

The Role of *ERF* and *ACO* Genes in the Response of Flax to Waterlogging Stress

Zahra Behzadi 

*Corresponding Author: PhD, Department of Genetics and Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email address: zahrabehzadi70@gmail.com

Hamid Najafi Zarini 

Associate Professor, Department of Genetics and Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email address: najafi316@gmail.com

Gholam Ali Ranjbar 

Associate Professor, Department of Genetics and Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email address: ali.ranjbar@sanru.ac.ir

Ali Pakdin Parizi 

Assistant Professor, Tabarestan Agricultural Genetics and Biotechnology Research Institute, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Sari, Sari, Iran. Email address: ali.pakdin@gmail.com

Abstract

Objective

Flax (*Linum usitatissimum*) holds a significant position among plants due to its versatile applications. It is found in various industries, such as oil extraction and medical applications. Therefore, it is valuable for both medicinal and industrial purposes. Like other plants, flax is susceptible to environmental stressors, with waterlogging stress being a prominent threat. Waterlogging stress occurs when excess water in the soil limits oxygen supply to plant roots, which disrupts metabolic processes and causes damage. Therefore, understanding how flax responds genetically to waterlogging stress is crucial. Recent studies have identified specific genes and metabolic pathways involved in this response. Notably, the *ERF* (Ethylene Response Factor) and *ACO* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase) genes play essential roles in regulating this response.

Materials and Methods

In our study, we grew two flax genotypes (sensitive and tolerant) in water-saturated soil (beyond Field Capacity). Then, they were collected at different time intervals (0, 12, 24, 72 hours, and seven days) after waterlogging onset.

Results

The gene expression patterns showed different responses between the genotypes. The ERF gene exhibited more fluctuations in the sensitive genotype, suggesting that the sensitive genotype experiences a higher level of stress. On the other hand, the ACO gene showed different expression patterns in the two genotypes studied.

Conclusion

These differences indicate distinct strategies for managing ethylene levels under waterlogging stress in these genotypes. Additionally, the regulation of ACO expression in these genotypes suggests a more controlled and potentially beneficial response to long-term waterlogging stress. Ethylene can play an important role as a crucial hormone when plants experience stress.

Keywords: Ethylene, Gene Expression, Root Tissue, Tolerance.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Behzadi Z, Najafi Zarini H, Ranjbar GA, Pakdin Parizi A (2024) The Role of ERF and ACO Genes in the Response of Flax to Waterlogging Stress. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 1 (1), 67-78.

Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (1), 67-78

DOI: 10.22103/gpb.2024.23308.1011

Received: December 29, 2023.

Received in revised form: March 10, 2024.

Accepted: March 11, 2024.

Published online: April 6, 2024.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman
and Iranian Genetics Society.



© the authors

نقش ژن های *ERF* و *ACO* در پاسخ کتان به تنش غرقاب

زهرا بهزادی 

*نویسنده مسئول: دانش آموخته دکتری، گروه ژنتیک و بهنژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

zahrabehzadi70@gmail.com

حمید نجفی زرینی 

دانشیار، گروه ژنتیک و بهنژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: najafi316@gmail.com

غلامعلی رنجبر 

دانشیار، گروه ژنتیک و بهنژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: ali.ranjbar@sanru.ac.ir

علی پاکدین پاریزی 

استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه:

ali.pakdin@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۸

چکیده

هدف: کتان به دلیل کاربردهای چندمنظوره جایگاه قابل توجهی در بین گیاهان دارد. در صنایع مختلفی از جمله تولید روغن و مصارف دارویی استفاده می شود. لذا یک گیاه دارویی و صنعتی با ارزش به شمار می رود. گیاه کتان در برابر عوامل تنش زای محیطی آسیب پذیر است. در میان این عوامل تنش زاء تنش غرقابی به عنوان یک تهدید برجسته به شمار می آید. تنش غرقاب ناشی از آب اضافی در خاک که اکسیژن رسانی به ریشه گیاهان را محدود می کند، فرآیندهای متابولیک طبیعی را مختل می کند و به گیاهان آسیب می رساند. درک اساس ژنتیکی پاسخ کتان به تنش غرقابی بسیار مهم است. مطالعات اخیر ژن های خاص و مسیرهای متابولیکی درگیر در این پاسخ را روشن کرده است. ژن های *ERF* (فاکتور پاسخ اتیلن)^۱ و *ACO* (۱-آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات اکسیداز)^۲ نقش اساسی در تنظیم پاسخ های تنش، از جمله تنش غرقابی دارند.

¹ Ethylene Response Factor (*ERF*)

² 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (*ACO*)

مواد و روش‌ها: در این مطالعه دو ژنوتیپ کتان (حساس و متحمل) در شرایط کنترل‌شده و در خاک اشباع از آب (بیشتر از ظرفیت مزرعه‌ای خاک) رشد کردند. نمونه‌ها در فواصل زمانی مختلف (صفر، ۱۲، ۲۴، ۷۲ ساعت و هفت روز) پس از شروع غرقاب جمع‌آوری شد.

