

«مقاله پژوهشی»

بیان افتراقی ژن‌های درگیر در مسیر تحمل به تنش خشکی در راستای غربالگری ژنوتیپ‌های متحمل در گندم نان

محمدحسن کفاش مقدم^{۱*}، فروغ سنجریان^{۱*}، علاءالدین کوردناچه^۲، مهرداد چائی چی^۳، امیرمحمد ناجی^۲

۱. گروه زیست‌فراورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.

۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳. بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۲)

Differential expression of genes related to dehydration tolerance for screening of tolerant genotypes in bread wheat

Mohammad Hassan Kaffash Moghaddam^{1,2}, Forough Sanjarian^{1*}, Alaeddin Kordnaeje, Mehrdad Chaichi³, Amir Mohammad Naji²

1. Plant Bio-Product group, Agricultural Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.

3. Department of Seed and Plant Improvement Research, Hamedan, Agricultural and Natural Resources, Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Hamedan, Iran.

(Received: Mar. 3, 2022 - Accepted: Jun. 12, 2022)

Abstract

Bread wheat is one of the most important crops in the world, which is essential in terms of global food security. However, its production is extremely compromised in agricultural regions affected by water deficiency during part of the growing season and mostly in the later stages of growth. Therefore, it is promising to identify the native drought-tolerant germplasms and molecular mechanisms used to enhance drought stress resistance. The aim of this study was to investigate the expression level of eight selected genes related to drought tolerance *NCED*, *ABF*, *HKT*, *PAL*, *bHLH*, *ABC transporter* and lipoxygenase in two native germplasms of Iranian winter wheat, one is sensitive and the other is drought tolerant. For this purpose, drought treatment was applied on native germplasms in a completely randomized design with three replications and two levels of treatment in the greenhouse. Selected gene fragments were amplified, gene expression was measured by Reverse Northern Blot and quantified using total lip software. Analysis of variance of the mean relative expression of each gene compared to the internal control gene showed that drought stress had a significant effect on the expression of all genes except *bHLH* gene. Biplot based on the first and second components made it possible to isolate genotypes in dehydration stress based on the expression of the seven genes evaluated. This method can be used in screening and identifying tolerant genotypes in landrace population of wheat.

Keywords: Drought stress, gene expression, landrace population of wheat, Reverse Northern Blot

چکیده

گندم به‌عنوان مهم‌ترین غله در بسیاری از مناطق جهان است و غذای اصلی اکثر مردم را تشکیل می‌دهد. با این وجود، اغلب مناطق تولید گندم در جهان در بخشی از فصل رشد و بیشتر در مراحل انتهایی رشد با کمبود آب مواجه هستند. لذا شناسایی ارقام متحمل و نیز مطالعه مکانیسم‌های افزایش‌دهنده مقاومت به تنش خشکی از راهکارهای مناسب جهت مقابله با عوارض تنش خشکی خواهد بود. تحقیق حاضر با هدف بررسی سطح بیان هشت ژن منتخب مرتبط با تحمل به خشکی *NCED*، *P450*، *ABF*، *HKT*، *PAL*، *bHLH* و لیپواکسیژناز در دو ژرم پلاس بومی گندم زمستانه ایرانی حساس و متحمل به خشکی انجام گرفت. سنجش بیان این ژن‌ها بر روی نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری‌شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو سطح تیماری (نرمال و تنش خشکی) از گیاهان کشت شده در گلخانه، صورت گرفت. برای این منظور پس از تکثیر cDNA با ژن‌های منتخب، بیان آن‌ها با استفاده از روش نورترن‌بلات معکوس نسبت به یک ژن کنترل داخلی (*TEF-1α*) سنجیده و با استفاده از نرم‌افزار توتال لب کمی گردید. مطالعه بیان نسبی هر ژن نسبت به ژن کنترل داخلی نشان داد که اعمال تنش خشکی بر میزان بیان تمامی ژن‌ها به جزء ژن *bHLH* اثر معنی‌داری داشته‌است. نمودار دوطرفه بر پایه مولفه‌های اول و دوم، جداسازی ژنوتیپ‌ها را در تنش کم‌آبی بر اساس مقدار بیان هفت ژن مورد ارزیابی امکان‌پذیر کرد. این روش می‌تواند در غربالگری و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل در توده‌های بومی گندم کاربرد مؤثری داشته‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توده‌های بومی گندم، تنش خشکی، بیان ژن، نورترن

