دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پنج ژنوتیپ گندم دوروم (*Triticum turgidum* L.) تحت تنش خشکی

طاهره نعیمی[۱]، لیلا فهمیده[۲] و براتعلی فاخری[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
۳- استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۲۲
صفحه: ۲۰ تا ۲۸

چکیده

در راستای مواجه با تنش‌ها به‌ویژه تنش خشکی، شناخت ژن‌های مقاومت در گیاهان و ساز و کار عمل این ژن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه، اثر سطوح تنش خشکی بر سطح بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برخی ژنوتیپ‌های گندم دوروم بررسی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل پنج سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و پنج ژنوتیپ گندم دوروم (شبرنگ، بهرنگ، کرخه، آریا و دنا) با سه تکرار انجام شد. ژنوتیپ‌ها به‌صورت گلدانی کشت شدند و تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای (چهار برگی) اعمال شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و اثرات متقابل تنش خشکی × ژنوتیپ برای سطوح تنش (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی) نسبت به سطح کنترل (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که سطوح تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح کنترل بیشترین اثر را بر میزان بیان ژن *NAC* و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز داشت. ژنوتیپ شبرنگ بیشترین میانگین نسبی بیان ژن *NAC* و میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را نشان داد. با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، با افزایش سطوح تنش خشکی میزان بیان ژن *NAC* و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، پنج ژنوتیپ گندم دوروم افزایش یافت و ژنوتیپ شبرنگ بیشترین بیان ژن *TaNAC2A* را در هنگام تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به نمونه کنترل داشت.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، روش Real Time PCR، ژنوتیپ شبرنگ، مرحله گیاهچه‌ای

مقدمه

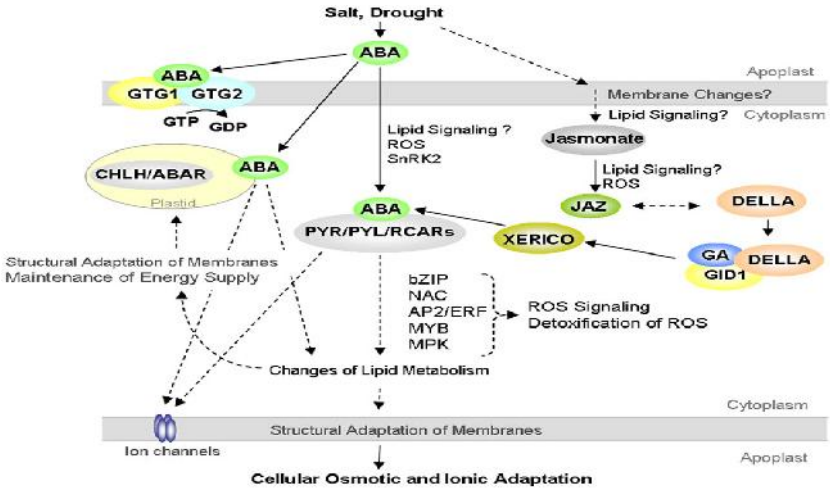
خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی در سراسر جهان است (۳). یکی از معیارهای بررسی توانایی تحمل گیاهان به تنش خشکی، بررسی عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش خشکی با عملکرد آن‌ها در شرایط رطوبتی مطلوب است (۸). تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS[۱]) می‌شود. در پاسخ به افزایش تولید ROS، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد (۱۱). تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۱۴). گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (۱). هر اقدامی برای اصلاح ژنتیکی مقاومت به خشکی با استفاده از تنوع ژنتیکی نیاز به یک روش ارزیابی یا غربال‌گری کارآمد دارد که باید سریع بوده و قادر به ارزیابی عملکرد گیاه در مراحل حساس رشدی و غربال‌کردن یک جمعیت بزرگ فقط با استفاده از تعداد محدودی مواد گیاهی باشد. مقاومت به خشکی نتیجه برهم‌کنش صفات مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است و بنابراین می‌توان از این اجزای مختلف به‌عنوان شاخص‌های گزینش برای غربال کردن تیپ ایده‌ال (ایدئوتیپ) گیاهی استفاده کرد. بجای یک صفت ساده باید ترکیبی از صفات مختلف که رابطه مستقیم با مقاومت به خشکی دارند به‌عنوان معیارهای گزینش مورد استفاده قرار گیرد (۱۷).

مطالعات اخیر در مورد گیاهان تراریخت نشان داده است که ژن‌های خانواده‌های مختلف از عوامل رونویسی (TFs) مانند: WRKY-MYB-NAC-bZIP-AP2/ERF هنگام ایجاد تنش‌های غیرزنده سبب ایجاد مکانیسم تحمل در گیاهان تراریخت می‌شوند (۲۸،۱۷). پروتئین‌های *TaNAC2A* از عوامل رونویسی در گیاهان خاص می‌باشند که عملکردشان در رابطه با نمو گیاه و همچنین در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده است (شکل ۱).

