ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٨
صفحه ٣٥٦ - ٣٤٥

بررسی میزان کلروفیل، پرولین و بیان ژن *P5CS* در مراحل رویشی و گلدهی زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) تحت تنش خشکی

Study of chlorophyll content, proline accumulation and *P5CS* gene expression at vegetative and flowering stages in *Dracocephalum kotschyi* under drought stress

صغری کیانی[1]، بهروز شیران*[2]، جعفر احمدی[3]، حسین فلاحی[4]، صدیقه فابریکی اورنگ[3]

١- دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران و عضو هیأت علمی دانشگاه پیام نور، دانشکده کشاورزی، تهران، ایران
٢- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
٣- به‌ترتیب استاد، دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران
٤- استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

Kiyani S[1], Shiran B[*2], Ahmadi J[3], Falahi H[4], Fabriki Orang S[3]

1. PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Professor, Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Razi University, Bagh-e-Abrisham Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: beshiran45@gmail.com

(تاریخ دریافت: ٩٨/٣/١٢ - تاریخ پذیرش: ٩٨/٧/١٣)

چکیده

زرین‌گیاه یکی از گیاهان دارویی بومی ایران و متعلق به خانواده لامیاسه است. یکی از پاسخ‌های مهم گیاهان به تنش‌های اسمزی افزایش پرولین می‌باشد. پرولین در رشد گیاه در شرایط طبیعی و همچنین افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی مؤثرمی‌باشد. از جمله آنزیم‌های اصلی در مسیر بیوسنتز پرولین Δ-پرولین٥-کربوکسیل‌سنتاز (*P5CS*) می‌باشد که نقش مهمی در تجمع پرولین در شرایط تنش خشکی و افزایش مقاومت گیاه ایفا می‌کند. در این آزمایش تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل a، b و کل، میزان پرولین و بیان ژن *P5CS* در گیاه دارویی زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) در دو مرحله رویشی و گلدهی مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت یک آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور تنش خشکی شامل تنش خشکی شدید (٢٥٪ ظرفیت زراعی)، متوسط (٥٠٪ ظرفیت زراعی) و کم (٧٥٪ ظرفیت زراعی) و گیاهان شاهد (١٠٠٪ ظرفیت زراعی) و فاکتور دیگر دوره‌های رشدی شامل دوره رویشی و گلدهی با سه تکرار انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن *P5CS* و محتوای پرولین و همچنین کاهش معنی‌داری در محتوای رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل a، b و کل شد. بیشترین میزان بیان ژن *P5CS* و حداکثر مقدار پرولین در دوره گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی متوسط (٥٠٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

پرولین
تنش خشکی
زرین‌گیاه
Dracocephalum kotschyi
P5CS

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

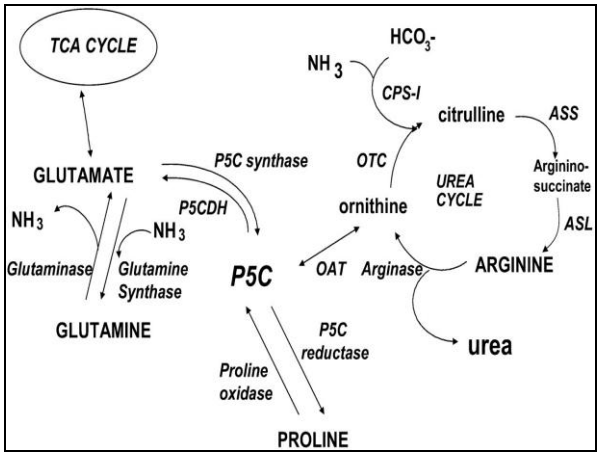
مقدمه

زرین‌گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschyi* یک گیاه دارویی علفی چند ساله متعلق به خانواده لامیاسه، بومی ایران و دارای خواص بیولوژیکی و دارویی فراوانی می‌باشد. در طب سنتی از این گیاه در کاهش تب، درد مفاصل و روماتیسم و به عنوان ضد التهاب و التیام دهنده زخم استفاده می‌شود، این گیاه در تقویت سیستم ایمنی نیز نقش عمده‌ای دارد (Fattahi et al. 2016). با وجود اهمیت دارویی بسیار زیاد این گیاه تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر تنش خشکی بر روی این گیاه صورت نگرفته است.

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که همانند سایر تنش‌های محیطی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. توانایی گیاهان برای زنده ماندن در شرایط تنش خشکی بستگی به گونه گیاهی، مرحله رشد گیاه، طول دوره تنش و شدت تنش دارد. همه مراحل رشد و نمو گیاه نسبت به تنش خشکی به‌طور یکسان دچار خسارت نمی‌شوند، بعضی از مراحل نسبت به تنش خشکی خیلی حساس و بعضی حساسیت کمتری دارند. اهمیت تنش خشکی در مرحله رشد زایشی به‌دلیل تولید محصول نسبت به مرحله رشد رویشی بسیار بیشتر می‌باشد. تنش خشکی دلیل اصلی کاهش رشد گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد که باعث پاسخ‌های مختلف گیاه در سطوح فیزیولوژیکی و مولکولی می‌شود. محتوای رطوبت نسبی برگ یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیکی برای اندازه‌گیری آب گیاه می‌باشد که مقدار آب در دسترس گیاه را نشان می‌دهد و مقدار آن تحت تأثیر تنش خشکی کاهش می‌یابد. در شرایط کمبود آب، کاهش محتوای رطوبت نسبی برگ در نتیجه افزایش تبخیر و کاهش جذب آب توسط سیستم ریشه‌ای گیاه اتفاق می‌افتد (Fathi and Tari 2016).

تأثیر تنش خشکی بر روی کلروفیل بستگی به ژنوتیپ گیاه و شرایط محیطی دارد. کاهش مقدار کلروفیل در اثر تنش خشکی می‌تواند به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و تجزیه رنگدانه‌های کلروفیل باشد. همچنین تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و در نتیجه تجزیه کلروفیل شود (Bouchemal et al. 2016; Sepehri and Golparvar 2011; Sahehi et al. 2016).

از جمله پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی افزایش میزان ترکیبات تنظیم اسمزی مانند پرولین در سلول‌های گیاهی برای حفظ آماس سلول می‌باشد. در شرایط تنش خشکی افزایش سنتز و تجمع پرولین به‌عنوان یک پاسخ متابولیکی گیاه می‌باشد در ضمن این که افزایش پرولین در شرایط تنش نشان‌دهنده مقاومت و سازگاری گیاه نسبت به شرایط نامساعد می‌باشد (Fathi and Tari 2016). نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت (Rayapati et al. 1991) یونجه (Ginzberg et al. 1998) و آرابیدوپسیس (Kiyosue et al. 1996) گزارش شده‌است. به‌طور معمول پرولین در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد.



