

Expression of Genes Controlling Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase Activity and Their Relationship with Wheat Yield under Different Moisture Conditions

Sadat Motahari¹, Z., Navabpour^{2*}, S., Mazandarani³, A. and Melaei³, S. M.

Received Date: 29 May 2024

Accepted Date: 23 August 2024

(Research Article)

Abstract

Drought stress is the most important factor leading to a decrease in both the quantity and quality of wheat yield, a strategic crop. This stress has a negative impact on various vital biochemical and physiological processes in wheat. This study aimed to assess the activity of glutathione reductase and ascorbate peroxidase enzymes, as well as to investigate the expression levels of genes that control these enzymes and their relationship with yield and some yield components in the field under three moisture conditions for two wheat cultivars. The experiment was conducted in a split-plot design within a randomized complete block design with four replications. The main factor consisted of three levels of moisture stress: -0.3 bar (field capacity as the control treatment), -2 bar, and -4 bar, applied in field conditions using a tensiometer. The secondary factor included two wheat cultivars, Kalateh and Ehsan. The results of the analysis of variance indicated that the effects of different moisture levels and the differences between the two cultivars were significant ($p \leq 0.01$) for all evaluated traits. Yield and its related traits were negatively impacted by drought stress, leading to a decrease. The activity of ascorbate peroxidase and glutathione reductase enzymes was influenced by the interaction between drought stress and cultivar. In general, their activity increased with the occurrence of stress, consistent with the increase in gene expression. The increase in gene expression under stress conditions was four times higher in the Kalateh cultivar compared to the control, and two times higher than in the stress condition. The results suggest that drought stress resulted in a decrease in yield and related traits, likely due to oxidative stress and disruption of plant biological processes. Plants under drought stress aim to reduce oxidative damage by upregulating genes related to antioxidant enzymes, resulting in decreased yield but increased resistance through biological reactions. This pattern was more pronounced in the Kalateh cultivar, indicating its biological resilience to stress. Overall, the results indicated that the Kalateh cultivar performed better than the Ehsan cultivar.

Keywords: Antioxidant enzymes, Gene expression, Drought, Wheat

1. MSc Graduated in Plant Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Associate Professor, Department of Genetics and Breeding, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. MSc Graduated, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*: Corresponding author Email: s.navabpour@gau.ac.ir

بیان ژن‌ها کنترل کننده فعالیت گلوکوتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز و ارتباط آن‌ها با عملکرد گندم تحت شرایط مختلف رطوبتی

Expression of Genes Controlling Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase Activity and Their Relationship with Wheat Yield under Different Moisture Conditions

زهراسادات مطهری^۲، سعیدنواب پور^{۲*}، ابوالفضل مازندرانی^۳ و سید مجتبی ملائی^۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۸

(مقاله پژوهشی)

چکیده

تنش خشکی مهم‌ترین عامل افت کمی و کیفی عملکرد گندم، به عنوان یک محصول زراعی راهبردی، است. این تنش بر انواع فرآیندهای حیاتی بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گندم تأثیر منفی دارد. این پژوهش با هدف ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گلوکوتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز و به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های کنترل کننده این دو آنزیم و ارتباط آن‌ها با عملکرد و برخی از اجزای عملکرد در مزرعه و تحت سه شرایط رطوبتی برای دو رقم کلاته و احسان (به ترتیب متحمل و حساس به خشکی) گندم انجام شد. آزمایش به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عامل اصلی سه سطح تنش رطوبتی، شامل ۰/۳- بار (ظرفیت زراعی به عنوان تیمار شاهد)، ۲- بار و ۴- بار بود، که در شرایط مزرعه و با کمک تانسومتر، اعمال شد. عامل فرعی هم شامل دو رقم گندم کلاته و احسان بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح مختلف رطوبتی و همچنین تفاوت بین دو رقم، برای کلیه صفات ارزیابی شده معنی دار ($p \leq 0/01$) بود. عملکرد و صفات وابسته به آن تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت و کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز تحت تأثیر اثر متقابل تنش خشکی و رقم قرار گرفت و به طور کلی با بروز تنش مقدار فعالیت آن‌ها افزایش یافت که این نتایج منطبق بر افزایش بیان ژن‌ها بود. این افزایش بیان ژن‌ها در سطح تنش ۴- بار در رقم کلاته بیشتر از شرایط شاهد و ۲- بار تنش بود. نتایج نشان می‌دهد که تنش خشکی باعث کاهش عملکرد و صفات وابسته شد. این کاهش ممکن است ناشی از فشار اکسیداتیو و اختلال در فرآیندهای بیولوژیکی گیاه باشد. در شرایط تنش خشکی، گیاهان با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های ضد اکسیداتیو، تلاش می‌کنند تا آسیب‌های اکسیداتیو کاهش یابد و در نتیجه، عملکرد کاهش می‌یابد اما با واکنش‌های بیولوژیکی قوی‌تر، تا حدی مقاوم‌تر شوند. این الگو در رقم کلاته بیشتر مشهود است که نشان‌دهنده مقاومت بیولوژیکی آن در برابر تنش است. نتایج نشان داد رقم کلاته نسبت به وضعیت رقم احسان در شرایط بهتری قرار داشت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی اکسیدان، بیان ژن، خشکی، گندم

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. دانش‌آموخته گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*: نویسنده مسئول
Email: s.navabpour@gau.ac.ir

گندم یک محصول راهبردی در تغذیه انسان به شمار میرود و افزایش روزافزون جمعیت جهانی مستلزم تولید بیشتر محصولات کشاورزی است (Najafi et al., 2019). تقاضا برای گندم در جهان با افزایش سریع رشد جمعیت در حال افزایش است (Hosseini et al., 2021). پیش‌بینی می‌شود که جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ از هشت میلیارد نفر بگذرد؛ از این‌رو میزان تولید این محصول هم از طریق افزایش سطح کشت و هم از طریق افزایش در واحد سطح باید افزایش یابد (Ji et al., 2017). این گیاه مهم‌ترین محصول در کشورهای در حال صنعتی شدن است و در بین غلات بیش‌ترین و وسیع‌ترین سازگاری را به شرایط متفاوت اقلیمی دارا می‌باشد (Shewry & Hey, 2015). افزایش روزافزون جمعیت کره زمین و نیاز به مواد غذایی بیش‌تر، محققان بخش کشاورزی را به تلاش در راستای بالا بردن میزان عملکرد محصولات در واحد سطح واداشته است (Nezhadahmadi et al., 2013). این گیاه اولین گیاهی است که انسان برای تأمین غذای خود شروع به کاشت و تکثیر آن نموده است و شاید که کشاورزی در دنیا با کاشت آن در ۲۳۰۰ سال پیش در منطقه‌ی خاورمیانه آغاز شده باشد. این گیاه از نظر سطح زیر کشت و تولید مهم‌ترین محصول زراعی ایران است. گندم یکی از محصولات استراتژیک است که از نظر سطح و ارزش غذایی دارای اهمیت بسیار بالایی بوده و یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان زراعی جهان شناخته شده است. گندم غذای اصلی مردم ایران و همواره محصولی مهم بوده که جنبه‌های اجتماعی، اقتصادی و سیاسی زندگی مردم را تحت تأثیر خود داشته است. از این‌رو تولید گندم و خودکفایی آن یکی از مهم‌ترین اهداف دولت بوده است (Khezrie-afravi et al., 2010).

خشکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده محیطی در کاهش عملکرد و کیفیت گندم و به‌عنوان یک چالش مهم برای محققان کشاورزی و اصلاح‌کنندگان گیاهان است (Khezrie-afravi et al., 2010; Nezhadahmadi et al., 2013). کشور ما ایران از لحاظ جغرافیایی و اقلیمی در منطقه خشک و نیمه‌خشک واقع شده و از عمده مشکلات زراعت در این اقلیم، تنش خشکی است. این تصور که با مدیریت صحیح آبیاری می‌توان مشکلات ناشی از رشد گیاه را حل کرد کار پیچیده‌ای است (Homaei, 2012). بهره‌وری محصول گندم به دلیل کمبود آب در زمین‌های زیر کشت آن در ایران و جهان رو به کاهش است. برای غلبه بر این مشکل، نیاز مبرمی به غربالگری ارقام گندم متحمل به خشکی و یا پرورش ارقام

جدید با مقاومت به خشکی وجود دارد (Školníková et al., 2022).

تنش خشکی بر انواع فرآیندهای حیاتی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه تأثیر منفی می‌گذارد. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان تحت تنش خشکی با آن مواجه می‌شود، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS; Reactive Oxygen Species) است. خشکسالی به دلیل نشت بیشتر الکترون‌ها به سمت O_2 در طی فرآیندهای فتوسنتزی و تنفسی منجر به استرس اکسیداتیو در سلول گیاهی می‌شود که منجر به افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول منجر به فعال کردن مسیرهای سیگنال‌دهی اختصاصی شده که با اکسید کردن پروتئین‌های خاص و تأثیر بر عوامل رونویسی سبب تغییر الگوی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش شده و در نهایت سلول را برای سازگاری به شرایط جدید آماده می‌کند (Salehi et al., 2014). طیف وسیعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ترکیبات سلولی متفاوت، مربوط به گیاهان مختلف شناسایی شده است (Gill & Tuteja, 2010). چرخه اسکوربات-گلوپروتئین (AsA-GSH)، یکی از مهم‌ترین مؤلفه‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی، مسیری اساسی برای مهار H_2O_2 و مکانیسم مؤثر سم‌زدایی در سلول‌های گیاهی با استفاده از AsA و GSH و آنزیم‌های مرتبط با آن‌ها است. فعالیت هم‌زمان آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوپروتئین‌ردوکتاز به‌عنوان بخشی از این سامانه آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سلول را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) حفاظت کند (Liu et al., 2015). این آنتی‌اکسیدان‌ها اطلاعات لازم در مورد وضعیت ردوکس سلولی را نیز ارائه می‌دهند و بر روی رونویسی ژن‌هایی که مسئول پاسخ به تنش هستند، تأثیر می‌گذارند تا حداکثر دفاع ایجاد شود. به‌عبارت دیگر، نقش محافظتی چرخه AsA-GSH در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش‌های شوری و خشکی، مشارکت این چرخه در تنظیم بیان ژن آنزیم‌های کلیدی شامل APX1، GRC1، DHAR، MDHAR، GPX1 و GS3 (گلوپروتئین‌سنتتاز) است که همگی در چرخه AsA-GSH دخیل هستند (Wei et al., 2015). این پژوهش با هدف ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گلوپروتئین‌ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز و جهت بررسی میزان بیان ژن‌های کنترل‌کننده این دو آنزیم و ارتباط آن‌ها با عملکرد و برخی از اجزای عملکرد در مزرعه و تحت سه شرایط رطوبتی برای دو رقم گندم انجام شد.

مواد و روش

بعد از ضد عفونی بذور دو رقم کلاته (متحمل به خشکی) و احسان (حساس به خشکی) (Damavandi et al., 2025)، کاشت آن‌ها در مزرعه در اواخر آذرماه ۱۴۰۱ انجام شد. ارقام گندم کلاته، و احسان استفاده شد به دلیل رواج کاشت در منطقه (استان گلستان) و تنوع در عملکرد و اجزای عملکرد مورد استفاده قرار گرفتند. ارقام کلاته و احسان جزو ارقامی می‌باشند که به تازگی معرفی شده‌اند جزو ارقامی هست که به صورت رایج در منطقه کشت می‌شود. موقعیت طول جغرافیایی منطقه کشت ۵۴ درجه و ۳۴ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی آن ۳۶ درجه و ۸۳ دقیقه شمالی و با ارتفاع ۱۷۶ متر از سطح دریا است. بافت خاک آن از نوع لومی رسی است میانگین بارندگی سالانه در این منطقه بین ۴۵۰ تا ۵۵۰ میلی‌لیتر و رطوبت نسبی آن بین ۵۰ تا ۶۰ درصد است. همچنین، محدوده دمایی این منطقه از ۵- تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد متغیر است. آزمایش به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عامل اصلی سه سطح تنش رطوبتی، شامل ۰/۳- بار (ظرفیت زراعی به عنوان تیمار شاهد)، ۲- بار و ۴- بار بود، که در شرایط مزرعه و با کمک تانسومتر، اعمال شد. عامل فرعی هم شامل دو رقم گندم کلاته و احسان بود. نمونه برداری برگ جهت ارزیابی بیان ژن‌ها در زمان خمیری سخت مرحله ۸۷ مقیاس زادوکس صورت گرفت. حدود پنج گرم نمونه برگ در تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها برداشت گردید و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری صفات عملکردی مانند وزن هزار دانه، تعداد دانه، تعداد سنبله، تعداد دانه در سنبله و عملکرد دانه در زمان رسیدگی، پس از حذف اثرات حاشیه‌ای، از یک متر

ردیف‌های میانی برداشت انجام شد.

