



## Expression Analysis of Key Genes in Durum Wheat under Mild and Severe Drought Stress

Saba Simorgh<sup>1</sup> , Zahra Tahmasebi<sup>1</sup> , Reza Mohammadi<sup>2</sup> & Alireza Etminan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

<sup>2</sup> Dryland Agricultural Research Institute, Sararood Branch, Agricultural Research, Education and Extension (AREEO), Kermanshah, Iran.

<sup>3</sup> Department of Plant breeding and Biotechnology, Ker. C., Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Corresponding author. E-mail: [z.tahmasebi@ilam.ac.ir](mailto:z.tahmasebi@ilam.ac.ir)

### ABSTRACT

**Introduction:** Drought stress is one of the most important factors limiting the productivity of durum wheat (*Triticum durum* L.) in arid and semi-arid regions of the world, and understanding the response of genes at the molecular level is essential for the development of tolerant cultivars. Therefore, the present study aimed to investigate the relative expression of six key genes related to drought response, including *TdDhn5* and *Wdhn13* (dehydrin genes), *TdAPX1* and *TdCAT1* (antioxidant genes), and *TdDRF1* and *TdDREB1* (transcription factors), in seven durum wheat genotypes including (Zahab, G6, G8 and G9 as sensitive and genotypes G10, G12 and G14 as tolerant under no stress, mild, and severe conditions. The primary objective of the study was to identify genotype-based expression patterns and assess their potential as factors for enhancing drought tolerance.

**Materials and methods:** Wheat seeds were grown in greenhouse conditions in pots with a volume of approximately 2 liters containing 1.5 kg of field soil. Drought stress was applied at the three-leaf stage at two levels: mild and severe. Mild drought with biweekly irrigation and severe drought stress at the 3-leaf stage with complete cutting. Irrigation was induced according to the method described by Moradi et al. (2024). Each irrigation was 250 cc. After four weeks of exposure to stress, sampling was performed. The third fully opened leaf was harvested from three biological replicates of the pot for each genotype in each treatment, with each replicate consisting of five plants. Total RNA was extracted from the third leaves of the seedlings at the 3-4 leaf stage by the TRIzol method and after cDNA synthesis, gene expression was quantified by the technique using the Actin gene as a reference gene. Data were analyzed using ANOVA and the LSD test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The results showed that the expression of the dehydrin genes *TdDhn5* and *TdWdhn13* increased significantly under mild and severe stress conditions (50% and 100%, respectively). In severe stress, the highest expression value was observed in the G14 genotype for *TdDhn5* and in the G12 genotype for *TdWdhn13*. Antioxidant genes *TdAPX1* and *TdCAT1* were also upregulated under both mild and severe stress conditions, with the increase being greater in drought-tolerant genotypes. Notably, under severe stress, *TdAPX1* expression was prominent in Genotype G9, and *TdCAT1* expression was observed in genotype G12. Transcription factors *TdDRF1* and *TdDREB1* demonstrated their regulatory role, with increased expression under mild stress and a peak under severe stress, particularly in Genotypes G12 and G14.

**Conclusion:** This study clarified gene- and genotype-specific expression patterns in response to drought stress and identified G12 genotype as a prominent candidate for tolerance. The coordinated increase in dehydrin genes and transcription factors in response to severe stress confirms their potential as molecular markers in durum wheat breeding programs for drought tolerance. The need for field studies to validate these findings is recommended.

**Keywords:** Durum wheat, relative gene expression, dehydrin, antioxidant genes, transcription factors.

**Article Type:** Research Article

**Article history:** Received: 08 Feb 2025, Revised: 02 Apr 2025, Accepted: 10 Jun 2025, Published online: 28 Jun 2025

**Cite this article:** Simorgh, S., Tahmasebi, Z., Mohammadi, R. & Etminan, A. (2025). Expression Analysis of Key Genes in Durum Wheat under Mild and Severe Drought Stress. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 4(2), 164-179. DOI: [10.22126/cbb.2025.12987.1120](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.12987.1120)



© The Author(s).  
doi: [10.22126/cbb.2025.12987.1120](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.12987.1120)

**Publisher:** Razi University



# بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳



بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

Homepage: <https://cbb.razi.ac.ir>

## بررسی بیان برخی ژن‌های کلیدی گندم دوروم در مواجهه با تنش خشکی ملایم و شدید

صبا سیمرغ<sup>۱</sup>، زهرا طهماسبی<sup>۱</sup>✉، رضا محمدی<sup>۲</sup> و علیرضا اطمینان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

<sup>۲</sup> موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

<sup>۳</sup> گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

✉ نویسنده مسئول. رایانامه: [z.tahmasebi@ilam.ac.ir](mailto:z.tahmasebi@ilam.ac.ir)

### چکیده

**مقدمه:** تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده بهره‌وری گندم دوروم (*Triticum durum* L.) در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان است و درک پاسخ ژن‌ها در سطح مولکولی آن برای توسعه ارقام متحمل ضروری است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی بیان نسبی شش ژن کلیدی مرتبط با پاسخ به خشکی، شامل TdDhn5 و TdDhn13 (ژن‌های دهیدرین)، TdAPX1 و TdCAT1 (ژن‌های آنتی‌اکسیدانی) و TdDRF1 و TdDREB1 (عوامل رونویسی)، در هفت ژنوتیپ گندم دوروم شامل (ذهاب، G6، G8 و G9 به عنوان حساس و ژنوتیپ‌های G10، G12 و G14 به عنوان متحمل تحت شرایط (بدون تنش، ملایم و شدید) انجام شد. هدف اصلی تحقیق شناسایی الگوهای بیان ژنوتیپ‌محور و تعیین پتانسیل آن‌ها به عنوان فاکتورهای بهبود تحمل به خشکی بود.

