Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Study of total protein content, soluble sugar, proline content and P5CS gene expression in leaves of three wheat cultivars under drought stress

Akram Ghaderi

M.Sc. Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: akramghadiri1363@yahoo.com

Sodabeh Jahanbakhsh Godehkahriz

*Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: jahanbakhsh@uma.ac.ir

Seyede Yalda Raeisi sadati

PhD. Student of genetic molecular, Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: y.raeisi@uma.ac.ir

Abstract

Objective

The present study was designed to identify the physiological and molecular responses of drought stress induced metabolism in plants. Since the studied plants include resistant and susceptible wheat crop, it is important to know the drought tolerance mechanisms in these cultivars in order to improve the resistance and tolerance of drought stress to the climate in Iran.

Materials and Methods

For this purpose, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications was conducted in Mohaghegh Ardebil University in 2018-2019. The main factors included drought stress (35, 60 and 85% of field capacity (control)) and sub factor included three wheat cultivars (Pishgam, Pishtaz and Baharan). Drought stress in the three-leaf stage was applied for 10 days and then the seedlings were sampled to check the total protein content of the solution, the sugar content, proline content and the expression of proline-5-D gene expression -

5-carboxyxyl synthase (P5CS) of the leaf tissue sample.

Results

The results showed that with increasing severity of drought stress, the amount of proline, soluble sugar and total protein increased. The highest and lowest levels of total protein, respectively, belonged to the leading cultivar under conditions of strict control and stress. The highest amount of soluble sugar (75.76 and 91.66 mg / g, respectively, wet weight of leaves) in spring wheat and severe drought stress and the lowest (57.59 and 48.7 mg / g, respectively). Examination of P5SC gene expression showed that the number of transcripts of this gene increases under stress and this shows that this gene plays an important role in responding to stress in plants. Baharan showed higher drought resistance than other cultivars by increasing P5CS gene expression and significant proline production and accumulation under drought stress.

Conclusions

In general, it is inferred that drought-induced expression key gene involved in the biosynthesis of proline (P5CS) cause increased levels of proline leaves and also with the accumulation of soluble sugar probably causes more stress tolerance in cultivars.

Keywords: Drought Stress, Proline, P5CS Gene, Total Protein, Wheat

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghaderi A, Jahanbakhsh Godehkahriz S, Raeesi sadati SY (2020) Study of Total Protein Content, Soluble Sugar, Proline Content and P5CS Gene Expression in Leaves of three Wheat Cultivars under Drought Stress. Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 125-144.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 125-144. DOI: 10.22103/jab.2020.15668.1219

Received: October 31, 2020. Accepted: December 5, 2020.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

مطالعه میزان پروتئین کل، قند محلول، محتوای پرولین و بیان ژن P5CS در برگ‌های سه رقم گندم تحت تنش خشکی

اکرم قدیری

دانش آموخته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. ایمیل: akramghadiri1363@yahoo.com

سدابه جهانبخش گده کهریز

* نویسنده مسئول: دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
تلفن: ۰۹۱۴۳۵۴۴۲۱۳ ایمیل: jahanbakhsh@uma.ac.ir

سیده یلدا رئیسی ساداتی

دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. ایمیل: y.raeisi@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵**

چکیده

هدف: پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیکی گندم در مرحله گیاهچه‌ای و بررسی بیان ژن p5cs دخیل در تنش خشکی در سه رقم زراعی گندم می‌باشد. لذا شناخت مکانیسم‌های تحمل به تنش خشکی در این ارقام، به‌منظور بررسی توان گندم در مقابله با سطوح اعمال شده تنش خشکی با توجه به اقلیم کشور، اهمیت می‌یابد.

مواد و روش‌ها: به این منظور آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیل اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل فاکتور اول تنش خشکی (۳۵ ، ۶۰ و ۸۵ درصد ظرفیت زراعی (کنترل)) و فاکتور دوم ارقام گندم (پیشگام، پیشتاز و بهاران) بودند. تنش خشکی در مرحله سه برگی، به‌مدت ۱۴ روز اعمال گردید

و سپس نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها به‌منظور بررسی میزان پروتئین کل محلول، قند محلول، محتوای پرولین و بررسی بیان ژن -1- پرولین-۵ -کروبوکسیل سنتتاز (P5CS) از نمونه بافت برگی انجام گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد با افزایش شدت تنش خشکی میزان پرولین، قند محلول و میزان پروتئین کل افزایش یافت. بیش‌ترین و کمترین میزان پروتئین کل به ترتیب به رقم پیشگام در شرایط کنترل و تنش شدید تعلق داشت. بیش‌ترین میزان قند محلول (به ترتیب ۷۵/۷۶ و ۹۱/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در گندم رقم بهاران و تنش شدید خشکی و کمترین آن (به ترتیب ۵۷/۵۹ و ۴۸/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در گندم رقم پیشگام و عدم تنش خشکی به دست آمد. بررسی میزان بیان ژن P5SC نشان داد که میزان رونوشت‌های این ژن در شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند و این موضوع نشان می‌دهد که این ژن در پاسخ به تنش در گیاهان نقش مهمی ایفا می‌کند. رقم بهاران با افزایش بیان ژن P5CS و تولید و تجمع پرولین قابل توجه در تنش خشکی، مقاومت به خشکی بیشتری را نسبت به سایر ارقام نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی چنین استنباط می‌شود که خشکی با القاء بیان ژن کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین (P5CS) موجب افزایش سطح پرولین برگ‌ها شده و نیز با تجمع قند محلول احتمالاً سبب تحمل بیشتری به تنش در ارقام می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پروتئین کل، تنش خشکی، ژن P5CS، گندم