جهت اندازه‌گیری وزن دانه و وزن هزاردانه از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. پس از برداشت کامل کرت‌های آزمایشی و بوجاری کردن بذور، کل دانه‌های حاصل، وزن شده و برحسب تن در هکتار یادداشت گردید و عملکرد دانه بدست آمد.

اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش ناکانو و آسادا (1981) و آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز با استفاده از روش اسمیت (1988) انجام شد.

استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج‌شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت و به وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* با استفاده از PCR، سنتز شده آزمون گردید (Kazemi et al., 2010). جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های کاتالاز و متالوتیونین از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است استفاده شد. آغازگرهای موردنیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. از آنجایی که طول توالی محصولات بین ۱۳۲ و ۱۸۷ باز بود، دمای نقطه ذوب بین ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با توجه به درصد GC و طول باندها انتخاب شد. اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت (Moloudi et al., 2013).

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده

Table 1: Sequence of used primers

ژن‌ها Genes	جفت پرایمر ۵'-۳' Primer pairs 5'-3'
APX	F: AAAGCGAAGCATCCAAAG R: CAGAGGGTCACGAGTCCA
GR	F: GCACACGACCAAGCACATAT R: ATATCCGCCACCAAGAATAACG
GAPDH	F: TCACCACCGACTACATGACC R: ACAGCAACCTCCTTCTCACC

نتایج و بحث

بررسی در سطح معنی‌داری ۱ درصد قرار داشتند. همچنین، اثر متقابل تنش و رقم بر وزن هزاردانه، در سطح معنی‌داری ۵ درصد به صورت معنی‌دار نبود. اما این اثر بر تعداد دانه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. از سوی دیگر، اثر متقابل تنش و

نتایج تجزیه واریانس عملکرد و صفات وابسته در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس این تحلیل، اثر بلوک بر هیچ‌یک از صفات معنی‌دار نبود. در مقابل، اثر تنش و رقم بر تمامی صفات مورد

رقم بر صفات تعداد سنبله‌ها و عملکرد دانه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 2: Variance analysis of traits in the form of split plots in the form of randomized complete block design

میانگین مربعات Average of squares				درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variance
عملکرد دانه Grain yield	تعداد سنبله Spike number	تعداد دانه Seed number	وزن هزار دانه 1000- seed weight		
13.2 ^{ns}	10.0061 ^{ns}	15.5 ^{ns}	0.9473 ^{ns}	3	بلوک Block
302 ^{**}	11809.1 ^{**}	197 ^{**}	954.42 ^{**}	2	سطح رطوبتی Humidity level
6.02	446.02	31.7	27.47	6	خطای اصلی Original error
84 ^{**}	31300.7 ^{**}	96.3 ^{**}	115.770 ^{**}	1	رقم Variety
53 ^{**}	317.8 ^{**}	31.3 [*]	7.71 ^{ns}	2	سطح رطوبتی × رقم Variety × Humidity level
5.5	11	8.5	8.95	9	خطای فرعی Minor error
11.15	22.8	6.93	8.97	-	ضریب تغییرات CV

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and ** are non-significant and significant at five and one percent probability levels, respectively

رقم احسان این اختلاف معنی‌دار بود. در شرایط تنش ۴- بار هر دو رقم کاهش معنی‌داری در کاهش وزن هزاردانه داشتند و کمترین مقدار وزن هزاردانه مربوط به رقم احسان در این شرایط بود که اختلاف معنی‌داری با مقدار وزن هزار دانه رقم کلاته در شرایط مشابه داشت. کاهش وزن هزاردانه ارقام گندم در شرایط خشکی نشان‌دهنده عدم تأمین مواد فتوسنتزی مورد تقاضای دانه‌ها می‌باشد. چنین واکنشی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Saeedi *et al.*, 2018; Ahmadi *et al.*, 2018). کاهش وزن دانه‌ها در اثر تنش خشکی می‌تواند ناشی از تأثیر کاهش تولید شیره پرورده و کاهش طول دوره پر شدن دانه باشد. بهامین و همکاران (Bahamin *et al.*, 2019) نیز کاهش وزن هزاردانه در شرایط تنش خشکی را به کوتاه‌تر شدن دوره پر شدن دانه و قرار گرفتن در معرض دمای بالاتر در روزهای پایانی دوره رشد نسبت داده‌اند، که این عوامل منجر به کاهش قطر و ریزتر شدن دانه‌ها می‌شود.

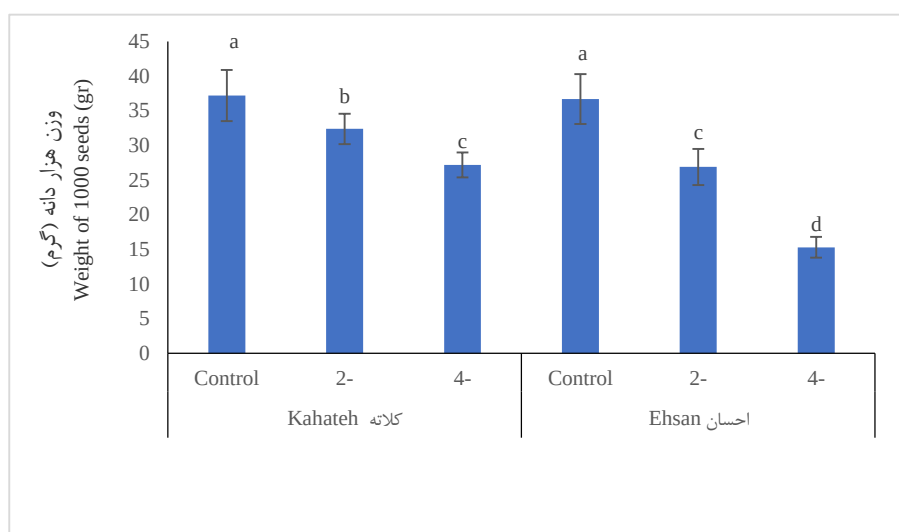
نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی (جدول ۳) نشان داد اثر بلوک برای هر دو صفت غیرمعنی‌دار شد. اثر تنش و رقم در رابطه با هر دو صفت مورد ارزیابی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار گردید. اثر متقابل تنش در رقم برای فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار گردید ولی برای آنزیم گلوکوتائین ردوکتاز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد.

