



Study of Physiological Traits and Gene Expression Changes in Four Drought Sensitive and Tolerant Genotypes under Water Deficit

Behnam Tahmasebpour¹ | Sodابه Jahanbakhsh ^{✉2} | Ali Reza Tarinejad³ | Hamid Mohammadi⁴ | Ali Ebadi⁵

1. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: b.tahmasebpour@uma.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: jahanbakhsh@uma.ac.ir
3. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. Email: tarinejad@azaruniv.edu
4. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. Email: tarinejad@azaruniv.edu
5. Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: ebadi@uma.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: September 18, 2023

Received in revised form: November 10, 2023

Accepted: November 13, 2023

Published online: June 21, 2024

Keywords:

flowering stage,
Semi-quantitative PCR,
stress tolerance.

ABSTRACT

Drought stress is one of the most important limiting factors for plant growth and soil fertility, which causes crop yield reduction. In order to investigate the relative expression of genes related to drought stress tolerance, four genotypes (including two sensitive and two resistant genotypes to moisture stress) of bread wheat as factor A were subjected to a factorial experiment on basis randomized complete block design with three replications under normal and drought stress at the beginning of flowering stage as factor B in the research farm of Azerbaijan Shahid Madani University. The results of analysis of variance showed a significant difference at least at 1% probability level between drought stress levels according to most studied traits. Based on the results from the comparison of means of traits, the high tolerance of Eroum cultivar to drought stress was due to the higher increase in MDA and H₂O₂ and lower decrease in traits of chlorophyll a, total chlorophyll content, carotenoid content. In addition, the Mihan cultivar was more tolerant to drought stress because of the higher increase of proline, carotenoid, POX, and CAT, due to drought stress. The expression of genes in the examined samples was performed by semi-quantitative polymerase chain reaction in three replicates. Glutathione peroxidase gene (GAPDH) was used as housekeeping gene. Examining the relative expression level of antioxidant genes showed that the high tolerance of Mihan cultivar to drought stress can probably be attributed to the high activity of catalase and ascorbate peroxidase enzymes and the high tolerance of Arum cultivar to the higher activity of antioxidant enzymes proline synthetase, peroxidase and attributed to superoxide dismutase. Considering that the antioxidant genes catalase, ascorbate peroxidase, proline synthetase, peroxidase, and superoxide dismutase in tolerant cultivars showed a significant increase in expression under stress and normal conditions compared to sensitive cultivars under the same stress and normal conditions; so, this genes may induce tolerance to drought stress in plants under stress conditions.

Cite this article: Tahmasebpour, B., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Tarinejad, A., Mohammadi, H., & Ebadi, A. (2024). Study of physiological traits and gene expression changes in four drought-sensitive and tolerant genotypes under water deficit. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 55(2), 13-28. DOI: 10.22059/ijfcs.2023.365057.655028.





بررسی تغییرات صفات فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درگیر در تحمل به تنش خشکی چهار ژنوتیپ گندم نان حساس و متحمل به تنش خشکی

بهنام طهماسب‌پور^۱، سدابه جهانبخش^{۲*}، علیرضا تازی‌نژاد^۳، حمید محمدی^۴، علی عبادی^۵

۱. گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: b.tahmasebpour@uma.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: jahanbakhsh@uma.ac.ir
۳. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران. رایانامه: tarinejad@azaruniv.edu
۴. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ایران. رایانامه: hmohammadi@azaruniv.edu
۵. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: ebadi@uma.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	تنش خشکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان و حاصلخیزی خاک می‌باشد که باعث کاهش محصول در گیاهان زراعی می‌شود. به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تحمل تنش خشکی، چهار ژنوتیپ (شامل دو ژنوتیپ حساس و دو ژنوتیپ مقاوم به تنش رطوبتی) گندم نان به‌عنوان عامل A تحت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط آبیاری نرمال و تنش خشکی در مرحله شروع گلدهی به‌عنوان عامل B در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بررسی شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح تنش خشکی از نظر اکثر صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین صفات، تحمل بالای رقم اروم به تنش خشکی به‌دلیل افزایش بیشتر در صفات مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن برگ و کاهش کمتر در صفات کلروفیل a، محتوای کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید می‌باشد. همچنین تحمل بیشتر رقم میهن به تنش خشکی به دلیل افزایش بیشتر صفات میزان پرولین، کاروتنوئید، پراکسیداز و کاتالاز در اثر اعمال تنش خشکی بود. بیان ژن‌ها در نمونه‌های مورد بررسی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نیمه‌کمی در سه تکرار انجام شد. از ژن گلوکاتایون پراکسیداز (GAPDH) به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که تحمل بالای رقم میهن به تنش خشکی را می‌توان احتمالاً به فعالیت بالای آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و تحمل بالای رقم اروم را به فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پرولین سنتتاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز نسبت داد. با توجه به اینکه ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پرولین سنتتاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در ارقام متحمل، در شرایط تنش و نرمال افزایش بیان معنی‌داری را نسبت به ارقام حساس و در همان شرایط تنش و نرمال از خود نشان دادند، بنابراین این ژن‌ها ممکن است در شرایط تنش باعث القای تحمل به تنش خشکی در گیاه شوند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۱۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۱/۲۵	
کلیدواژه‌ها:	
تحمل به تنش، مرحله گلدهی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیمه-کمی.	

استناد: طهماسب‌پور، ب.، جهانبخش‌گده کهریز، س.، تازی‌نژاد، ع.، محمدی، ح.، و عبادی، ع. (۱۴۰۳). بررسی تغییرات صفت فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درگیر در تحمل به تنش خشکی چهار ژنوتیپ گندم نان حساس و متحمل به تنش خشکی. *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۵ (۲)، ۱۳-۲۸. DOI: 10.22059/ijfcs.2023.365057.655028



۱. مقدمه

گندم مهمترین گیاه زراعی است که حدود ۲۰ درصد از اراضی جهان به کشت آن اختصاص یافته است. مطابق گزارش سازمان خواروبار کشاورزی جهانی (FAO)، مصرف غلات جهان هفت میلیون تن (۰/۳ درصد) افزایش یافته است. همچنین پیش‌بینی شده بود در سال ۲۰۱۸ سطح تولید غلات ایران به ۲۰/۱ میلیون تن برسد که این میزان اندکی بالاتر از تولید ۱۹/۶ میلیون تن آن در سال ۲۰۱۷ و ۱۲ درصد بالاتر از میانگین پنج ساله خود است (FAO, 2018). گندم مورد نیاز برای تامین غذا در سال ۲۰۲۰ به ۱۴۵ مگاتن رسیده است که شیب رشد آن نسبت به دهه گذشته، آهسته‌تر است (FAO, 2011-2020).

تنش خشکی هرساله خسارت فراوانی را در محصولات زراعی ایجاد می‌کند و موجب کاهش ۱۷ درصدی عملکرد می‌شود (Hadi *et al.*, 2016). برای غلبه بر تنش خشکی، گیاهان پاسخ‌های گوناگونی از قبیل تولید اسمولایت (Osmolyte) برای تنظیم اسمزی و تغییر در بیان پروتئین‌ها را نشان می‌دهند (Bohnert & Jensen, 1996) که نحوه سازوکار فیزیولوژیکی گیاهان در شرایط تنش را تغییر می‌دهند (Tamura *et al.*, 2003). در زمان رویارویی با تنش، گیاهان از مکانیسم‌های متفاوتی جهت جابجایی گونه‌های اکسیژن فعال و حفاظت خود در برابر اثرات منفی این گونه‌ها استفاده می‌کنند (Ahmadi *et al.*, 2018). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده در طی تنش خشکی، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالاتری هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) است و سیستم غیر آنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها، مانیتول‌ها و پلی‌فنل‌ها) می‌باشد (Blokhin *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2014; Fita *et al.*, 2015). گیاهان از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برای افزایش تحمل در برابر تنش اکسیداتیو استفاده می‌کنند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها (نظیر آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) تحت تنش افزایش می‌یابد که نمایانگر مقاومت گیاه در مقابل تنش است (Parida & Das, 2005). Movludi *et al.* (2014) در مطالعه اثرات کمبود آب و نیتروژن روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکرد دانه جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنیل‌اکسیداز در شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد.

