ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۳،پاییز ۱۳۹۷
صفحه ۳۶۱ - ۳۵۳

مطالعه الگوی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در خویشاوندان وحشی گندم تحت تنش کم‌آبی

Expression pattern of anti-oxidant genes in wheat wild relatives under water deficit stress

جعفر احمدی*[۱]، علیرضا پورابوقداره[۲]

۱- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- پژوهشگر پسا دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Ahmadi J*[1], Pour-Aboughadareh AR[2]

1- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, College of Agriculture and natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Post Doc. Position, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/٤/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

خویشاوندان وحشی گندم به‌عنوان منبع ژنی ایده‌آلی جهت بهبود تحمل تنش خشکی در گندم شناخته شده‌اند. هدف از این تحقیق ارزیابی الگوی بیان برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی شامل *MnSOD*، *APX* و *GPX* در گونه‌های مختلف زراعی و وحشی گندم تحت شرایط عدم تنش (۹۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بود. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) جهت مقایسه پنج گونه *Aegilops* و دو گونه *Triticum* به‌همراه دو رقم شاهد گندم نان مقاوم (سیروان) و حساس به خشکی (دریا) در شرایط گلخانه اجرا شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای میزان بیان نسبی ژن‌های مورد ارزیابی نشان داد اثر تنش، گونه و اثر متقابل بین تنش و گونه برای کلیه ژن‌ها معنی‌دار بود. تنش خشکی منجر به افزایش بیان ژن‌های *APX*، *MnSOD* و *GPX* به‌ترتیب به‌میزان ۹/۵۵، ۱۲/٦٤ و ۱۰/۱۸ برابر بیش‌تر نسبت به شرایط عدم تنش شد. علاوه بر این، نتایج به‌دست آمده از مقایسه گونه‌های مختلف نشان داد الگوی بیان ژن در بین گونه‌های مختلف نیز متفاوت است. از مهم‌ترین نتیجه به‌دست آمده از این تحقیق می‌توان به افزایش بیان ژن‌های بررسی شده در گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. speltoides* و *Ae. cylindrica* نسبت به دیگر گونه‌ها و رقم مقاوم شاهد در شرایط تنش خشکی اشاره نمود. بنابراین انجام مطالعات تکمیلی جهت تعیین ساز و کارهای مرتبط با تحمل تنش خشکی در این گونه‌ها توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان
تنش خشکی
گندم
گونه‌های اکسیژن فعال

مقدمه

در بین تنش‌های محیطی، خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل نامطلوب مؤثر بر رشد و نمو گیاهان زراعی محسوب می‌باشد و به‌واسطه تأثیر هم‌زمان بر خصوصیات مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی بافت‌ها و سلول‌های گیاهی در نهایت منجر به زوال گیاه و کاهش عملکرد می‌شود (Comas et al. 2013). از این‌رو، بررسی مکانسیم‌های مختلف سلولی و مولکولی پاسخ دهنده به تنش خشکی یکی از ملزمات اساسی در برنامه‌های اصلاحی با هدف بهبود تحمل به تنش خشکی می‌باشد. تنش خشکی مشابه سایر تنش‌ها منجر به القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS[1]) مانند رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-)، هیدروکسیل (OH)، پرهیدروکسی (H_2O)، الکوزی (RO) و دیگر عوامل غیر رادیکالی مانند پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی می‌شود (Singh-Gill and Tuteja 2010). اگرچه گونه‌های فعال اکسیژن در غلظت‌های پایین می‌توانند به‌عنوان عوامل تنظیم‌کننده برخی واکنش‌های گیاهی و یا به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه عمل کنند، با این حال معمولاً به‌عنوان عوامل مخرب در گیاهان شناسایی شده‌اند که موجب آسیب اکسیداتیو به مولکول‌های مختلف هم‌چون چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دورن سلولی می‌شوند (Kruk et al. 2005). در موقع رویارویی با تنش، گیاهان از مکانسیم‌های متفاوتی جهت جاروب گونه‌های اکسیژن فعال و حفاظت خود در برابر اثرات منفی این گونه‌ها استفاده می‌کنند (Ahmadi et al. 2018). محتوای گونه‌های اکسیژن فعال در سیستم‌های بیولوژیک توسط دو نوع دفاع آنتی‌اکسیدانتی شامل روش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شود. سیستم آنزیمی مانند آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD[2])، کاتالاز (CAT[3])، پراکسیداز (POX[4]) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX[5]) و سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربیک اسید (ASA[6])، گلوتاتیون (GSH[7])، توکورفول و غیره می‌باشند (Ashraf 2009; Verma et al. 2014).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌توانند به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم منجر به افزایش تحمل به تنش در گندم شوند. در این رابطه، Singht et al. (2012) رابطه مسقیم و معنی‌داری بین افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و عملکرد دانه در گندم را گزارش کردند. Farooq et al. (2009) اظهار داشتند که افزایش سطح آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌واسطه جاروب گونه‌های اکسیژن فعال منجر به بهبود تحمل تنش خشکی خواهند شد. علاوه براین، تجمع فنولویک و پرولین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های اصلی در کاهش اثرات نامطلوب تنش خشکی هستند (Farooq et al. 2017).