بررسی اثر متقابل تنش خشکی در رقم بر روی میزان تغییرات وزن هزاردانه ارقام (شکل ۱) نشان داد، بیشترین وزن هزاردانه ارقام در شرایط عدم تنش مشاهده گردید و با اعمال تنش خشکی و افزایش شدت آن مقدار وزن هزاردانه کاهش یافت. در شرایط شاهد اختلاف وزن هزاردانه ارقام معنی‌دار نبود ولی با اعمال تنش مقدار وزن هزاردانه در رقم احسان کاهش بیشتری داشت. در شرایط تنش ۲- بار مقدار وزن هزاردانه رقم کلاته با شرایط عدم تنش اختلاف معنی‌داری نداشت ولی برای

جدول ۳: تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی
Table 3: Variance analysis of biochemical traits in the form of split plots in the form of randomized complete block design

میانگین مربعات Average of squares		درجه آزادی df	منابع تغییرات Sources of changes
فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione reductase activity	فعالیت آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase activity		
00.846 ^{ns}	00.364 ^{ns}	3	بلوک Block
478 ^{**}	302 ^{**}	2	تنش stress
22	15	6	خطای اصلی Original error
88 ^{**}	84 ^{**}	1	رقم variety
45 [*]	53 ^{**}	2	تنش × رقم variety × stress
13.42	9.6	9	خطای فرعی Minor error
7.2	5.5	-	ضریب تغییرات CV

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد
ns, * and ** are non-significant and significant at five and one percent probability levels, respectively

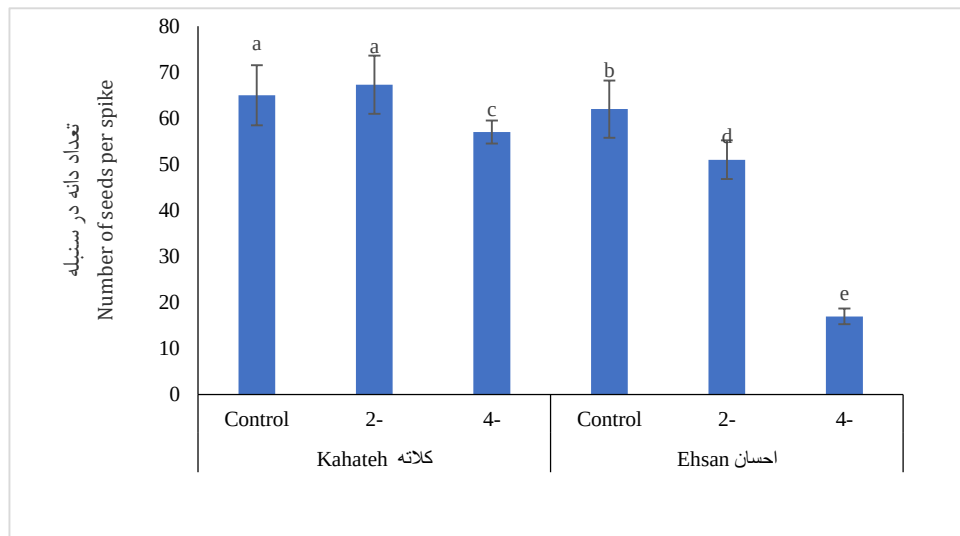


شکل ۱: میزان تغییرات وزن هزاردانه در ارقام مختلف تحت شرایط رطوبتی

Fig. 1: The amount of changes in the weight of a thousand seeds in different cultivars under different humidity conditions

تعداد دانه در این رقم نیز کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری با تعداد دانه در شرایط تنش ۲- بار داشت. کاهش تعداد دانه در سنبله، حاکی از کاهش باروری دانه‌ها به دلیل تلقیح نامناسب و همچنین کمبود منبع آبی و ایجاد تنش و رقابت بین دانه‌ها است که سبب کاهش تعداد دانه در سنبله و کاهش عملکرد خواهد شد، نتایج آزمایش امام و همکاران (۲۰۰۷) روی رقم‌های گندم از نظر تعداد دانه کاملاً مشابه با نتایج این مطالعه بود. اثر منفی تنش خشکی بر تعداد دانه در سنبله می‌تواند به دلیل

بررسی نتایج تعداد دانه در ارقام تحت شرایط تنش خشکی (شکل ۲) نشان داد واکنش ارقام در شرایط مختلف متفاوت بود. در رقم احسان تعداد دانه در شرایط عدم تنش بیشترین مقدار را داشت و با اعمال تنش روند کاهشی تعداد دانه مشاهده گردید به طوری که اختلاف در تعداد دانه در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود. در رقم کلاته بیشترین تعداد دانه در شرایط تنش ۲- بار مشاهده گردید اما اختلاف آن با تعداد دانه در شرایط عدم تنش معنی‌دار نبود. ولی با افزایش شدت تنش به ۴- بار

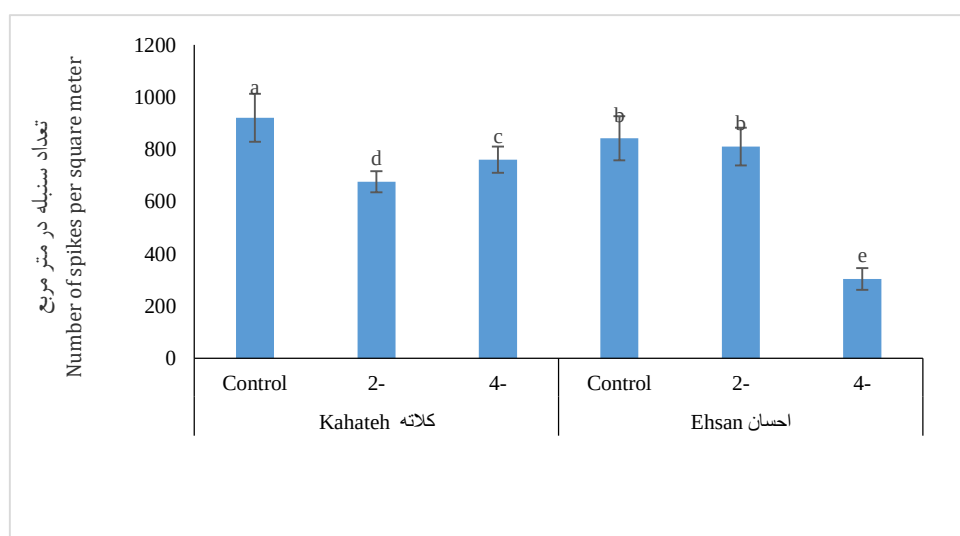


شکل ۲: میزان تغییرات تعداد دانه در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

Fig. 2: The rate of changes in the number of seeds in different cultivars under different humidity conditions

بود. در رقم کلاته تعداد سنبله در مترمربع با افزایش شدت تنش به ۴- بار افزایش یافت به‌طوری‌که مقدار آن از شرایط عدم تنش کمتر و از شرایط تنش ۲- بار بیشتر بود. تنش خشکی موجب کاهش تعداد سنبله در واحد سطح شد به‌طوری‌که کمترین تعداد سنبله در واحد سطح در شرایط تنش خشکی (قطع آب بعد از مرحله گرده‌افشانی) در رقم Zm79/3/Cno*.768/3A80CMH//Charger به‌دست آمد (Namor et al., 2022).

