

## تأثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن *NAC* رمزکننده عامل رونویسی برخی ارقام گندم نان منطقه سیستان

محمدعلی دلارام پور<sup>۱</sup>، لیلا فهمیده<sup>۲\*</sup>، زیبا فولادوند<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل
۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳. مربی پژوهشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۰

### چکیده

خشکی یک عامل محیطی مهم محدودکننده کشت گندم و دیگر محصولات کشاورزی در سراسر جهان است. گندم از جمله گیاهانی است که به دلیل سازگاری ژنوتیپ‌های آن به شرایط متفاوت محیطی و جنبه‌های مختلف مصرف آن در مناطق وسیعی از جهان با شرایط آب و هوایی مختلف کشت می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی الگوی بیان ژن *TaNAC67* و همچنین تغییرات آنزیم پلی فنل اکسیداز و میزان پرولین پنج رقم گندم زراعی منطقه سیستان (هامون، هیرمند، کویر، بولانی و کراس بولانی) تحت سطوح مختلف تنش خشکی بود. ابتدا بذور پنج رقم گندم به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در شرایط گلخانه کشت داده شد. ۴۵ روز پس از کشت، اعمال تنش خشکی با اعمال سطوح مختلف رطوبتی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) انجام و میزان اسیدآمینو پرولین و آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رونویسی *TaNAC67* از برگ‌های گیاه نمونه برداری شد و پس از استخراج RNA سنتز cDNA، بررسی الگوی بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از روش Real-time PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و  $\text{Ratio} = \frac{\text{SAS}}{\text{SAS}_{9/1}}$  انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس، اثر سطوح رطوبتی و اثرات متقابل سطوح رطوبتی در رقم بر بیان نسبی ژن *NAC* و میزان اسیدآمینو پرولین و آنزیم پلی فنل اکسیداز معنی دار شد. با افزایش سطوح تنش خشکی از سطح ۲۰ تا ۵ درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح نرمال (۲۵ درصد)، میزان بیان نسبی ژن *NAC* و همچنین میزان پرولین و پلی فنل اکسیداز در ارقام هیرمند و سپس کراس بولانی بیشتر بود. با توجه به نتایج این پژوهش، در بین ۵ رقم مورد بررسی گندم نان، می‌توان این گونه عنوان کرد که رقم هیرمند عکس العمل بهتری نسبت به تنش خشکی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پلی فنل اکسیداز، ارقام مقاوم و حساس، پرولین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی

### مقدمه

تنش خشکی به‌عنوان یک عامل محیطی ناسازگار و پیچیده‌ترین تنش در مقیاس جهانی است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013; Ceccarelli, 2010) که بر بسیاری از فعالیت‌های رشدی و متابولیسی گیاهان اعم از کاهش سطح برگ، ارتفاع، وزن خشک، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تجمع اسیدهای آمینه و کاهش کلروفیل، تعرق و تغییر در سنتز

گندم تنها غله‌ای است که در سطح وسیع مورد کشت قرار گرفته و مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا به شمار می‌رود که بیش‌ترین سطح زیر کشت را در جهان به خود اختصاص داده است (Metwali et al., 2011). یکی از عوامل محدودکننده مهم محیطی که تولید و عملکرد گیاهان زراعی را در بسیاری از مناطق خشک و نیم خشک مانند ایران تحت تأثیر قرار می‌دهد تنش خشکی است (Allagulova et al., 2003).

اکسیداز در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (Agarwal and Pandey, 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ممکن است راهی برای تحمل گیاه به تنش‌های محیطی باشد (Abogadallah, 2010). آنزیم پلی فنل اکسیداز سبب پدیده‌ی قهوه‌ای شدن در میوه‌ها و سبزی‌ها و گندم می‌شود، در کل اثر آن نوعی پاسخ دفاعی در برابر آفات و بیماری‌ها است (Zhu et al., 2003).

تنش‌های محیطی باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (Du et al., 2011; Reddy et al., 2004). پاسخ و سازگاری گیاهان در برابر تنش‌های محیطی (مانند تنش خشکی) نیازمند تغییرات متعدد سیتولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی در گیاه است. این تغییرات به‌وسیله ژن‌های تنظیمی متعددی کنترل می‌شوند (Nakashima et al., 2009).

تحت تنش خشکی ژن‌های بسیاری در گیاهان القاء می‌شود. تصور بر این است که تولیدات حاصل از این ژن‌ها در تحمل به تنش، تنظیم بیان ژن، علامت‌دهی و پاسخ به تنش نقش دارد (Ito et al., 2006). برخی از این محصولات ژنی در محافظت از گیاهان در برابر اثرات تنش از طریق دریافت تنش، سیگنال‌های انتقال، شبکه تنظیم‌کننده رونویسی و نیز تحمل در برابر پسابیدگی نقش دارند (Allagulova et al., 2006).

بررسی ژن‌های القاپذیر به‌وسیله تنش در گیاهان به دو دسته تقسیم می‌شود: دسته اول شامل پروتئین‌هایی هستند که در تحمل به تنش‌های غیر زیستی فعالیت دارند مانند چاپرون، پروتئین‌های ضد انجماد و آنزیم‌های سم‌زدا. دسته دوم شامل پروتئین‌هایی که در تنظیم بیان ژن‌ها فعالیت دارند مانند عوامل رونویسی و فسفاتازها. در این بررسی حداقل پنج مسیر تنظیمی متفاوت برای بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و سرما پیش‌بینی شده است (Sahrawat et al., 2003). سه مسیر تنظیمی وابسته به ABA و دو مسیر تنظیمی مستقل از ABA هستند. مسیر-های وابسته به اسید آبسزیک شامل ژن‌های *MYC*، *NAC*، *MYB*، *AREB/ABF* و مسیرهای مستقل از اسید آبسزیک شامل خانواده عوامل رونویسی AP2/ERF است که دارای زیر خانواده ERF، RAV، DREB(AP2) و APETALA2 است (Uno et al., 2000).

پروتئین (Ashraf, 2010; Guo et al., 2010; Dai et al., 2012) و بیان پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود (FAO, 2015).

گیاهان در مواجهه با تنش خشکی از سازوکارهای مختلفی سود می‌جویند. تنظیم اسمزی و افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مهم‌ترین سازوکارها به شمار می‌رود. تنظیم اسمزی با هدف حفظ تورژسانس سلولی، تداوم جذب از محیط ریشه و پایداری غشاها انجام می‌گیرد. یکی از اسیدآمین‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی پرولین است که در پاسخ به پتانسیل پایین آب (مثل خشکی و شوری) به مقدار زیاد تجمع می‌یابد و همبستگی مثبت بین تجمع آن و سازش به تنش‌های اسمزی (تنش‌های خشکی، شوری و ...) در گیاهان گزارش شده است (Raney et al., 1991). پرولین حلالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از تغییر ماهیت آن‌ها جلوگیری می‌کند (Powell and Pfdifer, 1956). باجی و همکاران (Bajji et al., 2001) گزارش کردند که غلظت پروتئین‌های محلول برگ‌ها در اثر تنش خشکی به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین، کاهش سنتز پروتئین و نیز تجمع اسیدآمین آزاد از جمله پرولین، کاهش می‌یابد.

