

تغییر بیان ژن های *P5CS* و *P5CR* دخیل در بیوسنتز پرولین و *MDA* تحت تنش اسمزی در شش رقم گندم (*Triticum aestivum* L.)

Change the *P5CS* and *P5CR* genes expression of involved in the biosynthesis of proline under osmotic stress in the six varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.)

پریسادادگر*^۱، زهره علیزاده^۱، محمدقادر قادری^۱، علی ایزانلو^۱

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استادیار، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

Dadgar P^{*1}, Alizade Z¹, Ghadry MGh¹, Izanloo A¹

1. MSc, Assistant professors, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Birjand University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: parisadadgar67@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

تنش خشکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار، فاکتور اول ارقام گندم شامل روشن و کویر (متحمل به خشکی)، قدس و مهدوی (حساس به خشکی) و شعله و طبسی (مقاومت متوسط نسبت به خشکی) و فاکتور دوم تنش اسمزی اعمال شده با پلی اتلین گلیکول ۸۰۰۰ در سه سطح صفر، ۵- و ۱۰- بار، بذور ارقام جوانه زده را در محیط کشت هوگکند به مدت ۱۵ روز تحت تنش اسمزی اجرا شد. در مطالعه حاضر بررسی اهمیت بیان ژن های *P5CS* و *P5CR* در ارتباط با تجمع پرولین و *MDA* و نقش فیزیولوژیکی آن‌ها تحت شرایط تنش اسمزی در شش رقم گندم می‌باشد. اثر ارقام بر میزان تجمع پرولین در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد. مقدار پرولین برگ و ریشه ارقام متحمل به خشکی نسبت به ارقام مقاوم به خشکی در شرایط تنش اسمزی ۱۰- بار مقاوم‌تر مشاهده شد. برای مقایسه میانگین اثر متقابل تنش اسمزی×ارقام که بیشترین میانگین را رقم روشن (متحمل به خشکی) در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار نشان داد. در ارقام روشن و کویر که به‌عنوان ارقام مقاوم‌تر شناخته می‌شوند تجمع معنی‌دار پرولین را نشان ندادند. افزایش سطح تنش اسمزی سبب تخریب غشاهای سلولی و افزایش غلظت *MDA* به ترتیب در رقم شعله و طبسی بیش از ارقام دیگر شد. با اعمال افزایش سطح تنش اسمزی در ارقام، میزان بیان نسبی رونوشت ژن های *P5CR* و *P5CS* افزایش نشان داد. این ژن‌های در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار در رقم قدس (حساس) بیشترین بیان رونوشت نسبی را نشان دادند، در حالی که در سطح تنش اسمزی ۵- بار در رقم روشن (متحمل به خشکی) بیشترین بیان نسبی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پرولین
پلی اتلین گلیکول
تنش اسمزی
گندم
مالون دی آلدئید