نتایج: الگوهای بیان ژن پاسخ‌های متمایزی را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد. ژن *ERF* در ژنوتیپ حساس نوسانات بیشتری نشان می‌دهد احتمالاً ژنوتیپ حساس درجه بالاتری از تنش را تجربه می‌کند. از سوی دیگر، ژن *ACO* در دو ژنوتیپ نمونه‌برداری شده الگوهای بیان متفاوتی دارد.

نتیجه‌گیری: این تفاوت‌ها نشان‌دهنده استراتژی‌های مختلف مدیریت سطوح اتیلن تحت تنش غرقابی در این ژنوتیپ‌ها است. همچنین، تنظیم بیان *ACO* در ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده تنظیم کنترل‌شده‌تر و بالقوه سودمندتر برای تنش غرقابی طولانی مدت است. اتیلن می‌تواند به عنوان یک هورمون حیاتی در پاسخ به تنش گیاهی تاثیر به‌سزایی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: اتیلن، بافت ریشه، بیان ژن، تحمل.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بهزادی زهرا، نجفی حمید، رنجبر غلامعلی، پاکدین پاریزی علی (۱۴۰۳) نقش ژن‌های *ERF* و *ACO* در پاسخ کتان به تنش غرقاب. *مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی*، ۱(۱)، ۶۷-۷۸.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman
and Iranian Genetics Society



© the authors

مقدمه

کتان (*Linum usitatissimum*)، گیاهی با ارزش است که به‌دلیل کاربردهای چندوجهی آن جایگاه قابل‌توجهی در بین گیاهان دارد، کاربردهایش در صنایع مختلف از جمله تولید روغن و مصارف دارویی شناخته شده است. دانه کتان که سرشار از اسیدهای چرب امگا ۳، لیگنان‌ها و فیبر است، به‌دلیل فواید بالقوه برای سلامتی، از جمله کاهش خطر بیماری قلبی، حمایت از سلامت دستگاه گوارش و پیشگیری از برخی سرطان‌ها مشهور است. علاوه بر این، دانه کتان در طب سنتی به‌دلیل خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آن استفاده می‌شود (Zare et al. 2021; Nowak & Jeziorek 2023). با این حال، علی‌رغم پتانسیل دارویی بسیار زیاد، کشت کتان در برابر عوامل تنش‌زای محیطی مختلف آسیب‌پذیر است، که در میان آن‌ها تنش غرقابی به‌عنوان یک تهدید برجسته ظاهر می‌شود. غرقابی، یک تنش غیرزنده ناشی از آب اضافی در خاک، مانع از اکسیژن‌رسانی به ریشه گیاهان می‌شود، فرآیندهای متابولیک

¹ Field capacity

طبیعی را مختل می‌کند و به گیاهان آسیب می‌رساند. عواقب غرقابی به‌ویژه برای محصولات زراعی بسیار شدید است و اغلب منجر به کاهش رشد، تلفات محصول و حساسیت به بیماری‌ها می‌شود (Kariuki et al. 2016; Qiu et al. 2023). در این زمینه، درک اساس ژنتیکی پاسخ کتان به تنش غرقابی از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات اخیر برخی از ژن‌ها و مسیرهای متابولیک درگیر در پاسخ به تنش در گیاه کتان را روشن کرده است (Wang et al. 2022; Qi et al. 2023). با این حال، مکانیسم‌های اساسی تحمل گیاه کتان در برابر این تنش‌ها به‌طور کامل شناخته نشده است (Wang et al. 2023).

