

## بررسی بیان خانواده ژنی دهیدرین‌ها در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل جو وحشی و زراعی در شرایط تنش خشکی

رها عابدینی<sup>۱</sup>، مریم شهبازی<sup>۲\*</sup>، زهرا سادات شبر<sup>۲</sup>، ریحانه پیشکام راد<sup>۳</sup> و آسا ابراهیمی<sup>۱</sup>  
<sup>۱</sup> گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> بخش تحقیقات فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران  
<sup>۳</sup> گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیده

دهیدرین‌ها دومین گروه از پروتئین‌های بسیار آب‌دوست از گروه LEA هستند که در شرایط کم‌آبی و دمای پایین در گیاهان تجمع می‌یابند و به نظر می‌رسد در ایجاد تحمل به تنش نقش مهمی دارند. به منظور بررسی اهمیت دهیدرین‌ها در پاسخ ژنوتیپ‌های حساس و متحمل جو به خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلدان روی ارقام زراعی یوسف، موروکو و اکوتیپ جو وحشی اسپانتانوم (*Hordeum spontaneum*) به عنوان عامل اول و تیمار آبیاری در سه سطح عادی (آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک)، تنش ملایم (۳۰ درصد) و تنش شدید (۱۰ درصد) به عنوان عامل دوم منظور گردید. آبیاری عادی تا مرحله دو برگی انجام گرفت، سپس آبیاری برای گیاهان تحت تنش تا رسیدن به تنش مورد نظر قطع گردید. نمونه‌برداری از برگ کاملاً توسعه یافته در مرحله رویشی برای بررسی‌های فیزیولوژیک و مولکولی انجام شد. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک نشان داد که اثر خشکی بر همه صفات و نیز تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود و رقم حساس موروکو به طور معنی‌داری ماده خشک و محتوی نسبی آب برگ پایین‌تری در تیمارهای خشکی در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر داشت. نتایج حاصل از بررسی بیان کمی ژن‌ها از طریق Real-time PCR از بین ۱۳ عضو خانواده ژنی دهیدرین‌ها در جو، به غیر از ژن‌های *Dhn8* و *Dhn13* که هیچ تغییر بیانی نداشتند، بیان سایر ژن‌ها در شرایط تنش شدید، افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش بیان ژن‌های *Dhn3*، *Dhn7*، *Dhn9* و *Dhn10* در ژنوتیپ‌های متحمل یوسف و جو اسپانتانوم، *Dhn1* تنها در یوسف و سایر ژن‌ها در جو اسپانتانوم مشاهده گردید که می‌تواند بیانگر اهمیت این ژن‌ها در ایجاد تحمل به خشکی باشد. از سوی دیگر، افزایش بیان *Dhn12* در شرایط تنش خشکی و تنها در اکوتیپ وحشی برای نخستین بار در این بررسی گزارش شده است.

**واژه‌های کلیدی:** اسپانتانوم، بیان ژن، تحمل به خشکی، دهیدرین، جو

## مقدمه

خشکی یکی از عوامل محدود کننده مهم محیطی است که تولید و عملکرد گیاهان زراعی را در بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران تحت تأثیر قرار می‌دهد. افزایش رشد و گسترش گیاهان به میزان ذخیره آب آنها بستگی دارد (Allagulova et al., 2003). تلاش‌های بسیاری برای شناسایی مکانیسم‌های تحمل به خشکی در گیاهان از طریق رویکردهای مولکولی در حال انجام است و برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطح رونویسی گزارش شده‌اند (Du et al., 2011). برخی از این محصولات ژنی در محافظت از گیاهان در برابر اثرات تنش از طریق دریافت تنش، سیگنال‌های انتقال، شبکه تنظیم‌کننده رونویسی و نیز در تحمل در برابر پسابیدگی (dehydration) نقش دارند (Allagulova et al., 2003; Umezawa et al., 2006). پس از شناسایی ژن‌های تحمل به تنش خشکی، می‌توان آنها را از طریق مهندسی ژنتیک به گیاهان مورد نظر منتقل کرد (Abebe et al., 2003). در گیاهان گروهی از پروتئین‌های آب‌دوست با عنوان Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA) آخرین مرحله رسیدگی دانه (یعنی زمانی که جنین بیشترین تحمل به پسابیدگی را دارد) تجمع می‌یابند. این پروتئین‌ها تحت تأثیر تنش آبی، دمای پایین، شوری و آبسزیک اسید (ABA) در اندام‌های رویشی نیز انباشته می‌شوند که بیانگر نقش حفاظتی این گروه از پروتئین‌ها در شرایط محدودیت آبی است (Wise and Tunnacliffe, 2004). حضور پروتئین‌های LEA در گیاهان مختلف بیانگر توزیع گسترده این پروتئین‌ها در سلسله گیاهی است (Allagulova et al., 2003).

