell cycle, therefore, the higher expression of telomerase gene in tolerant genotype (ENSAT254) compared to susceptible one (LC1064C) probably suggests that this gene is involved in resistance of sunflower to drought stress.

Keywords: Drought resistance, Field capacity, Oil seed crops, Real time PCR, Telomere.

Citation: Hoseinpour F, Darvishzadeh R, Parvini Kohneh Shahri M (2020) Study of expression of Telomerase gene in oily sunflower under drought stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 12(1), 125-142.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 125-142.

DOI: 10.22103/jab.2020.14559.1162

Received: December 16, 2019; Accepted: January 9, 2020.

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی بیان ژن تلومراز در آفتابگردان روغنی تحت تنش خشکی

فائزه حسین پور

دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه

ارومیه، ارومیه، ایران. آدرس ایمیل: faeze_hoseinpor@yahoo.com

رضا درویش زاده

*نویسنده مسئول: استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. آدرس ایمیل:

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مریم پروینی کهنه شهری

استادیار، گروه زیست شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران. آدرس ایمیل:

m.parvini@iaurmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۰

چکیده

هدف: خشکی شایع‌ترین تنش محیطی است که به طور تقریبی موجب محدودیت تولید در ۲۵ درصد از زمین‌های دنیا می‌شود. تنش خشکی باعث ایجاد تغییرات در مورفولوژی، فیزیولوژی و پروفایل بیان ژن‌ها در گیاه می‌شود. یکی از اثرات تنش خشکی، تنش اکسیداتیو است که سبب آسیب به DNA تلومری می‌شود. مکانیسم غالب حفظ تلومر در اکثر یوکاریوت‌ها وابسته به فعالیت آنزیم تلومراز است که مانع کوتاه شدن انتهای کروموزوم می‌گردد. در این مطالعه بیان ژن تلومراز در دو ژنوتیپ مقاوم و حساس به خشکی در آفتابگردان روغنی با تکنیک Real time PCR ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: ژنوتیپ‌های ENSAT254 و LC1064C در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۸ برگ از لحاظ وضعیت آبی نزدیک ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. بعد از این مرحله تعدادی از گلدهان‌ها در همان ظرفیت زراعی نگهداری شدند (نمونه‌های شاهد) اما تعدادی تحت تنش خشکی ۸۰٪، ۶۰٪ و ۴۰٪ ظرفیت زراعی قرار گرفتند. نمونه برداری از برگ‌ها در دو زمان ۷ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش و از تیمار شاهد انجام گرفت. استخراج RNA از نمونه‌های برگ با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (شرکت سیناکلون، ایران) و واکنش Real time

PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن تلومراز انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام گرفت. نمودارها با Excel نسخه ۲۰۱۶ رسم شدند.

نتایج: نتایج مقایسات میانگین نشان داد میزان بیان ژن کدکننده آنزیم تلومراز در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم آفتابگردان متفاوت است به طوری که میزان بیان ژن کدکننده آنزیم تلومراز در ژنوتیپ مقاوم (ENSAT254) نسبت به ژنوتیپ حساس (LC1064C) به طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: از آنجاییکه آنزیم تلومراز در حفظ یکپارچگی و پایداری ژنوم در چرخه‌ی سلولی نقش اساسی دارد در نتیجه افزایش بیان ژن تلومراز در ژنوتیپ متحمل (ENSAT254) در مقایسه با ژنوتیپ حساس (LC1064C) احتمالاً حاکی از دخالت ژن فوق در مقاومت آفتابگردان به تنش خشکی باشد.

واژه‌های کلیدی: تلومر، دانه‌های روغنی، ظرفیت مزرعه‌ای، مقاومت به خشکی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی.