تنش خشکی با اختلال در محل‌های (میتوکندری، کلروپلاست، میکروزوم، آپوپلاست، سیتوسل، پراکسی زوم) انتقال الکترون، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) را تحریک کرده و سبب تجمع آن‌ها می‌گردد (Dat et al., 2010; Xoconstle-Cazares et al., 2000). گونه‌های اکسیژن از طریق پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب پروتئین‌ها سبب ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو کرده که منجر به خسارات جدی به ساختارهای سلولی می‌شود (Ma et al., 2006). ROSها باعث آسیب به غشای سلولی، برانگیخته شدن واکنش‌های اکسیداسیون و پراکسیداسیون و ازهم‌گسیختگی مولکول‌های زیستی و ماکرومولکول‌هایی همچون: لیپیدها، پروتئین‌های ساختاری و DNA می‌شوند (Zahang and Kirkham., 1995; Ajith and Janardhanan, 2007; Ashraf, 2009; Gill and Tuteja, 2010).

گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی فنل

این تنش‌ها واجد یک اثر منفی بر روی تولید و عملکرد گیاه می‌باشند که این خود، حوزه تحقیقات وسیعی را برای بهبود عملکرد گیاهی می‌طلبد. گیاهان برای سازگار شدن با شرایط کم‌آبی، مکانیسم‌های گوناگونی را توسعه داده‌اند (Mardeh et al., 2006). هنگامی که گیاه در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرد با تغییر در الگوی بیان ژن‌های خود تلاش می‌کند با شرایط محیطی جدید سازگاری پیدا کند (Ozturk et al., 2002).

هدف از این مطالعه بررسی ارقام گندم نان زراعی منطقه سیستان (هامون، هیرمند، کویر، بولانی، کراس بولانی) از نظر مقاومت در برابر سطوح تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) بر اساس میزان تغییرات بیان نسی ژن NAC و میزان تغییرات اسیدآمین پپتیداز و آنزیم پلی فنل اکسیداز بود.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و سطوح خشکی

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل پنج رقم گندم نان منطقه سیستان (هامون، هیرمند، کویر، بولانی و کراس بولانی) بود که از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه شد. در هر گلدان ۲۰ عدد بذر کاشته شد و در مرحله ۴ برگگی عمل تنک کردن بر روی گلدان‌ها صورت گرفت و در نهایت تعداد ۳ بوته درون هر گلدان باقی ماند (Tarahomi et al., 2010). گلدان‌ها در آزمایشگاه پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تحت شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری (Esfandiari et al., 2011) و یک روز در میان با آب معمولی، آبیاری می‌شدند. به منظور جلوگیری از خروج آب زهکش، از گلدان بدون روزنه استفاده شد (Gharbi et al., 2013). اعمال تیمار مورد نظر روی گیاه، ۴۵ روز پس از کشت در مرحله پنجه‌زنی گیاه انجام شد. در نهایت نمونه‌برداری از گیاهان دو هفته پس از اعمال تنش صورت گرفت. سطوح مختلف آبیاری در پنج سطح: ۲۵ درصد (شاهد)، ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ درصد ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد.

#### طراحی آغازگرهای مورد استفاده

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی TaNAC67 به همراه ژن خانه‌دار 18s استفاده شد. بر این اساس طراحی

ژن‌های NAC، جزء مسیرهای وابسته به ABA است و زمانی که گیاه تحت تنش قرار می‌گیرد ABA به سرعت در ریشه گیاه سنتز و به سلول‌های نگهبان روزنه منتقل و در آنجا تجمع می‌یابد و سبب غیرفعال شدن پمپ پتاسیم و در نتیجه مانع ورود پتاسیم به سلول‌های روزنه می‌شود در نتیجه روزنه‌ها بسته می‌شود (Ackerson, 1980; Hartung, 1983) از طرفی هم‌زمان با خروج پتاسیم یون  $H^+$  و اسیدهای آلی و اسمولیت‌ها (مانند پرولین) در سلول‌های نگهبان روزنه تجمع می‌یابند و باعث افزایش غلظت شیرابه سلولی شده در نتیجه باعث ایجاد یک مکش منفی و تداوم جذب آب می‌شود. همچنین زمانی که گیاه تحت تنش قرار می‌گیرد گیرنده‌های اسیدآسیزیک فعال و سبب سنتز ABA شده و این ABA ساخته شده علاوه بر انتقال به بخش‌های هوایی گیاه نقش پیام‌رسانی داشته و سبب انتقال پیام به بخش‌های دیگر گیاه و افزایش ROSها می‌شود این ROSها نقش پیامبر ثانویه داشته و به تمام بخش‌های گیاه انتقال می‌یابد اما سبب تجزیه ماکرومولکول‌های زیستی می‌شود که در این صورت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی فعال می‌شود (Cornish and Zeevart, 1985b; Roberts and Tucker, 1998).

پروتئین‌های NAC از عوامل رونویسی در گیاهان خاص می‌باشند که عملکردشان در رابطه با توسعه گیاه و همچنین در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده است. اساس نام‌گذاری NAC با توجه به توالی مشخص شده‌ی NAM در گل اطلسی و ATAF1/2 در آرابیدوپسیس و پروتئین CUC2 است. برای اولین بار cDNA کدکننده پروتئین NAC به‌عنوان یک ژن پاسخ‌گو به تنش کم‌آبی (RD26) در آرابیدوپسیس گزارش شد (Yamaguchi-Shinozaki et al. 1992). پروتئین NAC در گندم (NAM-B 1) زیرگروه SNAC-B و (ORE1/ATNAC2/ANAC092) و همچنین پروتئین NAC در آرابیدوپسیس در گروه (NAM/CUC3)، گزارش داده شد که این ژن‌ها در کنترل پیری در این گیاهان تأثیرگذار هستند (Uauy et al. 2006).

گندم از جمله گیاهانی است که به دلیل سازگاری ژنوتیپ‌های آن به شرایط متفاوت محیطی و جنبه‌های مختلف مصرف آن در مناطق وسیعی از جهان با شرایط آب و هوایی مختلف کشت می‌شود (Cook and Veseth, 1991). کم‌آبی نه تنها در اثر کمبود آب، که در اثر تنش‌هایی مثل دمای پایین یا شوری نیز حاصل می‌شود، بنابراین در این فرآیندها و فعل‌وانفعالات، ترکیبات مولکولی زیادی دخالت دارند. همه

RNA تام از بافت‌های موردنظر با استفاده از دستورالعمل کیت Total RNA isolation شرکت دنازیست آسیا از برگ گیاه گندم، استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه نانودراپ تعیین گردید.