1- Reactive oxygen species

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]



شکل ۱- ارتباط بین مسیرهای مختلف انتقال سیگنال گیاهان در پاسخ به تنش خشکی و شوری
Figure 1. Signal network of drought tolerance and salinity in plants

اساس نامگذاری *TaNAC2A* با توجه به توالی مشخص شده‌ی NAM در گل اطلسی و ATAF1/2 در آرابیدوپسیس و پروتئین CUC2 می‌باشد. برای اولین بار cDNA کدکننده‌ی پروتئین *TaNAC2A* به عنوان یک ژن پاسخ‌گو به تنش کم‌آبی در آرابیدوپسیس گزارش شد (۳۰). با استفاده از یک روش غربالگری ترکیبی در مخمر، سه گروه همولوگ *SNAC* (*RD26.ANAC072- ANAC055- ANAC019*) مشخص شد که به توالی پروموتور ژن *ERD1* در ناحیه‌ی MYC ژن متصل است. این ژن‌ها توسط تنش‌های خشکی و شوری بیان می‌شوند، تجزیه و تحلیل ریزآرایه‌ی گیاهان تراریخت نشان داد که ژن‌های *SNAC* در هنگام تنش مانند ژن گلیکولاز در تنظیم ژن‌های بالای دست گیاهان تراریخت نقش دارند (۲۶). پایانه‌ی-N (N-terminal) پروتئین‌های *TaNAC2A*، یک ناحیه بزرگ همولوگ، که حاوی ناحیه (Domain) متصل به DNA به طول حدود ۱۵۰ اسید آمینه که در بردارنده ۵ منطقه‌ی حفاظت‌شده (A-E) می‌باشد. دمین اتصال به DNA (*NAC 019*) در آرابیدوپسیس توسط کریستالوگرافی اشعه‌ی X مشخص شده است (۶). در پژوهشی برای بررسی مکانیسم‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی و شوری ژن *TaNAC29* با استفاده از روش انتقال ژن از گندم نان به آرابیدوپسیس منتقل و نتایج Real Time PCR نشان داد که ژن *Ta NAC 29* نقش مهمی در فرآیند پیری گیاه به هنگام ایجاد تنش خشکی و شوری دارد (۱۴). در رونوشتی از ژن‌های تراریخت آرابیدپسیس از گیاه برنج و همچنین از گیاه گندم مشخص شد در گیاه برنج گروه ارتولوگ *OsNAP* از خانواده عوامل رونویسی *NAC* سبب تخریب کلروفیل می‌شود. ژن *NAC* می‌تواند برای بدست آوردن تغییرات خاص در کنترل و انتقال مجدد مواد مغذی طول عمر گیاه را بالا ببرد (۲۲).

هدف از این مطالعه بررسی اثر پنج سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بر میزان بیان ژن *TaNAC2A* در ژنوتیپ‌های گندم دوروم (شبرنگ، بهرنگ، کرخه، آریا و دنا) و بررسی میزان تغییرات آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز طی اعمال تنش خشکی بر ژنوتیپ‌های مذکور است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای تنش

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل پنج ژنوتیپ گندم دوروم (کرخه، آریا، دنا، شبرنگ و بهرنگ) و فاکتور دوم شامل سطح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بودند که سطح ۲۵ درصد به‌عنوان سطح شاهد در نظر گرفته شد.

بذور پنج ژنوتیپ گندم دوروم (کرخه، آریا و دنا) تهیه‌شده از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ژنوتیپ (شبرنگ و بهرنگ) تهیه‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل با هیپوکلریت سدیم ۲٪ ضدعفونی و به‌مدت پنج دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. ژنوتیپ‌ها در مدت ۷۲ ساعت و دمای ۲۵°C و تاریکی جوانه زدند. بعد از مشاهده ریشه‌چه بذور ریشه دار شده به گلدان‌هایی که به پنج قسمت مساوی تقسیم شده بود انتقال و سه بذر ریشه‌دارشده از هر ژنوتیپ در هر گلدان در عمق ۳ سانتی‌متری خاک کشت شدند (۲۵). گلدان‌هایی به گنجایش ۳۰۰۰ گرم خاک معمولی مزرعه که حاوی خاک، ماسه، و کود دامی با نسبت ۲:۱:۱ بودند برای این کار استفاده شدند (۱۶).

برای هر سطح تنش خشکی سه گلدان (تکرار) در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان‌ها یک روز در میان با آب معمولی انجام شد و به‌منظور جلوگیری از خروج آب زهکش، از گلدان بدون روزنه استفاده شد (۹). نگهداری گلدان ها در دمای ۲۵±۲ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]
[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

تاریکی انجام شد (۷). در مرحله چهار برگی عملیات تنک انجام شد و در پایان از هر ژنوتیپ یک گیاه در هر گلدان باقی ماند (۲۰، ۲۵).