تبدیل به گلوتامیک -5- سمی آلدئید می‌شود که بدون واسطه و به‌صورت خود به خود تبدیل به دلتا -1- پیرولین 5- کربوکسیلات می‌شود. در ادامه فرآیند، ماده اخیر به کمک آنزیم P5CR و احیا شدن NADPH به L- پیرولین تبدیل می‌شود (Yamchi et al. 2005). تجمع پیرولین نتیجه هیدرولیز پروتئین‌ها بوده و مسیر پیشنهادی تولید آن از گلوتامیک اسید گزارش شده‌است که در شرایط تنش، اکسیداسیون پیرولین به‌علت به‌هم ریختن غشای میتوکندری و اختلال در سنتز پروتئین کاهش می‌یابد. البته پیرولین در تنظیم اسمزی، جذب آمونیاک حاصل از تجزیه پروتئین و هم‌چنین در تولید انرژی در موارد خاص نقش دارد (Leinhose and Bergman 1995; Fakhem Rezaei and Zare Nahandi 2012). مالون دی آلدئید در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع توسط گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود تغییر در پراکسیداسیون چربی‌ها به‌عنوان شاخص میزان آسیب اکسایشی در موجودات زنده به شمار می‌آید. احتمال دارد دلیل اصلی آسیب شدید به غشای یاخته‌ای تولید رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) باشد که در نهایت منجر به پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع غشای یاخته‌ای می‌شود. افزایش نفوذپذیری غشا و کاهش پایداری غشا می‌تواند منجر به افزایش نشت الکترولیت‌ها به فضای بین یاخته‌ای شود (Brosani et al. 2001). با پیشرفت تکنولوژی در ابزارهای مولکولی و ژنتیکی تغییر گسترده‌ای در استفاده از روش‌های مولکولی و بهره‌مندی از روش‌های نوین ایجاد شده‌است. یکی از مهم‌ترین ابزارهای مولکولی مورد استفاده در غربالگری منابع ژرم پلاسمی الگوی بیان ژن است. میزان بیان ژن‌های دخیل در تحمل و مقاومت به تنش‌ها نیز سنجیده می‌شود و اطلاعاتی در رابطه با سازوکارهای ژن‌های مورد هدف برای پژوهشگران فراهم می‌کند (Fita et al. 2015). در راه کارهای تحمل به تنش، تفاوت‌های جزئی و دقیق در تنظیم بیان ژن‌ها منجر به ایجاد تنوع بسیار بزرگ از کاملاً متحمل تا کاملاً حساس می‌شود. بنابراین همین تفاوت‌های جزئی و دقیق در بیان ژن‌ها ممکن است در واریته‌های درون یک گونه نیز منشاء ایجاد واریته‌های متحمل و حساس به تنش خشکی به شود (Huang et al. 2008). از طرف دیگر، در اغلب مطالعات

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است. اولین محصول زراعی از نظر دانه در ایران می‌باشد (Hasheminasab 2012). این گیاه توانایی سازگاری بسیار زیاد با اقلیم‌های گوناگون دارد (Emam 2011). در میان عوامل محدودکننده عملکرد، کمبود آب مهم‌ترین عاملی است که به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک جهان از جمله ایران، باعث محدودیت کاشت و کاهش عملکرد گیاهان زراعی می‌شود (Kramer 1983). خشکی شایع‌ترین تنش محیطی است که به‌طور تقریبی موجب محدودیت تولید در ۲۵ درصد زمین‌های دنیا شده‌است. بنابراین توزیع و پراکنش گیاهان در سرتاسر دنیا تا حدود زیادی متأثر از میزان آب می‌باشد. از بین عوامل محیطی تنش‌زا، خشکی دومین عامل اصلی کاهش عملکرد می‌باشد (Biglouie et al. 2010). پیرولین یک اسید آمینه پروتئینی است که به‌صورت طبیعی در مقادیر بالا در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع پیدا می‌کند. در پاسخ به تنش خشکی تجمع پیرولین در سیتوزل، به‌صورت طبیعی سبب تنظیم اسمزی در سیتوپلاسم می‌شود. (Ashraf and Foolad 2007). پیرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگار در ساختمان زیرسلولی پروتئین‌ها و مولکول‌های محافظت‌کننده تحت تنش اسمزی در نظر گرفته شد. نقش مثبت پیرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به تنش‌های شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت (Ginzberg et al. 1998)، یونجه (Kiyosue et al. 1996) و آرابیدوپسیس (Rayapati and Stewart 1991) گزارش شده‌است. بررسی‌ها مؤید این است که سه عامل مهم شامل ۱- تحریک سنتز، ۲- مهار تجزیه، و ۳- جلوگیری از ورود پیرولین به درون پروتئین‌ها در تجمع پیرولین در شرایط تنش خشکی مطرح هستند (Arndt et al. 2001). البته تجمع پیرولین در دوره تنش ممکن است نتیجه تجزیه پروتئین‌ها و نیز کاهش استفاده از آن‌ها به‌دلیل کاهش رشد گیاه هم باشد (Movahhedi Dehnavi et al. 2011). در شرایط غیر تنش، پیرولین از مسیر اورنتین در گیاه تولید می‌شود، ولی در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی و شوری، پیرولین از مسیر L- گلوتامیک‌اسید توسط آنزیم دلتا-1- پیرولین 5- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH

اسمزی قرار گرفت. سپس بافت برگ‌ای ایجاد شده در محیط هوگلند را بلافاصله در نیتروژن مایع برای استخراج قرار داده شد. سنجش میزان پرولین طبق روش زیر انجام شد (Magne and Larher 1992). منحنی استاندارد پرولین، با غلظت‌های ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ ppm ترسیم شد در این رابطه Y برابر غلظت خوانده شده و X برابر غلظت پرولین می‌باشد (رابطه ۱). و غلظت پرولین بر حسب $M\mu/g$ W.F اعلام شد.

$$Y=0.0033 X - 0.017 \quad R^2 = 0.9995 \quad \text{رابطه ۱}$$

برای اندازه‌گیری مالون دی آلدئید از روش (Heath and Packer 1969) استفاده شد. برای محاسبه‌ی غلظت مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی معادل $15 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب وزن تر ارائه شد.

RNA کل از روش CTAB تغییر شکل یافته استخراج شد. به‌منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ^۱ (۲۰۰۰، کمپانی، Thermo Fisher، آمریکا) خوانده شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه روی ژل آگارز ۱درصد، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. جهت ساخت دو تکرار cDNA، از RNA کل گندم از آنزیم Reverse Transcriptase M-MLV شرکت یکتا تجهیز آزما، آغازگر الیگو dT استفاده شد.

آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *ACT* (ژن خانه‌دار)، *P5CS* و *P5CR* بر اساس مناطق حفاظت شده این ژن‌ها در گندم طراحی شدند. برای تعیین مناطق حفاظت شده از هم‌ردیفی ژن گندم و ژن‌های چند گونه گیاهی دیگر استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ژن مورد نظر از گندم از بانک ژن تارنمای NCBI^۲ تهیه شد سپس براساس نتایج BLAST^۳ ژن‌های مشابه با گونه‌های دیگر انتخاب شدند. در گام بعد توالی‌ها با نرم‌افزار MEGALIGN هم‌ردیف شدند. در نهایت با نرم‌افزار الیگو ۷ آغازگرهای اختصاصی از مناطق حفاظت شده ژن‌های مورد نظر طراحی شدند (جدول ۱). به‌منظور اطمینان از کارایی و عملکرد اختصاصی آغازگرها، واکنش RCR انجام شد.

بیان ژن در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است که ژن‌های دخیل در تحمل به تنش در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس بیان می‌شوند، اما تفاوت، در زمان و میزان بیان آن‌ها می‌باشد هر چند که تعداد این مطالعات محدود می‌باشد (Rodrigues et al. 2009). تصور می‌رود که در بیوسنتز پرولین ژن *P5CS* عامل محدودکننده سرعت بیوسنتز (کندترین آنزیم مسیر) آن بوده و نقش کلیدی در سنتز پرولین در گیاهان داشته باشد (Yoshiba et al. 1997). البته در گزارشاتی نیز بین بیان ژن *P5CS* و میزان پرولین رابطه‌ای مشاهده نشده است (Stines et al. 1999). از طرف دیگر، ژن *P5CR* عامل محدودکننده مسیر بیوسنتز پرولین نیست اما برخی نویسندگان معتقدند که بیان *P5CR* نیز طی تنش القا می‌شود (Verbruggen et al. 1993; Savouré et al. 1997). البته می‌دانیم که ژن *P5CR* در مسیر اورنی تین نیز آخرین آنزیم مسیر می‌باشد به‌عبارت دیگر در هر دو مسیر نقش دارد، لذا با توجه به اهمیت پرولین و مالون دی آلدئید و نقش فیزیولوژیکی آن‌ها در پاسخ به تنش، هدف از این مطالعه بررسی اهمیت بیان ژن‌های *P5CR* و *P5CS* در ارتباط با تجمع پرولین تحت شرایط تنش اسمزی در شش رقم گندم می‌باشد. همچنین هدف دیگر این پژوهش این است که آیا پرولین در ارقام متحمل و حساس به خشکی بیشتر به‌عنوان یک محافظت کننده اسمزی یا تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند و آیا از این نظر بین ارقام متحمل و حساس خشکی تفاوتی وجود دارد؟