آغازگرها بر اساس انتهای ۳' به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم‌افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

### استخراج RNA از برگ گیاه

Table 1. Name and sequences of primer designed

جدول ۱. اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده		طول نوکلئوتید	دمای اتصال
نام آغازگر	توالی آغازگر	Length nucleotides (bp)	Annealing temperature (°C)
Name primer	Sequences primer		
پیشرو TaNAC67. FWD1	5'-ATCGGCAGCGGAGCGATT-3'	229	63.2
پسرو TaNAC67. REV1	5'AGGGGTCGAAAGCGGTAGAGG-3'		
پیشرو 18S. FWD2	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'	151	59.5
پسرو 18S. REV2	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'		

EDTA ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C قرار داده شد. از RNA تیمار شده با DNase1 برای ساخت cDNA استفاده شد. مواد از میکروتیوب حاوی کیت Geneall شرکت پیشگام، به میکروتیوب ۰/۲ جهت سنتز cDNA منتقل گردید (جدول ۳).

### تیمار RNA با آنزیم DNase1 و سنتز cDNA

برای تیمار RNA از آنزیم DNase1 شرکت پیشگام استفاده گردید. بدین منظور مواد موجود در جدول (۲) در یک میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتری عاری از RNase ریخته شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. به‌منظور غیرفعال نمودن DNase، ۱ میکرولیتر از

### جدول ۲. میزان و مواد لازم جهت تیمار RNA با آنزیم DNase1

Table 2. The amount and materials needed for RNA treatment with DNase1 enzyme

اجزای واکنش	حجم مواد
Reagents	Volume
DNase	۱ μl
RTase reaction buffer (10X)	۱ μl
Total RNA	۷.۵ μl
Nuclease free water	۰.۵ μl

جدول ۳. مخلوط اجزای واکنش جهت سنتز cDNA با استفاده از آغازگرهای برگشتی طراحی شده.

Table 2. Reagents and volume for cDNA synthesis using by reverse primer designed

اجزاء واکنش	حجم مواد
Reagents	Volume
Total RNA (100 ng)	۳ μl
Specific Primer (10 μM)	۰.۵ μl
dNTP (10 mM)	۰.۵ μl
RTase reaction buffer (10X)	۱ μl
DTT (0/1 mM)	۱ μl
HYPER Script™ Reverse Trans criptase 200u/ μl	۰/۵ μl
Zym ALL™ RNase inhibitor	۰/۵ μl
Nuclease free water	۳ μl

اندازه‌گیری آنزیم پلی فنل اکسیداز با روش جانوویتز-کلب و همکاران (Janovitz-Klapp et al., 1990) انجام شد. ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۲۰ میلی‌مولار مخلوط شدند و برای صفر کردن دستگاه از محلول بافر فسفات استفاده شد. سپس جذب هر نمونه دوباره با فاصله ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد.

#### اندازه‌گیری تغییرات میزان پرولین

اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش بیتز و همکاران (Bates et al., 1973) انجام و در نهایت میزان نور جذبی در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین خالص تهیه شد و بعد از قرار دادن در دستگاه اسپکتروفوتومتر اعداد حاصله وارد EXCEL شده و منحنی Scatter رسم شد.

#### داده‌ها و نرم‌افزارها

پس از اندازه‌گیری و به دست آوردن داده‌های مربوط به آنزیم پلی فنل اکسیداز و میزان پرولین و داده‌های مولکولی، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با روش دانکن) به صورت فاکتوریل با دو فاکتور رقم (۵ سطح) و سطوح آبیاری (۵ سطح) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزارهای SAS 9.1 انجام شد، برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد.

#### نتایج و بحث

**نتایج بررسی آنزیم پلی فنل اکسیداز و میزان پرولین**  
بر اساس نتایج جدول (۴) تجزیه واریانس مشاهده شد که اثر بلوک، سطوح رطوبتی، در سطح ۱ درصد و اثر رقم و اثر متقابل رقم در سطوح رطوبتی در سطح ۵ درصد بر میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم در سطوح رطوبتی نشان داد که رقم هیرمند در سطح ۵ درصد از نظر میزان آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ( $\mu\text{gr}/\text{prot}$ ) نسبت به سایر ارقام برتری داشت (شکل ۱).

تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی مختلف گزارش شده است

بیان ژن‌ها مورد مطالعه در این پژوهش با روش Real time PCR و با استفاده از کیت EvaGreen (شرکت پیشگام) و آغازگرهای مربوطه در دستگاه Real time PCR set Corbett (3000) بررسی شد. ترکیب واکنش برای هر نمونه مورد نظر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل ۴ میکرولیتر مخلوط EvaGreen، ۱ میکرولیتر آغازگر مستقیم، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی، ۱۴ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA در نظر گرفته شد. پارامترهای دمایی جهت تکثیر مطابق زیر است:

(۱) مرحله واسرشته سازی اولیه: ۴-۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ (۲) مرحله واسرشته سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ (۳) مرحله اتصال آغازگر: ۴۵ ثانیه در دمای ۶۱/۹ درجه سانتی‌گراد؛ (۴) مرحله تکثیر: ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و منحنی ذوب با افزایش دما از ۵۰ تا ۹۹ درجه هر پنج ثانیه یک درجه بود.

تمامی واکنش‌های PCR در طی ۲ تکرار انجام گرفت. تجزیه داده‌های دستگاه Real time PCR با نرم‌افزار SAS ver 9.1 انجام شد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول  $-\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livake and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

$$[1] \Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct} \text{ نمونه کنترل} - \Delta\text{Ct} \text{ نمونه آزمایشی})$$

$$[2] \Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct} \text{ ژن خانه‌دار} - \Delta\text{Ct} \text{ ژن هدف})$$

برای هر نمونه سه تکرار برای ژن اختصاصی و سه تکرار برای ژن خانه‌دار 18S<sup>1</sup> در نظر گرفته شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

##### استخراج عصاره آنزیمی

جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۱ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ۴ سی‌سی بافر Ice - cold در هاون سرد کاملاً ساییده و به صورت همگن درآورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به‌عنوان عصاره آنزیمی (پروتئینی) برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید (De Azevedo Neto et al., 2006).

