



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

## Evaluation of Physiological Responses and *CONSTANS-Like* Gene Expression Under Late-Season Drought Stress in Two Wheat Genotypes

Bentolhoda Farokhpuri | Ghader Mirzaghaderi\* | Adel Siosemardeh

Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

\*Corresponding author ✉: [gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir](mailto:gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir)

### Article Info

**Article type:**  
Research Article

**Article history:**

Received: August 24, 2025;  
Received in revised form: December 13, 2025;  
Accepted: December 19, 2025;  
Available online: December 30, 2025

**Keywords:**

Antioxidant enzymes,  
Drought stress,  
Photosynthetic pigments,  
Wheat,  
Synthetic wheat line,  
*CONSTANS-Like*

### ABSTRACT

Terminal drought stress severely constrains wheat production in arid and semi-arid regions such as Iran, where yield stability is heavily reliant on unpredictable spring precipitation. The *CONSTANS-Like* (*COL*) gene family integrates light signals and circadian rhythms to regulate flowering time and is also involved in abiotic stress adaptation. This study investigated the physiological and transcriptional responses of eight *COL* gene family members to terminal drought stress in the flag leaf tissue of a synthetic hexaploid wheat line, in comparison to the commercial cultivar Pishgam. A split plot experiment was performed under field conditions the fram of a randomized complete block design with three replications. Two The main factor was irrigation regimes (well-watered and drought-stressed) and two genotypes were located in subplots. The synthetic line maintained higher levels of photosynthetic pigments and exhibited enhanced activity of key antioxidant enzymes, particularly superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), under both conditions. Under well-watered conditions, all homeologous groups showed higher transcript abundance in the synthetic line, correlating with its accelerated growth and early flowering phenotype. Under drought stress, one homeologous group was downregulated in both genotypes, whereas the other two were significantly upregulated, with markedly stronger induction in the synthetic line. This expression pattern suggests their involvement in promoting early maturity and desiccation escape mechanisms. The coordinated enhancement of antioxidant defense and selective upregulation of specific *COL* genes indicates a synergistic interaction between oxidative stress mitigation and developmental acceleration under drought conditions. Collectively, these findings indicate that superior tolerance to late drought of the artificial wheat line is associated with stable photosynthetic performance and a distinct *COL* gene expression profile, making this line a suitable candidate for cultivation in areas with late-season drought stress.



**Cite this article:** Farokhpuri, B., Mirzaghaderi, G. and Siosemardeh, A. (2025). Evaluation of physiological responses and *CONSTANS-Like* gene expression under late-season drought stress in two wheat genotypes. *Plant Genetic Research*, 12(2): 143–160.

**DOI:** <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2069839.1014>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

## Introduction

Terminal drought stress is a major constraint on wheat production in arid and semi-arid regions like Iran, where yield stability is heavily dependent on unpredictable spring precipitation. This multifactorial stress impacts various growth and yield parameters, often by altering carbohydrate metabolism pathways and modulating the expression of associated genes. Wheat plants deploy complex physiological, biochemical, and molecular responses to adapt to or resist drought stress. The *CONSTANS-Like (COL)* gene family, central regulators of photoperiodic flowering through the integration of light signals and the circadian clock, are also implicated in abiotic stress responses.

## Materials and Methods

This study employed a split plot experiment under field conditions in the frame of a randomized complete block design with three replications. The main factor was irrigation regime including well-watered and terminal drought-stressed (irrigation withheld from anthesis, Zadoks GS65, to physiological maturity, Zadoks GS89). Two genotypes were allocated to subplots which included the common wheat cultivar 'Pishgam' and a synthetic wheat derived hexaploid line called R6P1 (already was improved at the University of Kurdistan from crossing between a synthetic wheat line and the commercial common wheat cultivar 'Pishgam'). To evaluate the physiological responses, the content of photosynthetic pigments (including chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids) as well as the activity of key antioxidant enzymes (e.g., peroxidase and superoxide dismutase) were assessed. Additionally, the transcriptional responses of some *COL* family genes were investigated in the genotypes studied.

## Results and Discussion

Transcriptional analysis was conducted on eight members of the *COL* gene family, encompassing three homeologous groups (a, b, and c), all of which containing conserved B-box and CCT domains. Expression of homeologous group a (*TraesCS7D02G131700*, *TraesCS7A02G132100*, *TraesCS7B02G032800*) was significantly down-regulated in both genotypes, suggesting a limited role of *COL* genes in drought stress responses. In contrast, homeologous group b (*TraesCS7A02G263500*, *TraesCS7B02G161500*, *TraesCS7D02G264300*) and homeologous group c (*TraesCS7A02G218600*, *TraesCS7D02G220300*) were strongly up-regulated under drought stress compared with normal conditions. This up-regulation was significantly more pronounced in the artificial line, highlighting the critical role of these specific *COL* genes in promoting accelerated maturation and drought escape mechanisms. The results reveal a synergistic interaction in the synthetic line. the coordinated enhancement of the antioxidant system effectively reduces oxidative stress, while the distinct, stress-responsive expression profile of specific *COL* Homeologous facilitates developmental acceleration. This combination underpins a highly effective strategy for avoiding terminal drought. The results indicate that the preservation of photosynthetic pigments in the synthetic line compared to 'Pishgam' may underlie the superior drought tolerance of this genotype, as chlorophyll degradation is typically associated with reduced photosynthetic efficiency and growth. Elevated activities of antioxidant enzymes, particularly peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), further reflect an adaptive response to drought-induced oxidative stress. Notably, the substantial increase in SOD activity plays a critical role in scavenging reactive oxygen species, thereby limiting cellular damage.

Furthermore, alterations in the expression of *COL* gene family members especially the upregulation of homeologous groups b and c suggest the activation of molecular pathways involved in flowering time regulation and drought response, potentially enhancing the drought escape strategy. Conversely, the downregulation of homeologous group a may indicate a reallocation of energy and resources to improve stress resilience. Collectively, these findings demonstrate that drought tolerance in the synthetic line arises not only from the maintainance of photosynthetic capacity but also involves complex enzymatic and genetic regulatory mechanisms that together contribute to enhanced plant adaptability under environmental stress.

### **Conclusions**

In conclusion, this study provides comprehensive evidence that the terminal drought tolerance of the synthetic hexaploid wheat line is mechanistically linked to its sustained photosynthetic capacity, powerful antioxidant defense system, and a unique, stress-responsive transcriptional regulation of key *COL* gene homeologous. These findings posit the *COL* gene family, particularly homeologous groups b and c, as promising targets for molecular breeding and biotechnological interventions aimed at enhancing drought resilience and yield stability in wheat under changing climatic conditions.

### **Author Contributions**

B.F conducted all laboratory experiments. B.F, Gh.M and A.S contributed to the conceptualization, design, and supervision of the research study. B.F prepared the initial manuscript draft. B.F and Gh.M supported the analysis and interpretation of the data. B.F and Gh.M reviewed and approved the final version of the manuscript.

### **Data Availability Statement**

Data available on request from the authors.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Kordestan University for its technical supports. We are also deeply grateful to the anonymous reviewers for their valuable suggestions in manuscript revision.

### **Ethical Considerations**

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

### **Funding**

No funding was received for this study.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

بررسی صفات فیزیولوژیکی کلیدی و بیان ژن‌های منتخب خانواده *CONSTANS-Like* در شرایط

تنش خشکی انتهایی فصل در دو ژنوتیپ گندم

بنت‌الهدی فرخ‌پوری <sup>ID</sup> | قادر میرزاقادری\* <sup>ID</sup> | عادل سی‌وسه مرده <sup>ID</sup>

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

## اطلاعات مقاله

## چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تنش خشکی انتهایی فصل به دلیل وابستگی به بارندگی بهاره، تولید گندم را محدود می‌کند. خانواده ژنی *CONSTANS-Like (COL)* نقش کلیدی در تنظیم گلدهی از طریق ادغام پیام‌های نوری و ساعت شبانه‌روزی دارد و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نیز مشارکت می‌کند. در این پژوهش پاسخ‌های فیزیولوژیکی و رونویسی هشت عضو خانواده ژنی *COL* در شرایط تنش خشکی انتهایی فصل در بافت برگ پرچم یک لاین سنتتیک گندم، در مقایسه با رقم تجاری پیشگام بررسی شد. آزمایش به صورت اسپلیت پلات در شرایط مزرعه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد که در آن فاکتور اصلی آبیاری و فاکتور فرعی ژنوتیپ بود. نتایج نشان داد که لاین سنتتیک در هر دو شرایط، سطوح بالاتری از رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD) را حفظ کرد. در شرایط نرمال، بیان بالاتر تمامی گروه‌های هومیولوگ در لاین سنتتیک مشاهده شد که با رشد سریع و گلدهی زود هنگام مرتبط بود. در شرایط تنش، یک گروه هومیولوگ در هر دو ژنوتیپ کاهش بیان نشان داد، در حالی که دو گروه دیگر افزایش بیان قابل توجهی داشتند، به ویژه در لاین سنتتیک که نقش احتمالی آن‌ها را در زودرسی و فرار از خشکی نشان می‌دهد؛ از این رو احتمالاً هماهنگی میان دفاع آنتی‌اکسیدانی و بیان خاص ژن‌های *COL*، باعث کاهش تنش اکسیداتیو و تسریع رشد می‌شود. تحمل به خشکی انتهایی فصل در لاین سنتتیک با حفظ ظرفیت فتوسنتزی و الگوی بیان متمایز ژن‌های *COL* مرتبط بوده و این لاین را به کاندیدای مناسبی برای کشت در مناطق با تنش خشکی انتهایی فصل تبدیل می‌کند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