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در آزمایشگاه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد، فاکتور اول ارقام گندم شامل روشن و کویر (متحمل به خشکی)، قدس و مهدوی (حساس به خشکی) و شعله و طبری (مقاومت متوسط نسبت به خشکی) و فاکتور دوم تنش اسمزی اعمال شده با پلی اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ در سه سطح صفر (شاهد)، ۵- (تنش متوسط) و ۱۰- (تنش زیاد) بار بود (Michel 1983). بذور جوانه زده ارقام در محیط کشت هوگلند (Hoagland and Arnon 1950) به مدت ۱۵ روز تحت تنش

¹ ThermoScientific

² National Center for Biotechnology Information

³ Basic Local Alignment Search Tool

استفاده از نرم‌افزار Totalab نسخه 1.10 انجام گرفت. برای اینکار میانگین شدت نوار ایجاد شده از هر ژن را به میزان شدت نوار ژن خانه‌دار (اکتین) تقسیم شد، در هر نمونه داده‌ها نرم‌ال‌سازی شده و بررسی‌های آماری توسط نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها انجام گرفت

نتایج و بحث

در شرایط آزمایشگاهی، جهت مشاهده صدمات ناشی از تنش خشکی از ماده Polyethylen glycol (PEG) استفاده می‌شود (Sivritepe et al. 2008). PEG مولکول‌هایی با وزن مولکولی زیاد است که پتانسیل آب را به روشی مشابه با خشکی خاک کاهش می‌دهد (Van Den Berg and zeng 2006). نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی شش رقم گندم و سطوح مختلف تنش اسمزی (صفر، -۵، -۱۰- بار) برای صفات بررسی شده بجز بیان P5CR تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۲).

ژن خانه‌دار ACT به‌عنوان کنترل داخلی و برای هم رقت نمودن cDNAها در نظر گرفته شد (Zolala et al. 2008; Guenin et al. 2009). از ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش از مقدار متفاوت cDNA برای هر نمونه، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq، یک میکرولیتر آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول استفاده شد که با آب مقطر استریل به حجم مورد نظر رسانده شد. چرخه واکنش جهت تکثیر عبارت است از مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشته‌سازی: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگر: ۱ دقیقه در دمای اختصاصی هر آغازگر، مرحله تکثیر: ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله تکثیر نهایی: ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ مرتبه چرخش بین مراحل ۲ الی ۴. تمام واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان پرولین، مالون دی آلدئید و مقایسه میانگین‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه 11.5 انجام شد. نوارهای تشکیل شده برای هر نمونه نشانه‌ای از میزان رونوشت ژن مورد نظر است که امتیازبندی به نوارهای با

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد بررسی

نام ژن‌ها	آغازگرها	توالی آغازگر	طول آغازگر	نام آغازگر	نوارهای مورد انتظار برای هر ژن برحسب bp	دمای اتصال آغازگر
ACT	Forward	5'-GGAGAAGATCTGGCATCA-3'	19bp	F3ACT-LS	756bp	55
	Reverse	5'-GGATACCAGGAACCTCCAT-3'	18bp	R579ACT-TA		
P5CS	Forward	5'-AGTCCCGACCTGATGCC-3'	18bp	F1346P5CS-TA	756bp	58
	Reverse	5'-CTTATGCCAACCTCAGCAC-3'	19bp	R2102P5CS-TA		
P5CR	Forward	5'-CTGGCTTGAGTGGTAGTGG-3'	19bp	F588P5CR-TA	257bp	60
	Reverse	5'-TGTGGCAGCAACAACGGCA-3'	19bp	R845P5CR-TA		

