نشریه پژوهش‌های گندم
دوره دوم. شماره یکم. بهار و تابستان ۱۳۹۸
دانشگاه کردستان
Journal of Wheat Research
Volume 2. Issue 1. 2019

بررسی بیان فاکتورهای رونویسی WRKY در شرایط تنش شوری در گندم نان (*Triticum aestivum*)

سعید احدی[۱]، اسعد معروفی*[۲]، بهمن بهرام نژاد[۳] و عادل سی و سه مرده[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
*۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
پست الکترونیک نویسنده مسئول: a.maroufi@uok.ac.ir

دریافت: ۰۵/ ۰۵/ ۱۳۹۸ پذیرش: ۱۱/ ۰۶/ ۱۳۹۸

چکیده

اصلاح ژنتیکی برای تحمل به شوری یکی از روش‌های موثر اصلاحی برای گندم است. اما درک سازوکار، مطالعه و شناسایی ژن‌های تحمل به شوری پیش نیاز اصلاح ژنتیکی است. نقش تعدادی از خانواده‌های عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های محیطی ثابت شده است، بنابراین شناسایی و مطالعه آنها امکان غلبه بر تنش‌های موجود مانند شوری را تسهیل می‌کند. با توجه به نقش موثرخانواده مهم فاکتور رونویسی WRKY در تقابل با تنش‌ها، میزان بیان دو ژن مهم این خانواده از جمله *TaWRKY10* و *TaWRKY53* در ارقام مقاوم و حساس به شوری در گندم در مرحله ۳ تا ۴ برگی بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن *TaWRKY10* در ارقام گندم حساس (تجن) و مقاوم (بم) به شوری دارای بیان متفاوتی است، ولی در رقم بم در شرایط تنش شوری در طی یک دوره ۴۸ ساعتی، دارای بیان بیشتری هم در برگ و هم در ریشه نسبت به شاهد و نیز نسبت به رقم تجن است. هر چند بیان *TaWRKY53* در ارقام مقاوم و حساس متفاوت بود، اما این ژن در رقم حساس با گذشت زمان، بیان بیشتری نسبت به شاهد و رقم مقاوم در برگ و ریشه نشان داد. همچنین کاربرد اسید سالیسیلیک نیز در شرایط تنش شوری باعث تغییر در بیان این ژن‌ها در این ارقام شد. به طور کلی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی WRKY می‌توانند در ایجاد مقاومت به تنش شوری در گندم نقش ایفا کنند و بنابراین در اصلاح ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: *گندم، اصلاح ژنتیکی، تنش شوری، مقاومت*

مقدمه

در بین غلات، گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد استفاده برای غذای انسان است. گندم متعلق به خانواده گرامینه (گندمیان) و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان به شمار می‌رود (Shewry, 2009). گندم معمولی یا همان گندم نان *(Triticum aestivum)* بیشترین میزان کشت را در بین انواع گونه‌های گندم داراست و اهمیت مطالعه و بررسی بر روی آن با توجه به افزایش جمعیت و تهدیدهای زیستی بیش از گذشته است (Shewry, 2009). گندم در دوره رشد با انواع تنش‌های زنده و غیر زنده مواجه می‌شود که نمو، رشد و به ویژه عملکرد را محدود می‌کنند. تنش شوری یک عامل اساسی و محدود کننده در کاهش عملکرد بسیاری از محصولات زراعی از جمله گندم در دنیا و ایران می‌باشد. غلظت‌های بالای نمک در محیط ریشه گیاهان، تنش‌های اسمزی را به وجود می‌آورد که از جذب و انتقال آب جلوگیری می‌کند. همچنین افزایش شوری خاک و آب موجب افزایش نمک در گیاه و در نتیجه سمیت یونی درون سلول‌ها می‌شود (Xiaomu *et al.*, 1995). شوری برتمام فرایندهای اصلی گیاه مانند رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین، متابولیسم لیپید و انرژی موثر بوده، درنتیجه تمام مراحل زندگی گیاه از جوانه‌زنی تا تولید زیست توده و عملکرد دانه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Parida *et al.*, 2004). در مقابل، در شرایط تنش گیاهان مجبورند مراحل اساسی رشد خود را انجام دهند و از بدین منظور از راهکارهای متنوعی استفاده کنند. گیاهان در مقابله با شوری راهبردهایی دارند که منجر به افزایش تولید و بهبود مقاومت در آنها می‌شود. این راهبردها شامل تجمع انتخابی یا خروج یون‌ها،کنترل جذب یونها توسط ریشه و انتقال یونها به برگ،کده‌بندی یونها در سلولها و یا در همه بخشهای گیاه، ایجاد آبکش سازمان نیافته، افزایش نشت مواد از غشای پلاسمایی، سنتز ترکیبات سازگار، القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، القای هورمون‌های گیاهی، حذف نمک‌ها با غدد نمکی، ترشح و برون تراوی نمک‌ها از طریق غدد نمکی و رقیق سازی نمک با آبدار شدگی می‌باشند (Prasad, 1996). بسیاری از این عکس العمل‌های گیاهان در سطح مولکولی کنترل می‌شود، گیاهان با تغییر الگوی بیان ژن‌های مرتبط با تنش برای کاهش آسیب تنش و نیز هموستازی دوباره یون و آب پاسخ می‌دهند (Apel and Hirt, 2004)، که دارای اهمیت ویژه‌ای برای ایجاد مقاومت گیاه نسبت به تنش شوری می‌باشد. انتقال دهنده‌های یونی مختلفی تعیین کننده میزان نهایی هموستازی یونی هستند که در سطح رونویسی و پس از رونویسی تنظیم می‌شوند (Apel and Hirt, 2004). با توجه به وسعت بالای اراضی تحت تأثیر نمک در جهان ضرورت شناخت کامل مکانیسم‌های ژنتیکی به خوبی احساس می‌شود. استفاده از ارقام مقاوم به شوری یکی از مهم‌ترین روش‌های مؤثر در بهره‌برداری و افزایش عملکرد در زمین‌های شور و نسبتاً شور به حساب می‌آید (FAO, 2008). با توجه به وجود تنش شوری در مناطق وسیعی از ایران شناسایی، جداسازی، بررسی تغییرات بیان و انتقال ژن‌های عامل مقاومت به تنش شوری به گیاهان زراعی از جمله گندم، امکان افزایش سطح زیر کشت گیاهان و در نتیجه افزایش تولید را فراهم می‌آورد.