**مواد و روش‌ها:** بذره‌های گندم در شرایط گلخانه در گلدان‌های با حجم تقریبی ۲ لیتر حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک مزرعه رشد یافتند. تنش خشکی در مرحله سه برگی در دو سطح ملایم و شدید اعمال شد. خشکی ملایم با آبیاری دو هفته یکبار و تنش خشکی شدید در مرحله ۳ برگی با قطع کامل آبیاری طبق روش Moradi et al., (2024) القا شد. در هر بار آبیاری ۲۵۰ سی سی برای هر گلدان لحاظ گردید. پس از چهار هفته قرار گیری گیاهان در معرض تنش، نمونه‌برداری انجام شد. برگ کامل باز شده سوم از سه تکرار بیولوژیکی گلدان به ازای هر ژنوتیپ در هر تیمار، هر کدام با پنج گیاه برداشت شد. RNA کل از برگ‌های سوم گیاهچه‌ها در مرحله ۳-۴ برگی با روش TRIzol استخراج و پس از سنتز cDNA، بیان ژن‌ها با تکنیک با استفاده از ژن Actin به عنوان ژن مرجع کمی‌سازی شد. داده‌ها با ANOVA و آزمون LSD ( $p < 0.05$ ) تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که بیان ژن‌های دهیدرین TdDhn5 و TdDhn13 در شرایط تنش ملایم و شدید (۵۰ و ۱۰۰ درصد) به ترتیب افزایش قابل توجهی یافت، به طوری که در تنش شدید بالاترین مقدار بیان در ژنوتیپ G14 برای TdDhn5 و در ژنوتیپ G12 برای TdDhn13 مشاهده شد. ژن‌های آنتی‌اکسیدانی TdAPX1 و TdCAT1 نیز در شرایط تنش ملایم و شدید افزایش بیان داشتند، که این افزایش در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی بیش‌تر بود؛ به ویژه در تنش شدید، بیان TdAPX1 در ژنوتیپ G9 و TdCAT1 در ژنوتیپ G12 برجسته بود. عوامل رونویسی TdDRF1 و TdDREB1 نیز با افزایش بیان در تنش ملایم و اوج‌گیری در تنش شدید، به ویژه در ژنوتیپ‌های G12 و G14، نقش تنظیم‌کننده خود را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه الگوهای بیان خاص ژن و ژنوتیپ را در پاسخ به تنش خشکی روشن کرد و ژنوتیپ G12 را به عنوان نامزدی برجسته برای تحمل خشکی شناسایی کرد. افزایش هماهنگ ژن‌های دهیدرین و عوامل رونویسی در تنش شدید، پتانسیل استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی گندم دوروم متحمل به خشکی را تأیید می‌کند. نیاز به مطالعات میدانی برای اعتبارسنجی این یافته‌ها توصیه می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** گندم دوروم، بیان نسبی ژن، دهیدرین، ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، عوامل رونویسی.

**نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

**نوع مقاله: دریافت:** ۱۴۰۳/۱۱/۲۰ **اصلاح:** ۱۴۰۴/۰۱/۱۳ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۰۳/۲۰ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۰۴/۰۷

**استناد:** سیمرغ، ص.، طهماسبی، ز.، محمدی، ر. و اطمینان، ع. (۱۴۰۴). بررسی بیان برخی ژن‌های کلیدی گندم دوروم در مواجهه با تنش خشکی ملایم و شدید.

DOI: [10.22126/cbb.2025.12987.1120](https://doi.org/10.22126/cbb.2025.12987.1120) ۱۶۵-۱۷۹. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۴(۲)، ۱۶۵-۱۷۹.



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

## مقدمه

گندم دوروم (*Triticum durum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی جهان است که حدود ۲۰ درصد از کالری مصرفی جمعیت جهان را تأمین می‌کند (FAO, 2023). با این حال، الگوهای نامنظم بارندگی، ناشی از تغییرات اقلیمی و خشک‌سالی‌های طولانی‌مدت تهدیدات جدی برای تولید گندم، به ویژه در اکوسیستم‌های زراعی وابسته به باران که حدود ۷۰ درصد گندم جهان در آن‌ها کشت می‌شود، ایجاد کرده‌اند (Lesk et al., 2016). تنش خشکی مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی از جمله بسته شدن روزنه‌ها، تنظیم اسمزی و فعال‌سازی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را در گیاهان فعال می‌کند (Farooq et al., 2014). در سطح مولکولی، این پاسخ‌ها شامل بیان متفاوتی از ژن‌هایی است که کدکننده دهیدرین‌ها (DHNs)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل رونویسی مانند پروتئین‌های اتصال‌دهنده که عامل پاسخ به کم‌آبی (DREB) هستند که مکانیزم‌های دفاعی پایین‌دست را هماهنگ می‌کنند (Eftekhari et al., 2017).

دهیدرین‌ها، زیرمجموعه‌ای از پروتئین‌های خانواده‌ی<sup>۱</sup> LEA هستند که در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی و دماهای پایین به میزان زیادی تجمع پیدا می‌کنند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در پایداری غشاها و کاهش آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۲</sup> (ROS)

دارند (Hassan et al., 2015). در گندم، ژن‌هایی مانند Dhn5 و Wdhn3 در تحمل خشکی با حفظ هیدراتاسیون سلولی و جلوگیری از دنا توره شدن پروتئین‌ها نقش دارند (Close, 1997). به طور مشابه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز آسکوربات (APX) و کاتالاز (CAT) آسیب اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS را در شرایط تنش کاهش می‌دهند (Hekimi et al., 2018). ژن‌های TdAPX و TdCAT8، که از گندم دوروم مشتق شده‌اند که در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی فعالیت بیشتری را نشان داده‌اند (Ghorbel et al., 2023; Feki et al., 2024). عوامل رونویسی مانند DREB با اتصال به عناصر cis-فعال در پروموتورهای آن‌ها، بیان ژن‌های القاشده توسط تنش را تنظیم می‌کنند (Lata & Prasad, 2011).

با وجود مطالعات فراوان بر روی ژن‌های منفرد، بررسی جامع الگوی بیان ژن‌ها در میان ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم و در سطوح متفاوت تنش هنوز محدود است. این کمبود به‌ویژه در نژادهای سازگار با شرایط ایران که دارای تنوع ژنتیکی ناشناخته و بالقوه‌ای برای سازگاری با تنش‌های محیطی هستند، بیشتر مشاهده می‌شود (Mohammadi et al., 2013).