همان‌طورکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود، اثر متقابل تنش در رقم بر روی تعداد سنبله در ارقام، متفاوت بود. در هر دو رقم بیشترین تعداد سنبله در شرایط عدم تنش مشاهده گردید. در شرایط تنش خشکی ۲- بار کاهش تعداد سنبله در مترمربع در رقم کلاته چشمگیر و معنی‌دار بود اما برای رقم احسان این کاهش کم و غیرمعنی‌دار بود. عکس این شرایط در تنش خشکی ۴- بار مشاهده شد و تعداد سنبله در مترمربع در رقم احسان کاهش زیادی یافت اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار

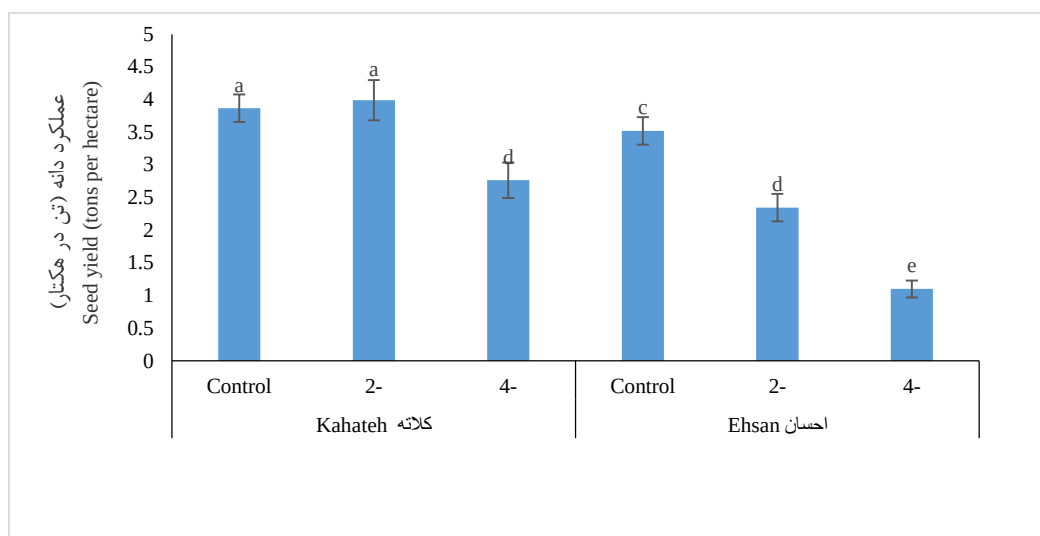


شکل ۳: میزان تغییرات تعداد سنبله در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

Fig. 3: The rate of changes in the number of spikes in different cultivars under different humidity conditions

عملکرد در شرایط تنش ۴- بار مشاهده شد. کاهش عملکرد دانه تحت تنش رطوبتی پس از گرده افشانی در گزارشات متعدد دیگر نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (Saeedi et al., 2018). به گزارش بارناباس و همکاران (2008) کاهش عملکرد در تنش خشکی به علت کاهش محتوای نشاسته است چرا که بیش از ۶۵ درصد دانه غلات از نشاسته تشکیل شده است. تنش خشکی سرعت و میزان رشد فنولوژیکی گندم و در نهایت عملکرد دانه و اجزای آن را تحت تأثیر قرار می دهد (Soleimani, 2016).

نتایج بررسی اثر متقابل تنش در رقم بر روی عملکرد دانه (شکل ۴) نشان داد، رقم کلاته در شرایط تنش ۲- بار بیشترین مقدار عملکرد دانه را داشت ولی اختلاف آن با شرایط عدم تنش معنی دار نشد. با این وجود با افزایش شدت تنش مقدار عملکرد کاهش داشت و اختلاف آن نیز معنی دار بود. در رابطه با رقم احسان نتایج نشان داد که مقدار عملکرد دانه در این رقم در شرایط عدم تنش در بالاترین مقدار خود قرار داشت و با وجود این که مقدار آن از عملکرد رقم کلاته کمتر بود ولی اختلاف آن ها معنی دار نگردید. در رقم احسان با اعمال تنش خشکی مقدار عملکرد کاهش معنی دار داشت و کمترین



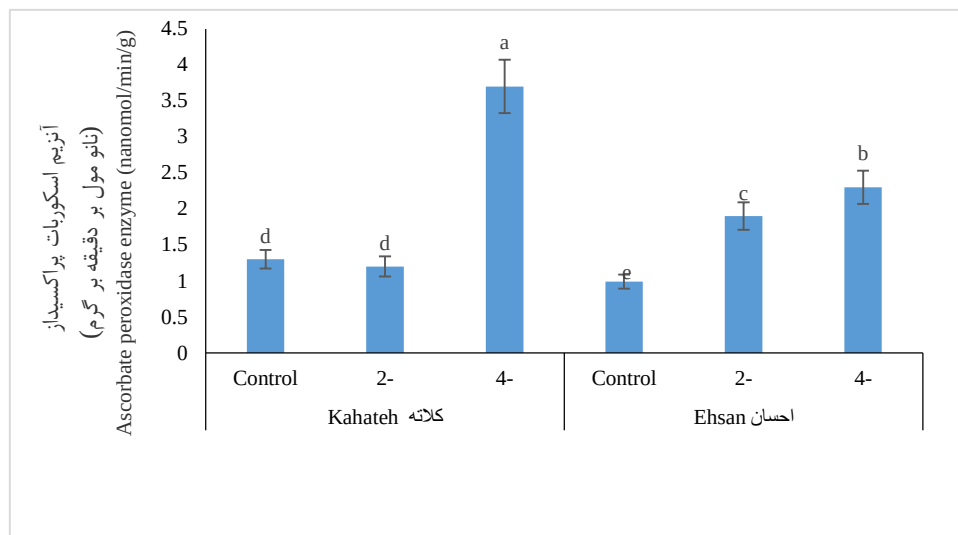
شکل ۴: میزان تغییرات عملکرد دانه در ارقام مختلف تحت شرایط رطوبتی

Fig. 4: Amount of grain yield changes in different cultivars under different humidity conditions

پاک سازی سلول از پراکسید هیدروژن ایفا می کند و می تواند به بهبود مقاومت گیاه در مقابل تنش های اکسیداتیو کمک کند. آنزیم آسکوربات پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را کاهش می دهد و رابطه مثبت بین فعالیت این آنزیم و تحمل گیاه به تنش های اکسیداتیو وجود دارد.

