مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۹۹-۱۸۹

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

مطالعه بیان نسبی ژن *wdhn5* در ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی گندم تحت تنش خشکی

Assessment of relative gene expression of *wdhn5* in wild and agronomy wheat genotypes under drought stress conditions

حمیرا شاهی[۱]، نفیسه مهدی نژاد[۱]، فاطمه حدادی[۲]، بهمن فاضلی نسب[۳*]

Homeyra Shahi[1], Nafiseh Mahdinezhad[1], Fatemeh Haddadi[2], Bahman Fazeli-Nasab[3]

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

1. Departement of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bfazeli@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۵)

چکیده

به‌منظور بررسی نقش تنظیمی و الگوی بیان ژن *wdhn5* و هم‌چنین خصوصیات فیزیولوژیکی گندم تحت تنش خشکی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در گلدان روی سه گونه وحشی دیپلوئید (Urartu, Tauschii, Speltoides)، دو رقم گندم دوروم زراعی تتراپلوئید (بهرنگ و شبرنگ) و دو رقم گندم زراعی هگزاپلوئید (بولانی و سیستان) به‌عنوان عامل اول و تیمار آبیاری در سه سطح تیمار آبیاری ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، تیمار آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم) و تیمار آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) به‌عنوان عامل دوم انجام شد. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک شامل میزان ماده خشک، کارایی مصرف آب و محتوای نسبی آب برگ نشان داد که اثر خشکی بر همه صفات معنی‌دار بود و گونه حساس اسپلتوئیدس به‌طور معنی‌داری ماده خشک، کارایی مصرف آب و محتوای نسبی آب برگ پایین‌تری در تیمارهای خشکی در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر داشت. نتایج حاصل از بررسی بیان کمی ژن *Wdhn5* از طریق Real-time PCR نشان داد که بیان این ژن در ژنوتیپ‌های متحمل تائوشی و بولانی در تیمار آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک افزایش معنی‌داری پیدا کرد که این می‌تواند نشان دهنده اهمیت این ژن در شرایط تنش خشکی باشد. بر اساس این نتایج رقم زراعی بولانی و گونه وحشی تائوشی به‌طور نسبی متحمل به خشکی و گونه اسپلتوئیدس حساس به خشکی است.

واژه‌های کلیدی

ظرفیت زراعی،
کارایی مصرف آب،
میزان ماده خشک،
محتوایی نسبی آب برگ

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

مقدمه

گندم به خانواده گندمیان (گرامینه یا پواسه)، طایفه هوردیه و جنس تریتیکوم تعلق دارد. گونه‌های اهلی و وحشی گندم از لحاظ تعداد کروموزوم به سه گروه دیپلوئید (= AA, BB, ۲n=۲x=۱٤DD)، تتراپلوئید (۲n=٤x=۲۸= AA BB) و هگزاپلوئید (۲n=٦x=٤۸ =AABBDD) تقسیم می‌شوند. گونه‌های تتراپلوئید، آمفی‌پلوئیدی از تلاقی دو دیپلوئید هستند و هگزاپلوئیدها،آمفی‌پلوئیدی از تلاقی یک دیپلوئید و یک تتراپلوئید می‌باشند (Othmeni *et al.* 2019; Sourdille *et al.* 2001). از بین سطوح پلوئیدی، گونه‌های وحشی گیاهان زراعی بخش مهمی از نمونه‌های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند که حاوی ژن‌های بسیار مفید و با ارزش برای بهبود مقاومت به برخی تنش‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما، مقاومت به آفات و امراض مهم هستند و معمولا به‌عنوان منابع ژنی مورد استفاده پژوهش‌گران قرار می‌گیرند و تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاح گران را تأمین می‌کنند (Bommineni *et al.* 1997; Dvořák and Ross 1986).

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محدودکننده تولید محصولات گیاهی در سراسر جهان محسوب شده و اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاه و سایر فرایندهای متابولیکی دارد (Akram *et al.* 2013; Lum *et al.* 2014). پیام‌های دریافتی گیاه از محیط در هنگام بروز تنش خشکی منجر به ایجاد یک سری تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه در جهت ایجاد سازش با شرایط جدید می‌شود. بروز این پاسخ‌ها در نتیجه تغییر الگوی بیانی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش صورت می‌گیرد. یکسری ژن‌های پاسخ به تنش خشکی شناسایی شده‌اند که سطح رونویسی آن‌ها در طی تنش خشکی افزایش یا کاهش می‌یابد و محصولات این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی درگیر می‌باشند. به‌عنوان متال *DHN* ها ژن‌هایی تجمعی هستند که در پاسخ به تنش‌های کم‌آبی، سرمایی، پسابیدگی و شوری بیان می‌شوند و پروتئین‌های *LEA* را برای مقاومت بیان می‌کنند (Rasouli and Fazeli-Nasab 2014).

پروتئین‌های *LEA* (Late embryogenesis abundant proteins) جهت مقابله با تنش‌های محیطی اولین بار در گندم و پنبه به‌عنوان پروتئین‌های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند و چون این گروه پروتئینی برای اولین بار در مراحل آخر رشد و نمو جنین در بذرها شناسایی شده‌اند، در نتیجه به همین دلیل LEA نام‌گذاری شدند (Dure *et al.* 1989; Stockinger *et al.* 1997; Wise 2003). این پروتئین‌ها دارای گلایسین و سایر آمینواسیدهای قطبی بوده و حداقل یک کپی از توالی توافقی ۱۵ آمینواسیدی غنی از آمینواسید لیزین محافظت شده در همه گونه‌های گیاهی دارند که با توجه به علامت اختصاری لیزین به قطعه k مشهور است (Liu *et al.* 2012).