این مطالعه از qRT-PCR برای کمی‌سازی بیان نسبی شش ژن مرتبط با خشکی در هفت ژنوتیپ گندم تحت شرایط کنترل، ملایم و شدید استفاده می‌کند. ژنوتیپ‌ها

<sup>۱</sup> Late Embryogenesis Abundant<sup>۲</sup> Reactive Oxygen Species

درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد رشد کردند. آبیاری در ظرفیت مزرعه ۸۰ درصد بر اساس روش Souza *et al.*, (2000) به مدت دو هفته حفظ شد.

### تنش خشکی

اندازه گلدان‌های آزمایشی با حجم حدود ۲ لیتر و میزان خاک ۱/۵ کیلوگرم برای هر گلدان لحاظ شد. در مرحله‌ی ۳ برگ (۲۱ روز پس از جوانه‌زنی)، گیاهچه‌ها تحت تنش خشکی قرار گرفتند (Moradi *et al.*, 2024). بوته‌های شاهد دو روز یکبار آبیاری شدند. میزان آبیاری ۲۵۰ سی سی برای هرگلدان در هر نوبت لحاظ گردید. خشکی ملایم با آبیاری دو هفته یکبار و تنش خشکی شدید با قطع کامل آبیاری القا شد. پس از چهار هفته قرارگیری گیاهان در معرض تنش، نمونه‌برداری انجام شد. برگ کامل باز شده سوم از سه تکرار بیولوژیکی و برای هر ژنوتیپ و هر تیمار، با پنج نمونه برداشت شد، نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

محتوای کل RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ با استفاده از معرف TRIzol شرکت دنازیست آسیا (Denazist Asia) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase I تیمار گردید. نسبت جذب نوری A260/A280 بالاتر از ۱/۸ نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب RNA بود. سنتز cDNA رشته‌ی اول از ۲ میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت

بر اساس عملکرد آن‌ها در شرایط محدود آبی انتخاب شده‌اند. با تمرکز بر پاسخ‌های اختصاصی ژن‌ها و ژنوتیپ‌ها، این پژوهش در جهت شناسایی نشانگرهای مولکولی مؤثر در اصلاح ژنتیکی تحمل به خشکی نقش‌آفرینی می‌کند. اهداف ویژه تحقیق شامل بررسی میزان بیان ژن‌های دهیدرین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و DREB در شرایط افزایش شدت تنش خشکی و تحلیل نوع واکنش این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم گندم دوروم نسبت به خشکی است.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و شرایط رشد

در این پژوهش هفت ژنوتیپ گندم دوروم شامل رقم ذهاب به عنوان شاهد و ژنوتیپ‌های شماره‌ی ۶، ۸ و ۹ به عنوان ژنوتیپ‌های حساس و ژنوتیپ‌های شماره‌ی ۱۰، ۱۲ و ۱۴ به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (جدول ۱) که میزان تحمل آن‌ها بر اساس آزمایش‌های میدانی بر پایه‌ی شاخص‌های تحمل به خشکی مشخص شده است (داده‌های منتشر نشده). پس از تهیه بذرها از بخش تحقیقات غلات، معاونت تحقیقات کشاورزی دیم سرارود کرمانشاه، ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند، سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند و به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر (ظرفیت تقریبی ۲ لیتر) که با خاک مزرعه (۱/۵ کیلوگرم) پر شده بودند، منتقل شدند. گیاهان تحت شرایط کنترل‌شده در دمای ۲۵

سنتز cDNA شرکت پارس طوس انجام شد. واکنش سنتز در حضور پرایمرهای oligo(dT) و random hexamers در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه برای غیرفعال‌سازی آنزیم انجام شد. cDNA حاصل به نسبت ۱:۱۰ با آب بدون نوکلئاز رقیق شد و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

### جدول ۱. ژنوتیپ‌های مورد بررسی گندم دوروم در مطالعه‌ی بیان متحمل به خشکی

**Table 1.** Durum wheat genotypes investigated in drought tolerance expression

| شماره | کد ژنوتیپ | شجره                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | ذهاب      | شاهد آزمایش                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2     | G6        | SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACAN<br>INIA/11/BOOMER_33/ZAR/3/BRAK_2//AJAIA_2//SOLGA_8/10/PLATA_10/6/MQUE/4/U<br>SDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-<br>D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR<br>84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT/12/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/SORA/2*PL<br>ATA_12//S |
| 3     | G8        | SILVER_14/MOEWE//BISU_1/PATKA_3/3/PORRON_4/YUAN_1/9/USDA595/3/D67.3/R<br>ABI//CRA/4/ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/POD_9/10/TARRO_1/2*Y<br>UAN_1//AJAIA_13/YAZI/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/11/CF4-JS<br>21//RASCON_37/2*TARRO_2/10/AZ//ALTAR 84/          |
| 4     | G9        | SILVER_14/MOEWE//BISU_1/PATKA_3/3/PORRON_4/YUAN_1/9/USDA595/3/D67.3/R<br>ABI//CRA/4/ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/POD_9/10/TARRO_1/2*Y<br>UAN_1//AJAIA_13/YAZI/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/11/SILK_3/DIP<br>PER_6/3/ACO89/DUKEM_4/5*ACO89/4/PLATA         |
| 5     | G10       | SWAHEN_2/KIRKI_8//PROZANA_1/4/ADAMAR_15//ALBIA_1/ALTAR<br>84/3/SNITAN/9/GUAYACAN<br>INIA/GUANAY/8/GEDIZ/FGO//GTA/3/SRN_1/4/TOTUS/5/ENTE/MEXI_2//HUI/4/YAV_1<br>/3/LD357E/2*TC60//JO69/6/SOMBRA_20/7/JUPARE<br>2001/10/PLATA_6/GREEN_17/3/CHEN/AUK//BISU*2/5/PLATA_3//         |
| 6     | G12       | HUBEI//SOOTY_9/RASCON_37/3/2*SOOTY_9/RASCON_37/4/2*SOOTY_9/RASCON_3<br>7/6/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/3/GUANAY/5/NETTA_4/DUKEM_12//RASC<br>ON_19/3/SORA/2*PLATA_12/4/GREEN_18/FOCHA_1//AIRON_1/7/ALTAR<br>84/STINT//SILVER_45/3/GUANAY/4/GREEN_14//YAV_10/AUK/5/G         |
| 7     | G14       | 61-130/414-44//377-2/4/Df21-72//61-130/Uvy/3/128-13ya05514/5/ALTAR 84 IRDW 2013-<br>14-045-OMAR-OMAR-OSAR-OSAR-6SAR                                                                                                                                                           |