بلات معکوس

مقدمه

گندم از دیرباز مهم‌ترین غذاهای اصلی بشر بوده و امروزه نیز منبع عمده تأمین انرژی، پروتئین و ریزمغذی‌های مورد نیاز روزانه انسان است. گندم هگزاپلوئید ۴۰۰۰ تا ۳۵۰۰ سال قبل از میلاد در نواحی خاورمیانه وجود داشته و بعد از آن در حدود ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد از طریق "راه استپی" و راه ابریشم" در سایر نقاط آسیا پراکنده شد (Igrejas & Branlard, 2020). در سال ۲۰۱۸ تولید سالانه جهانی گندم ۷۳۴ میلیون تن بود که نصف این مقدار در کشورهای جنوب (Global South) تولید شد. تولید کنندگان گندم در این کشورها زارعین خرده‌پا هستند و معیشت آن‌ها در گرو همین تولید است. متأسفانه در دهه‌های اخیر رشد بهره‌وری گندم در این کشورها اندک بوده‌است که از عمده دلایل آن تغییرات ناخوشایند اقلیمی است (Krishna et al., 2020). تغییرات شدید آب و هوایی و در رأس آن کمبود منابع آب از جمله چالش‌های امنیت غذایی در سال‌های پیش‌رو خواهد بود. کاهش بارندگی و افزایش دما باعث شده که خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل در محدودیت تولید غلات در جهان باشد. خشکی با تأثیر منفی بر بروی رشد، فیزیولوژی و تکامل بذر باعث از دست رفتن ۱۰-۹٪ تولید جهانی غلات می‌شود (Zhang et al., 2018). کمبود منابع آب در تولید گندم نیز بسیار مهم است. بیشترین آب استفاده شده در کشاورزی صرف تعریق، تثبیت کربن و در نتیجه رشد گیاه می‌شود. تعریق توسط روزنه‌ها، محل تبادلات گازی بین گیاه و محیط، در شرایط مختلف تنظیم می‌شود. آبسزیک اسید هورمون گیاهی است که مسئول بسته‌شده روزنه‌هاست و نقش مهمی در رابطه با مصرف آب دارد. آبسزیک اسید شبکه پیام‌رسانی کینازی را کنترل می‌کند که توسط استرس‌ها فعال شده و با تنظیم فشار اسمزی سلول‌های محافظ، موجب بسته‌شدن روزنه و حفظ

آب می‌شود (Mega et al., 2019). در سلول‌های گیاهی، بیوستت آبسزیک اسید در پلاستیدها شروع می‌شود و دو آنزیم zeaxanthin epoxidase (ZEP) و 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) از آنزیم‌های مهم پلاستیدی درگیر در این بیوستت هستند. در پاسخ به هورمون آبسزیک اسید نیز مسیرهای مختلفی فعال می‌شوند که مشتمل بر فاکتورهای رونویسی، تغییرات بیان ژن و عوامل تنظیم‌کننده هستند (Finkelstein, 2013).

جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در سلول در شرایط مختلف محیطی یا فیزیولوژیکی روش‌های مختلفی وجود دارند. یکی از این روش‌ها نوردن بلات معکوس است که متکی بر هیبریداسیون است. در این روش cDNA ژن هدف تکثیر شده و بر روی غشا لکه‌گذاری می‌شود. سپس با cDNA کل نشان‌دار شده سلول مورد نظر، دو رگ‌گیری می‌شود. این روش برای اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن‌های هدف در سلول‌های تحت تنش به کار می‌رود (Gholamnezhad, 2017).

در این پژوهش تغییرات بیان ژن‌های انتخابی در مسیر آبسزیک اسید در گندم‌های حساس و متحمل در شرایط تنش خشکی آخر فصل با روش نوردن بلات معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

کشت بذور و اعمال تیمار

ژنوتیپ متحمل گندم مورد بررسی با انتخاب از بین ۱۲۳ ژرم‌پلاسما ایرانی به‌دست آمد (Chaichi et al., 2019). رقم مرودشت هم به‌عنوان رقم حساس انتخاب شد. بذور پس از نگهداری در دمای ۶-۵ درجه‌ی سانتیگراد به‌جهت زمستان‌گذرانی، در لوله‌های پلی‌اتیلن یک متری کاشت شدند. کاشت بذور به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دو سطح تنش خشکی برای هر رقم صورت گرفت. در