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قدیری اکرم، جهانبخش گده کهریز سدابه، رئیسی ساداتی سیده یلدا ، (۱۳۹۹) مطالعه میزان پروتئین کل، قند محلول، محتوای پرولین و بیان ژن P5CS در برگ‌های سه رقم گندم تحت تنش خشکی مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۴۴-۱۲۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گندم (Triticum aestivum L.) در بین غلات، به‌عنوان یک گیاه مهم در سبد غذایی، نقش مهمی در سلامت جامعه دارد و در مساحت وسیعی از زمین‌های کشاورزی در دنیا کشت می‌شود. توانایی سازگاری گندم با اقلیم‌های مختلف به‌حدی است که در سراسر کره زمین قابلیت زراعت دارد (Emam 2011). با توجه به خاستگاه گندم، این غله در طول دوره رویشی همواره با تنش آبی مواجه است. به‌طوری که تقریباً ۳۲ درصد از کشت گندم در طول فصل رشد در کشورهای در حال توسعه با انواع مختلفی از تنش خشکی مواجه است. خشکی و تنش گرما هر ساله خسارت اقتصادی فراوانی را بر روی محصولات زراعی ایجاد می‌کنند (Hadi et al. 2016). تنش کم‌آبی منجر به تولید انواع اکسیژن فعال شده و در نتیجه‌ی تولید این ماده پراکسیداسیون لیپیدهای

غشاءها، تخریب رنگدانه‌هایی مثل کلروفیل، تخریب اسید نوکلئیک‌ها و تغییر پروتئین‌های ساختاری و کارکردی اتفاق می‌افتد. گیاه با تجمع پرولین، و پروتئین‌سازی می‌تواند در برابر تنش ایجاد شده مقاومت کند (Farooq et al. 2009). واکنش گندم به تنش آبی سازوکار پیچیده‌ای دارد که شامل تغییرات مولکولی و گسترش آن به کل فعالیت‌های متابولیسمی و اثرگذاری آن بر مورفولوژی و فنولوژی گیاه می‌باشد (Pirasteh-Anosheh & Emam 2012). بنابراین، درک و فهم پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف به‌ویژه تنش خشکی، کاملاً ضروری است. پروتئین‌های محلول از اجزای مهم و کلیدی در متابولیسم برگ‌ها می‌باشند، آنزیم روبیسکو[1] نقش موثری در فتوسنتز داشته و بیش از ۵۰ درصد محتوای پروتئین‌های محلول برگ‌ها را تشکیل می‌دهد لذا هر گونه تغییر در غلظت پروتئین‌های محلول برگ با تغییر در محتوای این آنزیم و در نتیجه تغییر در سرعت فتوسنتز برگ‌ها همراه است (Hanson et al. 1982). هنگامی‌که گیاه در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرد با تنظیم فشار اسمزی سعی در تخفیف اثرات ناشی از تنش خشکی می‌کند. تنظیم اسمزی مکانیزمی برای حفظ روابط آبی تحت تنش اسمزی بوده و به وسیله تجمع محدوده‌ای از مولکول‌ها یا یون‌های فعال اسمزی شامل قند محلول و پرولین که یکی از اسیدهای آمینه‌ای که نقش مهمی در تنظیم اسمزی گیاهان دارد، انجام می‌شود (Mesterajelo et al. 2009). بیوسنتز پرولین در طول تنش خشکی به‌دلیل افزایش بیان آنزیم کلیدی به‌نام P5cs[2] است (Secenji et al. 2005). در گیاهان عالی، پرولین از دو مسیر گلوتامیک اسید[3] و ارنتین[4] سنتز می‌شود. این دو مسیر به‌عنوان مسیرهای اصلی به‌ویژه در شرایط تنش‌های اسمزی می‌باشند. دو آنزیم پرولین ۵-کربوکسیل سنتتاز (P5CS) در گام اول و پرولین ۵-کربوکسیل ردوکتاز (P5CR) در گام دوم در مسیر سنتز پرولین نقش دارد. ژن رمز کننده P5C از گیاهان گوناگون استخراج شده و با نام P5CS ثبت شده است (Nanjo et al. 1999). حدوداً بیش از ۷۰ درصد کل ترکیبات آمینی در طول دوره‌های شدید تنش، پرولین می‌باشد. پرولین آزاد ماده‌ای است که به‌سهولت در اثر مواجه شدن با تنش‌ها تجمع می‌یابد و به‌عنوان یک اسمولیت، پرولین نقش مهمی را در تعادل اسمزی، نگهداری و حفاظت از ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌های سلول، حذف رادیکال‌های آزاد و تولید انرژی دارد (Savoure & Szabados 2010). خشکی، بیان بسیاری از ژن‌های گیاهی را تحریک می‌کند. بیان ژن‌هایی که در پاسخ گیاه به خشکی ضروری هستند در گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد بیشتر است و اغلب در ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به ژنوتیپ‌های حساس بیشتر است. همچنین موتانت‌هایی شناسایی شده‌اند که در آن‌ها ممانعت ژن‌های القاکننده‌ی خشکی منجر به حساسیت به تنش می‌شود (Tang et al. 2012). پرولین با تنش کم‌آبی به‌واسطه‌ی افزایش بیان آنزیم کلیدی P5cs افزایش می‌یابد. در تحقیقی Kavar et al. (2008) در سطح مولکولی، بسیاری از گروه‌های ژنی را شناسایی کردند که پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که نقش مهمی را در پاسخ به تنش خشکی ایفا می‌کنند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌هایی دخیل در سازگاری به تنش از قبیل پرولین اشاره کرد. این ژن‌ها بر اساس عملکرد محصولاتشان به دو گروه تقسیم

[1]. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
[2]. ⍰– Pyroline-5- carboxylase synthatase
[3]. Glutamic acid
[4]. Arnithine

می‌شوند. دسته اول، پروتئین‌های کارکردی هستند که شامل پروتئین‌های کانال آبی، چاپرون‌ها، پروتئازها، LEA[5] و آنزیم‌های سازنده محافظهای اسموتیک می‌شود. دسته دوم، پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌اند که شامل عوامل رونویسی، پروتئین‌کینازها و آنزیم‌های سازنده‌ی هورمون گیاهی اسید آبسزیک هستند. برای بهبود تحمل تنش، پروتئین‌های کارکردی مختلفی مانند آنزیم‌های سازنده اسموتیک بیشتر بیان می‌شوند (Qin et al. 2012). به‌عبارتی گیاهان با یکسری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که توسط شبکه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود به خشکی پاسخ می‌دهند. به‌طوری‌که تغییر در پروفایل بیان ژن‌های حساس به خشکی از اجزاء ضروری مکانیسم‌های مقاومت به تنش هستند (Shinozavaki et al. 2003). از طرفی، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرآیندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA[6]، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Aminafshar et al. 2014; Mohammadabadi & Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی۶ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Ahsani et al. 2019). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Mohammadabadi 2019). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در موجودات مختلف مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016). از این ژن‌های مهم می‌توان به ژن P5CS که نقش مهمی در برگ گندم دارد اشاره کرد. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی میزان تجمع پرولین و سطح بیان ژن P5CS در برگ‌های گندم تحت تنش خشکی و رابطه بیان این ژن و تجمع پرولین آزاد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا گردید. فاکتورهای مورد بررسی شامل فاکتور اول تنش خشکی (۳۵، ۶۰ و ۸۵ درصد ظرفیت