#### اندازه‌گیری تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

<sup>1</sup>. Housekeeping gene

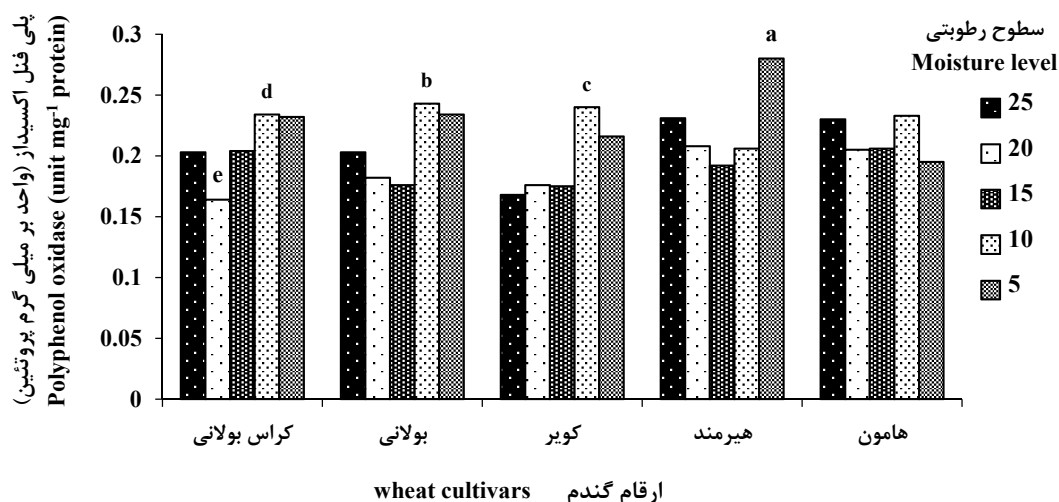
(۵ درصد) مشاهده شد. آنزیم پلی فنل اکسیداز، اکسیدوردوکتازهایی هستند که نقش بسیار مهمی را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی و شوری دارند و هم-چنین در سم‌زدایی اشکال مختلف اکسیژن فعال شده در سلول اهمیت دارند که در هنگام بروز تنش موجب جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده، می‌شوند و با اکسیداسیون‌های متفاوت در مکانیسم‌های دفاعی گیاه شرکت می‌کنند (Mittler, 2002).

(Hernandez et al., 2000). نتایج حاکی از آن است که تنش خشکی با برهم زدن شرایط مطلوب، سبب بروز اختلاف متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌گردند که یکی از عوامل اصلی این اختلافات تولید انواع اکسیژن فعال یا (ROS) می-باشند. احیای ناقص اکسیژن اتمسفری، سبب تشکیل رادیکال‌های سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل می‌شود (Nickavar et al., 2006). در این تحقیق بیشترین میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز در پایین‌ترین سطوح رطوبتی

جدول ۴. تجزیه واریانس آنزیم پرولین و پلی فنل اکسیداز

Table 4. Analysis of variance of proline and polyphenol oxidase enzymes				
S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی Df	پرولین Proline	آنزیم پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase enzymes
Block	بلوک	2	0.0079**	0.019**
Moisture Levels (D)	سطوح رطوبتی	4	0.24**	0.0069**
Genotype (G)	رقم	4	0.00038 <sup>ns</sup>	0.0015*
G × D	برهمکنش سطوح رطوبتی و رقم	16	0.0015**	0.0014*
Error	خطا	48	0.00018	0.00066
CV (%)	ضریب تغییرات (%)	-	3.23	12.29
R-square	ضریب تبیین	-	0.99	0.74

ns, \* and \*\* are not significantly and significantly different in 5% and 1% respectively different



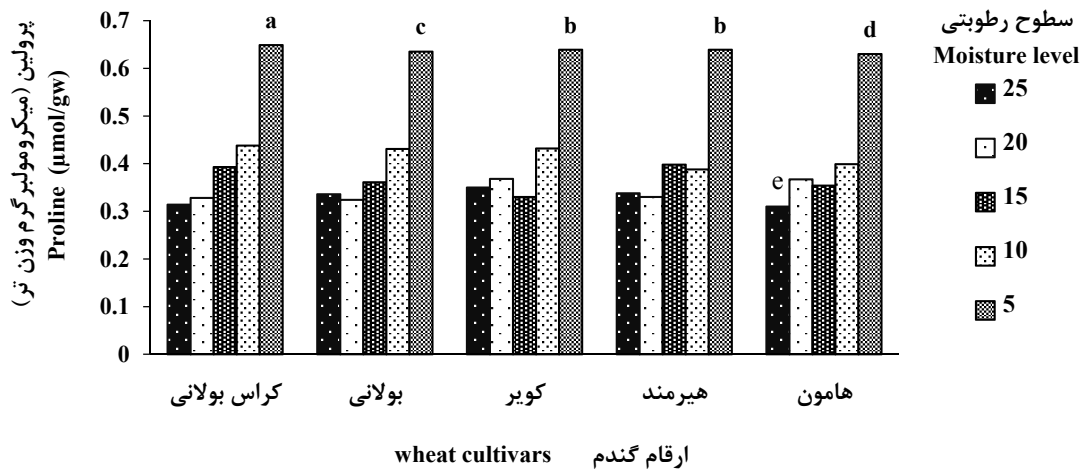
شکل ۱. میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز پنج رقم گندم نان در سطوح مختلف رطوبتی  
Fig. 1. Polyphenol oxidase enzyme in five wheat cultivars in levels of different moisture

۱درصد بر محتوای اسیدآمینو پرولین معنی‌دار بود. با توجه به شکل ۲، رقم بولانی با میزان ۰/۰۰۶۵ و رقم هیرمند با

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که تأثیر بلوک، سطوح رطوبتی و اثر متقابل رقم در سطوح رطوبتی در سطح

مقدار زیاد تجمع می‌یابد (Ranney et al., 1991). افزایش میزان آنزیم را به خود اختصاص دادند. پرولین آزاد بسیاری از گیاهان در پاسخ به تنش کم‌آبی مثل خشکی و شوری به

میزان ۰/۰۰۶۳ ( $\mu\text{mol/gw}$ ) در سطح ۵ درصد بیشترین میزان آنزیم را به خود اختصاص دادند. پرولین آزاد بسیاری از گیاهان در پاسخ به تنش کم‌آبی مثل خشکی و شوری به



شکل ۲. میزان اسید آمینه پرولین پنج رقم گندم نان در سطوح مختلف رطوبتی

Fig. 2. Proline enzyme levels in five wheat cultivars in levels of different moisture

درواقع پرولین به‌عنوان یک چپرون شیمیایی (chaperone chemical) باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌کند و هم‌چنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات ناشی از تنش‌های مختلف در فرایند طبیعی سلولی ممانعت به عمل می‌آورد. این افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش تا مدتی باقی می‌ماند. علاوه بر آن دارای نقش تنظیم‌کننده اسمزی، حفاظت از غشاء، حافظ منبع نیتروژن و کربن برای رشد پس از تنش، منبع انرژی برای تنظیم پتانسیل رداکس، روبرنده اکسیژن فعال OH و بیشتر نقش تنظیم‌کننده اسمزی دارد (Solomon and Beer, 1994). در لوبیا و سویا گزارش شد که با کاهش پتانسیل آب، افزایش معنی‌داری در میزان پرولین مشاهده گردید (Farshadfar et al., 2000) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

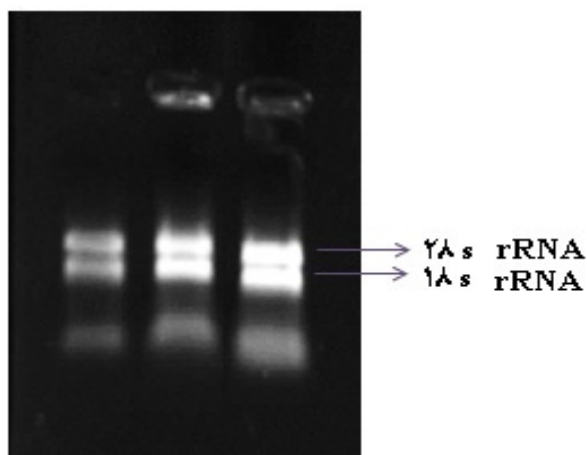
#### نتایج صحت استخراج RNA

بعد از استخراج RNA کل جهت تأیید استخراج نمونه‌ها، روش‌های متعددی وجود دارد که یکی از این روش‌ها، الکتروفورز ژل آگارز است. پس وجود باندهای ۱۸S و ۲۸S را می‌توان دلیلی بر صحت استخراج دانست. شکل (۳).