واژگان کلیدی:

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،

تنش خشکی،

رنگدانه‌های فتوسنتزی،

گندم،

لاین سنتتیک،

*CONSTANS-Like*

## مقدمه

(2024). این ژن‌ها به‌عنوان فاکتورهای رونویسی دارای دمین‌های B-box و CCT، علاوه بر نقش کلیدی در زمان‌بندی گلدهی، در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز نقش دارند (Gangappa and Botto, 2014). نوسان بیان ژن‌های خانواده COL متناسب با طول روز، عامل اصلی تنظیم گلدهی در شرایط مختلف نوری است و در روزهای بلند، تجمع COL باعث تسریع گلدهی می‌شود (Suárez-López et al., 2001; Kakizaki et al., 2017).

در شرایط روز بلند، سطح mRNA کدکننده ژن‌های COL در اواخر بعد از ظهر به اوج خود می‌رسد، در حالی که در شرایط روز کوتاه، بیشترین تجمع mRNA کدکننده ژن‌های COL در طول دوره تاریکی رخ می‌دهد (Suárez-López et al., 2001). پروتئین COL در حضور نور تثبیت شده و در تاریکی تجزیه می‌شود که منجر به تجمع آن در طول روزهای بلند و در نتیجه تسریع گلدهی می‌شود. برعکس، کاهش سطح پروتئین COL در شرایط روز کوتاه، گلدهی را به تأخیر می‌اندازد (Kakizaki et al., 2017). با توجه به نقش محوری ماژول CO-FT در تنظیم زمان گلدهی (Gorologia et al., 2017; Shaw et al., 2020)، توصیف جامع الگوهای بیان آن تحت تنش خشکی بسیار مهم است و بینش حاصل از آن می‌تواند مهندسی ژنتیک هدفمند و مداخلات ویرایش ژنوم، از جمله CRISPR/Cas9، را برای تعدیل دقیق بیان ژن و در نتیجه افزایش تحمل به خشکی در ارقام ممتاز گندم تسهیل کند (Wang et al., 2014).

با وجود شناخت گسترده نقش ژن‌های COL در تنظیم زمان گلدهی از طریق پاسخ به فتوپریود، مطالعات اندکی به بررسی دقیق عملکرد این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی انتهای فصل پرداخته‌اند. این مسئله از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا در گندم، مرحله انتهای فصل حساسیت بالایی دارد و تأثیر قابل توجهی بر عملکرد نهایی محصول دارد، ضمن اینکه زودرسی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های فرار از خشکی در برنامه‌های به‌نژادی گندم شناخته می‌شود. همچنین، تنش خشکی انتهای فصل یکی از محدودکننده‌ترین عوامل تولید در

مقاومت به تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های چندژنی است که با تأثیر بر رشد، عملکرد و فرایندهای متابولیکی گیاه، بهره‌وری محصولات کشاورزی را به شدت کاهش می‌دهد (Nezhadahmadi, Waraich et al., 2010). گیاهان برای مقابله با این تنش، مسیرهای سازگاری پیچیده‌ای را در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی فعال می‌کنند (Gehan et al., 2015). در گندم، تنش خشکی انتهای فصل به‌ویژه در مرحله زایشی، از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد است و با کاهش راندمان فتوسنتز و کلروفیل همراه است (Fotovat et al., 2007; Zhang et al., 2018). با این حال، ژنوتیپ‌هایی با توانایی حفظ کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بالاتر مانند SOD، POD و CAT، عملکرد بهتری در شرایط خشکی نشان داده‌اند (Sairam et al., 2005).

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با ساختار آلوپلوئیدی و دارا بودن سه زیرژنوم (AABBDD) از انعطاف‌پذیری ژنتیکی بالایی برخوردار است. گندم یکی از مهم‌ترین غلات و اساسی‌ترین محصول غذایی در سراسر جهان محسوب می‌شود (Seyfollahpour et al., 2024). خویشاوندان وحشی و لاین‌های سنتتیک منابع ارزشمندی از آل‌های جدید برای بهبود تحمل به خشکی هستند (Pont et al., 2019; Mirzaghaderi et al., 2020). تحلیل وراثت‌پذیری خصوصی نشان داده است که تلاقی ارقام بهترین روش به‌نژادی برای بهبود عملکرد دانه، تعداد سنبله در بوته و روز تا سبز شدن است (Pourali et al., 2022).

یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده سازگاری گندم با محیط زمان گلدهی است که به شدت تحت تأثیر پاسخ به فتوپریود قرار دارد. مسیرهای گلدهی فتوپریودی، گذار از رشد رویشی به زایشی را از طریق ادغام سیگنال‌های نوری و ریتم‌های شبانه‌روزی تنظیم می‌کنند (Romero et al., 2024). ژن‌های *CONSTANS-Like (COL)*، به‌عنوان عناصر مرکزی در این مسیر عمل کرده و با فعال‌سازی ژن FT، آغاز گلدهی را تسریع می‌کنند (Romero et al.,

مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران است. از این‌رو، بررسی عملکرد ژن‌های *COL* در این زمینه، به درک بهتر سازوکارهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی مؤثر بر تحمل به خشکی و فرار از آن کمک کرده و مسیر توسعه ارقام مقاوم و زودرس را تسهیل می‌نماید.

بررسی نقش ژن‌های *COL* در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به خشکی انتهای فصل، به‌ویژه در لاین‌های سنتتیک با قابلیت زودرسی برجسته، خلأ مهمی را در دانش فعلی پر می‌کند. این مطالعه می‌تواند علاوه بر افزایش فهم مسیرهای تنظیمی گلدهی تحت شرایط تنش، زمینه‌ساز کاربردهای مهندسی ژنتیک هدفمند و توسعه ارقام گندم مقاوم‌تر به خشکی باشد. هدف پژوهش حاضر، ارزیابی نقش ژن‌های منتخب خانواده *COL* در پاسخ به تنش خشکی انتهای فصل و ارتباط آن‌ها با صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با تحمل به خشکی، با تمرکز ویژه بر برتری لاین سنتتیک در زودرسی نسبت به رقم پیشگام و تبیین نقش این ژن‌ها در سازوکارهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی مرتبط با فرار از خشکی است.

#### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی، کشت و اعمال تنش:** در طول فصل رشد پاییزه سال ۱۴۰۰، یک لاین سنتتیک هگزاپلوئید مشتق شده از گندم به نام R16P1 (که قبلاً در دانشگاه کردستان از تلاقی بین یک لاین گندم سنتتیک و رقم تجاری گندم معمولی «پیشگام» تولید شده بود)، در مقایسه با ارقام تجاری باران و پیشگام، تاریخ ظهور سنبله زودتری به میزان ۱۰ تا ۱۴ روز نشان داد (Mirzaghaderi et al., 2020). برای ارزیابی جامع این لاین سنتتیک زودرس، بذره‌های حاصل از بک‌کراس F4 در تاریخ ۱۵ اسفند ۱۴۰۱ کاشته شدند. این آزمایش به‌صورت اسپلیت‌پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان (۳۵.۲۴۳۳° شمالی، ۴۶.۹۹۰۹° شرقی؛ ارتفاع ۱۴۸۵ متر از سطح دریا) انجام شد. فاکتور اصلی آبیاری شامل دو رژیم آبیاری کامل (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه) با آبیاری هر ۱۰ روز یک‌بار بر اساس

ارزیابی بصری سلامت گیاه (عدم پژمردگی یا پیچ‌خوردگی برگ) و تنش خشکی انتهای فصل که در آن آبیاری به‌صورت دستی از گرده افشانی (Zadoks GS65) تا بلوغ فیزیولوژیکی (Zadoks GS89) قطع شد (Zadoks et al., 1974). فاکتور فرعی شامل دو ژنوتیپ (لاین سنتتیک R6P1 و رقم تجاری پیشگام) بود.