Oligo به صورتی طراحی شدند که اندازه قطعه تکثیر شده بین 300-400 bp باشد (جدول ۱). جهت تکثیر قطعات ژنی از الگوی cDNA استفاده شد. برای این منظور ابتدا استخراج RNA با به کارگیری کیت RNA X Plus (سینا کلون، ایران) طبق پروتکل پیشنهادی انجام شد و ساخت cDNA نیز با کیت SinaClon First Strand cDNA synthesis Kit (سینا کلون، ایران) انجام شد. سپس با استفاده از واکنش PCR قطعات ژنی به مقدار حداقل 500ng تکثیر شد. برای تهیه درشت آرایه قطعات ژنی بر روی کاغذ نیتروسولولر لکه گذاری و تثبیت شدند. برای این کار محصول PCR ژنهای انتخابی با استفاده از محلول 1mM NaOH و 0.25mM NaCl واسرشت شده و در دستگاه بلاتر بر روی غشا منتقل شدند. برای تثبیت غشا به مدت یک ساعت در آن دمای ۱۰۰°C قرار گرفت. دو تکرار از هر قطعه ژنی روی غشا لکه گذاری شد و آب مقطر و محصول PCR ژن *18sRNA* به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Gholamnezhad et al., 2016).

سطح نرمال گلدانها در تمامی مراحل رشد در حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند و در سطح تنش گلدانها تا دو هفته قبل از مرحله ی غلاف دهی در حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند و از این مرحله به بعد تا آغاز مرحله ی غلاف دهی میزان آبیاری به نصف ظرفیت مزرعه کاهش یافت و پس از آن آبیاری گلدانهای تنش قطع شد. نمونه برداری از تمامی گلدانها با سه تکرار در مرحله ی گل دهی از برگ پرچم گیاهان صورت گرفت و جهت آزمایشهای مولکولی به فریزر -۷۰ درجه منتقل شد.

تکثیر ژنها و آماده سازی درشت آرایه: ژنهای *ABF*, *bHLH* (Basic helix-loop-helix) *ABC*, *P450*, *PAL*, *NCED*, *HKT* و *Lipoxygenase* به عنوان ژنهایی که انتظار می رفت در مسیر آبسبزیکی اسید تحمل به تنش خشکی در سیستمهای گیاهی نقش داشته باشند جهت بررسی بیان ژن در شرایط تنش خشکی آخر فصل انتخاب شدند. ژن *TEFα.1* (میزان بیان آن طی سطوح مختلف تنش ثابت است) نیز به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد. آغازگرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار

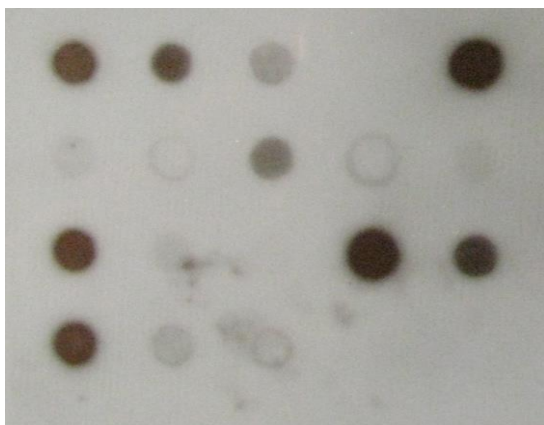
جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

آغازگر	شماره دسترسی	نام ژن
F: CGAGAAGCCGTACCTCAAG R: CTTCTCCTTGTCGAGCATCAC	JN807462.1	<i>NCED</i>
F: GATGGAGATAGTTCAGAGGTG R: CTCTCTCCGTCTCCATATC	CJ685625.1	<i>bHLH</i>
F: TGGCATCAAAGTGACCGAAGG R: GGCCCACTGGAGAAAGACAAT	AY641449.1	<i>P450</i>
F: GATCCAACCTGTCCTACTTCC R: CACTTGACAGACCTACTCC ⁵	DQ009003.1	<i>HTK1(HKT1)</i>
F: GAAGACGGTGGATGAGGTGTG R: CACAACCATCCCTGCATACC	AF519804.1	<i>ABF</i>
F: GCATTAAGCACGATTTTCCTTG R: CACTTTGACAACAACCGACAG	FJ185035	<i>ABC transporter</i>
F: GTGAGCACGCACTGAGAATC R: ACGGGTAGTCCTTGATGTGC	U32468	<i>Lipoxygenase</i>
F: TTCTGTCCGTCCTTGCTGAG R: CAATGGGGGTGCCTTGGAAG	JQ005112.1	<i>PAL</i>
F: GGTGATGCTGGCATAGTGAAG R: GATGACACCAACAGCCACAG	M90077	<i>Translation Elongation Factor 1a</i>

و عدد نهایی جهت آنالیز به‌دست آمد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام پذیرفت. به‌منظور مقایسه همزمان ژن‌های مورد ارزیابی در کنار تیمار اعمال‌شده، از تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده شد. برای مشاهده بای‌پلات تیمار در کنار متغیرها بدین‌منظور از عملکرد *fviz-pca* در پکیج *factoextra R package ver. 1.0.7* (Kassambara, 2017) استفاده شد.