در شرایط غیر تنش، پرولین از مسیر اورنتین در گیاه تولید می‌شود ولی در گیاهان تحت شرایط خشکی و شوری، پرولین از L-گلوتامیک اسید توسط آنزیم دلتا - ۱ - پرولین ۵ - کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH تبدیل به گلوتامیک - ۵ - سمی آلدئید می‌شود که بدون واسطه و به‌صورت خودبه‌خود تبدیل به دلتا - ۱ - پرولین ۵ - کربوکسیلات می‌شود. در ادامه فرایند، ماده اخیر به کمک آنزیم P5CR و احیا شدن NADPH به L-پرولین تبدیل شود. در شرایط تنش خشکی، به دلیل بسته شدن روزنه‌ها در طول دوره تنش و تغییر کارایی مصرف آب، ماده خشک تولیدی گیاه کاهش می‌یابد؛ بنابراین گونه‌های مختلف گیاهی دامنه وسیعی از فرایندهای مقاومت به خشکی را نشان می‌دهند که منجر به ایجاد سازگاری‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌گردد. برای مثال پرولین یکی از اسیدهای آمینه فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش به‌سزایی دارد اگرچه پرولین در همه اندام‌های گیاه در تنش تجمع می‌یابد ولی سریع‌ترین انباشت را در برگ‌ها خواهد داشت، تجمع پرولین در ریشه‌ها با تأخیر زمانی نسبت به تجمع در برگ‌ها صورت می‌گیرد (Ghani et al., 2011).

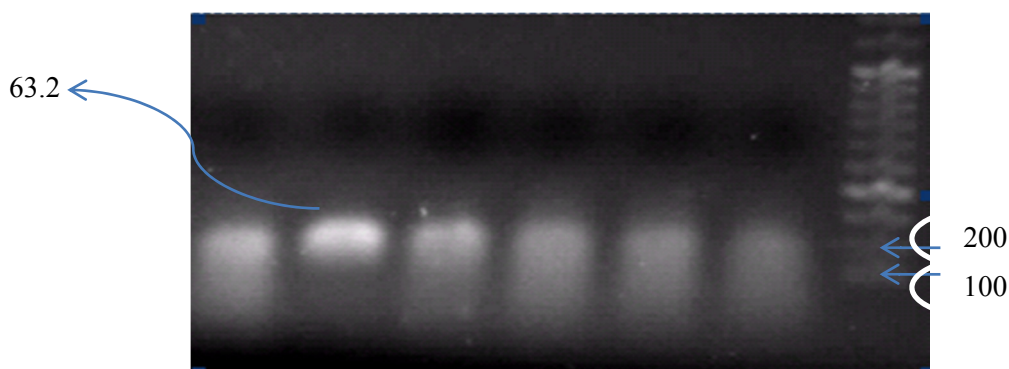
نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای مناسب ژن 18s گرادیانته دمایی برای بررسی دمای اتصال پرایمر ژن 18s انجام شد که مناسب‌ترین دمای اتصال پرایمر موردنظر ۵۹ به دست آمد شکل (۵).

نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای مناسب ژن *NAC67* گرادیانته دمایی برای بررسی دمای اتصال پرایمر ژن *NAC* نشان داد که بهینه‌ترین دمای اتصال پرایمر موردنظر ۶۳/۲ درجه سانتی‌گراد بود شکل (۴).



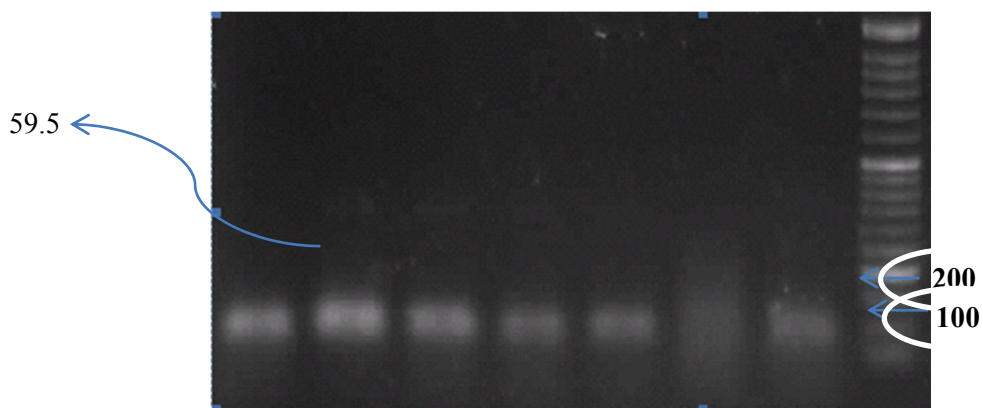
شکل ۳. RNA استخراج شده از برگ گیاه گندم

Fig. 3. RNA extracted from wheat leaf



شکل ۴. نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای ژن *NAC*

Fig 4. The result of PCR to determine the temperature of the NAC gene



شکل ۵. نتیجه حاصل از PCR برای تعیین دمای ژن 18s

Fig 5. The result of PCR to determine the temperature of the 18s gene



### نتایج منحنی ذوب ژن *NAC67* و *18s*

از جمله خصوصیات و مزایای Real time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرایند PCR انجام می‌شود. عدم وجود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر عدم وجود پرایمر دایمر است و آغازگرها تقابلی با هم ندارند. واکنش دارای بازدهی مناسبی برای تعیین کمیت بیان ژن است.

### نتایج نمودار تکثیر ژن *NAC67* و *18s*

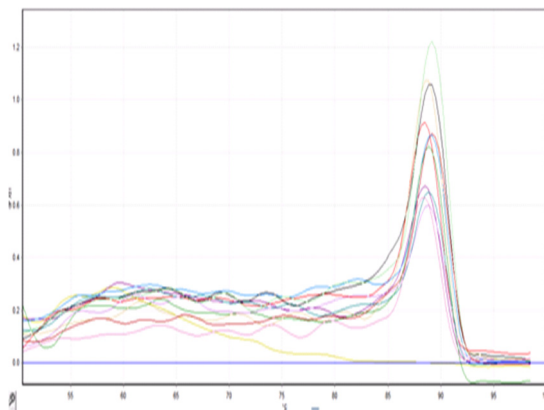
به اولین چرخه‌ای که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه (Threshold) باشد چرخه آستانه یا CT گویند. عدد CT با مقدار الگوی اولیه رابطه معنی‌داری دارد و از روی آن می‌توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. این چرخه (سیکلی از

PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه عبور می‌کند) به‌عنوان CT شناخته می‌شود.