با پیشرفت تکنولوژی در ابزارهای مولکولی و ژنتیکی تغییر گسترده‌ای در استفاده از روش‌های مولکولی و بهره‌مندی از روش‌های نوین ایجاد شده‌است. در این زمینه، یکی از مهم‌ترین ابزارهای مولکولی مورد استفاده در غربالگری منابع ژرم‌پلاسمی و شناسایی بهترین افراد جهت بکارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، مانند انتخاب بهترین فرد به‌منظور استفاده در برنامه‌های تلاقی، استفاده از الگوی بیان ژن است. به‌عنوان نمونه در گذشته شناسایی افراد تنها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان‌پذیر بود ولی با استفاده از تکنیک بیان ژن نه تنها این شناسایی صورت می‌گیرد بلکه میزان بیان ژن(های) دخیل در تحمل و مقاومت به تنش‌ها نیز سنجیده می‌شود و اطلاعات مفید دیگری در رابطه با سازوکارهای ژن‌های مورد هدف برای پژوهشگران فراهم می‌شود. تغییرات اقلیمی به‌واسطه بروز تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی، گرما و شوری بر تولید محصولات کشاورزی تأثیر چمشگیری دارند. بنابراین تمرکز بر به‌کارگیری استراتژی‌های جدید برای مواجهه با شرایط نامطلوب ایجاد شده به‌واسطه تغییرات اقلیمی و ایجاد واریته‌های مقاوم جهت کشت در چنین شرایطی یکی از ملزومات اساسی در برنامه‌های اصلاحی آینده به‌شمار می‌آید (Fita et al. 2015). با توجه به محدودیت تنوع ژنتیکی قابل استفاده در گونه‌های زراعی اصلاح شده برای سازگاری به تغییرات اقلیمی و بنابراین شانس ضعیف دستیابی به تنوع آللی جدید در این ذخایر، استفاده از خویشاوندان وحشی و گونه‌های بیگانه می‌تواند یک منبع ژنی غنی و متنوع از آلل‌های جدید و

[1] Reactive Oxygen Species
[2] Superoxide Dismutase
[3] Catalase
[4] Proxidase
[5] Ascorbate Peroxidase
[6] Ascorbate Acid
[7] Glutathione

ایده‌آل را برای به‌نژادگران فراهم آورد (Warschefsky et al. 2014).