### PCR زمان واقعی کمی (qRT-PCR)

NCBI GenBank طراحی شدند (جدول ۲). هر

واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی سایبر گرین، ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، دو میکرولیتر از الگوی cDNA و شش میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. شرایط چرخه‌ای به‌صورت زیر تنظیم شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به

واکنش qRT-PCR با استفاده از مخلوط اصلی SYBR Green I Master Mix در سیستم PCR زمان واقعی انجام شد. آغازگرهای ویژه ژن‌های هدف شامل TdCAT1، TdAPX1، TdWdhn13، TdDhn5، TdDRF1 و TdDREB1، همچنین ژن مرجع Actin، با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 بر اساس توالی‌های محافظت‌شده گندم در پایگاه داده

مدت ۱ دقیقه، در ادامه ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای تمامی ژنوتیپ‌ها اعمال شد. در پایان، تحلیل منحنی ذوب (در بازه ۶۰ تا ۹۵ درجه‌ی سانتی-گراد) برای بررسی اختصاصیت تک محصولی واکنش‌ها انجام شد. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001) محاسبه گردید. به طوری که  $\Delta Ct$  از اختلاف مقدار آستانه چرخه‌ای (Ct) بین ژن هدف و ژن مرجع TdActin، و  $\Delta\Delta Ct$  از اختلاف  $\Delta Ct$  در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل به دست آمد.

**جدول ۲.** پرایمرهای طراحی شده در نرم افزار primer 3 برای هفت ژن اختصاصی گندم برای qRT-PCR.

**Table 2.** Primers designed by primer 3 software for seven wheat-specific genes for qRT-PCR..

| ژن             | شماره دسترسی | توالی (5'-3')                                 | طول قطعه تکثیر (bp) |
|----------------|--------------|-----------------------------------------------|---------------------|
| <i>TdDhn5</i>  | AY619566     | CACAGGGGAGAGCACAAAGAC<br>CATGCCAGTACCCTGCTGT  | ۱۹۵                 |
| <i>Wdhn13</i>  | AB863587.1   | CTGGAATGACCGGCTCGAA<br>GTCCAGGCAGCTTGTCTT     | ۱۳۸                 |
| <i>TdAPX1</i>  | LT934123.1   | AACGTTTGGGCTTTTCTCCT<br>CAACTCTTCTCCTATCGCAA  | ۱۸۶                 |
| <i>TdCAT1</i>  | OP434464.1   | GGAATATGAGGAGCGGTTTCG<br>ATCCTTGTCTGCAGCAGCTT | ۲۰۷                 |
| <i>TdDRF1</i>  | FJ560495     | GCCGCACCCTTCGAGAT<br>CAGAGACTGAATTAGGCCCATCAC | ۲۲۶                 |
| <i>TdDREB1</i> | FJ560500.1   | GGCATGCTGCAGTCTGATTA<br>AAGCCGACCAACACCATAG   | ۱۵۷                 |
| <i>TdActin</i> | FK827289.1   | CTGCCAAGAACAGCTCCTCA<br>TTCCAGAAGACTCCATGCCG  | ۱۳۵                 |

## نتایج

ژن‌های دهیدرین و عوامل رونویسی گردید. ژنوتیپ G12

به طور مداوم بالاترین سطوح بیان را در اکثر ژن‌ها نشان داد که شاید بتوان آن را به عنوان ژنوتیپ برجسته برای مقاومت به خشکی مطرح نمود. در حالی که G6 کمترین واکنش را از خود نشان داد و حساس بودن آن به همراه دو ژنوتیپ G8 و G9 تأیید شد.

### ژن‌های دهیدرین TdDhn5 و TdWdhn3

بیان ژن TdDhn5 در شرایط تنش خشکی ملایم و شدید در تمام ژنوتیپ‌های مورد آزمایش افزایش نشان داد (شکل ۱). در تنش ملایم، افزایش حداقل پنج برابری

نتایج حاصل از بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR در هفت ژنوتیپ گندم دوروم شامل رقم ذهاب و شش ژنوتیپ اصلاحی دیگر تحت سه شرایط (بدون تنش (کنترل)، تنش ملایم و تنش شدید خشکی) نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در سطح بیان ژن‌ها بود. در شرایط بدون تنش (کنترل)، سطوح بیان ژن‌ها در همه ژنوتیپ‌ها پایین بود، با اعمال تنش ملایم، افزایش متوسطی در بیان ژن‌ها مشاهده شد. در حالی که تنش شدید منجر به افزایش قابل‌توجه بیان ژن‌ها، به‌ویژه در

مشاهده شد. افزایش شدت تنش، موجب افزایش بیان این ژن شد. تا حدی که این افزایش به ۱۰ تا ۲۵ برابر شرایط بدون تنش رسید، که بالاترین مقدار در G14 ثبت شد.



