

واکنش فیزیولوژیک و بیان ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی در ارقام متحمل و حساس گندم نان

Physiological response and expression of genes involved in drought tolerance in tolerant and susceptible bread wheat cultivars

فواد فاتحی^{۱*}، حمید محمدی^۲

Foad Fatehi^{1*}, Hamid Mohammadi²

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

1. Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
2. Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

تنش خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که رشد و نمو گیاه را تنظیم کرده و تولید گیاه را محدود می‌کند. گیاهان از طریق تغییر متابولیسم سلولی‌شان و مکانیسم‌های دفاعی مختلف می‌توانند به تنش رطوبتی واکنش نشان داده و سازگار شوند. دست‌ورزی سطوح سیستم دفاعی آنتی اکسیداتیو و تجمع اسمولیت‌های سازگار ممکن است عملکرد را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، هدف از این مطالعه، پیدا کردن رابطه بین بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و پرولین به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی در ارقام گندم تحت تنش بود. بدین منظور یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل دو رقم گندم ایرانی (رقم پیش‌تاز، رقم نیک‌نژاد)، سه سطح تنش خشکی بودند. تنش خشکی منجر به کاهش کلروفیل a، کلروفیل b، کل و عملکرد در هر دو رقم شد که کاهش در رقم متحمل نیک‌نژاد کمتر بود. تنش خشکی منجر به افزایش محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و SOD شد. تحمل نسبی رقم متحمل نیک‌نژاد به تنش خشکی را می‌توان به افزایش محتوای کلروفیل و پرولین بیشتر که به‌طور نزدیکی به سیستم دفاعی اکسیداتیو (شامل آنزیم‌های CAT، APX و SOD) ارتباط دارند، نسبت داد. همچنین آنالیز بیان ژن نشان داد که سطوح بیان ژن‌های CAT، APX، SOD و P5C5 در تنش خشکی افزایش یافت. رقم نیک‌نژاد ظرفیت آنتی اکسیدانتی بالا و القاء بیان ژن‌های مرتبط با تنش بهتری تحت تنش خشکی داشت. بنابراین، این رقم کارایی بهتری در مقایسه با پیش‌تاز در شرایط تنش دارد. به نظر می‌رسد در بین ژن‌های مورد بررسی، ژن‌های SOD و P5C5 نقش مهمی در واکنش به شرایط تنش خشکی داشتند.

عملکرد،

آنتی اکسیدان‌ها،

پرولین،

بیان ژن،

تنش خشکی،

گندم.

مقدمه

شرایط اقلیمی خشک و نیمه خشک که اکثر مناطق کشور ما را در برمی‌گیرد، سبب محدودیت منابع آبی و امکانات تولید محصولات زراعی شده است. رشد سریع جمعیت از یک طرف و کاهش یا ثابت ماندن منابع از طرف دیگر بررسی راه‌های استفاده بهینه از پتانسیل‌های تولید مواد غذایی را جهت بهره‌وری بیشتر ضروری می‌سازد (Shiferaw *et al.* 2013). گندم یکی از مهمترین مواد غذایی است که با سطح زیر کشت ۲/۱ میلیون کیلومتر مربع و تولید جهانی ۷۰۰ میلیون تن، ۲۰ درصد کالری را برای جمعیت جهان به ارمغان می‌آورد. به طوری‌که در مناطق دیم، گندم از نظر سطح زیر کشت رتبه اول را دارد و در شرایط فاریاب، براساس سطح زیر کشت در رتبه دوم بعد از برنج قرار دارد (Portmann *et al.* 2010). بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی، سطح زیر کشت کل غلات در ایران ۸۶۹۰۰۰۰ هکتار، تولید کل غلات تقریباً ۱۷ میلیون تن در هکتار و عملکرد کل غلات در ایران حدود ۲ تن در هکتار است (FAO 2014). تنش‌های غیرزیستی مثل خشکی به رشد و تولید گیاه زراعی آسیب رسانده و امنیت غذایی جهانی را تهدید می‌کند (Lobell and Gourdjji 2012). متابولیسم هوازی در گیاهان منجر به تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. ROS دائماً در گیاهان در شرایط پایدار فیزیولوژیکی تولید می‌شود و گیاهان برای پاک‌سازی موثر و حفظ سطوح ROS در سطوح غیر آسیب‌پذیر تکامل یافته‌اند. با این حال، زمانی که گیاهان در معرض شرایط تنش غیر زیستی یا زیستی قرار می‌گیرند، تولید ROS بیش از ظرفیت پاک‌سازی آن‌ها شده و منجر به ایجاد رادیکال‌های بسیار واکنش‌پذیر می‌شود که قادر به تحمیل آسیب زیادی به غشاءها، DNA و پروتئین‌ها هستند (Asada 1999). از طرف دیگر این مولکول‌های فعال، زمانی که در پایین‌تر از سطوح غیر آسیب‌پذیر حفظ می‌شوند، مولکول‌های پیام‌رسان مفیدی هستند که در تقویت پیام تنش، برای فعال کردن سازوکار تطابق و دفاع درگیر می‌شوند (Noctor and Foyer 1998).

خشکی یا تنش کمبود آب یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) از جمله سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروکسیل ($\cdot OH$)، پرهیدروکسی ($HO_2^{\cdot}$) و آلکوکسی ($RO\cdot$)، اکسیژن منفرد (1O_2) و نیز هیدروژن پراکسید (H_2O_2) را افزایش می‌دهد. معمولاً ROS در اندامک‌های سلولی مثل کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم، آپوپلاست و غشاهای آن‌ها که در انتقال الکترون فعال درگیرند، تولید می‌شوند (Asada 1999). همچنین این اندامک‌ها جایگاه آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مختلف مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و غیره، با پتانسیل فرونشانی گونه‌های اکسیداتیو بسیار واکنش‌پذیر، برای حفظ هموستازی کل گیاه هستند (Smirnoff 1995). به علاوه گیاهان مجهز به پاک‌سازی کننده‌های غیر آنزیمی شناخته شده‌ای مثل آسکوربات، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها هستند (Noctor and Foyer 1998). ارقام زراعی با داشتن یک سازوکار دفع آنتی‌اکسیدانی موثر، به کمک افزایش تولیدات پاک‌سازی‌کننده‌ی آنزیمی و غیر آنزیمی، توانایی تحمل شرایط نامساعد مثل تنش خشکی را توسعه داده‌اند. به عبارتی ارقام زراعی با توانایی افزایش پتانسیل‌شان برای کاهش اثرات مضر آسیب اکسایشی که توسط خشکی و دیگر تنش‌های غیر زیستی ایجاد می‌شود، به‌طور معنی‌داری باعث عملکردهای بالاتر می‌شوند (Caverzan *et al.* 2016).