سازوکار عمل پروتئین‌های *LEA* هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است، ولی چنین به نظر می‌رسد که یک رابطه مستقیم بین هورمون آبسزیک اسید به‌عنوان یک سیگنال در پاسخ به تنش‌های محیطی و تولید دهیدرین در گیاهان وجود دارد به‌طوری‌که این هورمون باعث افزایش تولید این گروه از پروتئین‌ها می‌گردد که شاهدی جهت تائید کارکرد دهیدرین‌ها در شرایط تنش است (Borovskii *et al.* 2002; Wise and Tunnacliffe 2004).

در تحقیقی بیان پروتئین‌های *LEA* در پاسخ به تنش‌های محیطی بررسی و به این نتیجه رسیدند که این پروتئین‌ها باعث پایداری گیاه در برابر خشکی، محافظت ساختار سیتوسولیک، جلوگیری از تجزیه یون‌ها و پایداری دیواره سلولی می‌شوند و در اواخر دوره جنینی در بذور تجمع پیدا کرده و باعث مقاومت در برابر تمامی تنش‌های محیطی می‌شود (Sivamani *et al.* 2000). تجزیه‌وتحلیل توالی *Wdhn5* گندم نشان داده که توالی آن مشابه توالی دهیدرین‌های گیاهان دیگر است و این پروتئین عمدتا آب‌دوست و غنی از باقیمانده‌های گلایسین هست (Labhilili *et al.* 1995).

تجزیه و تحلیل نورترن بلات نشان داده که *Wdhn5* بیشترین بیان را در جنین بالغ دارد، اما نقش آن در جوانه بی‌تأثیر هست (Busk and Pagès 1998). برای شناسایی قطعی نحوه عمل این پروتئین‌ها، آزمایشی بر روی گیاهان جهش‌یافته و طبیعی به‌عنوان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

شاهد با روش خاموش‌سازی ژنی که ارتباط مستقیم با عملکرد پروتئین‌های دهیدرین داشت انجام گرفت و مشخص گردید که گیاهان شاهد می‌توانند بعد از تنش شوری (که باعث ایجاد تنش اسموتیک می‌شود) تا ۹٤ درصد وزن تر معمول را بازیابی کنند، درحالی‌که گیاهان جهش داده شده تنها تا ۳٤ درصد وزن تر معمول خود را بازیابی کردند (Saavedra *et al.* 2006).

در تحقیقی مشاهده شده که میزان بیان پروتئین‌های دهیدرین در گیاهان مختلف مقاوم به خشکی، در مقایسه با گیاهان غیر مقاوم به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (Velasco-Conde *et al.* 2012). همچنین جهت رونویسی فعال ژن‌های *Cor/Lea* و افزایش مقاومت به تنش زیستی از طریق بیان همولوگ *DREB2* گندم در توتون تراریخته مشخص شده که *DREB2* به‌عنوان فاکتور رونویسی عمل کرده و بیان ژن‌های *wdhn13*, *wrab17*, *wrab18*, *wrab19* را در جهت توسعه مقاومت به تنش‌های غیرزنده در گندم تنظیم می‌کند، که این پژوهش باعث شناسایی ژن *wdhn13* در گندم نان نیز شده است (Kobayashi *et al.* 2008). ضمنا جهت تغییر ساختار و بالا بردن مقاومت به خشکی در برنج با کاهش میزان ایندول- ۳- استیک اسید به‌وسیله فعالیت *TLD1/OsGH3.13* مشخص شده که کاهش میزان IAA به تجمع mRNA پروتئین‌های *LEA* کمک کرده و باعث شروع مقاومت تنش در برنج می‌شود (Zhang *et al.* 2009).

ازآن‌جایی‌که گندم مهم‌ترین گیاه زراعی در جهان و ایران و دارای ژنوتیپ‌های زیادی است که در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ بنابراین لازمه استفاده کارا و صحیح از آن‌ها، شناسایی ژن‌های مقاومت به تنش‌های مختلف و بررسی تغییرات بیان نسبی آن‌ها است. هدف از این تحقیق، بررسی مقایسه‌ای اثر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیان ژن*wdhn5* در برگ گونه‌های مختلف گندم با استفاده از فن Real time PCR است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر صفات تولید ماده خشک (وزن خشک گیاهان)، محتوای نسبی آب برگ (RWC) و کارایی مصرف آب و همچنین ارزیابی بیان نسبی ژن *DHN5* پژوهشی روی گونه‌های مختلف گندم در سال ۱۳۹٦-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلدان بر روی ارقام زراعی هگزاپلوئید و تتراپلوئید (بولانی، بهرنگ، شبرنگ، سیستان) و گونه‌های وحشی گندم (تائوشی، اورارتو و اسپلتوئیدس) به‌عنوان فاکتور اول و فاکتور دوم در سه شرایط آبی شامل تیمار آبیاری ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، تیمار آبیاری ٦۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم)، تیمار آبیاری ٤۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) اجرا شد.