شکل ۱- بیوسنتز پرولین از طریق مسیرهای گلوتامیک اسید و آرنتین

در گیاهان عالی پرولین از دو مسیر گلوتامیک اسید و ارنتین سنتز می‌شود (شکل ۱). این دو مسیر به‌ویژه در شرایط تنش‌های اسمزی مسیرهای اصلی سنتز پرولین محسوب می‌شوند. در مسیر گلوتامیک اسید، پرولین از طریق دو ماده واسط گلوتامیک γ سمی آلدئید و پرولین ۵-کربوکسیل (P5C) سنتز می‌شود. در مرحله اول آنزیم پرولین ۵- کربوکسیل سنتاز (P5CS) و بعد از آن آنزیم پرولین ۵- کربوکسیل رداکتاز (P5CR) در سنتز پرولین نقش دارند. ژن کدکننده P5C از گیاهان گوناگون استخراج و به نام *P5CS* ثبت شده‌است (Najo et al. 1999). آنزیم Δ-پرولین۵- کربوکسیل‌سنتاز، آنزیم تعیین کننده سرعت سنتز پرولین می‌باشد و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

نقش مهمی در تحمل گیاهان نسبت به تنش خشکی دارد. تجمع پرولین با افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش خشکی همبستگی مستقیم و بالایی را نشان داده است. همچنین افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز پرولین نیز باعث افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش خشکی شده‌است (Chen et al. 2009). در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم *P5CS* در سلول افزایش یافته و مقدار پرولین را در سلول به حدی بالا می‌برد که از خسارت ناشی از کم آبی به گیاه جلوگیری می‌کند (Yamchi et al. 2005). در این خصوص Li et al. (2018) نقش مهم و کلیدی ژن *P5CS* را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی بیان کردند. افزایش بیان این ژن در گیاهان تراریخته نیشکر باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش خشکی گردید (Li et al. 2018). گزارش شده که متابولیسم پرولین نقش مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارد. تجمع پرولین تحت شرایط تنش خشکی در تنباکوی تراریخته باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی شد (Silva et al. 2018). در بررسی‌های انجام شده بر روی گیاه یونجه القاء تنش خشکی توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول باعث افزایش میزان پرولین شد اما با افزایش طول مدت تنش از میزان پرولین کاسته شد هرچند که نسبت به گیاهان کنترل هنوز افزایش نشان می‌داد (Zhu et al. 2016).

با توجه به اهمیت دارویی زرین‌گیاه و این‌که تاکنون در ارتباط با تأثیر تنش خشکی بر روی این گیاه مطالعه‌ای صورت نگرفته این تحقیق با هدف بررسی محتوای رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل a، b و کل، میزان پرولین و بیان ژن کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز پرولین (*P5CS*) و ارتباط آن‌ها در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی در گیاه دارویی زرین‌گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شرایط کنترل شده در گلخانه دانشگاه شهرکرد با ارتفاع ۲۰۶۱ متر از سطح دریا و مختصات جغرافیایی (21 °32 09" N, 50° 49' 39" E) در دی ماه سال۱۳۹۵ در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور سطوح مختلف تنش خشکی و دو مرحله رشدی با سه تکرار انجام شد. شرایط گلخانه دارای دمای روزانه/ شبانه ۱±۱/۲۵±۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت هوای ۷۰٪ بود. بذرهای گیاه *Dracocephalum kotschyi* از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شدند. این بذرها به‌صورت یک توده بومی بوده و از منطقه حنای سمیرم اصفهان جمع‌آوری شده بودند. بذرهای این گیاه درون سینی نشاء پلاستیکی حاوی پیت ماس: کوکوپیت: ماسه به نسبت ۱:۱:۱ کشت شدند. نشاءها بعد از ده هفته و رشد کافی به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک رس: کود دامی: شن به نسبت ۱:۱:۲ انتقال یافتند. بعد از استقرار کامل گیاهچه‌ها و رشد کافی گیاهان، تیمارهای تنش خشکی شامل تنش خشکی شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی)، تنش خشکی متوسط (۵۰٪ ظرفیت زراعی)، تنش خشکی کم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) و تیمار شاهد (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشدی (رویشی و گلدهی) به مدت زمان یک هفته اعمال شدند. جهت اعمال تنش خشکی ابتدا ظرفیت زراعی خاک گلدان‌ها تعیین و سپس بر مبنای ظرفیت زراعی خاک، تیمارهای تنش خشکی اعمال شدند. نمونه‌گیری از برگ‌های جوان به منظور اندازه گیری رطوبت نسبی گیاه، میزان پرولین، کلروفیل، استخراج RNA و بررسی بیان ژن *P5CS*، یک هفته بعد از اعمال تنش خشکی در دو مرحله گلدهی و رویشی صورت گرفت. نمونه‌های برگی تهیه شده تا زمان بررسی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی درون فریزر۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور اطمینان از اعمال تنش در گیاهان مورد مطالعه محتوای رطوبت نسبی گیاه (RWC) پس از اعمال سطوح مختلف تنش خشکی در هر دو مرحله گلدهی و رویشی اندازه گیری شد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای رطوبت نسبی گیاه (RWC) محتوای نسبی آب برگ‌ها بر اساس روش Turner (1986) با اندکی تغییر انجام شد. در این روش برگ‌های تازه گیاهان بلافاصله بعد از نمونه برداری توزین شدند (FW)، سپس برگ‌ها به مدت ٦ ساعت درون آب‌مقطر غوطه‌ور شده و سپس توزین شدند (TW) پس از آن برگ‌ها به مدت ٢٤ ساعت درون پاکت‌های کاغذی و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و دوباره وزن برگ‌ها اندازه‌گیری شد (DW). محتوای آب نسبی برگ (RWC) براساس فرمول زیر محاسبه شد:

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

$$RWC\ (\%) = (FW - DW)/ (TW - DW) \times 100$$

استخراج کلروفیل موجود در برگ به روش Arnon (1949) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم بافت برگ نگهداری شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بوسیله ازت مایع سائیده شد. ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰٪ به آن اضافه و به‌خوبی هموژنیزه و به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٦٦٣ (کلروفیل a) و ٦٤٥ (کلروفیل b) با استفاده از شاهد (استن ۸۰٪) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و مقدار کلروفیل a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

$$\text{کلروفیل a} = \frac{[(12.7\times A663)-(2.69\times A645)]\times v}{1000\times w}$$

$$\text{کلروفیل b} = \frac{[(22.9\times A645)-(4.86\times A663)]\times v}{1000\times w}$$

$$\text{کلروفیل کل} = \frac{[(8.02\times A663)+(20.2\times A645)]\times v}{1000\times w}$$

که در این رابطه A663: میزان جذب در طول موج ٦٦٣ نانومتر، A645: میزان جذب در طول موج ٦٤٥ نانومتر، V: حجم نهایی عصاره بر حسب میلی‌لیتر و W: وزن بافت بر حسب گرم می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری پرولین از روش Bates et al (1973) با اندکی تغییر استفاده شد. در این روش ۵۰۰ میلی‌گرم بافت برگ نگهداری شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بوسیله اتانول ۹۵٪ هموژنیزه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای٤ درجه سانتی‌گراد و ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به ۲ میلی‌لیتر از روشناور[1] حاصل ۲ میلی‌لیتر نین هیدرین اسیدی اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد (درون حمام آب‌گرم) قرار گرفت. به مخلوط حاصل بعد از خنک شدن (درون حمام آب یخ) ٤ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۱۵تا ۲۰ ثانیه به خوبی مخلوط شد. سپس به‌منظور جدا شدن فاز رنگی حاوی تولوئن و فاز شفاف، مخلوط حاصل ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در محیط تاریک نگهداری شد. مقدار جذب نور فاز رنگی حاوی تولوئن که در بالا تشکیل شده بود در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. به‌منظور کمی کردن تغییرات پرولین، منحنی استاندارد جذب بر اساس دامنه تغییرات رنگ، در نمونه‌هایی با مقادیر پرولین مشخص (۰، ۸، ١٤، ٢٤، ٣٢ و ٤٠ پی‌پی‌ام) رسم شد. میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. تولوئن به‌عنوان شاهد دستگاه مورد استفاده قرار گرفت و استانداردها نسبت به آن سنجیده شدند.

استخراج RNA کل با استفاده از محلول تریزول شرکت Ambion (TRIzol®Reagent) وحذف آلودگی‌های DNA با استفاده از DNAseI (# EN0521) ساخت شرکت فرمنتاز (Fermentase) از نمونه‌های برگ طبق دستورالعمل شرکت‌های سازنده با اندکی تغییرات صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ترموفیشر مدل ۲۰۰۰ (Thermo NanoDrop 2000 Fisher) و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ تعیین شد. نمونه‌های RNA که دارای نسبت OD ۲٦۰ به ۲۸۰ نزدیک به ۲ بوده و بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ درصد فاقد اسمیر بوده و دارای دو باند قوی یکی مربوط به 28S rRNA و دیگری 18S rRNA بودند دارای کیفیت مطلوب بوده، جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۲- A). طراحی آغازگرهای مورد نیاز بر اساس داده‌های آنالیز ترنسکریپتوم (RNA-seq) این گیاه در شرایط کنترل و تنش انجام شد. توالی‌یابی نمونه‌های کنترل و تنش با استفاده از تکنیک Illumina Hi Seq 2000 به‌صورت خوانش‌های جفت انتهایی 2X100 توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد. سپس نرم‌افزار Fast QC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) به‌منظور بررسی کیفیت داده‌ها استفاده شد. حذف توالی‌های آداپتور وهمچنین داده‌های بی‌کیفیت توسط نرم‌افزار Trimmomatics v0.32 (http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic) انجام شد. داده‌های با کیفیت بالا برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به این‌که ژنوم زرین‌گیاه تا کنون توالی‌یابی نشده بود، به‌منظور یکپارچه‌سازی خوانش‌ها از de novo assembly استفاده شد. به این منظور داده‌های با کیفیت بالا توسط نرم‌افزار Trinity de novo RNA-Seq assembler (https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki)

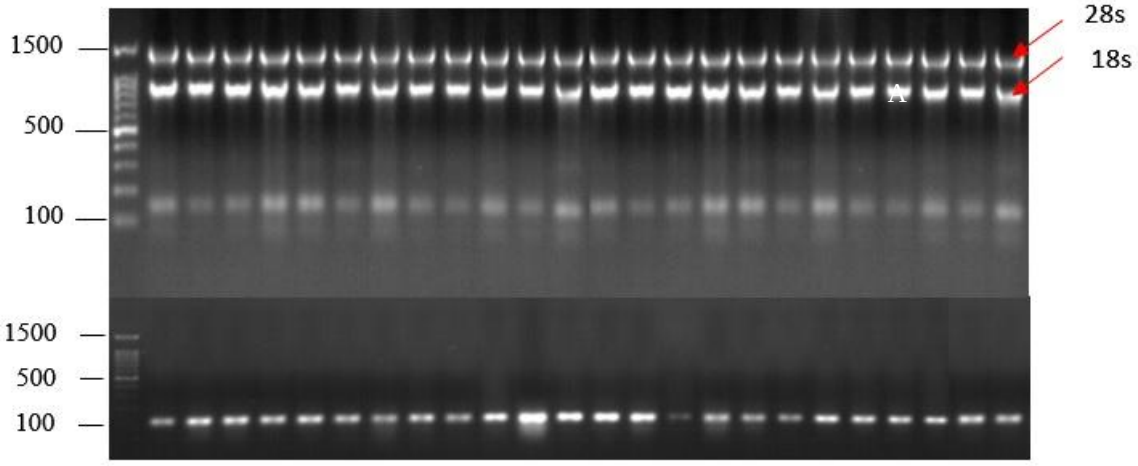
[1] supernatant

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

یکپارچه‌سازی شدند. برای هر یک از نمونه‌ها و با استفاده از بسته نرم‌افزاری RSEM پروفایل بیان ژن روی توالی‌های خوانده شده‌ای که نقشه‌یابی شد، صورت گرفت. با استفاده از این بسته نرم‌افزاری تعداد کانتیگ‌ها و ژن‌های منفرد در دو بافت کنترل و تنش مشخص شد. به منظور طراحی آغازگرها از نرم‌افزار آنلاین Primer3 (http://primer3.ut.ee) استفاده شد. ویژگی‌های جفت آغازگرها از لحاظ تشکیل ساختارهای ثانویه، هترودایمر، همودایمر و غیره با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Oligoanalyzer (https://eu.idtdna.com) همچنین توسط NCBI primer blast بررسی و تأیید شدند. جهت اطمینان از صحت آغازگرهای طراحی شده، این آغازگرها مجدداً بر روی توالی کانتیگ‌های حاصل از RNA-seq بلاست شدند. جدول ۱ لیست آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد. سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰میکرولیتر از ۲۰۰۰ نانوگرم RNA کل با استفاده از کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز آزما (YTA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت و در نهایت به نسبت ۱ به ۲ بوسیله آب‌مقطر دو بار تقطیر رقیق شد.