تنش آبی سطوح پروتئینی گیاهان را تحت تاثیر قرار داده و نتایج ضد و نقیضی را به همراه داشته است؛ به طوری که برخی کاهش و گروهی افزایش در سطوح پروتئینی را تحت تنش آبی گزارش کرده‌اند (Tod & Basler, 1965; Svensson *et al.*, 2002; Marian *et al.*, 2003). مشخص شده است که تحت تنش خشکی میزان پروتئین متصل‌شونده به رویسکو کاهش می‌یابد (Aranjuelo *et al.*, 2011). از طرف دیگر، تحت تنش کمبود آب انجام پاسخ به تنش از نظر پروتئین‌ها دارای تنوع می‌باشد و برخی پروتئین‌ها تنها در رقم متحمل دیده می‌شوند و پروتئین‌های مشترک نیز بین ارقام متحمل و حساس دارای تغییر در نوع بیان هستند (Riccardi *et al.*, 2004). علاوه بر این ارقام متحمل‌تر به تنش خشکی، دارای فعالیت بهتر کنترل روزنه‌ای هستند که این امر تحت تاثیر بیان یکسری پروتئین‌های خاص انجام می‌شود و در مجموع به این ارقام اجازه تثبیت کربن در شرایط تنش، بهبود کارایی مصرف آب و فعالیت فتوسنتزی را می‌دهد (Yordanov *et al.*, 2000).

خشکی باعث تجمع گروه پیچیده‌ای از پروتئین‌ها می‌شود که از سلول‌ها در برابر خسارت‌های ناشی از آن حفاظت می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل چاپرون‌ها، LEAs (Late embryogenesis abundant) و بازدارنده پروتئین‌های عمل‌کننده (تقاطع‌ی) (Interceptor proteinase) هستند. اگرچه بخش عمده‌ای از پروتئین‌های درگیر هنوز ناشناخته هستند (Bohnert & Jensen, 1996; Wang *et al.*, 2004).

مطالعاتی که به منظور درک مکانیسم پاسخ به تنش خشکی انجام می‌شود، در راستای توسعه ارقام متحمل گندم به تنش خشکی است. گیاهان به منظور رهایی از شرایط نامطلوب رشد، حفظ هموستازی، سم‌زدایی عناصر مضر و بازیابی رشد، اقداماتی در سطوح فیزیولوژیکی و مولکولی را به اجرا می‌گذارند (Rampino *et al.*, 2006). با این وجود دانش حاضر در مورد ژن‌های درگیر در مکانیسم پاسخ به تنش خشکی هنوز دارای محدودیت‌هایی است (Bray, 2002). ترنسکریپتومیکس، پروتئومیکس و مطالعات بیان ژن، فعالیت و تنظیم نسخه‌ها و پروتئین‌های متعدد وابسته به تنش را تنظیم می‌کند (Blomqvist *et al.*, 2006). پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای تفکیک بافت‌های پروتئینی و روشی مناسب برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌ها و تغییرات محیطی

به حساب می‌آید (Tamura *et al.*, 2003; Zang & Komatsu, 2007). با استفاده از پروتئومیکس می‌توان اثر تنش‌های غیر زیستی از جمله کمبود آب، شوری و دماهای بالا و پایین را با اطمینان کافی بررسی کرد (Zang & Komatsu, 2007). این رهیافت امکان تشخیص ژن‌های جدید را در شرایط محیطی مختلف فراهم می‌کند. تجزیه پروتئوم، روشی مستقیم برای تشخیص عمل ژن‌ها است و تجزیه و تحلیل ارتباط پروتئوم با اطلاعات توالی ژنوم، در ژنومیک کاربردی یک راهبرد باارزش محسوب می‌شود (Komatsu & Tanaka, 2004). در این راستا تجزیه و تحلیل پروتئینی روشی مستقیم برای تشخیص فعالیت ژن‌ها محسوب می‌شود و تجزیه ارتباط پروتئوم با اطلاعات توالی ژنوم راهبرد مهمی برای ژنومیکس کاربردی به شمار می‌آید (Komatsu & Tanaka, 2004).

گزارش‌ها نشان می‌دهد سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های خویشاوندی گندم در پاسخ به شرایط تنش خشکی شدید وجود دارد (Byrt *et al.*, 2014; Warschefsky *et al.*, 2014; Masoomi-Aladizgeh *et al.*, 2015; Pour-Aboughadareh *et al.*, 2017)؛ از این‌رو هدف از انجام این تحقیق، بررسی اهمیت نسبی صفات فیزیولوژیکی مؤثر بر عملکرد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و بررسی بیان برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درگیر در تحمل به تنش خشکی در ارقام متحمل و حساس به تنش خشکی بود.

۲. روش‌شناسی پژوهش

به‌منظور بررسی صفات فیزیولوژیکی مؤثر بر عملکرد دانه و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تحمل به تنش خشکی، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (واقع در ۳۵ کیلومتری جاده تبریز- مراغه با عرض جغرافیایی $37^{\circ}46'59''$ شمالی و طول جغرافیایی $45^{\circ}54'14''$ شرقی و ارتفاع ۱۳۱۸ متر از سطح دریای آزاد با اقلیم نیمه‌خشک با زمستان‌های سرد و یخبندان) تحت شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی در زمان گلدهی به‌عنوان فاکتور B، با ۴ ژنوتیپ گندم نان (جدول ۱) به‌عنوان فاکتور A تحت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در این بررسی ارقام میهن، اروم به‌عنوان ژنوتیپی که تا حدودی به تنش خشکی در مرحله شروع گلدهی در مناطق سرد متحمل است، در آزمایش‌ها گنجانده شد.

جدول ۱. شجره ارقام مورد مطالعه.

Row	Genotypes	Pedigree	Reaction to drought stress
1	Mihan	87Zhong-90/Bkt	tolerance
2	Eroum	Her/Alvand//NS732	tolerance
3	C-93-4	Nwau15/Attila//Shark/F4105W2.1	susceptible
4	C-93-11	Gul96/Shark-1	susceptible

دکدهای C-93 مربوط به ژنوتیپ‌های آزمایش یکنواخت سراسری URWYT سال ۱۳۹۳ مناطق سرد می‌باشند.

عملیات آماده‌سازی زمین، شامل انجام شخم، دیسک، تسطیح و ایجاد فارو در قطعه مورد نظر انجام شد. عمق کاشت بذور دو تا سه سانتی‌متر در نظر گرفته شد. هر تکرار شامل هشت کرت بود. در هر کرت چهار ردیف از هر ژنوتیپ در عمق دو تا سه سانتی‌متر کاشته شد. طول خطوط کاشت دو متر، فاصله بین بذور دو سانتی‌متر و فاصله خطوط کاشت ۱۷ سانتی‌متر منظور شد. آبیاری مزرعه یک نوبت در پاییز بعد از کاشت انجام شد. در فصل بهار و تابستان، آبیاری در هر دو شرایط فاقد و واجد تنش تا مرحله گلدهی به‌صورت یکسان و با دور آبیاری ۱۰ روزه انجام شد و در زمان اجرای تنش در کرت‌های تحت تنش رطوبتی گلدهی، قطع آبیاری از مرحله گلدهی تا انتهای دوره رشد گیاه اعمال شد. با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Mosadeghi *et al.*, 2009)، میزان ظرفیت زراعی مزرعه تعیین و بر اساس آن تنش اعمال شد. نمونه‌های خاک در داخل دستگاه اشباع شده و مکش مورد نظر بر آنها اعمال شد. پس از برقراری تعادل رطوبتی (با گذشت ۲۴ ساعت)، درصد رطوبت نمونه‌ها با استفاده از آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن احتمال بارندگی از پوشش نایلونی برای جلوگیری از نفوذ آب به تیمارهای تحت تنش استفاده شد. عملکرد دانه در یک متر مربع از هر کرت تعیین شد.