فاکتورهای رونویسی برای تنظیم بیان ژن‌ها ضروری هستند، بنابراین در تمامی موجودات زنده وجود دارند. تعداد عوامل رونویسی در هر موجود زنده بستگی به اندازه ژنوم آن دارد. بنابراین هرچه اندازه ژنوم بزرگتر باشد در نتیجه تعداد عامل رونویسی بیشتری هم وجود دارد (Nimwegen, 2003). بسته به نوع عامل رونویسی بعد از اتصال عامل رونویسی به نواحی مرتبط در ژن‌های تحت کنترل، بیان آنها کم یا زیاد می‌شود و مکانیسم‌های متفاوتی برای تنظیم بیان ژن دارند. بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند، بنابراین می‌توانند امکانی را برای گیاهان فراهم کنند تا بر تنش‌های موجود از جمله شوری غلبه کنند (Rahaie *et al.*, 2011). عوامل رونویسی WRKY یکی از بزرگترین سوپرخانواده‌های تنظیم کننده رونویسی در گیاهان می‌باشند که در تنظیم بسیاری از فرایندهای زیستی شرکت می‌کنند. نام این خانواده از چهار اسید آمینه حفاظت شده آن شامل tryptophan (W)، arginine (R) و lysine (K) tyrosine (Y) گرفته شده است. خانواده ژنی WRKY یکی از ده خانواده بزرگ ژنی هستند که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده‌اند (Eulgem *et al.*, 2000). این خانواده ژنی در طی تکامل گسترش پیدا کرده‌اند و احتمالا همراه با توسعه و تکامل، خود را با پیچیدگی‌های زیاد

مکانیسم‌های دفاعی عوامل زنده و غیر زنده وفق داده‌اند (Eulgem and Somssich, 2007). یافته‌های جدید نشان می‌دهد که پروتئین‌های مربوط به خانواده WRKY اغلب به عنوان فعال کننده‌ها و مهارکننده‌هایی در فرایندهای مهم گیاهی شرکت می‌کنند. عوامل رونویسی WRKY کلیدهای تنظیمی هستند که هم فعالیت‌های تنظیمی مثبت و هم فعالیت‌های تنظیمی منفی دارند (Eulgem and Somssich, 2007). یکی از مهم‌ترین فیتوهورمون‌ها که نقش مهمی در نشان دادن مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان دارد، سالیسیلیک اسید می‌باشد. سالیسیلیک اسید یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک تنظیم کننده رشد درونی گیاهی می‌باشد که از گروه ترکیبات فنلی طبیعی است و در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نقش دارد (Bezrukova *et al.*, 2001) همچنین یکی از اثرات تنش‌های محیطی از جمله شوری، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو است (Hoekstra et al., 2001). این نوع اکسیژن، سمی و بسیار فعال بوده و در غیاب هر مکانیسم محافظتی، متابولیسم معمولی سلول را از طریق آسیب اکسیداتیو تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از موارد آسیب آن پراکسیداسیون لیپیدهای غشاست که نتیجه آن تخریب پروتئین‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، از بین رفتن رنگدانه‌ها و تخریب رشته‌های DNA است (El-Tayeb, 2005). سالیسیلیک اسید در هنگام مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی باعث فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیداتیو در گیاه شده و می‌تواند باعث تقویت غشای سلولی و خنثی کردن خطر افزایش مقدار اکسیژن فعال در مدت زمانی که گیاه در معرض تنش قرار گرفته است، شود (El-Tayeb, 2005). با توجه به اهمیت فاکتورهای رو نویسی، بررسی بیان آن‌ها در شرایط تنش شوری و فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیداتیو توسط سالیسیلیک اسید می‌تواند باارزش باشد، تا اطلاعات حاصل از آن در راستای اصلاح و انتخاب گیاهان مقاوم به تنش شوری مورد استفاده قرار گیرد. زیرا مطالعات نشان داده اند که عوامل رونویسی مانندbZIP ، bHLH، WRKY، MYB، DREB و عناصر دخیل در انتقال پیام مانند پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (MAP کینازها) در کنترل تنظیم میزان بیان بسیاری از پروتئین‌های عملکردی نقش دارند و از مهم‌ترین تنظیم کننده‌های کنترل ژن‌ها می‌باشند (Rushton *et al.*, 2010; Nakashima *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2001). مطالعه این ژن‌ها مانند WRKYها به عنوان یک خانواده مهم امروزه یکی از ابزارهای مولکولی جهت دسترسی به سطوح پاسخ گیاهان به شرایط تنش‌های محیطی از جمله شوری می‌باشد. بررسی این گونه ژن‌ها در غلات و آرابیدوپسیس نقش آنها را به خوبی نشان داده است (Nakashima *et al.*, 2009). دراین تحقیق جهت درک توانایی گندم در تحمل تنش شوری در ارتباط با چند عامل رونویسی WRKY، مطالعه بیان آنها در شرایط تنش شوری و همچنین تاثیر سالیسیلیک اسید بر تغییر بیان آنها در فواصل زمانی پس از اعمال تیمار در دو رقم حساس و متحمل به شوری از گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، اعمال تنش شوری و نمونه‌برداری

بذور ارقام بم (مقاوم به شوری) و تجن (حساس به شوری) از مرکز تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در گلدان‌های پلاستیکی بزرگ کشت گردید. خاک گلدان‌ها شامل خاک مزرعه، ماسه و خاکبرگ به نسبت مساوی بود. در هر گلدان ۱۰ بذر سالم ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد کشت شد و بعد از ظهور گیاهچه‌ها، ۵ گیاه سالم نگهداری شد. گیاهان در شرایط رشدی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد پرورش یافتند. آبیاری تا زمان اعمال تنش با توجه به ظرفیت زراعی برای همه گلدان‌ها به صورت یکسان انجام شد. آزمایش‌های انجام-شده در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار طراحی شدند. در یک آزمایش جداگانه جهت مطالعه بیان ژن‌ها، ارقام بم و تجن در مرحله ۳ تا ۴ برگی در دو سطح صفر (شاهد) و غلظت ۱۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم آبیاری شدند. آبیاری تیمار شاهد با آب بدون کلرید سدیم انجام شد. در یک آزمایش دیگر نیز، ارقام مورد آزمایش در مرحله ۳ تا ۴ برگی با غلظت ۱۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم آبیاری شدند اما هم زمان با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید نیز محلولپاشی شدند و تیمار شاهد (سطح صفر) تنها آب بدون کلرید کلسیم بود.