توسعه صنعت متکی بر گندم به همراه افزایش تقاضا برای آن و همچنین مساعد بودن شرایط آب و هوایی در بسیاری از نقاط کشور، پژوهش‌های بیشتری را، بویژه در زمینه به نژادی گندم و گزینش ارقام متحمل به تنش‌های محیطی از جمله تنش کم‌آبی و اسمری طلب می‌نماید. هر اقدامی برای اصلاح ژنتیکی تحمل به خشکی با استفاده از تنوع ژنتیکی موجود، نیاز به یک روش ارزیابی کارآمد دارد که باید سریع بوده و قادر به انتخاب یک جمعیت بزرگ باشد (Fabriani and Lintas 1988). مقاومت به خشکی نتیجه صفات مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است (Khan *et al.* 2018). بنابراین، می‌توان از این اجزای مختلف به عنوان شاخص‌های گزینش برای انتخاب تیپ ایده‌آل گیاهی استفاده کرد. همچنین تا وقتی که کشاورزی

مقاوم و حساس گندم نان، یک آزمایش گلدانی در گلخانه آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در آبان ماه ۹۷ اجرا شد. بذور دو رقم گندم ایرانی (نیک‌نژاد و پشتاز) در گلدان‌های ۲/۵ لیتری کشت شدند. تا اواخر اسفند در محیط بیرون جهت ورنالیزاسیون قرار گرفتند. تنش خشکی به روش وزنی در سه سطح (FC, 30%FC, 60%FC) در مرحله ساقه رفتن تا پایان برداشت انجام شد. در مرحله سنبله‌دهی، تعدادی بوته از هر گلدان که به‌طور هم‌زمان وارد سنبله‌دهی شدند، علامت‌گذاری شدند و برای آنالیز صفات در نظر گرفته شدند. نمونه‌های برگ‌ی در مرحله سنبله‌دهی از برگ پرچم برداشت شده و سریعاً در نیتروژن مایع انداخته و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک: در هنگام رسیدگی فیزیولوژیک، عملکرد بیولوژیک، وزن هزار دانه و عملکرد دانه تعیین شد.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک: در این آزمایش در مرحله سنبله‌دهی، صفات محتوای کلروفیل a, b و کل، محتوای پروتئین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل: بر مبنای روش (Arnon 1949) انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۱ گرم نمونه برگ‌ی از تمامی تیمارها را در هاون چینی با ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملاً ساییده و حجم نهایی عصاره به ۱۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. سپس عصاره با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ صاف شد. از دستگاه پلیت‌ریدر برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها استفاده شد. میزان جذب عصاره استخراج‌شده در طول‌موج‌های ۶۴۵ نانومتر و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد. سپس با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a, کلروفیل b و کلروفیل کل محاسبه شد:

$$W \times 1000 / V \times [(2.69 \times A_{645}) - (12.7 \times A_{663})] = \text{میلی گرم کلروفیل a در هر گرم برگ تر}$$

مهمترین مصرف‌کننده منابع آب در کشور است، کارایی استفاده از آب در کشاورزی نیازمند حفاظت منابع محدود آن است (Nazari et al. 2018). افزایش کارایی استفاده از آب می‌تواند با استراتژی‌های بسیاری حاصل گردد. یکی از این راه‌کارها تغییر توان گیاهان زراعی برای تولید عملکرد قابل قبول تحت شرایط کم آبیاری می‌باشد چرا که گیاهان دارای طیف وسیعی از مکانیسم‌ها برای مقابله با خشکی هستند (Karimzadeh et al. 2012). بنابراین به کارگیری ارقام متحمل به خشکی و روش‌های به‌زراعی خاص امکان استفاده بهینه از مناطق نیمه خشک و دیم را میسر نموده و به سطح زیرکشت اراضی می‌افزاید. از آنجایی که شکاف بزرگی بین عملکرد پتانسیل و عملکرد گندم در مزرعه وجود دارد و آب یکی از نهاده‌های کلیدی برای کاهش خلاء عملکرد است، پس باید مطالعات دقیق‌تری بر روی آن انجام شود (Bandyopadhyay 2014). رشد عملکرد گندم به شدت تحت تأثیر کمبود رطوبت خاک و مرحله از زندگی گیاه که این کمبود اتفاق می‌افتد قرار دارد. کمبود آب به‌خصوص بعد از گلدهی از مشکلات اساسی کاهش عملکرد در گندم است. که غالباً با افزایش دما و کمبود رطوبت نسبی هوا تشدید می‌شود. با وجودی که خشکی تمام مراحل زندگی گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهد، تنش خشکی آخر فصل، کاهش عملکرد بیشتری را باعث می‌شود و شدت و مدت تنش خشکی میزان کاهش عملکرد را تعیین می‌کند (Almeselmani 2012). در این تحقیق هدف تشخیص انعطاف پتانسیل گندم به خشکی آخر فصل و همچنین بررسی فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی می‌باشد. به دلیل اینکه عملکرد گندم به شدت به شرایط محیطی حساس است، کمبود عملکرد فرایندی پیچیده است که نتیجه ارتباط اجزای عملکرد و فاکتورهای محیطی است. یافتن درک جامعی از تأثیر خشکی آخر فصل بر صفات فیزیولوژیکی و ژن‌های دخیل برای پیشرفت در افزایش تحمل به خشکی ضروری است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر عملکرد، برخی پارامترهای فیزیولوژیک و بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به خشکی در ارقام

مقدار و غلظت آنزیم‌ها و سایر اجزای واکنش بر اساس دستورالعمل این کیت تهیه و تنظیم شد. به منظور بهینه کردن این فرآیند از روش استفاده همزمان OligodT و پرایمرهای تصادفی در حضور آنزیم Reverse transcriptase و بکار بردن مقدار $1\mu\text{g}$ RNA برای انجام واکنش استفاده گردید. برای انجام این واکنش ابتدا مخلوط RNA، پرایمرها و آب DEPC به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس میکروتیوب حاوی اجزای واکنش به محیط سرد منتقل شد. در مرحله بعد، به نمونه‌ها مخلوط آنزیم و بافر اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از اتمام فرآیند سنتز، در نهایت برای غیرفعال کردن آنزیم Reverse transcriptase، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت از نمونه‌های به دست آمده جهت بررسی بیان ژن با روش PCR در زمان واقعی استفاده شد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- مواد شیمیایی و مقادیر بکار رفته در واکنش سنتز cDNA

Table 1- Chemicals used in cDNA synthesis reaction

Chemicals ماده شیمیایی	Amount مقدار
Buffer 5X	$4\mu\text{l}$
HyperScript TM RT Enzyme 2X	$1\mu\text{l}$
Oligo dT Primer ($50\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
Random 6 mers ($100\mu\text{M}$)	$1\mu\text{l}$
total RNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$1\mu\text{l}$
RNase Free dH ₂ O	$12\mu\text{l}$
Final Volume حجم نهایی	$20\mu\text{l}$

جدول ۲- مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده در واکنش RTqPCR

Table 2- Chemicals used in RTqPCR reaction

Chemical ماده شیمیایی	Amount مقدار
cDNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2\mu\text{l}$
SYBR premix 5X	$3\mu\text{l}$
Primer F ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)	$0.8\mu\text{l}$
Primer R ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)	$0.8\mu\text{l}$
ddH ₂ O	Up to $15\mu\text{l}$

$W = \frac{V \times [(4.69 \times A663) - (22.9 \times A645)]}{1000}$ میلی گرم
کلروفیل b در هر گرم برگ‌تر

$W = \frac{V \times [(8.02 \times A663) + (20.2 \times A645)]}{1000}$ میلی گرم
کلروفیل کل در هر گرم برگ‌تر

در روابط بالا A میزان جذب در طول موج موردنظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد برحسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ تازه برحسب گرم می‌باشد.

سنجش محتوای پروکلین: سنجش محتوای پروکلین با استفاده از دستگاه پلیت‌ریدر و در دمای $25^\circ\text{C} \pm 1$ با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد.