مقدمه

آفتابگردان زراعی با نام علمی *Helianthus annuus* L. گیاهی یکساله، یک پایه، دیپلوئید با $2n=2x=34$ کروموزوم از خانواده *Asteraceae* می‌باشد که عمدتاً به خاطر تأمین روغن خوراکی کشت می‌شود. جایگاه دانه‌های روغنی به عنوان محصولات تأمین‌کننده چربی در مقام دوم اهمیت قرار دارد (Abdul Rahmani, 2003). خشکی شایع‌ترین تنش محیطی است که به طور تقریبی موجب محدودیت تولید در ۲۵ درصد از زمین‌های دنیا می‌شود (Biglouie et al. 2010). ایران با متوسط میزان بارندگی سالیانه ۲۶۰ میلی‌متر جزو مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شود و نیمی از اراضی قابل کشت کشور در این مناطق قرار دارد (Jajarmi, 2009). تنش خشکی باعث ایجاد تغییرات در مورفولوژی، فیزیولوژی و پروفایل بیان ژن‌ها در گیاه می‌شود (Beck et al. 2007). بیشترین اثر سوء تنش خشکی بر گیاه در زمان گلدهی و تشکیل دانه است زیرا در این دوره افزایش تبخیر و تعرق همزمان با حداکثر نیاز گیاه به رطوبت می‌باشد (Golparvar et al. 2002). در طول این دوره به دلیل بسته شدن روزنه‌ها و تغییر کارایی مصرف آب، ماده خشک تولیدی گیاه کاهش می‌یابد (Simirnoff, 1998). اثر ثانویه تنش‌های غیر زیستی از قبیل شوری و کمبود آب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) است. ROSها مولکول‌های سمی هستند که باعث خسارت اکسیداتیو به پروتئین‌ها، DNA، و لیپیدها می‌شوند (Apel and Hirt, 2004). اصلی‌ترین علت اثرات تخریبی و مضر ROSها، توانایی آن‌ها برای شروع واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع است که منجر به پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا می‌شوند. در شرایط نرمال رشدی، ROSها به مقدار کم در اندامک‌هایی چون کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند اما در زمان تنش مقدار تولید آن‌ها به طور چشم‌گیری

افزایش می‌یابد. آفتابگردان یک محصول زراعی تقریباً متحمل به خشکی با نظام ریشه‌ای عمیق و جستجوگر می‌باشد که ریشه‌ی آن در شرایط خشکی در مقایسه با گیاهان زراعی دیگر می‌تواند آب را از لایه‌های زیرین و عمیق‌تر خاک جذب نماید (Khajehpour, 1991). میزان آب مصرفی آفتابگردان در ماه‌های اول رشد رویشی کمتر از زمانی است که گیاه کامل رشد کرده باشد و از مرحله تشکیل گل به بعد به علت بالا بودن دمای محیط و افزایش سطح سبز و پوشش گیاهی مقدار آب مصرفی بالا می‌رود (Gomez et al. 1991). تلومرهای یوکاریوتی، ساختارهای نوکلئوپروتئینی ویژه‌ای هستند که در انتهای کروموزوم‌های خطی قرار می‌گیرند. نقش اصلی تلومر، حفاظت از انتهای کروموزوم‌ها می‌باشد. به این شکل که آن از اتصال انتهای کروموزوم‌ها به یکدیگر، شکسته شدن و سایر واکنش‌های نامناسب جلوگیری می‌کند. این ساختار همچنین در جدا شدن صحیح کروموزوم‌ها در طی تقسیم میتوز و میوز نقش دارد (Autexier and Lue, 2006). همچنین تلومر با اتصال به غشای هسته در مکان‌یابی و جای‌گیری صحیح کروموزوم‌ها در هسته (Kupiec, 2014) و در تنظیم بیان ژن‌هایی که در مجاورت آن قرار دارند، نقش دارد (Kollár et al. 2014). تلومر همچنین به عنوان ساعت مولکولی عمل کرده و تعداد دفعات تقسیم سلول را مشخص می‌کند. کوتاه شدن طول تلومر سبب ایجاد سینگال‌های درون سلولی می‌شود که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را راه اندازی می‌کند (Lan, 2009). تنش اکسیداتیو به DNA تلومری با افزایش سطح 8-oxodG آسیب وارد می‌کند. افزایش 8-oxodG به دلیل شکست در DNA و تخریب در جفت بازهای DNA با کاهش طول تلومر همراه است. این کار با اتصال به TRF2 و ممانعت از عملکرد آنزیم‌های ترمیم کننده DNA انجام می‌گیرد (Kawanishi et al. 2004). مکانیسم غالب حفظ تلومر در اکثر یوکاریوت‌ها وابسته به فعالیت آنزیم تلومراز است که مانع کوتاه شدن انتهای کروموزوم می‌گردد. در واقع این آنزیم انتهای ۳' تک رشته‌ای تلومر را گسترش می‌دهد و مانع کوتاه شدن کروموزوم می‌گردد (Li et al. 2014). آنزیم تلومراز یک ترانس کریپتاز معکوس است که می‌تواند RNA موجود در ساختار خود را به عنوان الگو قرارداده و بدین ترتیب انتهای ۳' DNA را بسط دهد. در واقع آنزیم تلومراز یک نوع DNA پلیمرز وابسته به RNA می‌باشد. تولید ژنوتیپ‌های مقاوم در مقابل تنش خشکی، از طریق بکارگیری روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مقاوم، اهمیت بسزایی در حفظ منابع طبیعی کشور دارد. در این مطالعه بیان ژن تلومراز در دو ژنوتیپ آفتابگردان روغنی با واکنش متفاوت به تنش خشکی با تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی (Real time PCR) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