نهایتا از برگ و ریشه گیاهان تیمار شده و شاهد در هر دو طرح به صورت مجزا در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار نمونه‌گیری انجام گرفت. تا زمان استخراج RNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

برای استخراج RNA کل از برگ و ریشه، از محلول RNAXTM_PLUS شرکت سیناژن طبق پروتکل همراه استفاده شد. جهت حذف DNA از RNA استخراج شده از آنزیم DNase I شرکت Frementas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. همچنین سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت Vivantis طبق دستورالعمل مربوطه نجام شد.

طراحی آغازگرها و RT-PCR نیمه‌کمی

آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس برای ژن *TaActin* به عنوان ژن رفرنس با شماره دسترسی AB181991.1 در پایگاه داده NCBI)، *TaWRKY10* (با شماره دسترسی HQ700327.1) و *TaWRKY53* (با شماره دسترسی EF368357.1) با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) طراحی شدند. از نرم‌افزار تحت وب Oligo calc (Kibbe, 2007) نیز جهت بررسی آنالیزهای ترمودینامیکی مانند دمای اتصال و دایمر استفاده شد. مشخصات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده است. بیان ژن‌ها به روش نیمه‌کمی مورد بررسی قرار گرفت. نسبت‌های به‌کار رفته و چرخه‌های حرارتی مربوط به هر کدام از ژن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها به صورت نیمه کمی ابتدا آزمایش‌های مقدماتی جهت تعداد مناسب چرخه‌ها و دمای بهینه اتصال پرایمرها با استفاده از گرادیان چرخه‌ها و دما انجام شد. بهترین شرایط تکثیر تعداد ۳۰ چرخه تعیین شد که بر اساس نرسیدن به وضعیت ثابت در تکثیر محصولات PCR بود. محصولات حاصل از واکنش RT-PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بررسی شدند. سپس ژل‌ها در ظرف حاوی اتیدیوم بروماید (با غلظت ۰/۵ می‌کروگرم در میلی‌لیتر رقیق شده در آب مقطر) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از شستن ژل در آب مقطر، از آنها توسط دستگاه ژل داکیومنت عکس‌برداری انجام شد.

جدول ۱- توالی و دمای اتصال مربوط به آغازگرهای ژن‌های مورد مطالعه

Table 1- Primer sequence and annealing temperature of the studied genes

آغازگر Primers	توالی آغازگر Primer sequence	دما Temperature
F- *TaActin*	GCTTCCTCATGCTATCCTTC	۵۶/۵ºC
R- *TaActin*	CCAGGAACTTCCATACCAAC	۵۶/۹ºC
F- *TaWRKY10*	GGCTTCGCTAGGACTTACC	۵۶/۶ºC
R- *TaWRKY10*	CGTAGGTGGTGAGGACGTA	۵۷ºC
F- *TaWRKY53*	CCTTTCAGCAGGATGAGGTC	۵۹/۸ºC
R- *TaWRKY53*	ACCTTCTGCCCGTACTTCCT	۶۰/۱ºC

F- پرایمر فوروارد (مستقیم)، R- پرایمر رورس (معکوس)، melting temperature = (Tm)

F=Forward, R=Reverse, (Tm)=melting temperature

جدول ۲- چرخه‌های حرارتی واکنش RT-PCR برای ژن‌های مورد بررسی

Table 2- RT-PCR thermal cycling for the studied genes

دما Temperature (ºC)	زمان Time	مرحله Phase	تعداد چرخه Cycle number
۹۴	۵ دقیقه	واسرشت اولیه	۱
۹۴	۴۵ ثانیه	واسرشت	
* بسته به نوع ژن	۴۵ ثانیه	اتصال	۳۰
۷۲	۵۵ ثانیه	بسط	
۷۲	۵ دقیقه	بسط نهایی	۱

* دمای اتصال برای ژن *TaActin* ۶۰ درجه سانتی‌گراد، *TaWRKY10* ۵۸ درجه سانتی‌گراد و برای *TaWRKY53* ۶۱ درجه سانتی‌گراد

* Annealing temperature for *TaActin* is 60 ° C, *TaWRKY10* 58 ° C and for *TaWRKY53* 61 ° C

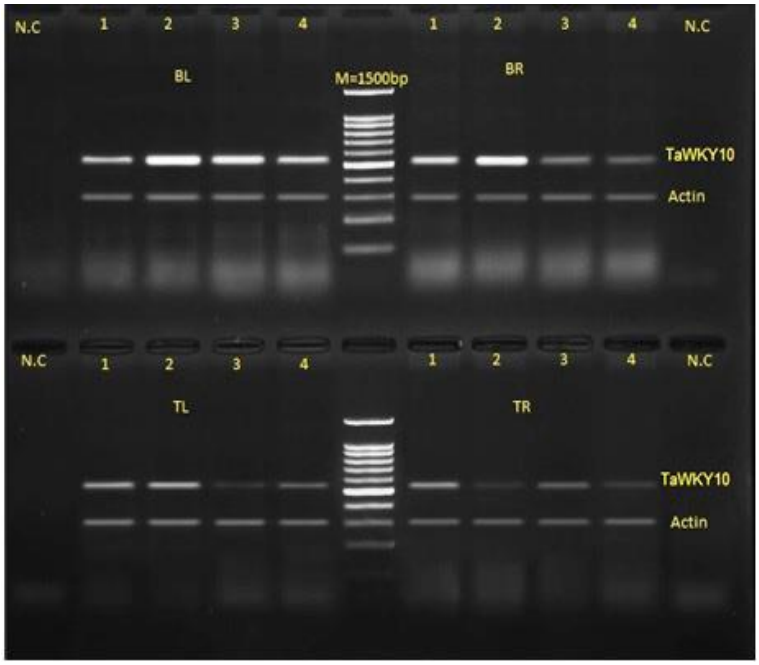
آنالیز بیان ژن و تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه‌کمی که به صورت عکس تهیه شدند با استفاده از نرم‌افزار GelQuantNET biochemlabsolutions.com به داده‌های کمی تبدیل شدند. ژن اکتین (*TaActin*) به عنوان ژن رفرنس انتخاب شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح اجرا شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و در پایان مقایسه میانگین داده‌های حاصل توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارهای مناسب توسط نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 جهت تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها رسم گردید.