جنس‌های تریتیکوم[1] و آژیلوپس[2] از مهم‌ترین جنس‌های موجود در تیره Triticea می‌باشند که گونه‌های موجود در آن‌ها مهم‌ترین خویشاوندان وحشی گندم زراعی را تشکیل می‌دهند به‌طوری که برخی از این گونه‌ها به‌صورت مستقیم و غیر مستقیم به‌عنوان والد بخشنده ژنوم A، B و D شناخته شده‌اند. تا کنون مطالعات زیادی در رابطه با قابلیت گونه‌های ژرم‌پلاسمی مختلف گندم در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده صورت گرفته است به‌طوری که نتایج هر یک از این مطالعات منجر به شناسایی برخی از گونه‌ها به‌عنوان منابع ایده‌آلی برای جستجوی ژن‌های مقاومت شده‌اند (Ramezani et al. 2012; Zamani Babgohari et al. 2013; Byrt et al. 2014; Masoomi-Aladizgeh et al. 2015; Pour-Aboughadareh et al. 2017; Ahmadi et al. 2018).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه اخیر توسط Pour-Aboughadareh et al. (2017)، مشخص شد سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در گونه‌های خویشاوندی گندم در پاسخ به شرایط تنش خشکی شدید وجود دارد، از این‌رو هدف از انجام این تحقیق بررسی الگوی بیان نسبی برخی از ژن‌های مرتبط با تحمل تنش خشکی و مقایسه گونه‌های ژرم‌پلاسمی مختلف با یکدیگر و با ارقام تجاری گندم نان متحمل و حساس به خشکی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی در این تحقیق شامل هفت گونه زراعی و وحشی گندم شامل پنج گونه از جنس *Aegilops* و دو گونه از جنس *Triticum* بود که بر اساس نتایج حاصل از مطالعه Pour-Aboughadareh et al. (2017) انتخاب شدند. مشخصات ژنومی و اطلاعات مربوط به نواحی جمع‌آوری هر یک از این گونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده‌است. بذور هر یک از گونه‌های مورد بررسی به‌همراه دو رقم شاهد گندم نان مقاوم (سیروان) و حساس (دریا) به خشکی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی) در شرایط گلخانه با دوره نوری ۱۶: ۸ (روشنایی: تاریکی) و شرایط دمایی ۲۵ – ۲۰ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. هر واحد آزمایشی شامل یک گلدان پلاستیکی به ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و قطر دهانه ۸ سانتی‌متر بود. از هر نمونه تعداد پنج بذر در هر گلدان کشت شد. محتوی هر گلدان شامل خاک، ماسه و کود حیوانی با نسبت برابر بود. دو سطح فاقد تنش و تنش خشکی به عنوان فاکتور اول و گونه‌های مورد بررسی به‌همراه ارقام شاهد (سیروان و دریا) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. اعمال تیمار خشکی بر اساس روش ظرفیت زراعی[3] (FC) در دو سطح ۹۰ درصد (شرایط عدم تنش) و ۲۵ درصد (تنش خشکی) ظرفیت زراعی در مرحله سه برگی صورت گرفت. پس از اتمام دوره تنش (به مدت چهار هفته) نمونه‌برداری در مدت زمان معین و بر روی گیاهچه‌های ۳۸ روزه انجام شد. پس از پایان دوره اعمال تنش نمونه‌برداری از بافت برگ انجام و نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

به‌منظور پیشگیری از اثر آنزیم RNase و تجزیه RNA، ابتدا تمام وسایل مورد نیاز برای استخراج RNA استریل شدند. جهت حذف آلودگی‌های احتمالی، هاون و دسته هاون‌ها به مدت چند دقیقه با محلول هیپوکلرید سدیم مورد تیمار قرار گرفتند، سپس با مایع ظرفشویی شستشو داده و پس از آبکشی بار دیگر با اتانول ۷۰ درصد آبکشی شدند. سپس تجهیزات فوق با محلول هیدروژن پراکسیداز (H_2O_2) ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. پس از این مرحله، تمام لوازم با آب‌مقطر اتوکلاو شده آبکشی شده و پس از فویل‌بندی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه اتوکلاو شدند. پس از اتمام اتوکلاو، جهت استریل تمام وسایل به مدت ٤-٦ ساعت درون آون با دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای استریل تجهیزات پلاستیکی از آب دپس (DEPC) و سپس اتوکلاو (دمای ۱۲۰ درجه و زمان ۲۰ دقیقه) استفاده شد. تانک الکتروفورز و کاست مورد نیاز برای ژل RNA نیز با استفاده از محلول SDS یک درصد و H_2O_2 استریل و در نهایت با آب‌مقطر شستشو داده شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-