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات در شش رقم گندم

P5CR	P5CS	میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
		مالون دی آلدئید Mμ/g W.F	پرولین (ریشه) Mμ/g W.F	پرولین (برگ) Mμ/g W.F		
۲۱۵۴/۱ ^{ns}	۳۰۵۰/۴*	۰/۳۷۰۷**	۴۸۲۹۸۷/۰۶**	۴۷۳۶۶/۶۹*	۲	تنش اسمزی
۱۵۲۲/۲ ^{ns}	۱۹۲۰/۸*	۰/۰۳۴۲**	۱۳۲۸۴۶/۰۴**	۱۴۲۳/۲۳**	۵	رقم
۲۳۹۹**	۳۳۰۵/۴**	۰/۰۰۹۹۳**	۸۰۷۹۳/۷۵**	۹۸۷/۰۷ ^{ns}	۱۰	تنش اسمزی×رقم
۶۸۴/۸	۸۲۲/۸	۰/۰۰۱۶	۱۹۷۴/۱۶۹	۶۲۹/۰۳	۵۴	خطا
۱۴/۳۴	۱۰/۳۷	۲۱/۰۶۴	۲۹/۰۰۵	۲۹/۵۳		ضریب تغییرات (CV)

ns و ** و *** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

1993). در این بررسی رقم شعله و طبسی با وجود افزایش مقدار پرولین به ترتیب در ریشه و برگ در نتیجه تنظیم اسمزی نمود مناسبی از لحاظ عملکرد تحت تنش نشان داد و به عنوان یک ارقام مقاومت متوسط به خشکی شناخته شد، این رقم از طریق تجمع کربوهیدرات‌های محلول نیز تا حدی تنظیم اسمزی را انجام داده است، اما ارقام روشن و کویر که به عنوان ارقام مقاوم‌تر شناخته می‌شوند تجمع معنی‌دار پرولین را نشان ندادند، لذا نمود بهتر آن‌ها در شرایط خشکی ممکن است به دلیل سایر مکانیسم‌های مقاومت به تنش باشد. بنابراین ممکن است بتوان گفت که تنظیم اسمزی علی‌رغم توانایی در کمک به جذب آب نقش چندانی در مقاومت به تنش ندارد و نمی‌تواند معیاری مناسب برای انتخاب در جهت مقاومت به خشکی باشد. حتی می‌توان گفت این مکانیسم مختص ارقام حساس است. برای اثبات این نکته نیاز به مطالعه طیف وسیعی از ارقام گندم تحت تنش خشکی می‌باشد. تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش به واسطه سنتز پرولین و غیر فعال شدن تخریب آن است افزایش محتوای پرولین در شرایط تنش باعث محافظت غشای سلولی، پروتئین‌ها، آنزیم‌های سیتوپلاسمی و مهار گونه‌های فعال اکسیژن و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود (Liang et al. 2013). در شرایط تنش خشکی بر روی دو رقم گندم (ورونیکا و پیشتاز) میزان فعالیت پرولین افزایش پیدا کرد، تجمع این اسید آمینه در برگ ممکن است از طریق کاهش پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب سلول، امکان ادامه جذب آب را برای سلول فراهم کند (Tale Ahmad and Hadad 2010). در بررسی انجام شده در گندم، مقدار پرولین تحت تنش خشکی، کل بخش هوایی گیاه در ریشه و اندام هوایی افزایش یافت تنش اسمزی در گیاهان گندم، کلزا (Norouzi 2008) و مطالعات بسیاری نیز موجب افزایش میزان اسید آمینه پرولین شد (Slama et al. 2005; Ghorbanli et al. 2013). بنابراین گیاهانی که در تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند مقدار زیادی از منابع کربن و نیتروژن خود را صرف سنتز تنظیم کننده‌های اسمزی از قبیل پرولین می‌کنند تا بتوانند فشار تورژسانس سلول‌های خود را حفظ نمایند (Aranjuelo et al. 2011).