پروتئین‌های LEA بر اساس توالی در چند گروه طبقه‌بندی می‌شوند که دهیدرین در گروه II یا خانواده D-11 در این طبقه‌بندی قرار می‌گیرد (Rodriguez et al., 2005). دهیدرین‌ها از دانه‌های ذرت، دانه‌های لوبیای چشم‌بلبلی، جوانه‌های جو و ذرت و بافت پوستی هلو جداسازی شده‌اند (Allagulova et al., 2003). این پروتئین‌ها دارای وزن مولکولی ۹ تا ۲۰۰ کیلودالتون هستند (Allagulova et al., 2003) و بر اساس وجود موتیف‌های حفظ شده به پنج گروه طبقه‌بندی می‌گردند (Choi and Close, 2000). به نظر می‌رسد دهیدرین‌ها به عنوان چپرون‌ها در پایداری وزیکول‌ها، پروتئین‌ها و ساختارهای غشایی، تنظیم اسمزی و سم‌زدایی در گیاهان تحت تنش نقش ایفا می‌کنند، اما عملکرد دقیق آنها تا کنون مشخص نشده است (Wise and Tunnacliffe, 2004). بیان ژن‌های دهیدرین هم از طریق راه‌های وابسته به ABA و هم از طریق راه‌های غیروابسته به ABA تنظیم می‌شود (Nylander et al., 2001; Allagulova et al., 2003). عملکرد ویژه دهیدرین‌ها را می‌توان به محل قرارگیری این پروتئین‌ها در سیتوپلاسم و هسته نسبت داد (Allagulova et al., 2003). تنوع خانواده ژنی دهیدرین‌ها و محل استقرار آنها بر روی کروموزوم‌های متفاوت در گونه‌های گیاهی مختلف مانند جو بررسی، تا کنون ۱۳ ژن دهیدرین در این گیاه مشخص شده است (Rodriguez et al., 2005). در بررسی ریزآرایه (microarray) در گیاه جو در شرایط تنش خشکی (Guo et al., 2009) و تنش خشکی و سرما (Tommasini et al., 2008)، ژن‌های دهیدرین به عنوان دسته‌ای از ژن‌های دخیل در تحمل به تنش معرفی شده‌اند.

(2009 و یک اکوتیپ جو وحشی *Hordeum HS* (*vulgare ssp. spontaneum* L.) با شماره 02TN374 (از بانک ژن ملی ایران) متحمل به خشکی (زهرای، ۱۳۸۸) بود. کشت گیاهان در شرایط گلخانه در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، در گلدان حاوی مخلوط پیت:پرلیت (۲:۳) انجام شد. آبیاری در گیاهان شاهد و تیمار ملایم و شدید به ترتیب بر اساس ۷۰، ۳۰ و ۱۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک در ۳، ۷۰ و ۳۰ (مجموعاً ۲۰۰ بوته برای هر ژنوتیپ) صورت گرفت. تیمار خشکی در مرحله دو برگگی (پس از خروج کامل برگ دوم) اعمال و پس از رسیدن به ۳۰ و ۱۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک، نمونه برداری از گیاه و برگ‌های کاملاً توسعه یافته صورت گرفت.

#### سنجش‌های فیزیولوژیک

تولید ماده خشک گیاه (وزن خشک گیاهان)، محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content, RWC) با روش معمول (Ritchie et al., 1990) و هدایت روزنه‌ای برگ با استفاده از دستگاه پورومتر قابل حمل (AT Devices Cambridge, UK) بررسی شد. اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای از سطح رویی برگ‌ها، بین ساعت ۷ تا ۹ صبح انجام شد.