۱-۲. بررسی صفات فیزیولوژیکی درگیر در تحمل به تنش خشکی

نمونه‌برداری از چهار رقم انجام و نمونه‌ها با انجماد سریع در ازلت مایع و انتقال به فریزر -70°C تا زمان استفاده نگهداری شدند. صفات مقدار کلروفیل a, b و مقدار کلروفیل کل، محتوای پروکلین برگ، غلظت کاروتنوئید برگ، محتوای پروتئین محلول، غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، مقدار پراکسید هیدروژن برگ (H_2O_2)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) اندازه‌گیری شدند. جهت تعیین غلظت پروتئین از روش Bradford (1976) استفاده شد. فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Chance & Maehly (1955) صورت گرفت. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Kar & Mishra (1976) استفاده شد. میزان پروکلین برگ با استفاده از روش Bates *et al.* (1973) اندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ با استفاده از روش Arnon (1976) اندازه‌گیری شد.

۲-۲. بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درگیر در تحمل به تنش خشکی

نمونه‌برداری از چهار رقم (دو رقم حساس و دو رقم مقاوم به تنش رطوبتی) انجام شد و نمونه‌ها با انجماد سریع در ازلت مایع و انتقال به فریزر -70°C تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. بررسی الگوی بیان ژن‌ها در نمونه‌های مورد بررسی با روش پی‌سی‌آر نیمه‌کمی در سه تکرار انجام شد. استخراج RNA کل از ریشه و سرشاخه‌ی نمونه‌های گیاهی با استفاده از کیت RNax plus انجام شد. به منظور تأیید کیفیت RNA استخراجی چهار میلی‌لیتر از نمونه روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. همچنین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Eppendorf BioPhotometer Plus جذب نمونه‌ها در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. نمونه مطلوب دارای نسبت طول موجی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۷ تا ۲ می‌باشد. از آنجایی که احتمال دارد نمونه‌های RNA استخراج‌شده به DNA ژنومی آلودگی داشته باشند از آنزیم *DNaseI* جهت رفع آلودگی استفاده شد. از ژن گلوکاتایون پراکسیداز (GAPDH) به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer premier5 انجام گرفت و ویژگی‌های از جمله تشکیل دایمر آغازگر، هترودایمر آغازگر رفت و برگشت، تشکیل ساختار سنجاق‌سری، تکثیر قطعات ناخواسته (False priming) مورد مطالعه و با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Primer Blast اختصاصی بودن قطعات تکثیری برای هر کدام از ژن‌ها به‌طور مجزا مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی در جدول ۲ درج شده است.

جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده.

Gene name	Primer sequence ('3-'5)	Melting temperature (°C) (Tm)	Amplified product size
CAT	F: AGGCTCACCTGGTAAAGTTC	57	248
	R: CAGTGGGATGATGTCTCTG		
POX	F: CCAGCACGACACGTGAATG	60	101
	R: CATGATTTGCTGCTGCTCGTA		
P5CS	F: ACAGAGATAAAGTAGCAGAGAC	57	166
	R: AGACCTTCAACACCCACAG		
PPO	F: GCGACACCAGCTTCGTCTTC	61	230
	R: GTACTCCTTCCGCCCCTTCTT		
SOD	F: CAG AGG GTG CTG CTT TAC AA	59	107
	R: GGT CAC AAG AGG GTC CTG AT		
APX	F: CAAGGCTCTGACCACCTCAG	60	101
	R: CATCTTCCCAGGGTGTGACC		
GAPDH	F: CGGAAAGTTGACTGGAATGG	61	202
	R: GGACCTGTTGTCACCCTGAA		

F (Forward): جلور، R (Reverse): برگشتی.

۳-۲. ساخت DNA مکمل تک‌رشته‌ای

با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون و RNAهای استخراج‌شده، cDNA تک‌رشته‌ای طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. ترکیبات واکنش RT-PCR و چرخه زمانی واکنش برای تکثیر قطعات در جدول ۳ درج شده است. میانگین Ct ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای مختلف در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۳. چرخه زمانی واکنش RT-PCR برای تکثیر قطعات مورد نظر.

Stage	Cycle number	Time (min)	Temperature (°C)
Initial denaturation	1	2	94
Denaturation	1	1	94
Annealing	35	45	58-60
Extension	1	1	72
Final Elongation	1	10	72

جدول ۴. میانگین Ct ژن‌های مورد مطالعه در ارقام مختلف گندم.

SOD					APX				
	C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum		C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum
Ct of stress	20.01	16.03	25.165	20.78	Ct of stress	18.29	16.2	22.4	21.28
Ct of normal	24.675	20.215	29.015	24.17	Ct of normal	21.89	21.27	26.26	23.955
POX					GAPDH				
	C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum		C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum
Ct of stress	19.025	22.94	22.445	19.825	Ct of stress	23.13	25.655	27.35	26.23
Ct of normal	25.22	26.01	25.965	23.68	Ct of normal	26.805	28.915	29.8	29.11
PPO					CAT				
	C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum		C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum
Ct of stress	25.65	25.445	23.435	20.28	Ct of stress	25.815	20.615	22.365	21.745
Ct of normal	25.985	25.6	23.34	23.205	Ct of normal	27.965	26.185	26.23	24.38
P5CS									
	C-93-4	C-93-11	Mihan	Eroum					
Ct of stress	27.16	24.795	25.47	26.685					
Ct of normal	30.975	28.98	29.92	29.78					

در نهایت بیان نسبی ژن مورد نظر نسبت به ژن خانه‌دار نرمال شده سپس با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مقدار Fold Change هر ژن تحت شرایط نرمال و تنش محاسبه شد. سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارهای تحت تنش نسبت به شرایط نرمال محاسبه و به صورت نمودار ستونی ترسیم شد (Livak & Schmittgen, 2001).

برای مقایسه بیان ژن بین تیمارهای تنش خشکی و شاهد و بین ارقام حساس به تنش و متحمل به تنش خشکی از برنامه اکسل ۲۰۱۷ استفاده شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین برای داده‌های بیان ژن به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد برای سه تکرار بیولوژیک با استفاده از برنامه SPSS 23 انجام شد. به منظور مقایسه ژنوتیپ‌های مورد آزمایش تجزیه واریانس به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی برای کلیه صفات فیزیولوژیکی انجام شد. مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی و عملکرد دانه با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت.