افزایش فعالیت APX تحت شرایط تنش خشکی در گیاهچه های گندم توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Bartoli et al., 1999; Zhang et al., 2004) که این یافته با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در دو رقم گندم مطابقت دارد. افزایش آنزیم های آنتی اکسیدانتی با کاهش صدمه اکسیداتیوی و افزایش تحمل به تنش رابطه مستقیمی دارد (Banu et al., 2010).

بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (شکل ۵) بیانگر فعالیت متفاوت این آنزیم در ارقام مختلف بود. در رقم کلاته مقدار فعالیت این آنزیم در شرایط تنش ۲- بار افزایش نیافت و با شرایط عدم تنش اختلاف معنی دار نداشت، اما با افزایش شدت تنش مقدار فعالیت این آنزیم به صورت چشمگیری افزایش یافت و بالاترین میزان فعالیت را نشان داد. در رقم احسان شرایط به این گونه بود که با اعمال تنش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش معنی داری یافت و بیشترین مقدار این فعالیت در تیمار تنش ۴- بار مشاهده گردید. با این وجود اختلاف معنی داری با میزان فعالیت این آنزیم در شرایط مشابه در رقم کلاته نداشت. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی، به ویژه در زمان های پس از شروع تنش، نقش مهمی در



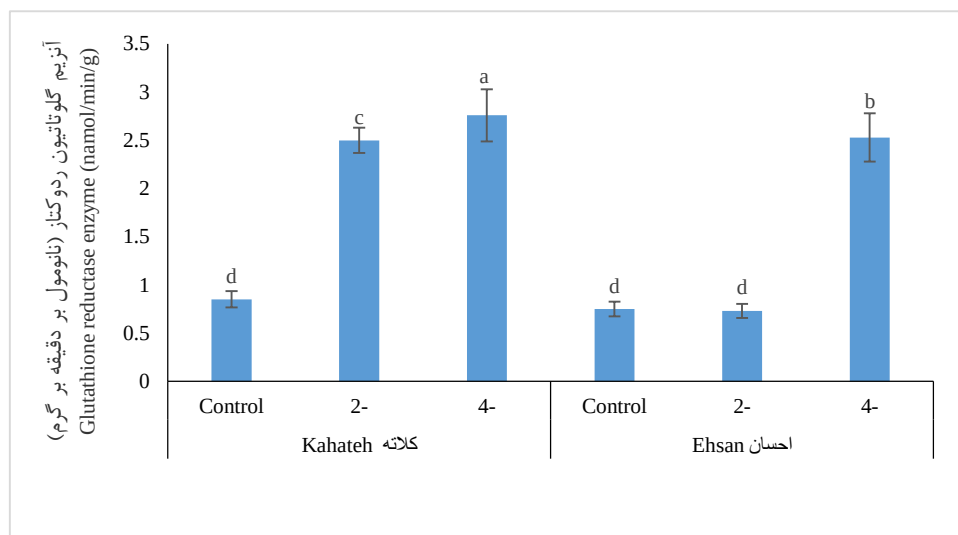
شکل ۵: میزان تغییرات آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

Fig. 5: The amount of ascorbate peroxidase enzyme changes in different cultivars under different humidity conditions

افزایش شدت تنش و در شرایط تنش ۴- بار مقدار فعالیت این آنزیم در هر دو رقم افزایش نشان داد، به طوری که بیشترین افزایش مربوط به رقم کلاته بود ولی اختلاف آن با رقم احسان و مقدار فعالیت آنزیم در همین رقم در تنش ۲- بار معنی دار نگردید. افزایش GR به دلیل احیای مجدد گلوکاتاتیون اکسیدشده بسیار حائز اهمیت است. افزایش فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز در شرایط خشکی باعث افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو می شود (Sairam et al., 2003).

فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز

نتایج ارزیابی اثر متقابل تنش در رقم بر روی میزان فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز (شکل ۶) نشان داد، در هر دو رقم کمترین مقدار فعالیت در شرایط عدم تنش مشاهده گردید و اختلاف معنی داری بین ارقام وجود نداشت. با اعمال تنش و در شرایط تنش ۲- بار، مقدار فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز در رقم احسان افزایش نیافت ولی در رقم کلاته افزایش یافت و اختلاف معنی داری با شرایط عدم تنش داشت. همچنین با



شکل ۶: میزان تغییرات آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

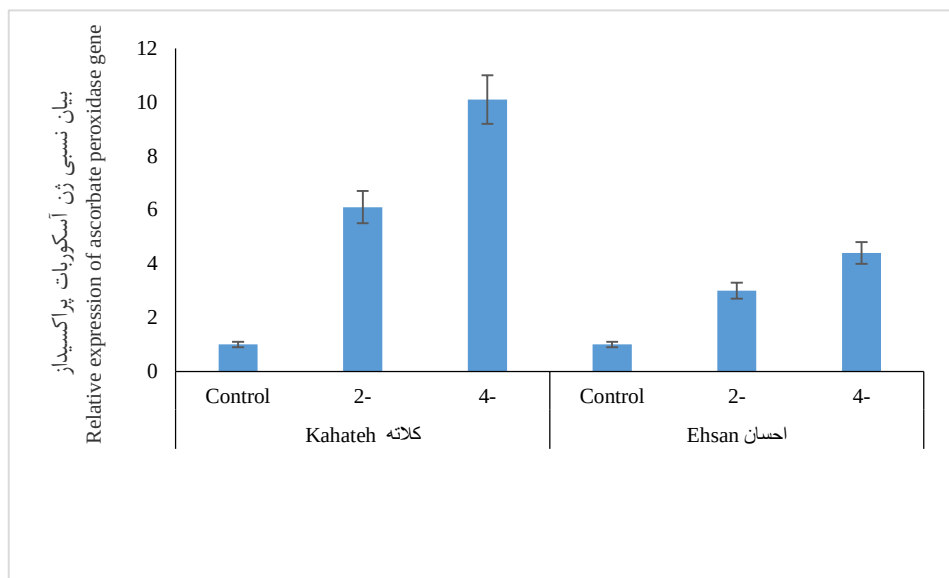
Fig. 6: The amount of glutathione reductase enzyme changes in different cultivars under different humidity conditions