نتایج و بحث

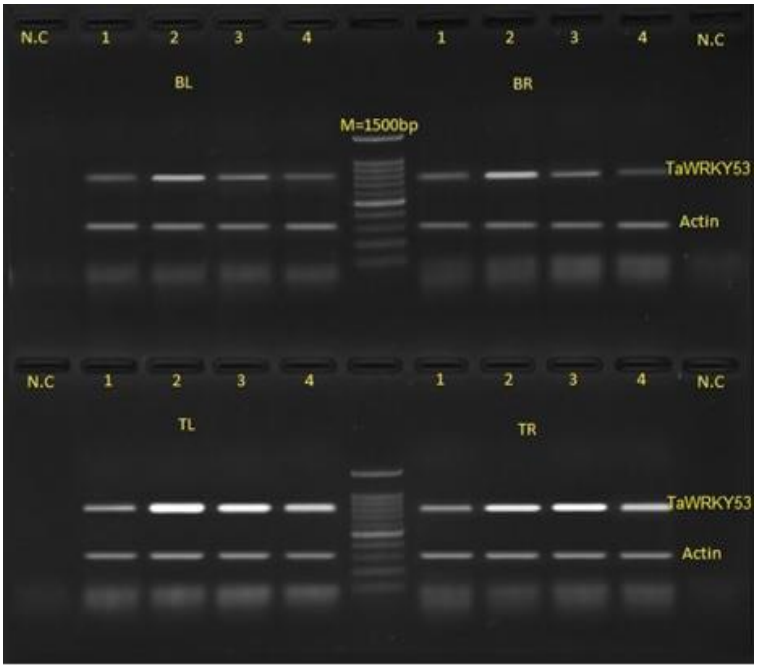
استخراج RNA ، سنتز cDNA و واکنش‌های RT-PCR

استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از بافت برگ و ریشه ارقام بم و تجن با استفاده از کیت سیناژن انجام شد. میانگین غلظت RNA استخراج شده ۰/۶ می‌کروگرم بر می‌کرولیتر و نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ برای تمامی نمونه‌ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود. پس از سنتز cDNA، واکنش RT-PCR نیمه‌کمی برای هرسه ژن انجام شد (شکل ۱ و ۲) و نوارهای به دست آمده برای ژن‌های *TaWRKY53* و *TaWRKY10* به کمک ژن اکتین (*TaActin*) نرمال سازی شد. داده‌های بیان ژن در بافت‌های ریشه و برگ گیاهان در دو آزمایش جداگانه تحت تیمار کلرید سدیم به تنهایی و کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید هم زمان به دست آمد که نتایج به شرح زیر است.



شکل ۱- واکنش‌های RT-PCR جهت بررسی الگوی بیان ژن *TaWRKY10* در بافت برگ و ریشه ارقام بم و تجن گندم پس از تیمار با ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (BL) بافت برگ رقم بم، (BR) بافت ریشه رقم بم، (TL) بافت برگ رقم تجن، (TR) بافت ریشه رقم تجن، (۱ تا۴) به ترتیب ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، (N.C) کنترل منفی، M اندازه نمای ۱۵۰۰ بازی DNA و Actin ژن رفرنس.

Figure 1- RT-PCR reactions to study the expression patterns of *TaWRKY10* in leaf and root tissues of Bam and Tajan cultivars after treatment with 170 mM NaCl. (BL) leaf tissue of Bam cultivar, (BR) root tissue of Bam cultivar, (TL) leaf tissue of Tajan, (TR) root tissue of Tajan, (1 to 4) 0, 12, 24 and 48 hours after treatment respectively, (NC) Negative Control, M 1500 bp DNA Marker and Actin, Reference Gene.

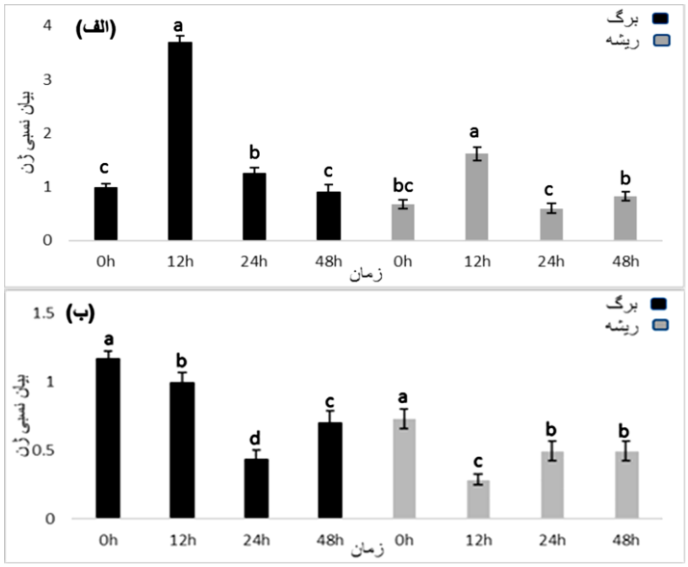


شکل ۲- واکنش‌های RT-PCR جهت بررسی الگوی بیان ژن *TaWRKY53* در بافت برگ و ریشه ارقام بم و تجن گندم پس از تیمار با ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (BL) بافت برگ رقم بم، (BR) بافت ریشه رقم بم، (TL) بافت برگ رقم تجن، (TR) بافت ریشه رقم تجن، (۱ تا۴) به ترتیب ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، (N.C) کنترل منفی، (M) اندازه نمای DNA و Actin ژن رفرنس.

Figure 2- RT-PCR reactions to study the expression patterns of *TaWRKY53* in leaf and root tissues of Bam and Tajan cultivars after treatment with 170 mM NaCl. (BL) leaf tissue of Bam cultivar, (BR) root tissue of Bam cultivar, (TL) leaf tissue of Tajan, (TR) root tissue of Tajan, (1 to 4) 0, 12, 24 and 48 hours after treatment respectively, (NC) Negative Control, M 1500 bp DNA Marker and Actin, Reference Gene.