هر کرت آزمایشی به ابعاد ۳ × ۳ متر، با فاصله ۵۰ سانتی‌متر بین کرت‌های اصلی و ۵۰ سانتی‌متر بین کرت‌های فرعی، ۳۰ سانتی‌متر بین ردیف‌ها و ۲۰ سانتی‌متر بین گیاهان درون ردیف‌ها بود. کنترل علف‌های هرز در طول آزمایش به‌صورت دستی انجام شد. برگ‌های پرچم در مرحله خمیری نرم (Zadoks Z83) ۳۰ دقیقه قبل از غروب آفتاب جمع‌آوری شدند تا همزمان با اوج بیان ژن‌های ساعت شبانه‌روزی *COL* و به حداکثر رساندن پایداری فیزیولوژیکی، در نتیجه‌ی به حداقل رساندن تغییرات روزانه در پارامترهای فتوسنتزی، هدایت روزنه‌ای و سطح متابولیت‌ها باشد. همه نمونه‌ها بلافاصله برای تجزیه و تحلیل بعدی در نیتروژن مایع منجمد شدند.

**تعیین غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی:** برای تعیین غلظت کلروفیل (a و b) و کاروتنوئیدها، ۰/۱ گرم از بافت برگ تازه کاملاً آسیاب و در ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد همگن شد. پس از مخلوط کردن اولیه با استفاده از میکسر ورتکس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاصل فیلتر شد و جذب آن‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV/Vis اندازه‌گیری شد. غلظت کلروفیل (a، b و کل) و کاروتنوئید با استفاده از معادلات استاندارد محاسبه و به‌صورت میلی‌گرم در هر گرم وزن تازه بافت برگ ( $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ ) ثبت شد.

**تهیه عصاره برگ و تعیین میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی:** برای تهیه عصاره، ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاه که قبلاً مستقیماً در نیتروژن مایع منجمد شده بود، با دقت آسیاب و در بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار

شرکت سازنده با *DNase I* بدون RNase (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) تیمار شد. برای تأیید عدم وجود آلودگی DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تمام الگوهای RNA قبل از سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای Ubiquitin (شماره دسترسی: G160709-004) با PCR تأیید شدند. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Kia Gene Fan Avar (کیا ژن، ایران) با پرایمرهای الیگو (dT) و مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده انجام شد. طراحی آغازگر: گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum*) شامل سه زیرژنوم هومولوگ (A، B و D) است که شباهت توالی بالایی (بیشتر از ۹۵ درصد) و توزیع ژنی هم‌خطی را نشان می‌دهند (Krasileva et al., 2013). از آنجایی که خانواده ژنی *COL* شامل رونوشت‌های هومولوگ در هر سه زیرژنوم با شباهت توالی بیش از ۹۵ درصد است، آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که نواحی اگزون حفاظت‌شده مشترک در هر گروه هومولوگ را هدف قرار دهند. در نهایت سه جفت آغازگر برای تکثیر هشت ژن از رونوشت‌های خانواده *COL* که نشان‌دهنده سه گروه هومولوگ هستند، توسعه داده شدند.

توالی‌های ژنی از پایگاه داده NCBI بازبازی شدند و تجزیه و تحلیل معماری دمین با استفاده از Inter Pro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) وجود یک یا دو دمین B-Box را به همراه یک دمین CCT در تمام توالی‌ها تأیید کرد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3Plus طراحی و اختصاصی بودن آن‌ها توسط Primer-BLAST (NCBI) تأیید شد. توالی‌های آغازگر در جدول ۱ فهرست شده‌اند.

**ترکیب مخلوط واکنش PCR و شرایط چرخه حرارتی:** واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، حاوی ۱۰ میکرولیتر 2XTag Master Mix WLD، ۱ میکرولیتر آغازگر مستقیم و ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر الگوی cDNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر (معادل مجموع ۵۰ نانوگرم cDNA در هر واکنش) و ۳ میکرولیتر آب بدون

(pH = ۷) در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد همگن شد. سوسپانسیون سلولی هموژنیزه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاصل برای تعیین مقدار پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم جمع‌آوری شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) با مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره با ۱ میلی‌لیتر معرف Bradford تعیین شد و پس از ۲۰ دقیقه، جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت پراکسیداز (POD) طبق روش قناعتی و همکاران (Ghanati et al., 2002) به صورت فتوشیمیایی با نظارت بر تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، در حالی که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش کک مک و هورست (Cakmak and Horst, 1991) با ثبت جذب نوری در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفومتر سنجیده شد. فعالیت‌های ویژه POD و SOD به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین ( $\Delta \text{Abs min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ) طبق روش دیبالی و همکاران (Djébali et al., 2011) اندازه‌گیری شدند.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** بلافاصله پس از برداشت، نمونه‌های بافت برگ پرچم برای حفظ یکپارچگی RNA در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان پردازش بیشتر در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA کل با استفاده از روش SDS-LiCl همان‌طور که توسط وناپوسا و همکاران شرح داده شده است (Vennapusa et al., 2020) از بافت برگ پرچم در مرحله خمیری نرم (Zadoks Z83) استخراج شد. یکپارچگی RNA با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ارزیابی شد. وجود باندهای ۲۸S و ۱۸S rRNA مشخص، RNA با کیفیت بالا را نشان داد. غلظت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتر نانودراپ (بایوکروم، انگلستان) تعیین شد. نمونه‌هایی با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۹ و ۲/۱ و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ بین ۲/۰ و ۲/۲ قابل قبول در نظر گرفته شدند. برای حذف آلودگی DNA ژنومی، ۱ میکروگرم از RNA کل طبق شیوه‌نامه

نوکلئاز انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه بود که هر کدام شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای اتصال بهینه (Ta) به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد تا سنتز کامل محصولات PCR تضمین شود. شرایط **qRT-PCR**: تمام آزمایش‌های qPCR (Quantitative Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) مطابق با شیوه‌نامه‌های MIQE (Bustin, 2009) انجام شد. واکنش qPCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ پیکومول در میکرولیتر از هر آغازگر (جدول ۲) و ۱۰ میکرولیتر SYBR™ Green Master Mix (Parstous Scientific, Iran) با استفاده از دستگاه StepOne™ (Thermo Fisher Scientific) انجام شد. پروتکل چرخه حرارتی با فعال‌سازی پلیمرز در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه آغاز شد و پس از آن ۴۰ چرخه تکثیر انجام شد. هر چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دماهای بهینه شده مخصوص آغازگر (مطابق جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از چرخه‌های تکثیر، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در پایان پروتکل، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب با افزایش تدریجی دما از ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا ویژگی اختصاصیت تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرد. دو تکرار زیستی مستقل و دو تکرار فنی برای هر نمونه در نظر گرفته شد. علاوه بر این، کنترل‌های بدون الگو (NTCs) در تمام اجراهای qPCR گنجانده شدند که تکثیر غیرقابل تشخیص (un detect) را برای همه واکنش‌ها نشان دادند. جفت آغازگرها به‌طور دقیق اعتبارسنجی شدند تا عملکرد قوی تضمین شود و معیارهای زیر را برآورده کنند: کارایی

تکثیر در واکنش‌ها بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد بود، تجزیه و تحلیل منحنی استاندارد با استفاده از سریال رقت، ضرایب همبستگی ( $R^2$ ) بزرگتر از ۰/۹۸ را نشان داد. همچنین اختصاصیت آمپلیکون توسط منحنی‌های ذوب تک پیک تأیید شد. این کنترل‌ها در کنار هم، قابلیت اطمینان و اختصاصیت داده‌های qPCR را تضمین کردند. برای نرمال‌سازی داده‌های بیان، از ژن اکتین (GenBank: AB181991) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Dudziak *et al.*, 2020). تجزیه و تحلیل آماری مقادیر Ct اکتین، بیان بسیار پایداری را در تمام شرایط آزمایش نشان داد (میانگین  $0.23 \pm 27/45 = Ct$ ; محدوده: ۲۷/۰۳-۲۷/۸۸)، با حداکثر تنوع بین گروهی تنها ۰/۸۵ چرخه، که بسیار کمتر از آستانه ۱/۵ چرخه توصیه شده برای پایداری ژن مرجع است (Bustin, 2009). پایداری بیان اکتین، همراه با اعتبارسنجی دقیق آغازگرها و کنترل‌ها، استحکام سنجش qPCR ما را برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بیان ژن در گندم تأیید می‌کند. فهرست آغازگرها به همراه دمای اتصال آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

**تحلیل آماری:** تمام داده‌ها، شامل پروفایل‌های بیان ژن و صفات فیزیولوژیکی، از آزمایش‌های انجام شده در قالب طرح اسپلیت‌پلات بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی جمع‌آوری شدند. آزمون نرمال بودن توزیع باقی‌مانده‌ها و بررسی خطاهای آزمایشی انجام شده و نتایج نشان‌دهنده صحت فرضیات آماری برای تحلیل واریانس بوده است. داده‌های بیان ژن در محیط نرم‌افزار R با استفاده از بسته rtPCR (Mirzaghaderi, 2025) به روش  $\Delta\Delta Ct$  (Livak and Schmittgen., 2001) تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های فیزیولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) قرار گرفتند و آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) برای مقایسه میانگین‌ها و شناسایی تفاوت‌های آماری معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها و تیمارها اعمال شد. نمودارهای مربوط به نتایج فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی با استفاده از بسته ggplot2 در R ایجاد شدند.