اتیلن یک هورمون گیاهی است که نقش مهمی در واکنش گیاه به تنش غرقابی دارد. هنگامی که گیاهان در معرض شرایط غرقابی قرار می‌گیرند، کمبود اکسیژن (هیپوکسی) باعث تولید اتیلن می‌شود. این هورمون واکنش‌های فیزیولوژیکی و مولکولی مختلفی را موجب می‌شود که به گیاهان کمک می‌کند تا با تنش مقابله کنند. در ابتدا موجب القاء تشکیل بافت آئرانسیم می‌شود، که فضاهای هوایی در قشر ساقه و ریشه هستند. این امر انتشار اکسیژن را از ساقه به ریشه تسهیل می‌کند و به کاهش اثرات هیپوکسی کمک می‌کند (Iglesias-Moya et al. 2023; Ni et al. 2019; Qi et al. 2019). اتیلن می‌تواند رشد ریشه را در شرایط غرقابی مهار کند، در نتیجه مصرف انرژی گیاه کاهش می‌یابد و این امر به حفظ منابع در گیاه کمک می‌کند (Ni et al. 2019). هورمون اتیلن، رشد ریشه‌های نابجا را تقویت می‌کند، که می‌تواند توانایی گیاه را برای جذب اکسیژن و مواد مغذی از لایه‌های زیرین خاک که دارای آب کمتری است، بهبود بخشد (Yu et al. 2019; Qi et al. 2019). از همه مهمتر اینکه، این هورمون بر بیان ژن‌های مرتبط با تحمل تنش، از جمله ژن‌های دخیل در متابولیسم بی‌هوازی و دفاع آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد (Fatma et al. 2019; Ni et al. 2022). در مجموع این واکنش‌ها به گیاهان کمک می‌کند تا با شرایط غرقابی سازگار شوند و انرژی و منابع را حفظ کنند و در نهایت توانایی آن‌ها را برای بقا و رشد در شرایط تنش افزایش دهند. در مطالعه‌ای که بیان ژن را در بافت‌ها و اندام‌های مختلف کتان در شرایط نرمال و تنش مورد بررسی قرار داده است گزارش شده است که بافت‌های مختلف اندام کتان سطوح مختلفی از تحمل تنش را نشان می‌دهند و برخی از ژن‌ها رشد بهینه اندام‌های خاص را تضمین می‌کنند. این مطالعه همچنین فاکتورهای رونویسی AP2 را شناسایی کرد که در پاسخ به تنش در گیاهان کتان نقش دارند (Qi et al. 2023).

فاکتور پاسخ اتیلن (*ERF*)^۱ و ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات اکسیداز (*ACO*)^۲، یک فاکتور رونویسی، در تنظیم پاسخ‌های تنش مختلف، از جمله پاسخ‌های مربوط به غرقابی نقش دارد. از سوی دیگر، *ACO*، آنزیمی در مسیر بیوسنتز اتیلن، به تولید اتیلن، یک هورمون گیاهی مرتبط با سیگنال‌دهی تنش کمک می‌کند. درک نقش ژن‌های *ERF* و *ACO* در زمینه تنش غرقابی برای توسعه استراتژی افزایش تحمل به تنش غرقابی ژنوتیپ‌های کتان بسیار مهم است و در نهایت پژوهش‌ها را به تولید ژنوتیپ‌های سازگارتر سوق می‌دهد. از سوی دیگر، افزایش تحمل تنش غرقاب در کتان نه تنها برای تضمین تولید محصول پایدار حیاتی است، بلکه نویدبخش استفاده بیشتر از پتانسیل دارویی گیاه کتان است (Qiu et al. 2023). گیاه کتان معمولاً در شرایط

¹ Ethylene Response Factor (*ERF*)

² 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (*ACO*)

غرقابی کشت نمی‌شود، اما به‌دلیل دوره رشد کوتاه، این پتانسیل را دارد تا به‌عنوان کشت دوم پس از برنج کشت شود، درک پاسخ ژنتیکی آن به تنش آبی بسیار مهم است. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر شرایط تنش غرقابی بر بیان ژن‌های *ERF* و *ACO* در گیاه کتان می‌باشد. لذا در این مطالعه به شناسایی تغییرات بیان ژن در این شرایط پرداخته شد، که در نهایت درک ما از سازگاری کتان و بهره‌وری محصول را افزایش می‌دهد، این موضوع به نفع کشاورزان مناطقی است که بارندگی در فصل کشت دارای نوسان است و خاک مزرعه تا حدودی سنگین است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: دو ژنوتیپ کتان (حساس و متحمل)، در محیط کنترل‌شده در گلدان حاوی خاک مزرعه و ماسه‌بادی با نسبت ۲:۱ کاشته شد و تحت شرایط دمایی ۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری‌های مربوط به خاک شامل ظرفیت مزرعه (FC)^۱ و هدایت الکتریکی (EC)^۲ خاک صورت گرفت. پس از رسیدن گیاه به مرحله چهاربرگی حقیقی، تنش غرقاب اعمال شد. گلدان‌های اختصاص‌یافته به سطح صفر در حد ظرفیت مزرعه‌ای خاک آبیاری و برای سایر گلدان‌ها بیش از این مقدار آب اضافه می‌شد تا خاک به حد اشباع برسد و حدود یک سانتی‌متر آب روی سطح خاک را فرا می‌گرفت. نمونه‌برداری بافت ریشه گیاه کتان در فواصل زمانی صفر، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و هفت روز پس از تنش غرقاب انجام شد.