### نتایج تغییرات بیان ژن

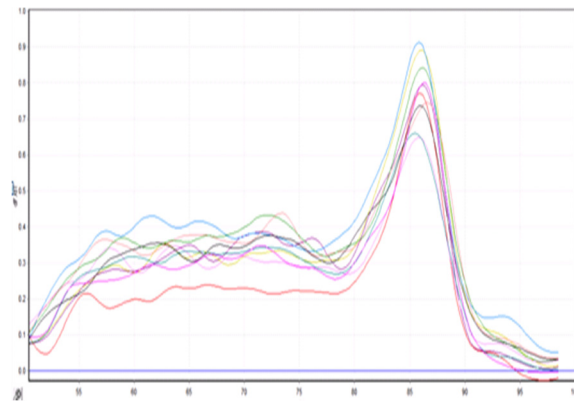
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۵) که تأثیر بلوک، تنش خشکی و اثر متقابل رقم در تنش خشکی تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان دادند. ولی اثر رقم معنی‌دار نشد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که (شکل ۳) که رقم هیرمند در سطح ۵ درصد بیشترین میزان بیان ژن با مقدار ۲/۹۶ نسبت به سایر ارقام اختصاص داد که تفاوت معنی‌داری با رقم کویر در سطح ۱۰ درصد با مقدار ۰/۱۶ که کمترین میزان را نشان داد، داشت.



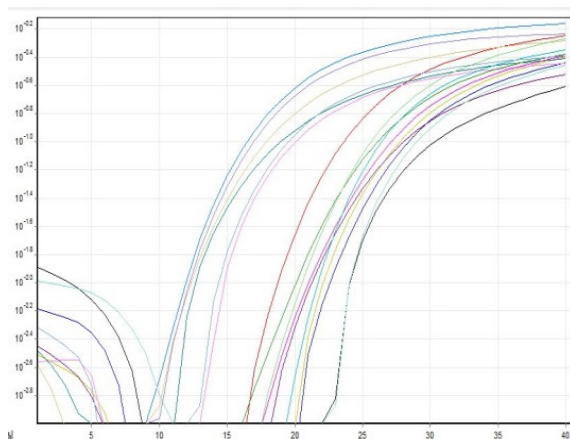
شکل ۷. منحنی ذوب ژن *18s* گیاه گندم

Fig. 7. *18s* gene Melting Curve of Wheat Plant



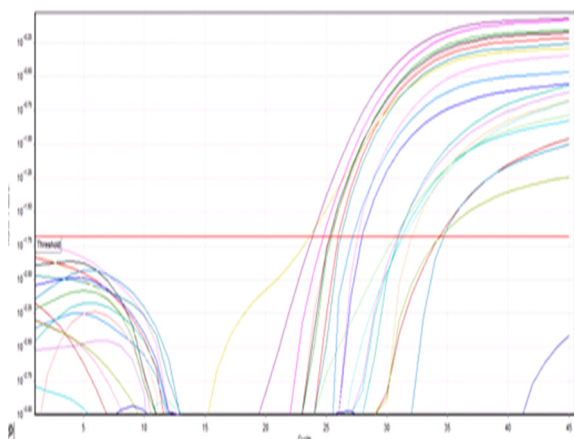
شکل ۶. منحنی ذوب ژن *NAC* گیاه گندم

Fig. 6. *NAC* gene Melting Curve of Wheat Plant



شکل ۹. منحنی تکثیر ژن *18s* گیاه گندم

Fig. 9. *18s* gene Amplification curve of wheat plant



شکل ۸. منحنی تکثیر ژن *NAC* گیاه گندم

Fig. 8. *NAC* gene Amplification curve of wheat plant

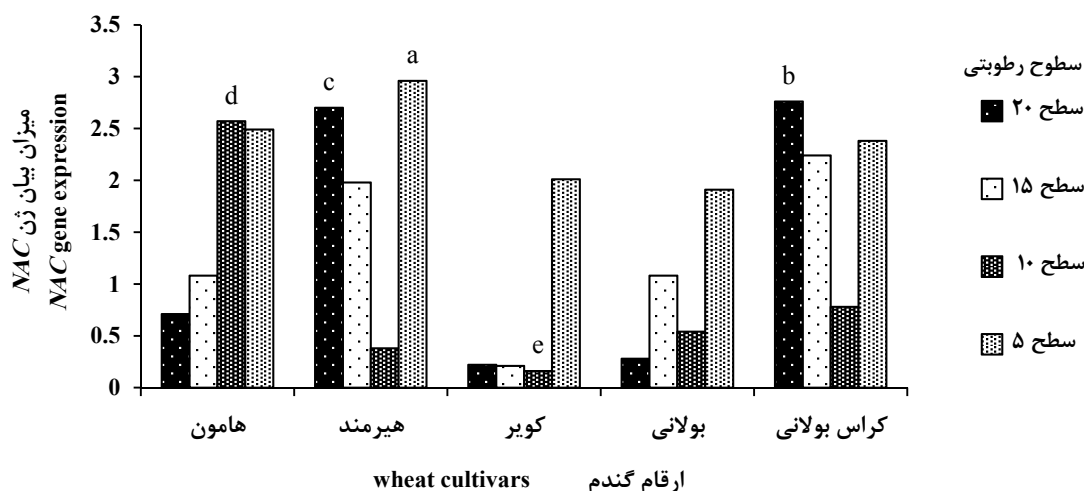
جدول ۶. نتایج تجزیه واریانس بیان ژن TaNAC67

Table 6. Analysis of the variance of TaNAC67 gene expression

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی Df	$\Delta\Delta\text{T}$
Block	بلوک	2	0.013**
Moisture Levels (D)	سطوح رطوبتی	3	3.128**
Genotype (G)	رقم	4	10.95 <sup>ns</sup>
G × D	اثر متقابل	12	2.99**
Error	خطا	38	0.503
CV (%)	ضریب تغییرات (%)	-	7.26

<sup>ns</sup>, \* و \*\*: به ترتیب عدم معنی‌داری و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

<sup>ns</sup>, \* and \*\* respectively Dmmnydary significant difference in levels one and five percent.