[5]. *Late Embryogenesis Abundant*
[6]. DNA

زراعی (کنترل)) و فاکتور دوم ارقام گندم (پیشگام، پیشتاز و بهاران) بودند. بذور تهیه شده از مرکز تحقیقات مغان، بعد از ضد عفونی بر روی کاغذ صافی قرار گرفته و سپس به‌مدت دو روز در داخل دستگاه ژرمیناتور باقی ماند. پس از مشاهده بذور جوانه‌زده، این بذور در گلخانه درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک معمولی، شن و ماسه بادی به نسبت ۲ به ۱، کشت شدند. تنش خشکی از مرحله سه برگی به‌مدت دو هفته اعمال گردید و سپس نمونه‌برداری از نمونه‌های بافت برگی شاهد و تیماری به‌منظور بررسی میزان قند محلول، پروتئین کل، محتوای پرولین و بررسی بیان ژن □-1- پرولین-۵ -کروبوکسیل سنتتاز (P5CS) انجام گرفت و در ازت مایع به یخچال ۸۰- انتقال یافتند.

اندازه‌گیری پروتئین کل محلول: جهت تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد همراه با تغییراتی استفاده گردید (Bradford 1976). جهت تهیه این معرف مقدار ۲۰ میلی‌گرم آبی کوماسی (G 250) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به محلول اضافه و با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای استخراج پروتئین بافت تر نمونه برگی در بافر تریس – HCl ۰/۰۵ مولار و pH =۷/۵ خوب سائیده شد. همگنای حاصل سانتریفیوژ (مدل HAEMATOKRIT 200، کمپانی Hettich) گردید (Sudhakar et al. 2001). از محلول شفاف رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله‌های آزمایشی که قبلاً به هر کدام مقدار ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد ریخته شده بود (حجم کل محلول ۱ میلی‌لیتر) اضافه گردید. پس از گذشت دو دقیقه، قرائت در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

استخراج قندهای کل از جوان‌ترین برگ با استفاده از روش .Omokolo et al (1996) انجام گرفت. برای اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگی برداشته و سپس ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه در هاون چینی کاملاً هموژن گردید و به لوله آزمایش درب‌دار منتقل شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. مایع رویی جدا و به لوله‌ی دیگری منتقل شده و سپس دو بار و در هر بار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به بخش جامد باقی‌مانده اضافه و کاملاً شستشو گردید و بخش مایع رویی به لوله آزمایش منتقل شده و عصاره‌ی حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از جداسازی روشناور، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ی الکلی انتخاب و داخل لوله‌های آزمایشی ریخته شد. سپس ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Irigoyen et al. 1992). سنجش غلظت پرولین: میزان پرولین برگ با استفاده از روش بیتس اندازه‌گیری شد (Bates et al. 1973). بدین منظور نمونه‌های بافت برگی با سولفوسالیسیلیک اسید[7] ۳٪ استخراج گردید. سپس در لوله جداگانه دیگری، به ۲ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال[8] خالص اضافه شد. در ادامه لوله‌ها به‌مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از خارج شدن از آب جوش، ۲ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه و در یخ قرار گرفت. بعد از تشکیل دو فاز

[7]. 5-Sulfosalicylic acid
[8]. Acetic acid (Glacial)

جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV_ 160A_ SHIMADZO ساخت کشور ژاپن با سل کوارتزی) با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. استخراج RNA از بافت برگ و انجام RT- PCR کمی: برای استخراج RNA کل از ترایزول (مکسل، ایران) استفاده شد. RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (فرمنتاز، USA) تیمار شد و بعد از اتمام تیمار با DNase جهت تعیین کمیت نمونه‌های RNA به روش اسپکتوفتومتری از دستگاه نانودراپ (مدل بیوفتومتر پلاس، شرکت اپندورف آلمان) استفاده شد. به‌منظور تایید کیفیت RNA استخراج شده از آگارز ۱/۵ ٪ استفاده گردید. سپس ۵۰۰ نانو گرام از RNA کل برگ‌ها برای سنتز رشته cDNA بکار برده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Synthesis System cDNA (SmoBio) (تایوان)، بر طبق دستورالعمل آن شرکت انجام شد. به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن به‌روش Real-Time PCR از دستگاه مدل StepOne برای شرکت Applied Biosystem استفاده شد. بررسی الگوی بیان ژن‌ها با آغازگرهای اختصاصی ژن P5CS در سه تکرار انجام گردید. در این پژوهش از ژن 18srRNA به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. آغازگرهای استفاده شده برای ژن P5CS در نرم افزار Primer3 و با توجه به اختصاصی بودن، عدم ایجاد اتصال‌های بین پرایمری پایدار و دمای ذوب مناسب طراحی شد که در جدول یک آورده شده است.

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای مربوط به ژن P5CS و ژن خانه‌دار 18srRNA

Table 1. Name and Sequence of Primers Related to the P5CS Gene and 18srRNA Reference Gene

نام ژن Gene name		توالی آغازگر Primer sequence	تعداد نوکلئوتیدها the number of nucleotides	دمای ذوب (^{0}C) melting temperature
P5CS	آغازگر رفت Sense Primer	5' TTGAGGGCAGTTATGTAGCGG 3'	21	58
	آغازگر برگشت Antisense Prime	5' CCTGTCGCCTGTCAAATAGTG 3'		
18srRNA	آغازگر رفت Sense Primer	5' GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC 3'	133	61

آغازگر برگشت Antisense Prime	CTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGG 5"3'	