به‌منظور استخراج RNA، نمونه‌های بافت ریشه به‌وسیله هاون چینی در ازت مایع پودر شدند و مقدار ۰/۱ گرم به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر به آن بافر ترای‌زول (YTzol Pure RNA) اضافه شد. پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری و ۱۵ دقیقه بعدی در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰g) شد. سپس فاز مایع برداشته شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محلول به‌وسیله تکان دادن، پنج دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و مجدداً سانتریفیوژ شد. سپس فاز بالایی برداشته شده (۵۰۰ میکرولیتر) و به آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای -۲۰- نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ طبق برنامه قبل به‌مدت ۲۰ دقیقه پلت RNA تشکیل شد. پلت‌ها به‌وسیله اتانول ۷۰ درصد شستشو شدند و پس از خشک شدن (حدود ۷ دقیقه پس از تخلیه اتانول) در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شدند. کمیت و کیفیت سنجی RNA استخراج شده به‌وسیله اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شد. پیش از سنتز cDNA نمونه‌های RNA با آنزیم DNase شرکت Termofisher تیمار شدند. بدین منظور به دو میکروگرم (حداکثر پنج میکرولیتر) RNA استخراج شده یک میکرولیتر $MgCl_2$ و یک واحد آنزیم (یک میکرولیتر) DNase I افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس برای توقف واکنش به آن یک میکرولیتر EDTA افزوده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه

¹ Field capacity

² Electrical Conductivity

در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت. سنتز cDNA به وسیله کیت سیناکلون انجام شد. بدین منظور ابتدا به پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNaseI با یک میکرولیتر (dt) Primer Oligo، یک میکرولیتر mM 10 dNTP mix و سه میکرولیتر آب DEPC، مخلوط شد و پنج دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس به مدت دو دقیقه بر روی یخ نگه داشته شد. به محلول مقدار چهار میکرولیتر 5X buffer، یک میکرولیتر MMulv Enzyme، یک میکرولیتر RNase inhibitor و چهار میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه قرار گرفت. پس از آن به مدت پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و در نهایت محصول واکنش در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن یکی از جنبه‌های اصلی این مطالعه بود که بر دو ژن کلیدی شامل فاکتور پاسخ اتیلن (*ERF*) و ۱-آمینوسیلوپروپان-۱-کربوکسیلات اکسیداز (*ACO*)، تمرکز داشت. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qPCR)، برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های *ERF* و *ACO* مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز بیان ژن به وسیله دستگاه Real time PCR مدل ABI- plus step one جهت بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد. هر واکنش ۱۲ میکرولیتری شامل ۶ میکرولیتر سایبرگرین، ۱۵ میکرومول از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده (پنج برابر) و آب عاری از نوکلئاز بود. طراحی پرایمرها بر اساس توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده NCBI و Tair با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام شد. از ژن مرجع MYB در Real Time PCR استفاده شد. تغییرات بیان ژن با استفاده از روش Livak & Schmittgen (2001) (فرمول: $\Delta\Delta CT^{-2}$) بررسی و آنالیز شد.

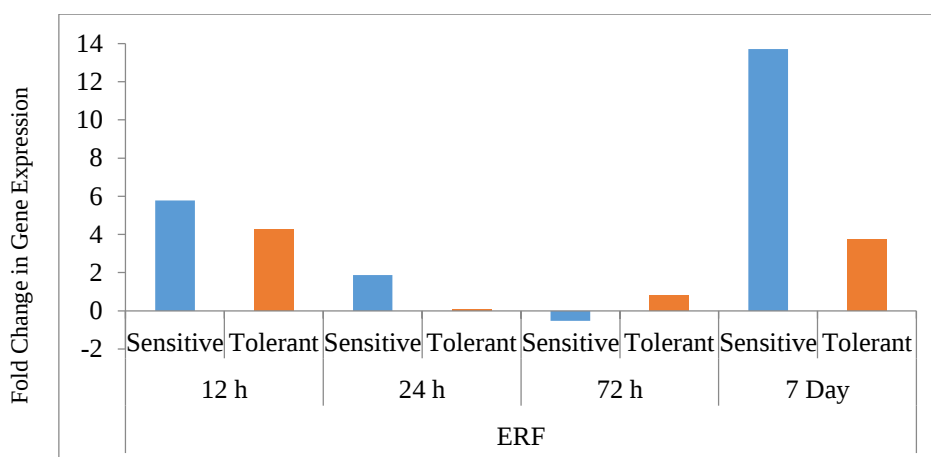
جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن
Table 1. Primers used in gene expression analysis

Tair	نام پرایمر Primer name	جهت توالی Sequence direction	توالی پرایمر Primer sequence	طول محصول Product length
AT2G47520.1	ERF071	F R	GAATGATCGGATCGTGCTGGTTA AGCAGCTCGCGCTTACG	149
AT1G05010	ACO4	F R	TCGGTGACCAGATTGAGGTGA CGCGTCATTTCCAGGGTTGT	122
Genbank:GQ374578	LuMYB1-2	F	GGAGACGCGTAATAGGTTTG GCGAGCAATTCCTTGACCATCTG	