بیان ژن *TaWRKY10* تحت تیمار کلرید سدیم

الگوی بیان ژن *TaWRKY10* تحت تأثیر تیمار با سدیم کلرید ۱۷۰ میلی‌مولار (شکل ۱) و نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری برای ژن مذکور نشان داد که در رقم مقاوم (بم)، در هر دو بافت برگ و ریشه میزان بیان بعد از ۱۲ ساعت نسبت به تیمار شاهد (سطح صفر) به طور معنی‌داری (سطح احتمال $P<0/05$) افزایش نشان داد ولی با گذشت زمان بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار میزان بیان به سطح تیمار شاهد برگشت. برای این ژن بیشترین میزان آن در برگ بعد از ۱۲ ساعت (۳/۷ برابر نسبت به شاهد) و در ریشه نیز بعد از ۱۲ ساعت (۲/۴ برابر نسبت به شاهد) پس از اعمال تیمار شوری مشاهده گردید (شکل ۳ الف). در رقم حساس (تجن) بیان ژن مذکور در هر دو بافت برگ و ریشه روندی کاهشی را نشان داد، به طوری که کمترین مقدار آن در برگ بعد از ۲۴ ساعت و در ریشه نیز بعد از ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار دیده شد (شکل ۳ ب).

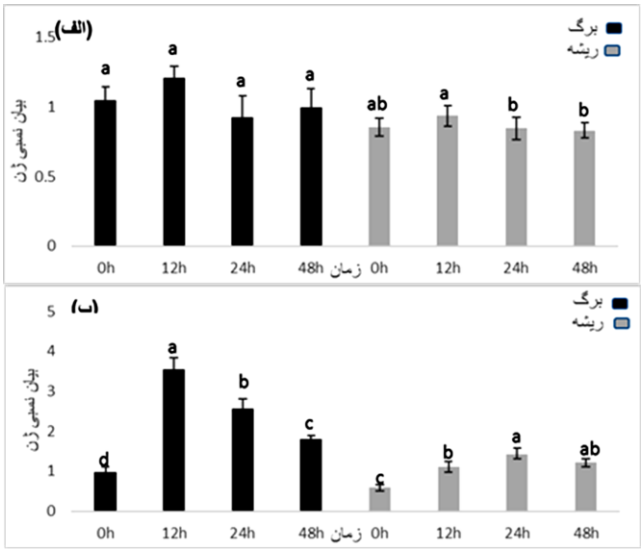


شکل ۳- نمودار میزان بیان ژن *TaWRKY10* در بافت برگ و ریشه در ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (الف) رقم بم، (ب) رقم تجن. مقادیر میانگین ۳ تکرار می‌باشد. حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با هم ندارند.

Figure 3- Level of expression of *TaWRKY10* in leaf and root tissues at 0, 12, 24 and 48 hours after 170 mM NaCl treatment. (a) Bam, (b) Tajan. The values are the mean of 3 replicates. Means with the same letters are not significantly different at 5 percent level.

بیان ژن *TaWRKY53* تحت تیمار کلرید سدیم

نمودار الگوی بیان ژن *TaWRKY53* تحت تأثیر تیمار با سدیم کلرید ۱۷۰ میلی‌مولار در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری برای ژن *TaWRKY53* نیز نشان داد که تیمار سدیم کلرید ۱۷۰ میلی‌مولار در رقم مقاوم (بم)، تأثیر معنی‌داری بر بیان این ژن ندارد (شکل ۴ الف). ولی در رقم حساس (تجن) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد در هر دو بافت پس از گذشت ۱۲ ساعت روی داد (شکل ۴ ب)، به طوری که بیشترین میزان بیان در برگ بعد از ۱۲ ساعت (۳/۶ برابر نسبت به شاهد) و در ریشه بعد از ۲۴ ساعت (۱/۳ برابر نسبت به شاهد) پس از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۴ ب).

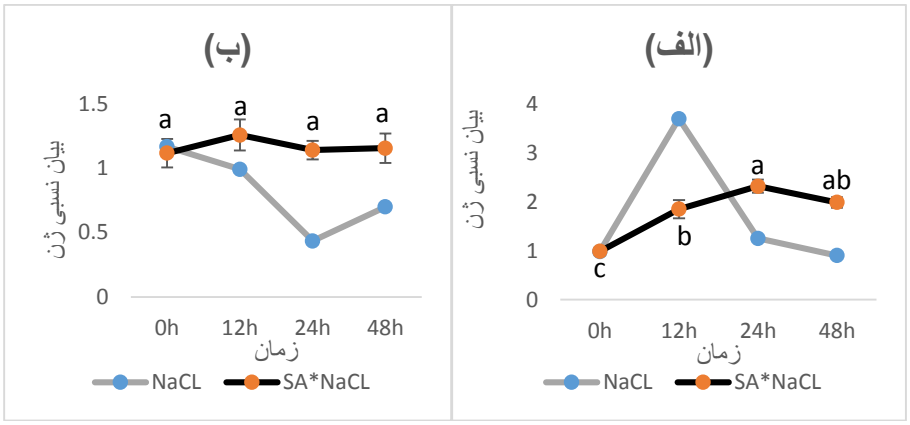


شکل ۴- نمودار میزان بیان ژن *TaWRKY53* در بافت برگ و ریشه در ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (الف) رقم بم، (ب) رقم تجن. مقادیر میانگین ۳ تکرار می‌باشد. حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با هم ندارند.

Figure 4- Level of expression of *TaWRKY53* in leaf and root tissues at 0, 12, 24 and 48 hours after 170 mM NaCl treatment. (a) Bam, (b) Tajan. The values are the mean of 3 replicates. Means with the same letters are not significantly different at 5 percent level.