کشت بذرها در گلدان‌های یک کیلویی حاوی مخلوطی متشکل از کوکوپیت و پرلیت با نسبت ۱:۱ در عمق یک سانتی‌متری انجام شد. گلدان‌ها در شرایط یکسان حداقل دما ۹ و حداکثر دما ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت عادی و به میزان مساوی هر دو الی سه روز یک‌بار تا رسیدن گیاه به مرحله رشدی ۱٦ بر اساس مقیاس رشدی Zadoks انجام شد، سپس درحالی‌که آبیاری برای گیاهان شاهد به‌صورت عادی انجام می‌شد، تنش برای گیاهان مورد تنش به روش وزنی انجام گرفت. حدود سه روز (۷۲ ساعت) پس از شروع تیمارهای تنش، جهت انجام بررسی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گلدان‌ها به پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل منتقل شدند.

سنجش‌های فیزیولوژیک

تولید ماده خشک (وزن خشک گیاهان)، کارایی مصرف آب (اثر سطوح مختلف تنش، رقم و اثر متقابل آن‌ها بر شاخص‌های فیزیولوژیک) (Blum 2009) و محتوای نسبی آب برگ (RWC) (Schlemmer *et al.* 2005) اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت Total RNA isolation شرکت دنا زیست آسیا انجام و سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم (DNase1 promega RQ1 RNase free-DNase,) تیمار شد و به‌عنوان الگوی واکنش PCR قرار گرفت. کمیت RNA استخراج‌شده در دستگاه نانودراپ (مدل VDC٢٤، شرکت Analytik jena AG، انگستان) و کیفیت با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. مشاهده‌ی باندهای RNA ریبوزومی 18s و 28s به‌طور مشخص (Wieczorek *et al.* 2012) نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب RNA استخراج شده در تحقیق حاضر بود. سپس از RNA تیمار شده با Dnase برای ساخت cDNA استفاده شد. ضمنا در واکنش PCR بجای استفاده از cDNA از RNA به‌عنوان الگو (جهت انجام آزمایش کنترل منفی) استفاده شد.

ژن 18S به‌عنوان ژن خانه‌دار (house Keeping) (آغازگر رفت (5´-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3´) و آغازگر برگت (5´-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3´) با طول قطعه تکثیری ۱۵۱ جفت باز و دمای اتصال ۵۹/۵ درجه سانتی‌گراد) و ژن دهیدرین با کد دسترسی TC304281 از گونه *Triticum aestivum* به‌عنوان ژن نامزد دخیل در تحمل به خشکی (آغازگر رفت (5´-GGATGGAAACCAGCGACAC-3´) و آغازگر برگشت (5´-TCTAAATCTGCGACAAACTCTGTATG-3´) با طول قطعه ۲۲۹ جفت باز و دمای اتصال ٦١/٥ درجه سانتی‌گراد) انتخاب شدند. اختصاصی بودن آغازگرها جهت واکنش PCR با روش‌های؛ وجود تنها یک سیگنال تک پیکی در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیرشده PCR و روئیت یک باند تکی بر روی ژل آگاروز تائید شدند.

ساخت cDNA با استفاده از کیت FIREScript RT cDNA Synthesis KIT، شرکت Solis BioDyne به شرح زیر انجام گرفت. RNA تام (سه میکرولیتر با غلظت ۱۰۰ نانوگرم)، پرایمر (هر کدام نیم میکرولیتر با غلظت نهایی ده میکرومولار)، dNTP (نیم میکرولیتر با غلظت نهایی ده میلی‌مولار)، RTase reaction buffer (10X) (یک میکرولیتر با غلظت نهایی یک برابر)، DTT (یک میکرولیتر با غلظت نهایی یک دهم میلی‌مولار)، HYPER Script TM Reverse Trans criptase 200u/µl (نیم میکرولیتر)، Zym ALL™ RNase inhibitor (نیم میکرولیتر) و Nuclease free water (سه میکرولیتر).

بیان ژن با روش Real Time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen (شرکت Solis BioDyne) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real Time PCR (مدل Rotor-Gene 3000، شرکت Corbett Research، استرالیا) انجام شد (شکل ۱). مخلوط واکنش PCR برای هر نمونه با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به شرح؛ ٤ میکرولیتر مخلوط EvaGreen، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱ میکرولیتر به ازای هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت)، ١٤ میکرولیتر آغازگر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود. ضمنا چرخه دمایی به شرح؛ یک چرخه مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و ٤٠ چرخه (مرحله‌ی واسرشته سازی، در دمای ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ٦١/٥°C به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله‌ی طویل شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۲۰ ثانیه) انجام شد. منحنی ذوب نیز با افزایش دما از ۵۵°C تا ۹۹°C، هر پنج ثانیه یک درجه بود. تمامی واکنش‌های PCR در سه تکرار انجام شد.