نتایج و بحث

با تکثیر ژن‌های منتخب توسط آغازگرهای طراحی‌شده، قطعات ژنی با اندازه مطابق با اندازه پیش‌بینی‌شده به‌دست آمد. پس از دورگه‌سازی غشا با cDNA برای هر تیمار و انجام مرحله‌ی ظهور، لکه‌های مربوط به هر ژن مشخص شد (شکل ۱) و سپس با استفاده از نرم‌افزار Totallab میزان تیرگی لکه‌های مربوط به هر ژن برآورد گردید. میزان بیان نسبی ژن‌ها در مقایسه با بیان ژن کنترل داخلی نرمال‌سازی شد و برای مقایسات میانگین آماری به کار رفت.



شکل ۱. ظهور لکه‌ها بر روی فیلم رادیولوژی.

جدول مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن‌های *PAL*، *ABC transporter* و

ساخت cDNA نشان‌دار

از RNA استخراج‌شده توسط آنزیم M-MuLV (سینا کلون، ایران) با استفاده از dNTPی ساخت شرکت Roch آلمان حاوی باز یوراسیل نشان‌دار شده با مولکول DIG، cDNA نشان‌دار ساخته شد. جهت سنجش میزان بیان ژن مقدار یکسان از cDNA نشان‌دار از هر نمونه تهیه‌شده و با آب جوش واسرشته‌سازی شد.

دورگه‌سازی غشا درشت آرایه

ابتدا پیش دورگه‌سازی غشا با محلول 35 ml SDS 7%، 12.5 ml phosphate buffer و 100μl EDTA 100mM به مدت ۹۰ دقیقه در ۶۵°C انجام شد. محلول دورگه‌سازی با افزودن 50μ از cDNA نشان‌دار واسرشته شده به 5ml محلول پیش دورگه‌سازی به‌دست آمد. سپس این محلول به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در تماس با غشای لکه‌گذاری شده درون لوله‌ی آون هیبریداسیون در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. جهت مشخص شدن میزان اتصال cDNA به هر لکه ژنی از آنتی‌بادی DIG استفاده شد (Gholamnezhad *et al.*, 2016). برای هر نمونه سه تکرار انجام شد. این آنتی‌بادی به آنزیم آلکالین فسفات از متصل بوده و پس از افزودن سوبسترای آنزیم بر روی غشای نیتروسلولوزی واکنشی انرژی‌زا انجام می‌گیرد. طول موج ساطع‌شده از این واکنش با قرار دادن فیلم رادیولوژی بر روی غشا در تاریک‌خانه موجب تیره شدن فیلم رادیولوژی در نقاط مقابل لکه‌های ژنی شد.

پس از ظهور لکه‌ها از فیلم رادیولوژی عکس گرفته شد و تیرگی لکه‌های مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Totallab V1.0 به‌صورت کمی درآمد. عدد تیرگی مربوط به هر لکه جهت نرمال کردن به عدد تیرگی مربوط به ژن خانه‌دار تقسیم شد

ب: N^+ نشان‌دهنده شرایط نرمال رطوبتی و D نمایانگر شرایط تنش رطوبتی است. میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ ندارند.

فاکتورهای رونویسی *bHLH* خانواده بزرگی از فاکتورهای رونویسی هستند که برخی از آن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و سرما نقش دارند (Waseem et al., 2019). اگرچه بیشتر مطالعات در مورد نقش احتمالی آن‌ها در سازگاری گیاه با خشکی بر رشد روزنه، رشد تریکوم، رشد تارهای کشنده و حساسیت به آبسزیک اسید متمرکز شده‌است (Li et al., 2019). در آزمایش‌های این پژوهش تغییر معنی‌داری در میزان بیان این ژن در گیاه شاهد و گیاه تحت تنش خشکی مشاهده نشد. بررسی اثر متقابل ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی و تنش رطوبتی هم نشان داد که تنها در ژن‌های *ABF*، *PAL* و *ABC transporter* این اثر متقابل معنی‌دار بوده و در بقیه موارد اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید.