اثر متقابل رقم × تنش اسمزی نیز در همه صفات مورد مطالعه به جز پرولین برگ تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد، معنی‌دار بودن اثرات متقابل نشان‌دهنده آن است که سطوح مختلف تنش اسمزی تاثیر متفاوتی بر صفات مختلف در شش رقم مختلف داشته است و تاثیر تنش اسمزی در شش رقم مختلف یکسان و به یک شدت نبوده است (جدول ۲). مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش اسمزی نشان داد که با کاهش پتانسیل آب، پرولین برگ و ریشه افزایش یافت. به طوری که بیشترین مقدار پرولین برگ و ریشه در سطح ۱۰- بار به ترتیب با میانگین ۱۲۳/۷۲ و ۳۱۴/۴۱ $\mu\text{g W.F}$ مشاهده شد (جدول ۳). به‌طور کلی تجمع پرولین تحت تنش، توانایی گیاه را برای رشد و بقا فراهم می‌کند. مقایسه میانگین ارقام گندم نشان داد که بیشترین میزان پرولین برگ در رقم طبسی (مقاومت متوسط نسبت به خشکی) با میانگین $\mu\text{g W.F} 90/28$ و بیشترین میزان پرولین ریشه در رقم شعله (مقاومت متوسط نسبت به خشکی) با میانگین $\mu\text{g W.F} 344/43$ مشاهده شد (جدول ۴) بنابراین مقدار پرولین در برگ و ریشه ارقام متحمل به خشکی نسبت به ارقام مقاوم به خشکی در شرایط تنش اسمزی ۱۰- بار مقاوم‌تر نشان داده شدند.

(Beemarao et al. 2007) بیان کردند که کاهش در فعالیت پرولین اکسیداز با افزایش فعالیت گاماگلوتامیل کیناز ممکن است دلیل تجمع بیشتر پرولین تحت شرایط تنش باشد. ولی نمی‌توان با تکیه بر این دلیل بیان نمود که هر گیاهی تحت شرایط تنش خشکی، پرولین بیشتری دارد مقاوم‌تر است. چه بسا ژنوتیپی که تحت شرایط تنش خشکی پرولین بیشتری دارد اما به خشکی حساس‌تر است. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش اسمزی × ارقام نشان داد که بیشترین میانگین پرولین را رقم روشن (متحمل به خشکی) در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار به خود اختصاص داد (شکل ۲). افزایش غلظت پرولین تحت تنش نشان دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد رقم گندم مقاوم به خشکی علی‌رغم عدم تنظیم اسمزی متابولیسم خود را تحت تنش حفظ کرده که نشان‌دهنده تحمل واقعی به تنش است. تنظیم اسمزی نوعی مکانیسم اجتناب از تنش می‌باشد (Martin et al.

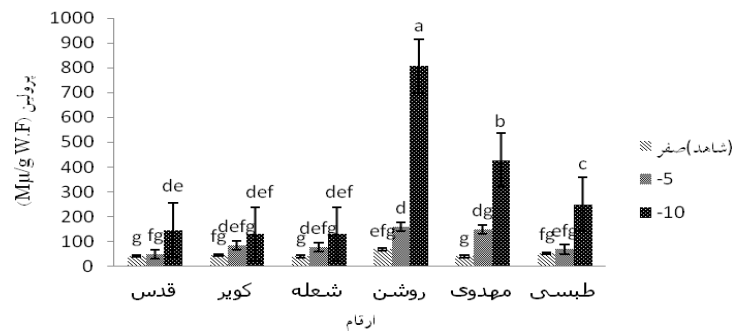
جدول ۳- مقایسه میانگین مطرح تنش اسمزی

تنش اسمزی (بار)	پرویلین (برگ) Mμ/g W.F	پرویلین (ریشه) Mμ/g W.F	مالون دی آلدئید Mμ/g W.F
صفر (شاهد)	۴۳/۲۶ ^b	۴۷/۴۸ ^c	۰/۰۶۵ ^c
-۵	۵۰/۸۵ ^b	۹۷/۶۷ ^b	۰/۱۹۲ ^b
-۱۰	۱۲۳/۷۴ ^a	۳۱۴/۴۱ ^a	۰/۳۱۳ ^a