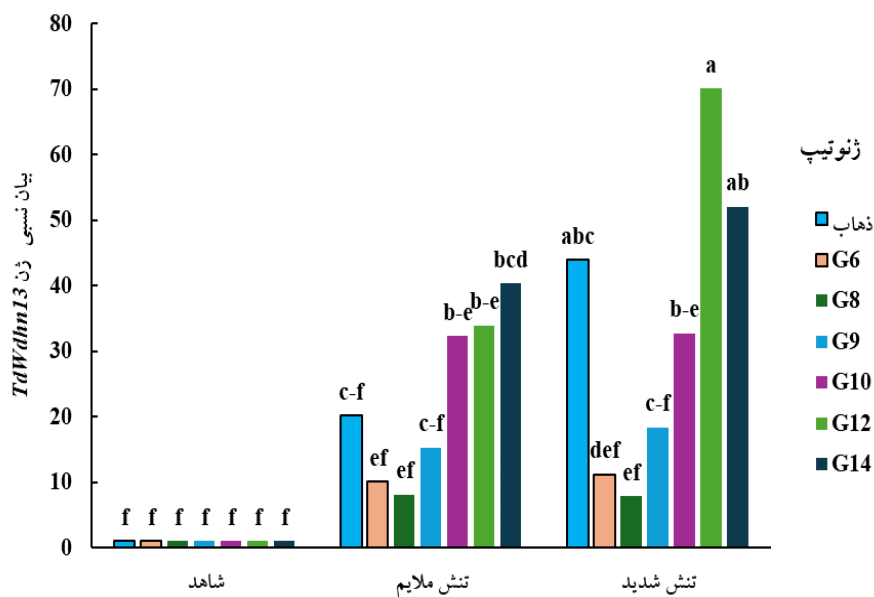
شکل ۱. بیان نسبی ژن TdDhn5 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید.

**Figure 1.** Relative expression of the TdDhn5 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.

### ژن‌های آنتی‌اکسیدانی TdCAT1 و TdAPX1

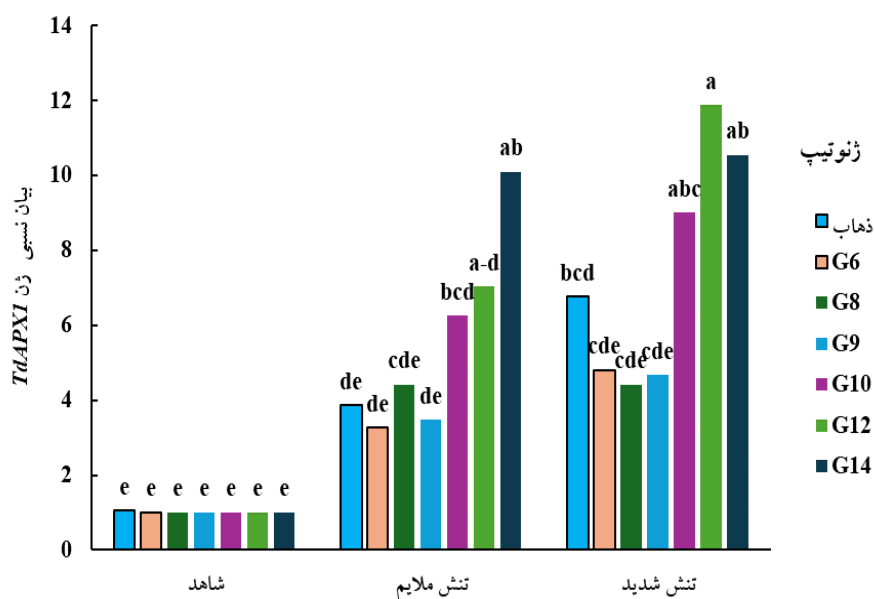
بیان کمی ژن TdAPX1 در شرایط تنش خشکی ملایم و شدید افزایش یافت. اما این افزایش بیان در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی به نسبت ژنوتیپ‌های حساس و نیز رقم ذهاب در هر دو شرایط تنش خشکی ملایم و شدید بیش‌ترین بود. با این‌حال، این افزایش بیان در شرایط تنش خشکی شدید، مقداری بیش‌تر بود (شکل ۳).

ژن TdWdhn13 الگوی بیانی مشابه TdDhn5 داشت، اما میزان بیان نسبی آن بیش‌تر بود (شکل ۲). نتایج حاصل از بیان نسبی این ژن، نشان‌دهنده تأثیر هم‌زمان شدت تنش خشکی و تفاوت‌های ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های گندم دوروم بود. به طوری که میزان بیان در ژنوتیپ‌های متحمل بیش‌تر از ژنوتیپ‌های حساس بود. تا جایی که بیش‌ترین میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل G12 در شرایط تنش شدید خشکی مشاهده شد و اختلاف آماری معنی‌داری با ژنوتیپ G14 و رقم ذهاب نداشت (شکل ۲).



شکل ۲. بیان نسبی ژن TdWdhn13 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید.

**Figure 2.** Relative expression of the TdWdhn13 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.



شکل ۳. بیان نسبی ژن TdAPX1 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید..

**Figure 3.** Relative expression of the TdAPX1 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.

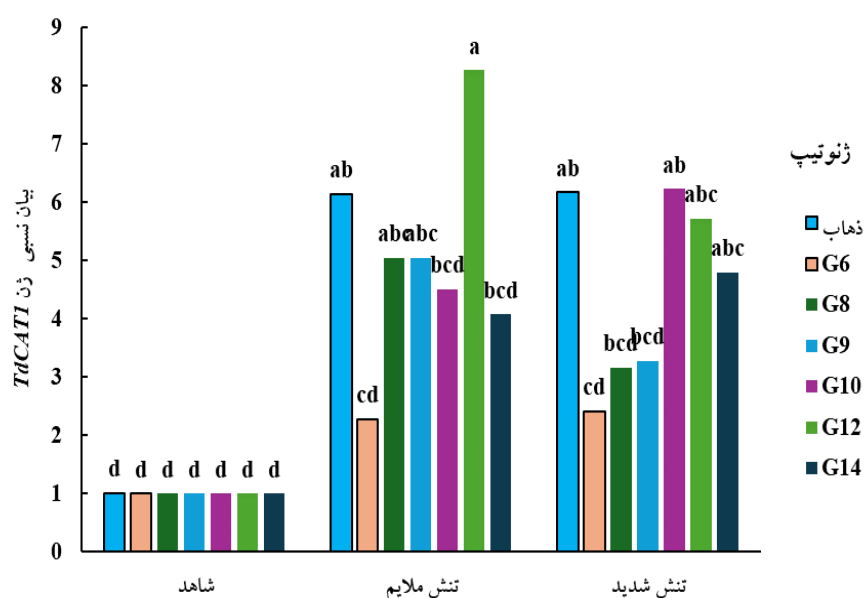
ترین بود (شکل ۵). این افزایش سریع بیان، به ویژه در ژنوتیپ‌های G12 و G14 گندم دوروم، نقش تنظیم‌کننده‌ی این ژن را در پاسخ به تنش خشکی تأیید می‌کند.

