

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 Shahi¹, Nafiseh Mahdinezhad¹, Fatemeh Haddadi², Bahman Fazeli-Nasab³

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

واژه‌های کلیدی

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

به منظور بررسی نقش تنظیمی و الگوی بیان ژن *wdhn5* و هم‌چنین خصوصیات فیزیولوژیکی گندم تحت تنش خشکی، آزمایشی به صورت 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) به عنوان 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) به عنوان 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 به طور 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 تانوشی 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 تانوشی به طور نسبی متحمل به خشکی و گونه اسپلتوئیدس حساس به خشکی است.

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 نام‌گذاری شدند (Dure et al. 1989; Stockinger et al. 1997; Wise 2003). این پروتئین‌ها دارای گلیسین 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 شاهدهی جهت تأیید 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 بدور تجمع پیدا کرده و باعث مقاومت در برابر تمامی تنش‌های محیطی می‌شود (Sivamani et al. 2000). تجزیه و تحلیل توالی *Wdhn5* گندم نشان داده که توالی آن مشابه توالی دهیدرین‌های گیاهان دیگر است و این پروتئین عمدتاً آب‌دوست و غنی از باقیمانده‌های گلیسین هست (Labhili 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

گندم به خانواده گندمیان (گرامینه یا پواسه)، طایفه هوردیه و جنس تریتیوم تعلق دارد. گونه‌های اهلی و وحشی گندم از لحاظ تعداد کروموزوم به سه گروه دیپلوئید (AA, BB, DD) $(2n=2x=14)$ ، تتراپلوئید (AA BB) $(2n=4x=28)$ و هگزاپلوئید (AABBDD) $(2n=6x=48)$ 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 معمولاً به‌عنوان منابع ژنی مورد استفاده پژوهش‌گران قرار می‌گیرند و تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاح‌گران 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 مثال *DHN* ها ژن‌هایی تجمعی هستند که در پاسخ به تنش‌های کم‌آبی، سرمایی، پسابدگی و شوری بیان

مواد و روش‌ها

به منظور 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 ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلدان بر روی ارقام زراعی هگزاپلوئید و تتراپلوئید (بولانی، بهرننگ، شبرنگ، سیستان) و گونه‌های وحشی گندم (تائوشی، اورارتو و اسپلتوئیدس) به عنوان فاکتور اول و فاکتور دوم در سه شرایط آبی شامل تیمار آبیاری ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، تیمار آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم)، تیمار آبیاری ۴۰ 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 به صورت عادی و به میزان مساوی هر دو الی سه روز یکبار تا رسیدن گیاه به مرحله رشدی ۱۶ بر اساس مقیاس رشدی *Zadoks* انجام شد، سپس درحالی‌که آبیاری برای گیاهان شاهد به صورت 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 فیزیولوژیکی

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

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 ۹۴ درصد وزن تر معمول را بازیابی کنند، درحالی‌که گیاهان جهش داده شده تنها تا ۳۴ 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 به طور 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* به عنوان 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). ضمناً جهت تغییر ساختار و بالا بردن مقاومت به خشکی در برنج با کاهش میزان ایندول-۳-استیک اسید به وسیله 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).

از آنجایی‌که 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.

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 (RNase free-DNase, RQ1) تیمار شد و به‌عنوان الگوی واکنش PCR قرار گرفت. کمیت RNA استخراج شده در دستگاه نانودراپ (مدل VDC۲۴، شرکت Analytik jena AG، انگلستان) 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. ضمناً 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 ۶۱/۵ درجه سانتی‌گراد) انتخاب شدند. اختصاصی بودن آغازگرها جهت واکنش PCR با روش‌های وجود تنها یک سیگنال تک پیکری در آنالیز منحنی درجه حرارت ذوب فرآورده‌های تکثیرشده PCR و رویت یک باند تکی بر روی ژل آگاروز تأیید 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)، HYPHER Script TM Reverse Trans criptase 200u/ul (نیم میکرولیتر)، Zym ALLTM RNase inhibitor (نیم میکرولیتر) و Nuclease free water (سه میکرولیتر).