برای تجزیه اطلاعات و ارزیابی نظری از بای‌پلات استفاده شد. بدین‌منظور ماتریس دو طرفه که از داده‌های مربوط به هفت شاخص (بیان ژن‌های *ABF*، *HKT*، *NCED*، *PAL*، *P450*، *ABC transporter* و *Lipoxygenase*) و دو ژنوتیپ تحت دو شرایط نرمال و تنش رطوبتی تشکیل شده از طریق تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به هفت مؤلفه تجزیه شد. نتایج حاصل از این تجزیه در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده و مقادیر ویژه برای هر کدام از مؤلفه‌های اصلی، سهم واریانس آن مؤلفه را از کل واریانس نشان می‌دهد. با استفاده از وارد کردن پارامترهای مختلف اندازه‌گیری شده، درصد واریانس توجیه شده توسط دو یا سه مؤلفه اول مشخص گردید و بر همین اساس پارامترهای مناسب که بیشترین درصد واریانس را توجیه نمودند انتخاب گردیدند. با توجه به جدول ۳ با واردکردن هفت پارامتر بیان ژن‌های *ABF*، *HKT*، *NCED*، *PAL*، *ABC transporter*، *P450* و *Lipoxygenase* با

Lipoxygenase در دو رقم متحمل و حساس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده اما در سایر موارد اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید (جدول ۲-الف). به همین ترتیب مقایسه میانگین داده‌ها در خصوص میزان بیان ژن‌های مورد ارزیابی تحت دو شرایط تنش و نرمال رطوبتی نشان داد که در تمامی ژن‌ها به‌جز ژن *bHLH* میزان بیان در شرایط مذکور دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بودند (جدول ۲-ب).

جدول ۲. الف) مقایسه میانگین میزان بیان ژن‌های مورد ارزیابی در دو رقم حساس و متحمل به تنش خشکی به‌روش دانکن.

<i>bHLH</i>	T ⁺	1.25 ^a
	S	1.04 ^a
<i>ABF</i>	T	0.41 ^a
	S	0.61 ^a
<i>HKT</i>	T	1.66 ^a
	S	1.39 ^a
<i>NCED</i>	T	0.61 ^a
	S	0.69 ^a
<i>PAL</i>	T	0.14 ^b
	S	0.37 ^a
<i>P450</i>	T	0.18 ^a
	S	0.12 ^a
<i>ABC transporter</i>	T	1.70 ^b
	S	2.17 ^a
<i>Lipoxygenase</i>	T	1.18 ^b
	S	1.65 ^a

الف: T⁺ نشان‌دهنده رقم متحمل و S نمایانگر رقم حساس است. میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ ندارند.

جدول ۲. ب) مقایسه میانگین میزان بیان ژن‌های مورد ارزیابی تحت دو شرایط تنش و نرمال رطوبتی

<i>bHLH</i>	N ⁺	1.31 ^a
	D	0.99 ^a
<i>ABF</i>	N	0.38 ^b
	D	0.65 ^a
<i>HKT</i>	N	1.86 ^a
	D	1.20 ^b
<i>NCED</i>	N	0.45 ^b
	D	0.84 ^a
<i>PAL</i>	N	0.0 ^b
	D	0.50 ^a
<i>P450</i>	N	0.08 ^b
	D	0.21 ^a
<i>ABC transporter</i>	N	2.61 ^a
	D	1.25 ^b
<i>Lipoxygenase</i>	N	1.67 ^a
	D	1.16 ^b

مولفه‌های اول و دوم قابل مشاهده است که هر یک ژنوتیپ‌ها را می‌توان از ژنوتیپ دیگر در تیمارهای مختلف رطوبتی بر اساس بیان هفت ژن مورد ارزیابی تفکیک نمود (شکل ۲).

یکی از تنش‌هایی که معمولاً گیاهان با آن مواجه هستند، تنش کم‌آبی است که می‌تواند عملکرد محصول را به شدت کاهش دهد. در طول تکامل، گیاهان راهکارهایی را برای جلوگیری از هدر رفت آب توسعه داده‌اند. از جمله این موارد می‌توان به بسته‌شدن روزنه‌ها در مقابله با تنش خشکی اشاره کرد. آبسزیک اسید (ABA) خروج آب از گیاه را از طریق بستن روزنه‌ها کاهش می‌دهد. آنزیم کلیدی بیوسنتز آبسزیک اسید در گیاهان عالی 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase است که توسط ژن *NCED1* کد می‌شود (Muhammad Aslam et al., 2022). فاکتور اتصالی به عناصر پاسخ‌دهنده به آبسزیک اسید، ABF، با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در بسته‌شدن روزنه تحمل به خشکی را افزایش می‌دهد (Yang et al., 2020). گیاهان تراریخته با ژن *NCED1* نشان داد که این ژن باعث ایجاد شاخص‌های فیزیولوژیکی مفید در افزایش مقاومت به تنش خشکی از جمله تراکم روزنه‌ای کمتر برگ، سرعت فتوسنتز کمتر می‌شود (He et al., 2018).

