University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 16, No. 3, pp. 765-785 (Fall 2023)

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.4970.2094

Original article

The effect of drought stress on enzymatic and molecular changes of some antioxidants in parental and mutant bread wheat genotype using RNAseq. data

M. Radfar[1], S.S. Ramezanpour[2*], H. Soltanloo[2], L. Kianmehr[3]

1. *PhD student in nuclear agriculture and plant biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,Gorgan, Iran*
2. *Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Gorgan, Iran*
3. *Postdoctoral Researcher Fellow, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran*

Received 20 Decdmber 2021; Accepted 19 February 2022

Extended abstract

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important grains used in the world and its production is reduced in different regions due to drought stress. the plant antioxidant system can scavenge the reactive oxygen species (ROS) produced under drought. Induction of mutation using gamma ray is one of the common methods for genetic modification and identification of tolerant and resistant mutants. Mutant T65-58-8 is one of these drought tolerant genotypes that has been obtained by irradiation to Tabasi wheat genotype. The wheat plant needs irrigation during the flowering stage and drought stress is very important in this stage. In this study, in the flowering stage, the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX) involved in the mechanisms of tolerance to oxidative damage of ROS in the flag leaf were studied and the expression of the genes related to these enzymes was investigated using RNAseq. method.

Materials and methods

Drought stress was applied based on field capacity (FC). The experiment was performed as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. Factors studied in this experiment include genotype at two levels (Tabasi parent and Mutant T65-58-8) and drought stress at 5 levels (100% FC or control, 75%, 22%, re-sampling from control pots at 18% FC and sampling after re-irrigation to the pot when had 90% FC). Wheat growth stages can be studied by Zadoks index. SOD activity was measured by Minami and Yoshikawa method, CAT activity by Aebi method, GR activity by Foyer and Halliwell method and GPX activity by Hopkins and Tudhope method. RNA sequencing was performed using Illumina NovaSeq 6000. Gene expression was obtained based on sequencing data by Bowtie2, Tophat2, HTseq-count and Featurecount softwares. After normalization by generating FPKM, Log2FC gene expression was calculated.

Results and discussion

Examination of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX) indices showed a significant difference ($p<0.01$). Comparisons showed

* Corresponding author: Seyedeh Sanaz Ramezanpour; E-Mail: ramezanpours@gau.ac.ir

© 2023, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

that SOD and CAT activity was higher in the mutant genotype at all stress levels. In the Tabasi genotype, re-irrigation increased the activity of SOD and CAT enzymes compared to the activity of this enzyme in field capacity 18%. In the study of GR and GPX enzymes, it was found that in both genotypes, the activity of this enzymes ancreases with increasing drought stress. In the Tabasi genotype, irrigation reduced the activity of GR enzyme and in the Tabasi and mutant genotypes, re-irrigation did not reduce the activity of GPX enzyme. Examination of GPX activity showed that this enzyme has a constant activity in mutant genotype under drought stress conditions. Examination of 21 genes related to SOD enzymes showed that six genes named *FSD3*(1), *CSD1*(2), *FSD2*(2) and *CCS*(1) mutant genotype had significant expression changes in drought stress conditions compared to the control. 6 catalase-related *CAT1*(3) and *CAT2*(3) genes from 14 genes related to CAT also had a significant increase in mutant genotype under drought stress compared to the control. One *CAT1* gene and two *CAT2* genes in mutant genotype had more expression in drought conditions than Tabasi genotype. 7 genes called *CSA* associated with GPX from 16 genes related to GPX also had a significant increase in mutant genotype under drought stress compared to the control. H_2O_2, KCN, chloroform-ethanol, sodium azide (NaN_3), metal ions, carbohydrates, polyethylene glycol affect the activity of SOD. NaN_3, amines, potassium cyanide and salicylic acid affect the activity of CAT. Gold, vitamin-E and selenium can also affect GPX activity.

Conclusion

The study shows that the activity of SOD, CAT and GPX enzymes in both genotypes has increased under drought stress conditions. However, comparison of the expression of known genes related to these three enzymes shows that only some of these known genes have been altered. One *FSD3* gene, two *CSD1* genes, two *FSD2* genes and one *CCS* gene had significant expression changes in the mutant genotype under drought stress compared to the control. This could be considered as confirmation of the increase in superoxide dismutase activity in the mutant genotype under drought stress, but the difference in expression of these 6 genes in the mutant genotype under drought stress compared to the Tabasi genotype under drought stress was not significant. This indicates that other factors in the mutant genotype under drought stress have increased the activity of SOD enzyme or limited the production or activity of this enzyme in the Tabasi genotype under drought stress. from the 6 altered genes expressed in the mutant genotype under drought stress compared to the control, one gene called *CAT1* and two genes called *CAT2* in the mutant genotype under drought stress showed more expression than the Tabasi genotype under drought stress. These genes can be introduced as genes involved in more tolerance of mutant genotype to drought stress than Tabasi genotype under drought stress. 7 genes called *CSA* had a significant change in expression in the mutant genotype under drought stress compared to the control, but these genes were not significantly different in the mutant genotype compared to the Tabasi under drought stress. Comparison of glutathione reductase enzyme in mutant and Tabasi genotypes in drought condition showed that the activity of this enzyme in the two genotypes was not significantly different. The activity of SOD, CAT and GPX enzymes can be inhibited or intensified by chemical agents and compounds.

Keywords: Altered gene expression, Enzymatic antioxidants, Field capacity, Mutant wheat, RNA sequencing

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد شانزدهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۲

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.4970.2094

مقاله پژوهشی

تأثیر تنش خشکی بر تغییرات آنزیمی و مولکولی برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در ژنوتیپ والدی و جهش‌یافته گندم نان با استفاده از داده‌های RNAseq

میثم رادفر[۱]، سیده ساناز رمضانپور[۲*]، حسن سلطانلو[۲]، لیلا کیانمهر[۳]

۱. دانشجوی دکتری کشاورزی هسته‌ای و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. محقق پسادکتری، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی
تغییر بیان ژن
توالی‌یابی RNA
ظرفیت زراعی
گندم موتانت

تاریخ دریافت:
۱۴۰۰/۰۹/۲۹

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۰/۱۱/۳۰

تاریخ انتشار:
پائیز ۱۴۰۲

۱۶(۳): ۷۶۵-۷۸۵

چکیده

گندم یکی از مهم‌ترین غلات جهان بوده و میزان تولید آن در مناطق مختلف تحت تأثیر خشکی کاهش می‌یابد. موتانت T65-58-8 یک ژنوتیپ متحمل به خشکی است که با پرتودهی به گندم طبسی ایجاد شده است. در این تحقیق در مرحله گلدهی به مطالعه آنزیم‌های دخیل در مکانیسم‌های تحمل به خسارت اکسیداتیو ناشی در برگ پرچم پرداخته شده و بیان ژن‌های مرتبط با این آنزیم‌ها نیز با استفاده از روش RNAseq بررسی شد. مقدار تنش خشکی بر اساس ظرفیت زراعی اعمال گردید. بررسی شاخص‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نشان داد در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با افزایش تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در هر دو ژنوتیپ افزایش یافته است و این افزایش در ژنوتیپ موتانت بیشتر از والد طبسی بود. بررسی ۲۱ ژن مرتبط با آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نشان داد که بیان یک ژن *FSD3*، دو ژن *CSD1*، دو ژن *FSD2* و یک ژن *CCS* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد تغییر بیان معنی‌داری داشتند. از ۱۴ ژن مرتبط با کاتالاز، ۳ ژن با نام *CAT1* و ۳ ژن با نام *CAT2* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌اند. یک ژن *CAT1* و دو ژن *CAT2* در ژنوتیپ موتانت در شرایط خشکی دارای بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ والد طبسی بود. افزایش تنش خشکی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده و فعالیت این آنزیم‌ها در ژنوتیپ والد بیشتر از ژنوتیپ موتانت بود. از ۱۶ ژن مرتبط با گلوتاتیون پراکسیداز تعداد ۷ ژن با نام *CSA* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX می‌تواند تحت تأثیر عوامل و ترکیبات شیمیایی مهار یا تشدید شود.

مقدمه

جمعیت جهان در حال افزایش است و گیاهان یکی از اصلی‌ترین منابع تأمین انرژی برای این جمعیت در حال افزایش می‌باشند. به دلیل چالش‌های آب‌وهوایی و تأثیر تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده روی عملکرد گیاهان، افزایش بهره‌وری در کاشت، داشت و برداشت و جلوگیری از خسارت، همواره یکی از دغدغه‌های مهم جامعه بشری بوده است.

غلات اصلی‌ترین گیاهان در حال کشت در روی زمین هستند و گندم به‌عنوان یک عضو از این خانواده نسبت به سایر غلات با میزان تولید کمی بیش از ۷۳۴ میلیون تن پس از ذرت (*Zea mays* L.) و برنج (*Oryza sativa* L.) در رتبه سوم جهان از نظر مقدار تولید و با کمی بیش از ۲۱۴ میلیون هکتار در رتبه اول جهان از نظر سطح برداشت قرار دارد (FAO, 2018).

* نگارنده پاسخگو: سیده ساناز رمضان‌پور. پست الکترونیک: ramezanpours@gau.ac.ir

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) یکی از غلات مهمی است که به دلیل غنی بودن از لحاظ مواد مغذی و قابلیت تهیه انواع غذاها، در سرتاسر جهان مورداستفاده قرار می‌گیرد. در چند وقت اخیر، مصرف گندم به‌شدت افزایش‌یافته است. هرچند استفاده کامل یا به شکل تصفیه‌شده آن سودمند است اما در مصرف آن اثرات منفی نیز مشاهده شده است (Gayathri and Rashmi, 2016). حدود ۹۵ درصد گندم تولیدشده در جهان از نوع نان است (Peng et al., 2011).

کشور ایران با مساحتی حدود ۱۶۵ میلیون هکتار در محدوده ۲۵ تا ۴۰ درجه عرض جغرافیایی و در یکی از مناطق بسیار خشک جهان واقع شده است. متوسط میزان بارندگی در ۷۰ درصد کشور کمتر از ۲۵۰ میلی‌متر در سال است (Mesgaran et al., 2016; Alimohamadi, 2002). در ایران مانند بسیاری از کشورهای جهان، نان حاصل از گندم مهم‌ترین ماده غذایی روزانه و قوت اصلی را تشکیل می‌دهد و نقش عمده‌ای در تأمین انرژی و پروتئین موردنیاز بدن را بر عهده دارد (Noormohammadi et al., 2007). کشت بهینه گندم در ایران با چالش‌های گوناگونی مواجه است. آفت‌ها و بیماری‌ها، کاشت عمده به‌صورت دیم، وجود ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف، فرسودگی ادوات و تجهیزات مربوط به کاشت و برداشت، قابلیت تأمین و استفاده مناسب از بذر، کود و سموم و نیز شرایط آب‌وهوایی و به‌ویژه اقلیم خشک و کم‌بارش کشور ازجمله بخشی از چالش‌های کشت گندم در ایران است.

تنش خشکی به محدودیت آب در یک دوره‌ی زمانی طولانی اطلاق می‌گردد (Gokcay, 2012). امروزه یکی از چالش‌های مهم برای رشد گندم در کل جهان کمبود آب است که منجر به کاهش عملکرد این گیاه زراعی در بیش از ۷۰ درصد زمین‌های زراعی گردیده است و در آینده نزدیک که فعالیت‌های کشاورزی به مناطق با حاصلخیزی کمتر برای پاسخ به نیازهای فزاینده غذایی بشر گسترش می‌یابند، محدودیت آب اهمیت بیشتری خواهد یافت (Flexas et al., 2013; Foley et al., 2011).