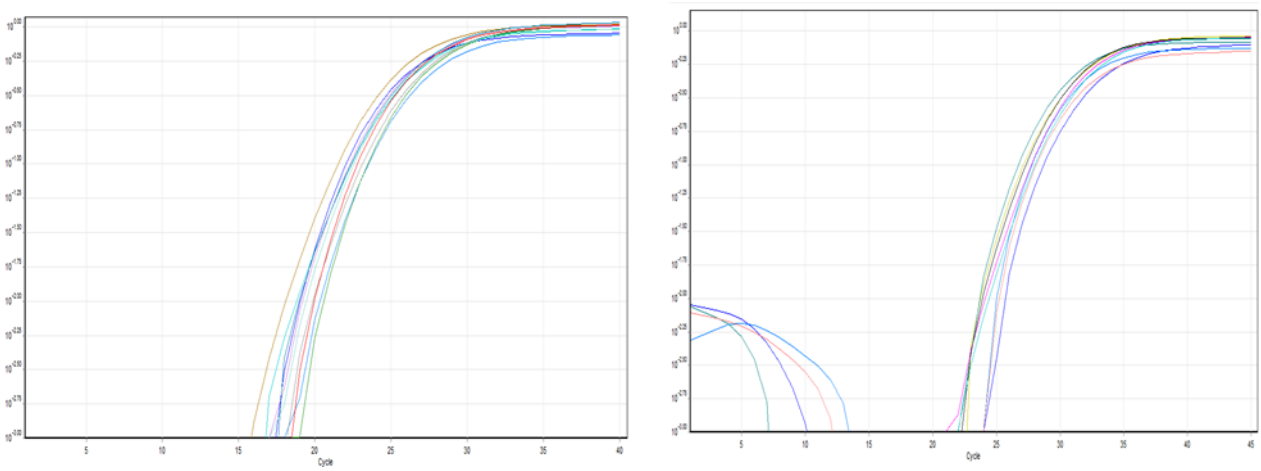
میزان بیان ژن دهیدرین با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001; Yuan *et al.* 2008) (فرمول یک) محاسبه و بر اساس ژن *18s* (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه ژنوتیپ‌ها سنجیده شد.

فرمول (۱)

ΔΔCt=(ΔCt نمونه آزمایشی – ΔCt نمونه کنترل)

ΔCt=(ΔCt ژن هدف – ΔCt ژن خانه دار)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]



شکل ۱- منحنی تکثیر ژن *wdhn5* (سمت راست) و 18sRNA (سمت چپ)

Fig.1. The amplification curve of wdhn5 (right) and 18sRNA (left)

مطالعات آماری

تجزیه‌وتحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مختلف و نتایج به‌دست‌آمده از Real time-PCR با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و نمودارها توسط برنامه Excel رسم شد.

نتایج و بحث

سطوح مختلف تنش خشکی تاثیرات متفاوتی بر هر یک از صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه می‌گذارد و گیاهانی که بدین لحاظ تغییرات و خسارات ناخواسته کمتری را متحمل کردند، به لحاظ تحمل به خشکی ارجحیت دارند. به این سبب یافتن ارقامی که قادر به استفاده بهینه از منابع محیطی موجود در دوره‌های مناسب رشد باشند، بسیار حائز اهمیت است.

در این تحقیق نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت تولید ماده خشک نشان می‌دهد که منابع تغییر تنش خشکی، ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل تنش خشکی در ژنوتیپ در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۱) و مشخص شد ژنوتیپ‌های مختلف در برابر تنش خشکی رفتارهای متفاوتی نشان دادند. معنی‌دار شدن اثر متقابل تنش و ژنوتیپ و نتایج مقایسه میانگین دانکن نشان داد عمل تنش‌های گوناگون در ژنوتیپ‌های مختلف یکسان نبوده و بر حسب نوع و یا سطح تنش و ژنوتیپ موردنظر تغییرات متنوعی رخ داده است. مقایسه میانگین میزان تولید ماده خشک نشان داد که مقدار تولید ماده خشک در اثر تنش خشکی به‌طور معنی‌داری از ۰/۰۸۰ گرم در شرایط نرمال به ۰/۰۵۸ گرم در شرایط تنش کاهش یافت.

از نظر میزان تولید ماده خشک، گونه تائوشی بالاترین مقدار (۰/۰۸۳) را نشان داد که تفاوت معنی‌داری با گونه اسپلتوئیدس با کمترین مقدار ۰/۰۶۳ داشت. بر اساس نتایج اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نشان داد که در شرایط آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان تولید ماده خشک را گونه تائوشی با مقدار ۰/۰۷۶ و گونه اسپلتوئیدس در این تنش کمترین میزان تولید ماده خشک را با مقدار ۰/۰۶۸ دارا بود و هم‌چنین در شرایط آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار را گونه تائوشی با مقدار ۰/۰۶۵ و کم‌ترین مقدار را گونه اسپلتوئیدس با مقدار ۰/۰۴۳ را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

صفت کارایی مصرف آب به‌عنوان نسبت کل ماده خشک در واحد آب مصرف‌شده تعریف شده است. در بیشتر گونه‌های گیاهی تنها بخشی از بیوماس کل اهمیت اقتصادی دارد و کارایی مصرف آب به‌صورت عملکرد اقتصادی در واحد آب مصرف‌شده تعریف شده است (Condon *et al.* 2004).