مقدار آب در خاک خشک، با استفاده از محاسبات، نسبت به ظرفیت خاک مزرعه مشخص شد و برای تعیین مقادیر آب در هر گلدان از تیمارها، ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم خاک در داخل آون در درجه حرارت ۱۰۳°C قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت، توزین و وزن خاک خشک تعیین شد. سپس خاک خشک‌شده در گلدانی ریخته و به آرامی و تا حد اشباع، آب به آن اضافه شد و پس از خارج‌شدن کامل آب ثقلی گلدان توزین شد و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری شده در ظرفیت زراعی ۲۵ درصد تعیین شد و تیمارهای مختلف محاسبه شدند. اعمال تنش خشکی روی گیاهان ۴۵ روز پس از کشت صورت گرفت و ۲۰ روز پس از اعمال تنش نمونه‌برداری برگ و اندازه‌گیری صفات انجام شد (۲۰). نمونه برگی ژنوتیپ مورد بررسی تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شد (۲).

جداسازی RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA کل گیاه گندم دوروم با استفاده از کیت Total RNA isolation شرکت دنا زیست آسیا، مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28srRNA و 18srRNA روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. جهت از بین‌بردن DNA ژنومی از DNase شرکت پیشگام استفاده شد.

طراحی آغازگرها

از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه *TaNAC2A* به همراه ژن 18srRNA بود. طراحی این آغازگرها به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم‌افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

Table 1. The sequence of primers used in the Real-Time PCR reaction

Gene	Forward primer	Reverse primer
TaNAC2A	5'-ATCGGCAGCGGAGCGATT-3'	5'-AGGGGTCGAAGCGGTAGAGG-3'
18srRNA	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'	5'-AGGGGTCGAAGCGGTAGAGG-3'

پس از استخراج RNA، ساخت cDNA با استفاده از کیت Geneall، شرکت پیشگام انجام گرفت. بیان ژن‌ها با روش Real Time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real Time PCR set Corbett (3000) بررسی شد. بررسی کمی بیان نسبی ژن از طریق دستگاه Real TimePCR set Corbett (3000) انجام شد. تمام cDNAهای ساخته‌شده از طریق دستگاه Real Time PCR مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

در این آزمایش از Hot taq Evagreen mix (no Rox) (شرکت دنا زیست آسیا) استفاده شد. شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۱۵دقیقه، سپس ۴۰ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و طویل سازی۲۰ ثانیه در دمای۶۰-۶۵ درجه و در نهایت طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد (۲) میزان و مواد لازم جهت انجام Real Time PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید. جهت تجزیه و تحلیل نسبت بیان ژن هدف (ژن *TaNAC2A*) در مقایسه با ژن کنترل 18 srRNA برای تمام تیمارها از روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. بیان نسبی PCR برای هر ژن ازفرمول $Ratio=۲^{-\Delta\Delta CT}$ بدست آمد. همچنین جهت بررسی و تأیید عدم وجود آلودگی ژنومی از نمونه کنترل منفی (No RT Control) نیز استفاده شد. پس از بررسی میزان تکثیر از طریق Real Time PCR، تجزیه توسط نرم‌افزار دستگاه (Corbettresearch – RG3000) محاسبه شد و پس از به‌دست‌آوردن چرخه آستانه و میزان دقیق غلظت، تجزیه داده‌ها از طریق فرمول $Ratio=۲^{-\Delta\Delta CT}$ و با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد محاسبه قرار گرفت.

استخراج عصاره آنزیمی

جهت استخراج عصاره آنزیمی، از بافر فسفات پتاسیمی ۱۰۰ میلی‌مولار با pH= ۷ استفاده شد. ۲۰۰ میلی‌گرم بافت سبز برگی با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج عصاره آنزیمی در هاون چینی کاملاً ساییده شد و پس از عبوردادن از کاغذ صافی، به‌مدت ۱۵ دقیقه با دمای چهار درجه سانتیگراد با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از فاز رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیمی استفاده شد. روش سنجش میزان فعالیت آنزیمی آنزیم کاتالاز با روش بییر و سایزر (۴) اندازه‌گیری و میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز به‌روش یوشی‌مورا و همکاران (۳۱) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به PCR شیب دمایی

جهت تعیین دمای بهینه برای اتصال آغازگرهای ژن *TaNAC2A* و ژن مرجع 18 srRNA، گرادیان دمایی به طور جداگانه برای ژن اصلی و ژن مرجع در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج، دمای مناسب اتصال پرایمرها برای ژن *TaNAC2A* و همچنین ژن 18srRNA، ۵۹/۵ درجه سانتی‌گراد، انتخاب شد. وجود باند اختصاصی بر روی ژل پس

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

از انجام روش PCR با اندازه مورد نظر تاییدکننده درستی ساخت cDNA است.