مرحله پر شدن دانه‌ها و پیش از گلدهی بحرانی‌ترین مراحل رشد و نمو گندم به تنش خشکی است (Rajaram et al., 1996; Reddy et al., 2004a). تنش خشکی با تأثیر بر عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند فتوسنتز، سنتز کلروفیل، متابولیسم مواد مغذی، جذب و انتقال یون، تنفس و متابولیسم کربوهیدرات‌ها، رشد گیاه را کاهش می‌دهد (Jaleel et al., 2008; Farooq et al., 2009; Li et al., 2011). در طول تنش خشکی، محدودیت غلظت CO_2 بین سلولی منجر به تجمع اجزای انتقال الکترون فتوسنتزی می‌شود که می‌تواند اکسیژن مولکولی را کاهش دهد و درنتیجه باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] که برای دستگاه فتوسنتز مضر است، شود (Basu et al., 2016).

روی‌هم‌رفته، قرار گرفتن گیاه در معرض نور بیش‌ازحد دائمی و کم بودن دی‌اکسید کربن، الکترون‌ها را به سمت مولکول اکسیژن هدایت می‌کند و منجر به تولید ROS می‌شود (Asada, 2006). درواقع، هنگامی‌که نور دریافت شده توسط سیستم‌های نوری گیاه، نتواند برای فتوسنتز یا تنفس نوری استفاده شود و به‌صورت گرما نیز نتواند دفع شود، باعث انفجار اکسیداتیو می‌شود، مکانیسمی که در بسیاری از تنش‌ها مشترک است (Chaves et al., 2003). در بین اجزای سلول گیاهی، لیپیدهای غشایی و ماکرومولکول‌ها مانند DNA و پروتئین‌ها ممکن است توسط ROSهایی مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) یا اکسیژن تک ($^1O_2$) آسیب ببینند (Kasim et al., 2013). تنش خشکی نیز باعث تولید ROSها خصوصاً رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن می‌شود (Reddy et al., 2004b).

آسیب‌های ناشی از ROS و اختلال در شرایط پایدار سلولی[2] با عملکرد آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مختلف مانند کاتالاز (CAT)[3]، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)[4]، پراکسیداز (POD)[5]، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)[6]، آسکوربات پراکسیداز (APX)[7]، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)[8] و عملکرد آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی مانند اسید اسکوربیک[9]،

[1] Reactive Oxygen Species
[2] Homeostasis
[3] Catalase
[4] Superoxide Dismutase
[5] Peroxidase
[6] Glutathione Reductase
[7] Ascorbate Peroxidase
[8] Glutathione Peroxidase
[9] Ascorbic acid (vitamin C)

کاروتنوئیدها[1]، آلفا-توکوفرول‌ها[2] و افزایش محتوای گلایسین بتائین و مقدار گلوتاتیون، کاهش می‌یابد (Gill and Tuteja, 2010; Chen et al., 2016; Hussain et al., 2016). بر اساس سطوح تولید ROSها، میزان سم‌زدایی در گیاهان توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و یا غیر آنزیمی تنظیم می‌شود. تحمل گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی با مکانیسم تولید ROS و مهار آن توسط ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط دارد (Gill and Tuteja, 2010).

سوپر اکسید دیسموتازها (SODs) آنزیم‌های حاوی فلز هستند که باعث تغییر شکل رادیکال‌های سوپر اکسید (O_2^-) به اکسیژن (O_2) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شوند (واکنش ۱). این آنزیم در همه موجودات هوازی موردبررسی قرار گرفته است و نقش مهمی در دفاع در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن که به‌عنوان محصولات جانبی بسیاری از اکسیداسیون‌های بیولوژیکی تولید می‌شوند، ایفا می‌کند. شرایط محیطی می‌توانند تولید رادیکال‌های اکسیژن را تشدید کنند و درنتیجه پیشنهاد شده است که SOD برای تحمل تنش گیاه مهم است (Bowler et al., 1994).

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) پالاینده اصلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن است؛ بنابراین SOD دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن اطلاق می‌شود. این آنزیم با پایین نگه‌داشتن غلظت سوپر اکسید باعث می‌شود که تشکیل رادیکال هیدروکسیل نیز به حداقل برسد. فرم‌های آیزوزایمی مختلفی از این آنزیم در گیاهان شناسایی‌شده است.

واکنش ۱: $2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$

کاتالاز یک آنزیم رایج است که تقریباً در تمام موجودات زنده در معرض اکسیژن (مانند باکتری‌ها، گیاهان و حیوانات) یافت می‌شود. کاتالاز تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (واکنش ۲؛ Chelikani et al., 2004). این آنزیم در محافظت از سلول در برابر آسیب اکسیداتیو توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) بسیار مهم است. به همین ترتیب، کاتالاز دارای یکی از بالاترین تعداد گردش از همه آنزیم‌ها است. یک مولکول کاتالاز می‌تواند میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن را در هر ثانیه به آب و اکسیژن تبدیل کند (Goodsell, 2004).

کاتالاز از چهار زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که هرکدام بیش از ۵۰۰ اسیدآمینه دارند (Boon et al., 2007).

کاتالاز حاوی چهار گروه آهن است که به آنزیم اجازه می‌دهد با پراکسید هیدروژن واکنش نشان دهد (Maehly and Chance, 1954).

واکنش ۲:

$$2H_2O_2 + Catalase \rightarrow 2H_2O + O_2 + Catalase$$

گلوتاتیون (GSH) یک آنتی‌اکسیدان در گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و برخی از باکتری‌ها است. گلوتاتیون قادر است از آسیب دیدن اجزای مهم سلولی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های آزاد، پراکسیدها، پراکسیدهای چربی و فلزات سنگین جلوگیری کند (Pompella et al., 2003). در گیاهان، گلوتاتیون در مدیریت استرس نقش دارد و جزء چرخه گلوتاتیون-آسکوربات است، چرخه‌ای که پراکسید هیدروژن سمی را کاهش می‌دهد (Noctor and Foyer, 1998). گلوتاتیون در حالت‌های کاهش‌یافته (GSH) و اکسیدشده (GSSG) وجود دارد. استرس اکسیداتیو سلولی با نسبت گلوتاتیون کاهش‌یافته به گلوتاتیون اکسیدشده در داخل سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود بدین ترتیب که افزایش نسبت GSSG به GSH نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو بیشتر است (Pastore et al., 2001; Lu, 2013). حالت اکسیدشده توسط NADPH به حالت کاهش‌یافته تبدیل می‌شود. این تبدیل توسط گلوتاتیون ردوکتاز کاتالیز می‌گردد (واکنش ۳).

واکنش ۳:

$$NADPH + GSSG + H_2O \rightarrow 2GSH + NADP^+ + OH^-$$

گلوتاتیون پراکسیداز نام عمومی یک خانواده آنزیمی با فعالیت پراکسیدازی است که نقش بیولوژیکی اصلی آن محافظت از ارگانیسم در برابر آسیب اکسیداتیو است (Muthukumar and Nachiappan, 2010). عملکرد بیوشیمیایی گلوتاتیون پراکسیداز کاهش هیدروپراکسیدهای لیپیدی به الکل‌های مربوطه و کاهش پراکسید هیدروژن آزاد به آب است (Muthukumar et al., 2011). واکنش ۴، واکنش اصلی که گلوتاتیون پراکسیداز را کاتالیز می‌کند، نشان می‌دهد (Bhabak and Mugesh, 2010). گلوتاتیون ردوکتاز سپس توسط واکنش ۵، گلوتاتیون اکسیدشده را برای تکمیل چرخه کاهش می‌دهد.

واکنش ۴: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GS\text{–}SG + 2H_2O$

واکنش ۵:

$$GS\text{–}SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

[1] Carotenoids

[2] α-Tocopherols

درنتیجه می‌توان گفت گلوتاتیون ردوکتاز (GR) نسبت GSH/GSSG را تنظیم و GSH را برای GPX و DHAR فراهم می‌نماید که به ترتیب H_2O_2 را به H_2O تبدیل می‌کند و آسکوربات اکسیدشده را کاهش می‌دهد.

معمولاً یک تا سه روز پس از خیس شدن خاک به‌وسیله باران یا آبیاری، رطوبت موجود در خاک به شرایط نسبتاً پایداری می‌رسد، این حد رطوبت، ظرفیت زراعی (FC)[12] نامیده می‌شود. در این حالت منافذ درشت خاک، آب خود را ازدست‌داده ولی منافذ ریز هنوز پر از آب است و گیاهان می‌توانند از آن استفاده کنند. رطوبت ظرفیت زراعی حد بالایی از رطوبت قابل‌جذب گیاه را نشان می‌دهد و هرچه رطوبت از این حد بیشتر باشد تحت تأثیر نیروی ثقل از خاک و حوزه فعالیت ریشه‌ها خارج می‌شود (Theophilo and Marta, 2010).

اصطلاح اصلاح موتاسیونی[13] (با استفاده از جهش) اولین بار برای اشاره به القاء (گزینش) آگاهانه و توسعه لاین‌های جهش‌یافته به‌منظور بهبود گیاهان زراعی مطرح گردید. این اصطلاح همچنان در مفهوم گسترده‌تری برای بهره‌برداری از جهش‌یافته‌های طبیعی و همچنین خودبه‌خودی[14] و توسعه هر واریته حامل یک جهش شناخته‌شده با هر منبعی، کاربرد دارد (Nouri et al., 2014).

به مجموع تمام رونوشت‌های RNA یک ارگانیسم ترانسکریپتوم گفته می‌شود (Clark, 2005). RNA-Seq (مخفف «توالی‌یابی RNA») یک تکنیک توالی یابی است که از توالی‌یابی نسل آینده (NGS)[15] برای نشان دادن وجود و مقدار RNA، در یک نمونه بیولوژیکی در یک‌لحظه معین، جهت تجزیه‌وتحلیل تغییرات ترانسکریپتوم سلولی استفاده می‌کند (Chu and corey, 2012; Wang et al., 2009). با توجه به کاهش شدید هزینه‌های توالی یابی نسل آینده، بررسی ترانسکریپتوم می‌تواند به رمزگشایی بیان ژن افتراقی بین ارقام یا ژنوتیپ‌های متضاد کمک کند. چنین رویکردی می‌تواند ژن‌های کاندید کنترل‌کننده تحمل به خشکی را در گندم کشف کند (Edwards et al., 2013; Berkman et al., 2012)

مواد و روش‌ها

در این تحقیق دو ژنوتیپ گندم والد طبسی و موتانت T65-58-8 در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مورد کشت و آنالیزهای تحقیقاتی قرارگرفته‌اند. گندم طبسی پابلند و حساس به ورس بوده و نیز یکی از بهترین گندم‌ها برای مناطق خشک و شور ایران است. این رقم در سازمان انرژی اتمی ایران (پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج، البرز، ایران) با هدف مقاومت به ورس موردبررسی و اصلاح قرار گرفته است (Majd and Ardakani, 2003).

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، انجام شد. فاکتورهای موردبررسی در این آزمایش شامل ژنوتیپ در دو سطح (والد طبسی و موتانت T65-58-8) و تنش خشکی در ۵ سطح (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی یا شاهد، ۷۵٪ ظرفیت زراعی، ۲۲٪ ظرفیت زراعی، نمونه‌برداری مجدد از گلدان شاهد در ۱۸٪ ظرفیت زراعی و نمونه‌برداری پس از آبیاری مجدد به گلدان دارای۳۰٪ ظرفیت زراعی در ۹۰٪ ظرفیت زراعی) بود. برای انجام آزمایش از ۳۰ گلدان پلاستیکی ۲۰۰ گرمی به ابعاد دهانه ۲۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۱,۵ سانتی‌متر که هرکدام حاوی ۳۵۰۰ گرم خاک لوم با ترکیب رس، شن و سیلت به نسبت ۲:۲:۱ بود، استفاده شد. هنگام تهیه بستر کشت، به ۲۵۰ کیلوگرم خاک ۱۲/۵ کیلوگرم کود حیوانی اضافه و مخلوط گردید.