۳. نتایج پژوهش و بحث

۳-۱. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و اثر متقابل این دو عامل بر اکثر صفات مورد ارزیابی معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات مربوط به ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش و اثر متقابل ژنوتیپ \times تنش در جداول ۶، ۷ و ۸ درج شده است. تحت شرایط نرمال و تنش خشکی، ژنوتیپ میهن بیشترین کلروفیل b و ژنوتیپ اروم کمترین آن را به خود اختصاص دادند (جدول ۶). از لحاظ غلظت کلروفیل a و کلروفیل کل، ژنوتیپ میهن در شرایط نرمال بیشترین مقدار (۰/۴۹) را به خود اختصاص داد (جدول ۸). بررسی روند تغییرات غلظت کلروفیل a و کلروفیل کل از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که این تغییرات در ارقام مورد بررسی روند کاهشی دارد (جدول ۸). به نظر می‌رسد کاهش غلظت کلروفیل در اثر تنش شدید خشکی می‌تواند ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول باشد که این رادیکال‌ها موجب پراکسیداسیون و تجزیه این رنگدانه‌ها می‌شوند (Schutz & Fangmeir, 2001)؛ همچنین این موضوع نشان می‌دهد که این گیاه برای حفظ آب، تعرق را کاهش داده و به همین دلیل فتوسنتز نیز در تیمار تحت تنش به حداقل رسیده است. دوام فتوسنتز و حفظ

کلروفیل برگ تحت شرایط تنش از جمله شاخص‌های فیزیولوژیکی مقاومت به تنش است. تنش خشکی باعث تولید اکسیژن فعال همراه با کاهش و تجزیه کلروفیل می‌شود. در برخی پژوهش‌ها گزارش‌های ضد و نقیضی درباره اثر تنش خشکی روی غلظت کلروفیل ارائه شده است. Sheteawi & Tawfik (2007) بیان کردند که افزایش تنش خشکی منجر به افزایش کلیه رنگدانه‌های فتوسنتزی در ماش شده است. Nikolaeva *et al.* (2010) گزارش کردند که تنش خشکی منجر به افزایش محتوای کلروفیل می‌شود. علت افزایش محتوای کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی، کوچک‌تر شدن سلول‌های برگ به علت کاهش سطح برگ و ضخیم‌شدن آن‌ها گزارش شده است (Darvishi-Baloochi *et al.*, 2010).

نتایج بررسی روند تغییرات محتوای کاروتنوئید از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که این تغییرات در ارقام اروم و c-93-11 سیر نزولی و در ارقام میهن و c-93-4 سیر صعودی دارد (جدول ۸). ژنوتیپ میهن در شرایط تنش خشکی بیشترین غلظت کاروتنوئید را داشت که غلظت آن حدود دو برابر شرایط نرمال بود.

تحت شرایط تنش خشکی ژنوتیپ‌های میهن و c-93-11 بیشترین پرولین را به خود اختصاص دادند (جدول ۸). بررسی روند تغییرات محتوای پرولین از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که این تغییرات در چهار رقم مورد بررسی سیر صعودی دارد (جدول ۸). افزایش پرولین در گیاه هنگام تنش، نوعی مکانیسم دفاعی است. پرولین از طریق تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پاک‌کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، تحمل گیاه را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Kuznetsov & Shevyankova, 1997). تحت شرایط نرمال ژنوتیپ اروم بیشترین محتوای پروتئین را به خود اختصاص داد، اما در شرایط تنش خشکی ژنوتیپ c-93-4 دارای کمترین محتوای پروتئین بود (جدول ۸). نتایج بررسی روند تغییرات پروتئین از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که این تغییرات در ارقام اروم و c-93-4 روند نزولی و در ارقام میهن و c-93-11 روند صعودی دارد (جدول ۸). در شرایط تنش خشکی ژنوتیپ c-93-11 بیشترین پراکسیداز را به خود اختصاص داد، در صورتی که در شرایط نرمال ژنوتیپ‌های میهن و c-93-11 دارای کمترین پراکسیداز بودند (جدول ۸). نتایج بررسی روند تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که با اعمال تنش خشکی، فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند؛ به‌طوری‌که کمترین فعالیت این آنزیم در شرایط بدون تنش به‌دست آمد (جدول ۸). تحت شرایط تنش خشکی ژنوتیپ c-93-4 بیشترین محتوای مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن برگ و ژنوتیپ اروم بیشترین مالون‌دی‌آلدهید را به خود اختصاص دادند (جدول ۸). نتایج بررسی روند تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن برگ از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که این تغییرات در چهار رقم مورد بررسی سیر صعودی دارد (جدول ۸).

تحت شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ‌های c-93-11 و اروم به‌ترتیب بیشترین و کمترین کاتالاز را به خود اختصاص دادند (جدول ۸). بررسی روند تغییرات آنزیم کاتالاز از شرایط نرمال به تنش خشکی نشان می‌دهد که با اعمال تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مورد بررسی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (جدول ۸).

بر اساس شاخص‌های STI، GMP و MP ژنوتیپ‌های میهن و اروم به‌عنوان متحمل‌ترین و ژنوتیپ‌های c-93-11 و c-93-4 به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ ارزیابی شدند (جدول ۶). تحت شرایط نرمال ژنوتیپ‌های میهن و اروم (به‌ترتیب با میانگین‌های ۳۸۹/۷۶ و ۳۸۵/۵۹ گرم در متر مربع) بیشترین و ژنوتیپ c-93-4 (با میانگین ۲۴۳/۶۷ گرم در متر مربع) کمترین عملکرد دانه را به خود اختصاص دادند، در صورتی که تحت شرایط تنش گلدهی، ژنوتیپ میهن (با میانگین ۲۳۲/۷۰ گرم در متر مربع) بیشترین و ژنوتیپ c-93-4 (با میانگین ۱۲۷/۸۶۰ گرم در متر مربع) کمترین عملکرد دانه را دارا بودند، بنابراین بیشترین و کمترین عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش گلدهی به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های میهن و c-93-4 بود (جدول ۸).

جدول ۵. تجزیه واریانس صفات مختلف تحت تأثیر ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی.

S.O.V	Mean of Squares											
	df	Carotenoid content	Proline content	Protein content	Peroxidase content	MDA	H ₂ O ₂ content	Catalase content	Grain yield	Chl b content	Chl a content	Total Chl content
Replication	2	0.023	11.475 *	1.155 *	0.014 **	0.281	0.004	0.048	7075.122	0.020	0.0001	0.003
Genotype (G)	3	0.134 *	100.953 **	1.670 **	0.083 **	4.464 **	1.076 **	85.626 **	7682.015 **	0.145 **	0.054 **	0.132 **
Stress (S)	1	0.063	1386.331 **	0.834	1.202 **	27.985 **	9.041 **	362.828 **	61927.74 **	0.007	0.127 **	0.442 **
G*S	3	0.131 *	81.656 **	4.685 **	0.207 **	2.74 **	0.698 **	40.33 **	3073.119 **	0.005	0.016 **	0.082 **
Error	14	0.031	1.846	0.218	0.002	0.196	0.008	1.653	5093.82	0.011	0.001	0.004
CV (%)		33	10.20	3.24	4.85	30.04	9.52	11.14	43.53	46.33	12.07	14.28

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد هستند.

جدول ۶. مقایسه میانگین صفات مربوط به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گندم نان.

Reaction of cultivars to drought stress	Genotype	Chlb content (mg.g FW)	STI	GMP	MP
Tolerant	Mihan	0.427 ^a	0.817	301.158	311.229
Tolerant	Eroum	0.064 ^c	0.486	232.265	262.748
Susceptible	C-93-4	0.261 ^b	0.281	176.511	185.766
Susceptible	C-93-11	0.158 ^{bc}	0.434	219.448	224.116

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

جدول ۷. مقایسه میانگین صفات مربوط به سطوح تنش رطوبتی.

Stress level	Chlb content (mg.g FW)
Normal	0.245 ^a
Stress	0.210 ^a

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

جدول ۸. مقایسه میانگین صفات مربوط به اثرات متقابل ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش خشکی.