دو ژنوتیپ (لاین خالص) آفتابگردان روغنی (ENSAT254 و LC1064C) با واکنش متفاوت به تنش خشکی بر اساس مطالعات پیشین انتخاب شدند (Soleimani et al. 2018). بذر ژنوتیپ‌ها از موسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (Institut National de la Recherche Agronomique; INRA) تهیه شد. بذر در گلدان‌های استوانه‌ای پلاستیکی 25×30 با بستر کشت دو نسبت خاک معمولی و یک نسبت ماسه کشت شدند. سپس گیاهان در گلخانه با دمای 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و با فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی/نور به مدت ۶ هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند (Schneider and Miller, 1981). تمام گلدان‌ها تا رسیدن به مرحله ۶-۸ برگی، بطور یکسان (تزدیک ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) آبیاری شدند و از این مرحله تنش خشکی با سطوح ۸۰، ۶۰، ۴۰ درصد ظرفیت زراعی اعمال شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها در زمان ۷ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی با استفاده از ازت مایع انجام گرفت و نمونه‌ها به فریزر با دمای -80 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول: ۲ ژنوتیپ آفتابگردان، فاکتور دوم: ۳ سطح تنش خشکی و فاکتور سوم: ۲ زمان نمونه برداری) با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول استخراج RNX-plusTM (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به طور خلاصه ابتدا نمونه گیاهی به اندازه ۵۰ میلی‌گرم در ازت مایع خرد و هموژنیزه شد. سپس ۸۰۰ میکرولیتر بافر RNX-plus به تیوپ حاوی پودر نمونه اضافه شد و بعد از ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس کردن، یک میکرولیتر مرکاپتواتانول به تیوپ حاوی پودر و بافر RNX-plus اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ قرار داده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از جدا کردن فاز رویی، هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه به مدت یک ساعت در دمای -20 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با الکل ۷۵٪ شستشو و ۳۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به رسوب اضافه شد و در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد. برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد و مقدار RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و بررسی جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

ساخت cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA کل و Oligo dT به عنوان آغازگر عمومی توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس با نام تجاری Transcriptase RevertAidTM M-MuLV Revers (Thermo Fisher Scientific) با کیت ساخت کشور آمریکا 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 شد.

آغازگرها برای بررسی بیان ژن تلومراز و همچنین ژن کنترل داخلی اکتین با نرم افزار Oligo7 (<https://www.oligo.net/>) طراحی شدند (شکل ۱، جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلی مرز با در نظر گرفتن ۳ تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر که شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix با کیت Thermo Fisher Scientific ساخت کشور آمریکا، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرومولار) (شکل ۱، جدول ۱)، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ میکروگرم) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در دستگاه Rotor-Gene Q (کیازن، آمریکا) با استفاده از برنامه‌ی ۱۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای مختص آغازگر و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از اتمام چرخه‌های PCR منحنی تکثیر و ذوب برای هر ژن به دست آمد. اختصاصی بودن آغازگرها جهت انجام واکنش PCR، از وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی ذوب فرآورده‌های تکثیر PCR تایید شدند. جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از RT-PCR در زمان واقعی از ژن اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. سنجش تغییرات در بیان ژن تلومراز با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارایه شده توسط Livak and Schmittgen (۲۰۰۱) انجام گرفت.

تجزیه تغییرات بیان ژن بر پایه مدل آماری طرح کاملاً تصادفی با رویه مدل خطی عمومی (General linear model: GLM) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی (Tukey) در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) در نرم افزار SAS نسخه ۴/۲ انجام گرفت.

الف- توالی ناحیه کد کننده ژن تلومراز استنتاج شده برای آفتابگردان

```
>
AAGGACATTTTTGATGTCTGCTCAGCTCTTCAGCCAACCCAATGCACT
CACAGCAATGACACATGCGTCGTTGGAGCGACATGCCTATATCACTCTCTTCACAA
GCGGCTCAAGATTC
TTATACGCAAAGCAAGTCATTGCCACGAGTAAAGTTACTGAATAAGCATATCTTG
GATCAAAGCTCCAC
ATCTGAGCAATCTTCAGAGTTATCTTGCTCAAAACGCCAGGTGGTGTGCTTTGTATG
GGCTGCTTGTATG
AACATTATCCCCGGGAAGTCTTGAAATTGGAGGATTCTAAGGAAGAATATATC
TAAGTTCATCAGGC
TACGGATATACGAGAAGTTTTCTCTACATCAGTGCATGTATAAACTGAAAATATCA
GACTTTCAGTTCCT
ATCAGCTATCTGCAATTCGGGTATCATTGGAAAGCTTCTAGAAAGATGGACATATT
GGGTGTTTGCCTTC
ATTGTAGTGCCGTTGCTGCAAGCTAACTTTTATGTAAGTGAAGTGAAGCATGGGAA
```