برای اندازه‌گیری مقدار ظرفیت زراعی خاک، تعداد ۶ گلدان مشابه آماده و داخل هرکدام از آن‌ها مقدار ۳۵۰۰ گرم از خاک تهیه‌شده برای انجام این آزمایش ریخته شد. ۳ عدد از این گلدان‌ها به‌صورت یکسان آبیاری شدند تا به حالت غرق آب و اشباع درآیند و خاک ۳ گلدان نیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود. (Bilski, 2001; IAEA, 2008). روی ۳ گلدان اشباع، به‌منظور جلوگیری از تبخیر با پلاستیک پوشانده شد. وزن این گلدان‌ها هر ۶ ساعت اندازه‌گیری و ثبت شد. اندازه‌گیری تا زمانی که وزن گلدان‌ها تقریباً ثابت شد ادامه یافت. در این حالت آب ثقلی از خاک اشباع داخل گلدان جدا و از زیر گلدان خارج‌شده و مقدار رطوبت باقیمانده در خاک، آب موجود در نقطه ظرفیت زراعی را نشان می‌دهد. با کم کردن میانگین وزن خاک سه گلدان خشک از خاک سه گلدان مرطوب در نقطه ظرفیت زراعی، میزان آب خاک برای هر گلدان در نقطه

[1] Field Capacity
[2] Mutation Breeding
[3] Spontaneous
[4] Next-Generation Sequencing

ظرفیت زراعی به دست می‌آید. از این اعداد جهت آبیاری گلدان‌ها و حفظ آب در نقطه ظرفیت زراعی استفاده شد.

در هر واحد آزمایشی (گلدان) ۱۰ بذر کشت شد. سپس تعداد بوته‌ها در مرحله گیاهچه‌ای به‌صورت ۵ گیاه در هر گلدان تنک گردید. وزن گلدان‌ها از زمان کاشت بذر تا زمان پنجه‌زنی به‌صورت منظم هر هفته یک‌بار و سپس هفته‌ای دو بار اندازه‌گیری و تا زمان اعمال تنش، با آبیاری، رطوبت آن تا حد ظرفیت زراعی حفظ گردید.

گیاه گندم در طی مرحله گلدهی به آبیاری نیاز داشته و تنش خشکی در این مرحله دارای اهمیت بسیاری است. مراحل رشد گندم توسط شاخص زادوکس (Zadoks et al., 1974) قابل‌مطالعه است. تلقیح در یک سنبله برای تمام سنبله‌ها پس از ۱۰ روز به اتمام می‌رسد و در طول این مدت معمولاً سنبله‌ها به خسارت ناشی از درجه حرارت کم، زیاد یا تنش رطوبت بسیار حساس می‌باشند (Razmi, 2016). لذا بر اساس شاخص زادوکس ۵ روز قبل از رسیدن بوته‌های گندم به مرحله گل‌دهی (زادوکس ۶۰)، آبیاری به گلدان‌ها انجام و ۴ ساعت بعد، نمونه‌گیری از برگ پرچم بوته‌های گندم آغاز شد. در اولین نوبت (زادوکس ۵۵)، نمونه‌گیری از برگ پرچم در حالتی که رطوبت خاک به میزان ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی بود، انجام پذیرفت و به‌عنوان شاهد نام‌گذاری شد. سپس نمونه‌برداری دوم در زادوکس ۶۰، هنگامی‌که رطوبت خاک در ۷۵٪ ظرفیت زراعی بود صورت گرفت. نمونه‌برداری سوم در زادوکس ۶۸ و وقتی رطوبت خاک در ۲۲٪ ظرفیت زراعی بود، انجام شد. بر اساس جدول ۱ دو نمونه‌برداری دیگر نیز در زادوکس ۷۱ انجام گرفت به‌نحوی‌که از گلدان شاهد هنگامی‌که رطوبت آن ۱۸٪ ظرفیت زراعی بود مجدداً نمونه‌برداری شد. سپس از گلدانی که دارای رطوبت به میزان ۳۰٪ ظرفیت زراعی بوده و به آن تا نقطه ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی آبیاری مجدد انجام شده بود، وقتی رطوبت گلدان به ۹۰٪ ظرفیت زراعی رسید نمونه‌گیری انجام شد.

جدول ۱. روز و مقدار رطوبت خاک به هنگام نمونه‌برداری بر اساس شاخص زادوکس و ظرفیت زراعی خاک

Table 1. Day and amount of soil moisture during sampling based on Zadoks index and soil arable capacity.

Sampling	نمونه‌برداری	رطوبت خاک بر اساس ظرفیت زراعی Soil moisture based on Feild Capacity				
Field Capacity	**ظرفیت زراعی**	Control (100%)	(75%)	(22%)	Rewater to 30% (90%)	Second smaple from Control (18%)
Sampling day based on Zadoks index	**روز نمونه‌برداری بر اساس شاخص زادوکس**	55	60	68	71	71

در هر سطح از تنش خشکی، برگ پرچم ۳ بوته از ۵ بوته داخل هر گلدان جدا و به قطعات کوچک تقسیم و با همدیگر ترکیب شد تا تکرار بیولوژیکی مربوط به همان گلدان ساخته شود. در هر مرحله، نمونه جمع‌آوری‌شده از هر گلدان که شامل ترکیب برگ پرچم ۳ بوته داخل همان گلدان بود، به چند قسمت جداگانه برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل مقدار SOD و آزمایش توالی‌یابی RNA تقسیم و هر قسمت داخل فویل استریل آلومینیومی که دارای برچسب اطلاعات نمونه‌برداری بود قرار گرفته و در داخل نیتروژن مایع از گلخانه به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد دانشگاه منتقل شد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس تغییر شیمیایی نیترو بلو تترازولیوم (NBT)، از روش می‌نامی و یوشیکاوا (Minami and Yoshikawa, 1979) استفاده شد. یک واحد فعالیت SOD، مقدار آنزیم موردنیاز برای مهار ۵۰٪ سرعت احیا NBT است. بدین منظور محلول واکنش شامل ۵۵ هزارم مول نیترو بلو تترازولیوم، ۱/۴۲٪ ترایتون X-100، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۶ میلی مول پیروگالول بود. پس از اضافه کردن عصاره نمونه بافت، تغییر جذب در اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر ارزیابی گردید. نتیجه مطابق تعریف مک‌کورد و فریدوویچ (McCord and Fridovich, 1969) و با واحد بین‌المللی بر گرم وزن‌تر برگ پرچم گزارش شد.

فعالیت کاتالاز با مصرف H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه تعیین شد (Aebi, 1984). مخلوط سنجش حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=7)، ۱۵ میلی‌مولار H_2O_2 و ۵۰ میلی‌لیتر عصاره برگ در حجم ۳ میلی‌لیتر بود. یک واحد فعالیت CAT، مقدار مول H_2O_2 تجزیه‌شده در ۱

دقیقه است که به‌صورت واحد بین‌المللی بر گرم وزن تر برگ پرچم گزارش شد.

فعالیت آنزیم GR با روش فویر و هالیول (Foyer and Halliwell, 1976) تعیین می‌شود. در این روش از مخلوط واکنش حاوی بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.6)، گلوتاتیون (GSSG) یک میلی‌مولار و ۱۰ میلی‌مولار NADPH استفاده شد. واکنش با خواندن اسپکتروفوتومتری نمونه‌ها در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد از فعالیت آنزیم GR برابر با مقدار آنزیمی است که یک میلی مول GSSG را در یک دقیقه کاهش می‌دهد.

برای اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز از روش هاپکینز و تودوپ (Hopkins and Tudhope, 1973)، با استفاده از t-butyl hydroperoxide به‌عنوان یک بستر، استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=7)، ۲ میلی مولار EDTA، ۰/۲۸ میلی‌مولار NADPH، ۰/۱۳ میلی‌مولار GSH، ۰/۱۶ واحد GR، ۰/۰۷۳ میلی‌مولار t-butyl hydroperoxide و عصاره آنزیم (۵۰ میلی‌گرم پروتئین) بود. یک واحد فعالیت GSH-Px به‌عنوان مقدار آنزیمی که باعث اکسیداسیون NADPH (میلی مول بر دقیقه گرم پروتئین) می‌شود، تعریف و به‌صورت واحد بین‌المللی بر گرم وزن تر برگ پرچم گزارش شد.

نمونه‌های والد طبسی و موتانت در رطوبت ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی و ۲۲٪ ظرفیت زراعی برای توالی‌یابی RNA انتخاب و به‌صورت والد طبسی ۱۰۰٪ (والد طبسی شاهد)، والد طبسی ۲۲٪ (والد طبسی خشکی)، موتانت ۱۰۰٪ (موتانت شاهد) و موتانت ۲۲٪ (موتانت خشکی) نام‌گذاری گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج (RibospinTM Plant, GeneAll Biotechnology Co., Ltd.) کشور کره جنوبی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شده و جداسازی mRNA نیز از RNA کل با استفاده از کیت آماده‌سازی کتابخانه RNA (TruSeq™ Stranded mRNA kit, Illumina, Inc). کشور امریکا بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس توالی‌یابی mRNA با استفاده از دستگاه NovaSeq 6000 شرکت Illumina کشور امریکا انجام شد.

میزان بیان ژن‌ها بر اساس داده‌های حاصل از توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای Bowtie2، Tophat2، HTseq-count و Featurecount به دست آمد و پس از نرمال‌سازی آن با محاسبه FPKM، Log2FC بیان ژن‌ها محاسبه گردید.

داده‌های بیوشیمیایی توسط نرم‌افزار SPSS در سطح معنی‌داری یک درصد بررسی‌شده و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام شد. از نرم‌افزار Excel جهت رسم شکل‌های این تحقیق استفاده شد. از اطلاعات پایگاه‌های داده زیر نیز جهت بررسی داده‌های حاصل از توالی‌یابی استفاده گردید.

http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php
https://beta.uniprot.org
https://plants.ensembl.org/index.html

نتایج و بحث

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و اثر متقابل این دو فاکتور بر شاخص‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان داد که تنش خشکی و اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ بر شاخص گلوتاتیون ردوکتاز (GR) در سطح احتمال یک درصد دارای اثر معنی‌دار بود و اثر ژنوتیپ بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، در ژنوتیپ والد و موتانت با افزایش میزان تنش خشکی (کاهش میزان رطوبت) افزایش می‌یابد. این نتیجه با نتایج تحقیقات به‌دست‌آمده توسط سایر محققین مطابقت داشت (Malek et al., 2019;Song et al., 2017;Mohammadkhani and Sharifi, 2016). فعالیت این آنزیم در نمونه موتانت شاهد بیشتر از نمونه والد طبسی شاهد بود و با افزایش تنش خشکی در نمونه‌گیری دوم از گلدان شاهد در رطوبت ۱۸٪ مشخص گردید که فعالیت این آنزیم در هر دو نمونه نسبت به شاهد افزایش‌یافته و در نمونه موتانت بیشتر از نمونه والد بود. بررسی گیاهان در نمونه‌هایی که خاک آن‌ها دارای ۳۰٪ رطوبت بوده و پس از آبیاری مجدد، رطوبت آن‌ها در هنگام نمونه‌برداری به ۹۰٪ رسیده بود، نشان داد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در نمونه موتانت در مقایسه با نمونه موتانتی که در رطوبت ۱۸٪ قرار داشت تغییری نداشته است اما از نمونه موتانت شاهد بیشتر است. در ژنوتیپ والد، آبیاری مجدد باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD نسبت به فعالیت این آنزیم در ظرفیت زراعی ۱۸٪ شده بود. فعالیت SOD در ژنوتیپ موتانت در تمام سطوح رطوبتی از ژنوتیپ والد بیشتر بود (شکل ۱). این موضوع نشان می‌دهد

که ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی بیشتری داشته است.