شکل ۳. میزان بیان ژن NAC پنج رقم گندم نان در سطوح مختلف رطوبتی

Fig. 3. NAC gene expression of five wheat cultivars in levels of different moisture

(Dubos et al., 2010). ژن‌های NAC فاکتور رونویسی خاص گیاهی هستند که نقش مهمی در توسعه گیاهان از طریق تنش زنده و غیرزنده بازی می‌کند در گندم نان ژن SNAC1 به‌وضوح افزایش حساسیت ABA بیشتری و به‌طور قابل توجهی بهبود تحمل به تنش خشکی را نشان داده‌اند که بیان می‌کنند ژن SNAC1 یک نامزد بالقوه برای افزایش تحمل به خشکی در گندم نان بوده است. ABA هورمون مهم در تنظیم باز و بسته شدن روزنه است این نقش مهم در بافت رویشی تحت تنش کم‌آبی، ترویج بسته شدن روزنه‌ها و تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های کنترل‌کننده کم‌آبی است حساسیت بالاتر ABA در گندم نان ممکن است بسته شدن روزنه‌ها را

پژوهشی با بازسازی شبکه ژنی درگیر و ترسیم تصویر روشن‌تری از نحوه پاسخ‌دهی گیاه جو به تنش خشکی و شناسایی ژن‌های کلیدی مربوطه انجام شد. بدین منظور ژن‌های کلیدی در بافت برگ از مقالات علمی گردآوری شد. ۱۷۲ ژن شناسایی گردید و شبکه ژنی و شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین برای این ژن‌ها به‌طور جداگانه ترسیم شد. در مجموع عوامل رونویسی بیشترین تعداد را بین ژن‌های مؤثر دارا بودند که نشان‌دهنده اهمیتشان در مکانیسم تحمل به خشکی است (Javadi et al., 2016).

بسیاری از ژن‌های NAC تنظیم‌کننده تعداد پنجه، توسعه دیواره سلولی، بزرگ شدن ریشه و پیری محصول هستند

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصله از این مطالعه که بر روی پنج رقم گندم نان منطقه سیستان تحت سطوح رطوبتی انجام شد، مشاهده شد که با افزایش سطوح تنش خشکی ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد ظرفیت زراعی نسبت به سطح شاهد ۲۵ درصد، میزان بیان نسبی ژن NAC افزایش یافت. به طوری که بیان ژن در سطح رطوبتی ۵ درصد رقم هیرمند با مقدار ۲/۹۶ بیشترین مقدار بود. همچنین با افزایش سطوح رطوبتی مقدار پرولین و آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز در ارقام مورد مطالعه افزایش نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در رقم هیرمند مشاهده شد. لذا بر اساس نتایج حاصله از بررسی بیان ژن NAC و میزان تغییرات پرولین و آنزیم پلی فنل اکسیداز در بین ارقام مورد بررسی، رقم هیرمند و کراس بولانی نسبت به سطوح رطوبتی مختلف عکس‌العمل بهتری نشان دادند در نتیجه با توجه به هم‌پوشانی نتایج مولکولی و صفات مورد مطالعه، رقم هیرمند بهترین عکس‌العمل را تحت این شرایط برخوردار بود. لذا پیشنهاد می‌شود به منظور تأیید نتایج حاصله سایر آزمایش‌های تکمیلی روی رقم هیرمند انجام شود تا بتوان از طریق مطالعات آزمایشگاهی ارقام یا ژنوتیپ‌ها را از نظر تنش‌ها و به خصوص تنش خشکی در زمان کمتری دسته‌بندی نمود.

تحریک و به حفظ آب و افزایش بقای کمک کند بنابراین بررسی ژن SNAC برای مهندسی ژنتیک و تولید ارقام گندم نان با بهبود مقاومت به تنش خشکی دارای اهمیت است (Saad et al., 2013).

در مطالعه‌ای نقش ژن NAC در تحمل به تنش غیرزنده برنج مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل بیان این ژن در برنج نشان داد که این ژن در تنش خشکی، شوری بالا و دمای پایین القا می‌شود و باعث افزایش تحمل گیاه برنج در تنش‌های غیرزنده می‌شود (Zheng et al., 2009). بیان ژن NAC در تحمل به تنش خشکی در نخود مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس دو کتابخانه cDNA از برگ نهال گیاه نخود فرآوری شده و یک ژن CarNAC3 از آن جدا شد. نتایج نشان داد که ژن CarNAC3 موجود ۲۸۵ اسید آمینه و یک دومین NAC دارد که در یک هسته متمرکز بوده و از فعالیت ترانس فعال در پایانه C- برخوردار است و باعث افزایش تحمل گیاه نخود در تنش‌های غیرزنده می‌شود (Peng et al., 2009). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که در مجموع با کاهش سطوح رطوبتی میزان بیان نسبی ژن NAC در ۵ رقم گندم نان مورد بررسی افزایش یافت و بیشترین میزان بیان آن در پایین‌ترین سطح رطوبتی (۵ درصد) مشاهده شد که با نتایج تحقیقات گذشته مطابقت دارد.

### منابع

- Abogadallah, G.M., 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling and Behavior* 5(4), 369-374. [In Persian with English summary].
- Ackerson, R.C., 1980. Stomatal response of cotton to water stress and abscisic acid as affected by water stress history. *Plant Physiology*. 65, 455-459.
- Agarwal, S., Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*. 48, 555-560
- Ajjith, T.A., Janardhanan, K.K., 2007. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 40(3), 157-162.
- Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., Vakhitov, V.A., 2003. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry*. 68(9), 945-951.
- Amiri Deh Ahmadi, S.R., Ganjeali Mohamadi, E., 2010. Effects of drought stress on morphological characteristics and yield components in different phenological stages of chickpea (*Cicer arietinum* L) greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Research*. 8(1), 157-166. [In Persian with English summary].
- Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*. 27(1), 84-93.
- Ashraf, M., 2010. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*. 28(1), 169-183.
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M., 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf) cultivars

- performing differently in arid conditions. *Plant Science*. 160, 669-681.
- Bates, S., Waldern, R.P., Teare, E.D., 1973. Rapide determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soli*. 39, 205-207.
- Cai, H., Tian, S., Dong, H., Guo, C., 2015. Pleiotropic effects of *TaMYB3R1* on plant development and response to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Gene*. 558, 227-234.
- Ceccarelli, S., 2010. Drought and drought resistance. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*. 1, 205-207.
- Cook, R.J., Veseth, R.J., 1991. Wheat health management (p. 152). St. Paul, MN: APS Press.
- Dai, H.P., Shan, C.J., Wei, A.Z., Yang, T., Sa, W.Q., Feng, B.L., 2012. Leaf senescence and photosynthesis in foxtail millet (*Setaria Italica* L. P. Beauv) varieties exposed to drought conditions. *Australian Journal of Crop Science*. 6(2), 232-237.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57(5), 779-795.
- de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C.E.B., Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 56, 87-94.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*. 4, 215-223.
- Du, J. B., Yuan, S., Chen, Y. E., Sun, X., Zhang, Z. W., Xu, F., Lin, H. H., 2011. Comparative expression analysis of dehydrins between two barley varieties, wild barley and Tibetan hulless barley associated with different stress resistance. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33(2), 567-574.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*. 15(10), 573-581.
- Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M., Shekari, F., 2011. The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms on wheat seedling. *Fresenius Environmental Bulletin*. 20(8), 2021-2036.
- FAO, F., 2015. Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment. FAO, Rome, Italy.
- Farshadfar, E., Farshadfar, M., Sutka, L., 2000. Combining ability analysis of drought tolerance in wheat over different water regimes. *Acta Agronomica Hungarica*. 48(4), 353-361.
- Ghani, F., Ghasemi PirBaloti, A., Hamed, B., Malekpour, F., 2011. Effect of different levels of water and nitrogen on morphological, physiological and physiological traits of *Matricaria aurea* L. herbal remedies. 2(2), 101-111. [In Persian with English summary].
- Gharbi, A., Rashid I.N., Tarynzhad. A.S, Chlbyyany. Q., 2013. Salinity and drought tolerance of durum wheat lines under greenhouse conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*. 4(28), 393-410. [In Persian with English summary].
- Ghasemi Pirbalouti, A., Samani, M. R., Hashemi, M., Zeinali, H., 2013. Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak) under reduced irrigation. *Plant Growth Regulation*. 72(3), 289-301.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(12), 909-930.
- Guo, X.Y., Zhang, X.S., Huang, Z.Y., 2010. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. *Journal of Plant Ecology*. 3(2), 79-87.
- Hartung, W., 1983: The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. *Plant, Cell and Environment*. 6, 427-428
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F., 2001. Antioxidant Systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Journal of Plant Physiology*. 127(3), 817-831.
- Hissao, T., 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Biology*. 24, 519-570.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupyand, P.M.J., Nicolas, J., 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 38, 926-931.