ارقام معنی دار نگردید. افزایش بیان این ژن در شرایط تنش ۲- بار در هر دو رقم چشمگیر نبود و نسبت به شاهد معنی دار نشد. ژن آسکوربات پراکسیداز کدکننده آنزیم آسکوربیک پراکسیداز می باشد. این آنزیم نقش کلیدی در تبدیل یون های هیدروژن

نتایج ارزیابی بیان ژن آسکوربات پراکسیداز در ارقام مختلف تحت تنش خشکی (شکل ۷) نشان داد، با افزایش شدت تنش میزان بیان این ژن در هر دو رقم در شرایط تیمار ۴- بار، افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد ولی اختلاف بین

شناخته شده است. آسکوربیک پراکسیداز یک آنزیم آنتی اکسیدان است که در ایجاد تعادل ردوکس تحت شرایط تنش خشکی نقش مهمی ایفا می کند.

پراکسید که یکی از رادیکال های تولید شده تحت تنش خشکی می باشد، به آب دارد و بیشترین فعالیت آن در کلروپلاست گزارش شده است (Sofa et al., 2015). لذا ژن کدکننده آن به عنوان یک ژن مهم در مکانیسم پاسخ به تنش خشکی



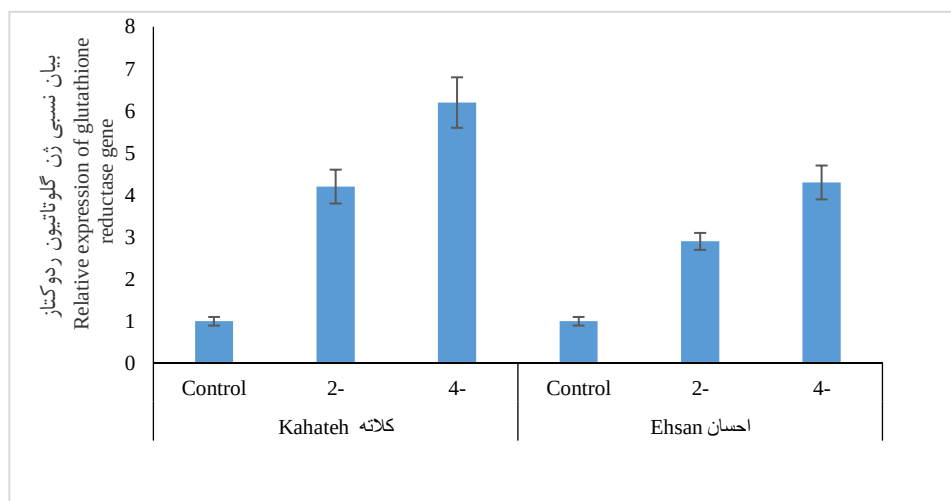
شکل ۷: بیان نسبی ژن APX در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

Fig. 7: Relative expression of APX gene in different cultivars under different humidity conditions

گلوکاتایون کاهش یافته به گلوکاتایون اکسید شده در داخل سلول ها اندازه گیری می شود بدین ترتیب که افزایش نسبت GSSG به GSH نشان دهنده استرس اکسیداتیو بیشتر است (Lu, 2013) گلوکاتایون ردوکتاز نسبت GSSG/GSH را تنظیم و GSH را برای GPX و DHAR فراهم می نماید که به ترتیب H_2O_2 را به H و O_2 تبدیل می کند و آسکوربات اکسید شده را کاهش می دهد (Rahantaniaina et al., 2017). افزایش بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز تحت تنش خشکی در نتایج ماکارن (2022) نیز گزارش شده است. همچنین این نتایج همسو با نتایج افزایش آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز تحت تنش خشکی بود. محققان نقش این آنزیم را به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدان تحت تنش خشکی گزارش نموده اند (Sairam et al., 2003; Madhu et al., 2022).

بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز

همان طور که در شکل (۸) مشاهده می شود، نتایج ارزیابی بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز تحت تنش خشکی روند افزایشی را با اعمال تنش خشکی نشان می دهد. در هر دو رقم بیان این ژن در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی دار داشت. در رقم کلاته بیشترین بیان این ژن در شرایط تنش ۴- بار مشاهده شد ولی اختلاف آن با میزان بیان این ژن در شرایط ۲- بار معنی دار نگردید. در رقم احسان نیز بیشترین مقدار بیان این ژن در شرایط تنش ۴- بار مشاهده شد اما اختلاف آن با تیمار ۲- بار معنی دار بود. گلوکاتایون ردوکتاز نقش مهمی در جمع آوری پراکسید هیدروژن و حفظ گلوکاتایون احیا بازی می کند گلوکاتایون در حالت های کاهش یافته (GSH) و اکسید شده (GSSG) وجود دارد. استرس اکسیداتیو سلولی با نسبت



شکل ۸: بیان نسبی ژن GR در ارقام مختلف تحت شرایط مختلف رطوبتی

Fig. 8: Relative gene expression in different cultivars under different humidity conditions

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که اعمال تنش رطوبتی، تمامی صفات را تحت تأثیر قرار داد. برای صفات بیوشیمیایی به این نتیجه دست یافتیم که با وقوع تنش، تغییرات زیادی در هر دو رقم مشاهده شد. تغییرات وزن و تعداد دانه و همچنین تعداد سنبله کاهش یافته و این کاهش در رقم احسان نسبت به کلاته بیشتر مشهود بود. علاوه بر آن عملکرد دانه نیز تحت تأثیر تنش قرار گرفت و کاهش یافت.

نتایج بررسی آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گلوپروتئین ردوکتاز نشان داد که تنش خشکی فعالیت این آنزیم‌ها افزایشی بود و در رقم کلاته که متحمل به خشکی معرفی شده این افزایش بیشتر بود. بیان ژن‌ها تا حدود زیادی همسو با نتایج فعالیت آنزیم‌ها بود و تحت تنش خشکی به‌ویژه در تنش شدید، افزایش بیشتری یافت. در نهایت با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان داشت رقم کلاته شرایط بهینه‌تری برای استفاده در مناطق، با بروز تنش خشکی را دارد.