[1] *Triticum*
[2] *Aegilops*
[3] Field Capacity

Plus™ شرکت سینا ژن انجام گرفت. به‌منظور اطمینان از کمیت و کیفیت RNA و تعیین غلظت آن از دستگاه نانودرآپ (Thermo Scientific, 2000C) استفاده شد. سپس بررسی کیفیت RNA کل استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. برای حذف آلودگی‌های احتمالی DNA ژنومی از RNAهای استخراج شده، تمامی RNAها با استفاده از کیت DNase1 (#N0521) شرکت Ferments بر اساس دستوالعمل شرکت سازنده تیمار شدند. واکنش سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت Hyper Script (601-602) شرکت GeneAll مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، از کیت RealQ Plus 2X Master Mix Green (5000850-1250) استفاده شد. در ابتدا به‌منظور تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-Time PCR برای هر جفت آغازگر چندین ضریب رقت در نظر گرفته شد. پس ازتعیین بهترین غلظت آغازگر و cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Bio-RAD Real-time PCR (MiniOpticon) انجام شد. توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی *APX*، *MnSOD* و *GPX* به‌همراه ژن مرجع *18s*rRNA در جدول ۲ نشان داده شده‌است. حجم مخلوط واکنش ۱۵ µl شامل ۷/۵ µl از 2x RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon) ، ۱ µl نمونه cDNA، ۰/۵ µl از هر یک از آغازگر پیشرو و پسرو و ۵/۵ µl آب عاری از RNase بود. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش، واکنش qRT-PCR با شرایط دمایی ۳ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس و به دنبال آن ٤۰ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و افزایش دما برای منحنی ذوب از ٦۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس انجام شد. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، برای هر جفت آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از روابط $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl 2001) محاسبه شد. پس از محاسبه داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی، تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد.

جدول ۱- اسامی توده‌های مربوط به گونه‌های مختلف جهت بررسی الگوی بیان ژن

ردیف	گونه	ژنوم	کد بانک ژن	محل جمع‌آوری (استان/ منطقه)
۱	*T. durum*	AB	IUGB-00038	اصفهان / گلپایگان
۲	*T. urartu*	A^u	IUGB-00346	کردستان / جاده سقز – مریوان
۳	*Ae. tauschii*	D	IUGB-00260	گیلان / آستارا
٤	*Ae. speltoides*	B	IUGB-00025	کرمانشاه / قصرشیرین
۵	*Ae. caudata*	C	IUGB-00081	ایلام / دره‌شهر
٦	*Ae. cylindrica*	DC	IUGB-00172	زنجان / زنجان
۷	*Ae. triuncialis*	UC	IUGB-00318	چهارمحال و بختیاری / جاده یاسوج – بروجن
۸	رقم مقاوم	ABD	سیروان	مرکز اصلاح و نهال بذر، کرج
۹	رقم حساس	ABD	دریا	مرکز اصلاح و نهال بذر، کرج

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده در آنالیز الگوی بیان ژن خویشاوندان وحشی گندم

منبع	توالی آغازگر	ژن	
Baek et al. (2003)	5′-CAGAGGGTGCTGCTTTACAA-3′	Forward	*MnSOD*
	5′-GGTCACAAGAGGGTCCTGAT-3′	Reverse	
Baek et al. (2003)	5′-CCCCCTGTACAAGTTCCTGA-3′	Forward	*GXP*
	5′-GTCAACAACGTGACCCTCCT-3′	Reverse	
Baek et al. (2003)	5′-GCAGCTGCTGAAGGAGAAGT-3′	Forward	*APX*
	5′-CACTGGGGCCACTCACTAAT-3′	Reverse	
Yousfi et al. (2016)	5′-GGCCGCTCCTAGCCCTAATTG-3′	Forward	*18SrRNA*
	5′-TGAGCACTCTAATTTCTTCAAAGTACG-3′	Reverse	

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های مطالعه شده در نه گونه زراعی و وحشی گندم

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		APX	*GPX*	*SOD*
تکرار	۳	۱/۳۱^{ns}	۰/٦٦^{ns}	۰/۸۵^{ns}
خشکی	۱	۲۷۳٤/٦۷**	۱۱٦۷/۰۸**	۲۰۸۵/۰۷**
گونه	۸	۱۵٦/٦۹**	۲۳/٦۱**	۱۰۹/٤۵**
خشکی × گونه	۸	۱٤۷/۲۱**	۱۱/٦۲**	۹۰/۸۸**
خطای آزمایش	۵۱	۳/٤۹	۰/۹۸	۱/۷٤
درصد ضریب تغییرات		۲۵/٤۲	۱۹/۳۹	۲۰/٦۰