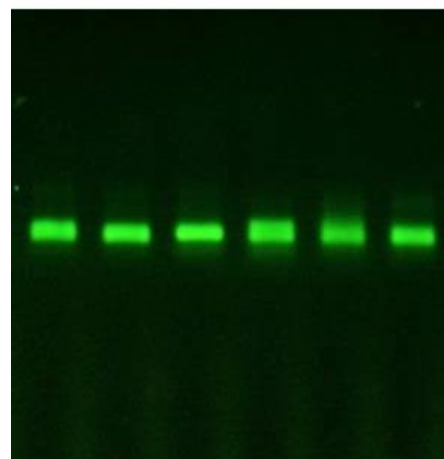
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای 25°C درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: مقدار فعالیت آنزیم با روش Ranieri و همکاران (۲۰۰۳) سنجیده شد. در اثر واکنش بین آسکوربات پراکسیداز و اسیدآسکوربیک و H_2O_2 دهیدروآسکوربات تولید می‌شود که در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز براساس روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۰) انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA از برگ از روش ترایزول استفاده شد (Chomczynski and Sacchi 1987). برای از بین بردن ناخالصی ناشی از DNA در RNA استخراج شده، از تیمار با آنزیم RNase-free DNase I شرکت فرمنتاز استفاده گردید. برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرولیتر EDTA با ۵۰ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 75°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز، نانودراپ NanoDrop (ThermoScientific 2000c, USA) و اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید. تبدیل RNA به cDNA به کمک کیت RevertAidTM First

طراحی آغازگر: از آنجایی که در پایگاه بین‌المللی NCBI، توالی ژن‌های مورد بررسی در گیاه گندم موجود بود، از این توالی‌ها برای طراحی آغازگر در نرم‌افزار Oligo7 مورد استفاده گردید. در نهایت آغازگرهای طراحی‌شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در نرم‌افزار primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفتند. لیست آغازگرهای طراحی‌شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۱- استخراج RNA

Figure 1- RNA extraction

جدول ۳- لیست آغازگرهای طراحی شده

Table 3- List of designed primers

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Tm, °C	Product size, bp	Accession number
Actin	F	CACGCTTCCTCATGCTATC	58	123	AB181991.1
	R	CTGACAATTTCCCGCTCAG			
SOD	F	GGGCACCTGAAGATGAAATC	58	120	FJ890986.1
	R	TTGAATTTGGTCCAGTAAGGG			
APX	F	CCAGCACCAACAAGTGATAC	58	121	AY513261.1
	R	CCAGCACCAACAAGTGATAC			
CAT	F	GCGAGAAGATGGTGATCG	58	143	GU984379.1
	R	CTTGATCTCATGGGTGAGG			
P5CS	F	CCAGGAAAGATAGCAAGSS	58	101	KC175596.1
	R	AAACCATCAGCAACCTCTG			

و مرجع با بازدهی نزدیک به هم و بیش از ۹۹ درصد تکثیر می‌شوند. بنابراین پیش از استفاده از این روش لازم است که از برقرار بودن این شرط اطمینان حاصل کرد. بدین منظور بایستی بازدهی تکثیر ژن‌های مرجع و هدف از طریق رسم منحنی استاندارد تعیین شود. تمام مراحل این آزمون با رعایت نکات ایمنی و در محیط عاری از آنزیم RNase انجام گرفت.

نحوه محاسبات آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گردید.

بررسی بیان ژن: برای ارزیابی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه، نمونه‌های منجمد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA کل مورد استفاده قرار گرفتند. پس از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA مقدار بیان ژن در حضور ژن کنترل Actin آزمایش شد. همزمان با انجام واکنش Real Time PCR استانداردسازی جهت تعیین کارایی تکثیر و ضریب تبیین شیب خط رگرسیون، با هدف تعیین فرمول مناسب برآورد نسبت واقعی بیان ژن‌های مورد مطالعه انجام شد که میزان کارایی تکثیر حدود ۹۹ درصد محاسبه گردید. بر این اساس برای محاسبه بیان ژن‌ها با بکارگیری فرمول ($2^{\Delta\Delta Ct}$) استفاده گردید (Schmittgen and Livak 2008). در این روش فرض بر این است که ژن‌های هدف

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و ارقام بر صفت عملکرد دانه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین عملکرد دانه مربوط به رقم نیک‌نژاد در شرایط بدون تنش بود که تنش خشکی در هر دو سطح باعث کاهش معنی‌دار عملکرد دانه در هر دو رقم شد اما میزان کاهش در رقم نیک‌نژاد در شرایط تنش کمتر بود (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد که رقم نیک‌نژاد پایداری عملکرد دانه بیشتری در

شرایط تنش خشکی اعمال شده دارد. بنابراین عدم کاهش شدید عملکرد دانه رقم نیک‌نژاد تحت تنش نشان‌دهنده مقاوم‌تر بودن رقم نیک‌نژاد پیشتاز نسبت به رقم پیشتاز بود (شکل ۲). دلیل کاهش عملکرد در شرایط تنش خشکی به احتمال زیاد کاهش تقسیم سلولی (Singh and Jenner 1984)، کاهش ظرفیت ذخیره‌سازی فتواسیملات‌ها در دانه (Bulm 1998)، کاهش دوره رشد دانه (Ahmadi and Baker 2001) می‌باشد که البته در این شرایط احتمالاً انتقال مجدد ذخایر انبار شده از قبل در ساقه‌ها به دانه‌های در حال رشد تحریک شده و این عمل جبران کاهش عملکرد ناشی از کاهش دوره رشد دانه را می‌کند (Yang and Zhang 2006).

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک مورد مطالعه

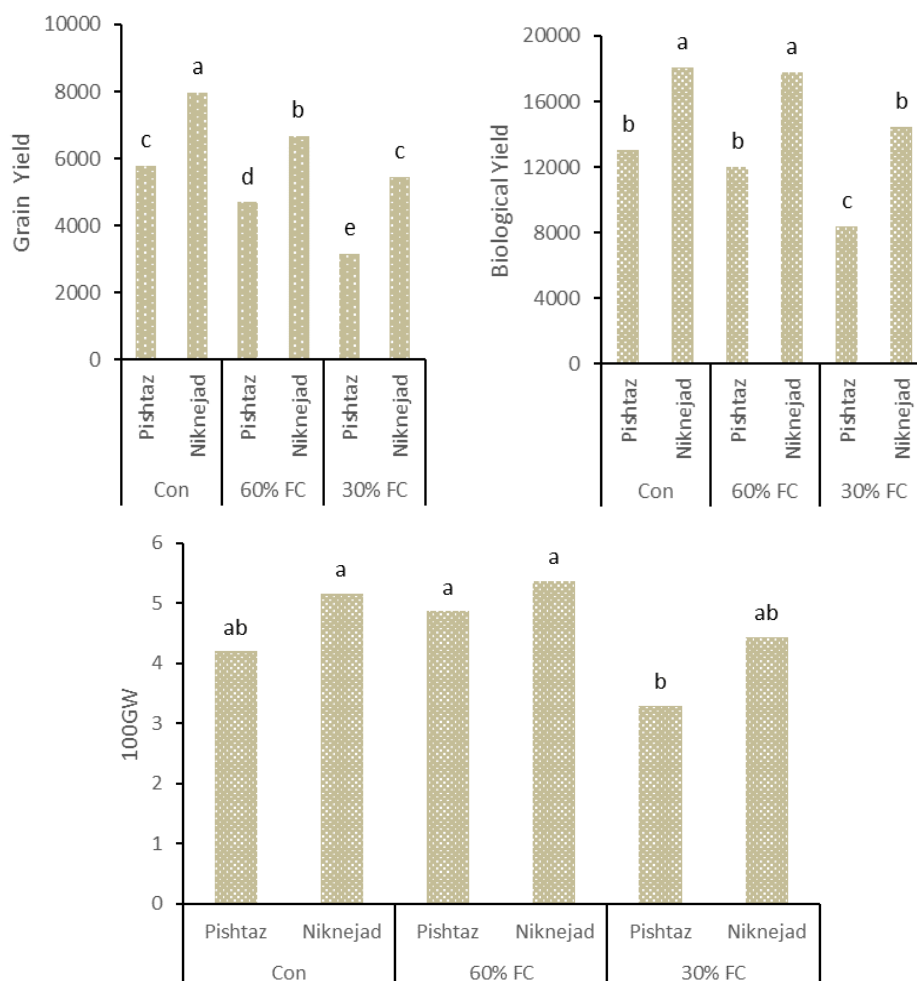
Table 4- Analysis of variance (ANOVA) for studied morphological traits

وزن هزار دانه (1000 grain weight)	عملکرد بیولوژیک (Biological Yield)	عملکرد دانه (Seed Yield)	درجه آزادی (d.f)	منابع تغییرات (Source)
3.46**	141703000.88**	20899836.53**	1	رقم (Cultivar)
2.43**	29650062.38**	10043776.354**	2	تنش خشکی (Drought Stress)
0.16 ^{ns}	402947.38 ^{ns}	36307.27*	2	رقم*تنش خشکی (Cultivar*Drought stress)
0.06	267089.83	7586.00	12	اشتباه آزمایشی (Error)

ارقام شامل پیشتاز و نیک‌نژاد می‌باشد.