در بین ژنوتیپ‌ها بیشترین میزان صفت کارایی مصرف آب مربوط به گونه تائوشی با مقدار ۰/۰۴۹ بود که تفاوت معنی‌داری با گونه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

اسپلتوئیدس با کمترین مقدار.۰/۰۳٦ داشت. با افزایش شدت تنش میزان کارایی مصرف آب کاهش یافت به‌طوری‌که میزان کارایی مصرف آب از ۰/۰۵۸ در شاهد (۹۰ درصد ظرفیت زراعی) به ۰/۰۲٦ در آبیاری ٤۰ درصد ظرفیت زراعی رسید که نشان دهنده‌ی کاهش میزان کارایی مصرف آب با اعمال تنش خشکی نسبت به شاهد هست. برهمکنش بین ژنوتیپ و شدت تنش بر روی کارایی مصرف آب در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان کارایی مصرف آب در ژنوتیپ‌ها مختلف کاهش یافت. اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نشان داد که در شرایط آبیاری ٦۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان کارایی مصرف آب را گونه تائوشی با مقدار ۰/۰۳۳ و گونه اسپلتوئیدس در این تنش کمترین میزان کارایی مصرف آب را با مقدار ۰/۰۲۷ دارا بود. هم‌چنین در شرایط آبیاری ٤۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار را گونه تائوشی با مقدار ۰/۰۲۱ و کم‌ترین را گونه اسپلتوئیدس و اورارتو با مقادیر ۰/۰۱۲ به خود اختصاص دادند (شکل ۲).

از مهم‌ترین تغییرات ناشی از تنش خشکی، کاهش محتوای آب نسبی برگ (RWC) است. این صفت می‌تواند توانمندی گیاه را در تحمل به تنش خشکی نشان دهد. کاهش محتوای آب نسبی و بسته شدن روزنه‌ها اولین تأثیر خشکی بوده که از طریق اختلال در ساخت مواد فتوسنتزی، موجب کاهش میزان عملکرد می‌شود. تنش خشکی با کاهش محتوای نسبی آب برگ و ایجاد محدودیت روزنه‌ای، باعث بسته شدن روزنه‌ها و کاهش فتوسنتز می‌شود (Molnár 2002; Yang *et al.* 2007).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس محتوای نسبی آب در این مطالعه نشان می‌دهد که منبع تغییر تنش خشکی و ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل تنش خشکی در ژنوتیپ در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ تأثیر بسیار معنی‌داری داشتند (جدول ۱). در این آزمایش بیشترین مقدار محتوای آب نسبی مربوط به شرایط شاهد یا ۹۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۸۲/۱۰ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به سطح آبیاری ٤۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ٦۷/۰۹ درصد بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین انجام شده برای ژنوتیپ‌ها نشان داد که بیشترین میانگین مقدار محتوای آب نسبی مربوط به گونه تائوشی با میانگین ۸۳/۷۷ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به گونه اسپلتوئیدس با مقدار ۳٦/۷۸ درصد هست. در سطح آبیاری ٦۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین و کمترین مقدار محتوای آب نسبی به ترتیب مربوط به گونه تائوشی با مقدار ۸۲/٦۷ و اسپلتوئیدس با مقدار ۷٤/٥٤ درصد بود. هم‌چنین در این آزمایش گونه تائوشی در سطح آبیاری ٤۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها به مقدار کمتری آب از دست داد و مقدار محتوای آب نسبی آن ۷۸ بود. گونه اسپلتوئیدس نیز با مقدار ٥۳/٦۹ درصد کمترین مقدار محتوای آب نسبی را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

تعدادی از پژوهشگران با مطالعه ارقام مختلف گندم در دو شرایط محیطی مختلف یک کاهش ٤٤ درصدی را در RWC ارقام تحت شرایط تنش رطوبتی گزارش کردند (Siddique *et al.* 2000). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که ارقام متحمل به خشکی، RWC بیشتری را در شرایط تنش و عدم تنش داشته و همبستگی بالایی بین این صفت با عملکرد دانه مشاهده شده است (Naroui Rad *et al.* 2013) بنابراین برای انتخاب ژنوتیپ‌ها در محیط‌های مواجه با خشکی، محتوای نسبی آب برگ موفق عمل می‌کند.

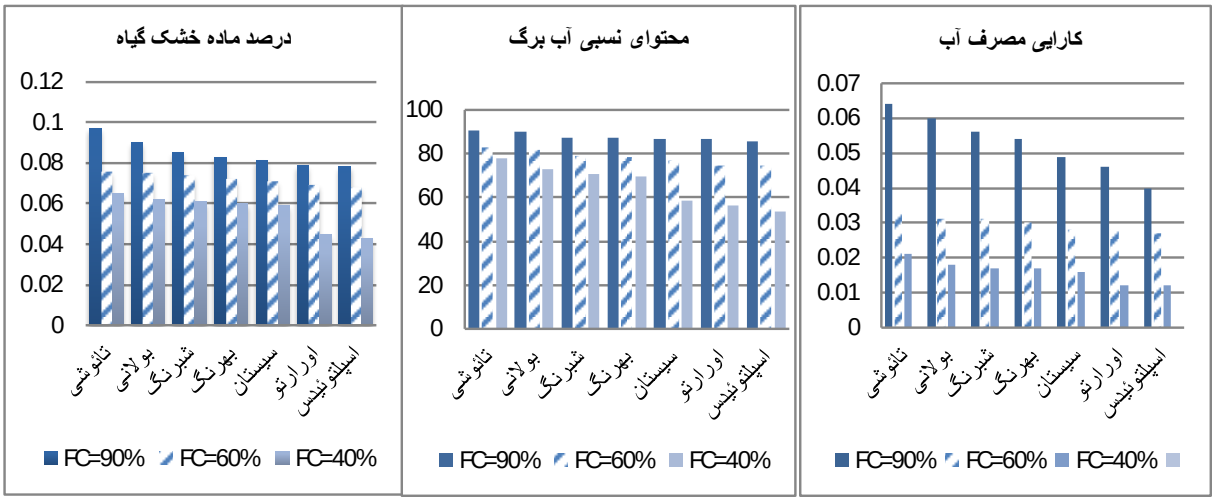
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف فیزیولوژیکی و بیان ژن *wdhn5* در ژنوتیپ‌های مختلف زراعی وحشی گندم تحت شرایط خشکی