بررسی آنزیم کاتالاز نشان داد، در ژنوتیپ والد و موتانت با افزایش میزان تنش خشکی (کاهش میزان رطوبت) فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. این نتیجه با نتایج تحقیقات به‌دست‌آمده توسط سایر محققین مطابقت داشت (Song et al., 2017;Mohammadkhani and Sharifi, 2016). فعالیت کاتالاز در نمونه موتانت شاهد بیشتر از نمونه والد طبسی شاهد بود و با افزایش تنش خشکی در نمونه‌گیری دوم از گلدان شاهد در رطوبت ۱۸٪ مشخص گردید که فعالیت این آنزیم در هر دو نمونه نسبت به شاهد افزایش‌یافته و در نمونه موتانت بیشتر از نمونه والد طبسی بود. بررسی گیاهان در نمونه‌هایی که خاک آن‌ها دارای ۳۰٪ رطوبت بوده و پس از آبیاری مجدد، رطوبت آن‌ها در هنگام نمونه‌برداری به ۹۰٪ رسیده بود، نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه موتانت در مقایسه با نمونه موتانتی که در رطوبت ۱۸٪ قرار داشت کاهش‌یافته است اما از نمونه موتانت شاهد بیشتر است. در ژنوتیپ والد، آبیاری مجدد باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT نسبت به فعالیت این آنزیم در ظرفیت زراعی ۱۸٪ شده بود. فعالیت CAT در ژنوتیپ موتانت در تمام سطوح رطوبتی از ژنوتیپ والد بیشتر بود اما در نمونه‌ای که آبیاری مجدد شده بود باهم برابر بودند (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ موتانت با افزایش تنش خشکی فعالیت کاتالازی بیشتری داشته است.

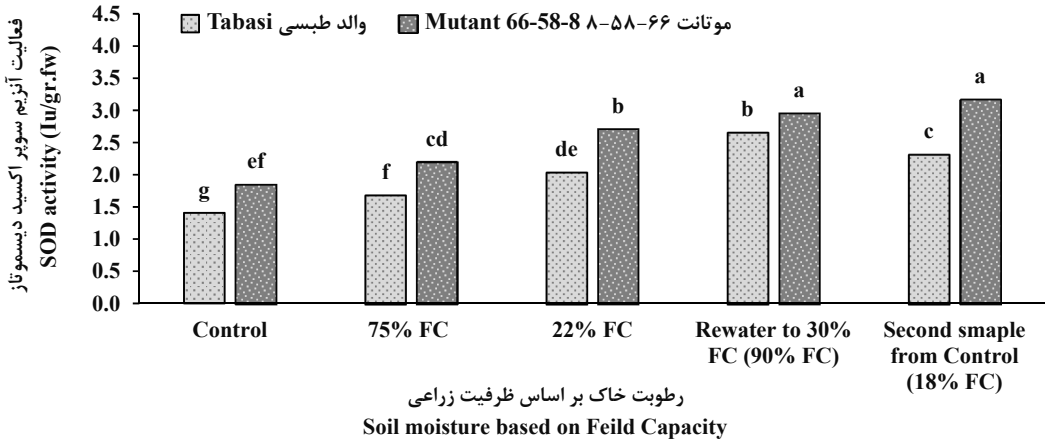
جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر شاخص‌های بیوشیمیایی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در گندم.

Table 2. Analysis of variance (Mean of square) of the effect of genotype and drought stress on biochemical parameters such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX) in wheat.

Source	منبع تغییر	درجه آزادی Df	SOD	CAT	GR	GPX
Genotype (G)	ژنوتیپ	1	2.32**	1.06**	0.01ns	0.31**
Drought Stress (D)	تنش خشکی	4	1.55**	2.14**	0.7**	0.17**
G × D	ژنوتیپ × تنش خشکی	4	0.07**	0.1**	0.11**	0.09**
Error	خطا	18	0.01	0.01	0.01	0.01
C.V. (%)	ضریب تغییرات		*24.1*	*18.6*	*26.7*	*25.3*

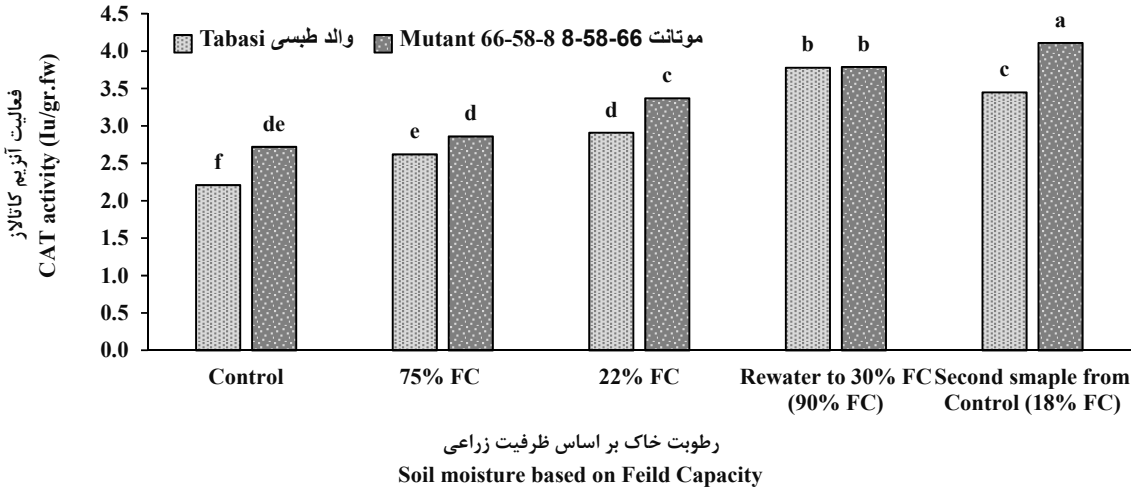
*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

*, ** and ns are significant at the 5%, 1% and non-significance levels, respectively.



شکل ۱. روند تغییرات مقدار فعالیت SOD در دو ژنوتیپ گندم والد طبسی و موتانت T66-58-8. تفاوت حروف کوچک ستون‌ها، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

Fig. 1. The trend of changes in the amount of SOD activity in two Tabasi wheat genotypes, parent and T66-58-8 mutant. The difference between the lower case letters of the columns indicates a significant difference at the level of 1%.



شکل ۲. روند تغییرات مقدار فعالیت CAT در دو ژنوتیپ گندم والد طبسی و موتانت T66-58-8. تفاوت حروف کوچک ستون‌ها، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

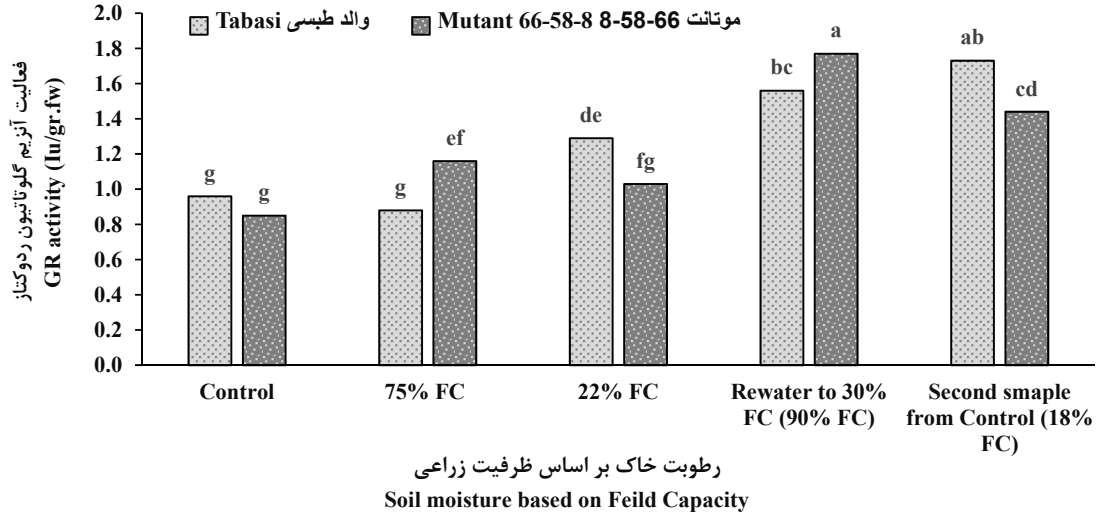
Fig 2. The trend of changes in the amount of CAT activity in two Tabasi wheat genotypes, parent and T66-58-8 mutant. The difference between the lower case letters of the columns indicates a significant difference at the level of 1%.

بررسی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز نشان داد آبیاری مجدد در ژنوتیپ والد طبسی سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شده است. محصول فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، پر اکسید هیدروژن است. در ژنوتیپ والد فعالیت کاتالاز که پر اکسید هیدروژن را تجزیه می‌نماید، افزایش داشت.

در بررسی آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز مشخص گردید، در ژنوتیپ والد و موتانت با افزایش میزان تنش خشکی (کاهش میزان رطوبت) فعالیت این آنزیم نیز افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم در نمونه موتانت شاهد با نمونه والد طبسی شاهد برابر بود و با افزایش تنش خشکی در نمونه‌گیری دوم از گیاه شاهد در رطوبت ۱۸٪ مشخص گردید که فعالیت این آنزیم در هر دو نمونه نسبت به شاهد افزایش‌یافته و در نمونه والد بیشتر از نمونه موتانت بود. بررسی گیاهان در نمونه‌هایی که خاک آن‌ها دارای ۳۰٪ رطوبت بوده و پس از آبیاری مجدد، رطوبت آن‌ها در هنگام نمونه‌برداری به ۹۰٪ رسیده بود، نشان داد که فعالیت این آنزیم در نمونه موتانت در مقایسه با نمونه موتانتی که در رطوبت ۱۸٪ قرار داشت افزایش‌یافته است و از نمونه موتانت شاهد نیز بیشتر است. در ژنوتیپ والد، آبیاری مجدد باعث کاهش فعالیت آنزیم GR نسبت به فعالیت این آنزیم در ظرفیت زراعی ۱۸٪ شده بود. فعالیت GR در ژنوتیپ موتانت در تمام سطوح رطوبتی با ژنوتیپ والد اختلاف داشته اما در نمونه شاهد با هم برابر بودند (شکل ۳). تغییرات فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ موتانت با کاهش رطوبت تا میزان ۲۲٪، با شیب ملایمی بوده است اما در ژنوتیپ والد، از رطوبت ۷۵٪ به بعد افزایش صورت پذیرفته است.

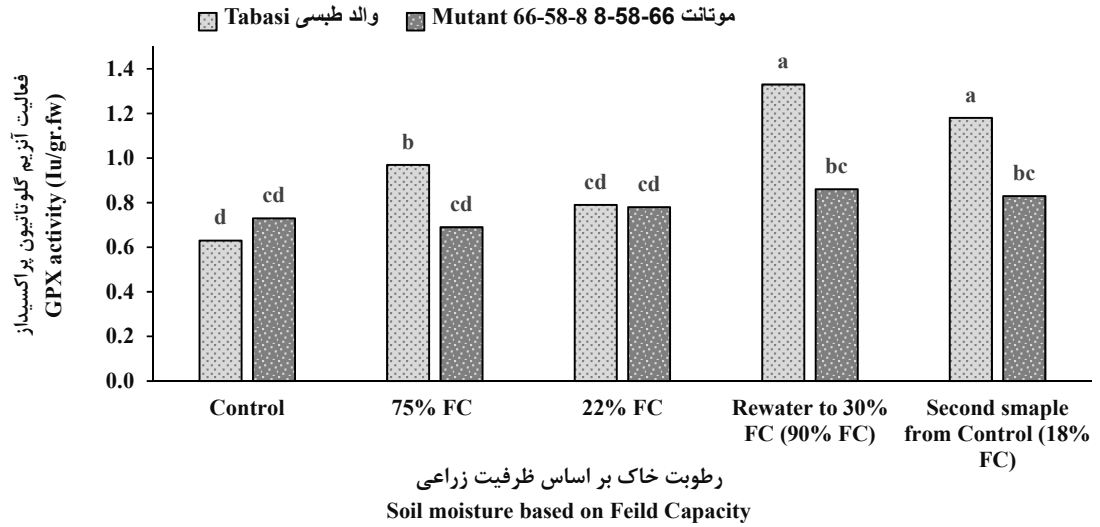
در بررسی انجام شده مشاهده گردید که فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، در ژنوتیپ والد با افزایش میزان تنش خشکی (کاهش میزان رطوبت) افزایش می‌یابد. فعالیت این آنزیم در نمونه موتانت شاهد با نمونه والد طبسی شاهد برابر بود و با افزایش تنش خشکی در نمونه‌گیری دوم از گیاه شاهد در رطوبت ۱۸٪ مشخص گردید که فعالیت این آنزیم در نمونه والد نسبت به شاهد افزایش‌یافته و در نمونه والد بیشتر از نمونه موتانت بود. بررسی گیاهان در نمونه‌هایی که خاک آن‌ها دارای ۳۰٪ رطوبت بوده و پس از آبیاری مجدد، رطوبت آن‌ها در هنگام نمونه‌برداری به ۹۰٪ رسیده بود، نشان داد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در نمونه موتانت و والد در مقایسه با نمونه موتانت و والدی که در رطوبت ۱۸٪ قرار داشت تغییری نداشته‌اند اما فعالیت آن در نمونه والد از نمونه موتانت بیشتر است. در ژنوتیپ والد و موتانت، آبیاری مجدد باعث کاهش فعالیت آنزیم GPX نسبت به سایر سطوح رطوبتی نشده بود. فعالیت GPX در ژنوتیپ والد در تمام سطوح رطوبتی به‌جز شاهد و ۲۲٪ از ژنوتیپ موتانت بیشتر بود (شکل ۴).