جدول ۱- اسامی، گروه هومیولوگ، توالی آغازگرهای طراحی شده، دمای اتصال و طول قطعه تکثیری برای بررسی بیان ژن‌های COL  
Table 1. Names, homeologous groups, sequences of designed primers, annealing temperatures, and lengths of amplified fragments for the analysis of COLs gene expression.

شناسه	گروه	توالی	دمای اتصال	طول قطعه تکثیر
ژن	هومولوگ	آغازگر	(سانتی‌گراد)	(جفت‌باز)
Gene ID	Homeologous group	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product length (bp)
TraesCS7D02G131700 TraesCS7A02G132100 TraesCS7B02G032800	a	CAGGATCAAGGGCCGCTTC TGTTGTCGGAGAAGGAGAGC	64	110
TraesCS7A02G263500 TraesCS7B02G161500 TraesCS7D02G264300	b	GGTGATCAAACAATCGTCCCG CTCTTCTCTTTGTACCGCTGC	60	110
TraesCS7A02G218600 TraesCS7D02G220300	c	ACGACAGCTAAGTATACGCCA GCCAGCATCATCAAAGAGTTCC	58	156
ACTIN		GGAGAAGCTCGCTTACGTG GGGCACCTGAACCTTTCTGA	55	135
Ta Ubiquitin		GCACCTTGGCGGACTACAACATTC GACACCGAAGACGAGACTTGTGAACC	58	131

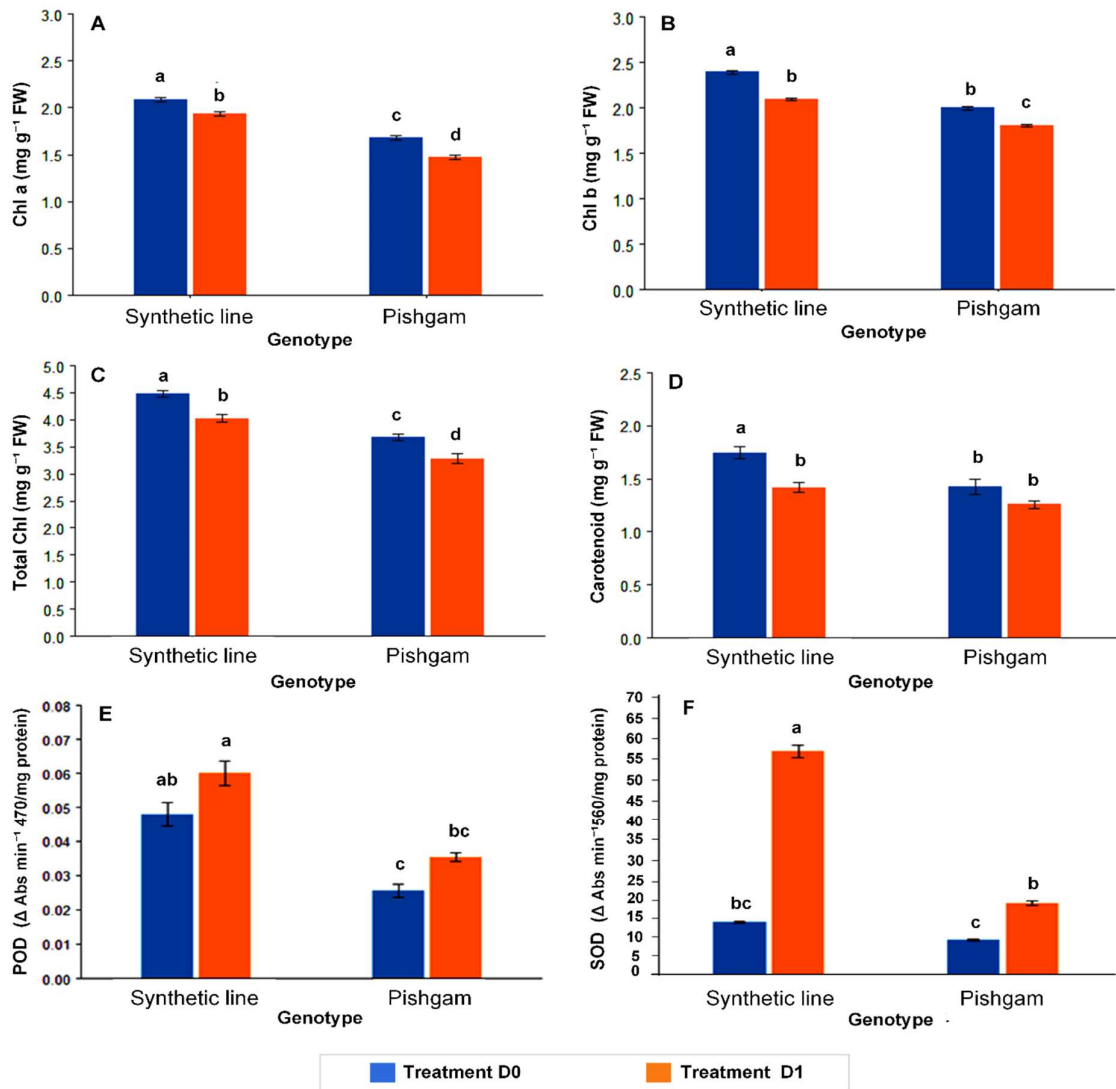
## نتایج و بحث

**تجزیه و تحلیل صفات فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی:** نتایج تجزیه واریانس محتوای کلروفیل (a, b و کل) و کاروتنوئید برگ پرچم، اختلاف معنی‌داری بین تکرارها نشان داد که حاکی از کنترل مناسب شرایط آزمایش بود. همچنین اثر متقابل تکرار × تنش غیرمعنی‌دار بود که نشان می‌دهد اعمال تنش در تمامی تکرارها یکنواخت بوده و اختلافی در واکنش بلوک‌ها به تیمار تنش وجود نداشته است. بین لاین سنتتیک و رقم پیشگام از نظر محتوای کلروفیل (a, b و کل) و کاروتنوئید برگ پرچم اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/01$ ). همچنین اثر تنش خشکی بر کلیه صفات ذکر شده معنی‌دار بود که بیانگر تاثیر قوی تنش بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌ها بود. اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی در همه صفات ذکر شده غیرمعنی‌دار بود، که نشان می‌دهد واکنش این رنگدانه به کمبود آب وابسته به ژنوتیپ نیست (جدول ۲). مقایسه میانگین به روش LSD در شرایط نرمال نشان داد که غلظت کلروفیل a در لاین سنتتیک (۲/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در مقایسه با پیشگام (۱/۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) به طور معنی‌داری بالاتر بود. تحت تنش خشکی انتهای فصل، هر دو ژنوتیپ کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل a تجربه کردند. با این حال، لاین سنتتیک سطح بالاتری را نسبت به پیشگام حفظ کرد که نشان دهنده تحمل بیشتر به تخریب ناشی از خشکی این رنگدانه است (شکل ۱ A).

به‌طور مشابه، در شرایط عادی، سطح کلروفیل b در لاین سنتتیک (۲/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) به‌طور معنی‌داری بالاتر از پیشگام (۲/۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود. هر دو ژنوتیپ تحت تنش خشکی انتهای فصل، کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل b نشان دادند، با این حال لاین سنتتیک به‌طور مداوم رنگدانه بیشتری نسبت به پیشگام حفظ کرد و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار باقی ماند (شکل ۱ B). محتوای کلروفیل کل نیز از همین روند پیروی کرد. در شرایط عادی، غلظت کلروفیل کل در لاین سنتتیک (۴/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود که به‌طور معنی‌داری بالاتر از پیشگام (۴/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود. اگرچه محتوای کلروفیل کل در هر دو ژنوتیپ تحت تنش خشکی انتهای فصل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، لاین سنتتیک همچنان غلظت کلروفیل کل بیشتری نسبت به رقم پیشگام نشان داد (شکل ۱ C). غلظت کاروتنوئید در شرایط عادی در لاین سنتتیک (۱/۷۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) به‌طور معنی‌داری بالاتر از پیشگام (۱/۴۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود. در هر دو ژنوتیپ تحت تنش خشکی انتهای فصل سطح کاروتنوئید کاهش یافت و کاهش در سطح کاروتنوئید فقط در لاین سنتتیک معنی‌دار بود. در شرایط تنش نیز، بین ژنوتیپ‌ها از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دیده شد (شکل ۱ D). این نتایج شواهدی از ظرفیت برتر حفظ رنگدانه لاین سنتتیک در شرایط محدودیت آب ارائه می‌دهد.