*، ** به ترتیب معنی داری در سطح ۵ و یک درصد؛ ^{ns}، عدم اختلاف معنی دار.

* and ** Significant at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively. ns, Not significant. Cultivars were Pishtaz and Niknejad.



شکل ۲- مقایسه میانگین صفات عملکرد دانه (کیلوگرم)، عملکرد بیولوژیک (کیلوگرم) و وزن صد دانه (گرم) تحت شرایط تنش خشکی در سه سطح (کنترل، ۶۰ درصد ظرفیت مزرعای و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعای) در ارقام پیشتاز و نیک‌نژاد.

Figure 2- Mean comparison of Grain Yield, Biological Yield and 100 Grain Weight traits under drought stress in two cultivars of wheat

خشک اندام‌های هوایی را بیش‌تر از وزن ریشه کاهش می‌دهد (Grigore et al. 2010).

وزن دانه یک جزء کلیدی عملکرد در غلاتی مثل گندم و برنج است و به عنوان یک عامل اصلی در بهبود عملکرد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Calderini et al. 1999). نتایج نشان داد که اثر تنش خشکی و ارقام تاثیر معنی‌داری بر صفت وزن صد دانه داشتند (جدول ۴). جدول مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین وزن صد دانه مربوط به شرایط عدم تنش خشکی و تنش در هر دو سطح در رقم نیک‌نژاد و شرایط عدم تنش و تنش خشکی متوسط در رقم پیشتاز بود. به عبارتی تنش خشکی شدید باعث کاهش وزن دانه در رقم پیشتاز شد، ولی رقم نیک‌نژاد در

اثرات اصلی تنش خشکی و ارقام بر عملکرد بیولوژیک معنی‌دار بود، ولی اثر متقابل تنش خشکی و ارقام بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۴). اعمال تنش خشکی موجب کاهش معنی‌داری در عملکرد بیولوژیک در ارقام مورد بررسی شد. درصد کاهش عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش نسبت به کنترل همواره در رقم نیک‌نژاد کمتر از رقم پیشتاز بود (شکل ۲). تولید ماده خشک در گیاهان یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیر گذار بر روی عملکرد می‌باشد. این صفت نشان‌دهنده پتانسیل گیاه در جذب نور و تبدیل انرژی نورانی به شیمیایی می‌باشد (Reynolds et al. 2009). در پژوهشی با بررسی اثر تنش رطوبتی بر برخی محصولات روغنی متعلق به خانواده براسیکاسه گزارش شده است که تنش آب، وزن

شرایط تنش خشکی شدید کمتر تحت تاثیر قرار گرفت (شکل ۲) که احتمالا علت آن مرتبط به انتقال مجدد بالاتر ترکیبات ثانویه از ساقه به دانه‌های در حال رشد این رقم باشد.

صفات فیزیولوژیک: نتایج نشان داد که اثر تنش خشکی و ارقام، تاثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a, b و کل داشتند (جدول ۵). بیشترین محتوای کلروفیل a مربوط به رقم پیشتاز در تنش سطح ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای، کمترین مربوط به هر دو رقم در تنش سطح ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای بود (شکل ۳). بیشترین محتوای کلروفیل b و کل در شرایط بدون تنش و تنش سطح ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای در رقم نیک‌نژاد مشاهده شد و کمترین آن در رقم پیشتاز در تنش سطح ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای مشاهده گردید (شکل ۳). Singh and Usha (2003) گزارش کردند که افزایش محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم رابیسکو با افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همراه بوده و در نهایت تجمع ماده خشک افزایش می‌یابد. گزارش‌های دیگری نشان داده که تنش خشکی به دلیل تولید انواع اکسیژن فعال در تیلاکوئیدها سبب کاهش غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئید در گیاهان می‌گردد (Farooq et al. 2009; Jaleel et al. 2007). کاهش در محتوای کلروفیل توسط پژوهشگران مختلفی گزارش شده است (Munné-Bosch and Alegre 2004; Haisel et al.).

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه

Table 5- Analysis of variance (ANOVA) for studied physiological traits

منابع تغییرات (Source)	درجه آزادی (d.f)	محتوای کلروفیل a (Chlorophyll a content)	محتوای کلروفیل b (Chlorophyll b content)	محتوای کلروفیل کل (Total Chlorophyll content)	محتوای پروлін (Proline content)	فعالیت کاتالاز (CAT activity)	فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX activity)	فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD activity)
رقم (Cultivar)	1	0.002 ^{ns}	0.14 ^{**}	0.10 ^{**}	114.00 ^{**}	23.12 ^{**}	1899.33 ^{**}	8986.93 ^{**}
تنش خشکی (Drought Stress)	2	0.016 ^{**}	0.07 ^{**}	0.14 ^{**}	814.20 ^{**}	298.95 ^{**}	5499.72 ^{**}	51014.67 ^{**}
رقم*تنش خشکی (Cultivar*Drought stress)	2	0.001 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.00 ^{ns}	62.05 ^{**}	10.80 ^{**}	514.65 ^{**}	18570.93 ^{**}
اشتباه آزمایشی (Error)	12	0.001	0.001	0.003	7.73	0.85	28.50	430.07