نتایج تجزیه واریانس بررسی بیان ژن *TaNAC2A* و آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس اثرات ژنوتیپ، سطوح خشکی و اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ مورد بررسی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی بدون تنش خشکی و ۲۰ درصد، ۱۵ درصد، ۱۰ درصد، پنج درصد ظرفیت زراعی تنش خشکی) در بیان ژن اصلی (*TaNAC2A*) و میزان آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر بیان ژن *TaNAC2A* و میزان آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در پنج ژنوتیپ گندم دوروم

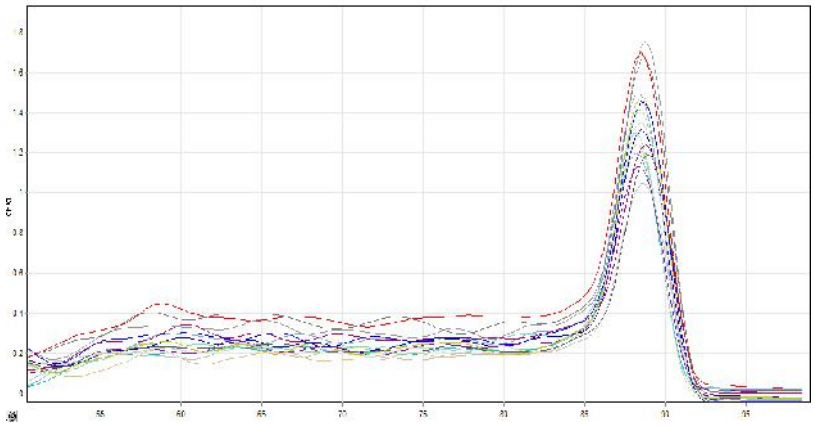
Table 2. Results of analysis of variance effect of genotype and drought stress on *TaNAC2A* gene expression and catalase and ascorbate peroxidase enzymes in five durum wheat genotypes

منابع تغییرات	درجه آزادی	بیان ژن *TaNAC2A*	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
بلوک	۲	۰/۰۰۹۴۱^{ns}	۰/۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۴۰^{ns}
تنش	۴	۴/۳۳۶۲**	۰/۱۸**	۰/۰۷۹۶**
ژنوتیپ	۴	۰/۱۶۰۴**	۰/۰۷۸**	۰/۰۰۶۱^{ns}
اثر متقابل تنش و ژنوتیپ	۱۶	۰/۱۰۰۵**	۰/۰۸۸**	۰/۰۱۸۸**
خطا	۴۴	۰/۰۱۴۰	۰/۰۰۰۰۱۴	۰/۰۰۱۳
ضریب تغییرات	–	۱۱/۵۷۱	۵/۵۸	۲۳/۶۱۷

ns، * و **: به ترتیب عدم‌معنی‌داری و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد

بیان نسبی ژن *TaNAC2A*

پس از اتمام فرآیند Real Time PCR با توجه به مشاهده منحنی‌های ذوب (شکل ۲ و ۳)، آغازگرها به‌صورت اختصاصی عمل کرده‌اند و یک نمونه منفرد از cDNA را تکثیر نموده‌اند، عدم وجود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر عدم وجود پرایمر دایمر می‌باشد و آغازگرها تقابلی باهم ندارند و واکنش دارای بازدهی مناسبی برای تعیین بیان نسبی ژن می‌باشد. شدت دمای ذوب (Tm) برای ژن *TaNAC2A* و ژن 18 srRNA به‌ترتیب ۸۸/۵ (شکل ۲) و ۸۴ درجه سانتی‌گراد (شکل ۳) دیده می‌شود. همچنین وجود پیک در یک دما برای تمامی تیمارها نشان از اختصاصی‌بودن محصول واکنش است.

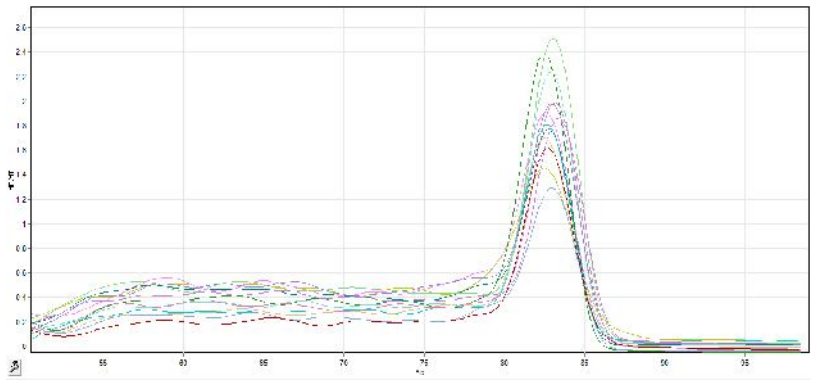


شکل ۲- منحنی ذوب ژن *TaNAC2A*. موقعیت پیک موجود نشان‌دهنده دمای ۸۸/۵ درجه سانتی‌گراد (Tmمحصول ژن *TaNAC2A*)

Figure 2. TaNAC2A Melting Curve. Available courier position indicating a temperature of 5/88 ° C (Tm of the NAC gene