بیان ژن *TaWRKY10* تحت تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و کلرید سدیم

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده نشان داد که بیان ژن *TaWRKY10* در اثر تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و سدیم کلرید در رقم مقاوم (بم) پس از اعمال تنش روند افزایشی را نشان می‌دهد (شکل ۵ الف)، به طوری که بیشترین میزان بیان بعد از ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد که حدود ۲ برابر نسبت به شاهد بود. ولی در رقم حساس (تجن) تغییرات معنی‌داری در بیان ژن مذکور مشاهده نگردید (شکل ۵ ب). در رقم تجن میزان بیان ژن *TaWRKY10* تحت تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و سدیم کلرید نیز بیشتر از حالت تیمار با سدیم کلرید به تنهایی بود (شکل ۵ ب) ولی در رقم بم میزان بیان تحت تیمار همزمان پس از گذشت ۱۲ ساعت یعنی در ساعات ۲۴ و ۴۸ بیشتر از حالت تیمار تنها با سدیم کلرید بود (شکل ۵ الف).

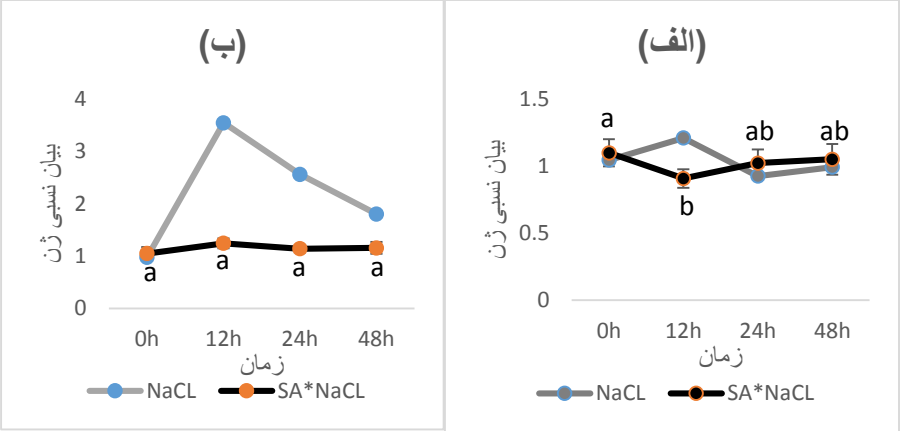


شکل ۵- نمودار روند میزان بیان ژن *TaWRKY10* در بافت برگ در ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار همزمان ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (الف) رقم بم، (ب) رقم تجن. مقادیر میانگین ۳ تکرار می‌باشد. حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با هم ندارند.

Figure 5- Trend of *TaWRKY10* expression in leaf tissue at 0, 12, 24 and 48 hours after simultaneous treatments with 0.1 mM salicylic acid and 170 mM sodium chloride. (a) Bam, (b) Tajan. The values are the mean of 3 replicates. Means with the same letters are not significantly different at 5 percent level.

بیان ژن *TaWRKY53* تحت تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و کلرید سدیم

نتایج بررسی بیان ژن *TaWRKY53* در اثر تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و سدیم کلرید نشان داد که در رقم مقاوم (بم) پس از ۱۲ ساعت روند کاهشی و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت دوباره به سطح شاهد رسید (شکل ۶ الف). ولی در رقم حساس در همه زمان‌ها سطح بیان ژن تقریبا ثابت بود (شکل ۶ ب). در رقم تجن سطح بیان ژن *TaWRKY53* تحت تیمار همزمان سالیسیلیک اسید و سدیم کلرید درمقایسه با حالت تیمار با سدیم کلرید به تنهایی کمتر بود (شکل ۶ ب)، ولی در رقم بم اختلاف قابل ملاحظه‌ای در سطح بیان دو نوع تیمار مشاهده نگردید (شکل ۶ الف).



شکل ۶- نمودار روند میزان بیان ژن *TaWRKY53* در بافت برگ در ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار همزمان ۰،۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و ۱۷۰ میلی‌مولار سدیم کلرید. (الف) رقم بم، (ب) رقم تجن. مقادیر میانگین ۳ تکرار می‌باشد. حروف یکسان اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با هم ندارند.

Figure 6- Trend of *TaWRKY53* expression in leaf tissue at 0, 12, 24 and 48 hours after simultaneous treatments with 0.1 mM salicylic acid and 170 mM sodium chloride. (a) Bam, (b) Tajan. The values are the mean of 3 replicates. Means with the same letters are not significantly different at 5 percent level.

تنش‌ها محدودیت یا نوسانات غیر قابل پیش‌بینی هستند که بر روی الگوی عادی متابولیکی گیاه تحمیل می‌شوند و باعث صدمه یا بیماری می‌گردند (Gaspar *et al.*, 2002). شناسایی ژن‌های موثر و تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به انواع تنش‌ها موجب می‌شود تا راهکارهای مؤثری در اصلاح گیاهان جهت بهبود تحمل به تنش ایجاد گردد (Cushman and Bohnert, 2000). در سال‌های اخیر با در اختیار داشتن روش‌های مطالعه بیان ژن، توجه بسیاری از محققین به مقایسه الگوی بیان ژن‌ها در گیاهان متحمل و حساس به تنش‌های زنده و یا غیر زنده جلب شده است. از جمله ژن‌های تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش‌ها، عوامل رونویسی هستند که نقش مهمی را در پاسخ به تنش‌ها در گیاهان مختلف ایفا می‌کنند که یکی از مهم‌ترین آنها خانواده ژنی WRKY می‌باشد. فاکتورهای رونویسی WRKY جزو خانواده بزرگی در گیاهان عالی محسوب می‌شوند که نقش مهمی در رشد، متابولیسم و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کنند (Zhou et al., 2008). در مطالعات انجام شده توسط Zhou همکاران (2008) گزارش شده است که ژن *GmWRKY54* مقاومت به شوری را در گیاه آرابیدوپسیس القاء می‌کند. همچنین Wangو همکاران (2013) با بررسی الگوی بیان فاکتور رونویسی *TaWRKY10* گندم در گیاه تراریخت توتون نشان دادند که این ژن با تعدیل اسمزی و تأثیر بر رونویسی ژن‌های وابسته به تنش، یک فاکتور مؤثر در فرایند مقاومت به شوری محسوب می‌شود. در این پژوهش نیز الگوی بیان ژن‌های *TaWRKY10* و *TaWRKY53* نشان داد که ژن *TaWRKY10* در شرایط تنش شوری در رقم مقاوم تر گندم (بم)، در هر دو بافت برگ و ریشه نسبت به تیمار شاهد بعد از ۱۲ ساعت به طور معنی‌داری افزایش بیان پیدا کرد ولی با گذشت زمان بعد از ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به سطح شاهد رسید. همچنین در رقم حساس تر (تجن) کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن مذکور در هر دو بافت مشاهده شد. این نتایج با مشاهدات Wang و همکاران (2013) مطابقت دارد. همچنین میزان بیان ژن *TaWRKY53* در رقم حساس تر به شوری (تجن) به صورت معنی‌داری افزایش یافت ولی در رقم مقاوم (بم) تأثیر معنی‌داری در الگوی بیان این ژن مشاهده نگردید. بنابراین به نظر می‌رسد ژن *TaWRKY53* تأثیر معکوس را در مقاومت به شوری در گندم دارد، که شاید به دلیل رابطه متقابل ژن‌های القاء شونده در شرایط تنش از جمله ژن *TaWRKY18* و یا سایر ژن‌ها با ژن *TaWRKY53* در رقم مقاوم باشد. همچنین گزارش شده است که ژن *WRKY53* در فرایند پیری نقش دارد (Ay *et al.*, 2009; Miao and Zentgraf, 2010) و بیان آن در شرایط تنش، مخصوصاً در ژنوتیپ‌های حساس به تنش افزایش می‌یابد (Ishihama and Yoshioka, 2012). در مطالعه روی گیاه