GTTACAAGTGTCT
TCTACGAGAAATCAGTCTGGGAAAACTGATGAAAACCTCAATTGGATGCTTAAAG
GATGAATGTTACAG
GTTGGTAAATGTGACTTCTGTTAAACAAATAGTGAGTTGTAGAAGATTTGGTTTCTC
TAGGGTTAGATTC
CGGCCAAAAGCTAACGGAATACGACCACTGGCTAATCTTAAATCGTCATCGCGACT
GCAAATTTACATT
CTATTAAGGAATTCAAGGCCGTAATGTCGTTCTTCAGGATCTACATGCCGCCTTAA
AAGATGTGCAAAT
TAAAGCTCCTGAAAAATTAGGTTTCGTCAGTGTTTCAGTTACAATGACGTGCACAGAA
ACTTGAGGAATTTT
ATATCTCGAGTAAAAAGCGGATCCAGCACGTTGCCTCGCATGTATATGGTTGTCGC
TGATGTTCAAAAAG
CTTATGATTCCATCGATCAGGATAAACTGCTTCATCTGATGAAAGATGTTATAGTGG
ATGATCATCTCCT
GCATCAAACACACCAAATTATCGCCTCAAACCAACATTTTCAAGTGCTTCATACAT
CAATTTGTGTAAA
CAGTTCGATCTCATGCTCAGAGTCACTCATCTCATAGCATTATTCTCGATCAGGGA
AGAAGCAGAATAG
CAGCGAAAGATGATCTCCATTTAATCTTCAACAACATGTGAAGAACAACCTGCTG
TATATAGATCAAAG
ATTTTACCAGCAAATGTTGGCATAACCACAAGGAAGCATTTTGTCTTCATTACTCTG
CTCATTCTACTTT
GGACACATGGAACTACCAAAGTGGTCCATTTTATAGACAAGATAACCAAATCTGA
TTTCATGCTGCTTA
GGTTTATCGATGATTTTCTTTTATATCAACCTCAAAGAACTAGCCCTTGGGTTCTT
TTCCAGGCTAGA
AAGAGGATTCTGCGAGTACAACCTGCAGCATGAACAAAGAAAAATTCGGTTTAAGTT
TTGACTTTGGCCAA
ATAAAGTCAAATTAACCTGGTCCGATTTTCGATGGAAATGGTAATAAGTTTGTAG
ATGGAGTGGTTTGC
TCATCAATTGCAAGACTCTAGAAGTTCAGGCAGACTACACA

ب- توالی و نتیجه آزمون ویژگی آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن تلومراز

Primer	Sequence (5'→3')	Length(bp)	Tm(°C)	GC %	Self-complementarity	Self-3' complementarity
Forward	TTGCCTCGCATGTATATGG	22	59.12	45.45	6.00	2.00
Reverse	TCTGCTTCTCCCTGATCG	21	59.25	52.38	4.00	4.00

ج- نتایج آزمون اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن تلومراز
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

>[XR_002567339.1](#) PREDICTED: *Helianthus annuus* telomerase reverse transcriptase (LOC110895733), transcript variant X12, misc_RNA

product length = 246

Forward primer 1 TTGCCTCGCATGTATATGGTTG 22
Template 1977 1998

Reverse primer 1 TCTGCTTCTCCCTGATCGAG 21
Template 2222 2202

>[XR_002567338.1](#), [XR_002567337.1](#), [XM_022143082.1](#), [XM_022143081.1](#),
[XM_022143080.1](#), [XM_022143079.1](#), [XM_022143078.1](#), [XM_022143077.1](#),
[XM_022143076.1](#), [XM_022143075.1](#), [XM_022143074.1](#).

شکل ۱. توالی ناحیه کد کننده ژن تلومراز، استنتاج شده برای آفتابگردان و نتایج طراحی آغازگر با نرم افزار

Oligo 7

Figure 1. Sequence of the coding region of telomerase gene, deduced for sunflower and the results of primer design with Oligo 7.