بررسی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نشان داد که این آنزیم در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی فعالیت ثابت داشته است.



شکل ۳. روند تغییرات مقدار فعالیت GR در دو ژنوتیپ گندم والد طبسی و موتانت T66-58-8. تفاوت حروف کوچک ستون‌ها، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

Fig. 3. The trend of changes in the amount of GR activity in two Tabasi wheat genotypes, parent and T66-58-8 mutant. The difference between the lower case letters of the columns indicates a significant difference at the level of 1%.



شکل ۴. روند تغییرات مقدار فعالیت GPX در دو ژنوتیپ گندم والد طبسی و موتانت T66-58-8. تفاوت حروف کوچک ستون‌ها، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

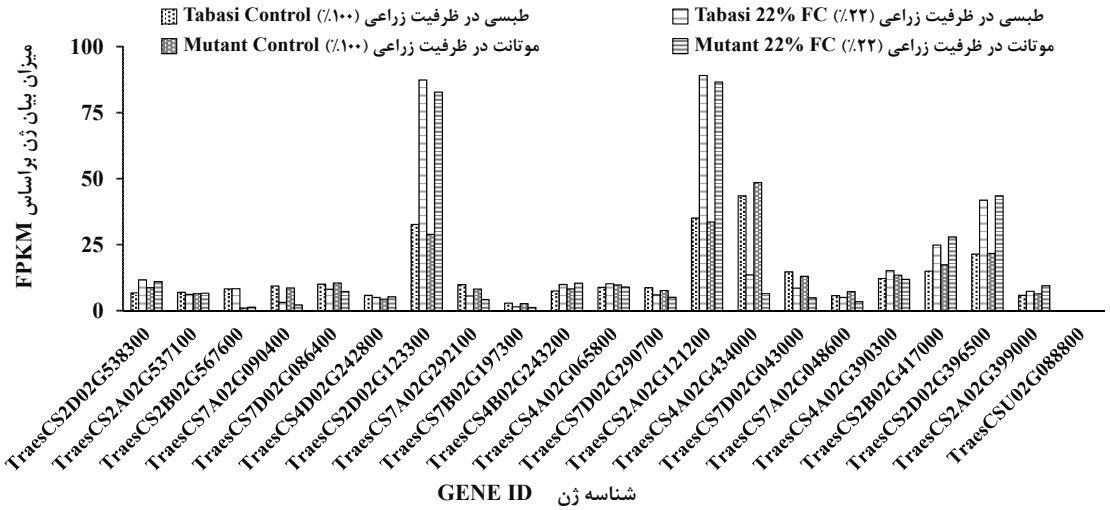
Fig. 4. The trend of changes in the amount of GPX activity in two Tabasi wheat genotypes, parent and T66-58-8 mutant. The difference between the lower case letters of the columns indicates a significant difference at the level of 1%.

با بررسی در پایگاه داده EnsemblPlants ژن‌هایی که کارکرد آن‌ها با عنوان سوپر اکسید دیسموتاز ثبت شده است شناسایی شدند. تعداد ۲۱ ژن ثبت شده در سایت مذکور در پایگاه داده KnetMiner و UniProt، مورد جستجو قرار گرفته و نام ژن، نام ورودی و نام پروتئین مربوطه استخراج شد (جدول ۳). سپس اسامی این ژن‌ها در داده‌های حاصل از توالی‌یابی برای ژنوتیپ والد طبسی و موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ مورد جستجو قرار گرفت. میزان بیان این ژن‌های مشترک در هر چهار نمونه بر اساس FPKM در شکل ۵ رسم شد. مطالعه این شکل نشان داد که بیان تعداد ۱۰ ژن از این ۲۱ ژن در ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش یافته و بیان تعداد ۹ ژن نیز کاهش یافته است، یک ژن بیان‌نشده و یک ژن نیز تغییر بیان نداشته است. در بررسی

ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ بیان تعداد ۹ ژن افزایش یافته و بیان تعداد ۹ ژن نیز کاهش یافته است، یک ژن بیان‌نشده و دو ژن نیز تغییر بیان نیافته است که از ۱۸ ژن افزایش و کاهش بیان یافته ۳ ژن افزایش و ۳ ژن کاهش بیان معنی‌دار داشته‌اند (جدول ۳). تعداد ۸ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش بیان و ۸ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند. تعداد ۵ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ افزایش بیان و ۱۰ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند. تفاوت بیان ۶ ژنی که در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تغییر بیان معنی‌دار داشتند در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ معنی‌دار نبود (جدول ۳). داده‌های شکل ۱ نشان می‌دهد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ بیشتر از ژنوتیپ والد طبسی بوده است.

بررسی در پایگاه داده EnsemblPlants برای ژن‌هایی که کارکرد آن‌ها با عنوان کاتالاز ثبت شده است نشان داد که تعداد ۱۴ ژن برای این آنزیم ثبت شده است. با بررسی این ژن‌ها در پایگاه داده KnetMiner و UniProt، نام ژن، نام ورودی و نام پروتئین مربوطه استخراج شد (جدول ۴). اسامی این ژن‌ها نیز در داده‌های حاصل از توالی‌یابی برای ژنوتیپ والد طبسی و موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ مورد جستجو قرار گرفت. میزان بیان این ژن‌های مشترک در هر چهار نمونه بر اساس FPKM در شکل ۶ رسم شد. مطالعه این شکل نشان داد که بیان تعداد ۱۰ ژن از این ۱۴ ژن در ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش یافته و تعداد ۴ ژن نیز بیان‌نشده است. در بررسی ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تعداد ۱۱ ژن افزایش بیان یافته و تعداد ۳ ژن نیز بیان نشده است که از میان ۱۱ ژن افزایش بیان یافته تعداد ۶ ژن افزایش بیان معنی‌دار داشته‌اند (جدول ۴). تعداد ۱ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش بیان و ۵ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند، دو ژن تغییر بیان نداشته و ۶ ژن نیز بیان نشده‌اند. تعداد ۷ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به والد در ظرفیت زراعی ۲۲٪ افزایش بیان و ۴ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند، تعداد ۳ ژن نیز بیان نشده است. از ۶ ژنی که در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تغییر بیان معنی‌دار داشتند تعداد ۳ ژن در ژنوتیپ موتانت ۲۲٪ نسبت به والد طبسی ۲۲٪ افزایش بیان معنی‌دار داشت (جدول ۴). داده‌های شکل ۲ نشان می‌دهد فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ بیشتر از ژنوتیپ والد طبسی بوده است.

در پایگاه داده EnsemblPlants برای ژن‌هایی که کارکرد آن‌ها با عنوان گلوتاتیون پراکسیداز ثبت شده است نیز جستجو انجام گرفت و مشاهده شد که تعداد ۱۶ ژن برای این آنزیم ثبت شده است. با بررسی این ژن‌ها در پایگاه داده KnetMiner و UniProt، نام ژن، نام ورودی و نام پروتئین مربوطه استخراج شد (جدول ۵). سپس اسامی این ژن‌ها در داده‌های حاصل از توالی‌یابی برای ژنوتیپ والد طبسی و موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ مورد جستجو قرار گرفت. میزان بیان این ژن‌های مشترک در هر چهار نمونه بر اساس FPKM در شکل ۷ رسم شد. مطالعه این شکل نشان داد که بیان تعداد ۱۲ ژن از این ۱۶ ژن در ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش یافته و بیان تعداد ۱ ژن نیز کاهش یافته است، سه ژن نیز تغییر بیان نیافته‌اند. در بررسی ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تعداد ۱۳ ژن افزایش بیان یافته و تعداد ۲ ژن نیز کاهش بیان یافته است، یک ژن نیز تغییر بیان نیافته است که از ۱۳ ژن افزایش بیان یافته ۷ ژن افزایش بیان معنی‌دار داشته‌اند (جدول ۵). تعداد ۴ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش بیان و ۶ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند، ۶ ژن نیز تغییر بیان نداشته‌اند. تعداد ۶ ژن در موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ افزایش بیان و ۸ ژن نیز کاهش بیان داشته‌اند، دو ژن نیز تغییر بیان نداشته‌اند. تفاوت بیان ۷ ژنی که در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به موتانت در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تغییر بیان معنی‌دار داشتند در ژنوتیپ موتانت در ظرفیت زراعی ۲۲٪ نسبت به والد طبسی در ظرفیت زراعی ۲۲٪ معنی‌دار نبود (جدول ۴). داده‌های شکل ۴ نشان می‌دهد فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ژنوتیپ والد در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ و ۲۲٪ با میزان این آنزیم در ژنوتیپ موتانت برابر بوده است.



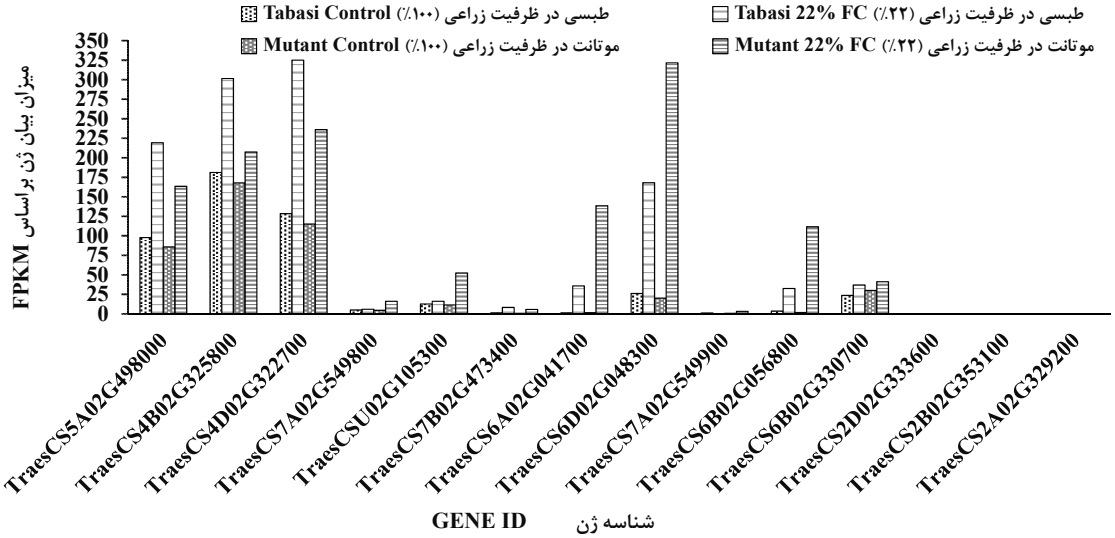
شکل ۵. میزان بیان ژن‌های مرتبط با SOD بر اساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt برحسب FPKM.