استفاده از دو مولفه اول حدود ۹۷ درصد واریانس کل توجیه گردید.

جدول ۳. آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس هفت پارامتر بیان ژن‌های *ABF*، *HKT*، *NCED*، *PAL*، *P450* و *ABC transporter* و *Lipoxygenase*

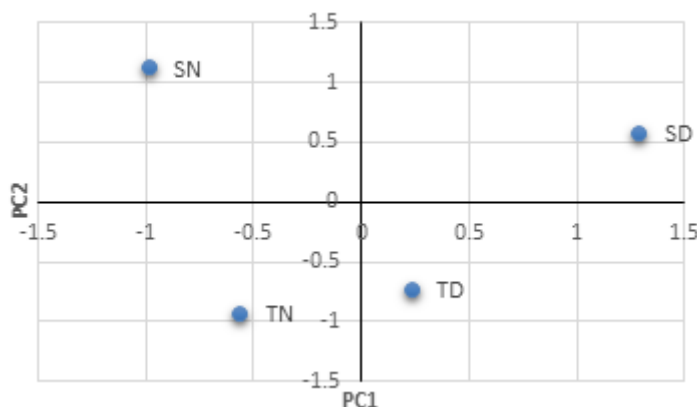
مولفه	مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
<i>ABF</i>	5.78	82.6	82.6
<i>HKT</i>	1.006	14.4	96.9
<i>NCED</i>	0.210	3.006	100
<i>PAL</i>	2.7×10^{16}	3.9×10^{15}	100
<i>P450</i>	1.8×10^{16}	2.7×10^{15}	100
<i>ABC transporter</i>	6.9×10^{16}	-9.9×10^{16}	100
<i>Lipoxygenase</i>	1.6×10^{16}	-2.4×10^{15}	100

بر همین اساس بردارهای ویژه پارامترهای اندازه‌گیری شده در دو محیط نرمال و تنش رطوبتی طبق جدول ۴ به دست آمد.

جدول ۴. بردارهای ویژه پارامترهای اندازه‌گیری شده در دو محیط نرمال و تنش رطوبتی

پارامتر	مولفه‌های اصلی	
	یک	دو
<i>ABF</i>	0.917	0.278
<i>HKT</i>	-0.905	-0.271
<i>NCED</i>	0.996	-0.023
<i>PAL</i>	0.975	0.224
<i>P450</i>	-0.886	0.457
<i>ABC transporter</i>	-0.666	0.744
<i>Lipoxygenase</i>	0.987	0.208

بر همین اساس با ترسیم نمودار دو طرفه بر پایه



نمودار ۲. ترسیم نمودار دو طرفه بر پایه مولفه‌های اول و دوم. T نشان‌دهنده رقم متحمل و S نمایانگر رقم حساس است. N

نشان‌دهنده شرایط نرمال رطوبتی و D نمایانگر شرایط تنش رطوبتی است.

گندم مشخص شد که در شرایط خشکی وارسته متحمل لیگنین بیشتری نسبت به وارسته حساس تولید می‌کند (Kaur & Zhawar, 2015). لیگنین‌ها در مسیر فنیل پروپانویید ساخته می‌شوند و فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) اولین آنزیم در این مسیر است. پیشنهاد شده است که ژن‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) برای رشد، نمو، سازگاری و پاسخ‌های کاهش‌دهنده به تنش‌های محیطی و پاتوژن‌های مختلف با تولید متابولیت‌های ثانویه تنظیم‌کننده پاسخ رشد گیاه ضروری هستند. سطح بیان بالای ژن PAL در ریشه ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس به خشکی مشاهده شده است (Rasool *et al.*, 2021). از جمله آنزیم‌های دیگری که در تولید لیگنین و پوتین نقش دارند سیتوکروم ای P450 (CYPs) هستند. علاوه بر این CYPها نقش اصلی در سم‌زدایی در سلول را دارند (Pandian *et al.*, 2020). نقش آنزیم‌های لیبوکسیژناز و متابولیت‌های تولیدی آن‌ها در پاسخ گیاه به استرس‌های زیستی مورد مطالعه زیادی قرار گرفته اما این مطالعات در مورد سازگاری گیاهان به تنش‌های غیر زیستی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌است. به‌طور کلی هم‌بستگی مثبتی بین غلظت ABA و محتوای رنوشت LOX در گیاهان تحت تنش آبی گزارش شده است (Babenko *et al.*, 2017). تنش خشکی و شوری در فلفل منجر به تغییرات معنی‌داری در الگوی بیانی ژن LOXI شد و جالب این است که تغییرات در تیمار با ABA مشاهده نشدند (Lim *et al.*, 2015).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌طور گسترده‌ای در گروه‌بندی جوامع بر اساس صفات مشابه به کار گرفته می‌شود و در مقایسه با تجزیه کلاستر که تنوع داده‌ها را در یک بعد کاهش می‌دهد صفات را در بیشتر از یک بعد (تعداد مؤلفه‌ها) نشان داده و این عمل اجازه تفسیر بیشتر در مورد ارتباطات بین صفات