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای ناحیه کد کننده ژن اکتین

Table 1. Oligonucleotide primers designed for coding sequence of actin gene

نام ژن	توالی آغازگر (۵'-۳')	شماره ژن	دمای ذوب
Gene name	Sequence of primer (5'-3')		Temperature melting (Tm)
	F:		
<i>Helianthus annuus</i> L. Actin	GCAGGGATGAGCACAAGTG	AF282624	58.8
	R:		
	CCCACCACTGAGCACACAATGT		

نتایج و بحث

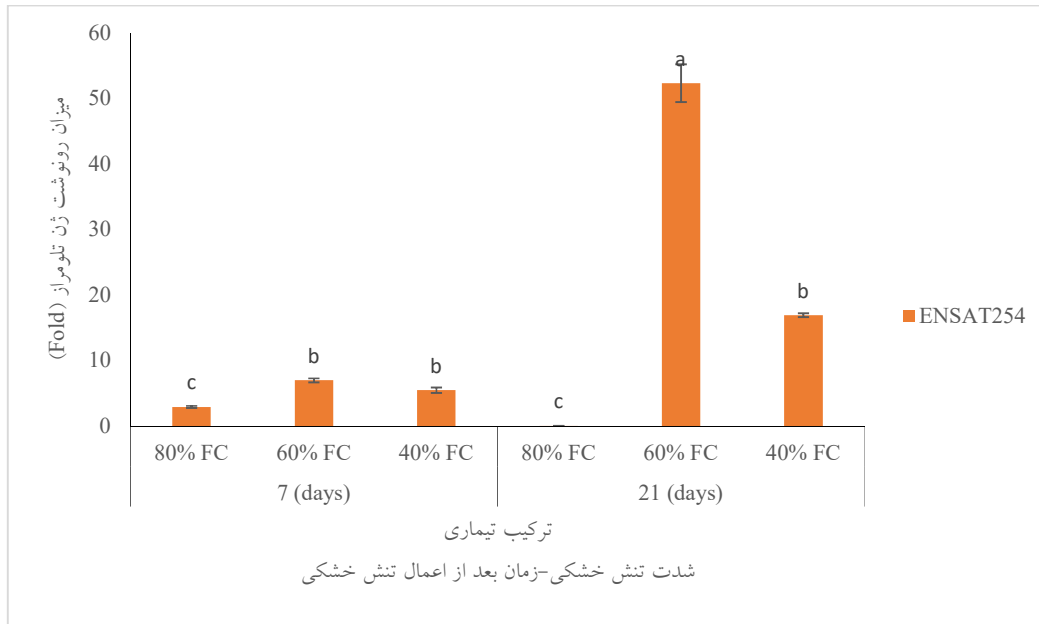
جدول تجزیه واریانس نشان می دهد اثر اصلی خشکی، ژنوتیپ و زمان بر روی بیان ژن تلومراز معنی دار نیست. در مقابل اثر متقابل سه جانبه ژنوتیپ × خشکی × زمان بر روی بیان ژن در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنی دار می باشد (جدول ۲). معنی دار بودن اثر متقابل نشان می دهد اختلاف سطوح یک فاکتور از سطحی به سطح فاکتور دیگر متفاوت می باشد. به عبارت دیگر رتبه بندی سطوح یک فاکتور بسته به سطوح فاکتور دیگر تغییر می کند.

میزان بیان ژن تلومراز در ژنوتیپ متحمل ENSAT254 هم در هفته اول و هم در هفته سوم بعد از اعمال تنش خشکی شدید ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافته است. در مقایسه دو زمان، افزایش بیان ژن در هفته ی سوم در مقایسه با هفته ی اول چشمگیرتر می باشد. در سطوح تنش خشکی ملایم ۸۰ درصد ظرفیت زراعی بیان ژن در ژنوتیپ متحمل کاهش یافته است (شکل ۲) و کاهش بیان در هفته سوم در مقایسه با هفته اول شدیدتر می باشد. مقایسات میانگین بیان ژن تلومراز در ژنوتیپ حساس LC1064C نشان می دهد که میزان بیان در هفته ی اول در تنش خشکی شدید ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی شیدا کاهش یافته است. در مقابل میزان بیان ژن در هفته ی سوم در تنش خشکی شدید ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با تنش های ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافته است. در این ژنوتیپ در سطح تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش محسوسی در بیان ژن مشاهده نمی گردد.

جدول ۲. تجزیه واریانس تغییرات رونوشت ژن Telomerase در ژنوتیپ‌های آفتابگردان روغنی طی زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش خشکی

Table 2. Analysis of variance for Telomerase transcript variation in oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes at different times after applying drought stress