جدول ۱- نام ژن و توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی آغازگر ('۳-'۵)	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (C)
P5CS	L: GCTGATCTCCTTGTTCTGTTGA R: AGTTATTAGTCCCTCGTGCCT	۱۱۷	۵۸/۳۳ ۵۸/۲۵
EF1-α	L: TCCTTTGGGTCGTTTTGCTG R: GGTAACCTTGGCACCTGTTG	۱۰۰	۵۸/۹۷ ۵۹/۰٤
ACTIN-7	L: CGAGACGACCTACAACTCCA R: AGCCGTAATCTCCTTGCTCA	۱۳۳	۵۸/۸٤ ۵۸/۸۰



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراج شده (A) و محصولات End-point PCR ژن *P5CS* (B) در نمونه‌های بافت برگ زرین گیاه در دو مرحله گلدهی و رویشی تحت تأثیرتنش خشکی

جهت اطمینان از سنتز صحیح cDNA و همچنین بررسی آغازگرهای طراحی شده و تأیید حضور ژن *P5CS* واکنش end-point PCR برای هرنمونه انجام شد (شکل ۲- B). به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن *P5CS* تحت شرایط تنش و کنترل در دو مرحله رویشی و گلدهی واکنش Real Time-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل Real Q Plus Master (Ampliqon) Mix Green 1x، دو میکرولیتر cDNA و یک میکرومولار از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت توسط دستگاه Bio Rad (Mini Opticon, USA) با دو تکرار تکنیکی و سه تکرار بیولوژیکی که هر تکرار بیولوژیکی شامل مخلوط بافت برگ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

گیاهان چند گلدان مختلف بود، انجام شد. برنامه دمائی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت ۳ دقیقه در دمای ۹٤°C برای واسرشت‌سازی اولیه، ٤۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹٤°C (واسرشته سازی)، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۸°C (اتصال آغازگرها)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲°C (بسط) و در نهایت افزایش دما برای ترسیم منحنی ذوب از ٦۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. میزان بیان نسبی ژن *P5CS* با استفاده از روش Schmittgen and Livak (2008) محاسبه شد. دو ژن *EF1– α* و *Actin-7* به عنوان کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت با توجه به پایداری بیشتر ژن *EF1 – α* درشرایط کنترل و تنش این ژن به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن داده‌های بیان ژن *P5CS* مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس محتوای رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل a، b و کل، میزان پرولین و بیان نسبی ژن‌ها و همچنین مقایسه میانگین‌ها به روش توکی، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 و رسم نمودارها با استفاده از Excel ver. 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد کلیه صفات مورد بررسی به طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفتند. محتوای رطوبت نسبی برگ، میزان پرولین و بیان نسبی ژن *P5CS* اثرات متقابل معنی‌داری (p<۰/۰۱) را نشان دادند. اثرات اصلی صفاتی مانند کلروفیل a، b و کل که اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نشده بود در جداول ۳ و ٤ نشان داده شده‌است.

جدول۲- تجزیه واریانس محتوای رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، پرولین و بیان نسبی ژن *P5CS* تحت تأثیر تنش خشکی در زرین‌گیاه در دو دوره رویشی و گلدهی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		محتوای رطوبت نسبی گیاه	aکلروفیل	bکلروفیل	کلروفیل کل	پرولین	*P5CS*
دوره رشدی	۱	٤٦۷/٦۷**	۰/۰۰٦*	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۰۰۳۸^{ns}	۱۳۳٤/۹۰**
تنش خشکی	۳	۱۰۵٦/٤٤**	۰/۰۰٦**	۰/۰۰٦۰**	۰/۰۲۵**	۰/۰۰۰۱۸۳**	٤۷۸/۸۵**
تنش خشکی*دوره رشدی	۳	۲۰٦/٦۱**	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۱۰ ^{ns}	۰/۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۱۵٦**	۵۵۲/۸۹**
خطای آزمایشی	۱٦	۱۱/۰٦	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۰۹٤	۵۹/۱٦

**اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد، ^{ns} عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۳- مقایسه میانگین رنگدانه‌های فتوسنتزی در زرین‌گیاه تحت تأثیر تنش خشکی

تنش خشکی (ظرفیت زراعی٪)	aکلروفیل	bکلروفیل	کلروفیل کل
٪۱۰۰	۰/۳۸±۰/۰۱a	۰/۱۹±۰/۰۲a	۰/۵۸±۰/۰۳a
٪۷۵	۰/۳۲±۰/۰۱b	۰/۱۳±۰/۰۱b	۰/٤٦±۰/۰۲b
٪۵۰	۰/۳۲±۰/۰۲b	۰/۱۳±۰/۰۱b	۰/٤۵±۰/۰۳ b
٪۲۵	۰/۳۲±۰b	۰/۱۲±۰/۰۱b	۰/٤۵±۰/۰۱b

^{ns}عدم وجود اختلاف معنی‌دار

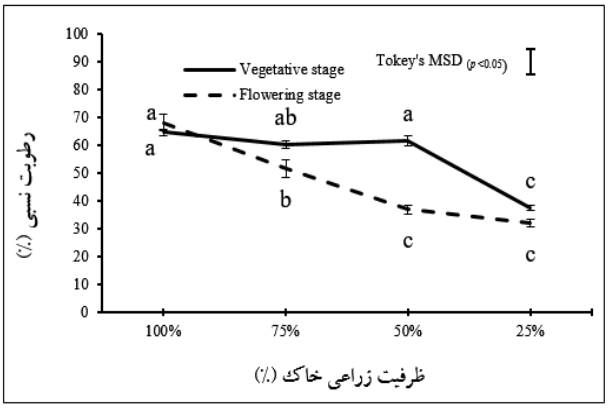
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