ژن TdDREB1 نیز هم در شرایط تنش ملایم و شدید خشکی در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش گندم دوروم افزایش بیان نسبی نشان داد، اما نسبت این افزایش نسبت به شاهد کم‌تر از ژن TdDFR1 بود (شکل ۶).

نتایج بیان نسبی ژن آنتی‌اکسیدانی TdCAT1 نشان داد که این ژن نیز در شرایط تنش خشکی ملایم و شدید افزایش بیان داشته است. این افزایش در ژن TdCAT بر خلاف ژن TdAPX1 در شرایط تنش ملایم برابر با تنش شدید بود (به عبارتی ژن بیان‌کننده آنزیم کاتالاز) (شکل ۴).

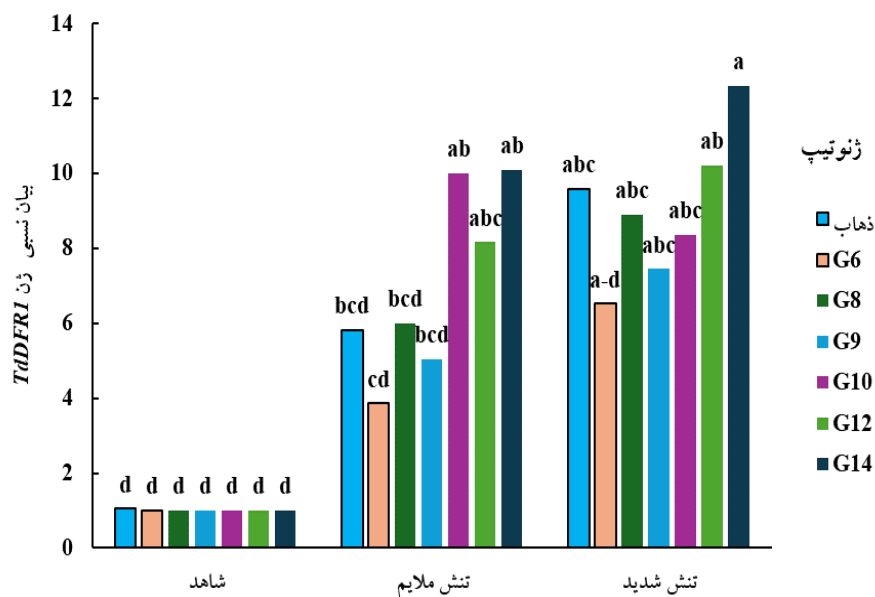
#### ژن‌های عوامل رونویسی TdDREB1 و TdDFR1

ژن TdDFR1 در تنش ملایم و در تنش شدید خشکی افزایش بیان داشت، که این افزایش در تنش شدید بیش-



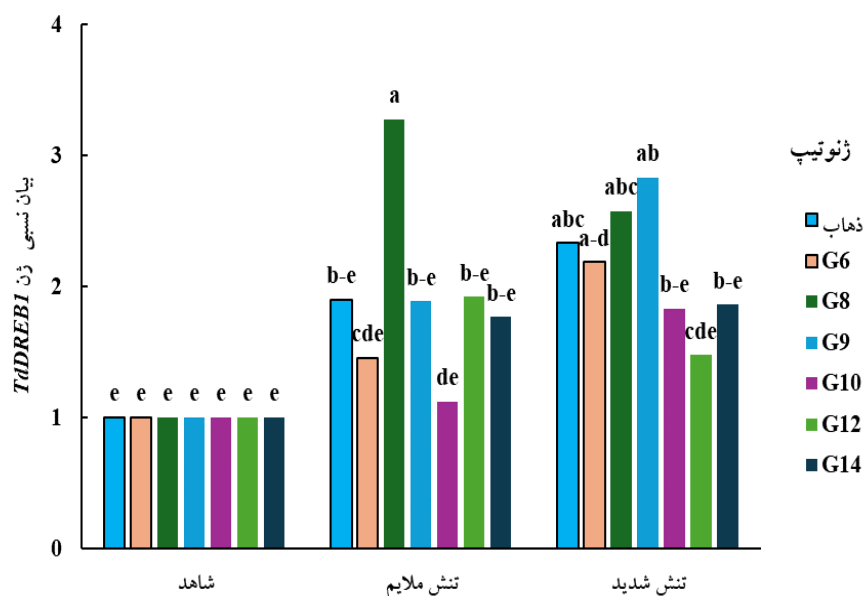
شکل ۴. بیان نسبی ژن TdCAT1 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید.

**Figure 4.** Relative expression of the TdCAT1 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.



شکل ۵. بیان نسبی ژن TdDFR1 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید.

**Figure 5.** Relative expression of the TdDFR1 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.



شکل ۶. بیان نسبی ژن TdDREB1 در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط بدون تنش (کنترل)، تنش خشکی ملایم و شدید.

**Figure 6.** Relative expression of the TdDREB1 gene in durum wheat genotypes under non-stress (control), mild, and severe drought stress conditions.