#### بررسی الگوی بیان ژن

الگوی بیان خانواده ژنی دهیدرین‌ها (شامل ۱۳ ژن دهیدرین) در مرحله رویشی در برگ‌های کاملاً توسعه یافته بررسی شد. ژن *HvActin* به عنوان ژن خانه‌دار (House keeping) و ژن‌های دهیدرین به عنوان ژن‌های نامزد دخیل در تحمل به خشکی با مرور منابع انتخاب، توالی آنها با جستجو در بانک‌های اطلاعاتی یافت شد. طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی با بهره‌گیری از برنامه OLIGO5 صورت گرفت. RNA

گیاه جو یکی از چهار غله مهم دنیاست که با داشتن تحمل نسبی در برابر خشکی، نسبت به سایر غلات در مناطقی با کمبود بارندگی و سایر محدودیت‌های خاک قادر به رشد و تولید محصول است. خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی پتانسیل بالایی از لحاظ تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارا هستند. جو وحشی اسپانتانوم، والد جو زراعی است و هیبرید آنها زیاست. این گیاه به عنوان منبع ژن‌های مقاوم در برابر تنش‌ها در اصلاح جو و نیز ایجاد تنوع زیستی در جو زراعی استفاده می‌شود (Guo et al., 2009). تفاوت‌ها در سطح رونویسی در مرحله رویشی بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی، تحت شرایط تنش خشکی در گیاه جو، می‌تواند در شناسایی ژن‌های کلیدی در افزایش تحمل به خشکی اهمیت زیادی داشته باشد (Guo et al., 2009). بیان ژن‌های خانواده دهیدرین قبلاً در یک رقم جو (Tommasini et al., 2008) تحت تنش خشکی و سرما مطالعه شده است، ولی از بیان افتراقی تمام اعضای خانواده دهیدرین در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی اطلاعات کاملی در دست نیست (Du et al., 2011). لذا در این پژوهش آثار تنش خشکی بر دو رقم زراعی حساس و متحمل و یک اکوتیپ جو اسپانتانوم و تغییرات الگوی بیان همه اعضای خانواده ژنی دهیدرین‌ها بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت گیاه و اعمال تنش‌ها

ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) رقم یوسف HV1 به عنوان رقم متحمل به خشکی (نیکخواه، ۱۳۸۶) و رقم موروکو (از ایکاردا) HV2 به عنوان رقم حساس (Guo et al.,

نسبی آب برگ نشان داد که بین ارقام، تیمارها و اثر متقابل آنها، از لحاظ مقدار هر سه صفت یاد شده، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱). در تنش شدید، رقم یوسف و اکوتیپ وحشی بیشترین درصد ماده خشک را به خود اختصاص دادند (شکل ۱). از نظر RWC در رقم یوسف بین شرایط شاهد، تنش ملایم و شدید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین میزان مورد مشاهده از نظر مقدار محتوای نسبی آب برگ به رقم موروکو، تحت شرایط تنش خشکی شدید مربوط بود (شکل ۱). هدایت روزنه‌ای هر سه ژنوتیپ مورد بررسی، تحت شرایط تنش خشکی ملایم و شدید کاهش نشان داد، میزان کاهش در شرایط تنش شدید بیشتر بود. بین ژنوتیپ‌ها از نظر هدایت روزنه‌ای تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱). بر اساس این نتایج، رقم یوسف و اکوتیپ وحشی به طور نسبی متحمل به خشکی و رقم موروکو حساس به خشکی است.

رشد گیاهان نتیجه تقسیم سلول‌ها و طول شدن آنها است. تنش خشکی مستقیماً با کاهش تثبیت  $CO_2$  و تقسیم و طول شدن سلول‌ها، موجب کاهش رشد می‌شود (Farooq *et al.*, 2009). اثر خشکی روی توسعه دیواره سلولی مشهودتر است، زیرا لازمه طول شدن سلول‌ها انعطاف‌پذیری دیواره سلولی تحت فشار تورژسانسی است، هر گونه کاهش در فشار تورژسانس که در نتیجه عدم تعادل در محتوای آب گیاه به وجود آید، می‌تواند به کاهش رشد در شرایط تنش خشکی منجر شود. محتوای نسبی آب برگ، معیاری از وضعیت آبی گیاه و مرتبط با تحمل گیاه به تنش خشکی است (Tommasini *et al.*, 2008). بسته شدن روزنه‌ها به

کل برگ‌ها (در تیمارهای مختلف) با استفاده از محلول ترایزول (شرکت Invitrogen) استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم RNase-free DNase1 (RQ1 RNase-free DNase, Promega) تیمار شد و به عنوان الگوی واکنش PCR قرار گرفت. پس از همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD) انجام گرفت. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از Real time-PCR (iCycler iQ real-time PCR, Bio-Rad) بررسی شد. میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted  $\Delta\Delta Ct$  (Yuan *et al.*, 2008) محاسبه گردید. در این روش، میزان بیان ژن‌های دهیدرین بر اساس ژن اکتین (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به رقم یوسف با آبیاری کافی (شاهد) سنجیده شد.