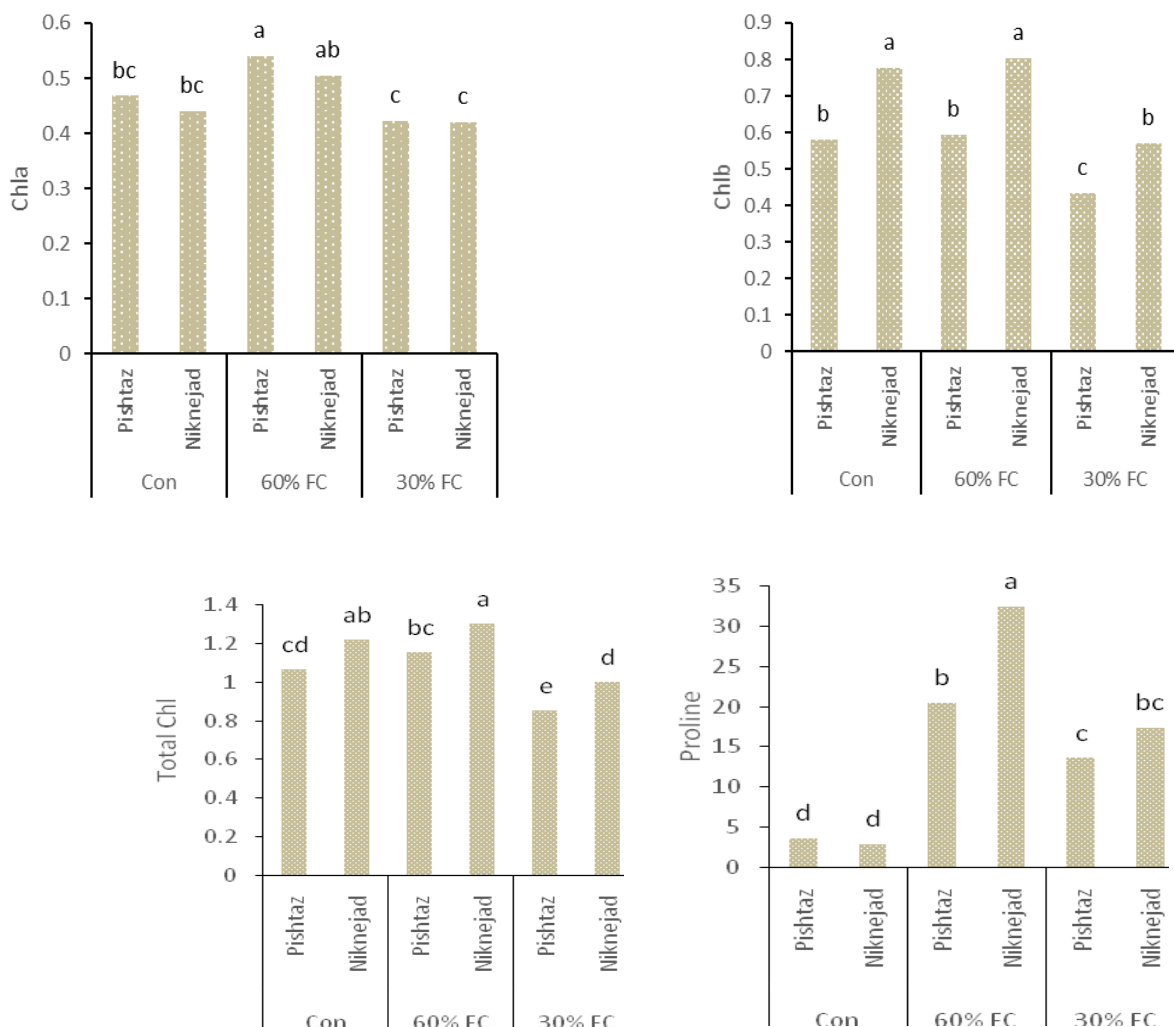
ارقام شامل پیشتاز و نیک‌نژاد می‌باشد.

ns، عدم اختلاف معنی‌دار. **، * به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ و یک درصد؛ ns، عدم اختلاف معنی‌دار.

* and ** Significant at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively. ns, Not significant. Cultivars were Pishtaz and Niknejad.

می‌کنند (Szegletes *et al.* 2000). بنابراین تنظیم اسمزی تحت عنوان تجمع اسمولیت‌هایی مانند گلیسی بتائین، پرولین، پلی‌آمین، پلی‌اول‌ها، و یون‌ها بخش مهمی از مکانیسم تحمل به تنش خشکی است. تنظیم اسمزی به میزان تنش خشکی بستگی دارد و ممکن است مدتی طول بکشد، زیرا کاهش سریع وضعیت آب گیاه زمانی برای تنظیم اسمزی فراهم نمی‌کند. به همین خاطر ممکن است تنظیم اسمزی مکانیسم موثر مقاومت به خشکی در شرایط وقوع سریع آن نباشد.

نتایج نشان داد اثر متقابل تنش خشکی و ارقام بر محتوای پرولین در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). بیشترین محتوای پرولین در شرایط تنش خشکی متوسط در در رقم نیک‌نژاد مشاهده شد و کمترین آن در رقم پیشتاز در تنش خشکی شدید مشاهده گردید (شکل ۳). تحت تنش خشکی گیاهان گندم مجبور به کاهش پتانسیل آب داخلی خود به منظور فرار از پسابیدگی و بالا نگه‌داشتن تعادل پتاسیل آبی خود هستند. برای رسیدن به چنین هدفی، سلول‌های گیاهی اسمولیت‌های کمک‌کننده به فرآیند تنظیم اسمزی ساخته و از این طریق تعادل آبی سلول‌ها را حفظ

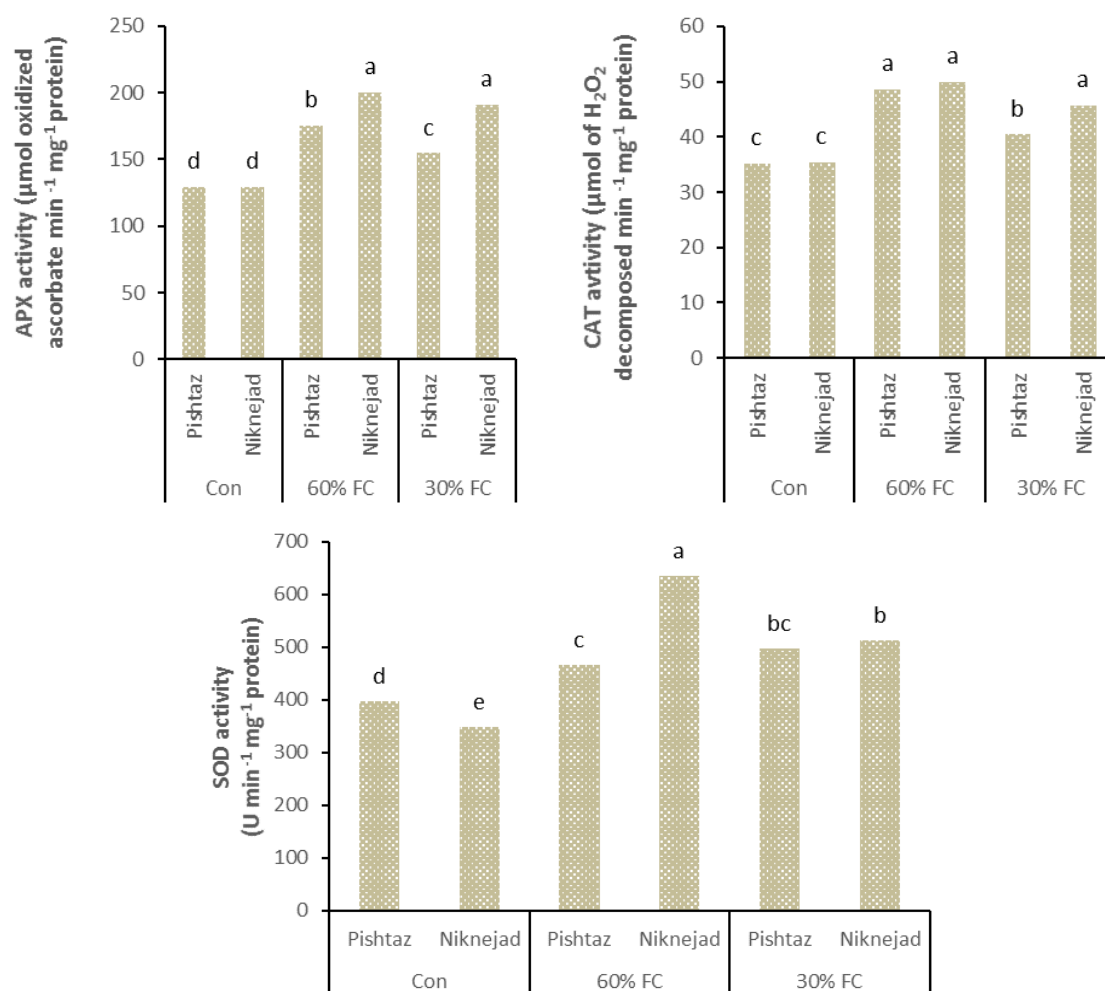


شکل ۳- مقایسه میانگین صفات کلروفیل a, b و کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، محتوای پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) تحت شرایط تنش خشکی در سه سطح (کنترل، ۶۰ درصد ظرفیت مزرعای و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعای) در ارقام پیشتاز و نیک‌نژاد.