این آنزیم‌ها بین دو ژنوتیپ و همچنین بین شرایط نرمال و تنش خشکی انتهایی فصل، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد. اثر متقابل ژنوتیپ × تنش برای فعالیت آنزیم SOD در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود، با این حال اثر متقابل ژنوتیپ × تنش برای فعالیت آنزیم POD از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲).

تجزیه واریانس برای فعالیت آنزیم‌های POD و SOD تفاوت‌های معنی‌داری را بین تکرارها نشان نداد. همچنین اثر متقابل تکرار × تنش غیرمعنی‌دار بود که نشان می‌دهد اعمال تنش در تمامی تکرارها یکنواخت بوده و اختلافی در واکنش بلوک‌ها به تیمار تنش وجود نداشته است. نتایج تجزیه واریانس فعالیت



شکل ۱- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی: (A) کلروفیل a (Chl a)، (B) کلروفیل b (Chl b)، (C) کلروفیل کل (Total Chl)، (D) کاروتنوئیدها، (E) پراکسیداز (POD) و (F) سوپراکسید دیسموتاز (SOD). Synthetic line: لاین سنتتیک، Pishgam: پیشگام، D0: شرایط نرمال، D1: شرایط تنش،  $\Delta \text{Abs min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ : تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین،  $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ : میلی‌گرم در هر گرم وزن تازه بافت برگ

Figure 1. Comparison of mean physiological-biochemical traits: (A) chlorophyll a (Chl a), (B) chlorophyll b (Chl b), (C) total chlorophyll (Total Chl), (D) carotenoids, (E) peroxidase (POD) and (F) superoxide dismutase (SOD). Synthetic line: synthetic line, Pishgam: pioneer, D0: normal conditions, D1: stress conditions,  $\Delta \text{Abs min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ : change in absorbance per minute per milligram of protein,  $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ : milligrams per gram of fresh weight of leaf tissue.

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی صفات مورد مطالعه در لاین سنتتیک و رقم پیشگام گندم تحت شرایط تنش خشکی انتهای فصل

Table 2. Analysis of variance of some studied traits in the synthetic line of wheat pioneer variety under late season drought stress conditions

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده The mean square of the measured traits					
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	پراکسیداز POD	سوپراکسید دیسموتاز SOD
تکرار Rep	2	0.0012 <sup>ns</sup>	0.0041 <sup>ns</sup>	0.0051 <sup>ns</sup>	0.0015 <sup>ns</sup>	0.00001 <sup>ns</sup>	0.965 <sup>ns</sup>
تنش Stress	1	0.5618 <sup>**</sup>	0.3513 <sup>**</sup>	1.8018 <sup>**</sup>	0.1768 <sup>**</sup>	0.0016 <sup>**</sup>	1622 <sup>**</sup>
تنش × تکرار Rep × Stress	2	0.0028	0.0014	0.0079	0.0052	0.00007	4.548
ژنوتیپ Genotype	1	0.0923 <sup>**</sup>	0.1821 <sup>**</sup>	0.5340 <sup>**</sup>	0.1819 <sup>**</sup>	0.00036 <sup>**</sup>	2410 <sup>**</sup>
ژنوتیپ × تنش Genotype × Stress	1	0.0022 <sup>ns</sup>	0.0087 <sup>ns</sup>	0.0021 <sup>ns</sup>	0.0193 <sup>ns</sup>	0.000004 <sup>ns</sup>	1010 <sup>**</sup>
خطا Error	4	0.0012	0.0006	0.0030	0.0023	0.000001	1.949

<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup> و <sup>\*</sup>: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup> and <sup>\*</sup>: Non-significant and significant at 5 and 1 % probability levels, respectively.

غیرمعنی دار بود. تجزیه واریانس سطوح بیان ژن‌های گروه هومبولگ a نشان داد که بین شرایط تنش خشکی انتهای فصل و شرایط نرمال تفاوت‌های آماری معنی داری وجود ندارد. اثرات ژنوتیپ در این گروه هومبولگ از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی دار بود و اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی در این گروه هومبولگ از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۳).

سطح بیان نسبی ژن‌های گروه هومبولگ a در شرایط تنش خشکی انتهای فصل نسبت به شرایط کنترل نشان داد که بیان این ژن‌ها به‌طور معناداری در هر دو ژنوتیپ کاهش یافته است؛ به گونه‌ای که در ژنوتیپ پیشگام مقدار بیان به ۰/۲۶ و در لاین سنتتیک به ۰/۲۹ کاهش یافته است. این کاهش معادل به ترتیب ۷۴ درصد و ۷۱ درصد کاهش بیان نسبت به شرایط نرمال می‌باشد که بیانگر سرکوب قوی و کارآمد این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی است. الگوی بیان مشاهده شده حاکی از این است که این ژن‌ها ممکن است در مرحله اولیه گلدهی در لاین سنتتیک تحت شرایط رشد بهینه فعال بوده، اما به تنش خشکی حساسیت بالایی نشان می‌دهند؛ موضوعی که می‌تواند دلالت بر نقش محدود آن‌ها در مقاومت به خشکی یا مکانیسم‌های فرار از خشکی در مراحل انتهایی رشد داشته باشد. کاهش چشمگیر بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی احتمالاً نقش مهمی در تنظیم زمان‌بندی گلدهی و پاسخ به نشانه‌های محیطی ایفا می‌کند.

فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی POD در شرایط عادی در لاین سنتتیک ۰/۰۴۷ و در ژنوتیپ پیشگام ۰/۰۲۵ بود که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود. تنش خشکی انتهای فصل فعالیت POD را در هر دو ژنوتیپ افزایش داد ولی این افزایش فعالیت در هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها معنی دار نبود؛ با این حال، لاین سنتتیک فعالیت POD بالاتری را در مقایسه با ژنوتیپ پیشگام در شرایط تنش حفظ کرد (شکل ۱ E).

فعالیت آنزیم SOD در شرایط عادی در لاین سنتتیک ۱۴/۳۵ و در ژنوتیپ پیشگام ۹/۴۴ بود که این تفاوت از نظر آماری معنی داری نبود. تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم در هر دو ژنوتیپ در مقایسه با شرایط عادی به‌طور معنی داری افزایش یافت. با این حال، این افزایش در لاین سنتتیک به‌طور قابل توجهی بیشتر بود و به ۶۱/۰۵ رسید، در حالی که در ژنوتیپ پیشگام تنها به ۱۹/۴۴ افزایش یافت. بنابراین، فعالیت SOD تحت تنش خشکی انتهای فصل در لاین سنتتیک به‌طور قابل توجهی بیشتر از ژنوتیپ پیشگام بود (شکل ۱ F).

تجزیه و تحلیل بیان برخی از ژن‌های خانواده COL: تجزیه واریانس  $\Delta Ct$  سطوح بیان ژن‌های رونویسی گروه هومبولگ a شامل *TraesCS7A02G132100*، *TraesCS7D02G131700* و *TraesCS7B02G032800* در بافت برگ پرچم، اختلاف معنی داری بین تکرارها نشان نداد که حاکی از کنترل مناسب شرایط آزمایش بود. همچنین اثر متقابل تکرار × تنش نیز

جدول ۳- تجزیه واریانس سطوح بیان برخی از ژن‌های خانواده COL در لاین سنتتیک و رقم پیشگام گندم تحت شرایط تنش خشکی انتهای فصل

Table 3. Analysis of variance of expression levels of some COL family genes in synthetic lines and Pishgam wheat cultivar under late season drought stress conditions.

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square		
		<i>TraesCS7D02G131700</i> <i>TraesCS7A02G132100</i> <i>TraesCS7B02G032800</i>	<i>TraesCS7A02G263500</i> <i>TraesCS7B02G161500</i> <i>TraesCS7D02G264300</i>	<i>TraesCS7A02G218600</i> <i>TraesCS7D02G220300</i>
تکرار Rep	1	0.0008 <sup>ns</sup>	0.00087 <sup>ns</sup>	0.0044 <sup>ns</sup>
تنش Stress	1	0.4596 <sup>ns</sup>	4.9645 <sup>*</sup>	4.6353 <sup>**</sup>
تنش × تکرار Stress × Rep	1	0.0775	0.0777	0.0171
ژنوتیپ Genotype	1	7.034 <sup>*</sup>	7.3434 <sup>*</sup>	4.813 <sup>**</sup>
ژنوتیپ × تنش Genotype × Stress	1	0.0125 <sup>ns</sup>	0.177 <sup>ns</sup>	0.0576 <sup>ns</sup>
خطا Error	2	0.1219	0.0768	0.0032

<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup> و <sup>\*</sup>: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup> and <sup>\*</sup>: Non-significant and significant at 5 and 1 % probability levels, respectively.