Genotype	Stress level	Chl content (d)	Total Chl content (d)	Carotenoid content (d)	Proline content (c)	MDA (b)	H ₂ O ₂ content (c)	Catalase content (a)	Grain yield (g.m ⁻²)
Eroum	Normal	0.222 ^c	0.285 ^{cd}	0.489 ^b	4.422 ^c	0.594 ^{bcd}	0.341 ^{ef}	4.893 ^e	385.585 ^a
	Stress	0.140 ^e	0.205 ^d	0.421 ^b	14.649 ^b	3.613 ^a	2.052 ^b	9.066 ^d	139.910 ^f
Mihan	Normal	0.485 ^a	0.901 ^a	0.472 ^b	6.222 ^c	0.181 ^d	0.261 ^f	8.573 ^d	389.760 ^a
	Stress	0.227 ^c	0.299 ^{cd}	0.996 ^a	27.579 ^a	1.084 ^{bc}	1.015 ^c	16.413 ^b	232.698 ^d
C-93-11	Normal	0.431 ^b	0.620 ^b	0.454 ^b	6.003 ^c	0.277 ^{cd}	0.257 ^f	8.503 ^d	269.623 ^b
	Stress	0.229 ^c	0.354 ^c	0.323 ^b	27.682 ^a	1.394 ^b	0.794 ^d	23.59 ^a	178.610 ^e
C-93-4	Normal	0.199 ^{cd}	0.508 ^b	0.487 ^b	6.245 ^c	0.523 ^{cd}	0.444 ^e	8.643 ^d	243.673 ^c
	Stress	0.159 ^{de}	0.371 ^c	0.573 ^b	13.784 ^b	4.122 ^a	2.351 ^a	12.648 ^c	127.86 ^g

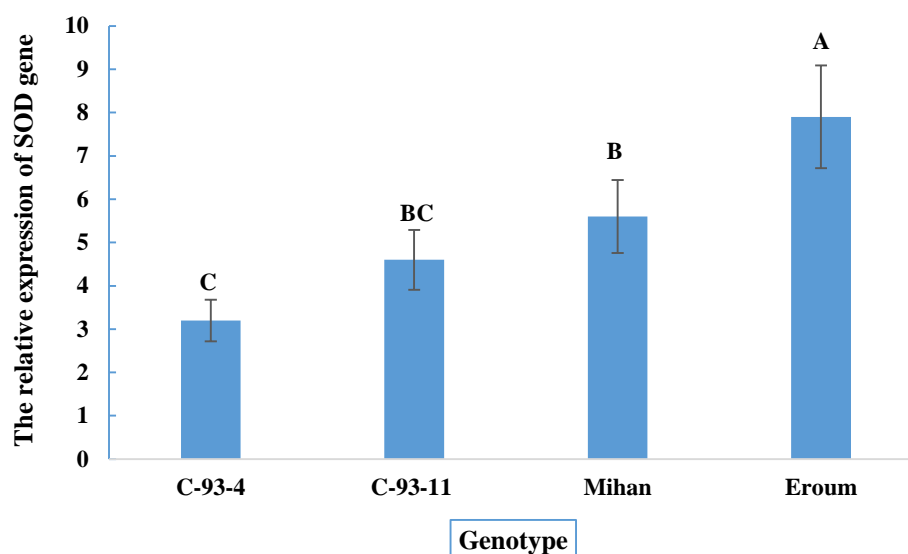
حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

۲-۳. بیان نسبی ژن سوپراکسیددیسموتاز

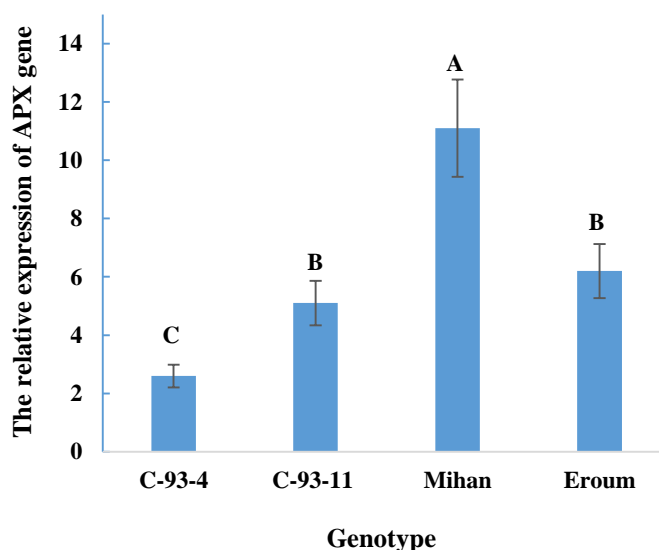
یکی از مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی سوپراکسیددیسموتاز (SOD) می‌باشد. بسیاری از پژوهشگران آن را قویترین آنتی-اکسیدان شناخته شده می‌دانند که می‌تواند بسیاری از گیاهان را در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایمن نگه دارد و سبب پایداری گیاه در برابر بسیاری از تنش‌های محیطی شود (Mittler, 2002). میزان تغییرات نسبی بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز (SOD) تحت تنش خشکی نسبت به شاهد در دو رقم متحمل اروم و میهن بیشترین مقدار و در رقم C-93-4 کمترین مقدار بود و رقم C-93-11 از نظر این صفت تفاوت معنی‌داری با رقم میهن و C-93-4 نداشت (شکل ۱). با توجه به اینکه تعداد زیادی از مطالعات، رابطه مثبت بین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و تحمل در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی را نشان می‌دهند (Gill & Tuteja, 2010). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزایش کارایی ارقام متحمل در مقایسه با ارقام حساس در شرایط تنش مرتبط با افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز باشد. گزارش شده تنش خشکی در ارقام مختلف گندم سبب بالا رفتن بیشتر سوپراکسیددیسموتاز می‌شود (Kar, 2011) که موافق با نتایج تحقیق می‌باشد. مطالعات نشان داده است که در گیاهچه‌های برنج میزان بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز در شرایط تنش اسمزی بسیار بیشتر از شرایط عدم تنش بوده است (Sharma et al., 2015).

۳-۳. بیان نسبی ژن آسکورات پراکسیداز

آسکورات پراکسیداز گرانش بالایی به H₂O₂ دارد و قادر است در غلظت‌های کم، H₂O₂ را سم‌زدایی کند (Gupta, 2011). از آنجایی که آسکورات پراکسیداز باعث حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، بالاتر بودن فعالیت این آنزیم به معنی حذف بیشتر رادیکال‌های اکسیژن و در نتیجه آن کاهش مرگ سلولی و افزایش مقاومت به خشکی است (Akhila et al., 2008). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، آسکورات پراکسیداز در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند. میزان تغییرات نسبی بیان ژن آسکورات پراکسیداز (APX) تحت تنش خشکی نسبت به شاهد در رقم متحمل میهن بیشترین و در رقم C-93-4 کمترین مقدار بود. ارقام اروم و C-93-4 از لحاظ مقدار این صفت حد واسط بوده و اختلاف معنی‌داری با دو رقم میهن و C-93-4 داشتند (شکل ۲). بنابراین احتمالاً می‌توان تا حدودی عملکرد بالای رقم میهن را تحت شرایط تنش نسبت به سایر ارقام، به فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سکورات پراکسیداز نسبت داد.



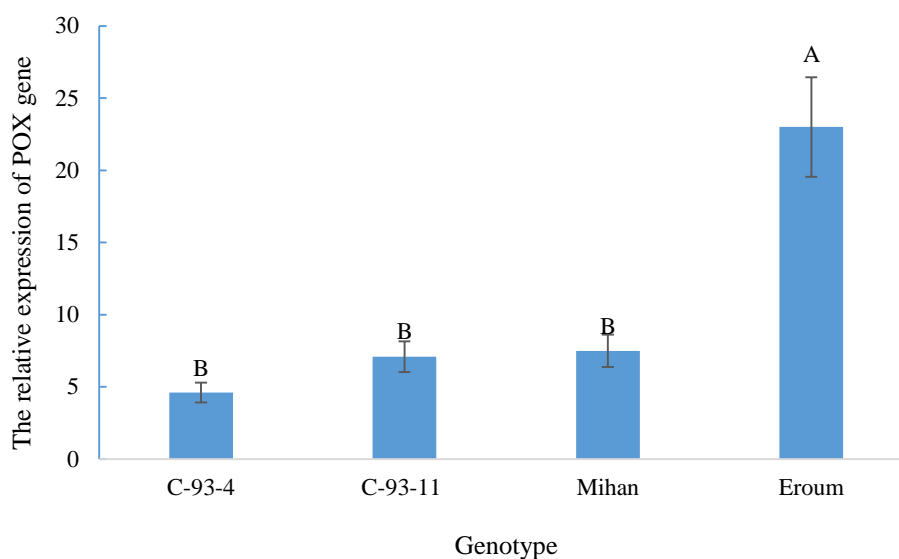
شکل ۱. بیان نسبی ژن سوپرااکسیددیسموتاز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.