Table1. Analysis of variance of different physiological traits and expression of *wdhn5* gene in wild and agronomy wheat genotypes under drought conditions

منبع تغییرات	درجه آزادی	محتوی نسبی آب برگ	کارآیی مصرف آب	درصد ماده خشک گیاه	بیان ژن دهیدرین ۵
رژیم آبیاری	۲	۱۵۵۵/٤۸**	۰/۰۰۷۱**	۰/۰۰۲٦**	۷/۳۳**
ژنوتیپ	٦	٤۸۹/۵۵ **	۰/۰۰۰۱۰**	۰/۰۰۰۳۸**	۰/۰٤۲ **
ژنوتیپ×آبیاری	۱۲	۱۰۹۰/۱۷**	۰/۰۰۰۰۷٤**	۰/۰۰۰۲٦**	۵۵/٤۵**
خطا	٤۲	٦/۱	۰/۰۰۰۰۰٤۷	۰/۰۰۰۰۲٦	۰/۸۹
ضریب تغییرات	-	۱۲/٦٤	٦/٤۸	۷/۲۱	٦/٤۵

*و ** به ترتیب بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد است.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × خشکی صفات مختلف فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های مختلف زراعی وحشی گندم تحت شرایط خشکی.

Fig 2. Mean comparison of the interactions between stress and drought (drought*stress) of different physiological in the wild and agronomy under drought stress.

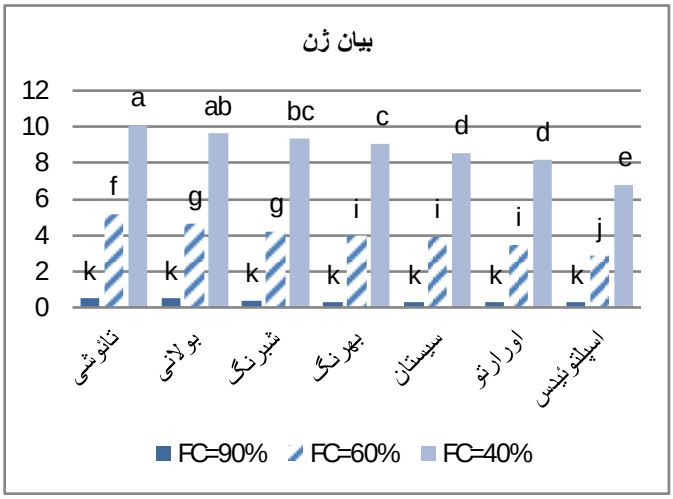
هنگامی‌که گیاهان در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، با تغییر در الگوی بیان ژن‌های خود، تلاش می‌کنند با شرایط محیطی جدید سازگاری پیدا کنند (Ozturk *et al.* 2002) ژن‌هایی که بیان آن‌ها تحت شرایط خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل تغییر می‌کند، احتمال دارد در مسیرهای حفاظتی و تحمل گیاه به خشکی دخالت داشته باشند. درصورتی‌که ژن‌هایی که در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش بیان نشان می‌دهند را می‌توان تنها پاسخی به تنش در نظر گرفت (Guo *et al.* 2009).

در مطالعه حاضر، تیمار تنش خشکی سبب تغییر در میزان بیان ژن *DHN5* شد. بیان ژن *DHN5* پس از قرارگیری در سطوح مختلف خشکی اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل در شرایط بدون تنش نشان داده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از آن است که ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی بر روی میزان بیان ژن *DHN5* در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ تفاوت بسیار معنی‌داری در شرایط تنش در مقایسه با کنترل نشان دادند (جدول ۱). در بین ژنوتیپ‌ها بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ژنوتیپ تائوشی با مقدار ٤/۷۹ که تفاوت معنی‌داری با بقیه ارقام داشت و کمترین مقدار را ژنوتیپ اسپلتوئیدس با مقدار ٤/۱۵ به خود اختصاص

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

داد. با افزایش شدت تنش، میزان بیان ژن افزایش یافت به‌طوری‌که میزان بیان ژن *DHN5* از مقدار ٤/٢٠ در شاهد (٩٠ درصد ظرفیت زراعی) به مقدار ٥/٢٩ در ٤٠ درصد ظرفیت زراعی رسید که نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان بیان ژن *DHN5* با اعمال تنش خشکی نسبت به شاهد هست.