Figure 3- Mean comparison of Chlorophyll a, b and Total (mg/g FW), Proline contents ($\mu\text{mol/g FW}$) traits under drought stress in two cultivars of wheat.

شرایط تنش خشکی شدید در رقم پیشناز مشاهده شد. APX گرایش بالایی به H_2O_2 دارد و قادر است در غلظتهای کم، H_2O_2 را سمزدایی کند (Gupta 2011). بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تنش خشکی ۶۰ درصد ظرفیت مزرعهای و کمترین آن در شرایط بدون تنش در هر دو رقم و تنش خشکی شدید در رقم پیشناز مشاهده شد (شکل ۴). گیاهان معمولاً فعالیت پراکسیداتیوها یا گلوکاتایوردوکتاز را در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی خشکی را افزایش می‌دهند. پژوهشگران نشان دادند که سیستم پاک‌سازی هیدروژن پراکسید در ژنوتیپ‌های مختلف گندم در شرایط کمبود آب بیشتر فعال است (Bartoli et al. 1999).

ارقام گندم با قدرت تنظیم اسمزی بالا خشکی را بهتر از ارقام دارای قابلیت کمتر در این فرآیند تحمل می‌کنند (Nayyar and Walia 2003). نتایج نشان داد اثر متقابل تنش خشکی و ارقام بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی متوسط در هر دو رقم و تنش خشکی شدید در رقم نیک‌نژاد مشاهده شد و حداقل فعالیت این آنزیم در شرایط بدون تنش در هر دو رقم مشاهده شد. CAT مسئول سمزدایی سطوح افزایش یافته H_2O_2 است (Gupta 2011). حداکثر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم نیک‌نژاد در هر دو شرایط تنش مشاهده شد و کمترین آن در

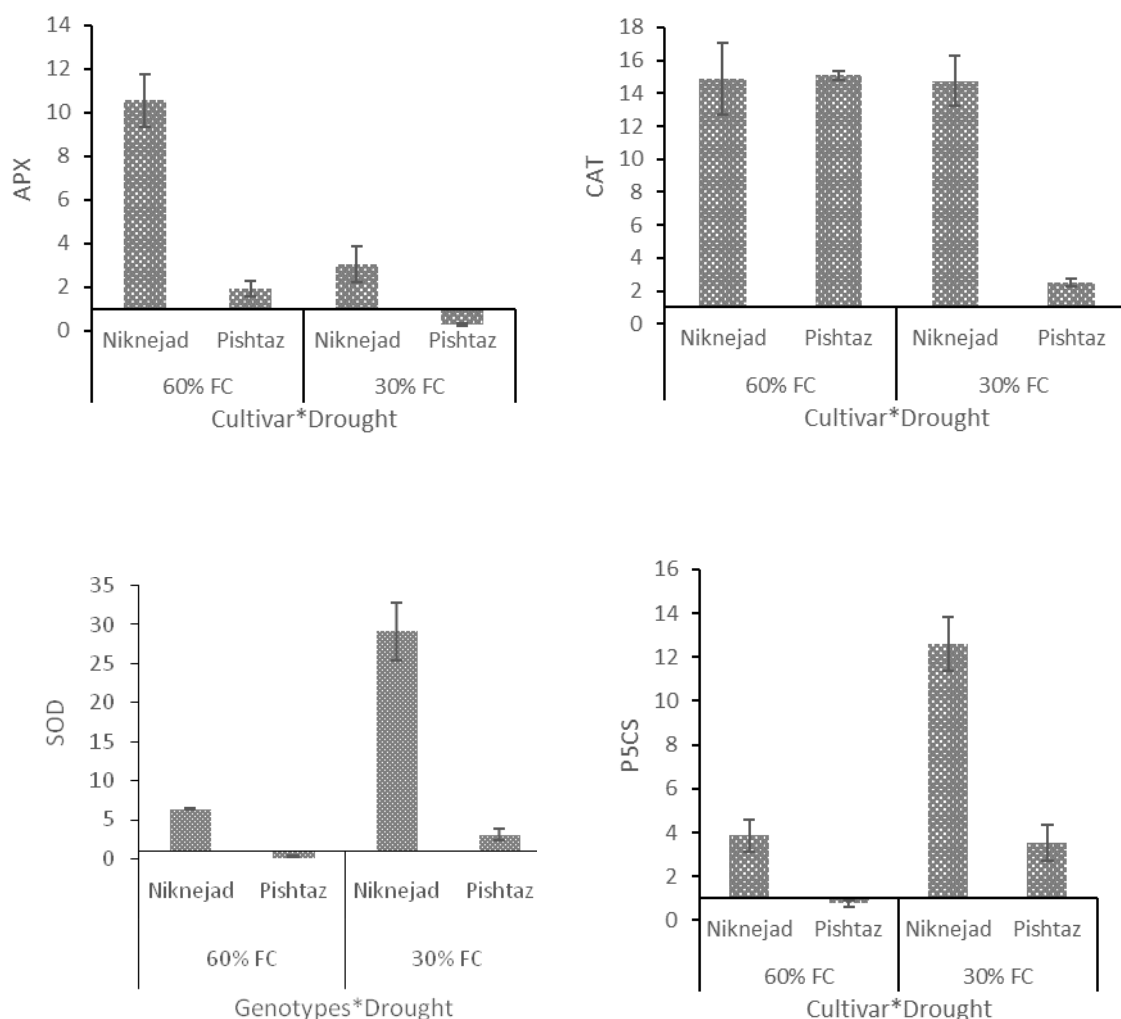


شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تنش خشکی در سه سطح (کنترل، ۶۰ درصد ظرفیت مزرعهای و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعهای) در ارقام پیشناز و نیک‌نژاد.

Figure 4- Mean comparison of CAT, APX and SOD traits under drought stress in two cultivars of wheat

بررسی بیان ژن: بررسی میزان بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدان در هر دو رقم در شرایط تنش و بدون تنش مشخص گردید که بیشترین میزان بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در تنش خشکی ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای در رقم نیک‌نژاد و کمترین آن در هر دو شرایط در رقم پیشتاز بود (شکل ۵). تحقیقات مختلف نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (Sairam and Srivastava 2002). از آنجا که آسکوربات 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). آسکوربات پراکسیداز دارای بالاترین توانایی در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشند و این توانایی بالاتر به دلیل فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها می‌باشد (Renu and Devarshi 2007). APX یک آنزیم کلیدی در سامانه مهار آنزیم ROS است که می‌تواند H_2O_2 تولید شده در کلروپلاست را از بین ببرد (Shen et al. 1997). تنش‌های محیطی موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی و تجمع پراکسید هیدروژن در پاسخ به تنش می‌شود (Blokhina et al. 2001). از طرفی دیگر، یکی از مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی سوپر اکسید دیسموتاز

(SOD) می‌باشد. بسیاری از پژوهشگران آن را قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان 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). گزارش شده تنش خشکی در ارقام مختلف گندم سبب بالا رفتن بیشتر سوپر اکسید دیسموتاز شد. آنها نقش مهمتر این آنزیم در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن، نسبت به دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را دلیل این افزایش بیشتر دانستند. گیاهان در شرایط طبیعی و عدم تنش به منظور حفظ و ایجاد تعادل هموستازی درون سلول انواع متفاوتی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کنند. با این حال، در شرایط تنش این میزان افزایش خواهد یافت (Kar 2011). بنابراین، به منظور جلوگیری از تجمع این ترکیبات و به موازات آن کاهش رشد گیاه فعالیت برخی از مکانیسم‌های تنظیمی و آنزیم‌های جاروبرگر ضروری می‌باشد. مطالعات صورت گرفته بر روی تنش‌های اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تنش‌های خشکی و اسمزی بیانگر این نکته است که، فعالیت و بیان هر یک از ژن‌های دخیل در این مسیر تا حد زیادی به رقم فرآیندهای متابولیکی و شدت اعمال تنش بستگی دارد (Reddy et al. 2004). مطالعات نشان داده است که در گیاهچه‌های برنج میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در شرایط تنش اسمزی بسیار بیشتر از شرایط عدم تنش بوده است (Sharma et al. 2015).