شکل ۲. بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

۳-۴. بیان نسبی ژن پراکسیداز

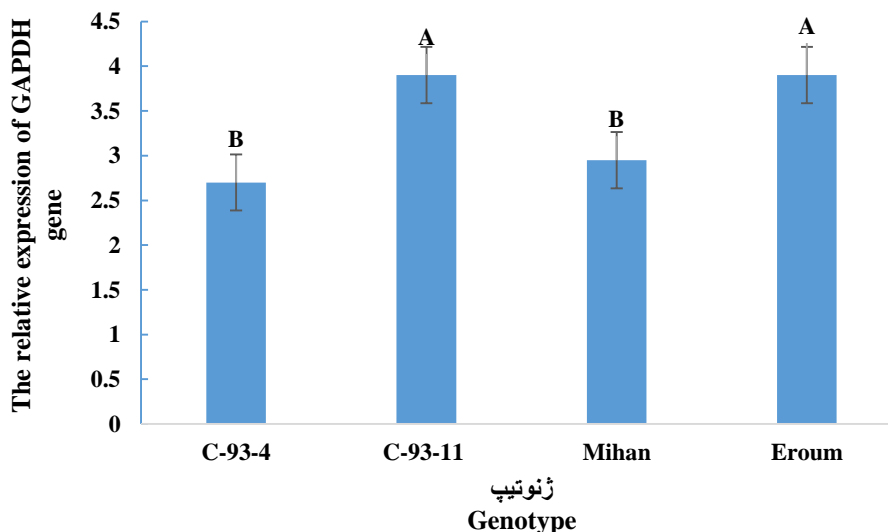
پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی، اسیدآسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم c کاتالیز کرده و به‌عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (Hashemi *et al.*, 2015). یکی از دلایل افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز این است که آنزیم پراکسیداز با واکنش‌های اکسند به‌وجودآورنده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و پراکسیداز نقش مؤثری در پاکسازی پراکسید هیدروژن دارد (Sofa *et al.*, 2010). میزان تغییرات نسبی بیان ژن پراکسیداز (POX) تحت تنش خشکی نسبت به شاهد در رقم متحمل اروم بیشتر از سایر ارقام بود (شکل ۳). بنابراین احتمالاً می‌توان تا حدودی عملکرد بالای رقم اروم و تحمل به تنش خشکی آن را تحت شرایط تنش نسبت به سایر ارقام، به فعالیت بیش از حد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز نسبت داد.



شکل ۳. بیان نسبی ژن پراکسیداز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

۳-۵. بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز

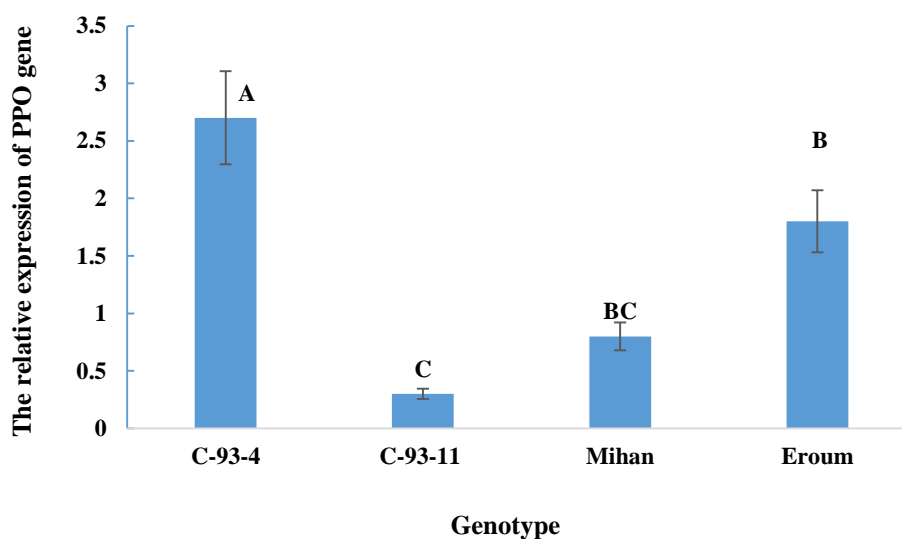
میزان تغییرات نسبی بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز (GAPDH) در ارقام اروم و C-93-11 تحت شرایط تنش نسبت به شاهد بیشترین و در دو رقم متحمل و حساس میهن و C-93-4 کمترین میزان بود و این موضوع نشان‌دهنده این است که مکانیسم تحمل به تنش این ارقام احتمالاً به سایر آنزیم‌ها بستگی دارد (شکل ۴).



شکل ۴. بیان نسبی ژن گلوتاتیون پراکسیداز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

۳-۶. بیان نسبی ژن پلی‌فنل اکسیداز

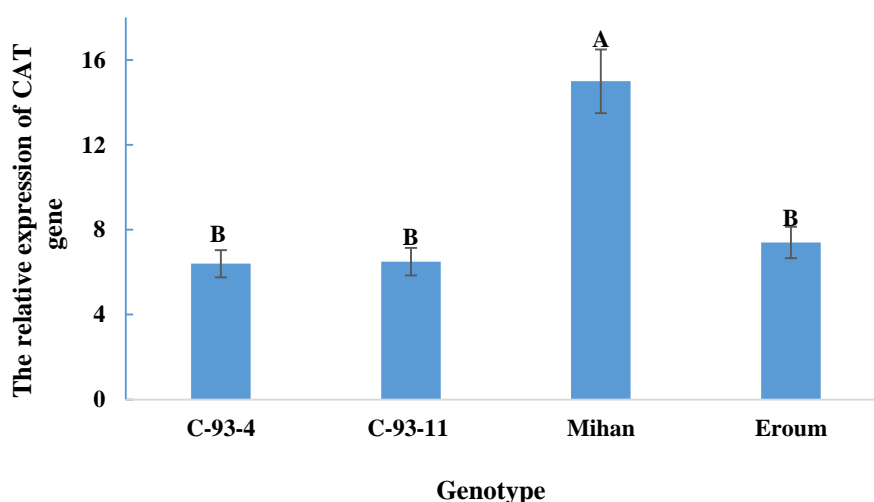
میزان تغییرات نسبی بیان ژن پلی‌فنل اکسیداز (PPO) در رقم C-93-4 تحت تنش نسبت به شاهد بیشتر از سایر ارقام می‌باشد (شکل ۵). میزان این صفت در رقم حساس C-93-11 کمترین مقدار و اختلاف معنی‌داری با رقم متحمل اروم داشت، ولی با رقم متحمل میهن اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۵). از آنجایی که هم شرایط رشد (مانند بروز تنش) و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی‌فنل اکسیداز تأثیرگذار می‌باشد (Thipyapong *et al.*, 2004)، می‌توان تفاوت ژنوتیپ‌ها در میزان فعالیت این آنزیم را تحت شرایط نرمال و تنش توجیه کرد.