## بحث

## نقش ژن‌های دهیدرین در تنظیم اسمزی

افزایش بیان ژن‌های دهیدرین TdDhn5 و TdWdhn13 تحت تنش ملایم و شدید با نقش‌های شناخته‌شده‌ی آن‌ها در حفاظت سلولی هم‌راستا است. القای اولیه در تنش ملایم احتمالاً از طریق مسیرهای وابسته به اسید آبسزیک (ABA) رخ می‌دهد، که سیگنال‌دهی اسمزی را آغاز می‌کند (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). اوج‌گیری در تنش شدید در ژنوتیپ‌های متحمل مانند G12 نشان‌دهنده پاسخ تجمعی به کم‌آبی و آسیب سلولی است که با فعالیت دامنه‌های محافظتی YSK2 در تعامل با غشاها مرتبط است (Kovacs *et al.*, 2008). مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس، که بیان پایینی داشت، تفاوت‌های ژنتیکی واریته‌ای را برجسته می‌کند که مشابه گزارش‌ها از گونه‌های مختلف گندم می‌باشد (Pantha *et al.*, 2025).

## فعال‌سازی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به

## ROSها

ژن‌های آنتی‌اکسیدانی TdAPX1 و TdCAT1 الگوهای وابسته به شدت تنش را نشان دادند، که با مدل‌های انفجار گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) سازگار است (Miller *et al.*, 2010). افزایش تدریجی در تنش ملایم برای TdAPX1 و اوج در تنش شدید در G9 برای TdAPX1 و در G12 برای TdCAT1 نشان‌دهنده‌ی فعال‌سازی آستانه محور مسیرهای

خنثی‌کننده‌ی ROS است. این تأخیر از چرخه بیهوده در شرایط ملایم جلوگیری می‌کند (Noctor & Foyer, 1998). برجستگی G9 در TdAPX1 ممکن است به کارایی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و فتوحفاظت (Photoprotection) مرتبط باشد (Smirnoff, 2000). در حالی که G12 با بیان بالا در هر دو ژن، مقاومت چندجانبه‌ای را نشان می‌دهد. فتوحفاظت به مجموعه مکانیزم‌ها و فرآیندهایی گفته می‌شود که گیاهان برای محافظت از خود در برابر آسیب‌های ناشی از نور خورشید زیاد، به‌ویژه در شرایط تنش مانند خشکی، به کار می‌گیرند. وقتی نور بیش از حد به گیاه می‌رسد (مثلاً در زمان تنش خشکی که روزنه‌ها بسته می‌شوند و فتوسنتز کاهش می‌یابد)، انرژی اضافی نور می‌تواند به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر شود که به غشاها، پروتئین‌ها و DNA آسیب می‌زند. بنابراین، در پژوهش حاضر ژن‌های مسئول تولید آنزیم‌هایی مثل پراکسیداز آسکوربات (APX) و کاتالاز (CAT) با خنثی کردن ROS، نقش کلیدی در فتوحفاظت دارند. در مطالعه‌ای، تحلیل ژنومی در گندم دوروم نشان داد که خانواده ژنی کاتالاز (CAT) در گندم دوروم شامل شش ژن (TdCAT) است که بر اساس ویژگی‌های ساختاری و فیلوژنتیکی به سه گروه گروه‌های (I-III) تقسیم‌بندی می‌شوند و این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از طریق تنظیم گونه‌های اکسیژن فعال نقش دارند. علاوه بر این، بررسی الگوی بیان ژن‌های TdCAT2 و TdCAT3 این خانواده ژنی تحت

تنش‌های مختلف مانند شوری، سرما، گرما و ABA نشان داد که این ژن‌ها الگوی بیان متغیری دارند و به‌طور القایی در شرایط تنش فعال می‌شوند که می‌تواند به درک بهتر مکانیزم‌های دفاعی مولکولی کمک کند (Ghorbel *et al.*, 2023).

#### تنظیم‌کننده‌های رونویسی و شبکه‌های مولکولی

ژن‌های TdDREB1 و TdDRF1 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی در پاسخ به تنش خشکی عمل کردند، با افزایش قابل‌توجه بیان که از شرایط تنش ملایم آغاز شد و در تنش شدید به اوج خود رسید. این افزایش که در ژنوتیپ‌های G12 و G14 برجسته‌تر بود، نقش تنظیم‌کننده‌ی این ژن‌ها را در هماهنگی پاسخ به تنش تأیید می‌کند. نقش TdDREB1 در اتصال به عناصر تنظیم‌کننده DRE/CRT و فعال‌سازی ژن‌های پایین‌دستی مانند دهیدرین‌ها شناخته شده است (Dubouzet *et al.*, 2003)، و این الگو در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد. ژن TdDRF1، که ممکن است عضوی از خانواده ERF باشد، به‌طور هم‌افزا با TdDREB1 عمل می‌کند و شبکه‌ای یکپارچه از تنظیم ژن‌ها را تشکیل می‌دهد که به افزایش تحمل به خشکی کمک می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند که الگوهای بیان ژن TdDRF1 در مراحل مختلف رشد گیاه در ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم تحت شرایط مزرعه متفاوت است و این تفاوت‌ها با صفات زراعی نیز ارتباط آماری معنی‌داری دارند (Latini *et al.*, 2022).

الگوهای بیان مشاهده‌شده در ژنوتیپ‌های متحمل G10، G12، G14 و رقم دیم ذهاب در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس G6، G8، G9 نشان‌دهنده تعاملات احتمالی بین ژن‌های محافظتی و تنظیم‌کننده‌ها است. این یافته‌ها با مطالعات قبلی در گیاهانی مانند جو تحت تنش خشکی (Ozturk *et al.*, 2002) سازگار است، که نقش محوری این تنظیم‌کننده‌ها را در تنظیم پاسخ‌های چندژنی به شرایط نامساعد تأیید می‌کند. برای درک دقیق‌تر این شبکه‌ها، انجام مطالعات بیش‌تر مانند مطالعات ترانسکریپتومی در سطح سلولی یا کل محتوای RNA گیاه لازم به نظر می‌رسد.