آرابیدوپسیس نیز نتایج نشان داده شده است که بیش بیان ژن *WRKY53* تأثیر منفی در مقاومت به تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی دارد (Sun and Yu, 2015). بنا براین الگوی متفاوت بیان ژن مذکور نسبت به ژن‌های دیگر در ارقام مقاوم و حساس گندم احتمالاً می‌تواند ناشی از نقش متفاوت این ژن باشد. به نظر می‌رسد که *TaWRKY10* در گندم نقش مهم تری در مقاومت به شوری ایفا می‌کند.

سالیسیلیک اسید یکی از هورمون‌های گیاهی است که هنگام مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی از جمله شوری، سیستم آنتی‌اکسیداتیو در گیاه را فعال نموده و در تقویت غشای سلولی و خنثی کردن خطر افزایش مقدار اکسیژن فعال موثر است. در پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید در کاهش اثرات منفی تنش شوری، الگوی بیان ژن‌های *TaWRKY10* و *TaWRKY53* در شرایط تیمار با کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید به صورت همزمان نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو رقم، میزان بیان ژن *TaWRKY10* تحت تیمار همزمان کلرید سدیم و سالیسیلیک اسید نسبت به حالت تیمار تنها با سدیم کلرید افزایش بیان نشان داد، ولی میزان بیان ژن *WRKY53* روندی کاهشی داشت. در مطالعات بر روی گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان داده شد که بیان ژن *WRKY53* تأثیر منفی در مقاومت به تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی دارد (Sun and Yu, 2015)، همچنین دیگر محققین نشان دادند که این ژن در تجزیه رنگدانه‌ها و تسریع پیری نقش دارد (Ay *et al.*, 2009; Miao and Zentgraf, 2010). بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن *WRKY53* در ارقام حساس تحت تنش شوری و کاهش بیان تحت تأثیر توأم تیمار سدیم کلرید و سالیسیلیک اسید ناشی از تأثیر منفی آن در مقاومت به تنش‌های محیطی از جمله شوری در گندم باشد (Miao and Zentgraf, 2007). کاربرد سالیسیلیک اسید می‌تواند باعث کاهش بیان ژن *WRKY53* شده و احتمالا کاهش خطرات آن را جبران کند. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد که کاربرد سالیسیلیک اسید بتواند در گندم باعث افزایش سازگاری به تنش شوری شود.

در راستای به کارگیری اصلاح ژنتیکی و روش‌های نوین بیوتکنولوژی تحقیقاتی نیز در دیگر گونه‌های غلات انجام شده است. از جمله آنها می‌توان به مطالعات Du و همکاران (2013). اشاره کرد که در آزمایشات خود نشان دادند که بیش بیان ژن *TaSIP* در برنج و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) می‌تواند منجر به القاء مقاومت به شوری و خشکی شود. همچنین Chen و همکاران (۲۰۰۷) با جداسازی و بررسی بیان ژن *OsNHX1* از برنج، گزارش کردند که این ژن باعث افزایش قابل توجهی در بهبود تحمل به تنش شوری در برنج آپلند می‌شود. He و همکاران نیز (2011) در مطالعات خود با جداسازی فاکتور رونویسی *TaMYB73* از گندم و انتقال آن به گیاه آرابیدوپسیس نشان دادند که بیش بیان این ژن مقاومت به شوری را در گیاه آرابیدوپسیس بهبود می‌بخشد. چندین مطالعه دیگر نیز به بررسی الگوی بیان ژن‌ها یی که دارای نقش مهم در ایجاد مقاومت در گیاهان در شرایط تنش شوری هستند، پرداخته اند و این نقش آنها را با انتقال به گیاهان دیگر ثابت کرده اند (Huang *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2003).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی این مطالعات نشان می‌دهند که برخی ژن‌ها از جمله فاکتورهای رونویسی نقش مهمی در بهبود و اصلاح گیاهان در مقاومت به شوری دارند. در خاتمه می‌توان نتیجه گرفت که نتایج این تحقیق در راستای تایید نقش فاکتورهای رونویسی در مقاومت به شوری مورد توجه است و در ایجاد و معرفی ارقام گندم مقاوم می‌تواند به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی: از دانشگاه کردستان جهت تامین هرینه انجام این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Apel, K. Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Plant Biology, 55:373-399.

Ay, N. Irmler, K. Fischer, A. Uhlemann, R. Reuter, G. Humbeck, K. 2009. Epigenetic programming via histone methylation at *WRKY53* controls leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Journal, 58(2):333-346.

Bezrukova, M, Sakhabutdinova, V. Fatkhutdinova, R. Kyldiarova, R. A. Shakirova, I. Sakhabutdinova, F. A. 2001. The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. Agrochemiya, 2: 51-54.

Chen, H. An, R. Tang, J. H. Cui, X. H. Hao, F. S. Chen, J. Wang, X. C. 2007. Over-expression of a vacuolar Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. Molecular Breeding, 19: 215-225.

Cushman, J. Bohnert, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Plant Biology, 3:117-124.