References

- Ahmadi, A. J., Jodi, M., Tawakli, A. and Ranjbar, M. 2018. Investing yield and response of morphological traits related to it in wheat genotypes under drought and irrigation stress conditions in nature's agricultural technology. Resource, 46(1): 155-166. (In Persian).
- Bahamin, S., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M. and Behashti, S. 2019. Effect of biological and chemical fertilizers of nitrogen and phosphorus on quantitative and qualitative productivity of maize under drought stress conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences, 12(1): 123-139. (In Persian).
- Bahamin, S., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M. and Behashti, S. 2021. Effect of nitrogen and phosphorus fertilizers on yield and nutrient efficiency indices in maize under drought stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 14(3): 675-690. (In Persian).
- Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Islam, M. M., Uraji, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y. and Murata, Y. 2010. Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, pp.1010012170-1010012170.
- Barnabás, B., Jäger, K. and Fehér, A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. Plant. Cell and Environment, 31(1): 11-38.
- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Tamambussi, E. and Beltrano, J. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: Effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. Journal of Experimental Botany, 50: 375-383.
- Damavandi, S., Navabpour, S., Mazandarani, A. and Molaei, S. M. 2025. Investigation of the differential response of some genes under the influence of oxidative stress in three bread wheat cultivars. Plant Production and Genetics, 6(1): 161-174.
- Fathi, A. and Bahamin, S. 2018. The effect of irrigation levels and foliar application (zinc, humic acid and salicylic acid) on growth characteristics, yield and yield components of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Environmental Stresses in Crop Sciences, 11(3): 661-674. (In Persian).
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48(12): 909-930.
- Homaei, M. 2012. The reaction of plants to salinity. National Irrigation and Drainage Committee of Iran, publication number: 58. (In Persian).

- Hosseini, M., Saidi, A. and Maali-Amiri, R. 2021. Developmental regulation and metabolic changes of RILs of crosses between spring and winter wheat during low temperature acclimation. *Environmental and Experimental Botany* 182: 104-299.
- Imam, Y. 2011. Grain production. Shiraz University Press, Iran. 190. (In Persian).
- Ji, H., Xiao, L. and Xia, Y. 2017. Effects of jointing and booting low temperature stresses on grain yield and yield components in wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 243: 33-42.
- Kazemi, G., Navabpour, S. and Ramezanpour, S. S. 2010. Evaluation of catalase gene expression and morphological traits in two wheat cultivar under salt stress. *Modern Genetic Journal*, 1: 79-87. [In Persian with English summary].
- Khezrie-afravi, M., Hoseinzadeh, A., Mohamadi, V. and Ahmadi, A. 2010. Assessment of drought resistance in Iran durum wheat landraces under water stress conditions and natural irrigation. *Journal of Crop Science*, 41(4): 741-753.
- Liu, H., Sultan, M. A., Liu, X. L., Zhang, J., Yu, F. and Zhao, H. X. 2015. Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PLoS One*, 10: e0121852.
- Lu, S. C. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(5): 3143-3153.
- Luo, R., Wei, H., Ye, L., Wang, K., Chen, F., Luo, L., Liu, L., Li, Y., Crabbe, M. J. C., Jin, L., Li, Y. and Zhong, Y. 2009. Photosynthetic metabolism of C₃ plants shows highly cooperative regulation under changing environments: A systems biological analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3): 847-852.
- Madhu Kaur, A., Tyagi, S., Shumayla Singh, K. and Upadhyay, S.K. 2022. Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Report*, 41(3): 639-654.
- Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S. and Sadeghipour, H. 2013. Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(2): 58-64.
- Najafi, N., Ahmadinezhad, R., Aliasgharzad, N. and Oustan, S. H. 2019. Effects of urea integration with manure and two types of compost (municipal waste and sewage sludge) on concentrations of micronutrients and sodium in wheat leaf, stem and seed. *Journal of Water and Soil Conservation*, 26(3): 63-81. (In Persian with English summary).
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- Namour, F., Salim, F. and Ghasemi, M. 2022. Investigation of yield and biological yield and number of spikes per unit area of advanced wheat cultivars and genotypes under drought stress conditions after pollination, The Second National Conference on Green Waste Management. (In Persian).
- Nezhadahmadi, A., Hossain-Prodhan, Z. and Faruq, G. 2013. Drought Tolerance in Wheat. *The Scientific World Journal*, 2013(1): 610-721.
- Rahantaniaina, M. S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Mhamdi, A., Vanacker, H. and Noctor, G. 2017. Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signaling & Behavior*, 12(8): e1356531.
- Saeedi, M., Moradi, F., Ahmadi, A., Sepehari, R., Najafian, G. and Shabani, A. 2018. Effects of final water stress on physiological characteristics and sink-source relationships in bread wheat of two cultivars. (*Triticum aestivum* L.) *Iranian Crop*, J392-408, (4)12. (In Persian).
- Sairam, R. K., Rao, K.V. and Srivastava, G. C. 2003. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163: 1037-1046.
- Salehi, M., Kalate Arabi, M. and Mosavat, S. A. 2014. Evaluation of Genetic Variation in Spring Bread Wheat Genotypes to Salinity in the North of Golestan Province. *Seed and Plant Improvement Journal*, 30: 305-325. (In Persian with English summary).
- Sánchez-Rodríguez, C., Sancho, Á. Y., Quintana, M. S. Rivilla-García, J. 2012. El efecto relativo dela edad enel balonmano de élite masculino en España. *E-balonmano. com: Revista de Ciencias del Deporte*, 8(3): 181-190.
- Shewry, P. R. and Hey, S. J. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3): 178-202.
- Shou, Y. C. 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3): 695-707.
- Školníková, M., Škarpa, P., Ryant, P., Kozáková, Z., and Antošovský, J. 2022. Response of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) to fertilizers with nitrogen-transformation inhibitors and timing of their application under field conditions. *Agronomy*, 12(1): 223.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. A. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175: 408-413.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 13561-13578.
- Soleimani, A. 2016. Investigating the effect of drought stress on wheat yield and yield components using the ET-HS model. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences*, 9(3): 205-215.
- Wei, W., Li, Q. T., Chu, Y. N., Reiter, R. J., Yu, X. M., Zhu, D. H. and Chen, S. Y. 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3): 695-707.
- Zhang, F., Guo, J. K., Yang, Y. I., He, W. I. and Zhang, L. X. 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26: 345-352.