برهمکنش بین رقم و شدت تنش بر روی مقدار بیان ژن در سطح ٠/٠١ و ٠/٠٥ بسیار معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف افزایش یافت. در آبیاری ٦٠ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب بیشترین و کمترین بیان ژن در ژنوتیپ تائوشی با مقدار ٥/١٩ و ژنوتیپ اسپلتوئیدس با مقدار ٢/٩١ مشاهده شد. در آبیاری ٤٠ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان بیان ژن متعلق به ژنوتیپ‌های تائوشی و بولانی به ترتیب با مقدارهای ١٠/٠٩ و ٩/٦٣ وکمترین میزان مربوط به ژنوتیپ اسپلتوئیدس با مقدار ٦/٧٩ اختصاص داشت (شکل ٣).



شکل ٣- مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی برای صفت بیان نسبی ژن دهیدرین در ژنوتیپ‌های مختلف زراعی و وحشی گندم تحت شرایط خشکی. حروف یکسان در هر نمودار بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ٥ درصد است.

Fig 3. Mean comparison of the interactions between stress and drought (drought*stress) of expression of *wdhn5* gene in the wild and agronomy under drought stress. Averages with the same latin letters do not show significant differences at the probability level of 0.05 in the Duncan test.

گروهی دیگر در سال ٢٠٠٧ پژوهشی با عنوان، بیان بیش از اندازه ژن *DHN5* گندم را در گیاه آرابیدوپسیس جهت مقاومت به تنش محیطی انجام دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ژن‌های پروتئین *LEA* در بیشتر گیاهان وجود داشته و تراریخته در زمان تنش باعث ایجاد مقاومت و پایداری شده و حتی بیان بیش‌ازحد آن باعث مقاومت بیشتر گیاه می‌شود (Brini *et al.* 2007). در آزمایشی دیگر ارتباط بین میزان تحمل به تنش خشکی ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی جو و بیان نسبی ژن دهیدرین ٣ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این بود که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین بیان ژن و وزن خشک اندام هوایی و همچنین همبستگی منفی و معنی‌دار بین بیان این ژن با نشت الکترولیتی برقرار است. ازآنجایی‌که نقش ژن دهیدرین٣ در پایداری غشا و جلوگیری از پسابیدگی یاخته‌ای است، نتایج می‌تواند مؤید اهمیت آن به‌عنوان ژن نامزد در تحمل به تنش خشکی در گیاه جو باشد (Hosseini Nejad *et al.* 2014).

در پاسخ القایی خانواده ژنی دهیدرین‌ها به مدت و شدت تنش خشکی انتهایی در ارقام حساس و متحمل به جو مشخص شده که افزایش معنی‌دار ژن‌های *Dhn3* و*Dhn5* پس از ٢١ روز و ژن‌های *Dhn1*، *Dhn3*، *Dhn5*، *Dhn7*، *Dhn9* پس از ٢٨ روز از زمان عمل تنش در رقم متحمل یوسف را نشان داده، درحالی‌که در رقم حساس مورکو، القایی در بیان هیچ یک از ژن‌های دهیدرین در این دو مرحله صورت نگرفته است (Abedini *et al.*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

2012). به‌طورکلی با توجه به بیان ژن *DHN5* در این آزمایش نیز احتمال دارد این ژن نقش محافظت گیاه گندم در تحمل به تنش خشکی را برعهده داشته باشد. بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان ژن نامزد در تحمل به خشکی و انتقال به گیاهان دیگر و ایجاد گیاهان تراریخته متحمل بهره برد و با توجه به نقش مهم ژن معرفی شده در تنظیم پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های غیرزنده باید بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل برای حمایت مالی آن‌ها در انجام این پروژه با شماره پژوهانه UOZ- GR-۱۵۸-۹۶۱۸ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abedini R, Shahbazi M, Shobbar ZS, Pishkam Rad R, Ebrahimi A. 2012. Expression analysis of dehydrins gene family in barley tolerant and sensitive cultivars and wild genotype under drought conditions. Iranian Journal of Plant Biology 4(11): 36-46.

Akram H, Ali A, Sattar A, Rehman H, Bibi A. 2013. Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. J Anim Plant Sci 23(5): 1415-1423.

Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. Field Crops Research 112(2-3): 119-123.

Bommineni V, Jauhar P, Peterson T. 1997. Transgenic durum wheat by microprojectile bombardment of isolated scutella. Journal of heredity 88(6): 475-481.

Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK. 2002. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. BMC Plant Biol 2(1): 5 (1-7).

Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K. 2007. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant cell reports 26(11): 2017-2026.

Busk PK, Pagès M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant molecular biology 37(3): 425-435.

Condon AG, Richards R, Rebetzke G, Farquhar G. 2004. Breeding for high water-use efficiency. Journal of Experimental botany 55(407): 2447-2460.

Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z. 1989. Common amino acid sequence domains among the *LEA* proteins of higher plants. Plant molecular biology 12(5): 475-486.

Dvořák J, Ross K. 1986. Expression of Tolerance of Na+, K+, Mg2+, Cl− and SO2− 4 Ions and Sea Water in the Amphiploid of *Triticum aestivum*× *Elytrigia elongata* 1. Crop Science 26(4): 658-660.

Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, Von Korff M, Varshney RK, Graner A, Valkoun J. 2009. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. Journal of Experimental botany 60(12): 3531-3544.