Fig. 5. Expression of SOD-related genes based on EnsemblPlants and UniProt database data in FPKM.

جدول ۳. ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با Superoxide Dismutase در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) بر اساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt.

Table 3. Genes and proteins related with Superoxide Dismutase in wheat (*Triticum aestivum*) based on EnsemblPlants and UniProt databases.

بیان ژن‌های مرتبط با SOD						
ردیف	Log2FC M22%-M100%	Log2FC M22%-T22%	شناسه ژن (ID) EnsemblPlants	نام ژن KnetMiner	نام ورودی UniProt	نام پروتئین UniProt
1	-	-	TraesCS2D02G538300	*MSD1*	Q96185	Superoxide dismutase
2	-	-	TraesCS2A02G537100	*MSD1*	P93606	Superoxide dismutase
3	-	-	TraesCS2B02G567600	*MSD1*	A0A3B6CFS9	Superoxide dismutase
4	-1.62**	ns	TraesCS7A02G090400	*FSD3*	A0A3B6RCP4	Superoxide dismutase
5	-	-	TraesCS7D02G086400	*FSD3*	A0A3B6T976	Superoxide dismutase
6	-	-	TraesCS4D02G242800	*CSD3*	A0A3B6JL04 A0A3B6JLK6	Superoxide dismutase Superoxide dismutase[Cu-Zn]
7	1.49**	ns	TraesCS2D02G123300	*CSD1*	H9NAV6	Superoxide dismutase[Cu-Zn]
8	-	-	TraesCS7A02G292100	*CSD2*	A0A3B6RFK1	Superoxide dismutase[Cu-Zn]
9	-	-	TraesCS7B02G197300	*CSD2*	Q96123	Superoxide dismutase[Cu-Zn]
10	-	-	TraesCS4B02G243200	*CSD3*	A0A0G2YAJ8 A0A3B6IVD1	Superoxide dismutase[Cu-Zn] Superoxide dismutase
11	-	-	TraesCS4A02G065800	*CSD3*	A0A3B6HPG6 A0A3B6HT65	Superoxide dismutase Superoxide dismutase[Cu-Zn]
12	-	-	TraesCS7D02G290700	*CSD2*	A0A3B6TK25 O24400	Superoxide dismutase[Cu-Zn] Superoxide dismutase[Cu-Zn]
13	1.34*	ns	TraesCS2A02G121200	*CSD1*	A0A3B6ASA5 A0A3B6ASV9	Superoxide dismutase[Cu-Zn] Superoxide dismutase[Cu-Zn]
14	-2.74**	ns	TraesCS4A02G434000	*FSD2*	A0A3B6I247	Superoxide dismutase
15	-1.25*	ns	TraesCS7D02G043000	*FSD2*	A0A3B6T868	Superoxide dismutase
16	-	-	TraesCS7A02G048600	*FSD2*	A0A3B6R832	Superoxide dismutase
17	-	-	TraesCS4A02G390300	*FSD3*	A0A3B6I0A1	Superoxide dismutase
18	-	-	TraesCS2B02G417000	*CCS*	A0A3B6CAQ5	HMA domain-containing protein
19	0.97*	ns	TraesCS2D02G396500	*CCS*	A0A1D6DFT2 A0A3B6DHS2	Genome assembly, chromosome: II HMA domain-containing protein
20	-	-	TraesCS2A02G399000	*CCS*	A0A3B6B295	HMA domain-containing protein
21	-	-	TraesCSU02G088800	*GER4*	A0A3B6UAQ9	Germin-like protein



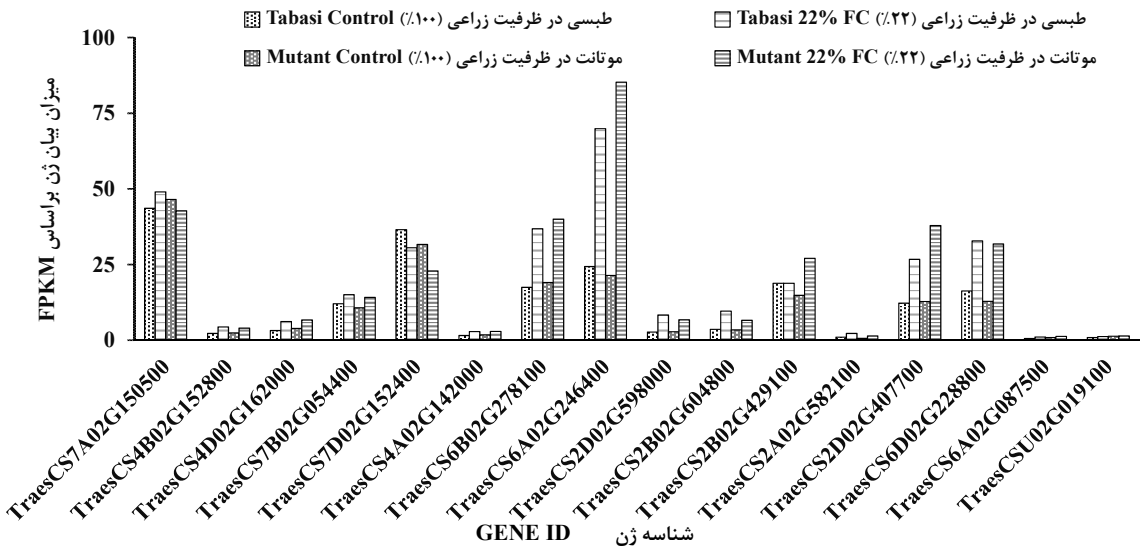
شکل ۶. میزان بیان ژن‌های مرتبط با CAT بر اساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt برحسب FPKM.

Fig. 6. Expression of CAT-related genes based on EnsemblPlants and UniProt database data in FPKM.

جدول ۴. ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با Catalase در گندم (*Triticum aestivum*) براساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt.

Table 4. Genes and proteins related with Catalase in wheat *Triticum aestivum*) based on EnsemblPlants and UniProt databases.

بیان ژن‌های مرتبط با CAT						
ردیف	Log2FC M22%-M100%	Log2FC M22%-T22%	شناسه ژن (ID) EnsemblPlants	نام ژن KnetMiner	نام ورودی UniProt	نام پروتئین UniProt
1	0.92*	ns	TraesCS5A02G498000	*CAT1*	A0A3B6KQP3	Catalase
2	-	-	TraesCS4B02G325800	*CAT1*	A0A3B6IUU1	Catalase
3	1*	ns	TraesCS4D02G322700	*CAT1*	A0A3B6JMX0 A0A3B6JQL2	Catalase Catalase
4	-	-	TraesCS7A02G549800	*CAT1*	A0A0H4LXI0 A0A3B6RQ09	Catalase Catalase
5	2.1**	1.6**	TraesCSU02G105300	*CAT1*	A0A3B6U183	Catalase
6	-	-	TraesCS7B02G473400	*CAT1*	A0A3B6SLN2	Catalase
7	5.76**	1.9**	TraesCS6A02G041700	*CAT2*	A0A3B6NJS8 A0A3B6NKD6	Catalase Catalase
8	3.92**	ns	TraesCS6D02G048300	*CAT2*	A0A3B6Q9M2 A0A3B6QCB0 F1DKC1	Catalase Catalase Catalase
9	-	-	TraesCS7A02G549900	*CAT1*	A0A3B6RP85	Catalase domain-containing protein
10	5.36**	1.7**	TraesCS6B02G056800	*CAT2*	A0A3B6PE57 A0A3B6PHD6	Catalase Catalase
11	-	-	TraesCS6B02G330700	*PLAT1*	A0A3B6PQ78	Uncharacterized protein
12	-	-	TraesCS2D02G333600	*4CLL9*	A0A1D5UJH8	Genome assembly, chromosome: II
13	-	-	TraesCS2B02G353100	*4CLL9*	A0A3B6CAX6	Uncharacterized protein
14	-	-	TraesCS2A02G329200	*4CLL9*	A0A3B6AZU8	Uncharacterized protein



شکل ۷. میزان بیان ژن‌های مرتبط با GPX بر اساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt برحسب FPKM.

Fig. 7. Expression of GPX-related genes based on EnsemblPlants and UniProt database data in FPKM.

جدول ۵. ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با Glutathione Peroxidase در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) بر اساس اطلاعات پایگاه داده EnsemblPlants و UniProt.

Table 5. Genes and proteins related with Glutathione Peroxidase in wheat (*Triticum aestivum*) based on EnsemblPlants and UniProt databases.

ردیف	Log2FC M22%-M100%	Log2FC M22%-T22%	شناسه ژن (ID) EnsemblPlants	نام ژن KnetMiner	نام ورودی UniProt	نام پروتئین UniProt
			بیان ژن‌های مرتبط با GPX			
1	-	-	TraesCS7A02G150500	*GPX1*	A0A3B6REL4 A0A3B6REQ8	Glutathione peroxidase Glutathione peroxidase
2	-	-	TraesCS4B02G152800	*GPX4*	A0A3B6IRX8	Glutathione peroxidase
3	-	-	TraesCS4D02G162000	*GPX4*	T1WSS4	Glutathione peroxidase
4	-	-	TraesCS7B02G054400	*GPX1*	A0A3B6SEF4	Glutathione peroxidase
5	-	-	TraesCS7D02G152400	*GPX1*	A0A3B6TM94	Glutathione peroxidase
6	-	-	TraesCS4A02G142000	*GPX4*	A0A3B6HVA3	Glutathione peroxidase
7	1*	ns	TraesCS6B02G278100	*CSA*	A0A3B6PLT1	Glutathione peroxidase
8	1.94**	ns	TraesCS6A02G246400	*CSA*	A0A3B6NSG2	Glutathione peroxidase
9	1*	ns	TraesCS2D02G598000	*CSA*	A0A3B6DQ00	Glutathione peroxidase
10	0.79*	ns	TraesCS2B02G604800	*CSA*	A0A3B6CH04	Glutathione peroxidase
11	0.82*	ns	TraesCS2B02G429100	*CSA*	A0A3B6CB61	Glutathione peroxidase
12	-	-	TraesCS2A02G582100	*CSA*	T1WT84	Glutathione peroxidase
13	1.49**	ns	TraesCS2D02G407700	*CSA*	A0A1D5UGB6	Glutathione peroxidase
14	1.24*	ns	TraesCS6D02G228800	*CSA*	A0A3B6QI62	Glutathione peroxidase
15	-	-	TraesCS6A02G087500	-	A0A3B6NJG4	Uncharacterized protein
16	-	-	TraesCSU02G019100	-	A0A3B6U390	Uncharacterized protein

مطالعات سونگ و همکاران (Song et al., 2017) نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های SOD و CAT در دو رقم گندم هگزاپلوئید مورد آزمایش در شرایط تنش رطوبتی نسبت به آبیاری خوب، افزایش‌یافته است. درعین‌حال مطالعات لو و همکاران (Lou et al., 2018) در مقایسه آنزیم‌های GR و GPX در گیاه گندم و در برگ پرچم در مقایسه با سنبله نیز نشان داده که میزان این دو آنزیم در شرایط تنش افزایش می‌یابد. هرچند افزایش آنزیم‌های SOD،

CAT، GR و GPX به‌صورت خطی نبود اما اطلاعات این دو تحقیق به همراه تحقیقات انجام شده توسط نواب پور و همکاران (Navabpour et al., 2020) نشان‌دهنده ارتباط افزایش این آنزیم‌ها با تنش خشکی در گندم است. در این تحقیق نیز افزایش این آنزیم‌ها در شرایط تنش خشکی مشاهده شد. فورد و همکاران (Ford et al., 2011) در بررسی ۳ رقم گندم تحت شرایط تنش خشکی، افزایش آنزیم‌های SOD و CAT را در هر سه رقم برای اجتناب از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اعلام نمودند. میری حصار و همکاران (Miri-Hesar et al., 2019) افزایش آنزیم SOD را در گندم، یکی از معیارهای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی بیان نمودند. بررسی تغییرات آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مشخص کرد که مقدار این آنزیم در ژنوتیپ والد طبسی و موتانت تا آخرین سطح تنش افزایشی بوده است. آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ موتانت در هنگام تنش متوسط خشکی واکنش افزایشی نداشته اما با شدت یافتن تنش میزان آن افزایش‌یافته است. تغییرات گلوتاتیون ردوکتاز در شرایط تنش رطوبتی در دو ژنوتیپ افزایشی بوده اما آهنگ آن در دو ژنوتیپ متفاوت است، به‌نحوی‌که در ژنوتیپ موتانت در اوایل تنش ثابت بوده و از تنش خشکی شدید، میزان آن افزایش می‌یابد. مقادیر GPX در شدت بسیار بالای تنش زیاد بوده اما در مقادیر تنش متوسط و شدید ژنوتیپ موتانت تغییرات معنی‌داری ندارد. فعالیت آنزیم‌های بررسی‌شده در طول روند تنش خشکی اعمال‌شده نشان می‌دهد که ژنوتیپ موتانت به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم به خشکی، فعالیت کاتالازی و سوپر اکسید دیسموتازی بیشتری نسبت به ژنوتیپ والد طبسی دارد. این نتایج با نتایج تحقیقات سایر محققان مطابقت داشت. (Malek et al., 2019; Mohammadkhani and Sharifi, 2016)؛ اما در خصوص فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، ژنوتیپ والد طبسی در تنش‌های بالاتر خشکی، دارای مقدار بیشتری بوده است.