جدول ٤- مقایسه میانگین رنگدانه‌های فتوسنتزی در زرین‌گیاه در دو مرحله گلدهی و رویشی

مرحله رشد	aکلروفیل	bکلروفیل	کلروفیل کل
رویشی	۰/۳۲±۰/۰۱b	۰/۱٤±۰/۰۱	۰/٤۷±۰/۰۳
گلدهی	۰/۳۵±۰/۰۱a	۰/۱٤±۰/۰۱	۰/۵±۰/۰۲
		ns	ns

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه تنش خشکی در هر دو مرحله رشدی باعث کاهش معنی‌دار ($p< ۰/۰۱$) محتوای نسبی آب برگ در زرین گیاه شد (جدول ۲). کمترین میزان رطوبت نسبی در هر دو دوره رشدی تحت تأثیرتیمار تنش خشکی شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد. گیاهان در مرحله گلدهی در شرایط تنش خشکی رطوبت نسبی کمتری داشتند. در مرحله رشد رویشی بیشترین پاسخ به تنش خشکی از نظر محتوای نسبی آب گیاه در شرایط تنش خشکی شدید مشاهده شد، در حالی‌که در مرحله گلدهی حتی یک تنش خشکی کم هم کاهش معنی‌داری را بر محتوای نسبی آب برگ ایجاد کرد (شکل ۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که زرین گیاه در دوره رویشی نسبت به تنش خشکی حساسیت کمتری داشته و توانایی حفظ رطوبت بیشتری دارد، اما در دوره گلدهی گیاه حساسیت بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داد. کاهش محتوای نسبی آب برگ در گیاهان باعث بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز و در مقادیر شدید منجر به توقف انتقال الکترون، ممانعت از جذب نور و تخریب غشاء می‌شود (Kamali et al. 2015).



شکل ۳- مقایسه میزان رطوبت نسبی برگ در زرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تنش خشکی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق تنش خشکی به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۱$) باعث کاهش میزان کلروفیل a، b و کل شد (جدول ۲). در میان رنگدانه‌های گیاهی مورد بررسی، کلروفیل a افزایش معنی‌داری در مرحله گلدهی نسبت به مرحله رویشی نشان داد اما کلروفیل b و کل در مراحل مختلف رشدی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۳). تنش خشکی کم در حد ۷۵ درصد ظرفیت زراعی باعث کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیلa، b و کل شد. بیشترین کاهش در میزان کلروفیل a، b و کل در اثر تنش خشکی شدید مشاهده شد که البته در مقایسه با شرایط تنش خشکی کم و متوسط میزان این کاهش معنی‌دار نبود (جدول ٤). کاهش میزان کلروفیل a، b و کل در زرین‌گیاه در اثر تنش خشکی می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت رنگدانه‌های فتوسنتزی این گیاه نسبت به تنش خشکی باشد. همچنین کاهش غلظت کلروفیل در گیاهان تحت تنش می‌تواند به‌دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول باشد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و در نتیجه تجزیه کلروفیل در گیاه می‌شوند (Bouchemal et al. 2016). به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز، پراکسیداز و ترکیبات فنلی و در نتیجه تجزیه کلروفیل دلیل اصلی کاهش کلروفیل در اثر تنش خشکی باشد. در نتیجه گیاهان در شرایط تنش خشکی با تجزیه رنگدانه‌های گیاهی از تجمع انواع اکسیژن فعال در گیاه جلوگیری می‌کنند. کاهش در میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در اثر تنش خشکی باعث کاهش در جذب نور توسط گیاه می‌شود (Salehi et al. 2016). میزان کلروفیل در گیاهان یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی گیاهان می‌باشد و با توجه به شدت، مدت و مرحله رشدی گیاه، تأثیر تنش خشکی بر میزان هر یک از کلروفیل‌های a، b و کل در گیاهان متفاوت خواهد بود (Fathi and Tari 2016). مطالعات زیادی وجود دارد که نشان می دهد تنش خشکی در گیاهان باعث

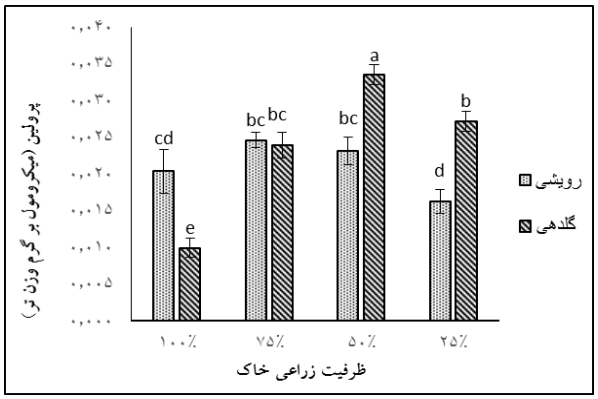
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود (Kadkhodaie et al. 2014; Bouchemal et al. 2016; Ahmadi et al. 2018; Mafakheri et al. 2010).

کلروفیل a رنگدانه اصلی فتوسنتز در گیاهان می‌باشد و افزایش معنی‌دار کلروفیل a در مرحله گلدهی احتمالاً بدلیل توان فتوسنتزی بیشتر گیاه در مرحله گلدهی می‌باشد. Cabello et al. (2006) بیشترین میزان کلروفیل کل را در گیاهچه‌های ۲۰ روزه مشاهده کرده و همچنین گزارش کردند که میزان کلروفیل a بیشتر تحت تأثیر سن برگ قرار می‌گیرد. بر اساس گزارشات Chaparzadeh et al. (2013) با رشد برگ‌ها، سطح برگ و در نتیجه فعالیت‌های بیوشیمیایی به‌منظور افزایش کلروپلاست افزایش یافته و در نتیجه باعث افزایش میزان کلروفیل در برگ‌ها می‌شود. یوزی‌لاک و همکاران (2016) میزان کلروفیل بیشتری را در برگ‌های رسیده و بالغ تنباکو گزارش کردند. Morteza et al. (2013) تغییرات میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی را در مراحل مختلف رشدی در گیاه ذرت بررسی کردند. آن‌ها در این بررسی مقدار بیشتر کلروفیل a، b و کل را در مرحله گلدهی نسبت به دوره رشد رویشی مشاهده کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که در مرحله گلدهی در حالی‌که سطح برگ‌ها بیشتر است، جذب نور بیشتری اتفاق می‌افتد و در نتیجه تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی را در گیاه تسهیل می کند.