شکل ۵. بیان نسبی ژن پلی فنل اکسیداز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

۷-۳. بیان نسبی ژن کاتالاز

آنزیم کاتالاز (CAT) نیز یکی از مهمترین آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که با افزایش تنش خشکی در گیاهان مختلف از جمله جو افزایش می‌یابد (EL-Tayeb, 2005). کاتالاز آنزیمی است که پراکسید هیدروژن تولید شده در مسیرهای تنفس نوری داخل پراکسیزوم‌ها را مهار می‌کند (Mittler, 2002) و مسئول سم‌زدایی سطوح افزایش یافته H_2O_2 می‌باشد (Gupta, 2011). میزان تغییرات نسبی بیان ژن کاتالاز تحت تنش خشکی نسبت به شاهد، در رقم متحمل میهن بیشترین مقدار و از ارقام دیگر تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۶). بنابراین می‌توان تا حدودی عملکرد بالای رقم میهن تحت شرایط تنش را نسبت به دو ارقام دیگر، به فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز نسبت داد. طبق نتایج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نقش قابل توجهی در تعیین پاسخ ژنوتیپ‌های گندم به تنش خشکی ایفا می‌کنند (Abedi & Pakniyat, 2010; Yang & Deng, 2015) که موافق با نتایج این پژوهش است.

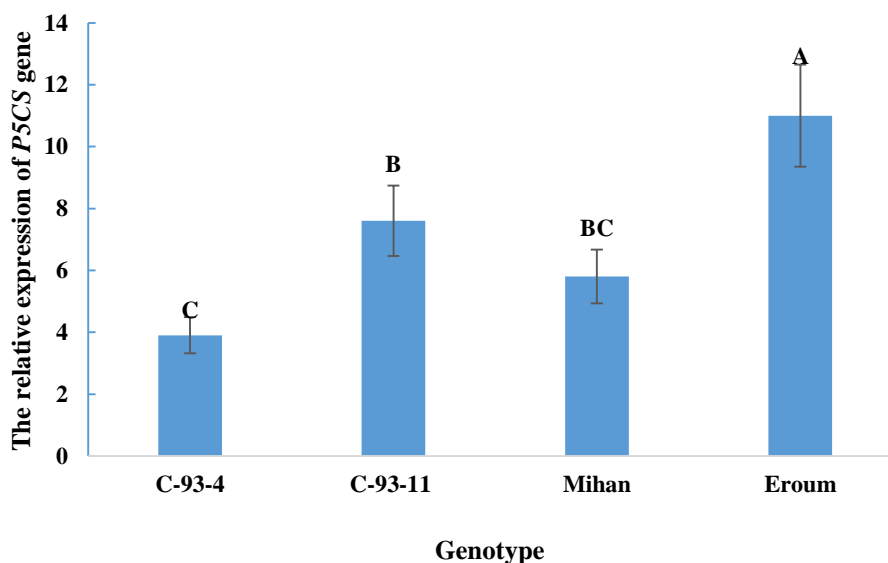


شکل ۶. بیان نسبی ژن کاتالاز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

۸-۳. بیان نسبی ژن پرولین سنتتاز

ژن پرولین سنتتاز (P5CS) جزء اصلی در بیوسنتز و تجمع پرولین را کد می‌کند. مطالعات زیادی همبستگی مثبت تجمع پرولین با

سازگاری گیاهان به تنش خشکی را بیان می‌کند (Garaghanipur *et al.*, 2014; Farooq *et al.*, 2017). میزان تغییرات نسبی بیان ژن پرولین‌سنتتاز در رقم متحمل اروم بیشترین مقدار و در رقم حساس C-93-4 کمترین مقدار بود. از لحاظ این صفت رقم میهن اختلاف معنی‌داری با رقم C-93-11 نداشت (شکل ۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزایش کارایی رقم متحمل اروم در مقایسه با سایر ارقام در شرایط تنش احتمالاً مرتبط با افزایش فعالیت ژن پرولین‌سنتتاز باشد. پرولین نقش محافظتی در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داشته و باعث پایداری ماکرومولکول‌ها (مانند پروتئین و نوکلئیک‌اسید) و ایفای نقش تأمین منبع کربن و نیتروژن تحت تنش خشکی می‌شود (Giri, 2011; Marček *et al.*, 2019). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده تمامی ارقام از انباشت پرولین‌سنتتاز به عنوان یک واکنش حفاظتی در برابر تنش خشکی استفاده کردند، ولی سرعت واکنش و تجمع پرولین در هر رقم متفاوت و تعیین‌کننده سطح تحمل به خشکی آن رقم بود. نتایج این آزمایش موافق با یافته‌های سایر محققان (Vendruscolo *et al.*, 2007) در گیاه گندم بود. افزایش بیان ژن P5CS برای بالارفتن سطح پرولین در گیاه سیب زمینی با افزایش روزهای تنش اسمزی گزارش شده است (Kishor, 1995). بر اساس این پژوهش می‌توان اظهار داشت که محتوای پرولین‌سنتتاز و بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط شاهد تغییرات قابل توجهی را نشان دادند. تنش خشکی سبب القای بیان ژن پرولین-سنتتاز (P5CS) و افزایش سطح پرولین‌سنتتاز در همه ارقام شد. بنابراین، می‌توان از میزان بیان ژن P5CS تحت شرایط تنش به‌عنوان یک شاخص در برنامه‌های اصلاحی جهت انتخاب ارقام متحمل به خشکی استفاده شود و از این نتایج در اصلاح مولکولی گیاه گندم بهره برد. در تحقیقی دیگر بیان ژن کلیدی دخیل در متابولیسم پرولین (P5CS) در برگ‌ها و جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آنها نشان داد که در نتیجه تنش خشکی ژن P5CS افزایش معنی‌داری پیدا کرد (Garaghanipur *et al.*, 2014).



شکل ۷. بیان نسبی ژن پرولین‌سنتتاز ارقام گندم متحمل و حساس تحت تنش رطوبتی نسبت به شاهد.

عملکرد دانه بالا و کیفیت خوب دانه‌ها اهداف مهم در زمینه تولید غلات می‌باشند (Fischer, 2008). از آنجایی که عملکرد صفت بسیار پیچیده‌ای است، بنابراین هرگونه افزایش عملکرد از طریق تغییر مدیریت مزرعه و یا از طریق برنامه‌های اصلاحی نیازمند شناخت دقیق عوامل تعیین‌کننده عملکرد می‌باشد (Acreche & Slafer, 2006). در همین راستا، افزایش عملکرد از طریق مهندسی ژنتیک تنها زمانی حاصل می‌شود که مکانیزم‌های فیزیولوژیکی تعیین‌کننده عملکرد دانه به‌خوبی درک شده باشند و در این صورت است که می‌توان گلوگاه‌هایی که عملکرد را محدود می‌کنند را بدون هیچ‌گونه هزینه اضافی باز کرد. بنابراین، سازگاری گیاهان به شرایط تنش اغلب مرتبط با کنترل محتوای ROS از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی، و همچنین تجمع اسمولیت‌های سازگار است.

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی، عملکرد بالای ژنوتیپ اروم در شرایط نرمال و تنش به میزان پروتئین کل و مالون دی آلدئید بیشتر، مرتبط است، در صورتی که عملکرد بالای ژنوتیپ میهن در شرایط نرمال و تنش به غلظت کلروفیل کل، غلظت کلروفیل a و b، میزان کاروتنوئید و میزان پرولین بیشتر مرتبط است. به طور کلی، نتایج آزمایش نشان داد که تحمل به تنش خشکی بالای رقم میهن را می توان احتمالاً به فعالیت بالای آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، و تحمل بالای رقم اروم به فعالیت بیشتر آنزیم های آنتی اکسیدانی پرولین سنتتاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت داد.

۵. سپاسگزاری

از مسئولین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی که ژنوتیپ های مورد مطالعه برای انجام این پژوهش را فراهم کردند تشکر و قدردانی می شود.