Du, H.Y. Shen, Y.Z. Huang, Z. J. 2013. Function of the wheat TaSIP gene in enhancing drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. Plant Molecular Biology, 81(4-5):417-429.

El-Tayeb, M. A. 2005. Response of barley grain to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation, 45(3): 215-224.

Eulgem, T. Rushton, P. J. Robatzek, S. Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in Plant Sciences, 5: 199-206.

Eulgem, T. Somssich, I. E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Plant Biology, 10:366-371.

FAO, 2008. Assessment of the World Food Security and Nutrition Situation. Committee on world food security, Thirty-fourth session, Rome.

Gao, Z. He, X. Zhao, B. Zhou, C. 2010. Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, *TaNIP* enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Cell Physiology, 51: 767-775.

Gaspar, T. Franck, T. Bisbis, B. Kevers, C. Jouve, L. Hausman, J.F. Dommes, J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation, 37, (3)263-285.

Guan, R. Qu, Y. Guo, Y. Yu, L. Liu, Y. Jiang, J. Chen, J. Ren, Y. Liu, G. Tian, L. Jin, L. Liu, Z. Hong, H. Chang, R. Gilliham, M. Qiu, L. 2014. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. Plant Journal, 80(6):937-50.

He, Y. Li, W. Lv, J. Jia, Y. Wang, M. Xia, G. 2011. Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, TaMYB73, improves salinity stress tolerance in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany, 63: 1511-1522.

Hoekstra, F. A. Golovina, E. A. Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Plant Sciences, 6:431-438.

Huang, Z. J. Xu, T. Xue, Y. B. Shen, Y. Z. 2003. Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance. Plant Sciences, 165: 1369-1375.

Huang, X. Zhang, Y. Jiao, B. Chen, G. Huang, S. Guo, F. Shen, Y. Huang, Z. Zhao, B. 2012. Overexpression of the wheat salt tolerance-related gene *TaSC* enhances salt tolerance in Arabidopsis. J. Exp. Bot. 63(15): 5463-5473.

Ishihama, N. Yoshioka, H. 2012. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Biology,15: 431-437.

Kibbe, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Research, 35(webserver issue).

Nakashima, K. Ito, Y. Yamaguchi, K. 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. Plant Physiology. 149:88-95.

Miao, Y. Zentgraf, U. 2007. The antagonist function of Arabidopsis *WRKY53* and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. Plant Cell, 19(3):819-830.

Miao, Y. Zentgraf, U. 2010. A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. Plant Journal, 63(2):179-188.

Nimwegen E. 2003. Scaling laws in the functional content of genomes. Trends in Genetics, 19(9):479-84.

Parida, A. K. Das, A. B. Mohanty, P. 2004. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. Journal of Plant Physiology, 161:531-542.

Pearson, G. Robinson, F. Beers Gibson, T. Xu, B. E. Karandikar, M. Berman, K. Cobb, M.H. 2001. "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". Endocrine Reviews. 22 (2): 153-83.

Prasad M. V. 1996. Plant Ecophysiology. John Wiley and Sons, Inc, New York.

Rahaie, M. Gomarian, M. Alizadeh, H. Malboobi, M. A. Naghavi, M. R. 2011. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using Reverse Northern Blot. Iranian Journal of Crop Sciences, 29: 835-844.

Rushton, P. J. Somssich, I. E. Ringler, P. Shen, Q. J. 2010. WRKY transcription factors. Trends in Plant Science, 15: 247-258.

Shewry, P. R. 2009. Wheat. Journal of Experimental Botany, 60: 1537-1553.

Sun, Y. Yu, D. 2015. Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. Plant Cell reports, 34: 1295-1306.

Untergasser, A. Cutcutache, I. Koressaar, T. Ye, J.,Faircloth, B. C. Remm, M. Rozen, S. G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research, 40: e115–e115.

Xiaomu, N. Ray, A. Bressan, P. M. José M. 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. Plant Physiology, 109: 735-742.

Wang, C. Deng, P., Chen, L. Wang, X. Ma, H. Hu, W. Yao, N. Feng, Y. Chai, R. Yang, G. He, G. 2013. A Wheat WRKY Transcription Factor TaWRKY10 Confers Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Tobacco. PLoS ONE. 8(6):1356-1371.

Zhou, Q.Y. Tian, A. G. Zou, H. F, Xie, Z. M. Lei, G. Huang, J. Wang, C. M. Wang, H. W Zhang, J. S. Chen, S. Y. 2008. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis plants. Plant Biotechnology Journal, 6(5):486-503.

Analysis of expression of WRKY transcription factors under saline conditions in bread wheat (*Triticum aestivum*)

Saeed Ahadi[1], Asad Maroufi[2*], Bahman Bahramnejad[3] & Adel Siosemardeh[3]

1.M. Sc. of Agricultural biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2*. Corresponding author, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
Email: a.maroufi@uok.ac.ir

Received: 2019/ 07/ 27 **Accepted:** 2019/ 09/ 02

Abstract

Genetically improvement for salinity resistance is one of the most effective breeding methods for wheat. But understanding the mechanism, assessing and identifying salinity tolerance genes is a prerequisite for genetic modification. The role of a number of families of transcription factors has been proven in response to environmental stresses, hence, their identification and investigation facilitates the possibility of overcoming stresses. Considering the significant role of the important family of WRKY transcription factors in response to stresses, the expression of two important genes of this family including TaWRKY10 and TaWRKY53 in different tolerant and susceptible cultivars of wheat was investigated. The results showed that *TaWRKY10* exhibited different expressions in susceptible wheat (Tajan) and resistant (Bam) cultivars. In resistant cultivar (Bam) under saline conditions over a period of 48 hours, *TaWRKY10* showed more expression level in both leaf and root tissues than the control and also the sensitive (Tajan) cultivar. However, the expression of *TaWRKY53* was different in resistant and susceptible cultivars. *TaWRKY53* in susceptible cultivar (Tajan), over the period of 48 hours, showed more expression level than the control and resistant cultivar (Bam) in leaves and root tissues. Also, by using salicylic acid under salinity stress, the expressions of *TaWRKY10* and *TaWRKY53* in Tajan and Bam cultivars were different. In general, our results show that WRKY transcription factors can play a role in generating resistance to salinity stress in wheat and therefore can be used in genetic improvement.

Key words: *Wheat, Genetic improvement, Salinity stress, Resistance*