یکی از مهم‌ترین پاسخ های گیاهان به تنش خشکی تجمع پرولین می‌باشد. پرولین یکی از اسید آمینه‌های اصلی پروتئین‌هایی است که در تنظیم اسمزی دیواره سلولی و غشاء سلول نقش دارند. تجمع پرولین در غشاء سلول در شرایط تنش خشکی در حفظ پتانسیل اسمزی، حذف رادیکال‌های آزاد، حفاظت از ماکرومولکول‌ها و تنظیم pH سلول‌ها نقش دارد (Boroujerdnia et al. 2016). به‌نظر می‌رسد که تجمع پرولین در تنش‌های اسمزی نه تنها فعالیت‌های شیمیایی سلول را متوقف نمی‌کند، بلکه به‌عنوان یک محافظ اسمزی ایفای نقش می‌کند.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه دوره‌های مختلف رشدی بر میزان پرولین اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، اما تنش خشکی و اثر متقابل دوره‌های رشدی و تنش خشکی بر میزان پرولین اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). با افزایش شدت تنش خشکی در هر دو دوره رشدی تجمع پرولین در ابتدا افزایش اما سپس کاهش نشان داد. هرچند این افزایش در دوره رویشی معنی‌دار نبود. تنش خشکی ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) در دوره رویشی باعث افزایش جزئی میزان پرولین شد اما در دوره گلدهی افزایش۲/٤ برابری میزان پرولین نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. تنش خشکی متوسط (۵۰٪ ظرفیت زراعی) در دوره رشد رویشی تاثیر چندانی بر روی میزان پرولین نشان نداد اما در دوره گلدهی باعث افزایش ۳/٤ برابری میزان پرولین نسبت به گیاهان شاهد شد. تنش خشکی شدید(۲۵٪ ظرفیت زراعی) در هر دو دوره رشدی باعث کاهش میزان پرولین شد (شکل٤). بیشترین میزان پرولین در دوره گلدهی تحت شرایط تنش متوسط (۵۰٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر در توافق با نتایج Zhu et al. (2016) بر روی گیاه یونجه بود که تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین شد اما افزایش مدت زمان تنش باعث شد که از میزان پرولین کاسته شود هر چند که افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشت.



شکل٤- مقایسه میزان پرولین در زرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تنش خشکی

مطالعات انجام شده در مراحل فنولوژیکی مختلف در ارقام پسته میزان پرولین بیشتری را در گل‌های باز شده پس از طی دوره سرمای بهاره نشان داد (Mansouri et al. 2011). در بررسی‌های انجام شده بر روی واریته‌های مختلف نخود افزایش میزان پرولین تحت شرایط تنش خشکی در مرحله گلدهی نسبت به مرحله رویشی گزارش شده است (Mafakheri et al. 2010). مطالعات صورت گرفته بر روی ارقام مختلف گندم در شرایط تنش خشکی افزایش غلظت پرولین را در ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم

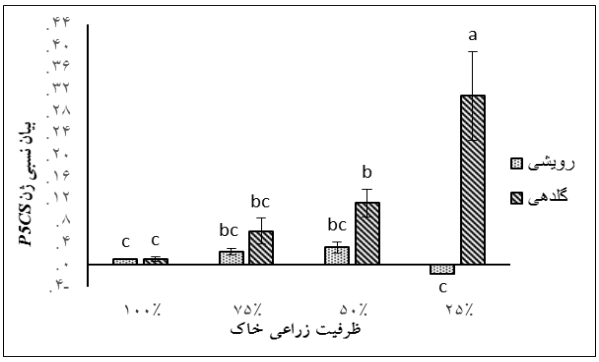
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

تحت شرایط تنش خشکی نشان داده است (Ahmadi and Siosemarde 2004). افزایش غلظت پرولین در دوره گلدهی تحت تنش خشکی را می‌توان به تجزیه بیشتر پروتئین‌ها و حساسیت بیشتر زرین‌گیاه نسبت به تنش خشکی در مرحله گلدهی تفسیر کرد. در مراحل اولیه تنش کم آبی در بعضی از گیاهان چندین اسید آمینه افزایش می‌یابند اما با ادامه شرایط تنش تجمع اسید آمینه پرولین بیشتر می‌شود و بیشترین ذخیره پرولین در برگ گیاهان می‌باشد (Heuer 1994). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و سازگاری به شرایط تنش اسمزی در گیاهان وجود دارد (kiyosue et al. 1996). تحقیقات انجام شده بر روی گیاه سویا نیز سنتز پرولین در برگ‌ها و گرهک‌های این گیاه را در اثر افزایش تنش نشان داده است (Lazcano-Ferrat and Lovatt 1999). افزایش غلظت پرولین در اثر کمبود آب در سه رقم گندم دوروم گزارش شده است (Bajji et al. 2001). به‌نظر می‌رسد که تجمع پرولین آزاد یک پاسخ متداول به تنش در گیاهان عالی باشد.البته اسیدهای آمینه دیگری نیز تحت تنش‌های خشکی و شوری انباشته می‌شوند، اما درجه تغییرات آن‌ها با تجمع پرولین که ظرف مدت کوتاهی پس از اعمال تنش به سطوح خیلی بالا می‌رسد قابل مقایسه نیست (Gzik 1999). افزایش میزان پرولین در اثر تنش خشکی در گیاهان مختلفی از جمله گل همیشه بهار (Metwally et al. 2013)، نخود (Mafakheri et al. 2010)، گیاهان سرده بشقابی (Cheng et al. 2018)، آویشن دنایی (Bistgani et al. 2017)، سیاهدانه (Ghorbanli et al. 2011) و گیاه دارویی بومادران (Gharibi et al. 2016) گزارش شده‌است. در توافق با این نتایج افزایش میزان پرولین در گیاه دارویی زرین گیاه نیز در اثر تنش خشکی مشاهده شد.

به‌وسیله تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم زرین‌گیاه با استفاده از روش RNA-Seq، ۸۷۳۹۹ ژن منفرد در زرین‌گیاه شناسایی شد که از این تعداد ژن شناسایی شده ۱۸۶۱ ژن افزایش بیان و ۱۰۸۹ژن کاهش بیان در شرایط تنش نسبت به شاهد نشان دادند. از میان ژن‌های تغییر بیان یافته ژن *P5CS* در شرایط تنش نسبت به شاهد به میزان حدود سه برابر تفاوت بیان نشان داد. دو ایزوفرم مربوط به این ژن با شماره دسترسی‌های MN053946 و MN053947 در سایت NCBI ثبت شدند.