سطح بیان نسبی ژن‌های گروه هومبولگ b تحت شرایط کنترل و تنش خشکی در دو ژنوتیپ گندم پیشگام و لاین سنتتیک نشان داد که در شرایط تنش خشکی، لاین سنتتیک گندم افزایش معنی داری در بیان ژن‌های مذکور نشان داد، به طوری که میزان بیان به ۶/۶۴ برابر نسبت به شرایط کنترل رسید (p < ۰/۰۵). به طور مشابه، در ژنوتیپ پیشگام نیز بیان این ژن‌ها به طور معنی داری افزایش یافت و حدود ۳/۰۸ برابر بیشتر از شرایط آبیاری مناسب بود (p < ۰/۰۵). این افزایش بیان، فعال‌سازی مسیرهای مولکولی مرتبط با این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ را تأیید می‌کند.

علاوه بر این، اختلاف معنی داری در سطح بیان این ژن‌ها بین لاین سنتتیک و ژنوتیپ پیشگام تحت تنش خشکی مشاهده شد (شکل ۲ B: p < ۰/۰۱). بیان بالاتر این ژن‌ها در لاین سنتتیک می‌تواند بیانگر ظرفیت بیشتر این ژنوتیپ در تنظیم پاسخ‌های مولکولی مرتبط با تنش خشکی باشد که ممکن است منجر به تحمل یا سازگاری بیشتر آن با شرایط خشکی شود.

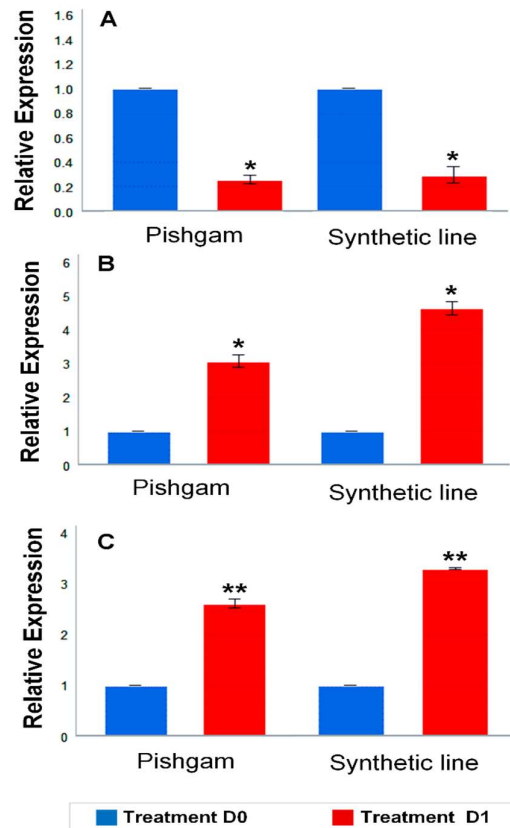
کاهش معنادار بیان ژن‌های گروه هومبولگ a می‌تواند نشان‌دهنده سازوکاری تطبیقی باشد که گیاه برای بهینه‌سازی مصرف منابع انرژی و مواد ساختمانی خود در شرایط تنش خشکی اتخاذ می‌کند. از سوی دیگر، این ژن‌ها ممکن است نقش مهمی در فرآیندهای رشد و توسعه نرمال گیاه داشته باشند که کاهش بیان آن‌ها منجر به مهار رشد یا تأخیر در فرآیندهای فیزیولوژیک می‌شود (شکل A۲).

تجزیه واریانس  $\Delta Ct$  سطوح بیان ژن‌های رونویسی گروه هومبولگ b شامل *TraesCS7B02G161500*، *TraesCS7A02G263500* و *TraesCS7D02G264300* در بافت برگ پرچم، بین تکرارها و همچنین بین اثر متقابل تکرار × تنش تفاوت معنی داری نشان نداد. تجزیه واریانس بیان ژن‌های رونویسی گروه هومبولگ b نشان داد که هر دو عامل ژنوتیپ و تیمار (تنش خشکی در مقایسه با شرایط آبیاری مطلوب) تأثیر معنی داری بر میزان بیان این ژن‌ها داشتند (p < ۰/۰۵). با این حال، اثر متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی از نظر آماری معنی دار نبود، که بیانگر پاسخ مشابه دو ژنوتیپ به تنش از نظر روند تغییر بیان است، اگرچه شدت آن متفاوت می‌باشد.

افزایش قابل توجه بیان ژن‌های گروه هومیولوگ b در لاین سنتتیک تحت تنش خشکی انتهایی فصل، به‌ویژه در مقایسه با ژنوتیپ پیشگام، نقش بالقوه این ژن‌ها را در تسریع فرآیند گلدهی و بروز مکانیسم‌های فرار از خشکی یا مقاومت به تنش خشکی به‌وضوح نشان می‌دهد. این نتایج با مطالعات ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2022) هم‌راستا است که در آن، خانواده ژنی *COL* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی فرآیند بهاره‌سازی و عناصر کلیدی در تنظیم زمان گلدهی در گندم شناسایی شده‌اند.

تجزیه واریانس مربوط به گروه هومیولوگ c، شامل ژن‌های *TraesCS7A02G218600* و *TraesCS7D02G220300* در بافت برگ پرچم، بین تکرارها و همچنین بین اثر متقابل تکرار × تنش تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تجزیه واریانس مربوط به این گروه هومیولوگ تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین ژنوتیپ‌ها و تیمارها را در سطح احتمال ۱ درصد (۰/۰۱) نشان داد (جدول ۳). با این وجود، اثر متقابل ژنوتیپ × تیمار معنی‌دار نبود که بیانگر پاسخ مشابه این دو ژنوتیپ به تنش خشکی از نظر الگوی بیان ژن‌های این گروه است. در این راستا، سطح بیان نسبی این ژن‌ها تحت شرایط کنترل و تنش خشکی در دو ژنوتیپ گندم پیشگام و لاین سنتتیک مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲ C). نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های گروه هومیولوگ c در هر دو ژنوتیپ گردید. بیان ژن‌ها در لاین سنتتیک به میزان ۳/۳۰ برابر و در پیشگام به میزان ۲/۶۱ برابر افزایش یافت که هر دو افزایش در سطح احتمال ۱ درصد (۰/۰۱) معنی‌دار بودند.

با توجه به این‌که ژن‌های *TraesCS7A02G218600* و *TraesCS7D02G220300* ارتولوگ ژن *COL9* در *Arabidopsis thaliana* بوده که نقش کلیدی در تنظیم زمان گلدهی و فرآیندهای مرتبط با زودرسی دارد، افزایش بالاتر بیان این ژن‌ها در لاین سنتتیک می‌تواند بیانگر فعالیت بیشتر مسیرهای تنظیمی مرتبط با زودرسی و مکانیسم‌های فرار از خشکی باشد. این یافته‌ها با مطالعات پیشین در گونه‌های دیگر که نقش تطبیقی و حفاظتی ژن‌های *COL9* را در



شکل ۲- میزان بیان گروه‌های هومیولوگ در بافت برگ پرچم گندم در مرحله خمیری نرم (Zadoks Z83). A: گروه هومیولوگ a (سه ژن ترنسکرپت از سه زیر ژنوم گندم)؛ B: گروه هومیولوگ b (سه ژن ترنسکرپت از سه زیر ژنوم گندم) و C: گروه هومیولوگ c (دو ژن ترنسکرپت از دو زیر ژنوم گندم)؛ D0: شرایط نرمال؛ D1: شرایط اعمال تنش خشکی، Pishgam: رقم پیشگام، Synthetic Line: لاین سنتتیک؛ \*: مقدار بیان نسبی نمونه‌ها در شرایط D1 نسبت به شرایط D0 در هر ژنوتیپ در سطح آماری ۵ درصد و \*\*: مقدار بیان نسبی نمونه‌ها در شرایط D1 نسبت به شرایط D0 در هر ژنوتیپ در سطح آماری ۱ درصد.