ns، ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج و بحث

قبل از انجام تجزیه واریانس، صادق بودن فرض‌های مربوط به این تجزیه بررسی شد. با توجه به اینکه میزان بیان ژن‌های مذکور در سطوح مختلف تنش و هم‌چنین گونه‌های مختلف بسیار متفاوت از هم بودند، لذا با بررسی روند نرمال بودن داده‌ها مشخص شد که داده‌های به‌دست آمده بر اساس $2^{-\Delta\Delta C}$ دارای روند غیر نرمال هستند. از این‌رو، جهت نرمال نمودن داده‌های آزمایشی تبدیل داده صورت گرفت و تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی بر اساس داده‌های تبدیل شده انجام شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در جدول ۳ ارائه شده‌است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود از نظر کلیه ژن‌ها اختلاف معنی‌داری بین سطوح تنش، گونه‌های مختلف و هم‌چنین اثر متقابل بین تنش و گونه مشاهده شد. میزان ضریب تغییرات (CV) برآورد شده برای کلیه ژن‌ها نسبتاً بالا بود. میزان ضریب تغییرات بستگی به ماهیت آزمایش و نوع صفت اندازه‌گیری شده دارد و در مواردی که میزان CV بالا است اگر تفاوت بین تیمارها معنی‌دار باشد (به‌ویژه در سطح احتمال ۱ درصد) مشکلی در تفسیر نتایج به‌وجود نخواهد آمد زیرا اختلاف بین تیمارها آنقدر زیاد بوده است که بزرگی اشتباه آزمایشی مانع معنی‌دار شدن F تیمار نشده است (Valizadeh and Maghaddam 2012). با توجه به میانگین میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌های مورد مطالعه در هر دو شرایط عدم تنش و تنش خشکی، تحت شرایط تنش خشکی (FC = ٪۲۵) میزان بیان ژن‌های *APX*، *SOD*

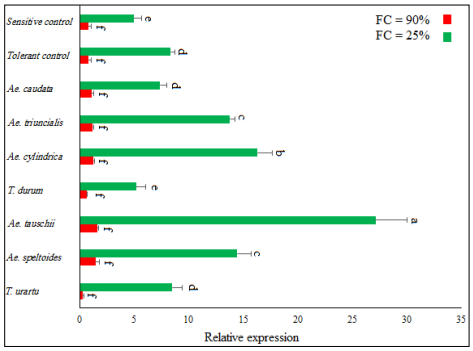
و *GPX* نسبت به شرایط عدم به‌ترتیب برابر با ۹/۵۵، ۱۲/٦٤ و ۱۰/۱۸ برابر بیش‌تر بود.

تغییر در تظاهر، تجمع و سنتز پروتئین در پاسخ به تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در جهت حفاظت از متابولیسم سلولی و ایجاد سازگاری تلقی می‌شود (Danyluk et al. 1998). زمانی‌که گیاهان در معرض انواعی از تنش‌های زنده و غیرزنده قرار می‌گیرند از پتانسیل ژنتیکی آن‌ها کاسته خواهد شد که این امر طبیعتاً منجر به کاهش کارکرد و عملکرد آن‌ها می‌شود. کمبود آب و وجود مقادیر بالایی از املاح نمکی در خاک از مهم‌ترین تنش‌های محیطی هستند که به شدت رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bartels and Sourer 2004). زمانی‌که گیاه با چنین شرایط نامساعدی مواجه می‌شود مسیرهای پیام‌رسانی[1] مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آن‌ها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. فعالیت کامل همه این آبشارهای پیام‌رسانی القاء شده، منجر به انطباق گیاه و در نتیجه تحمل تنش در آن می‌شوند (Leonardis et al. 2007). علاوه بر این، فرآورده‌های این ژن‌ها نه تنها در حفاظت سلول از تنش عمل می‌نمایند بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama et al. 2004). گیاهان در شرایط طبیعی و عدم تنش به‌منظور حفظ و ایجاد تعادل هموستازی درون سلول انواع متفاوتی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کنند. با این حال، در شرایط تنش این میزان بسیار افزایش خواهد یافت (Kar 2011). بنابراین، به‌منظور جلوگیری از تجمع این ترکیبات و به موازات آن کاهش رشد گیاه فعالیت برخی از مکانسیم‌های تنظیمی و آنزیم‌های جاروبگر ضروری می‌باشد. مطالعات صورت گرفته بر روی تنش‌های اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی 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 ژنوتیپ، مرحله رشدی، فرآیندهای متابولیسمی و شدت اعمال تنش بستگی دارد (Reddy et al. 2004). به‌عنوان مثال، در یک مطالعه صورت گرفته بر روی گیاه جو نشان داده شده‌است که تحت شرایط عدم تنش میزان بیان و فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در مرحله گیاهچه‌ای بیشتر از مرحله گیاه کامل است (Ehrenbergerova et al. 2009). علاوه بر این، مشخص شده‌است که در گیاهچه‌های برنج میزان بیان ژن‌های *APX* و *SOD* در شرایط تنش اسمزی بسیار بیشتر از شرایط عدم تنش بوده است، در حالی که ژن *CAT* یک روند کاهشی را نشان داده است (Sharma and Dubey 2005).