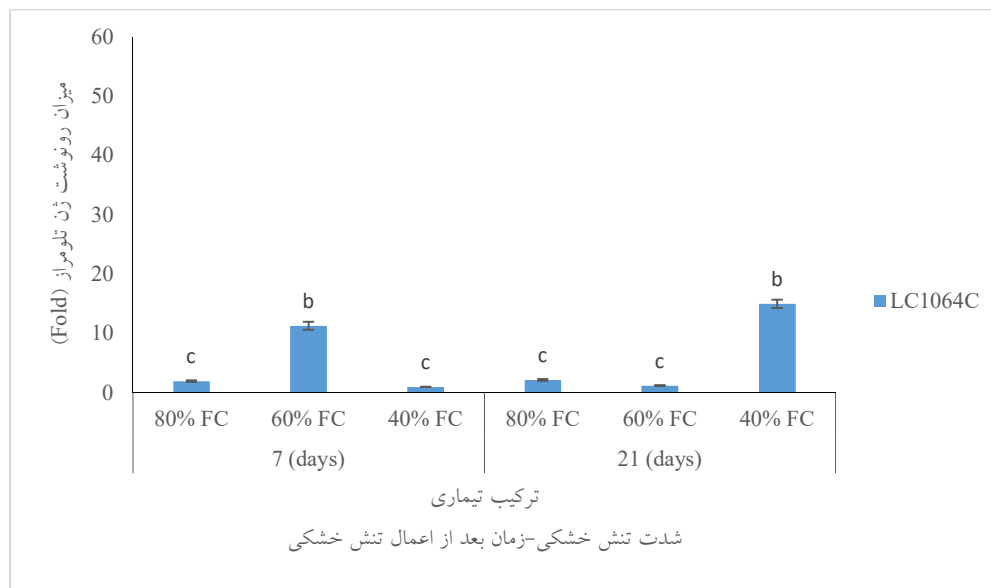
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F بودن
Source of variation	Degree of freedom	Mean square	Pr > F
خشکی	2	784.60	0.056
Drought			
ژنوتیپ	1	683.14	0.1051
Genotype			
زمان	1	841.14	0.074
Time			
خشکی × ژنوتیپ	2	498.34	0.1482
Drought × Genotype			
خشکی × زمان	2	290.90	0.3163
Drought × Time			
ژنوتیپ × زمان	1	618.84	0.122
Genotype × Time			
خشکی × ژنوتیپ × زمان	2	848.35	0.045
Drought × Genotype × Time			
اشتباه آزمایشی	24	240.789	
Experimental error			



شکل ۲. الگوی بیان ژن Telomerase در ژنوتیپ متحمل به خشکی (ENSAT254) آفتابگردان روغنی در ۳ سطح خشکی (۴۰، ۶۰، ۸۰) و ۷ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش خشکی. FC: ظرفیت زراعی (Field capacity).

Figure 2. Expression profiling of Telomerase in drought tolerant genotype of oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) (ENSAT254) at three levels of drought stress (40, 60, 80 percent of field capacity) after 7 and 21 days, post drought stress application.

البته در مقایسه دو ژنوتیپ در همین زمان، میزان بیان ژن در ژنوتیپ مقاوم بیشتر از ژنوتیپ حساس می باشد. جمع بندی نشان می دهد که الگوی بیان ژن در دو ژنوتیپ مورد مطالعه متفاوت است و این حاکی از واکنش متفاوت ۲ ژنوتیپ به تنش خشکی می باشد (شکل ۳). طبق نتایج، عموماً بیان ژن تلومراز در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس می باشد بر این اساس احتمالاً ژن تلومراز با مقاومت به تنش خشکی در آفتابگردان روغنی ارتباط داشته باشد. تنش های غیر زنده همانند خشکی، شوری، سرما و گرما، اولین و مهم ترین عامل در کاهش محصولات زراعی در جهان هستند به طوری که میانگین محصولات اصلی ترین گیاهان زراعی را تا بیش از ۵۰ درصد کاهش می دهند (Sabaghpour et al. 2006). از طرف دیگر وقوع خشکسالی های شدید و گسترده، اثرات عمیق اقتصادی، اجتماعی، زیست محیطی و حتی سیاسی برجای می گذارد.



شکل ۳. الگوی بیان ژن Telomerase در ژنوتیپ حساس (LC1064C) آفتابگردان روغنی در ۳ سطح خشکی (۸۰، ۶۰، ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) ۷ و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش. FC: ظرفیت زراعی (Field capacity).

Figure 3. Expression profiling of Telomerase in susceptible genotype of oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) (LC1064C) at three levels of drought stress (40, 60, 80 percent of field capacity) after 7 and 21 days, post drought stress application.