در پایان کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های حاصل از این آزمایش، با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید پس از سنجش و محاسبه صفات ذکر شده نتایج بدست آمده تجزیه شد. جهت تجزیه داده‌های Real time PCR از نرم افزار LinReg استفاده شد (Ruijter et al. 2009). پس از محاسبه چرخه آستانه Ct (Cycle of threshold)، مقدار بیان نسبی ژن مورد مطالعه در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد با استفاده از روش Ct□□ محاسبه شد (Schmittgen & Livak 2008).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و رقم بر میزان پروتئین کل و محتوای پرولین برگ گندم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. همچنین میزان قند محلول به طور معنی‌داری تحت تاثیر تنش خشکی و ارقام گندم نان قرار گرفت ولی اثر متقابل تنش خشکی x ارقام معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس تاثیر تنش خشکی بر میزان پروتئین کل، قند محلول و پرولین برگ ارقام گندم نان

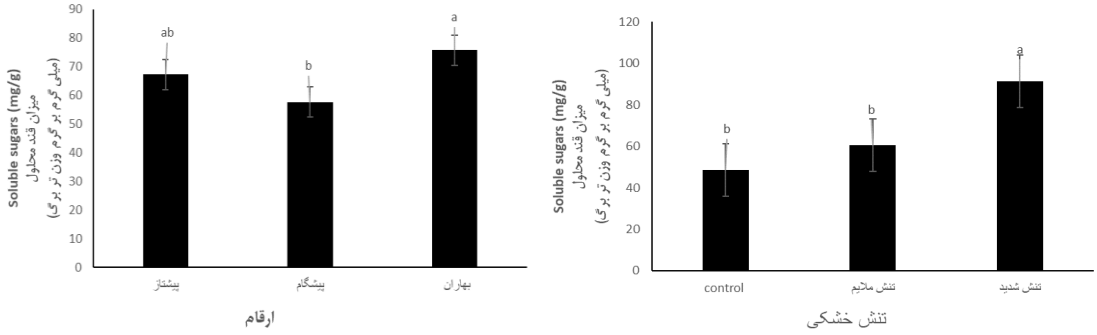
Table 2. Analysis of variance of drought stress effect on protein content, soluble sugars and leaf proline content of bread wheat cultivars

منابع تغییر SOV	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (MS)		
		پرولین Proline	پروتئین کل محلول protein	قند محلول soluble sugars
تنش خشکی drought stress	2	10.151*	28.067**	4337.84**
رقم cultivar	2	2.102**	3.768**	743.97*
تنش خشکی×رقم cultivar× drought stress	4	0.535**	2.450**	35.431 ns
خطا Error	18	2.76	0.013	17.17
ضریب تغییرات Coefficient of Variation (cv)	-	20.14	1.25	6.19

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌داری، معنی‌دار بودن در سطح ۱٪ و ۵٪ می‌باشد.

ns, *, and ** respectively indicate a non-significant and significant at the level of 1% and 5%

میزان قند محلول: میزان قند محلول به طور معنی‌داری تحت تاثیر تنش خشکی و ارقام گندم نان قرار گرفت ولی اثر متقابل تنش خشکی× ارقام معنی‌دار نبود. بطوری که بیش‌ترین میزان قند محلول در گندم رقم بهاران (۷۵/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و تنش شدید خشکی (۹۱/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و کمترین آن (۵۷/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در گندم رقم پیشگام و عدم تنش خشکی (۴۸/۷۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) به‌دست آمد.



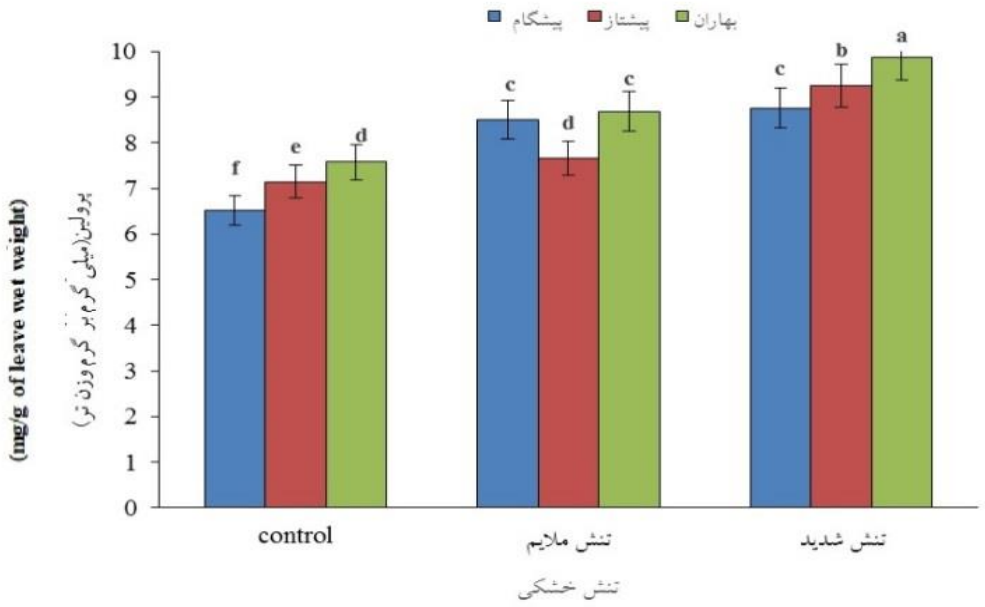
شکل ۱. اثر تنش خشکی و ارقام گندم بر میزان قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

Figure 1. Effect of drought stress and wheat cultivars on soluble sugars

تنش‌های مختلف منجر به ایجاد پاسخ‌های خاص فیزیولوژیک در گیاهان آلی می‌شود. تجمع ترکیبات اسموپروتکتانت یک پاسخ متابولیکی ویژه بوده که اهمیت آن ایجاد مقاومت در برابر شرایط مضر می‌باشد. Bajii et al. (2011) افزایش معنی‌دار پرولین و قندهای محلول در گیاهان تحت تنش را نسبت به گیاه شاهد گزارش کردند. که با نتایج ما در رابطه با افزایش میزان قندهای محلول تحت تنش شدید مطابقت داشت. در این پژوهش رقم مقاوم بهاران بیشترین میزان قند محلول را نسبت به رقم پیشگام نسبت به خشکی در مرحله سه برگی تحت شرایط تنش نشان داد. کربوهیدرات‌ها و پرولین قادرند که نقش سیگنال‌های متابولیکی را ایفا کرده، بنابراین بر روی پاسخ فیزیولوژیک و تنظیم متابولیکی به شرایط تنش تاثیر می‌گذارند (Turkan 2011). قندهای محلول به عنوان محافظت کننده‌های اسمزی در تنظیم اسمزی سلول نقش داشته و در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد. بنابراین تعیین میزان قندهای محلول ممکن است روشی مفید درانتخاب گونه‌های مقاوم به شوری و خشکی باشد (Pagter et al. 2005). در تحقیق حاضر یکی از دلایل احتمالی تجمع پرولین در ارقام بهاران و پیشگام تحت تنش خشکی شاید