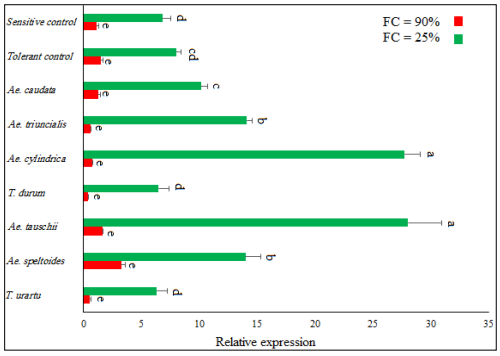
سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین و مهم‌ترین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید (O^{2-}) به H_2O_2 نقش حیاتی در سازوکارهای دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) ایفا می‌کند. پراکسید هیدروژن حاصله در مرحله بعدی به‌وسیله آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) پاکسازی می‌شود (Benavides et al. 2005). بر اساس کوفاکتورهای فلزی که در آنزیم‌ها استفاده می‌شود، SODها به سه گروه تقسیم می‌شوند: Cu/Zn-SOD که در سیتوسول و کلروپلاست قرار دارد، Mn-SOD که در میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد و Fe-SOD که در کلروپلاست قرار دارد (Khatun et al. 2008). نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین گونه‌ها از نظر بیان ژن *MnSOD* در شکل ۱ نشان داده شده‌است. در شرایط عدم تنش اختلاف معنی‌داری بین گونه‌های مختلف مشاهده نشد ولی در مقابل در شرایط تنش اختلاف بین گونه‌ها معنی‌دار و بیش‌ترین میزان بیان این ژن به‌ترتیب مربوط به گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica* و *Ae. speltoides* بود. تحت شرایط تنش بین گونه‌های *T. urartu*، *Ae. caudata* و رقم مقاوم به خشکی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از این‌رو با توجه به این نتایج به‌نظر می‌رسد گونه *Ae. tauschii* با ساختار ژنومی D نسبت به سایر خویشاوندان وحشی و حتی رقم مقاوم به خشکی (شاهد) از برتری نسبی بیش‌تری برخوردار بوده است که این به نوبه خود می‌تواند بیانگر قابلیت این ژنوم در حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش تحمل به تنش خشکی باشد. پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی، اسید

[1] Signal Transduction

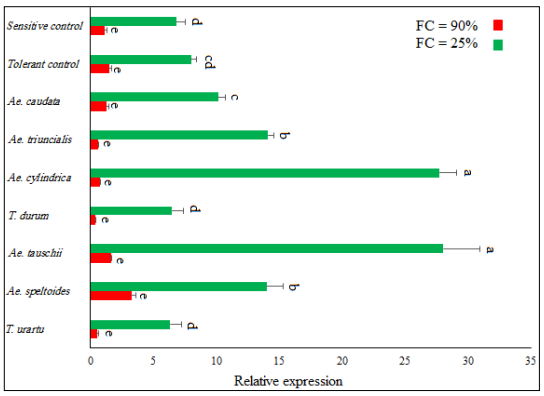
آسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم c کاتالیز کرده و به‌عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (Hashemi et al. 2015). APX یک آنزیم کلیدی در سامانه مهار آنزیمی ROS است که می‌تواند H_2O_2 تولید شده در کلروپلاست را از بین ببرد (Shen et al. 1997). تنش‌های محیطی موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی و تجمع پراکسید هیدروژن در پاسخ به تنش می‌شود (Blokina et al. 2001). بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشاهده می‌شود که تنش خشکی باعث افزایش میزان رونوشت ژن کدکننده APX در کلیه گونه‌ها شده‌است. با توجه به شکل ۲ در شرایط تنش خشکی گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. cylindrica*، *Ae. speltoides* و *Ae. triuncialis* به‌ترتیب با ساختارهای ژنومی D، DC، B و UC نسبت به سایر گونه‌ها و ارقام شاهد دارای بیش‌ترین میزان بیان ژن APX بودند. از این‌رو افزایش بیان ژن *APX* در این گونه‌ها می‌تواند باعث تحمل و زنده ماندن گیاه تحت تنش خشکی شود. از دیگر آنزیم‌های درگیر در حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده به‌واسطه تنش می‌توان به گایاکول پراکسیداز (GPX) اشاره کرد. این آنزیم از اکسیداسیون ترکیبات فنلی نظیر گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه H_2O_2 استفاده می‌کند و در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل نیز دیده می‌شود. گزارش شده‌است که میزان فعالیت این آنزیم در شرایط تنش‌های مختلف مانند سرما، خشکی و شوری افزایش می‌یابد (Gill and Tuteja 2010). در پژوهش حاضر نیز میزان بیان ژن *GPX* در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط عدم تنش در کلیه گونه‌ها افزایش یافت.