شکل ۵- مقایسه میانگین بیان ژن‌های آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تنش خشکی در سه سطح (کنترل، ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) در ارقام پیشتاز و نیک‌نژاد.

Figure 5- Mean comparison of gene expression of CAT, APX and SOD traits under drought stress in two cultivars of wheat

ممانعت یا تغییر در تجمع زیرواحدهای آنزیم تحت شرایط تنش خشکی باشد. مقایسه نحوه پاسخ به تنش خشکی در سه رقم گندم پس از تنش حاکی از افزایش رونویسی ژن کاتالاز در رقم مقاوم و متوسط نسبت به رقم حساس بود که دلیل آن احتمالاً ناشی از وقوع جهش مفید در سیستم تنظیمی ژن کاتالاز می‌باشد، طوری که اتصال فاکتورهای رونویسی موجب تقویت سرعت رونویسی از این ژن می‌گردد. بیان ایزوزایم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در برگ‌های گیاهچه‌های رقم 134Cahngwu بسیار قوی و در رقم Shaan253 بسیار ضعیف بود. الگوی بیان ایزوزایم POD مشابه با کاتالاز تحت شرایط خشکی افزایش یافت. طبق نتایج SOD، CAT و POD نقش قابل توجهی در تعیین پاسخ

همچنین بیشترین میزان بیان ژن کاتالاز در تنش خشکی ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای در هر دو رقم و تنش خشکی شدید در رقم نیک‌نژاد و کمترین آن در شرایط تنش خشکی شدید در رقم پیشتاز مشاهده شد (شکل ۵). آنزیم کاتالاز از دسته پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده پراکسید هیدروژن در محیط زیاد باشد و تنش خشکی یکی از عوامل اصلی افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهان است (Garg and Manchanda 2009). به علاوه این آنزیم در ارقام مقاوم به صورت معنی‌داری بیشتر از میزان آن در ارقام حساس به تنش خشکی افزایش می‌یابد (Hameed et al. 2011). کاهش در بیان ژن می‌تواند به علت

ژنوتیپ‌های گندم به تنش خشکی ایفا می‌کنند (Yang and Deng 2010; Abedi and Pakniyat 2015).

بررسی میزان بیان ژن کلیدی دخیل در بیوستز پرولین (P5C5) نیز نشان داد که حداکثر بیان این ژن در رقم نیک‌نژاد در هر دو شرایط تنش بویژه در تنش خشکی متوسط و کمترین میزان بیان این ژن در رقم پیشتاز در شرایط تنش خشکی متوسط مشاهده شد که در این مورد با افزایش تنش نیز تا حدی روند صعودی داشت (شکل ۵). افزایش بیان ژن P5CS برای بالارفتن سطح پرولین در گیاه سیب زمینی با افزایش روزهای تنش اسمزی گزارش شده است (Kishor 1995). Savoure و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که بیان ژن P5CS به محض قرار گرفتن در تنش اسمزی افزایش یافته است. 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). مطالعات انجام شده بر روی ارقام مختلف گندم و ذرت تولید القایی پرولین و گلاسیسین بتائین (GB) را به عنوان مواد محلول سازگار مهم تحت تنش خشکی اثبات کرده است. این دو اسموپروتکتانت در حین کاهش پتانسیل اسمزی سلول، باعث حفظ میزان آب سلولی و پایداری ساختار سلولی از طریق تشکیل غلاف آب اطراف پروتئین‌ها می‌شود. پرولین و GB همچنین نقش محافظتی در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داشته و باعث پایداری ماکرومولکول‌ها (مانند پروتئین و نوکلئیک اسید) و ایفای نقش تأمین منبع کربن و نیتروژن تحت تنش خشکی می‌شود (Giri 2011; Marček et al. 2019).

از آنجا که عملکرد صفت بسیار پیچیده ای است، بنابراین هرگونه افزایش عملکرد از طریق تغییر مدیریت مزرعه و یا از

طریق برنامه‌های اصلاحی نیازمند شناخت دقیق عوامل تعیین کننده‌ی عملکرد می‌باشد (Acreche and Slafer 2006). در همین راستا، افزایش عملکرد از طریق مهندسی ژنتیک تنها زمانی حاصل می‌شود که مکانیزم‌های فیزیولوژیکی تعیین کننده عملکرد دانه به خوبی درک شده باشند و در این صورت است که می‌توان گلوگاه‌هایی که عملکرد را محدود می‌کنند را بدون هیچ‌گونه هزینه اضافی باز نمود. عملکرد دانه بالا و کیفیت خوب دانه‌ها اهداف مهم در زمینه تولید غلات می‌باشند (Fischer 2008). 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. در مطالعه حاضر بیان چهار ژن مرتبط با تنش (CAT, APX, SOD و P5C5) به همراه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای پرولین مورد بررسی قرار گرفت که در مطالعات توجه ویژه‌ای به نقش این ژن‌ها و آنزیم‌ها برای افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، حفاظت از غشاءها شده است. ژن P5C5 جزء اصلی در بیوستز 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). همچنین به نقش پرولین به عنوان محافظت کننده‌ی اسمزی و پاکسازی رادیکال‌های آزاد تاکید شده، بنابراین می‌توان این احتمال را داد که رقم نیک‌نژاد ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بالایی داشته و این مورد باعث اعطای تحمل به تنش خشکی شده است. سطوح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت CAT, APX و بویژه SOD در شرایط تنش خشکی در رقم نیک‌نژاد افزایش یافت. با توجه به اینکه تعداد زیادی از مطالعات، رابطه مثبت بین فعالیت SOD و تحمل در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی را نشان می‌دهند (Gill and Tuteja ۲۰۱۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزایش کارایی رقم نیک‌نژاد در مقایسه با پیشتاز در شرایط تنش مرتبط با افزایش فعالیت SOD و P5C5 باشد.