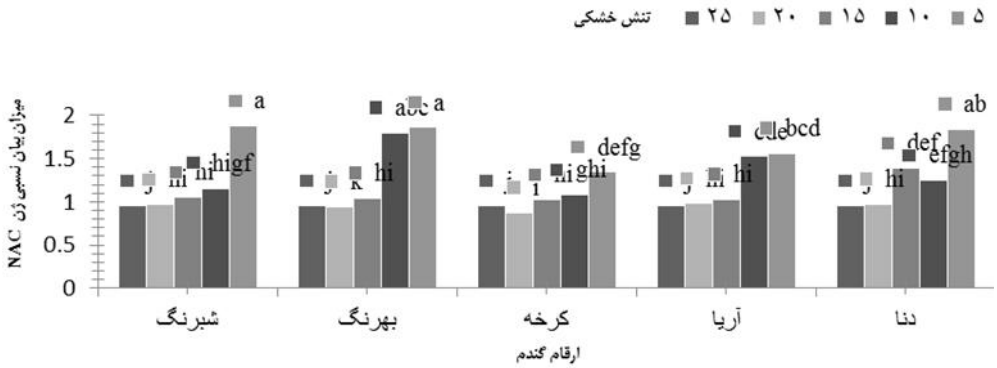
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

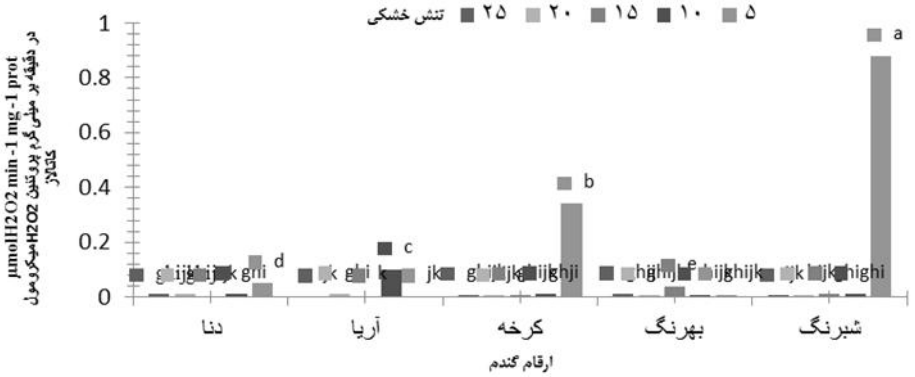


شکل ۳- منحنی ذوب ژن 18srRNA. موقعیت پیک موجود نشان‌دهنده دمای ۸۴ درجه سانتی‌گراد (Tm محصول ژن 18srRNA)
Figure 3. Melting curve of 18srRNA gene. Present peak location indicating temperature of 84 ° C (Tm product of 18srRNA gene 18)

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، با توجه به مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد بررسی بر بیان ژن *TaNAC2A*، بیشترین میزان بیان ژن *TaNAC2A* با میانگین ۱/۸۷۷ در ژنوتیپ شبرنگ و بهرنگ تحت تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (نمونه کنترل) و همچنین کمترین میزان بیان ژن *TaNAC2A* با میانگین ۰/۸۷۷ در ژنوتیپ کرخه و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (نمونه کنترل) مشاهده شد (شکل ۴). با مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ‌های گندم دوروم، ژنوتیپ شبرنگ بیشترین میزان آنزیم کاتالاز را با مقدار ۰/۸۸ و ژنوتیپ کرخه کمترین میزان از این آنزیم را با مقدار ۰/۰۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در سطح ۲۰ درصد ظرفیت زراعی به‌خود اختصاص داده است (شکل ۵).



شکل ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر تنش بر میزان بیان ژن *TaNAC2A*
Figure 4. Comparison of the average effect of stress on *TaNAC2A* gene expression

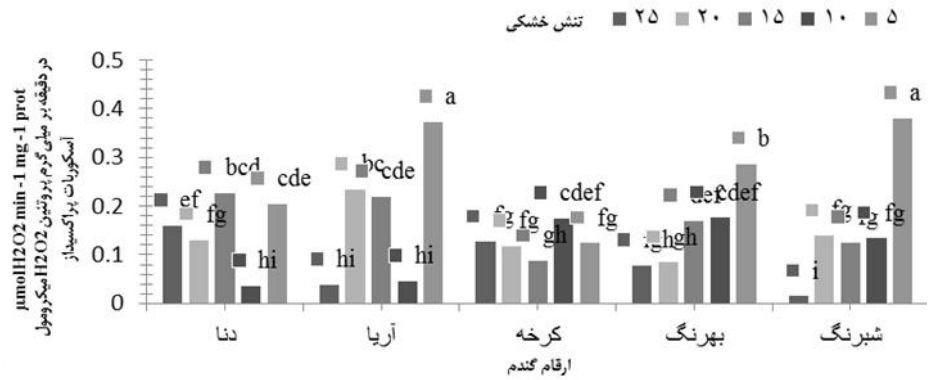


شکل ۵- اثر متقابل پنج سطح تنش خشکی بر میزان آنزیم کاتالاز در پنج ژنوتیپ گندم دوروم
Figure 5. Effect of five levels of drought stress on catalase enzyme in five durum wheat genotypes

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ در آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد ژنوتیپ شبرنگ و آریا در سطح پنج درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز به ترتیب ۰/۹۷۹، ۰/۹۷۸ و ژنوتیپ شبرنگ کمترین میزان ۰/۰۱۶ میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین را در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی داشت (شکل ۶).