شکل ۱- میزان بیان نسبی ژن *MnSOD* در شرایط عدم تنش و تنش خشکی در گونه‌های زراعی و وحشی گندم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس مقایسه میانگین به روش دانکن می‌باشند.



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن APX در شرایط عدم تنش و تنش خشکی در گونه‌های زراعی و وحشی گندم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس مقایسه میانگین به روش دانکن می‌باشند.



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن *GPX* در شرایط عدم تنش و تنش خشکی در گونه‌های زراعی و وحشی گندم. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس مقایسه میانگین به روش دانکن می‌باشند.

با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها نیز مشخص شد بیش‌ترین میزان بیان ژن *GPX* در هر دو شرایط عدم تنش و تنش در گونه *Ae. speltoides* مشاهده شد. گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. caudata*، *Ae. cylindrica* و *T. durum* نیز در شرایط تنش خشکی دارای بیش‌ترین میزان بیان ژن بودند. تحت این شرایط اختلاف بین سایر گونه‌ها معنی دار نبود (شکل ۳). با توجه به اینکه ایران در منطقه آب و هوایی خشک و نیمه خشکی از جهان قرار دارد بنابراین یافتن ژرم‌پلاسم‌های با ارزش از نظر دارا بودن ژن‌های القا کننده تحمل به خشکی دور از انتظار نیست. از این‌رو ارزیابی و شناسایی گونه‌هایی خویشاوند گندم که به‌خوبی به شرایط نامساعد محیطی در نواحی جغرافیایی مختلف سازگار شده‌اند می‌تواند یکی از گام‌های اساسی در تولید و به‌نژادی ارقام متحمل به تنش خشکی باشد. در سال‌های اخیر پیشرفت در

روش‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک هم‌چون بیان ژن‌های بیوسنتز کننده حفاظت اسمزی، جاروبگرهای اشکال اکسیژن، همسانه‌سازی مولکولی، ترادف‌یابی و انتقال ژن سبب فراهم نمودن مسیر جدیدی در توسعه و تولید ارقام متحمل به‌خشکی شده‌است.

از این‌رو، اجرای مناسب برنامه‌های اصلاح مولکولی و بیوتکنولوژی نیازمند شناخت مکانسیم(های) تحمل در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آن‌ها، ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌های برتر می‌باشد. تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با ارقام زراعی گندم در شرایط محیطی نامساعد صورت گرفته است و در بسیاری از این مطالعات به جنبه‌های مختلف فیزیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره شده‌است. اگرچه نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر به‌تنهایی قادر به معرفی گونه‌ها و یا ژنوم‌های خویشاوندی به‌عنوان گونه‌های برتر نیست، با این حال می‌تواند بیانگر قابلیت برخی از گونه‌های خویشاوندی در پاسخ به تنش خشکی باشد تا بتوان در آزمایشات تکمیلی بعدی از آن‌ها استفاده نمود.

به‌عنوان یک جمع‌بندی کلی نتایج این آزمایش نشان داد گونه‌های برخوردار از ژنوم‌های D (*Ae. tauschii*)، B (*Ae. speltoides*) و DC (*Ae. cylindrica*) در شرایط تنش خشکی نسبت به سایر گونه‌ها و ارقام زراعی از نظر هریک از ژن‌های مورد بررسی دارای ویژگی‌های منحصر به‌فردی بودند. از این‌رو به‌نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین این گونه‌ها و حذف گونه‌های فعال اکسیژن وجود دارد. بنابراین تولید واریته‌های سنتتیک و قرارگیری این ژنوم‌ها در یک زمینه ژنتیکی جدید می‌تواند در ایجاد واریته‌های جدید و متحمل به خشکی گندم مفید واقع شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی و معنوی دانشگاه بین المللی امام‌خمینی (ره) انجام شده‌است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S, Mehrabi AA, Sidique KHM (2018) Wild relatives of wheat: *Aegilops–Triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. Acta Physiologiae Plantarum 40:90.

Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances 27:84-93.

Bartels D, Sourer E (2004) Plant responses to abiotic stress. Springer Verlag, Chapter 1.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.

Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. Journal of Experimental Botany 52:1179-1190.

Byrt C, Xu B, Krishnan M (2014) The Na^+ transporter, *TaHKT1;5-D*, limits shoot Na^+ accumulation in bread wheat. The Plant Journal 80:516-526.

Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. Frontiers in Plant Science 4:1-6.

Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. The Plant Cell 10:623-638.

Ehrenbergerova J, Belcredi NB, Kopacek J, Melisova L, Hrstkova P, Macuchova S, Vaculova K, Paulickova I (2009) Antioxidant enzymes in barley green biomass. Plant Foods for Human Nutrition 64:122-128.

Farooq M, Aziz T, Wahid A, Lee DJ, Siddique KHM (2009) Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological applications. Crop & Pasture Science 60:501-516.

Farooq M, Hussain M, Nawaz A, Lee D, Alghamdi S, Siddique HMK (2017) Seed priming improves chilling tolerance in chickpea by modulating germination metabolism, trehalose accumulation and carbon assimilation. Plant Physiology and Biochemistry 111:274-283.

Fita A, Rodrıguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: a new paradigm for increasing food production. Frontiers in Plant Science 6:978.

Hashemi H, Kavousi HR, Pourseyedi SH () Effect of cadmium toxicity on gene expression and enzyme activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidas in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. Journal of Agricultural Biotechnology 16:99-111.

Kar RK (2011) Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. Plant Signaling and Behavior 6:1741-1745.

Khatun S, Babar Ali M, Hahn EJ, Paek, KY (2008) Copper toxicity in Withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany 64:279-285.

Kruk J, Czytko HH, Oettmeier W, Trebest A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. Journal Plant Physiology 162:749-757.

Leonardis AMD, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Fonzo ND, Cattivelli L, Mastrangelo AM (2007) Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress and genotype dependent manner. Plant Science 172:1005-1016.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis *DREB1A/CBF3* transcriptional factor using two microarray systems. Plant Journal 38:982-993.

Masoomi-Aladizgeh F, Aalami A, Esfahani M, Aghaei MJ, Mozaffari K (2015) Identification of CBF14 and NAC2 genes in *Aegilops tauschii* associated with resistance to freezing stress. Applied Biochemistry and Biotechnology 176:1059-1070.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleoid Acids Research 29:e45.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M, Siddique KHM (2017) Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: implications for wheat improvement. Acta Physiologiae Plantarum 39:106.

Ramezani A, Niazi A, Abolimoghadam AA, Zamani Babgohari M, Deihimi T, Ebrahimi M, Aktardanesh H, Ebrahimi E (2013) Quantitative expression analysis of *TaSOS1* and *TaSOS4* genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. Molecular Biotechnology 3:189-197.

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Droughtinduced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal Plant Physiology 161:1189-1202.

Sharma P, Dubey S (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant. Plant Growth Regulation, 46:209-221.

Shen WB, Huang LQ, Xu LL (1997) Ascorbate peroxidase in plants. Chemistry of Life 17:24-26.

Singh-Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909-930.

Valizadeh M, Moghaddam M (2012) Experimental designs in agriculture. 5th edition, Parivar Publisher, Tabriz, Iran. (In Farsi).

Verma KK, Singh M, Gupta RK, Verma CL (2014) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcasduring* soil flooding. Turkish Journal of Botany 38:130-140.

Warschefsky E, Penmetsa RV, Cook DR, von-Wettberg EJB (2014) Back to the wilds: tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. American Journal of Botany 101:1791-1800.

Yousfi S, Marquez AJ, Betti M (2016) Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. Journal of Integrative Plant Biology 58:48-66.

Zamani Babgohari M, Ebrahimi E, Niazi A (2014) In silico analysis of high affinity potassium transporter (*HKT*) isoforms in different plants. Aquatic Biosystems 10:9-23.