نتایج و بحث

اتیلن، یک هورمون گیاهی گازی است که اساساً تمام فرآیندهای فیزیولوژیکی را در طول چرخه زندگی گیاه تنظیم می‌کند. ACC اکسیداز (*ACO*) در مرحله نهایی تولید اتیلن در بافت‌های گیاهی نقش دارد. در گیاهان مختلف چندین ایزوفرم *ACO* جدا شده است که توسط یک خانواده چند ژنی کدگذاری شده است. شواهد قوی وجود دارد که بیان ژن *ACO* با نرخ تولید اتیلن همبستگی مثبت دارد و ایزوفرم‌های متعدد آن تحت تاثیر محیط هستند. بنابراین، تنظیم فعالیت ژن *ACO* ممکن است به عنوان ژن کمکی یا در چندین مورد به عنوان ژن اصلی برای کنترل بیوستز اتیلن در گیاهان عالی عمل کند (Rudus et al. 2013).

الگوهای بیان مکانی و زمانی خاص ژن‌های *ACO* در بافت‌های رویشی وجود دارد، نقش دقیق *ACO* به‌عنوان یک نقطه تنظیمی احتمالی در تولید اتیلن هنوز نیاز به روشن شدن دارد. چند نمونه از شواهد مستقیم برای دخالت *ACO* در تنظیم بیوسنتز اتیلن وجود دارد. یک مطالعه بیان در شبدر سفید نشان داد که *ACO* نقش تنظیمی در انتوزن (برگ ایفا می‌کند (Hunter et al. 1999). آنتاگونیست‌های اکسین باعث افزایش طول ریشه اولیه می‌شوند، به‌طور همزمان قطر ریشه و رشد ریشه مویی را در *Linum usitatissimum* کاهش می‌دهند که بر بیان ژن‌های بیوسنتز اتیلن تأثیر می‌گذارد، هر دو سطح رونوشت‌های *ACS* و *ACO* مهار می‌کند (Zhao and Hasenstein 2009). با این حال، Takahashi et al. (2010) مشاهده کردند که در بین ژن‌های *ACO* تنظیم‌شده متفاوت، *LS-ACO2* نقش کلیدی در تولید اتیلن در طول تشکیل ریشه مویی با pH_{ipa} پایین در کاهو بازی می‌کند. در مطالعه حاضر مشاهده شد پس از گذشت ۱۲ ساعت از شروع تنش غرقاب، ژنوتیپ حساس افزایش بیان *ERF* را نشان می‌دهد (تقریباً ۵/۷۷ برابر)، در حالی که ژنوتیپ متحمل تفاوت معنی‌داری را نسبت به شرایط بدون تنش نشان نمی‌دهد. در طی ۲۴ و ۷۲ ساعت، بیان *ERF* ژنوتیپ حساس همچنان نسبت به شرایط تنش بالاتر است (تقریباً ۴/۲۷ برابر)، که نشان‌دهنده پاسخ مداوم به تنش است. در نهایت پس از یک هفته، ژنوتیپ حساس بیشترین افزایش را نشان می‌دهد (تقریباً ۷/۷۴ برابر)، در حالی که ژنوتیپ متحمل افزایش متوسط (حدود ۱/۵۷ برابر) را حفظ می‌کند (شکل ۱).

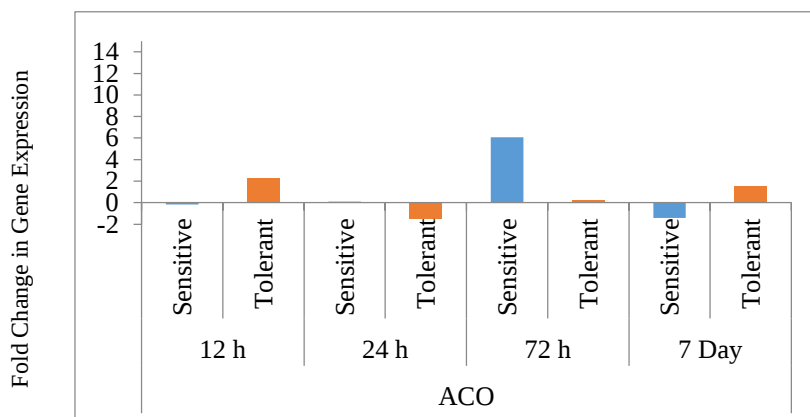


شکل ۱. نمودار تغییر بیان ژن *ERF* در زمان‌های مختلف تنش غرقاب در بافت ریشه گیاه کتان
Figure 1. The diagram of changes in *ERF* gene expression at different times of waterlogging stress in the root tissue of flax plant

طبق نتایج تغییر الگوی بیان که در شکل ۲ مشخص شده است بعد از ۱۲ ساعت، بیان *ACO* ژنوتیپ متحمل به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد (تقریباً ۶/۰۶ برابر). در ۲۴ ساعت، بیان ژن *ACO* در دو ژنوتیپ حساس و متحمل نسبت به شرایط

¹ Ontogeny

بدون تنش تفاوت معنی‌داری نداشت. تا ۷۲ ساعت و پس از آن (یک هفته)، بیان *ACO* ژنوتیپ حساس به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد (حدود ۲/۳۳ برابر)، که نشان‌دهنده پاسخ به تنش غرقابی است، اما ژنوتیپ متحمل همچنان بدون تغییر ماند.