شکل ۶- اثر متقابل پنج سطح تنش خشکی بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۵ ژنوتیپ گندم دوروم

Figure 6. Interaction of five levels of drought stress on the amount of ascorbate peroxidase enzyme in 5 durum wheat

طی بررسی‌های صورت‌گرفته در محیط‌های کم‌آب و با آب کافی میزان حساسیت ژنوتیپ گندم به خشکی متفاوت بوده و این حساسیت به‌شدت تنش بستگی دارد (۲۴). با توجه به مشاهدات Ribaut و همکاران (۲۳) این واکنش‌ها و سایر سازوکارها، گیاهان را در تحمل و سازگاری به تغییرات دما، رطوبت و ترکیب‌های محیط کشت مقاوم می‌سازد. همچنین در بعضی گیاهان صفات ثانویه مؤثر در واکنش گیاه در شرایط کم‌آبی تشخیص داده شده است (۲۳). از آنجا که عملکرد صفات کمی با وراثت‌پذیری پایین می‌باشد، انتخاب بر اساس آن به‌تنهایی نمی‌تواند قابل‌اطمینان باشد همچنین انتخاب بر اساس صفات فیزیولوژیک آسان و دقیق بوده و توارث‌پذیری این صفات نسبتا بالا است. بنابراین بازده ژنتیکی این صفات مطلوب بوده و انتخاب بر مبنای این صفات راه مطمئن و سریعی برای غربال جوامع گیاهی و بهبود عملکرد می‌باشد (۱۰) همچنین شاخص‌های فیزیولوژیک دارای اهمیت حیاتی در بقاء و سازگاری گیاه به تنش‌های محیطی هستند (۱۹). اطلاعات حاصل از بررسی بیان ژن *NAC* نشان داد که تیمار پنج درصد تنش خشکی بیشترین تأثیر را بر بیان ژن *NAC* داشته است. پیشرفت‌های تکنولوژیکی از قبیل توسعه سیستم حساس Real Time PCR، اندازه‌گیری کمی سریع و دقیق مقدارهای اندکی از mRNA را فراهم می‌کند (۱۵). Mittal و همکاران (۱۸) در آزمایشی توانایی دو ژنوتیپ حساس و متحمل گیاه کلزا (*Brassica. juncea* L) را در انطباق با محیط‌های نمکی در مزرعه مورد آزمایش قرار دادند. بر اساس این آزمایش مشخص شد که بهبود عملکرد فعالیت ژنوتیپ مقاوم تحت تنش، مربوط به افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و آسکوربیت پراکسیداز (APX) بوده است (۱۸). طبق نتایج پژوهش حسن‌پور لسکوکلایه و همکاران (۱۲)، تنش خشکی در ارقام گندم دوروم سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و کاهش آسکوربیت پراکسیداز (APX) شده است (۱۲).

در یک پژوهش بازسازی شبکه ژنی درگیر و تصویر روشن‌تری از نحوه پاسخ‌دهی گیاه جو به تنش خشکی و شناسایی ژن‌های کلیدی مربوطه انجام شد. بدین‌منظور ژن‌های کلیدی در بافت برگ از مقالات علمی گردآوری شد. در مجموع عوامل رونویسی بیشترین تعداد را بین ژن‌های موثر دارا بودند که نشان‌دهنده اهمیت‌شان در مکانیسم تحمل به خشکی می‌باشد (۱۷). فاکتورهای رونویسی باعث پیچیدگی تنظیم رونویسی می‌گردند (۲۷). تقریبا ۷٪ ژنوم گیاهان به مناطق کدکننده فاکتورهای رونویسی با مناطق سیس–المنت در نواحی پروموتری ژن‌های مرتبط به تنش‌های محیطی برهم‌کنش دارند و با افزایش بیان این ژن‌ها موجب تحمل به تنش می‌گردند (۱). نتایج سایر مطالعات نشان دادند که *TaNAC29* واقع در کروموزوم *2BS* نقش مهمی در فرآیند پیری و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی و شوری، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش آبسیزیک اسید در گیاهانی مانند گندم و برنج دارد (۲۹). همچنین افت فعالیت‌های مورفولوژیکی و القای پیری در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس نیز گزارش شده و افزایش بیان ژن *TaNAC29* در پروتوپلاست هسته گندم فعالیت رونویسی آن را در مخمر ثابت می‌کند. از سویی H_2O_2 واسط عوامل رونویسی متعددی می‌باشد که برنامه‌ریزی مجدد ترانسکریپتوم را القا کرده و سبب ایجاد موج ثانویه‌ای از واکنش‌ها می‌شود که در پاسخ‌های بسیاری از جمله مکانسیم‌های دفاعی دخیل هستند. عوامل رونویسی مرتبط با سیگنال‌دهی H_2O_2 از چندین خانواده مختلف هستند که شامل *NAC* ,*ZAT*, *WRKY*, *bZIP*, *DREB* و*MYB* می‌باشند (۱۳). در آرابیدوپسیس بسیاری از عوامل رونویسی خانواده *NAC* پیری برگ را کنترل می‌کنند. ۱۵ مورد از این عوامل مرتبط با پیری به‌وسیله H_2O_2 بیش‌بیان می‌شوند (۵). در پژوهشی به‌منظور بررسی مکانسیم تحمل به تنش خشکی در گیاه نخود، بیان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