بررسی بیان ژن *P5CS* با استفاده از Real Time PCR در این مطالعه نشان داد که دوره رشدی، تنش خشکی و اثرات متقابل دوره رشدی و تنش خشکی بر روی میزان بیان ژن *P5CS* اختلاف معنی داری داشت (جدول ۲). الگوی بیان نسبی ژن *P5CS* درگیاه *D.kotschyi* در شکل (۵) در شرایط کنترل و تنش در دو مرحله رویشی و گلدهی نشان داده شده است. در دوره رویشی تنش خشکی کم و متوسط بیان این ژن را افزایش دادند اما تنش خشکی شدید باعث کاهش بیان این ژن شد هرچند تغییرات بیان ژن در این دوره رشدی معنی‌دار نبود. در دوره گلدهی تنش خشکی کم باعث افزایش غیرمعنی‌دار بیان این ژن شد اما با افزایش شدت تنش خشکی میزان بیان این ژن افزایش معنی‌داری نشان داد به طوری که تحت تأثیر تنش خشکی شدید میزان بیان این ژن به مقدار ۸/۱ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت. نتایج حاصل از بررسی بیان این ژن با استفاده Real time در این مطالعه با نتایج آنالیز ترنسکریپتوم (RNA-seq) این گیاه در شرایط کنترل و تنش مطابقت نشان داد. مطالعات نشان داده است که تنش خشکی باعث القاء رونویسی mRNA آنزیم Δ –پرولین– ۵ –کربوکسیلات سنتاز (*P5CS*) و افزایش میزان بیان ژن *P5CS* شده‌است (Deng et al. 2013). افزایش بیان ژن *P5CS* در اثر القاء تنش‌های اسمزی در گیاه *Lotus japonicus* نیز مشاهده شده‌است (Signorelli and Monza 2017). افزایش بیان ژن *P5CS* و تجمع پرولین تحت تنش کم آبی در اواخر دوره تنش در آرابیدوبسیس و لوبیا نیز گزارش شده‌است (Yoshiba et al. 1997). گزارشاتی مبنی برافزایش بیان ژن *P5CS* در آرابیدوبسیس و نقش مهم و کلیدی این ژن در تجمع پرولین تحت تنش شوری وجود دارد (Verbruggem et al. 1993).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]



شکل۵- مقایسه میانگین و بیان نسبی ژن P5CS در زرین گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی تحت تنش خشکی

بررسی‌ها نشان داده است هنگامی که تنش اسمزی در گیاه رفع می‌شود سطح رونوشت ژن *P5CS* شروع به کاهش و به‌دنبال آن میزان پرولین نیز در گیاه کاهش می‌یابد (Peng et al. 1996). افزایش بیان ژن *P5CS* و بدنبال آن تجمع پرولین در ارقام حساس و متحمل گندم گزارش شده‌است (Hosseini et al. 2017). در مطالعه حاضر افزایش در سطح پرولین کندتر از سرعت بیان ژن *P5CS* بوده که شاید ناشی از این واقعیت باشد که سنتز پرولین زمان بر بوده و این روند ممکن است با فعالیت متابولیکی سلول همراه باشد که در طول تنش رو به افزایش و سپس کاهش می‌باشد. که در توافق با نتایج حاصل از Hosseini et al. (2017) می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق تنش خشکی کم و متوسط در مرحله گلدهی باعث کاهش معنی‌دار میزان رطوبت نسبی گیاه نسبت به گیاهان شاهد شد، اما این شدت از تنش کاهش معنی‌داری بر میزان رطوبت نسبی گیاه در مرحله رویشی نداشت. همچنین مقدار پرولین در مرحله گلدهی تحت تأثیر تنش خشکی کم و متوسط افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد در حالی‌که این مقدار از تنش در مرحله رشد رویشی افزایش معنی‌داری بر روی میزان پرولین در زرین‌گیاه نشان نداد. در مرحله گلدهی محتوای رطوبت نسبی گیاه همبستگی منفی معنی‌داری با مقدار پرولین (۰/۸۵۵-) نشان داد. در این آزمایش نشان داده شد که کلیه سطوح تنش خشکی به‌طور معنی‌داری میزان کلروفیل را نسبت به گیاهان شاهد کاهش دادند و گیاه در مرحله گلدهی بیشترین مقدار کلروفیل a را نشان داد .

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی حاصل از این پژوهش می‌توان اظهار داشت که محتوای رطوبت نسبی گیاه، میزان کلروفیل a و پرولین و بیان نسبی ژن کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین (*P5CS*) تحت شرایط تنش خشکی بستگی به دوره رشدی زرین‌گیاه و شدت تنش خشکی دارد به‌طوری که محتوای نسبی آب گیاه در مرحله گلدهی در کلیه سطوح تنش خشکی کاهش قابل توجهی نشان داد اما در مرحله رویشی فقط تنش خشکی شدید باعث کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب گیاه شد. همچنین میزان کلروفیل a در مرحله گلدهی بیشتر از دوره رویشی بوده و به‌طور کلی تنش خشکی میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی را در این گیاه کاهش داد. همچنین محتوای پرولین و بیان ژن *P5CS* در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در دوره گلدهی افزایش قابل توجهی نشان داشت، اما در دوره رویشی تنش خشکی بر روی میزان پرولین و بیان ژن *P5CS* تأثیر چندانی نداشت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که زرین‌گیاه در دوره گلدهی حساسیت بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داده و گیاهان بیشتر تحت تأثیر تنش قرار گرفته، رطوبت نسبی گیاه کاهش‌یافته، بیان ژن *P5CS* و میزان پرولین در این مرحله از رشد گیاه افزایش بیشتری نشان داده است.

منابع

Ahmadi A, Siosemarde A (2004) Effect of drought stress on soluble carbohydrates, chlorophyll and proline in four wheat cultivars compatible with different climatic conditions of Iran. Iranian journal of Agricultural Sciences 35:753-763. (In Farsi).

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Ourang SF, Mehrabi AA, Siddique KH (2018) Wild relatives of wheat: Aegilops–Triticum accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. Acta Physiologiae Plantarum. 40: 90

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant physiology 24:1

Bajji M, Lutts S, Kinet JM (2001) Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. Plant Science 160:669-81.

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

Bistgani ZE, Siadat SA, Bakhshande A, Pirbalouti AG (2017) The effect of drought stress and elicitor of chitosan on photosynthetic pigments, Proline, Soluble Sugars and Lipid peroxidation of the membrane in Thymus deanensis Celak. in Shahrekord climate. Environmental Stresses in Crop Sciences 10:13-20. (In Farsi).