علاوه بر این در آراییدوپسیس شواهدی تایید کننده نقش‌های دیگر ABFs در پاسخ به تنش خشکی، مانند بیوسنتز پرولین نشان داده شده است (Shrestha *et al.*, 2021). از جمله عوامل مؤثر در باز و بسته‌شدن روزنه‌ها تجمع یون‌ها از جمله پتاسیم است. نقش K^+ در تنش‌های اسمزی مانند تنش خشکی بسیار مهم است و هموستازی آن توسط کانال‌های HKT حفظ می‌شود (Riedelsberger *et al.*, 2021). از جمله راهکارهای دیگر گیاهان متحمل در برابر خشکی تغییرات در ساختار برگ به‌نحوی است که مانع تبخیر آب از سطح آن شود. کوتیکول ضخیم می‌تواند بازتاب انرژی گیاه را بهبود بخشد و تعرق را کاهش دهد و در نتیجه مقاومت گیاه را به خشکی افزایش دهد. در تنش خشکی مونومرهای کوتین در واحد سطح افزایش یافته و باعث افزایش ضخامت کوتیکول برگ می‌شود (Yang *et al.*, 2021). حمل مواد پوششی آبریز از جمله کوتین به خارج از غشا پلاسمایی بر عهده ناقلان ABC (ABC transporter) است (Hwang *et al.*, 2016). مطالعات در برنج نشان داده‌است یک ناقل ABC، OsABCG9، که برای رشد طبیعی در طول رشد رویشی ضروری است، نقش مهمی نیز در حمل و نقل موم اپی کوتیکولی در برنج دارد (Nguyen *et al.*, 2018). بیان بالای TsABCG11 از گیاه *Thellungiella salsuginea* در آراییدوپسیس مشخص کرد این ژن نقش مهمی در صادرات لیپید کوتیکول ایفا می‌کند و در تنش‌های غیر زیستی نقش دارد، و احتمالاً رابطه نزدیکی با تحمل استرس شدید در *T. salsuginea* دارد (Chen *et al.*, 2018). از موارد دیگری که می‌تواند باعث کاهش از دست دادن آب از سطح برگ شود، مقدار لیگنین در بافت است. در مطالعه وارسته‌های حساس و متحمل به خشکی در

(Chaichi *et al.*, 2019; Kamara *et al.*, 2022). بنابراین نتایج تحقیق حاضر می‌تواند در غربالگری ژنوتیپ‌ها و ارقام در برنامه‌های اصلاحی به‌منظور افزایش عملکرد و تولید ارقام متحمل تر در برابر تغییرات جوی و خشکسالی استفاده شود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی برای فراهم‌آوردن امکانات این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

را فراهم می‌آورد. در این تحقیق، استفاده از بای‌پلات ابزار مفیدی برای تجزیه اطلاعات بوده و ارزیابی نظری ساختار یک ماتریس بزرگ دو طرفه را ممکن می‌سازد. با ترسیم نمودار دو طرفه بر پایه مولفه‌های اول و دوم قابل‌مشاهده است که هر یک ژنوتیپ‌ها را می‌توان از ژنوتیپ دیگر در تیمارهای مختلف رطوبتی بر اساس مقدار بیان هفت ژن مورد ارزیابی تفکیک نمود. واکنش متفاوت ژنوتیپ‌های گندم نان به تنش خشکی و تفاوت در حساسیت یا مقاومت نسبی آن‌ها به تنش، به‌دلیل اختلاف در بیان ژن‌های مرتبط است