از بین رفتن محصولات کشاورزی و به طبع آن کاهش منابع مصرفی انسانی، منجر به افزایش قیمت محصولات زراعی و فشار بیشتر بر منابع طبیعی می شود (Behjati et al. 2009). به همین خاطر، از میان گیاهان زراعی که در مناطق خشک یا نیمه خشک کشت می شوند، شناسایی گیاهان مقاوم و مکانیسم‌هایی که منجر به مصرف بهینه آب و عملکرد زراعی بالا می گردند، حیاتی به نظر می رسد و همین باعث شده است که محققان به مطالعه مکانیسم‌های مقابله با خشکی در سطح مولکولی بپردازند. در رابطه با بررسی بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش خشکی در آفتابگردان تاکنون مطالعاتی انجام گرفته است. به عنوان نمونه در مطالعه‌ای تنوع ژنوتیپی برای پارامترهای وضعیت آب و تبادل گاز و همچنین بیان سه ژن انتخابی آکوپورین، دهیدرین، ژن کوتیلدون برگ (LEC= Leafy Cotyledon) تحت تیمارهای مختلف آبی (شرایط نرمال و تنش آبی و دهیدراته شدن مجدد) در یک جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب در آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) مورد بررسی قرار گرفته است (Poormohammad Kiani et al. 2006). در این مطالعه در مقایسه با ژنوتیپ‌های گیاهان نرمال، در تنش آبی تنوع بالای ژنتیکی برای پارامترهای وضعیت آب و تبادل گاز و میزان بیان ژن‌ها مشاهده شد. در مقابل در رابطه با بررسی بیان ژن تلومراز در مقاومت به تنش‌ها در گیاهان گزارشات کمی وجود دارد (Lee et al. 2016). پیشرفت‌های اخیر در علم ژنومیک منجر به

جمع‌آوری داده‌های بسیاری درباره‌ی ژن‌ها شده است. با این وجود، این پروتئین‌ها هستند که عملکرد سلول را تعیین می‌کنند در واقع بیشتر فرایندهای سلولی، وابسته به میانکنش‌های اختصاصی RNA و DNA و میانکنش تنظیم شده‌ی پروتئین‌های خاص با دیگر پروتئین‌ها است. تلومراز یک آنزیم نسخه‌بردار معکوس است که در مرحله G1-S از چرخه سلولی بیان شده و در همین مرحله از چرخه سلولی توالی‌های هگزامری (TTAGGG) را به انتهای ۳' DNA اضافه می‌کند. ماهیت بیوشیمیایی آنزیم تلومراز ریبونوکلئوپروتئینی می‌باشد (Aubert and Lansdorp, 2008). در تحقیقات انجام شده بر روی آنزیم تلومراز در گیاهان دیده شده است که تلومراز در مراحل رویانی و تکاملی و همچنین در بخش‌های گلده گیاهان فعال است (Nelson et al. 2012). در سطح سلولی در گیاهان، به بررسی مکانیزم‌های دخیل در فرایند پیری پرداخته اند تا بتوانند از طریق بهبود این مکانیزم‌ها، جوانی را طولانی‌تر یا به عبارتی بهتر پیری را به تاخیر بیندازند. پیری در سطوح مختلف بافت، اندام و سلول بروز می‌کند، و عوامل متعددی مانند عوامل ژنتیکی، بیوشیمیایی و میزان تولید رادیکال‌های آزاد، وجود یا عدم وجود آنزیم تلومراز و میزان فعالیت آن و طول تلومر در بروز آن نقش دارند (Ghanbari et al. 2017). مطالعات نشان داده اند که تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی سبب وارد شدن آسیب به DNA تلومری می‌شود (de Lange, 2002). مکانیسم مطرح در حفظ تلومر در اکثر یوکاریوت‌ها وابسته به میزان فعالیت آنزیم تلومراز است که مانع کوتاه شدن انتهای کروموزوم می‌گردد (de Lange, 2004). در شرایط تنش خشکی تقسیم سلولی و به طبع آن رشد شاخساره در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس معمولاً بیشتر است. لازمه تکرار چرخه سلولی نرمال حفظ ساختار کروموزوم‌ها است. هر گونه نقص در این ساختار باعث ایجاد آسیب به گیاه و اختلال در اعمال حیاتی و تولید می‌شود. این امر به دلایل مختلف از جمله تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد. احتمالاً با توجه به نقش کلیدی آنزیم تلومراز در حفظ ساختار انتهای کروموزوم‌ها، میزان بیان بالای ژن تلومراز در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس یک مکانیسم سازگاری دیگر در کنار سایر مکانیسم‌ها از جمله تنظیم اسمزی در جهت کاهش اثرات تنش خشکی بر گیاه باشد.

نتیجه گیری: از آنجاییکه آنزیم تلومراز در حفظ یکپارچگی و پایداری ژنوم در چرخه‌ی سلولی نقش اساسی دارد در نتیجه بیشتر بودن میزان بیان ژن تلومراز در ژنوتیپ متحمل (ENSAT254) در مقایسه با ژنوتیپ حساس (LC1064C) احتمالاً حاکی از دخالت ژن فوق در مقاومت آفتابگردان به تنش خشکی باشد. همچنین طبق این نتایج، مقاومت ژنوتیپ ENSAT254 آفتابگردان به تنش خشکی در سطح مولکولی تایید می‌شود. نتایج این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای تولید ارقام مقاوم به خشکی مفید واقع گردد.