### مطالعات آماری

آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مختلف و نتایج به دست آمده از Real time-PCR با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

### نتایج و بحث

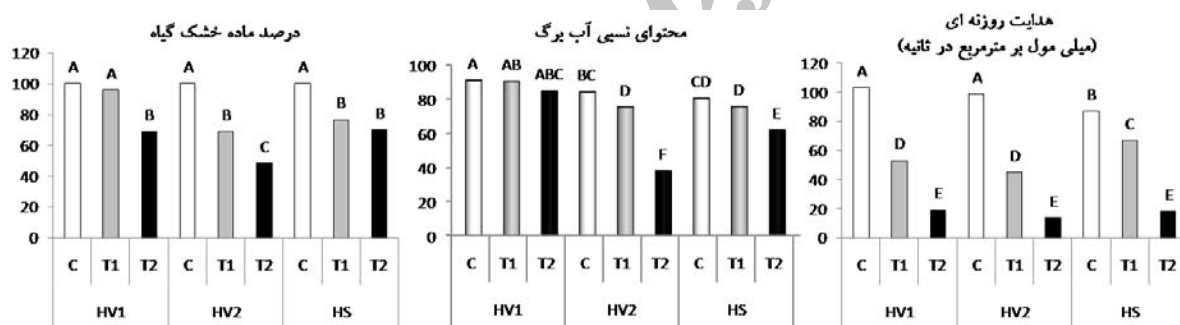
در این تحقیق، به منظور شبیه‌سازی شرایط خشکی در شرایط مزرعه، آزمایشی در گلخانه با تنظیم ظرفیت نگهداری آب خاک (Water Holding Capacity, WHC) در مرحله رویشی، با دو ژنوتیپ حساس و متحمل به خشکی جو زراعی و یک اکوتیپ جو وحشی انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای بررسی تولید ماده خشک، هدایت روزنه‌ای و محتوای

می‌شود. بسته شدن روزنه‌ها موجب حفظ و نگهداری آب در شرایط کم آبی می‌گردد، اگرچه باعث کاهش تبادلات گازی فتوسنتزی نیز خواهد شد (Mahajan and Tuteja, 2005).

عنوان نخستین پاسخ گیاهان به کمبود آب، برای جلوگیری از اتلاف آب از طریق تعرق است. بسته شدن روزنه‌ها در شرایط تنش توسط آبسزیک اسید و با تأثیر بر کانال‌های یونی در سلول‌های محافظ روزنه تنظیم

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف در ارقام زراعی و اکوتیپ جو وحشی تحت شرایط خشکی. \* و \*\* به ترتیب بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد است.

میانگین مربعات			منابع تغییرات
محتوای نسبی آب برگ	درصد ماده خشک گیاه	هدایت روزنه‌ای برگ	
۶۸۸/۱۵**	۴۹۲/۶۷**	۲۸۲/۵۷**	ژنوتیپ
۲۷۳۷/۷۵**	۱۰۰۵۲/۰۶**	۲۶۵۱۵/۰۲**	خشکی
۳۵۷/۶۵**	۲۱۸/۳۴**	۳۴/۶۴**	اثر متقابل
۱۳/۱۷	۱۴/۵۲	۴۰/۸۰	خطا
۴/۵۷	۴/۹۳	۱۲/۱۷	ضریب تغییرات