Figure 2. Expression levels of homeologous groups in wheat flag leaf tissue at the soft pulp stage (Zadoks Z83). A: Homeologous group a (three genes transcribed from three wheat subgenomes), B: Homologous group b (three genes transcribed from three wheat subgenomes), and C: Homeologous group c (two genes transcribed from two wheat subgenomes). D0: Normal condition, D1: Drought stress condition, Pishgam: Pishgam variety, Synthetic Line: Synthetic line, \*: Relative expression level of samples in D1 condition compared to D0 condition in each genotype at a statistical level of 5% and \*\*: Relative expression level of samples in D1 condition compared to D0 condition in each genotype at a statistical level of 1%.

افزایش تحمل به خشکی از طریق تعامل با پروتئین‌های مرتبط با تنش برجسته می‌کند، همسو است (Chen *et al.*, 2022).

در مجموع، نتایج این مطالعه، خانواده ژن COL را به‌عنوان اهداف مولکولی امیدوارکننده برای برنامه‌های اصلاحی مولکولی و مهندسی ژنتیک به منظور افزایش مقاومت به خشکی و بهبود پایداری عملکرد در گندم معرفی می‌کند. تغییرات اقلیمی و شرایط آب و هوایی متغیر، از جمله دوره‌های گرمای شدید و تنش خشکی انتهای فصل، چالش‌های قابل توجهی در زمینه امنیت زراعی و غذایی برای تولید پایدار گندم ایجاد می‌کنند. در این راستا، لاین سنتتیک به‌عنوان یک رهیافت مؤثر و عملی برای کاهش تنش خشکی انتهای فصل شناخته می‌شود. لاین سنتتیک دارای چرخه زندگی کوتاه‌تری بوده و فنولوژی گیاه را اصلاح می‌کند و در نتیجه همپوشانی بین مراحل حیاتی رشد، مانند پر شدن دانه و دوره‌های اوج تنش خشکی را به حداقل می‌رساند. این مکانیسم سازگاری، پایداری عملکرد را حتی در شرایط نامساعد آب و هوایی افزایش می‌دهد و به‌عنوان یک استراتژی تاب‌آوری موفق در برابر شرایط نامساعد آب و هوایی شناخته شده است (Singh *et al.*, 2024). بنابراین، روشن کردن اساس ژنتیکی پاسخ‌های زودرسی و تنش خشکی، به‌ویژه در مراحل حیاتی رشد مانند پر شدن دانه، برای توسعه گونه‌های گندم با تاب‌آوری و پایداری عملکرد بهبود یافته در شرایط تغییر اقلیم ضروری است.

تجزیه و تحلیل‌های فیزیولوژیکی نشان داد که لاین سنتتیک استفاده شده در مطالعه حاضر در مقایسه با ژنوتیپ پیشگام در شرایط نرمال، غلظت کلروفیل (a, b و کلروفیل کل) و کاروتنوئیدها را به‌طور قابل توجهی بالاتر داشت. علاوه بر این، تحت تنش خشکی (شکل ۱ A - D)، این ژنوتیپ توانست سطح رنگدانه‌ها را مؤثرتر از پیشگام حفظ کند. محتوای بالای رنگدانه‌ها نشان‌دهنده افزایش راندمان فتوسنتزی است که نه تنها تأمین مداوم انرژی و کربن برای تشکیل دانه را تضمین می‌کند، بلکه به کاهش آسیب

اکسیداتیو نیز کمک می‌کند و در نتیجه از عملکرد بالاتر در شرایط تنش پشتیبانی می‌کند. کاهش شدید رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی به آسیب ساختاری و عملکردی مولکول‌های کلروفیل و پروتئین‌های مرتبط نسبت داده شده است که منجر به کاهش جذب نور و اختلال در تبدیل انرژی می‌شود، این‌ها عواملی هستند که در نهایت عملکرد را محدود می‌کنند (Fotovat *et al.*, 2011; Ahmad and Prasad, 2007). بنابراین، توانایی برتر لاین سنتتیک در حفظ این رنگدانه‌ها، یک مزیت فیزیولوژیکی در شرایط تنش خشکی ایجاد می‌کند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی POD و SOD در لاین سنتتیک (شکل‌های ۱ E و ۱ F، در شرایط نرمال) در مقایسه با ژنوتیپ پیشگام بیشتر بود. تحت تنش خشکی انتهای فصل، فعالیت هر دو آنزیم در هر دو ژنوتیپ نسبت به شرایط عادی افزایش یافت؛ با این حال، این افزایش در لاین سنتتیک به‌طور قابل توجهی بیشتر بود. نکته قابل توجه این است که فعالیت SOD در لاین سنتتیک تحت تنش خشکی بیش از سه برابر بیشتر از ژنوتیپ پیشگام بود. ظرفیت افزایش یافته لاین سنتتیک برای فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند POD و SOD، توانایی آن را در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی، تأیید می‌کند. افزایش قابل توجه این آنزیم‌ها تحت تنش به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی کلیدی شناخته می‌شود که اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش می‌دهد و یکپارچگی سلولی را حفظ می‌کند (Ahmad *et al.*, 2018). این پاسخ آنزیمی احتمالاً نقش مهمی در حفظ سلامت سلولی و حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی ضروری در شرایط تنش خشکی دارد.

اگرچه زودرسی می‌تواند به‌دلیل کاهش مدت فتوسنتز و تجمع مواد مغذی، عملکرد نهایی را محدود کند (Singh *et al.*, 2024)، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که لاین سنتتیک، با حفظ عملکرد فتوسنتزی و افزایش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی، به‌طور مؤثر این محدودیت‌ها را کاهش داده است؛ بنابراین، به‌عنوان یک کاندیدای امیدوارکننده برای

شرایط آب و هوایی به‌طور فزاینده متغیر، به‌طور قابل-توجهی بهبود بخشد.

یافته‌های این مطالعه نقش حیاتی خانواده ژن *COL* را در تنظیم پاسخ‌های زودرسی و تحمل به تنش خشکی در گندم برجسته می‌کند و پتانسیل بالای این ژن‌ها را به‌عنوان اهداف کلیدی در برنامه‌های اصلاح نژادی مدرن نشان می‌دهد. به‌ویژه، افزایش بیان ژن‌های گروه هومولوگ *b* و *c* در لاین سنتتیک، که با بهبود عملکرد فتوسنتزی و فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه است، می‌تواند به توسعه ارقام گندم مقاوم‌تر در برابر خشکی منجر شود. این نتایج با مطالعات اخیر مانند مطالعات ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2022) و چن و همکاران (Chen *et al.*, 2022) همسو بوده و اهمیت تنظیم زمان گلدهی و مکانیسم‌های فرار از خشکی را در بهبود تاب‌آوری گندم در برابر تنش‌های غیرزیستی تأیید می‌کند؛ بنابراین، ادغام این یافته‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی می‌تواند منجر به تولید ارقام با چرخه زندگی کوتاه‌تر و تحمل بالاتر به تنش‌های آب و هوایی شود، که از اهمیت ویژه‌ای در شرایط تغییرات اقلیمی و نیاز به امنیت غذایی پایدار برخوردار است.

بر اساس نتایج این مطالعه، لاین سنتتیک به‌عنوان کاندیدای برتر برای سیستم‌های کشت در مناطقی با آب و هوای ناپایدار و خطر بالای تنش خشکی انتهای فصل شناسایی شده است. با توجه به عملکرد امیدوارکننده این لاین سنتتیک در شرایط تنش خشکی، تحقیقات آینده باید بر روشن کردن مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی زودرسی و تحمل به خشکی، به‌ویژه مسیرهای مرتبط با خانواده ژن *COL*، متمرکز شود. علاوه بر این، ارزیابی صفات مورفولوژیکی مهم برای برداشت مکانیزه، مانند ارتفاع گیاه و استحکام ساقه، در کنار پارامترهای کیفیت دانه، از جمله خواص پخت، ضروری خواهد بود. آزمایش‌های چندمکانی و گنجاندن این ژنوتیپ در برنامه‌های به‌نژادی، توسعه ارقام مقاوم، پرمحصول و باکیفیت سازگار با شرایط محیطی متغیر را تسهیل می‌کند.

کشت در مناطقی که دچار تنش خشکی انتهای فصل هستند، ظاهر می‌شود.

نقش عملکردی ژن‌های *COL* بسیار انعطاف‌پذیر و وابسته به فتوپریود است. در گیاهان روز بلند مانند *Arabidopsis thaliana* و گندم، محصول ژن‌های *COL* باعث فعال شدن ژن *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) می‌شود و با افزایش بیان *FT*، گلدهی را در شرایط روز بلند تقویت می‌کند. در مقابل، در گیاهان روز کوتاه مانند برنج، *COL* به‌عنوان یک مهارکننده گلدهی در شرایط روز بلند عمل می‌کند و گلدهی در شرایط روز کوتاه القا می‌شود (Hayama *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2015). این نقش‌های متضاد، پیچیدگی و سازگاری شبکه تنظیم ژن *COL* را در گونه‌های متنوع و زمینه‌های اکولوژیکی برجسته می‌کند. با توجه به نقش حیاتی شرایط نوری در تنظیم فعالیت ژن‌های *COL* که ارتباط نزدیکی با سیستم فتوپریودی گیاه دارند، مطالعات دقیق بیان آن‌ها تحت تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مختلف می‌تواند بینش‌های ارزشمندی در مورد مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی گلدهی لاین‌های سنتتیک ارائه دهد.