شکل ۲. نمودار تغییر بیان ژن *ACO* در زمان‌های مختلف تنش غرقاب در بافت ریشه گیاه کتان

Figure 2. The diagram of changes in *ACO* gene expression at different times of waterlogging stress in the root tissue of flax plant

به‌طور کلی، روند تغییرات بیان ژن، طی یک هفته در شرایط تنش نشان داد که این دو ژنوتیپ از نظر بیان ژن به تنش غرقابی پاسخ متفاوتی می‌دهند. ژن *ERF* که معمولاً با پاسخ‌های تنش مرتبط است، در ژنوتیپ حساس با گذشت زمان، تغییرات بارزتری را نشان داد. برعکس، ژن *ACO*، مرتبط با تولید اتیلن، الگوهای متفاوتی را بین ژنوتیپ‌ها داشت، به‌طوری که ژنوتیپ حساس در ابتدا کاهش بیان و ژنوتیپ متحمل افزایش یافت، که احتمالاً مکانیسم‌های متمایزی را در پاسخ آن‌ها به تنش غرقابی نشان می‌دهد. سطح بیان ژن‌های بیوسنتزی اتیلن تحت شرایط هیپوکسیک تنظیم می‌شود. افزایش سطح هورمون اتیلن منجر به اسیدی شدن محیط و کمک به مرگ سلولی برنامه ریزی شده و تشکیل آثرانسیم می‌شود که این فرایند به‌طور کلی توسط اتیلن کنترل می‌شود. بدین ترتیب اکسیژن‌رسانی از اندام هوایی به ریشه صورت می‌گیرد و موجب کاهش تلفات و خسارت ناشی از تنش غرقاب و در نتیجه تحمل تنش می‌شود. در شرایط تنش، بیان ژن *ERF*، یک عامل رونویسی کلیدی که در پاسخ‌های تنش نقش دارد، افزایش قابل‌توجهی را در مقایسه با شرایط کنترل نشان داد. به‌طور مشابه، بیان *ACO*، یک آنزیم ضروری در بیوسنتز اتیلن، در پاسخ به تنش غرقابی تنظیم شد. دگرگونی مشاهده‌شده در بیان ژن‌های *ERF* و *ACO* نقش بالقوه آن‌ها را به‌عنوان اجزای حیاتی مکانیسم پاسخ تنش کتان، به‌ویژه تحت تنش غرقابی، نشان می‌دهد. *ERF*، که یک عامل رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش شناخته شده است، ممکن است ژن‌های مرتبط با تنش را تنظیم کند و به استراتژی‌های سازگاری گیاه در شرایط تنش غرقاب کمک کند. علاوه بر این، افزایش بیان *ACO* نشان‌دهنده افزایش تولید اتیلن، یک مولکول کلیدی سیگنال‌دهنده تنش است که می‌تواند فرآیندهای فیزیولوژیکی و مولکولی مختلف را در پاسخ به تنش غرقابی تعدیل کند.

پاسخ به تنش‌های محیطی من جمله تنش غرقابی حاصل مکانیسم‌های مولکولی پیچیده‌ای است. در این پژوهش به پاسخ زیربنایی و متفاوت دو ژنوتیپ کتان به تنش غرقابی پی برده شد. نتایج بر تأثیر متقابل عوامل ژنتیکی و محیطی در تعدیل پاسخ‌ها