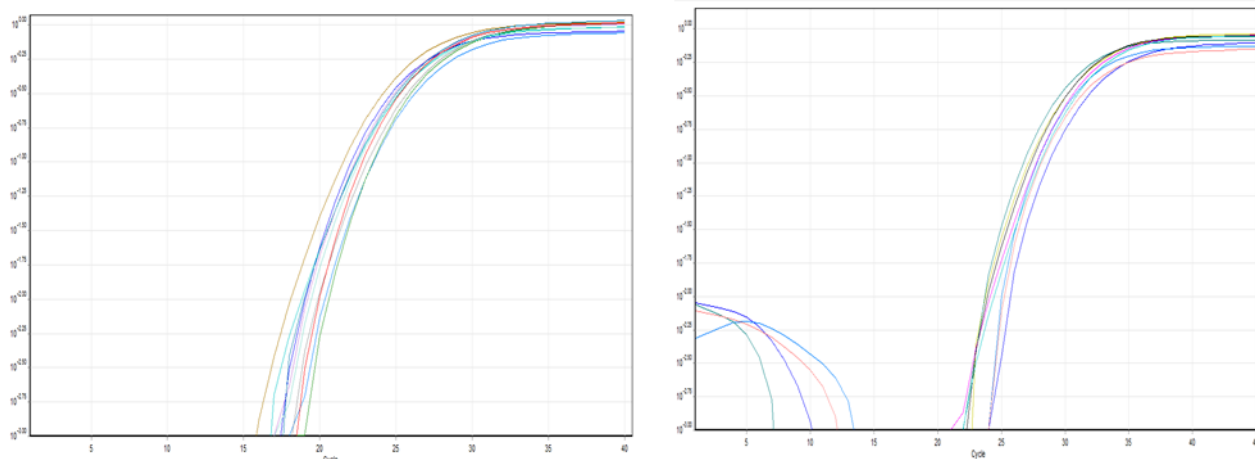
بیان ژن با روش Real Time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen (شرکت Solis BioDyne) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real Time PCR (مدل Rotor-Gene 3000، شرکت Corbett Research، استرالیا) انجام شد (شکل ۱). مخلوط واکنش PCR برای هر نمونه با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به شرح؛ ۴ میکرولیتر مخلوط EvaGreen، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱ میکرولیتر به ازای هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت)، ۱۴ میکرولیتر آغازگر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود. ضمناً چرخه دمایی به شرح؛ یک چرخه مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه (مرحله‌ی واسرشته سازی، در دمای ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در دمای ۶۱/۵°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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (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)

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct - \text{نمونه کنترل}) - \Delta Ct$$

$$\Delta Ct = (\Delta Ct - \text{ژن خانه دار}) - \Delta Ct$$



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

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مختلف و نتایج به دست آمده از Real time-PCR با آزمون چند دامنه‌ای

نتایج و بحث

دانکن در سطح خطای پنج درصد با استفاده از نرم افزار SAS انجام و نمودارها توسط برنامه Excel رسم شد.

خشک در اثر تنش خشکی به طور معنی داری 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 معنی داری 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 هم چنین 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 به عنوان نسبت کل ماده خشک در واحد آب مصرف شده تعریف شده است. در بیشتر گونه‌های گیاهی تنها بخشی از بیوماس کل اهمیت اقتصادی دارد و کارایی مصرف آب به صورت عملکرد اقتصادی در واحد آب مصرف شده 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 معنی داری با گونه

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 معنی داری داشتند (جدول ۱) و مشخص شد ژنوتیپ‌های مختلف در برابر تنش خشکی رفتارهای متفاوتی نشان دادند. معنی دار 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 مورد نظر تغییرات متنوعی رخ داده است. مقایسه میانگین میزان تولید ماده خشک نشان داد که مقدار تولید ماده

متقابل تنش خشکی در ژنوتیپ در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ تأثیر بسیار معنی داری 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 ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۶۷/۰۹ 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 ۳۶/۷۸ درصد است. در سطح آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین و کمترین مقدار محتوای آب نسبی به ترتیب مربوط به گونه تائوشی با مقدار ۸۲/۶۷ و اسپلتوئیدس با مقدار ۷۴/۵۴ درصد بود. همچنین در این آزمایش گونه تائوشی در سطح آبیاری ۴۰ 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 ۵۳/۶۹ 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 ۴۴ 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.