منابع

- بهجتی توحید، مرتضوی سید ابوالقاسم، پاریاب جابر (۱۳۸۸) اثرات اقتصادی خشکسالی بر روی کشاورزی و راهکارهای اقتصادی مقابله با آن. دومین همایش ملی اثرات خشکسالی و راهکارهای مدیریت آن، اصفهان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان.
- خواجه پور محمدرضا (۱۳۷۰) تولید نباتات صنعتی. انتشارات جهد دانشگاهی صنعتی اصفهان. ۲۵۱ صفحه.
- عبدالرحمنی بهمن (۱۳۸۲). اثر تراکم بوته بر روی خصوصیات زراعی و عملکرد دانه آفتابگردان رقم آرماویرسکی در شرایط دیم. مجله علوم زراعی ایران ۵(۳)، ۲۱۶-۲۲۵.
- قنبری علی، محسنی فرد احسان (۱۳۹۶) عوامل اصلی موثر بر مکانیسم پیری در گیاهان و جانوران با تمرکز بر تلومر و تلومراز، اولین کنفرانس بین المللی فناوری های نوین در علوم، آمل، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل.
- گل پرور احمدرضا، قنادها محمدرضا، زالی عباسعلی، احمدی علی (۱۳۸۱) تعیین بهترین صفات گزینش برای بهبود عملکرد ژنوتیپ های گندم نان در شرایط تنش. نهال و بذر ۱۸(۲)، ۱۴۴-۱۵۵.

Reference

- Abdul Rahmani B (2003) Effects of plant density on yield and agronomic traits of sunflower cv. Armavirsky under dryland condition in Maragheh. Iran J Crop Sci 5, 23-38 (In Persian).
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol 55, 373-399.
- Aubert G, Lansdorpe PM (2008) Telomeres and aging. Physiol Rev 88, 557-579.
- Autexier C, Lue NF (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase. Annu Rev Biochem 75, 493-517.
- Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. J Biosci 32, 501-510.
- Behjati T, Mortazavi A, Paryab J (2009) Economic impacts of drought on agriculture and its economic solutions. Second National Conference on Drought Impacts and Its Management Strategies, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research Center.
- Bigloui MH, Assimi MH, Akbarzadeh A (2010) Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of Virginia (flue-cured) tobacco type. Plant Soil Environ 56, 67-75.
- De Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. Oncogene 21, 532.
- De Lange T (2004) T-loops and the origin of telomeres. Nat Rev Mol Cell Bio 5, 323.

- Ghanbari A, Mohseni Fard A (2017) Main factors affecting aging mechanism in plants and animals, focusing on telomeres and telomeres. First International Conference on New Technologies in Science, Amol, Amol University of Technology.
- Gomez D, Marinez O, Arona M, Castro V (1991) Generating a selection index for drought tolerance in sunflower: I. Water use and consumption. *Helia* 14, 65-70.
- Jajarmi V (2009) Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivar. *World Acad Sci Eng Technol* 49, 105-106.
- Khajehpour MR (1991), Production of industrial crops. Jahad Daneshgahi Press (Isfahan University of Technology), 251 pages.
- Kawanishi S, Oikawa S (2004) Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 1019, 278-284.
- Kollar R, Bod'ova K, Nosek J, Tomáška LU (2014) Mathematical model of alternative mechanism of telomere length maintenance. *Phys Rev E* 89, 032701.
- Kupiec M (2014) Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *FEMS Microbiol Ecol* 38, 144-171.
- Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, Lim U, Hosgood III HD, Albanes D, Rothman N (2009). A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 15, 7429-7433.
- Lee JR, Xie X, Yang K, et al. (2016) Dynamic interactions of Arabidopsis TEN1: stabilizing telomeres in response to heat stress. *Plant Cell* 28, 2212–2224.
- Li Y, Tergaonkar V (2014) Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Res* 74, 1639-1644.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Nelson ADL, Shippen DE (2012) Surprises from the chromosome front: lessons from Arabidopsis on telomeres and telomerase. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology Cold Spring Harbor Laboratory Press 77, 7-15.
- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P et al. (2017) 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, 193-207.
- Sabaghpour SH, Mahmodi AA, Saeed A et al. (2006) Study on chickpea drought tolerance lines under dry land condition of Iran. *Indian J Crop Sci* 1, 70-73.

- Schneiter AA, Miller JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Science* 21,901-903.
- Smirnoff N (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech* 9, 214-219.
- Soleimani GA, Darvishzadeh R, Ebrahimi A, Bihamta MR (2018) Identification of SSR and retrotransposon-based molecular markers linked to morphological characters in oily sunflower under natural and water-limited states. *J Genet* 97, 189-203.