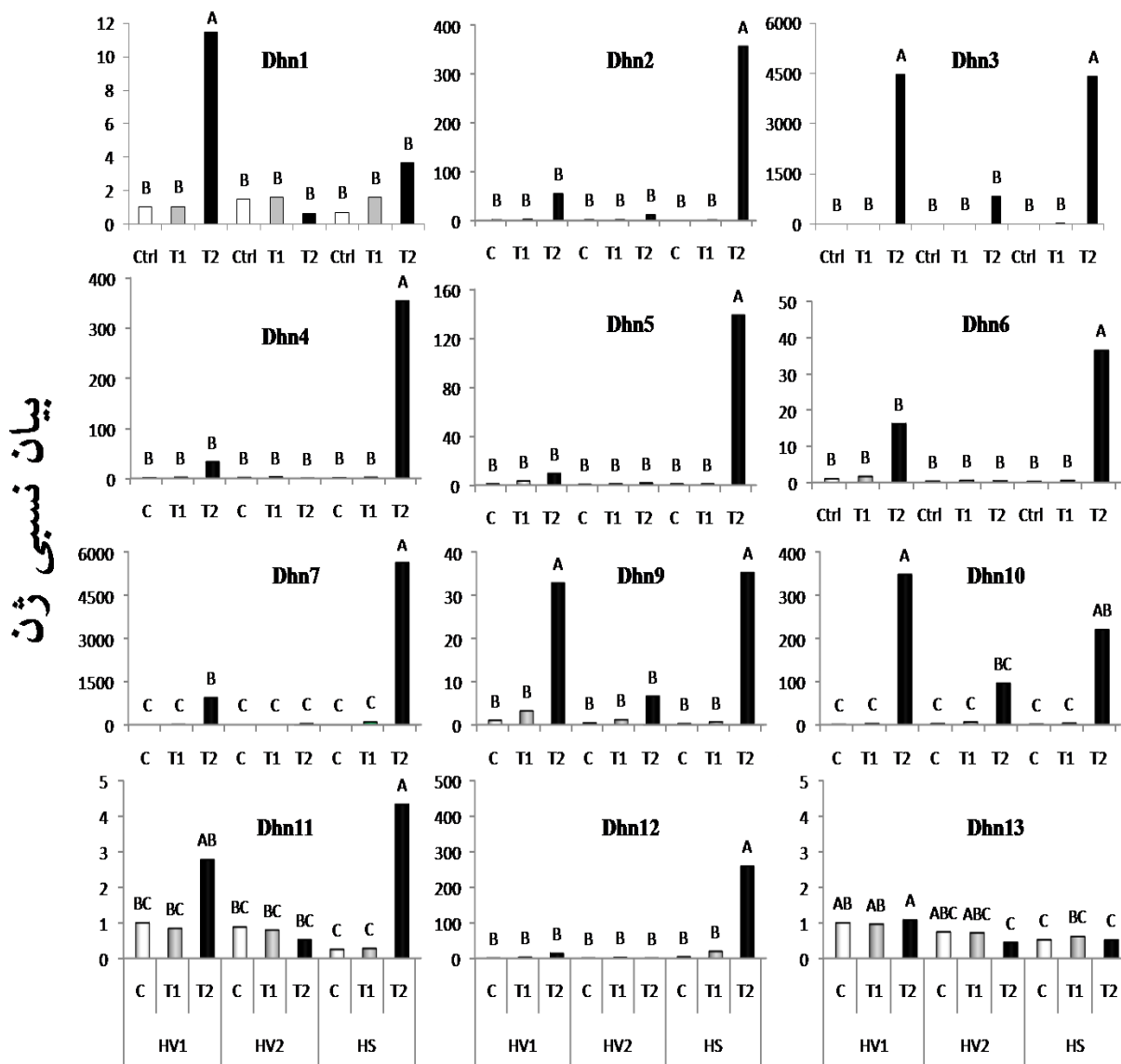
شکل ۱- اثر شرایط آبیاری عادی (C)، تنش خشکی ملایم (T1) و شدید (T2) بر صفات فیزیولوژیک در ارقام یوسف (HV1)، موروکو (HV2) و اکوتیپ وحشی (HS). حروف یکسان در هر نمودار بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

(شکل ۲). در شرایط تنش شدید، به غیر از ژن‌های *Dhn8* و *Dhn13* بیان سایر ژن‌ها افزایش معنی‌داری در یوسف و HS در سطح ۵ درصد داشتند (شکل ۲). به علت آن که هیچ تغییری در بیان *Dhn8* مشاهده نشد، بیان آن در شکل ۲ ارایه نشده است. در رقم متحمل به خشکی یوسف، اثر تنش شدید بر بیان ژن‌های *Dhn3*، *Dhn7*، *Dhn9* و *Dhn10* بسیار مشابه با اثر آن‌ها در