در برابر تنش تاکید می‌کند و سازگاری‌های ژنوتیپ متحمل را آشکار می‌سازد. تغییرات مشاهده شده در بیان ژن در طول یک هفته تنش غرقاب، گویای ماهیت پویای پاسخ‌ها در برابر تنش در سطح مولکولی است. ژن *ERF* که به دلیل نقش خود در مسیر سیگنال‌دهی اتیلن و تنظیم پاسخ به تنش به خصوص تنش غرقابی شناخته می‌شود، در طول زمان، نوسانات بارزتری را در ژنوتیپ حساس نشان داد. این نشان می‌دهد که ژنوتیپ حساس ممکن است درجه بالاتری از تنش را تجربه می‌کند، که نیاز به این واکنش یعنی بیان ژن قوی‌تر یا متغیر برای مقابله با شرایط تنش غرقابی دارد. در مقابل، ژن *ACO* که نقش مهمی در بیوسنتز اتیلن دارد، الگوهای بیان متفاوتی را بین دو ژنوتیپ نشان داد. کاهش اولیه بیان *ACO* در ژنوتیپ حساس و به دنبال آن افزایش در ژنوتیپ متحمل، نشان می‌دهد که این دو ژنوتیپ ممکن است از استراتژی‌های مختلفی برای مدیریت سطوح اتیلن تحت تنش غرقابی استفاده می‌کنند. این واگرایی نشان می‌دهد که ژنوتیپ حساس ممکن است تولید اتیلن را به عنوان یک پاسخ فوری به تنش غرقابی، احتمالاً به عنوان یک واکنش شوک، سرکوب کند. در مقابل، افزایش بیان *ACO* ژنوتیپ متحمل می‌تواند نشان‌دهنده یک واکنش تطبیقی کنترل‌شده‌تر و افزایش تولید اتیلن برای فعال کردن مکانیسم‌های پاسخ به تنش پایین‌دستی باشد. اتیلن یک هورمون حیاتی در پاسخ به تنش گیاه است و تنظیم آن برای بقا و سازگاری حیاتی است. سرکوب اولیه *ACO* در ژنوتیپ حساس می‌تواند منعکس‌کننده یک شوک اولیه یا پاسخ ناسازگار به تنش غرقاب باشد، در حالی که تنظیم مثبت بعدی در ژنوتیپ متحمل نشان‌دهنده تنظیم کنترل‌شده و بالقوه سودمندتر برای تنش غرقابی طولانی مدت است. پروفایل‌های بیان ژن متمایز بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل، اهمیت زمینه ژنتیکی را در تعیین تاب‌آوری تنش غرقابی برجسته می‌کند. نوسان بیان *ERF* در ژنوتیپ حساس ممکن است نشان‌دهنده فقدان ثبات در مکانیسم‌های پاسخ به تنش غرقابی باشد که به‌طور بالقوه منجر به کاهش اثر استراتژی‌های تحمل می‌شود. از سوی دیگر، تنظیم مثبت *ACO* در ژنوتیپ متحمل، پایداری مکانیسم تحمل به تنش را نشان می‌دهد که می‌تواند مزیت بقا را در شرایط تنش غرقابی به ارمغان آورد.

مکانیسم تحمل تنش گیاهی یک صفت چند وجهی است که تحت تأثیر شبکه‌ای از تعاملات ژنتیکی و محیطی است. توانایی ژنوتیپ متحمل برای حفظ پاسخ بیان ژنی پایدارتر می‌تواند یک عامل کلیدی در افزایش انعطاف‌پذیری آن باشد و اهداف بالقوه‌ای را برای برنامه‌های اصلاحی با هدف بهبود تحمل تنش غرقابی در محصولات فراهم آورد. درک اساس مولکولی پاسخ‌های تنش در گیاهان برای توسعه استراتژی‌هایی برای افزایش انعطاف‌پذیری محصول حیاتی است. الگوهای بیان افتراقی ژن‌های *ERF* و *ACO* مشاهده شده در این مطالعه بینش‌های ارزشمندی را در مورد عوامل ژنتیکی که به تحمل تنش غرقابی کمک می‌کنند ارائه می‌کند. با شناسایی ژن‌های خاص و مکانیسم‌های تنظیمی درگیر، می‌توان مداخلات هدفمندی مانند اصلاح ژنتیکی یا اصلاح انتخابی را برای تقویت این صفات در واریته‌های مستعد طراحی کرد. برای مثال، دستکاری بیان ژن‌های *ERF* و *ACO* در ژنوتیپ‌های حساس برای تقلید از الگوهای پاسخ ژنوتیپ‌های متحمل می‌تواند یک رویکرد امیدوارکننده برای بهبود تحمل تنش غرقابی باشد. علاوه بر

این، کاوش در شبکه‌های نظارتی و اهداف پایین‌دستی این ژن‌ها ممکن است درک بهتری در مورد مسیرهای مولکولی که تاب‌آوری در برابر تنش غرقابی را پشتیبانی می‌کنند، نشان دهد و راه‌های بیشتری برای بهبود تحمل و حتی عملکرد در این شرایط فراهم کند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، بیان متفاوت ژن‌های *ERF* و *ACO* در پاسخ به تنش غرقابی، پیچیدگی پاسخ‌های تنش گیاهی را برجسته می‌کند و بر پتانسیل مداخلات ژنتیکی و مولکولی برای افزایش انعطاف‌پذیری محصول تأکید می‌کند. این مطالعه پایه‌ای برای تحقیقات آینده با هدف بازگشایی شبکه‌های نظارتی پیچیده‌ای که تحمل تنش غرقابی را کنترل می‌کنند، فراهم می‌کند و راه را برای استراتژی‌های نوآورانه برای کاهش تأثیر تنش‌های محیطی بر کشاورزی هموار می‌نماید. با ارتقای درک خود از مکانیسم‌های مولکولی اساس تحمل تنش غرقابی، به دستیابی شیوه‌های کشاورزی پایدار نزدیک‌تر می‌شویم که می‌تواند از جمعیت رو به رشد جهانی در مواجهه با تغییرات آب و هوایی حمایت کند.