- Javadi, S. M., Shabr, Z. S., Pour Abed, A., Ghadiri, Sh., 2016. Reconstruction and Analysis of Drought Tolerance Gene Networks in *Hordeum Vulgare* Leaf. The First International Conference and the 9th National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran. 3-5 May. International Center of Shahid Beheshti University. [In Persian with English summary].
- Lata, C., Jha, S., Dixit, V., Sreenivasulu, N., Prasad, M., 2011. Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of *foxtail millet* cultivars. *Protoplasma*. 248(4), 817-828.
- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 25(4), 402-408.
- Mardeh, A. S. S., Ahmadi, A., Poustini, K., Mohammadi, V., 2006. Evaluation of drought resistance indices under various environmental conditions. *Field Crops Research*. 98(2): 222-229.
- Metwali, M.R., Ehab-Manal, H., Tarek, E., Bayoumi, Y., 2011. Agronomical traits and biochemical genetic markers associated with salt tolerance in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(5), 174-183.
- Mieeler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(9), 405-415.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7, 405-410.
- Nickavar, B., Kamalinejad, M., Hajyahya, M., Shafagh, B., 2006. Comparison of the free radical scavenging activity of six Iranian *Achillea* species. *Pharmaceutical Biology*. 44, 208-212.
- Oberts, J., Tucker, G.T., 1998. *Plant Hormone*. Humana press.
- Ornish, K., Zeevaart, J.A.D., 1985b: Abscisic acid accumulation by roots of *Xanthium strumarium* L. and (*Lycopersicon esculentum* Mill.) In relation to water. *Plant Physiology*. 79: 653-658.
- Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., Bohnert, H. N., 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought-and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*. 48(5), 551-573.
- Peng, H., Cheng, H.Y., Chen, C., Yu, W., Yang, N., Gao, W., Ma, H., 2009. A NAC transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum* L), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. *Journal of plant Physiology*. 166(17), 1934-1945.
- Powell, L. M., Pfdifer, P., 1956. The effect of controlled limited moisture on seedinas of cheyenne winter wheat selections. *Agronomy Journal*. 48, 555-557.
- Rahaei, M., Naghavi, M., Alizadeh, H., Malboobi, M.A., Abdemishani, S., Cyrus, Shank, P., Jupp, G., 2009. Investigation of MYB gene expression pattern in wheat (*Triticum aestivum* L.) under two short-term salinity and cold stresses using qRT-PCR. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 41(3), 436-433. [In Persian with English summary].
- Ranney, T.G., Bassuk, N.L., Whitlow, T.H., 1991. Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(4), 684-688.
- Rascio, A., Russo, M., Platani, C., Difonzo, N. 1998. Drought intensity effects on genotypic differences in tissue affinity for strongly bound water. *Plant Science*. 132, 121-126.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K. V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161(11), 1189-1202.
- Riechmann, L., Ratcliffe, O.J., 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Journal of Current Opinion in Plant Biology*. 3, 423-434.
- Saad, A.S.I., Li, X., Li, H.P., Huang, T., Gao, C.S., Guo, M.W., Liao, Y.C., 2013. Arice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. *Plant Science*. 203, 33-40.
- Sahrawat, A.K., Becker, D., Lutticke, S., Lorz, H., 2003. Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. *Plant Science*. 165(5), 1147-1168.
- Sardmadnia, H., Kochaki, A., 1994. The Importance of Environmental Stresses in Agriculture. *First Iranian Plant Breeding and*

- Congress. Agricultural University of Karaj, Tehran Agricultural University, pp. 169-157. [In Persian with English summary].
- Shabestari, M., 1990. Crop Physiology. Academic Publication Center, Tehran, 214P. [In Persian with English summary].
- Solomon, A., Beer, S., 1994. Effect of NaCl on the carboxylating activity of rubisco and absence of proline related compatible solutes Plant. Physiology. 108, 1387-1394.
- Tarohomi, P., Lahooti, D., Abbasi, P., 2010. Effects of drought stress on soluble sugars, chlorophyll and potassium of *Salvia leriifolia* Benth. Journal of Biological Sciences. 3(2), 1-7. [In Persian with English summary].
- Tardieu, F., 2012. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought Scenario. Journal of Experimental Botany. 63(1), 25-31.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science. 168(1), 223-231.
- Turner, N.C., 1986. Adaptation to water deficits: A changing perspective. Austral Journal Plant Physiology. 13, 175-190.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J., 2006. A *NAC* gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. Science. 314, 1298-1301.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(21), 11632-11637.
- Xoconostle-Cázares, B., Ramirez-Ortega, F. A., Flores-Elenes, L., Ruiz-Medrano, R., 2010. Drought tolerance in crop plants. American Journal of Plant Physiology. 5(5), 1-16.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., Shinozaki, K., 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. Plant and Cell Physiology. 33(3), 217-224.
- Yar Hussain, M., Heydariyan, Z., Nezaei, A., Ramezani, I., 2011. Examined the expression levels of two genes encoding the transcription factors related -*MYB* family in two varieties of wheat under salt stress. National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. [In Persian].
- Zhang, J., Kirkham, M.B., 1995. Water relations of water-stressed, split-root C4 (*Sorghum bicolor*) and C3 (*Helianthus annuus*) plants. American Journal of Botany. 1220-1229.
- Zhao, X., Kang, M., Ren, M., Chen, S. 1995. Analysis on combining ability of yield characters in common wheat. Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 10: 38-41.
- Zheng, X., Chen, B., Lu, G., Han, B., 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. Biochemical and Biophysical Research Communications. 379(4), 985-989.
- Zhu, J.K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current Opinion in Plant Biology. 6(5), 441-445.