این باشد که گیاه با این مکانیسم به روش تنظیم اسمزی شیب مثبتی را برای جذب آب به‌وجود آورده و بدین وسیله شرایط کم‌آبی را بهتر تحمل می‌کند. کاهش انتقال ساکارز به خارج از برگ‌ها منجر به افزایش کربوهیدرات‌های محلول می‌گردد.چنین فرآیندی تحت کمبود کوتاه مدت و بلندمدت آب دیده شده است که نقش مهمی در تنظیم اسمزی ایفا می‌کند (Silveira et al. 2010). در سایر پژوهش‌ها نیز افزایش میزان قند محلول تحت تنش خشکی گزارش شده است که با نتایج تحقیقات حاضر مطابقت دارد (Sadat Acilan 2016; Movludi et al. 2014).

محتوای پرولین: با افزایش شدت تنش خشکی، میزان پرولین افزایش یافت. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیش‌ترین میزان پرولین ۹/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ در رقم بهاران در شرایط تنش شدید خشکی و کم‌ترین میزان پرولین ۶/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ در رقم پیشگام تحت شرایط کنترل به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲. اثر متقابل تنش خشکی و ارقام گندم بر میزان پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

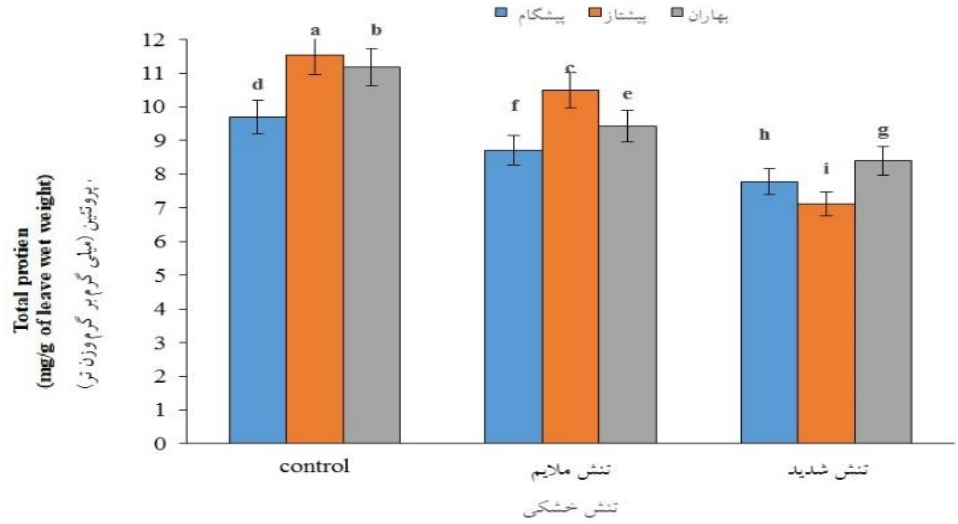
Figure 2. Interaction of drought stress and wheat cultivars on proline content

تجمع پرولین از جمله صفاتی است که در سطح سلولی یا مولکولی مطرح است و در ابتدا برای مقاومت به خشکی مهم تلقی می‌شود. افزایش پرولین در گیاه هنگام تنش، نوعی مکانیسم دفاعی است. تجمع پرولین به‌دلیل خشکی می‌تواند ناشی از تحریک سنتز آن یا جلوگیری از تجزیه آن و یا تجزیه پروتئین باشد (Gomes et al. 2010). در این پژوهش رقم مقاوم بهاران تجمع پرولین بیشتری را نسبت به رقم حساس پیشتاز نسبت به خشکی در مرحله سه برگی تحت شرایط تنش نشان داد. در تحقیق حاضر یکی از دلایل احتمالی تجمع پرولین در ارقام بهاران و پیشگام تحت تنش خشکی شاید این باشد که گیاه با این مکانیسم به روش تنظیم اسمزی شیب مثبتی را برای جذب آب به‌وجود آورده و بدین وسیله شرایط کم‌آبی را بهتر تحمل می‌کند. تجزیه سریع این اسیدآمینه به محض رهایی از تنش، می‌تواند احیاگرهای کافی را فراهم کند که از فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تولید ATP برای بازسازی خسارت‌های القا شده از تنش، پشتیبانی کند. تجمع پرولین در واکنش به تنش، به‌طور طبیعی در سیتوسول اتفاق می‌افتد. سیتوسول مکانی است، که در تنظیم تعادل اسمزی سیتوپلاسمی مشارکت می‌کند (Ashraf & Foolad 2007). در سایر پژوهش‌ها نیز افزایش میزان پرولین تحت تنش خشکی گزارش شده است که با نتایج تحقیقات حاضر مطابقت دارد (Sadat Acilan 2016; Movludi et al. 2014). همچنین تجمع پرولین به موازات فعالیت آنزیم‌های شرکت کننده در سنتز پرولین می‌باشد (Fujita et al. 2003).