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 GA. 2006.** Grain weight response to increases in number of grains in a Mediterranean area. Field Crop Research 98: 52-59.
- Aebi H. 1984.** Catalase in vitro. Methods Enzymology 105: 121-126.
- Ahmadi A, Baker DA. 2001.** The effect of water stress on the activities of key regulatory enzymes of the sucrose to starch pathway in wheat. Plant Growth Regulation 35: 81-91.
- Akhila S, Abraham TK, Jaya D. 2008.** Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea *Vigna unguiculata* L. varieties. J. Environ. Biol. 29: 89-91.
- Almeselmani M. 2012.** Physiological parameters for evaluating drought tolerance in durum wheat varieties grown in the field in Syria. Journal of Biology 1(2): 122-141.
- Arnon DI. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24: 1-15.
- Asada K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Biology 50: 601-639.
- Bandyopadhyay KK, Pradhan S, Sahoo RN, Singh R, Gupta VK, Joshi DK, Sutradhar AK. 2014.** Characterization of water stress and prediction of yield of wheat using spectral indices under varied water and nitrogen management practices. Agricultural Water Management 146: 115-123.
- Bartoli CG, Simontacchi M, Tambussi E, Beltrano J, Montaldi E, Puntarulo S. 1999.** Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. Journal of Experimental Botany 50: 375.
- Bates L S, Waldren RP, Teare ID. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39(1): 205-207.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany 91(2): 179-194.
- Bulm A. 1998.** Improving wheat grain filling under stress by stem reserve Mobilization. Euphytica 100: 77-83.
- Calderini DF, Abeledo LG, Savin R, Slafer GA. 1999.** Final grain weight in wheat as affected by short periods of high temperature during pre-and post-anthesis under field conditions. Australian Journal of Plant Physiology 26: 453-458.
- Caverzan A, Casassola A, Patussi Brammer S. 2016.** Antioxidant responses of wheat plants under stress. Genet Mol Biol 39(1):1-6.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162(1):156-159.
- Dhindsa RS, Dhindsa PP, Thorpe TA. 1980.** Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid-peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 32:93-101.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa PL, Reid DM. 1982.** Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. Physiologia Plantarum 56(4): 453-457.
- Fabriani G, Lintas C. 1988.** Durum wheat: chemistry and technology.
- FAO 2014.** Food and Agriculture Organization of the United Nation, <http://apps.fao.or>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009.** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development 29: 185-212.
- Fischer RA. 2008.** The importance of grain or kernel number in wheat: a reply to Sinclair and Jamieson. Field Crop Research 105: 15-21.
- Garaghanipur N, Shiran B, Khodambashie M, Molaie AR. 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.
- Garg N, Manchanda G. 2009.** ROS generation in plants: boon or bane?. Plant Biosystems 143(1): 81-96.
- Gill SS, Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48(12):909-30.
- Giri J. 2011.** Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling & Behavior 6(11): 1746-1751.
- Grigore MN, Toma C, Boscaiu M. 2010.** Ecological implications of bulliform cells on halophytes, in salt and water stress natural conditions. Analele Stiintifice ale Universitatii "Al I Cuza" din Iasi, 56: 5-17.

- Gupta SD. 2011.** Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Science Publishers, P.O. Box 699, Enfield, NH 03748, USA. Pp, 129-145.
- Haisel D, Pospíšilová J, Synková H, Schnablová R, Baková P. 2006.** Effects of abscisic acid or benzyladenine on pigment contents, chlorophyll fluorescence, and chloroplast ultrastructure during water stress and after rehydration. *Photosynthetica* 44: 606-614.
- Hameed A, Bibi N, Akhter J, Iqbal N. 2011.** Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 178-185.
- Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2007.** Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59: 150-157.
- Kar RK. 2011.** Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1741-1745.
- Karimzadeh H, Emam Y, Moori S. 2012.** Responses of yield, yield components and drought resistance indices in bread and durum wheat cultivars to post-anthesis drought stress. *Iranian Journal of Field Crop Science* 43(1): 151-162. (In Farsi with English abstract)
- Khan A, Pan X, Najeeb U, Kean Yuen Tan D, Fahad S, Zahoor R, Luo H. 2018.** Coping with drought: stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biological Research* 51:47.
- Kishor PK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995.** Overexpression of $[\Delta 1]$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant physiology* 108(4): 1387-1394.
- Liu X, Huang B. 2000.** Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science* 40: 503-513.
- Lobell DB and Gourdji SM. 2012.** The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiology* 160:1686-1697.
- Marček T, Hamow KÁ, Végh B, Janda T, Darko E. 2019.** Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *PloS One* 14(2): e0212411
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2004.** Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
- Nayyar H, Walia DP. 2003.** Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum* 46(2): 275-279.
- Nazari B, Liaghat A, Akbari MR, Keshavarz M. 2018.** Irrigation water management in Iran: Implications for water use efficiency improvement. *Agricultural Water Management* 208:7-18.
- Noctor G, Foyer CH. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49: 249-279.
- Portmann FT, Siebert S and Döll P 2010.** MIRCA 2000 Global monthly irrigated and rain fed crop areas around the year 2000: A new high-resolution data set for agricultural and hydrological modeling. *Global Biogeochemical Cycles* 24(1):1-24.
- Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF. 2003.** Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54(392): 2529-2540.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004.** Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161(11): 1189-1202.
- Renu K, Devarshi S. 2007.** Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environ. Exp. Bot.* 60: 276-283.
- Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, Angus WJ. 2009.** Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 1899-1918
- Sairam RK, Srivastava GC. 2002.** Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science* 162(6): 897-904.
- Savoure A, Jaoua S, Hua XJ, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N. 1995.** Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letter* 372: 13-19.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008.** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3(6):1101-1108.
- Sharifi P. 2012.** Relationship between drought stress and some antioxidant enzymes with cell membrane and chlorophyll stability in wheat lines. *African Journal of Microbiology Research* 6(3): 617-623.

- Sharma I, Tyagi BS, Singh G, Venkatesh K, Gupta OP. 2015.** Enhancing wheat production-A global perspective. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 85(1): 3-13.
- Shen WB, Huang LQ, Xu LL. 1997.** Ascorbate peroxidase in plants. *Chemistry of Life* 17:24-26.
- Shiferaw B, Smale M, Braun H-J, Duveiller E, Reynolds M and Muricho G. 2013.** Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security* 5:291-317.
- Singh B, Usha K. 2003.** Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation* 39: 137-141.
- Singh BK, Jenner CF. 1984.** Factors controlling endosperm cell number and grain dry weight in wheat: effects of shading on intact plants and of variation in nutritional supply to detached cultured ears. *Functional Plant Biology* 11: 151-163.
- Smirnoff N. 1995.** Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation* 217-243.
- Szegletes Z S, Erdei L, Tari I, Cseuz L. 2000.** Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications* 403-410.
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD. 1994.** Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and applied genetics* 88(1): 1-6.
- Yang J, Zhang J. 2006.** Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* 169: 223-236.
- 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.
- Zhao H, Dai T, Jing Q, Jiang D, Cao W. 2007.** Leaf senescence and grain filling affected by post-anthesis high temperatures in two different wheat cultivars. *Plant Growth Regulation* 51: 149-158.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

Physiological response and expression of genes involved in drought tolerance in tolerant and susceptible bread wheat cultivars

Foad Fatehi^{1*}, Hamid Mohammadi²

1. Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
2. Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: fatehi.foad@gmail.com

ABSTRACT

Water stress is one of the most important environmental factors that regulate plant growth and development, and limit production. Plants can respond and adapt to water stress by altering their cellular metabolism and invoking various defense mechanism. Manipulating the levels of antioxidative defense system may affect yield. Therefore, the aim of this study was to find out the relationship between gene expression of antioxidant enzymes and proline as an osmotic regulator in wheat cultivars under drought stress. For this purpose, a factorial experiment based on randomized complete block design was carried out with three replications. Treatments were two Iranian wheat cultivars (Pishtaz and Niknejad) and three levels of drought stress. Drought stress resulted in a reduction of Chl a, Chl b, total Chl and yield in both cultivars. This reduction was lower in tolerant cultivar Niknejad. Drought stress led to an enhancement in proline content, the activity of CAT (Catalase), APX (Ascorbate Peroxidase) and SOD (Superoxide Dismutase) enzymes. The tolerance of Niknejad cultivar under drought stress is associated with high chlorophyll (Chlorophyll), proline contents which is closely related to its enzymatic antioxidants activity (including CAT, APX and SOD). Gene expression analysis also showed that expression levels of CAT, APX, SOD and P5C5 genes increased under drought stress. Niknejad cultivar had a better antioxidant capacity and had a higher induction of stress-related genes under drought stress. Therefore, this cultivar performs better than the Pishtaz under stress conditions. Among the genes studied, it seems that SOD and P5C5 genes played important roles in response to drought stress conditions.

Key words: Yield, Antioxidants, Proline, Gene Expression, Drought stress, Wheat.