Hosseini Nejad J, Shahbazi M, Karimi J, Shabr ZS, Zahrawi M, Ghorbani A. 2014. Evaluation of the Relationship between Drought Tolerance of Wild and Agro Barley Genotypes and Relative Expression of Dehydrin Gene 3. First International Congress of the 9th Iranian Congress of Genetics (Article COI: CIGS13_0720),

Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S. 2008. Transcriptional activation of *Cor*/*Lea* genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat *DREB2* homolog in transgenic tobacco. Transgenic Res 17(5): 755-767.

Labhilili M, Joudrier P, Gautier M-F. 1995. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science 112(2): 219-230.

Liu C-C, Li C-M, Liu B-G, Ge S-J, Dong X-M, Li W, Zhu H-Y, Wang B-C, Yang C-P. 2012. Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). Plant molecular biology reporter 30(4): 848-859.

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(4): 402-408.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

Lum M, Hanafi M, Rafii Y, Akmar A. 2014. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. Journal of Animal and Plant Sciences 24(5): 1487-1493.

Molnár I. 2002. The effects of drought stress on the photosynthetic processes of wheat and of Aegilops biuncialis genotypes originating from various habitats. Acta Biologica Szegediensis 46(3-4): 115-116.

Naroui Rad MR, Mihdzar AK, Rafii MY, Jaafar HZE, Danaee M. 2013. Gene action for physiological parameters and use of relative water content (RWC) for selection of tolerant and high yield genotypes in F2 population of wheat. Australian Journal of Crop Science 7(3): 407-413.

Othmeni M, Grewal S, Hubbart-Edwards S, Yang C-y, Scholefield D, Ashling S, Yahyaoui A, Gustafson P, Singh PK, King IP. 2019. The use of pentaploid crosses for the introgression of Amblyopyrum muticum and D-genome chromosome segments into durum wheat. Front Plant Sci 10: 1110.

Ozturk ZN, Talamé V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert HJ. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought-and salt-stressed barley. Plant molecular biology 48(5-6): 551-573.

Rasouli H, Fazeli-Nasab B. 2014. Structural validation and homology modeling of LEA 2 protein in bread wheat. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci 14(10): 1044-1048.

Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S. 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. The Plant Journal 45(2): 237-249.

Schlemmer MR, Francis DD, Shanahan J, Schepers JS. 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. Agronomy Journal 97(1): 106-112.

Siddique M, Hamid A, Islam M. 2000. Drought stress effects on water relations of wheat. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41: 35-39.

Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD, Qu R. 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. Plant Science 155(1): 1-9.

Sourdille P, Tavaud M, Charmet G, Bernard M. 2001. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes. Theoretical and Applied Genetics 103(2-3): 346-352.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences 94(3): 1035-1040.

Velasco-Conde T, Yakovlev I, Majada JP, Aranda I, Johnsen Ø. 2012. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response. Tree Genetics & Genomes 8(5): 957-973.

Wieczorek D, Delauriere L, Schagat T. 2012. Methods of RNA Quality Assessment. Promega Corporation Web site: 1-14.

Wise MJ. 2003. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. BMC bioinformatics 4(1): 52.

Wise MJ, Tunnacliffe A. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? Trends in plant science 9(1): 13-17.

Yang Y, Liu Q, Han C, Qiao Y, Yao X, Yin H. 2007. Influence of water stress and low irradiance on morphological and physiological characteristics of *Picea asperata* seedlings. Photosynthetica 45(4): 613-619.

Yuan JS, Wang D, Stewart Jr CN. 2008. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology 3(1): 112-123.

Zhang S-W, Li C-H, Cao J, Zhang Y-C, Zhang S-Q, Xia Y-F, Sun D-Y, Sun Y. 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by *TLD1*/*OsGH3.13* activation. Plant physiology 151(4): 1889-1901.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

Assessment of relative gene expression of *wdhn5* in wild and agronomy wheat genotypes under drought stress conditions

Homeyra Shahi[1], Nafiseh Mahdinezhad[1], Fatemeh Haddadi[2], Bahman Fazeli-Nasab[3]

1. Departement of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
*Corresponding Author, Email: bfazeli@uoz.ac.ir

ABSTRACT

In order to examine the role of the *wdhn5* regulatory factor and its expression pattern as well as the physiological characteristics during drought stress in wheat plant, a factorial experiment was carried out in completely randomized design in pot with three genotypes. First factor was the wheat genotypes including two hexaploide cultivars (Bolani, Sistan), two tetraploide cultivars (Behrang, Shabrang) and wild types (*Urartu*, *Tauschii*, *Speltoides*). The irrigation treatment with three levels consisted of normal (90% of field capacity), mild stress (60% of field capacity) and severe stress (40% of field capacity) was as the second factor. Analysis of variance for physiological characteristics showed that the effect of water stress on all traits were significant, and the sensitive cultivar *Speltoides* had significantly lower dry mater production, water use efficiency and relative water content than the other cultivars. The result of real time PCR on relative expression of *wdhn5* gene showed that its expression in *Tauschii* and Bolani tolerant cultivars in 40% of field capacity increased significantly which could indicate the importance of this gene in drought stress conditions. Based on these results, Bolani cultivar and *Tauschii* wild cultivar are relatively tolerant to drought and *Splotheids* is sensitive to drought.

Key words: Field Capacity, water use efficiency, Dry matter, relative water content

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.6.4]