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های ۱۳ عضو خانواده ژنی دهیدرین در برگ سه ژنوتیپ مورد مطالعه تحت شرایط آبیاری عادی، تنش خشکی ملایم و شدید نشان داد که هیچ یک از ژن‌های دهیدرین در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط شاهد، بیان درخور توجهی نداشتند. این ژن‌ها تحت تنش ملایم نیز در مقایسه با شرایط شاهد، افزایش معنی‌داری نشان ندادند

ژن *Dhn1*، تنها در یوسف و بیان ژن‌های *Dhn2*، *Dhn4*، *Dhn5*، *Dhn6*، *Dhn11* و *Dhn12* به صورت معنی‌داری در اکوتیپ وحشی گردید (شکل ۲).

اکوتیپ وحشی متحمل بود، به طوری که این ژن‌ها افزایش بیان معنی‌داری را در هر دو داشتند. علاوه بر ژن‌های یاد شده، تنش خشکی شدید موجب القای بیان



شکل ۲- بیان نسبی ژن‌های دهیدرین در آخرین برگگ توسعه یافته در مرحله رویشی در ارقام یوسف (HV1)، موروکو (HV2) و اکوتیپ وحشی (HS) در شرایط آبیاری عادی (C)، تنش خشکی ملایم (T1) و شدید (T2) که نسبت به بیان همان ژن‌ها در رقم یوسف در شرایط عادی ارایه شده است. حروف یکسان در هر نمودار بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

خاک، کاهش رطوبت نسبی، دماهای بالا و پایین از جمله شرایطی هستند که می‌توانند پتانسیل آب را در گیاهان تحت تأثیر قرار داده، موجب بروز علائم کمبود آب شوند (Wise and Tunnacliffe, 2004). نقش دهیدرین‌ها در ایجاد تحمل به تنش‌ها هنوز به وضوح روشن نیست. از نظر تئوری، دیدگاه اصلی این است که دهیدرین‌ها در پایداری غشا و پروتئین‌ها طی شرایط پسابدگی نقش حفاظتی دارند.

از بین اعضای خانواده ژنی دهیدرین‌ها، بیان افزایش یافته ژن‌های *Dhn1*، *Dhn2*، *Dhn3*، *Dhn4*، *Dhn7* و *Dhn10* توسط Tommasini و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است که بیانگر اهمیت این ژن‌ها در ایجاد تحمل به خشکی است. از سوی دیگر، عدم تغییر میزان بیان ژن‌های *Dhn8* و *Dhn13* در تیمارهای خشکی در تحقیق حاضر، بیانگر عدم پاسخ آنها به خشکی در شرایط اعمال شده است. در عین حال، بیان افزایش یافته *Dhn12* در شرایط تنش خشکی، تنها در اکوتیپ وحشی برای نخستین بار در بررسی حاضر گزارش شده است. بیان افزایش یافته برخی ژن‌ها، تنها در اکوتیپ وحشی متحمل به خشکی می‌تواند دلیل بر وجود برخی سازوکارهای تحمل به خشکی متفاوت در خویشاوند وحشی جو و تضعیف آنها در جریان اصلاح این گیاه باشد. بنابراین، می‌توان از این نتایج در اصلاح مولکولی گیاه جو بهره بسیار برد

هنگامی 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). در سال‌های اخیر، مطالعات بیان ژن در سطح ژن، رونویسی و ترجمه تعداد زیادی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را معرفی نموده، ولی نقش دقیق این ژن‌ها در ایجاد تحمل یا حساسیت به تنش چندان روشن نشده است (Diab et al., 2004). ژن‌هایی که بیان آنها تحت شرایط خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل تغییر می‌کند، احتمالاً در مسیرهای حفاظتی و تحمل گیاه به خشکی دخالت دارند. 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). بررسی بیان ژنی در این مطالعه اطلاعات مفیدی را در خصوص درک چگونگی پاسخ ژن‌های مختلف دهیدرین در گیاه جو به تنش خشکی در مرحله رویشی ارائه می‌نماید و این اطلاعات به نوبه خود می‌تواند در توضیح مکانیسم سازگاری ژنوتیپ‌های متحمل در شرایط تنش خشکی حایز اهمیت باشد.