References

- Fatma, M., Asgher, M., Iqbal, N., Rasheed, F., Sehar, Z., Sofo, A., & Khan, N. A. (2022). Ethylene Signaling under Stressful Environments: Analyzing Collaborative Knowledge. *Plants*, 11(17), 2211. <https://doi.org/10.3390/plants11172211>
- Hunter, D. A., Yoo S. D., Butcher, S. M., & McManus, M. T. (1999). Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase during leaf ontogeny in white clover. *Plant Physiology*, 120, 131-141. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.131>
- Kariuki, L. W., Masinde, P., Githiri, S., & Onyango, A.N. (2016). Effect of water stress on growth of three linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties. *SpringerPlus*, 5(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2348-5>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402- 408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ni, X. L., Gui, M. Y., Tan, L. L., Zhu, Q., Liu, W. Z., & Li, C. X. (2019). Programmed Cell Death and Aerenchyma Formation in Water-Logged Sunflower Stems and Its Promotion by Ethylene and ROS. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1928. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01928>
- Nowak, W., & Jeziorek, M. (2023). The Role of Flaxseed in Improving Human Health. *Healthcare*, 11(3), 395. <https://doi.org/10.3390/healthcare11030395>
- Qi, F., Wang, F., Xiaoyang, C., Wang, Z., Lin, Y., Peng, Z., Zhang, J., Wang, N., & Zhang, J. (2023). Gene Expression Analysis of Different Organs and Identification of AP2 Transcription Factors in Flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plants*. 12(18), 3260. <https://doi.org/10.3390/plants12183260>
- Qi, X., Li, Q., Ma, X., Qian, C., Wang, H., Ren, N., Shen, C., Huang, S., Xu, X., Xu, Q., & Chen, X. (2019). Waterlogging-induced adventitious root formation in cucumber is regulated by

- ethylene and auxin through reactive oxygen species signalling. *Plant, Cell & Environment*, 42(5), 1458–1470. <https://doi.org/10.1111/pce.13504>
- Qiu, C., Qiu, H., Peng, D., Chen, J., Wang, Y., Stybayev, G., Baitelenova, A., Kipshakpayeva, G., Begalina, A., & Wu, Z. (2023). The Mechanisms Underlying Physiological and Molecular Responses to Waterlogging in Flax. *Journal of Natural Fibers*, 20(2), 2198275. <https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2198275>
- Ruduś, I., Sasiak, M., & Kępczyński, J. (2013). Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 295-307. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1096-6>
- Takahashi, H., Shinkawa, T., Nakai, S., & Inoue, Y. (2010). Differential expression of ACC oxidase genes during low-pH-induced root hair formation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 62, 137-149. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9499-0>
- Wang, N., Lin, Y., Qi, F., Xiaoyang, C., Peng, Z., Yu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Qi, X., Deyholos, M., & Zhang, J. (2022). Comprehensive Analysis of Differentially Expressed Genes and Epigenetic Modification-Related Expression Variation Induced by Saline Stress at Seedling Stage in Fiber and Oil Flax, *Linum usitatissimum* L. *Plants*, 11(15), 2053. <https://doi.org/10.3390/plants11152053>
- Wang, N., Qi, F., Wang, F., Lin, Y., Xiaoyang, C., Peng, Z., Zhang, B., Qi, X., Deyholos, M. K., & Zhang, J. (2023). Evaluation of Differentially Expressed Genes in Leaves vs. Roots Subjected to Drought Stress in Flax (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12019. <https://doi.org/10.3390/ijms241512019>
- Yu, J., Niu, L., Yu, J., Liao, W., Xie, J., Lv, J., Feng, Z., Hu, L., & Dawuda, M. M. (2019). The Involvement of Ethylene in Calcium-Induced Adventitious Root Formation in Cucumber under Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (5), 1047. <https://doi.org/10.3390/ijms20051047>
- Zare, S., Mirlohi, A., Saeidi, G., Sabzalian, M. R., & Ataii, E. (2021). Water stress intensified the relation of seed color with lignan content and seed yield components in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Scientific Reports*, 11(1), 23958. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02604-5>
- Zhao, Y., & Hasenstein, K. H. (2009). Primary root growth regulation: The role of auxin and ethylene antagonists. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 309-320. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9095-6>