میزان پروتئین: تنش خشکی موجب کاهش پروتئین کل در سه رقم مورد بررسی بهاران، پیشگام و پیشتاز شد به‌طوری که بیش‌ترین میزان پروتئین کل (۱۱/۵۵۵ میلی‌گرم بر گرم) در رقم پیشتاز تحت شرایط کنترل و کم‌ترین میزان آن (۷/۱۳۵ میلی‌گرم بر گرم) در همین رقم تحت شرایط تنش شدید خشکی به‌دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳. اثرمتقابل تنش خشکی و ارقام گندم بر میزان پروتئین کل(میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

Figure 3. Interaction of drought stress and wheat cultivars on protein content

گیاه با تجمع پرولین و پروتئین‌سازی می‌تواند در برابر تنش ایجاد شده مقاومت کند (Hong et al. 2005). در تحقیق حاضر با افزایش شدت تنش خشکی میزان پروتئین نسبت به شرایط کنترل کاهش یافت. برخی از محققان گزارش کردند که تحت شرایط نرمال پروتئین برگ افزایش می‌یابد (Fathi Amirkhiz et al. 2011). که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد که کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی در نتیجه واکنش پروتئین با رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تغییر اسیدآمینه، افزایش فعالیت آنزیم‌های سنتز کننده پرولین، موجب کاهش سنتز پروتئین می‌شود (Ranjan et al. 2001). در پژوهشی Donaldson et al. (2001) گزارش کردند که تنش خشکی در گندم سبب کاهش ساخت پروتئین می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشابه نتایج فوق می‌باشد، در شرایط وقوع تنش، یون‌هایی مثل Na^+ و Cl^- به‌داخل لایه‌های هیدراسیونی پروتئین‌ها

نفوذ کرده، سبب اختلال در کار این پروتئین‌ها می‌گردد. تنش آب به سبب تغییرات بیان ژن‌ها در گیاهان به‌رغم کاهش سنتز پروتئین کل، باعث تولید پروتئین‌های ویژه‌ای می‌گردد که سلول‌ها و به‌طور کلی گیاه را در برابر تنش محافظت می‌کند (Zhang et al. 2010).

بیان ژن کد کننده پرولین: بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس بیان ژن P5CS تحت تنش خشکی و بین ارقام در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس تاثیر تنش خشکی بر الگوی بیان ژن P5CS در سه رقم گندم

Table 3. Results of analysis of the effect of drought stress on P5CS gene expression in three wheat cultivars

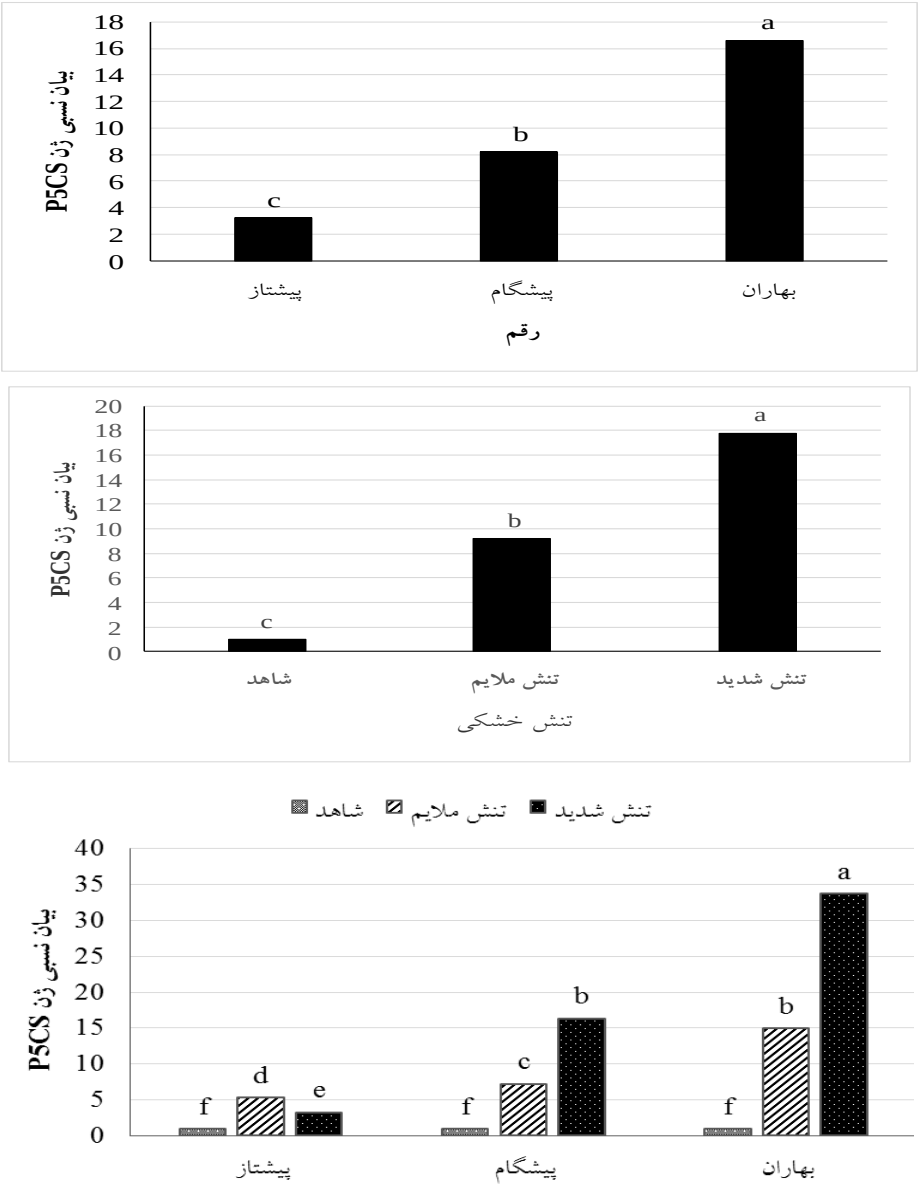
منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS) P5CS
تنش خشکی drought stress	2	41/855**
رقم cultivar	2	3/837**
cultivar× drought stress رقم × تنش خشکی	4	0/101**
خطا Error	18	۰۰۷۵/۰
ضریب تغییرات(cv) Coefficient of Variation	-	۵/۵۱

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌داری، معنی‌دار بودن در سطح ۱٪ و ۵٪ می‌باشد

ns, *, and ** respectively indicate a non-significant and significant at the level of 1% and 5%