ژن *TaNAC2A* مورد ارزیابی قرار گرفت و بر این اساس دو کتابخانه cDNA از برگ نهال گیاه نخود فرآوری شده و یک ژن *CarNAC3* از آن جدا شد. نتایج نشان داد که ژن *CarNAC3* موجود، ۲۸۵ اسیدآمینه و یک دومین *TaNAC2A* دارد که در یک هسته متمرکز بوده و از فعالیت ترانس فعال در پایانه –C برخوردار است و باعث افزایش تحمل گیاه نخود در تنش‌های غیرزنده می‌شود (۲۱).

همانطور که در نتایج این تحقیق مشاهده شد با افزایش سطوح تنش خشکی بر پنج ژنوتیپ گندم دوروم میزان بیان ژن *NAC* و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت و ژنوتیپ شبرنگ بیشترین بیان ژن نسبی را در هنگام تنش خشکی پنج درصد ظرفیت زراعی نسبت به نمونه کنترل داشت. با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش و نقش مهم بیان ژن‌های مقاوم به تنش خشکی در شرایط بحران کم آبی حاضر پیشنهاد می‌شود دیگر ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط تنش خشکی بررسی شوند. همچنین ژنوتیپ‌های شبرنگ و بهرنگ جهت انجام سایر آزمایشات مولکولی مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9618-37 انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می شود.

منابع

1. Agarwal, P., P.K. Agarwal, A.J. Joshi, S.K. Sopory and M.K. Reddy. 2010. Over expression of *PgDREB2A* transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. Molecular Biology Reports, 37: 1125-1135.
2. Amiri Deh Ahmadi, S.R., M. Parsa and A. Ganjeali. 2010. Effects of drought stress on morphological characteristics and yield components in different phonological stages of chickpea (*Cicer arietinum* L.) greenhouse conditions. Journal of Agricultural Research, 8 (1): 166-157 (In Persian).
3. Arraudeau, M.A. 1989. Breeding strategies for drought resistance. In Baker, F. W. G. (ed.), Drought resistance in cereals. CAB International, UK, 125: 107-116.
4. Beers, G.R. and I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Biology Chemical, 195(1): 133-140.
5. Dynowski, M., G. Schaaf and D.J. Loque. 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H_2O_2. Journal of Biochemical and Pharmacological Research, 414: 53-61.
6. Ernst, H.A., A.N. Olsen, K. Skriver, S. Larsen and L.L. Leggio. 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. EMBO Reports, 5(3): 297-303.
7. Esfandiari, E.A., M.R. Shakiba, S.A. Mahboob, H. Alyari and S. Shahabivand. 2009. The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid per oxidation in wheat seedling. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 1916-1922 (In Persian).
8. Fischer, R.A and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield response. Australian Journal of Agricultural Research, 29: 897-912.
9. Gharbi, A., I. Rashid, A.S. Tarynzhad and Q. Chlbyyany. 2013. Salinity and drought tolerance of durum wheat lines under greenhouse conditions. Journal of Crop Ecophysiology, 4(28): 393-410 (In Persian).
10. Golestani Araghi, S. and M.T. Assad. 1998. Evaluation of four screening techniques for drought resistance and their relationship to yield reduction ratio in wheat. Euphytica, 103: 293-299 (In Persian).
11. Gressel, J.Y. and D.M. Joel. 1994. Genetic engineering can help control parasitic weeds. In Biology and Management of Orobanche. Ed. By pieterse A.H., Verkleij, JAC and tter Borg. S.J. Royal Tropical Institute, Amsterdam, 406 pp.
12. Hassanpour Lescokelaye, K., J. Ahmadi, J. Daneshyan and S. Hatami. 2015. Changes in Chlorophyll, Protein and Antioxidant Enzymes on Durum Wheat under Drought Stress. Journal of Crop Breeding, 7(15): 76-87 (In Persian).
13. Huang, Q., Y. Wang, B. Li, J. Chang, M. Chen, K. Li and G. He. 2015. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. BMC plant biology, 15(1): 268.
14. Jiang, M. and J. Zhang. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant and Cell Physiology, 42(11): 1265-1273.
15. Leu, D.J., J. Gregory McVerry, W. Ian O'Byrne, C. Kiili, L. Zawilinski, H. Everett Cacopardo, C. Kennedy and E. Forzani. 2011. The new literacy's of online reading comprehension: Expanding the literacy and learning curriculum. Journal of Adolescent and Adult Literacy, 55(1): 5-14.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