درخت فیلوژنتیک تولیدشده در میان ۷۴ پروتئین SOD از گیاه یونجه (Medicago truncatula) و ۸ گونه گیاهی دیگر نشان داد که این پروتئین‌های SOD به سه دسته اصلی به نام‌های Cu/ZnSODs و Fe-MnSODs تقسیم می‌شوند. در بین Fe-MnSOD ها، FeSODها و MnSODهای این گیاهان در گروه‌بندی در کنار هم قرار گرفتند که نشان می‌دهد ممکن است از ژن‌های اجدادی مشترک منشأ گرفته باشند (Miller, 2012; Wang et al., 2017; Zhou et al., 2017). مطالعات قبلی گزارش داده‌اند که ژن‌های SOD ممکن است دو الگوی بیان متفاوت را نشان دهند، یعنی بیان ترکیبی و بیان خاص بافت (Feng et al., 2016; Zhou et al., 2017). در گیاهان،Cu/ZnSOD اغلب در سیتوپلاسم، پراکسی‌زوم‌ها، کلروپلاست‌ها و یا فضای خارج سلولی مشاهده می‌شود، علاوه بر این، FeSODها بیشتر در سیتوپلاسم و کلروپلاست‌ها قرار دارند درحالی‌که MnSODها در ماتریکس میتوکندری قرار دارند (Kliebenstein et al., 1998; Corpas et al., 2006; Pilon et al., 2011). این ژن‌ها به ترتیب با نام‌های *CSD*، *FSD* و *MSD* گزارش می‌شوند. سونگ و همکاران (Song et al., 2018) بیان نمودند ژن‌های *MtSOD* در شرایط مختلف تنش‌های غیرزنده مانند خشکی بیان افتراقی داشته و در مقایسه ژن‌های *MtCSD3*، *MtFSD1* و *MtFSD2* در بافت‌های مختلف مشاهده نمودند که این ژن‌ها در برگ‌ها بیان بیشتری داشته‌اند، این نشان می‌دهد که آنزیم SOD یک آنزیم حیاتی در پاک‌سازی ROSهای تولیدی در فتوسنتز گیاهی است (Zhang et al., 2016; Wang et al., 2017). چو و همکاران (Chu et al., 2005) فعالیت ژن *CCS* را در آرابیدوپسیس کدکننده پروتئین چاپرون مس که برای فعالیت آنزیم Cu/ZnSOD ضروری است، گزارش نمودند. چاپرون‌ها پروتئین‌هایی هستند که در تاشدگی (Folding) سایر پروتئین‌ها شرکت می‌کنند. پیلون و همکاران (Pilon et al., 2011) در بررسی فعالیت آنزیم‌های FeSOD و Cu/ZnSOD اظهار داشتند که وجود مس می‌تواند بیان Cu/ZnSOD را نسبت به FeSOD بیشتر نموده و عدم وجود مس باعث بیان بیشتر ژن *FSD1* گردد. در غلظت‌های بالای مس و سایر تنش‌های زیستی یا غیر زیستی، بیان *FSD1* با عدم اتصال پروتئین SPL7 متصل شونده به پروموتور، سرکوب می‌شود و فراوانی *CCS*، *CSD1* و *CSD2* نیز با عدم اتصال SPL7 به ژن مربوط به miRNA398 و عدم رونویسی این miRNA398، افزایش می‌یابد. در تحقیق انجام شده روی دو ژنوتیپ گندم موتانت و والد طبسی مشاهده شد که دو ژن *FSD2* و یک ژن *FSD3* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی با ۲۲٪ رطوبت در نقطه ظرفیت زراعی نسبت به ژنوتیپ موتانت در شرایط بدون تنش خشکی، کاهش بیان معنی‌دار داشته‌اند درحالی‌که دو ژن *CSD1* و یک ژن *CCS* به شکل معنی‌داری افزایش بیان یافته‌اند. با توجه به افزایش بیان ژن *CCS* و *CSD1* در این تحقیق، این ژن در گیاه گندم نیز می‌تواند در جهت تاشدگی

پروتئین‌های تولیدی توسط ژن *CSD1* درنظر گرفته شود. لذا به نظر می‌رسد آنزیم SOD با کوفاکتور مس/روی، در تحمل تنش خشکی دارای نقش بیشتری باشد. توالی ژن *FSD1* در گیاه گندم در سایت EnsemblPlants موجود نیست.

لونا و همکاران (Luna et al., 2005) اعلام داشتند که در تنش خشکی در گیاه گندم، کاهش رطوبت خاک و جذب CO_2 با انباشت H_2O_2 همبستگی دارد. محتوی H_2O_2 برگ افزایش یافت و این درعین‌حالی بود که فعالیت CAT در شرایط تنش خشکی شدید دو برابر شده بود. افتخاری و همکاران (Eftekhari et al., 2017) در بررسی بیان ژن *CAT1* و *DREB2* که یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ترجمه در گیاهان است اظهار داشتند که میزان بیان هر دو ژن در شرایط تنش خشکی در گیاه گندم افزایش یافت و بیان *DREB2* دو برابر *CAT1* بود. لی و همکاران (Li et al., 2020) در بررسی ژن مربوط به پروتئین فاکتور ترجمه MYB نوع R2R3 به نام *TaMpc1-D4* که در بیشتر پاسخ‌ها به تنش‌های غیرزیستی در گندم مشارکت نموده و در هسته سلول قرار دارد مشاهده نمودند که بیان زیاد این ژن باعث کاهش تحمل به خشکی در آرابیدوبسیس می‌گردد و ژن‌های *P5CS1*، *RD29A*، *CAT1*، *RD29B*، *DREB2A*، *ABF3*، *CBF1*، *CBF2*، *CBF3*، *ERF1*، *POD1* و *SOD (Cu/Zn)* که با تنش و سیستم آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارند را در گیاه آرابیدوبسیس ترانسژنیک در شرایط تنش خشکی به‌صورت منفی تنظیم می‌کند. با خاموش کردن این ژن در گیاه گندم، محتوی نسبی آب، میزان پرولین و بیان ژن‌های مربوط به تنش و سیستم آنتی‌اکسیدانی مانند *DREB1*، *DREB3*، *ERF3*، *ERF4b*، *ABF*، *P5CS*، *POD*، *SOD (Fe)* و *CAT* افزایش یافت. ام دی روهمان و همکاران (Md. Rohman et al., 2020) در بررسی پاسخ کاتالاز در شرایط خشکی در گیاه جو بیان داشتند که ژن *CAT2* و *CAT4* نقش مهمی در پاکسازی H_2O_2 برگ جو داشتند. *CAT2* هنگامی‌که گیاه در معرض تنش شدید خشکی قرار می‌گیرد، نقش مهمی ایفا می‌کند (Sofo et al., 2015). مطالعه انجام شده روی ژنوتیپ موتانت و والد طبسی آن نشان داد که از ۶ ژن افزایش بیان یافته در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد، تعداد ۳ ژن مربوط به *CAT1* و تعداد ۳ ژن مربوط به *CAT2* است و ژن‌های *CAT2* دارای بیان بسیار بیشتری بوده‌اند. درعین‌حال یک ژن *CAT1* و دو ژن *CAT2* نیز در موتانت خشکی نسبت به والد طبسی خشکی افزایش بیان داشتند.

تعداد ۷ ژن *CSA* در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد، بیان معنی‌داری یافته است. این ژن با پروتئینی به نام PHGPx که احتمالاً فسفولیپید هیدروپراکسید گلوتاتیون پراکسیداز است شناخته می‌شود. فسفولیپید هیدروپراکسید گلوتاتیون پراکسیداز (PHGPx) در گیاهان تحت شرایط تنش غیرزیستی و زیستی که واسطه استرس اکسیداتیو است، بیش‌ازحد بیان می‌شود (Faltin et al., 2010). جین و باتلا (Jain and Bhatla, 2014) نیز ارتباط تنش شوری با PHGPx را بررسی و گزارش نمودند که در آفتاب‌گردان PHGPx با NaCl ارتباط داشته و سبب پاک‌سازی آن در لپه‌ها می‌شود.

ما و همکاران (Ma et al., 2017) بیان داشتند که برای آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، مهارکننده و فعال‌کننده‌هایی وجود دارد که می‌توانند روی فعالیت این آنزیم‌ها تأثیرگذار باشند. پراکسید هیدروژن، KCN، Chloroform□ethanol، NaN_3، یون‌های فلزی، کربوهیدرات‌ها، پلی‌اتیلن گلیکول روی فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز تأثیر می‌گذارند. سدیم آزید (NaN_3)، آمین، پتاسیم سیانید و اسید سالسیلیک روی فعالیت کاتالاز تأثیرگذار هستند. طلا، ویتامین E و سلنیوم نیز روی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز اثرگذار می‌باشند.

نتیجه‌گیری نهایی

مطالعه انجام شده در این تحقیق روی ژنوتیپ والد طبسی و موتانت آن با نام T65-58-8 نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ تحت شرایط تنش خشکی افزایش‌یافته است. درعین‌حال مقایسه بیان ژن‌های شناخته‌شده مرتبط با این سه آنزیم در ژنوتیپ موتانت در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی نشان می‌دهد که تنها برخی از این ژن‌های شناخته‌شده تغییر بیان یافته‌اند. لذا می‌توان بیان نمود این ژن‌ها که مربوط به سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند، در برگ پرچم و در زمان گلدهی بیان می‌شوند. یک ژن *FSD3*، دو ژن *CSD1*، دو ژن *FSD2* و یک ژن *CCS* در ژنوتیپ موتانت خشکی نسبت به موتانت شاهد تغییر بیان معنی‌دار داشتند. این موضوع می‌توانست به‌عنوان تائید کننده افزایش فعالیت

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ژنوتیپ موتانت خشکی تلقی گردد اما تفاوت بیان این ۶ ژن در ژنوتیپ موتانت خشکی نسبت به طبسی خشکی معنی‌دار نبود. این موضوع نشان می‌دهد عوامل دیگری در ژنوتیپ موتانت خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شده است و یا عواملی تولید این آنزیم را در ژنوتیپ والد طبسی خشکی محدود کرده است. از ۶ ژن تغییر بیان یافته در ژنوتیپ موتانت خشکی نسبت به موتانت شاهد، یک ژن با عنوان *CAT1* و دو ژن با عنوان *CAT2* در ژنوتیپ موتانت خشکی بیان بیشتری را نسبت به ژنوتیپ والد طبسی خشکی نشان دادند. این ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان ژن‌های دخیل در تحمل بیشتر ژنوتیپ موتانت نسبت به ژنوتیپ والد طبسی به تنش خشکی معرفی گردند. ۷ ژن با عنوان *CSA* در ژنوتیپ موتانت خشکی نسبت به موتانت شاهد تغییر بیان معنی‌دار داشت اما این ژن‌ها در ژنوتیپ موتانت خشکی نسبت به والد طبسی خشکی تفاوت بیان معنی‌دار نداشت. مقایسه آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در ژنوتیپ موتانت و والد خشکی نشان داد که فعالیت این آنزیم در دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌دار نداشت.

منابع

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121–126.

Alimohamadi, R., 2002. Water crisis and the ways to cope with it in Iranian agriculture. Agricultural Aridity and Drought Journal. 6, 58-66. [In Persian with English summary].

Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141(2), 391–396.

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., Pereira, A., 2016. Plant adaptation to drought stress. F1000 Research. 5, 1554.

Berkman, P.J., Lai, K., Lorenc, M.T., Edwards, D., 2012. Next generation sequencing applications for wheat crop improvement. American Journal of Botany. 99(2), 365–371.

Bhabak, K.P., Mugesh, G., 2010. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. Accounts of Chemical Research. 43, 1408–1419.

Bilski, J., 2001. Soil water status: content and potential. Campbell Scientific. Inc. App. Note: 2S-I.

Boon, E.M., Downs, A., Marcey, D., 2007. Porposed mechanism of catalase in catalase: H_2O_2: H_2O_2 Oxidoreductase. Catalase Structural Tutorial Text.

Bowler, C., Camp, W.V., Montagu, M.V., Inzé, D., Professor Kozi Asada., 1994. Superoxide Dismutase in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 13, 199-218. https://doi.org/10.1080/07352689409701914

Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought-From genes to the whole plant. Functional Plant Biology. 30, 239–264.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences. 61, 192–208.

Chen, W., Guo, C., Hussain, S., Zhu, B., Deng, F., Xue, Y., et al., 2016. Role of xylo-oligosaccharides in protection against salinity-induced adversities in Chinese cabbage. Environmental Science Pollution Research. 23, 1254–1264. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5361-2

Chu, C.C., Lee, W.C., Guo, W.Y., Pan, S.M., Chen, L.J., Li, H.M., Jinn, T.L., 2005. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. Plant physiology. 139, 425–436. https://doi.org/10.1104/pp.105.065284

Chu, Y., Corey, D.R., 2012. RNA sequencing: platform selection, experimental design and data interpretation. Nucleic Acid Therapeutics. 22, 271–274

Clark, D., 2005. Molecular Biology. Elsevier Academic Press. 784.

Corpas, F.J., Fernandez-Ocana, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Sandalio, L.M., del Río, L.A., Barroso, J.B., 2006. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. Plant Cell Physiology. 47, 984-994.

Couto, N., Malys, N., Gaskell, S.J., Barber, J., 2013. Partition and turnover of glutathione reductase from Saccharomyces cerevisiae: a

proteomic approach. Journal of Proteome Research. 12, 2885–2894.

Edwards, D., Batley, J., Snowdon, R.J., 2013. Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. Theoretical Applied Genetics. 126, 1–11.

Eftekhari, A., Baghizadeh, A., Yaghoobi, M.M., Abdolshahi, R., 2017. Differences in the drought stress response of DREB2 and CAT1 genes and evaluation of related physiological parameters in some bread wheat cultivars. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 31, 709-716.

Faltin, Z., Holland, D., Velcheva, M., Tsapovetsky, M., Roeckel-Drevet, P., Handa, A.K., Abu-Abied, M., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y., Perl, A., 2010. Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for in vitro plant differentiation. Plant and Cell Physiology. 51:7, 1151–1162.

FAO. Food and Agriculture Organization. 2018. Retrieved 2021, from http://faostat. fao.org.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development. 29, 185–212. https://doi.org/10.1051/agro:2008021

Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Yang, Y., Zheng, Q., Wan, H., 2016. The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. Front Plant Science. 7, 1279.

Flexas, J., Niinemets, U., Galle, A., Barbour, M.M., Centritto, M., 2013. Diffusional conductances to CO as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. Photosynthesis Research. 117, 1-3.

Ford, K., Cassin, A., Bacic, A., 2011. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Frontiers in Plant Science. 2, 44.

Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., 2011. Solutions for a cultivated planet. Nature. 478, 337-342.

Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta. 133, 21-25.

Gayathri, D., Rashmi, B.S., 2016. Critical analysis of wheat as food. Matern Pediatr Nutr 2, 115. https://doi.org/10.4172/2472-1182.1000115

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48, 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Gokcay, D., 2012. Physiological and biochemical screening of different Turkish lentil (*Lens culinaris* M.) cultivars under drought stress condition. MSc dissertation, Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Turkey. 95.

Goodsell, D.S., 2004. Catalase. Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank. Retrieved 2021, from https://pdb101.rcsb.org/motm/57

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. British Journal of Haematology. 25, 563–575.

Hussain, S., Khan, F., Cao, W., Wu, L., Geng, M., 2016. Seed priming alters the production and detoxification of reactive oxygen intermediates in rice seedlings grown under sub-optimal temperature and nutrient supply. Frontiers Plant Science. 7, 439. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00439

IAEA, 2008. Field Estimation of Soil Water Content, A Practical Guide to Methods, Instrumentation and Sensor Technology. Retrieved 2021, from https://www.iaea.org.

Jain, P., Bhatla, S.C., 2014. Signaling role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) accompanying sensing of NaCl stress in etiolated sunflower seedling cotyledons. Plant Signaling & Behavior. 9. https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977746

Jaleel, C.A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R., 2008. Differential responses in water use efficiency in two varieties of Catharanthus roseus under drought stress. Comptes Rendus Biologies. 331, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.11.003

Kasim, W.A., Osman, M.E., Omar, M.N., Abd El-Daim, I.A., Bejai, S., Meijer, J., 2013. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. Journal of Plant Growth Regulation. 32, 122–130.

Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., Last, R.L., 1998. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. Plant Physiology. 118, 637-650.

Li, C., Jiang, D., Wollenweber, B., Li, Y., Dai, T., Cao, W., 2011. Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. Plant Science. 180, 672–678. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.009

Li, X., Tang, Y., Li, H., Luo, W., Zhou, C., 2020. Lixin Zhang, Jinyin Lv, A wheat R2R3 MYB gene TaMpc1-D4 negatively regulates drought tolerance in transgenic Arabidopsis and wheat. Plant Science. 299, 110613. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110613

Lou, L., Li, X., Chen, J., Li, Y., Tang, Y., et al., 2018. Photosynthetic and ascorbate-glutathione metabolism in the flag leaves as compared to spikes under drought stress of winter wheat (*Triticum aestivum* L). PLOS ONE. 13, 3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194625

Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1830:5, 3143–3153.

Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., Foyer, C.H., 2005. Drought controls on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. Journal of Experimenal Botany. 5, 417-423.

Ma, X., Deng, D., Chen, W. 2017. Inhibitors and Activators of SOD, GSH□Px, and CAT. In Enzyme Inhibitors and Activators. InTechOpen. London, Uk, pp. 207-224. https://doi.org/10.5772/65936.

Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis. 1, 357–424.

Majd, F., Ardakani, M.R., 2003. Nuclear Techniques In Agricultural Sciences. University of Tehran Press. 381p. [In Persian].

Malek, M., Galavi, M., Ramroudi, M., Nakhzari Moghaddam, A. 2019. Evaluation of drought tolerance of wheat cultivars under water deficiency stress after flowering. Journal of Crop Production. 12, 123-136. https://doi.org/10.22069/ejcp.2019.15545.2161

Mesgaran, M., Madani, K., Hashemi, H., Azadi, P., 2016. Evaluation of land and precipitation for agriculture in Iran. Working paper 2. Stanford Iran 2040 project. Stanford University. https://purl.stanford.edu/vf990qz0340.

McCOrd, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry. 244, 6049-6055.

Md. Rohman., M., Alam, S.S., Akhi, A.H., Begum, F., Amiruzzaman, M., 2020. Response of catalase to drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings and its purification. African Journal of Biotechnology. 19, 478-486.

Miller, A.F., 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. FEBS Letters. 586, 585-595.

Minami, M., Yoshikawa, H., 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clinica Chimica Acta. 92:3, 337-342.

Miri-hesar, K., Dadkhodaie, A., Dorostkar, S., Heidari, B., 2019. Differential activity of antioxidant enzymes and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. Notulae Scientia Biologicae. 11, 266-276.

Mohammadkhani, N., Sharifi, P. 2016. Anti-oxidative response of different wheat genotypes to drought during anthesis. Iranian Journal of Plant Physiology. 6:4, 1845- 1854.

Muthukumar, K., Nachiappan, V., 2010. Cadmium-induced oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. 47, 383–387.

Muthukumar, K., Rajakumar, S., Sarkar, M.N., Nachiappan, V., 2011. Glutathione peroxidase3 of Saccharomyces cerevisiae protects phospholipids during cadmium-induced oxidative stress. Antonie van Leeuwenhoek. 99, 761–771.

Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S., et al., 2020. Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 26, 793–802.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 49, 249–279.

Noormohammadi, Gh., Siadat, S.A., Kashani, A., 2007. Cereal Cultivation. Shahid Chamran University Press. Ahvaz. 446p. [In Persian].

Nouri, H., Bagheri, Kia, S., Mahdavi Mushki, K., 2014. Plant Mutation Modification and Biotechnology. Agricultural Research and Education Publications and Natural Resources. 505p. [In Persian].

Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., Federici, G., 2001. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. Clinical Chemistry. 47, 1467–1469.

Peng, J.H., Sun, D., Nevo, E., 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. Molecular Breeding. 28, 281.

Pilon, M., Ravet, K., Tapken, W., 2011. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. Biochimica et Biophysica Acta. 1807, 989-998.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochemical Pharmacology. 66, 1499–1503.

Rajaram, S., Braun, H.J., van Ginkel, M., 1996. CIMMYT's approach to breed for drought tolerance. Euphytica. 92, 147-153.

Razmi, G.R., 2016. Irrigation Management in Wheat Fields. East Azerbaijan Agricultural Jihad Organization. 6p. [In Persian]. https://agrilib.areeo.ac.ir/book1573.pdf.

Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004a. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology. 161, 1189-1202.

Reddy, A.R., Viswanatha Chaitanya, K., Vivekanandan, M., 2004b. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology. 161, 1189–1202.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A., 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Science. 16, 13561–13578.

Song, J., Zeng, L., Chen, R., Wang, Y., Zhou, Y., 2018. In silico identification and expression analysis of superoxide dismutase (SOD) gene family in *Medicago truncatula*. 3 Biotech. 8, 348.

Song, Q., Liu, C., Goudia Bachir, D., Chen, L., Hu, Y.G., 2017. Drought resistance of new synthetic hexaploid wheat accessions evaluated by multiple traits and antioxidant enzyme activity. Field Crops Research. 210, 91-103.

Theophilo, B., Marta, V., 2010. A variation of the Field Capacity (FC) definition and a FC database for Brazilian soils. p. 1-4. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for Changing World. 1-6 August 2010. Brisbane, Australia.

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics. 10, 57–63.

Wang, W., Zhang, X., Deng, F., Yuan, R., Shen, F., 2017. Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*. BMC Genomics. 18, 376.

Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research. 14, 415-421.

Zhang, J., Li, B., Yang, Y., Hu, W., Chen, F., Xie, L., Fan, L., 2016. Genome-Wide characterization and expression profiles of the superoxide dismutase gene family in *gossypium*. International Journal of Genomics. 8740901. https://doi.org/10.1155/2016/8740901

Zhou, Y., Hu, L., Wu, H., Jiang, L., Liu, S., 2017. Genome-Wide Identification and transcriptional expression analysis of cucumber superoxide dismutase (SOD) family in response to various abiotic stresses. International Journal of Genomics. 7243973. https://doi.org/10.1155/2017/7243973