این یافته‌ها در مجموع، تنظیم پیچیده و پویای بیان ژن‌های *COL* و نقش حیاتی آن‌ها در سازگاری گیاه با تنش‌های محیطی را برجسته می‌کند؛ بنابراین، دستکاری دقیق ژن‌های *COL* یک استراتژی امیدوارکننده برای افزایش تحمل به خشکی و عملکرد گندم است. در نهایت، تعاملات ژنتیکی پیچیده بین ژن‌های *COL* و سایر ژن‌های مرتبط با فتوپریود، مانند *Ppd-D1* و *VRN3*، یک شبکه تنظیمی چند لایه را برجسته می‌کند که از طریق آن گیاه زمان گلدهی و فرآیندهای رشدی مرتبط را تعدیل می‌کند (Shaw *et al.*, 2020). درک عمیق‌تر این تعاملات می‌تواند بینش‌های ارزشمندی برای مهندسی ژنتیک گندم با هدف افزایش تاب‌آوری در برابر تغییرات اقلیمی فراهم کند. این بینش‌ها راه را برای مداخلات ژنتیکی هدفمند هموار می‌کند که می‌تواند تاب‌آوری و بهره‌وری گندم را در

## References

- Ahmad, Z., Waraich, E.A., Akhtar, S., Anjum, S., Ahmad, T., Mahboob, W., Hafeez, O.B.A., Tapera, T., Labuschagne, M. and Rizwan, M. (2018). Physiological responses of wheat to drought stress and its mitigation approaches. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(4): 80.
- Ahmad, P. and Prasad, M.N.V. (2011). *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer, CA, USA.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Bustin, S.A. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 4611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cakmak, I. and Horst, W.J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3): 463-468.
- Chen, P., Zhi, F., Li, X., Shen, W., Yan, M., He, J., Bao, C., Fan, T., Zhou, S. and Ma, F. (2022). Zinc-finger protein MdBBX7/MdCOL9, a target of MdMIEL1 E3 ligase, confers drought tolerance in apple. *Plant Physiology*, 188(1): 540-559. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab420>
- Dudziak, K., Sozoniuk, M., Szczerba, H., Kuzdraliński, A., Kowalczyk, K., Börner, A. and Nowak, M. (2020). Identification of stable reference genes for qPCR studies in common wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under short-term drought stress. *Plant Methods*, 16(1): 58. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00601-9>
- Djébali, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M.T., Aouani, M.E. and Jacquet, C. (2011). Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, 131: 559-571. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9831-1>
- Fotovat, R., Valizadeh, M. and Toorchi, M. (2007). Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(3/4): 225.
- Gangappa, S.N. and Botto, J.F. (2014). The BBX family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 19(7), 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.010>
- Gehan, M.A., Greenham, K., Mockler, T.C. and McClung, C.R. (2015). Transcriptional networks-crops, clocks, and abiotic stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 24: 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.01.004>
- Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(3): 357-364. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409212>
- Goralogia, G.S., Liu, T.K., Zhao, L., Panipinto, P.M., Groover, E.D., Bains, Y.S. and Imaizumi, T. (2017). CYCLING DOF FACTOR 1 represses transcription through the TOPLESS co-repressor to control photoperiodic flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 92(2): 244-262. <https://doi.org/10.1111/tpj.13649>
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M. and Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 422(6933): 719-722. <https://doi.org/10.1038/nature01549>
- Kakizaki, T., Kitashiba, H., Zou, Z., Li, F., Fukino, N., Ohara, T., Nishio, T. and Ishida, M. (2017). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase mediates the biosynthesis of glucoraphasatin in radish. *Plant Physiology*, 173(3): 1583-1593. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01814>
- Krasileva, K.V., Buffalo, V., Bailey, P., Pearce, S., Ayling, S., Tabbita, F., Soria, M., Wang, S., Com, I.C. and Akhunov, E. (2013). Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biology*, 14: 1-19. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r66>
- Livak, K.J. and 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. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Mirzaghaderi, G. (2025). rtpcr: a package for statistical analysis and graphical presentation of qPCR data in R. PeerJ 13, e20185. <https://doi.org/10.7717/peerj.20185>
- Mirzaghaderi, G., Abdolmalaki, Z., Ebrahimzadegan, R., Bahmani, F., Orooji, F., Majdi, M. and Mozafari, A.A. (2020). Production of synthetic wheat lines to exploit the genetic diversity of emmer wheat and D genome containing *Aegilops* species in wheat breeding. Scientific Reports, 10(1), 19698. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76475-7>
- Nezhadahmadi, A., Prodhon, Z.H. and Faruq, G. (2013). Drought tolerance in wheat. The Scientific World Journal, 2013(1): 610721. <https://doi.org/10.1155/2013/610721>
- Pont, C., Leroy, T., Seidel, M., Tondelli, A., Duchemin, W., Armisen, D., Lang, D., Bustos-Korts, D., Goué, N. and Balfourier, F. (2019). Tracing the ancestry of modern bread wheats. Nature Genetics, 51(5): 905-911. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0393-z>
- Pourali, R., Pahlevani, M. H. and Zeynali Nejad, K. (2022). Diallel analysis of wheat cultivars for grain yield and estimation of their baking quality using STS markers. Plant Genetic Research, 10(2): 13-24 (In Persian). <https://doi.org/10.22034/PGR.10.2.2>
- Sairam, R., Srivastava, G., Agarwal, S. and Meena, R. (2005). Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. Biologia Plantarum, 49: 85-91. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-5091-2>
- Seyfollahpour, B., Bahraminejad, S., Cheghamirza, K. and Sasani, S. (2024). Estimation of genetic parameters related to grain quality characteristics in inbred lines derived from a cross of two bread wheat cultivars. Plant Genetic Research, 11(1): 107-120 (In Persian). <https://doi.org/10.22034/PGR.11.1.9>
- Shaw, L.M., Li, C., Woods, D.P., Alvarez, M.A., Lin, H., Lau, M.Y., Chen, A. and Dubcovsky, J. (2020). Epistatic interactions between PHOTOPERIOD1, CONSTANS1 and CONSTANS2 modulate the photoperiodic response in wheat. PLoS Genetics, 16(7): e1008812. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008812>
- Singh, C., Yadav, S., Khare, V., Gupta, V., Kamble, U. R., Gupta, O.P., Kumar, R., Saini, P., Bairwa, R.K. and Khobra, R. (2024). Unraveling the Secrets of Early-Maturity and Short-Duration Bread Wheat in Unpredictable Environments. Plants, 13(20): 2855. <https://doi.org/10.3390/plants13202855>
- Song, Y.H., Shim, J.S., Kinmonth-Schultz, H.A. and Imaizumi, T. (2015). Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. Annual Review of Plant Biology, 66(1): 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115555>
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. Nature, 410(6832): 1116-1120. <https://doi.org/10.1038/35074138>
- Romero, J.M., Serrano-Bueno, G., Camacho-Fernández, C., Vicente, M.H., Ruiz, M.T., Pérez-Castiñeira, J.R. and Valverde, F. (2024). CONSTANS, a HUB for all seasons: How photoperiod pervades plant physiology regulatory circuits. The Plant Cell, 36(6): 2086-2102. <https://doi.org/10.1093/plcell/koae090>
- Vennapusa, A.R., Somayanda, I.M., Doherty, C.J. and Jagadish, S.K. (2020). A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. Scientific Reports, 10(1): 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J.L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nature Biotechnology, 32(9): 947-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Waraich, E.A., Ahmad, R., Saifullah, Ahmad, S. and Ahmad, A. (2010). Impact of water and nutrient management on the nutritional quality of wheat. Journal of Plant Nutrition, 33(5): 640-653. <https://doi.org/10.1080/01904160903575881>
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. and Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. Weed research, 14(6): 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zhang, H., Jiao, B., Dong, F., Liang, X., Zhou, S. and Wang, H. (2022). Genome-wide identification of CCT genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their expression analysis during vernalization. PLoS One, 17(1): e0262147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262147>

Zhang, J., Zhang, S., Cheng, M., Jiang, H., Zhang, X., Peng, C., Lu, X., Zhang, M. and Jin, J. (2018). Effect of drought on agronomic traits of rice and wheat: A meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5): 839. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050839>