16. Maali-Amiri, R., I.V. Goldenkova-Pavlova, V. Pchelkin, V.D. Tsydendambaev, A.G. Vereshchagin, A.N. Deryabin, T.I. Trunova, D.A. Los and A.M. Nosov. 2007. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the Δ12-desaturase gene from cyano bacterium. Russian Journal of Plant Physiology, 54: 678-685.
17. Mitra J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. Current Science, 80: 758-763.
18. Mittal, S.N. and V. Kumari. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. Plant Physiology Biochemical, 54: 17-26.
19. Mohammadi, R., R. Haghparast, M. Aghaee-Sarbarze and A.V. Abdollahi. 2006. An evaluation of drought tolerance in advanced durum wheat genotypes based on physiologic characteristics and other related indices. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 37: 561-567 (In Persian).
20. Naeemi, T., L. Fahmideh and B.A. Fakheri. 2018. The impact of drought stress on antioxidant enzymes activities, containing of proline and carbohydrate in some genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* L.) at seedling stage. Journal of Crop Breeding, 10(26): 22-31 (In Persian).
21. Peng, H., H.Y. Cheng, C. Chen, W. Yu, N. Yang, W. Gao and H. Ma. 2009. A *NAC* transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum* L.), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. Journal of plant physiology, 166(17): 1934-1945.
22. Pereira-Santana, A., L.D. Alcaraz, E. Castaño, L. Sanchez-Calderon, F. Sanchez-Teyer and L. Rodriguez-Zapata. 2015. Comparative genomics of *NAC* transcriptional factors in angiosperms: implications for the adaptation and diversification of flowering plants. PlOS ONE, 10(11): e0141866.
23. Ribaut, J.M., C. Jiang and D. Hoisington. 2002. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. Crop Science, 42: 557-565.
24. Srmdnya, G. and A.S. Small. 1990. Publication Jihad Mashhad University (Translation). Crop Physiology, 467 pp.
25. Tabaraki, H., L. Fahmideh and Z. Foladvand. 2017. Study of *MYB* gene expression under drought stress in some bread wheat cultivars. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 6(1): 95-104 (In Persian).
26. Tran, T.S., A.L. Kolodkin and R. Bharadwaj. 2007. Semaphoring regulation of cellular morphology. Annu. Rev. Cell Dev. Journal plant of Biology, 23: 263-292.
27. Uauy, C., A. Distelfeld, T. Fahima, A. Blechl and J.A. Dubcovsky. 2006. *NAC* gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. Science, 314(5803): 1298-1301.
28. Vinocur, B. and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology, 16(2): 123-132.
29. Wang, W., B. Vinocur and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta, 218(1): 1-14.
30. Yamaguchi-Shinozaki, K., M. Koizumi, S. Urao and K. Shinozaki. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. Plant and Cell Physiology, 33(3): 217-224.
31. Yoshimura, K., Y. Yabute, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxides isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 123: 223-233.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]

Assessment of *TaNAC2A* Gene Expression and Ascorbate Peroxidase, Catalase Enzymes of Five Durum Wheat Genotypes (*Triticum turgidum* L.) Under Drought Stress

Tahereh Naeemi[1], Leila Fahmideh[2] and Barat Ali Fakheri[3]

1- Graduated M.Sc. Student, of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol
2- Associate Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, (Corresponding author: l.fahmideh@uoz.ac.ir)
3- Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol
Received: January 22, 2018 Accepted: November 13, 2019

Abstract

To deal with stresses, especially drought stress, identification of resistance genes in plants and understanding their functions is very important. In this study, we investigated the effects of drought stress on expression of *TaNAC2A* gene as well as on the activity of ascorbate peroxidase and catalase in some of the durum wheat genotypes. The experiment was conducted in factorial based on randomized complete block design with five drought stress levels (5, 10, 15, 20 and 25% of field capacity) and five durum wheat genotypes (Shabrang, Behrang. Karkhe, Arya and Dena) in three replications. The genotypes were planted in pots and different levels of drought stress were induced at seedling stage (four leaves). Variance analysis showed that the effects of genotype, drought stress and drought stress×genotype interaction were significantly different compare with the control (25% FC). Drought stress of 5% field capacity had the greatest influence on *TaNAC2A* expression as well as catalase and ascorbate peroxidase enzymes activity. The level of *TaNAC2A* expression and the activity of catalase and glycol peroxidase enzymes in Shabrang genotype were higher than that in other genotypes. Interestingly, with increasing drought stress levels, the *TaNAC2A* expression and antioxidant activity of catalase and ascorbate peroxidase was increased in all tested genotypes. Moreover Shabrang genotype had the highest *TaNAC2A* gene expression during drought stress of 5% field capacity compared with the control.

Keywords: Drought stress, Real Time PCR method, Seedling stage, Shabrang genotype

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.29252/jcb.12.33.20]