مقایسه میانگین بین ارقام گندم از نظر بیان نسبی ژن P5CS نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در رقم بهاران و کمترین میزان بیان در رقم پیشتاز مشاهده شد. همچنین تحت تنش خشکی بیان این ژن افزایش می‌یابد (شکل ۴ الف و ب). به‌طوریکه بیشترین میزان بیان ژن در تنش خشکی شدید و کمترین میزان آن در شرایط کنترل مشاهده شد. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی × رقم بر میزان بیان ژن P5CS نشان داد که با افزایش شدت تنش در ارقام پیشگام و بهاران بر میزان بیان ژن افزوده شد ولی در رقم پیشتاز ابتدا بیان ژن افزایش و سپس کاهش یافت. در کل بیشترین میزان بیان ژن در رقم بهاران و تنش خشکی شدید و کمترین میزان آن در رقم پیشتاز و بدون تنش ملاحظه شد (شکل ۴ ج). ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی، بسیاری از جنبه‌های رفتاری گیاه از جمله متابولیسم‌های فیزیولوژیکی، دفاع سلولی، تولید انرژی و حمل و نقل، انتقال و

تعادل یون‌ها، رشد و تقسیم سلول را منجر می‌شوند. نقش اصلی این ژن‌ها ایجاد هماهنگی معین بین مکانیسم‌ها برای حفظ رشد طبیعی گیاه تحت تنش است. بیان ژن‌هایی که با قرار گرفتن در معرض این تنش‌ها در گیاهان تحریک می‌شوند، هم در محافظت سلول‌ها و هم بر تنظیم ژن‌هایی که در انتقال پیام تنش نقش دارند مؤثر است (Tang et al. 2012).



شکل ٤. مقایسه میانگین الگوی بیان ژن P5CS در ارقام مختلف گندم (الف)، نمونه‌های شاهد، تنش ملایم و تنش شدید خشکی (ب) و مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی × رقم

ستون‌هایی با حروف مشابه اختلاف آماری معنی‌داری بر اساس آزمون LSD با هم ندارند

Figure 4. Comparison of mean expression pattern of P5CS gene in different wheat cultivars (a), control, mild and severe drought stress (b) and comparison of mean drought-

cultivar interaction effect

Columns with similar letters did not show statistically significant differences based on LSD test

تحمل خشکی در گیاهان یک صفت پیچیده می‌باشد که ژن‌های بسیاری درگیر با آن می‌باشند. ژن P5CS به‌عنوان یکی از ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسمی پاسخ به تنش خشکی مطرح می‌باشد که بیوسنتز پرولین را کنترل می‌نماید. به‌عبارتی یکی از ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین، ژن P5CS (□-۱-پرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز) است که در لوبیا شناسایی شده است (Chen et al. 2010). همانطور که ملاحظه می‌گردد افزایش بیان ژن P5CS در رقم مقاوم به خشکی (بهاران) نسبت به رقم حساس (پیشتاز) مشاهده می‌شود و این افزایش احتمالاً منجر به افزایش سطح فرآورده نهایی از این ژن (پرولین) می‌شود (KaviKishor et al. 2005). افزایش بیان ژن P5CS در بخش‌های رویشی بسیاری از گیاهان عالی از جمله برنج زراعی (Hur et al. 2004) و آرابیدوپسیس (Seki et al. 2002) گزارش شده است. الگوی بیانی نسبتاً مشابهی در تحقیق حاضر در رقم حساس و مقاوم دیده شد که با نتایج دیگر محققان مطابقت داشت (Xiong et al. 2002; Shi et al. 2003; Silva-Ortega et al. 2008). دلیل این امر احتمالاً به‌علت افزایش نیاز به ATP در ساعات بعدی تنش و پس از آن کاهش مصرف انرژی با سازگاری با شرایط تنش باشد (Munns & Tester 2008). به‌طور کلی تحقیقات بروی میزان بیان ژن P5SC نشان می‌دهند که میزان رونوشت‌های این ژن در شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند و این موضوع نشان می‌دهد که این ژن در پاسخ به تنش در گیاهان نقش مهمی ایفا می‌کند (Porcel et al. 2004).

نتیجه‌گیری: محققین بر این باورند که تنش باعث واکنش گیاه به کم‌آبی می‌شود که این موضوع خود باعث تحریک بیان ژن‌های مسئول در کم‌آبی گیاه مانند ژن P5SC می‌شود. باتوجه به نتایج حاصل می‌توان گفت رقم بهاران با افزایش بیان بیشتر ژن P5CS و تولید و تجمع پرولین قابل توجه در تنش خشکی، تحمل بیشتری را به خشکی نسبت به سایر ارقام نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از بررسی محتوای اسیدآمینه پرولین و قند محلول نشان داد، گیاهان مقاوم برای ایجاد تحمل در برابر تنش کم‌آبی، انرژی خود را صرف سنتز عوامل دخیل در مکانیسم دفاعی می‌کند. چنانچه تحت تنش کم‌آبی میزان پرولین و قند محلول افزایش یافته است. این افزایش پرولین با کاهش میزان پروتئین کل به‌منظور سنتز و تجمع بیشتر پرولین به هنگام تنش همراه بود. پرولین علاوه بر حفظ پایداری غشاء و محافظت از اندامک‌های سلولی از سایر مکانیزم‌های دفاعی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز محافظت می‌کند. به‌طور کلی چنین استنباط می‌گردد که رقم بهاران دارای بیشترین تحمل به خشکی و رقم پیشتاز کمترین تحمل را در بین ارقام فوق به تنش دارد و رقم پیشگام حالت بینابینی از خود نشان می‌دهد.

سپاس‌گزاری: از مرکز تحقیقات کشاورزی مغان که بذور ژنوتیپ‌های مورد مطالعه این تحقیق را فراهم نمودند، کمال تشکر را دارم و از سرکار خانم مهندس سیده یلدا رئیسی ساداتی مشاور اینجانب که در این مطالعه نهایت همکاری را داشتند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع

احسنی محمدرضا؛ محمدآبادی محمدرضا؛ اسدی فوزی مسعود و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱،۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی‌زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴، ۱۳۲-۱۱۹.

سادات اسیلان کمال (۱۳۹۵) تاثیر تنش کمبود آب بر محتوای قندهای محلول، پرولین، سبزینه برگ و پروتئین دانه در برخی دورگ‌های آفتابگردان (Helianthus annuus L.). علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۷، ۱۸۴-۱۷۵.

فتحی امیرخیز کیوان؛ امینی دهقنی مجید؛ مدرس ثانوی سید علی محمد؛ حشمتی سیاوش (۱۳۹۰) اثر کاربرد خاکی و برگی عنصر آهن (Fe) بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گلرنگ (Carthamus tinctorius L.)، تحت دو رژیم رطوبتی. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۲، ۵۰۹-۵۱۸.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) بیان ژن کالپاستاتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱،۲۳۴-۲۱۹.