۶. منابع

- Abedi, T., & Pakniyat, H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal Genetic and Plant Breeding*, 46(1), 27–34.
- Acreche, M., & Slafer, G.A. (2006). Grain weight response to increases in number of grains in a Mediterranean area. *Field Crop Research*, 98, 52-59.
- Ahmadi, J., Pour-Aboughadareh, A., Fabriki-Ourang, S., Mehrabi, A.A., & Sidique, K.H.M. (2018). Wild relatives of wheat: *Aegilops-Triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 90.
- Akhila, S., Abraham, T.K., & Jaya, D. (2008). Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea *Vigna unguiculata* (L.) varieties. *Journal of Environmental Biology*, 29, 89-691.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Christophe Avice, J., & Nogues, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 111-123.
- Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.
- Bates, L., Waldrem, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Blokhin, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. (2003). Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annual Review of Botany*, 91, 179-194.
- Blomqvist, L.A., Ryberg, M., & Sundqvist, C. (2006). Proteomic analysis of the etioplast inner membranes of wheat (*Triticum aestivum* L.) by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 128, 368-381.
- Bohnert, H.J., & Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14, 89-97.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bray, E.A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany*, 89, 803 -811.
- Byrt, C., Xu, B., & Krishnan, M. (2014). The Na⁺ transporter, *TaHKT1;5-D*, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *The Plant Journal*, 80, 516-526.
- Chance, B., & Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Meth. Enzymol.*, 11, 764-755.
- Darvishi-Baloochi, M., Paknejad, F., Kashani, A., & Ardakani, M.R. (2010). Effect of water stress and foliar feeding of micronutrients on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content, RWC, membrane stability and grain yield of maize (SC704). *Journal of Crop Science*, 41, 531-543. (In Persian).
- EL-Tayeb, M.A. (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45, 215-222.
- Farooq, M., Hussain, M., Nawaz, A., Lee, D., Alghamdi, S., & Siddique, H.M.K. (2017). Seed priming improves chilling tolerance in chickpea by modulating germination metabolism, trehalose accumulation and carbon assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 274- 283.
- Fischer, R.A. (2008). The importance of grain or kernel number in wheat: A reply to Sinclair and Jamieson. *Field Crop Research*, 105, 15-21.

- Fita, A., Rodríguez-Burruezo, A., Boscaiu, M., Prohens, J., & Vicente, O. (2015). Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. *Frontiers in Plant Science*, 6, 978.
- Food and Agriculture Organization. (2018). World food situation, FAO cereal supply and demand brief, 6 December, Available at: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>.
- Food and Agriculture Organization. (2011-2020). World food situation, Available at: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>.
- Garaghanipur, N., Shiran, B., Khodambashie, M., & Molaie, A.R. (2014). Study of proline accumulation and gene expression of *P5CS* in leaves and flower buds of common bean cultivars under drought stress. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6, 129-142.
- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giri, J. (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1746-1751.
- Gupta, S.D. (2011). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Science Publishers, P.O. Box 699, Enfield, NH 03748, USA. Pp, 129-145.
- Gygi, S., Rochon, Y., Franza, B.R., & Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology*, 19, 1720-1730.
- Hadi, H., Seyed Sharifi, R., Namour, A., & Qolipour, A. (2016). *Plant protectors and abiotic stresses*. First Edition. Publications of Urmia University. Pp 346.
- Hashemi, H., Kavousi, H.R., & Pourseyedi, S.H. (2015). Effect of cadmium toxicity on gene expression and enzyme activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 16, 99-111.
- Kar, R.K. (2011). Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 1741-1745.
- Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
- Kishor, P.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., & Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of [Δ 1]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108(4), 1387-1394.
- Komatsu, S., & Tanaka, N. (2004). Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. *Proteomics*, 4, 938-949.
- Kuznetsov, W., & Shevyanikova, N.L. (1997). Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Plant Physiology*, 100, 320-326.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, 25, 402-408.
- Marček, T., Hamow, K.Á., Véghe, B., Janda, T., & Darko, E. (2019). Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PLoS One*, 14(2), e0212411.
- Marian, C.O., Krebs, S.L., & Arora, R. (2003). Dehydrin variability among *Rhododendron* spp: A25 kDa dehydrin is highly conserved and associated with cold acclimation across wide array of species. *New Phytol.*, 161, 773-780.
- Masoomi-Aladizgeh, F., Aalami, A., Esfahani, M., Aghaei, M.J., & Mozaffari, K. (2015). Identification of *CBF14* and *NAC2* genes in *Aegilops tauschii* associated with resistance to freezing stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 1059-1070.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
- Mosadeghi, M.R., Morshedizad, M., Mahboubi, A.A., Dexter, A.R., & Schulin, R. (2009). Laboratory evaluation of a model for soil crumbling for prediction of the optimum soil water content for tillage. *Soil and Tillage Research*, 105, 242-250 (In Persian).
- Movludi, A., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Davari, M., & Parmoon, G.H. (2014). The effect of water deficit and nitrogen on the antioxidant enzymes activity and quantum yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 398-404. (In Persian).
- Nikolaeva, M.K., Maevskaia, S.N., Shugaev, A.G., & Bukhov, N.G. (2010). Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russ. Journal Plant Physiology*, 57, 87-95.
- Parida, A.K., & Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60, 324-349.
- Paroda, R. (2005). Scaling-up: How to reach a billion resource-poor farmers in developing countries. New directions for a diverse planet". Proceedings of 4 th International Crop Science Congress, 26 Sep -1 Oct 2004, Brisbane, Australia.

- Pour-Aboughadareh, A., Ahmadi, J., Mehrabi, A.A., Etminan, A., Moghaddam, M., & Siddique, K.H.M. (2017). Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: Implications for wheat improvement. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 106.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., & Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell and Environment*, 29, 2143-2152.
- Riccardi, F., Gazeau, P., Jacquemot, M.P., Vincent, D., & Zivy, M. (2004). Deciphering genetic variation of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 1003-1011.
- Schutz, M., & Fangmeir, E. (2001). Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to elevated CO₂ and water limitation. *Environ. Pollut.*, 114, 187-194.
- Sharma, I., Tyagi, B.S., Singh, G., Venkatesh, K., & Gupta, O.P. (2015). Enhancing wheat production-A global perspective. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(1), 3-13.
- Sheteawi, S.A., & Tawfik, K.M. (2007). Interaction effect of some biofertilizers and irrigation water regime on mung bean (*Vigna radiate*) growth and yield. *Journal appl. Science res.*, 3, 251-262.
- Sofo, A., Cicco, N., Paraggio, M., & Scopa, A. (2010). Regulation of the ascorbate-glutathione cycle in plants under drought stress, ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants, 137-189.
- SPII. (2015). Report of wheat breeding program results during 2014-2015. Cereal Research Division Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. (In Persian).
- SPII. (2016) Report of wheat breeding program results during 2015-2016. Cereal Research Division Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. (In Persian).
- Svensson, J., Ismail, A.M., Palva, E.T., & Close, T.J. (2002). Dehydrins. In: K.B. Storey and J.M. storey (Eds.), Sensing Signaling and Cell Adaptation, Elsevier Science, 155-171.
- Tamura, T., Hara, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (2003). Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology*, 131, 454-462.
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., & Steffens, J.C. (2004). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Science*, 167, 693-703.
- Tod, G.W., & Basler, E. (1965). Fate of various protoplasmic constituents in droughted wheat plants. *Phyton*, 22, 79-85.
- Vendruscolo, A.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., & Vieira, L.G.C. (2007). Stress induced synthesis of proline confers tolerance to water transgenic wheat. *Journal Plant Physiology*, 164, 1367-1376.
- Verma, K.K., Singh, M., Gupta, R.K., & Verma, C.L. (2014). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. *Turkish Journal of Botany*, 38, 130-140.
- Wang, W., Vinocur, B., Soseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat -shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 244-52.
- Warschefsky, E., Penmetza, R.V., Cook, D.R., & von-Wettberg, E.J.B. (2014). Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany*, 101, 1791-1800.
- Xiong, L., & Jiang Kang, Z. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum*, 112(2), 152-166.
- Yang, S., & Deng, X. (2015). Effects of drought stress on antioxidant enzymes in seedlings of different wheat genotypes. *Pakistan Journal Botany*, 47(1), 49-56.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38, 171-186.
- Zang, X., & Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68, 426-437.