گیاهان در طول چرخه زندگی خود با تنش‌های محیطی متعددی روبرو می‌شوند. یکی از مؤلفه‌های مشترک در پاسخ گیاهان به بسیاری از تنش‌های محیطی، پسابدگی سلولی است. عدم رطوبت کافی

## منابع

- زهرای، م. (۱۳۸۸) ارزیابی ژنوتیپ‌های جو اسپانتانوم (*Hordeum spontaneum*) از نظر شاخص‌های تحمل به خشکی. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۴: ۱-۲۵.
- نیکخواه، ح. ر. (۱۳۸۶) گزارش نهایی پروژه ارزیابی تحمل به خشکی آخر فصل در ارقام و لاین‌های پیشرفته جو. ۷۲ ص. به شماره ثبت: ۸۶/۱۴۹۵

- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. and Cushman, J. C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 13: 1748-1755.
- Allagulova, Ch. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M. and Vakhitov, V. A. (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Mascow)* 68: 945-951.
- Choi, D. W. and Close, T. J. (2000) A newly identified barley gene, *Dhn12*, encoding a YSK<sub>2</sub> DHN, is located on chromosome 6H and has embryo-specific expression. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1274-1278.
- Diab, A. A., Teulat-Merah, B., This, D., Ozturk, N. Z., Benscher, D. and Sorrells, M. E. (2004) Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1417-1425.
- Du, J. B., Yuan S., Chen, Y. E., Sun, X., Zhang, Z. W., Xu, F., Yuan, M., Shang, J. and Lin, H. H. (2011) Comparative expression analysis of dehydrins between two barley varieties, wild barley and Tibetan hull-less barley associated with different stress resistance. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 567-574.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R. K., Graner, A. and 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: 3531-3544.
- Mahajan, Sh. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E. T. and Welin, B. V. (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 45: 263-279.
- Ozturk, Z. N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H. J. (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48: 551-573.
- Ritchie, S., Nguyen, H. T. and Haloday, A. S. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science Society of America* 30: 105-111.
- Rodriguez, E. M., Svensson, J. T., Maatrasi, M., Choi, D. W. and Close, T. J. (2005) Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 852-858.
- Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, E. M., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J. and Close, T. J. (2008) Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics* 8: 387-405.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozoki, K. and Shinozoki, K. (2006) Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 113-122.
- Wise, M. J. and Tunnacliffe, A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9: 13-17.
- Yuan, J. S., Wang, D. and Stewart, C. N. J. (2008) Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnology Journal* 3(1): 112-23.



## Expression analysis of dehydrins gene family in barley tolerant and sensitive cultivars and wild genotype under drought conditions

Raha Abedini<sup>1</sup>, Maryam Shahbazi<sup>2\*</sup>, Zahra Sadat Shobbar<sup>2</sup>, Reihaneh Pishkam Rad<sup>3</sup> and Asa Ebrahimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

### Abstract

Dehydrins are known as late-embryogenesis abundant (LEA) proteins Group II, which are accumulated during low-temperature or water-deficit conditions. They are assumed to play a role in freezing and drought-tolerance in plants. In order to study the impact of dehydrins in response of tolerant and sensitive genotypes to drought, one experiment was carried out in a factorial design based on CRD for a wild ecotype and two barley cultivars in greenhouse. The barley cultivars including Yusef (HV1) and Morocco (HV2) and wild ecotype (HS) were as the first factor and irrigation treatment with three levels consisted of normal (70% of water holding capacity of soil), mild stress (30%) and severe stress (10%) was as the second factor. Normal irrigation was continued in two leaf stage and then discontinued for plants under stress to achieve certain level of stress. The samples were collected from the expanded leaves in vegetative stage for physiological and molecular analysis. Analysis of variance for physiological characteristics showed that the effect of water stress on all traits and differences between genotypes were significant, and HV2 had significantly lower dry matter production and relative water content than the other genotypes. Based on the real time PCR results, among 13 barley dehydrin genes, except for *Dhn8* and *Dhn13*, expression of other genes significantly upregulated under severe drought condition. The expression level of *Dhn3*, *Dhn7*, *Dhn9* and *Dhn10* was increased in the tolerant genotypes, HV1 and HS, whereas the expression level of *Dhn1* and the other genes increased only in Yusof and HS, respectively that was indicative of the role of dehydrin genes in drought tolerance. The increase of *Dhn12* expression level in wild ecotype through drought condition is reported for the first time in the current study.

**Key words:** Barely, Dehydrin, Drought tolerance, Gene expression, Spontaneum

\* Corresponding Author: mshahbazi@abrii.ac.ir