محمدآبادی محمدرضا؛ کرد محبوبه؛ نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰،۱۲۲-۱۱۱.

هادی هاشم؛ سیدشریفی رئوف؛ نامور علی. (۱۳۹۵) محافظهای گیاهی و تنش‌های غیر زیستی. انتشارات دانشگاه ارومیه، ارومیه.

References

Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Env Exp Bot 59, 206-216.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, et al. (2019) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric

Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Aminafshar M, Bahrampour V, Baghizadeh A, et al. (2014) CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal kermani, baluchi sheep and rayeni, tali goats. J cell Anim Biol 8, 156-160.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39, 205-207.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.

Bajii M, Lutts S, Kinet J. (2011) Water deficit effect on solute contribution toosmotic adjustment as a function of leaf ageing in three wheat cultivars performingdifferently in arid conditions. Plant Sci 160, 669-681.

Chen J, Zhang X, Jing R et al. (2010). Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (Phaseolus vulgaris L.). Theory Appl Gen 120, 1393-1404.

Donaldson E, Schillinger WE, Dofing SM (2001) Strwa production and grain yield relationships in winter wheat. Crop Sci 41, 100-106.

Emam Y (2011) Cereal Production. (4th Eds). Shiraz University Press, Shiraz. 190 p. (In Persian)

Fathi Amirkhiz K, Amini Dehaghi M, Modarres Sanavi SAM, Heshmati S (2011) The Effects of Soil and Foliar Application of Fe on some Biochemical Characteristics of Safflower (Carthamus tinctorius L.) under Two Irrigation Regimes. Iran J Field Crop Sci 42, 509-518. (In Persian)

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N et al. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agr Sust Dev 29, 185-212.

Fujita T, Maggio A, Rios MG et al. (2003). Identification of regions of the tomato - glutamyl kinase that are involved in allosteric regulation by proline. J Biol Chem Pp, 278.

Gomes FP, Oliva MA, Mielke MS et al. (2010) Osmotic adjustment, proline accumulation and membrane stability in leaves of Cocos nuciera submitted to drought stress. Sci Hort 126, 379-384.

Hur J, Jung KH, Lee CH, An G (2004) Stress- inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. Plant Sci 167, 417-426.

Hanson H, Bolaugh NE, Anderson RG (1982). Wheat in the Third World. West view press Inc. Boulder, Colorado, USA. P.13

Hadi H, Seyed Sharifi R, Namvar AS (2016) Plant protection and abiotic stresses. Urmia University Press, Urmia (In Persian)

Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS (2005) Removal of feedback inhibition of □1-

pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol 122, 1129-1136.

Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez-Diaz M (1992) Water stress inducedchanges in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (Medicago sativa L.) plants. Plant Physiol 84, 55-60.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

KaviKishor PB, Sangam S, Amrutha RN et al. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and stress tolerance. Curr Sci 88, 424-438.

Kavar T, Maras M, Kidric M et al. (2008) Identification of genes involved in the response of leaves of Phaseolus vulgaris to drought stress. Mol Bree 21, 159-172.

Movludi A, Ebadi A, Jahanbakhsh S et al. (2014) The effect of water deficit and nitrogen on the antioxidant enzymes activity and quantum yield of barley (Hordeum vulgare L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 42, 398-404.

Mohammadabadi MR (2019) Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 219-235 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Medic Biol Res 5, e6177.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10 ,111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. Plant Biol 59, 651-681.

Nanjo T, Masatomo K, Yoshiba Y et al. (1999) Biological function of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. Plant J 18, 185.

Pirasteh-Anosheh H, Emam Y (2012) The role of plant growth regulators in enhancing crop yield under saline conditions: from theory to practice. Iran J Crop Sci 21, 188-209. (In Persian).

Patger M, Bragato C, Brix H (2005) Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. Aquatic Bot 81, 285-299.

Porcel R, Azcón R, Ruiz-Lozano JM (2004) Evaluation of the role of genes encoding for □1-

pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants. Physiol Mol Plant Pathology 65, 211-221.

Qin Y, Wang M, Tian Y et al. (2012) Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in Arabidopsis. Mol Biol Rep 39, 7183-7192.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y et al. (2009) Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Res 37, e45.

Ranjan R, Bohra SP, Jeet AM (2001) Plant Senescence. Jodhpur, agrobios. Pp, 18-42.

Secenji M, Lendvai A, Hajósné Z et al. (2005) Experimental system for studying long-term drought stress adaptation of wheat cultivars. Acta Biol Szegediensis 49, 51-52.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protocols, 3, 1101-1108.

Shinozaki K, Yamagushi-Shinozaki M, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opinion Plant Biol 6, 410-417.

Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003) Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. Nat biotech, 21(1), 81.

Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiol Biochem 46, 82-92.

Silveira JAG, Arau´ jo SAM, Lima JPMS, vie´gas RA (2010) Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in Atriplexnummularia. Env Exp Bot 66,1-8.

Sudhakar S, Li Y, Katz MS, Elango N (2001) Translational regulation is a control point in RUNX2/Cbfa1 gene expression. Biochem Biophys Res Commun 289, 616-22.

Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Scencei 15.

Sadat Asilan K (2016) Effect of water deficit stress on soluble sugars, proline, protein and chlorophyll content in Sunflower (Helianthus annuus L.) hybrids. Iran J Filed Crop Sci 47, 184-175. (In Persian)

Seki M, Narusaka M, Ishida J et al. (2005) Monitoring the expression proles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J 31, 279-292.

Tang Y, Liu M, Gao S et al. (2012) Molecular characterization of novel TaNAC genes in wheat and overexpression of TaNAC2a confers drought tolerance in tobacco. Physiol plantarum

144, 210-224.

Turkan I (2011) Plant responses to drought and salinity stress, Development in a post-Genomic era. Adv Bot Res, 593p.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50 (In Persian).

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. plant cell 14, 165-183.

Zhang H, Mao X, Jing R et al. (2010) Characterization of a common wheat (Triticum aestivum L.) TaSnRK2. 7 gene involved in abiotic stress responses. J Exp Bot 62, 975-988.