اسپلتوئیدس با کمترین مقدار ۰/۰۳۶ داشت. با افزایش شدت تنش میزان کارایی مصرف آب کاهش یافت به طوری که میزان کارایی مصرف آب از ۰/۰۵۸ در شاهد (۹۰ درصد ظرفیت زراعی) به ۰/۰۲۶ در آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی رسید که نشان دهنده کاهش میزان کارایی مصرف آب با اعمال تنش خشکی نسبت به شاهد است. برهمکنش بین ژنوتیپ و شدت تنش بر روی کارایی مصرف آب در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی دار 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 ۶۰ 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 ۴۰ 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).

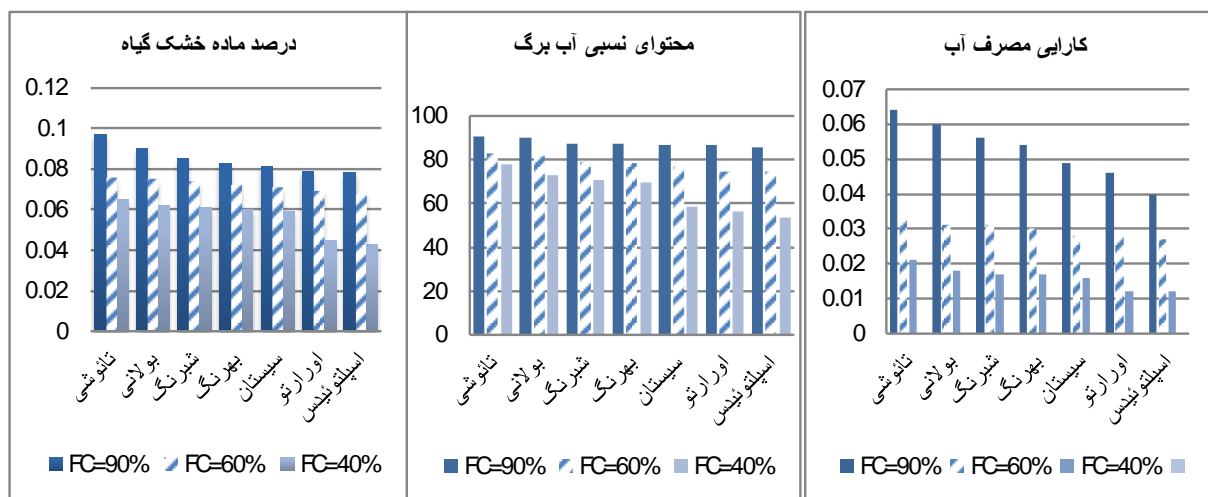
نتایج حاصل از تجزیه واریانس محتوای نسبی آب در این مطالعه نشان می‌دهد که منبع تغییر تنش خشکی و ژنوتیپ و همچنین اثر

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

Table 1. 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	کارایی مصرف آب	درصد ماده خشک گیاه	بیان ژن
رژیم آبیاری	۲	۱۵۵۵/۴۸**	۰/۰۰۷۱**	۰/۰۰۲۶**	۷/۳۳**
ژنوتیپ	۶	۴۸۹/۵۵**	۰/۰۰۰۱۰**	۰/۰۰۰۳۸**	۰/۰۴۲**
ژنوتیپ×آبیاری	۱۲	۱۰۹۰/۱۷**	۰/۰۰۰۰۷۴**	۰/۰۰۰۰۲۶**	۵۵/۴۵**
خطا	۴۲	۶/۱	۰/۰۰۰۰۰۴۷	۰/۰۰۰۰۰۲۶	۰/۸۹
ضریب تغییرات	-	۱۲/۶۴	۶/۴۸	۷/۲۱	۶/۴۵

* 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 wheat genotypes under drought stress.