REFERENCES

- Babenko, L. M., Shcherbatiuk, M. M., Skaterna, T. D., & Kosakivska, I. V. (2017). Lipxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 89(1), 5-21.
- Chaichi, M., Sanjarian, F., Razavi, K., & Gonzalez-Hernandez, J. L. (2019). Analysis of transcriptional responses in root tissue of bread wheat landrace (*Triticum aestivum* L.) reveals drought avoidance mechanisms under water scarcity. *PLoS one*, 14(3), e0212671.
- Chen, N., Song, B., Tang, S., He, J., Zhou, Y., Feng, J., ... & Xu, X. (2018). Overexpression of the ABC transporter gene TsABCG11 increases cuticle lipids and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Reports*, 12(5), 303-313.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *The arabidopsis book*, 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Gholamnezhad, J. (2017). Transcriptomics and useful techniques of defense gene expression evolution of plant. *Applied Biology*. 6: 21-42.
- Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N., & Razavi, K. (2016). Evolution of housekeeping Genes for Gene Expression in Wheat Leaves Infected by *Mycosphaerella graminicola* with Reverse northern dot blot. *Crop Biotechnology*, 5(12), 1-10.
- Kassambara, A. (2017). *Practical guide to principal component methods in R: PCA, M (CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra* (Vol. 2). Sthda.
- He, R., Zhuang, Y., Cai, Y., Agüero, C. B., Liu, S., Wu, J., ... & Zhang, Y. (2018). Overexpression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase cisgene in grapevine increases drought tolerance and results in pleiotropic effects. *Frontiers in plant science*, 9, 970.
- Hwang, J. U., Song, W. Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., ... & Lee, Y. (2016). Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Molecular plant*, 9(3), 338-355.
- Igrejas, G., & Branlard, G. (2020). The importance of wheat. In *Wheat quality for improving processing and human health* (pp. 1-7). Springer, Cham.
- Krishna, V. V., Yigezu, Y. A., Karimov, A. A., & Erenstein, O. (2020). Assessing technological change in agri-food systems of the Global South: A review of adoption-impact studies

- in wheat. *Outlook on Agriculture*, 49(2), 89-98.
- Kamara, M. M., Rehan, M., Mohamed, A. M., El Mantawy, R. F., Kheir, A. M., Abd El-Moneim, D., ... & Mansour, E. (2022). Genetic potential and inheritance patterns of physiological, agronomic and quality traits in bread wheat under normal and water deficit conditions. *Plants*, 11(7), 952.
- Kaur, L., & Zhawar, V. K. (2015). Phenolic parameters under exogenous ABA, water stress, salt stress in two wheat cultivars varying in drought tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(2), 151-156.
- Lim, C. W., Han, S. W., Hwang, I. S., Kim, D. S., Hwang, B. K., & Lee, S. C. (2015). The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought and high salinity stress response. *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 930-942.
- Li, Z., Liu, C., Zhang, Y., Wang, B., Ran, Q., & Zhang, J. (2019). The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *Journal of experimental botany*, 70(19), 5471-5486.
- Mega, R., Abe, F., Kim, J. S., Tsuboi, Y., Tanaka, K., Kobayashi, H., ... & Okamoto, M. (2019). Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. *Nature plants*, 5(2), 153-159.
- Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., ... & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1084.
- Nguyen, V. N., Lee, S. B., Suh, M. C., An, G., & Jung, K. H. (2018). OsABCG9 is an important ABC transporter of cuticular wax deposition in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 960.
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., & Jugulam, M. (2020). Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants*, 9(5), 454.
- Rasool, F., Uzair, M., Naeem, M. K., Rehman, N., Afroz, A., Shah, H., & Khan, M. R. (2021). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes family in wheat (*Triticum aestivum* L.): genome-wide characterization and expression profiling. *Agronomy*, 11(12), 2511.
- Riedelsberger, J., Miller, J. K., Valdebenito-Maturana, B., Piñeros, M. A., González, W., & Dreyer, I. (2021). Plant HKT channels: an updated view on structure, function and gene regulation. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1892.
- Shrestha, A., Cudjoe, D. K., Kamruzzaman, M., Siddique, S., Fiorani, F., León, J., & Naz, A. A. (2021). Abscisic acid-responsive element binding transcription factors contribute to proline synthesis and stress adaptation in Arabidopsis. *Journal of plant physiology*, 261, 153414. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153414>
- Waseem, M., Rong, X., & Li, Z. (2019). Dissecting the role of a basic helix-loop-helix transcription factor, SlbHLH22, under salt and drought stresses in transgenic *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in plant science*, 10, 734.
- Yang, Y., Li, H. G., Wang, J., Wang, H. L., He, F., Su, Y., ... & Xia, X. (2020). ABF3 enhances drought tolerance via promoting ABA-induced stomatal closure by directly regulating ADF5 in *Populus euphratica*. *Journal of*

Experimental Botany, 71(22), 7270-7285.

Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.