#### پیامدهای ژنوتیپی و به‌نژادی

تحلیل بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تحمل به تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مقاوم G10، G12 و G14 با عملکرد میدانی آن‌ها در شرایط کم‌آبی مزرعه هم‌خوانی داشت (داده‌ها منتشر نشده) که می‌تواند نقش پررنگ این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی را برساند. ژنوتیپ G12 با بالاترین بیان در بیش‌تر ژن‌ها از جمله TdWdhn13، TdAPX1 و TdCAT1 به‌عنوان ژنوتیپ کاندید گندم دوروم برای تحمل به تنش کم‌آبی در نظر گرفته شد و پتانسیل آن به عنوان اهداکننده‌ی ژن‌های مقاومت از طریق انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی را نشان می‌دهد. با این حال، نیاز به اعتبارسنجی بیش‌تر در سطح مولکولی جهت تأیید بیش‌تر مانند مطالعات ژنومیکس شبکه‌های تنظیم‌کننده یکی از قدم‌های ضروری می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

است. این عوامل با فعال سازی ژن های پایین دستی از جمله دهیدرین ها و آنتی اکسیدان ها، موجب بهبود پاسخ های حفاظتی گیاه می شوند. به طور کلی، ژنوتیپ G12 با بیشترین سطح بیان در بیشترین ژن ها، به عنوان متحمل ترین ژنوتیپ شناسایی شد. در حالی که ژنوتیپ های G6 و G8 کمترین سطح بیان را داشتند و در گروه حساس طبقه بندی شدند. این تفاوت ها مبنای ارزشمندی برای شناسایی ژنوتیپ های برتر در برنامه های اصلاحی مبتنی بر بیان ژن فراهم می آورد. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می دهد که هماهنگی میان مسیرهای دهیدرین، آنتی اکسیدانی و عوامل رونویسی نقش اساسی در تحمل خشکی گندم دوروم دارد. بنابراین، ژن های TdDREB1 و TdWdhn13، TdDhn5 می توانند به عنوان نشانگرهای مؤثر برای غربالگری ژنوتیپ های مقاوم و به کارگیری در برنامه های اصلاحی آینده مورد استفاده قرار گیرند.

نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ های مختلف گندم دوروم در پاسخ به سطوح متفاوت تنش خشکی، الگوهای بیان ژنی متمایزی از خود نشان می دهند. افزایش بیان ژن های خانواده دهیدرین TdDhn5 و TdWdhn13 در ژنوتیپ های متحمل، به ویژه در G12 و G14، بیانگر نقش کلیدی این پروتئین ها در پایداری غشاها و حفظ تعادل آبی سلول در شرایط کم آبی است. این افزایش احتمالاً با جلوگیری از تجمع گونه های فعال اکسیژن (ROS) و تثبیت ساختارهای پروتئینی همراه است. همچنین، افزایش معنی دار بیان ژن های آنتی اکسیدانی TdCAT1 و TdAPX1 در ژنوتیپ های متحمل نسبت به ژنوتیپ های حساس نشان داد که فعالیت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی نقش مکمل مهمی در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی دارد. از سوی دیگر، افزایش بیان عوامل رونویسی TdDRF1 و TdDREB1 در سطوح بالاتر تنش، بیانگر نقش اساسی آن ها در تنظیم مسیرهای ژنی مرتبط با تحمل خشکی

## References

- Close, T.J. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 291-296.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi Shinozaki, K. 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high salt and cold responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.
- Eftekhari, A., Baghizadeh, A., Yaghoobi, M.M., & Abdolshahi, R. 2017. Differences in the drought stress response of DREB2 and CAT1 genes and evaluation of related physiological parameters in some bread wheat cultivars. *Biotechnol Equipmwnt*, 31, 709-716.
- FAO. 2023. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook. Rome: FAO.
- Farooq, M., Hussain, M. & Siddique, K.H. 2014. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(4), 331-349.

- Feki, K., Tounsi, S., Kamoun, H., Al-Hashimi, A. & Brini, F. 2024. Decoding the role of durum wheat ascorbate peroxidase TdAPX7B-2 in abiotic stress response. *Functional & Integrative Genomics*, 24(6), 223.
- Ghorbel, M., Zribi, I., Besbes, M., Bouali, N. & Brini, F. 2023. Catalase gene family in durum wheat: genome-wide analysis and expression profiling in response to multiple abiotic stress conditions. *Plants*, 12(14), 2720.
- Hassan, N.M., El-Bastawisy, Z.M., El-Sayed, A.K., Ebeed, H.T. & Alla, M.M.N. 2015. Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 179-188.
- Hekimi, S., Noë, A., Branicky, R., & Wang, Y. 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217, 1915–1928.
- Kovacs, D., Agoston, B. & Tompa, P. 2008. Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signaling & Behavior*, 3(9), 710-713.
- Lata, C. & Prasad, M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4731-4748.
- Latini, A., Cantale, C., Thiagarajan, K., Ammar, K. & Galeffi, P. 2022. Expression analysis of the *TdDRF1* gene in field-grown durum wheat under full and reduced irrigation. *Genes*, 13(3), 555.
- Lesk, C., Rowhani, P. & Ramankutty, N. 2016. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84-87.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci Yilmaz, S. & Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453-467.
- Mohammadi, R. & Amri, A. 2013. Phenotypic diversity and relationships among worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) germplasm collection under rainfed conditions of Iran. *Crop and Pasture Science*, 64(2), 87-99.
- Moradi, M., Etminan, A., Mohammadi, R., Shoostari, L., Mehrabi, A.M. 2024. Assessment of expression pattern of some antioxidant and dehydrin genes in durum wheat genotypes under water deficit conditions. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16 (4), 189-208.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Ozturk, Z.N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. & Bohnert, H.J. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought-and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, 48(5), 551-573.
- Pantha, S., Kilian, B., Oezkan, H., Zeibig, F. & Frei, M. 2025. A comparison of drought responses in wild wheat relatives and domesticated wheat grown under irrigated and rainfed field conditions. *Field Crops Research*, 321, 109678.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221-227.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series b: Biological Sciences*, 355(1402), 1455-1464.

- Souza, C.C., Oliveira, F.A., Silva, I.F., & Amorim Neto, M.S. 2000. Evaluation of methods of available water determination and irrigation management in “terra roxa” under cotton crop. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4, 338-342