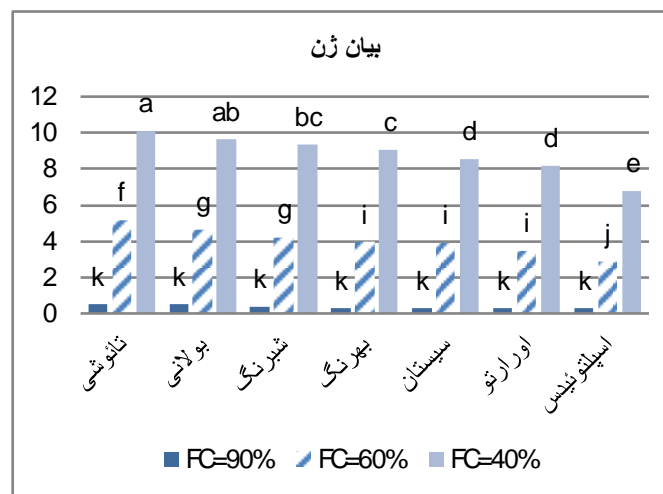
در مطالعه حاضر، تیمار تنش خشکی سبب تغییر در میزان بیان ژن *DHN5* شد. بیان ژن *DHN5* پس از قرارگیری در سطوح مختلف خشکی اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل در شرایط بدون تنش نشان داده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از آن است که ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی بر روی میزان بیان ژن *DHN5* در سطح احتمال ۰/۰۱ 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 ۴/۷۹ که تفاوت معنی‌داری با بقیه ارقام داشت و کمترین مقدار را ژنوتیپ اسپلتونیدس با مقدار ۴/۱۵ به خود اختصاص

دهنگامی که 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. در صورتی که 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).

یافت. در آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب بیشترین و کمترین بیان ژن در ژنوتیپ تائوشی با مقدار ۵/۱۹ و ژنوتیپ اسپلتونیدس با مقدار ۲/۹۱ مشاهده شد. در آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان بیان ژن متعلق به ژنوتیپ‌های تائوشی و بولانی به ترتیب با مقدارهای ۱۰/۰۹ و ۹/۶۳ و کمترین میزان مربوط به ژنوتیپ اسپلتونیدس با مقدار ۶/۷۹ اختصاص داشت (شکل ۳).

داد. با افزایش شدت تنش، میزان بیان ژن افزایش یافت به طوری که میزان بیان ژن *DHN5* از مقدار ۴/۲۰ در شاهد (۹۰ درصد ظرفیت زراعی) به مقدار ۵/۲۹ در ۴۰ 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 ۰/۰۱ و ۰/۰۵ بسیار معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف افزایش



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی برای صفت بیان نسبی ژن *wdhn5* در دهن‌دین 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 ۵ 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.

برقرار است. از آنجایی که نقش ژن دهن‌دین ۳ در پایداری غشا و جلوگیری از پسابیدگی یاخته‌ای است، نتایج می‌تواند مؤید اهمیت آن به عنوان ژن نامزد در تحمل به تنش خشکی در گیاه جو باشد (Hosseini Nejad *et al.* 2014).

در پاسخ القایی خانواده ژنی دهن‌دین‌ها 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 ۲۱ روز و ژن‌های *Dhn1*، *Dhn3*، *Dhn5*، *Dhn7*، *Dhn9* پس از ۲۸ روز از زمان عمل تنش در رقم متحمل یوسف را نشان داده، در حالی که در رقم حساس مورکو، القایی در بیان هیچ یک از ژن‌های دهن‌دین در این دو مرحله صورت نگرفته است (Abedini *et al.* ۲۰۰۷).

گروهی دیگر در سال ۲۰۰۷ پژوهشی با عنوان، بیان بیش از اندازه ژن *DHN5* گندم را در گیاه آراییدوپسیس 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 دهن‌دین ۳ 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 ژن با نشت الکترولیتی

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, Lumberras 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.
- Labhili 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.

- 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.

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 Shahi¹, Nafiseh Mahdinezhad¹, Fatemeh Haddadi², Bahman Fazeli-Nasab³

1. Department 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 *Spltoheids* is sensitive to drought.

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