Boroujerdnia M, Bihamta M, AlamiSaid K, Abdossi V (2016) Effect of drought tension on proline content, soluble carbohydrates, electrolytes leakage and relative water content of bean (Phaseolus vulgaris L.). Crop Physiology Journal 8: 23-41.

Bouchemal K, Bouldjadj R, Belbekri MN, Ykhlef N, Djekoun A (2017) Differences in antioxidant enzyme activities and oxidative markers in ten wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes in response to drought, heat and paraquat stress. Archives of Agronomy and Soil Science 63:710-722.

Chen JB, Wang SM, Jing RL, Mao XG (2009) Cloning the PvP5CS gene from common bean (Phaseolus vulgaris) and its expression patterns under abiotic stresses. Journal of Plant Physiology 166: 12-19.

Cheng L, Han M, Yang LM, Li Y, Sun Z, Zhang T (2018) Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of Scutellaria baicalensis Georgi under drought stress. Industrial Crops and Products 122: 473-482.

Deng G, Liang J, Xu D, Long H, Pan Z, Yu M, (2013) The relationship between proline content, the expression level of P5CS (Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase), and drought tolerance in Tibetan hulless barley (Hordeum vulgare var. nudum). Russian Journal of Plant Physiology 60: 693-700.

Fathi A, Tari DB, (2016) Effect of drought stress and its mechanism in plants. International Journal of Life Sciences 10:1-6.

Fattahi M, Bonfill M, Fattahi B, Torras-Claveria, L, Sefidkon F, Cusido RM and Palazon J (2016) Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschyi* Boiss at three phenological stages using uni-and multivariate methods. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants3: 177-185.

Gharibi S, Tabatabaei BE, Saeidi G, Goli, SA (2016) Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of Achillea species. Applied Biochemistry and Biotechnology 178:796-809.

Ghorbanli M, Khaniki GR, Elisei SS, Hedayati M. (2011) Effect of water deficit and its interaction with ascorbate on proline, soluble sugars, catalase and glutathione peroxidase amounts in Nigella sativa L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26: 466-476. (In Farsi).

Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Koncz C, Zilberstein A (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Molecular Biology 38: 755-764.

Gzik A (1996) Accumulation of proline and pattern of α-amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. Environmental and Experimental Botany 36:29-38.

Heuer B (1994) Osmoregulatory role of proline in waterand salt-stressed plants. Handbook of Plant and Crop Stress. CRC Press, Boca Raton, United States, 363-381.

Hosseini SS, Ramezanpour SS, Soltanloo H, Vakili BS (2017) Evaluating expression of genes involved in proline synthesis pathway in mutant wheat T65-58-8 under drought stress. Modern Genetic Journal 12:451-461. (In Farsi).

Kadkhodaie A, Razmjoo J, Zahedi M, Pessarakli M (2014) Selecting sesame genotypes for drought tolerance based on some physiochemical traits. Agronomy Journal 106: 111-118.

Kamali M, Khosroyar S, Kamali H, Sani TA and Mohammadi A (2016) Phytochemical screening and evaluation of antioxidant activities of *Dracocephalum kotschyi* and determination of its luteolin content. Avicenna Journal of Phytomedicine 6: 425-433.

Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. The Plant Cell 8: 1323-1335.

Lazcano-Ferrat I, Lovatt CJ (1999) Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of Phaseolus vulgaris L. and P. acutifolius A.Gray during water deficit. Crop Science 39:467-75.

Li J, Phan TT, Li YR, Xing YX, Yang LT (2018) Isolation, transformation and overexpression of sugarcane So P5CS gene for drought tolerance improvement. Sugar Tech 20:464-473.

Mafakheri A, Siosemardeh AF, Bahramnejad B, Struik PC, Sohrabi Y (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. Australian Journal of Crop Science 4:580-585.

Mansouri Dehshoaibi R, Davarynejad GH, Hokmabadi H. Tehranifar A (2011) Evaluation of proline, proteins and sugar during phonological processes of flower buds of commercial pistachio cultivars. Journal of Horticultural Science 25: 116-121.

Metwally SA, Khalid KA, Abou-Leila BH (2013) Effect of water regime on the growth, flower yield, essential oil and proline contents of Calendula officinalis. Nusantara Bioscience 5:65-69.

Najo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Shinozaki K (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 18: 185-193.

Peng Z, Lu Q, Verma DPS (1996) Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. Molecular and General Genetics 253: 334-341.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]

Rayapati PJ, Stewart CR (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (Zea mays L.) mitochondria. Plant Physiology 95: 787-791.

Salehi A, Tasdighi H and Gholamhoseini M (2016) Evaluation of proline, chlorophyll, soluble sugar content and uptake of nutrients in the German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under drought stress and organic fertilizer treatments. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6: 886-891.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. Nature Protocols 3: 1101-1108.

Sepehri A and Golparvar AR (2011) The effect of drought stress on water relations chlorophyll content and leaf area in canola cultivars (*Brassica napus* L.). Electronic Journal of Biology 7: 49-53.

Signorelli S, Monza J (2017) Identification of Δ1-pyrroline 5-carboxylate synthase (P5CS) genes involved in the synthesis of proline in Lotus japonicus. Plant Signaling and Behavior 12: e1367464.

Silva FL, Vieira LG, Ribas AF, Moro AL, Neris DM, Pacheco AC (2018) Proline accumulation induces the production of total phenolics in transgenic tobacco plants under water deficit without increasing the G6PDH activity. Theoretical and Experimental Plant Physiology 30: 251-260.

Turner NC (1986) Crop water deficits: a decade of progress, Advance in Agronomy 39: 1-51.

Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in Arabidopsis thaliana. Plant Physiology 103:771-781.

Yamchi A, Jazii FR, Ghobadi C, Mousavi A, Karkhanehee AA (2005) Increasing of Tolerance to Osmotic Stresses in Tobacco Nicotiana tabacum cv. Xanthi through Overexpression of P5CS Gene. Journal of Water and Soil Sicence 8:31-40. (In Farsi).

Yoshiba Y, Kiyosue T, Nakashima K, YamaguchiShinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant and Cell Physiology 38: 1095-1102.

Zhu HS, Yu XJ, Zhao XI, Dong KH, Yang WD (2016) The activity and gene expression levels of P5CS and delta-oat in Medicago sativa cvpianguan under drought stress. Pakistan Journal of Botany 48: 137-142.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.7.7]