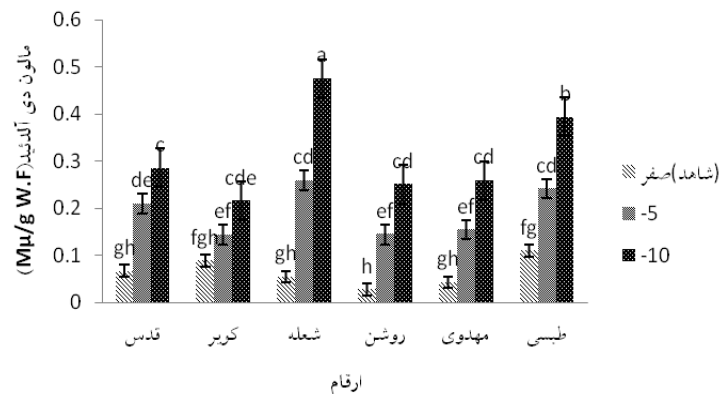
جدول ۴- مقایسه میانگین ارقام

ردیف	رقم	پرویلین (برگ) Mμ/g W.F	پرویلین (ریشه) Mμ/g W.F	مالون دی آلدئید Mμ/g W.F
۱	قدس	۶۳/۲۴ ^{cd}	۷۸/۳۹ ^d	۰/۱۸۷ ^b
۲	کوبر	۷۰/۵۰ ^{ab}	۸۶/۳۸ ^d	۰/۱۴۹ ^c
۳	شعله	۷۹/۹۷ ^{ab}	۳۴۴/۴۳ ^a	۰/۱۴۱ ^c
۴	روشن	۷۰/۴۷ ^{ab}	۲۰/۱۶ ^b	۰/۱۵۲ ^c
۵	مهدوی	۶۱/۲۲ ^b	۸۱/۸۹ ^d	۰/۲۶۳ ^a
۶	طیسی	۹۰/۲۸ ^a	۱۲۳/۰۷ ^c	۰/۲۴۸ ^a

* در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند دارای تفاوت آماری در سطح پنج درصد نمی‌باشند.



شکل ۲- اثرات متقابل سطوح تنش اسمزی و ارقام در صفت پرویلین (Mμ/g W.F)



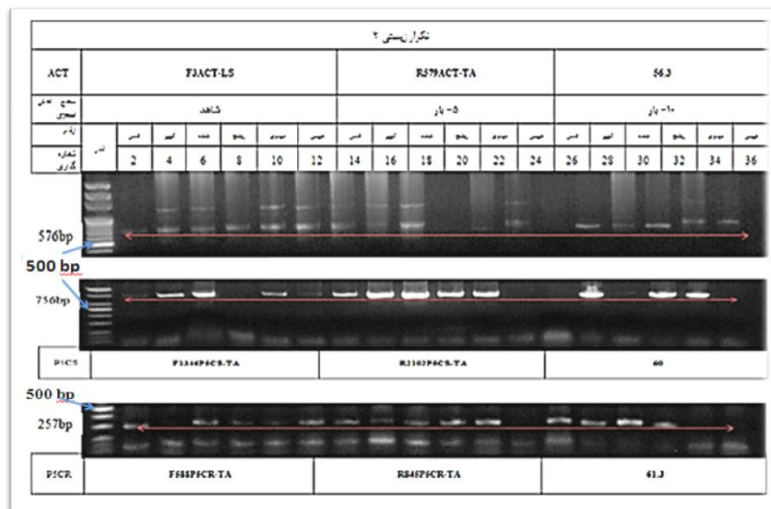
شکل ۳- اثرات متقابل سطوح تنش اسمزی و ارقام در صفت مالون دی آلدئید (Mμ/g W.F)

بیان ژن اول *P5CS* در مسیر ساخت پرولین نسبت به ژن دوم *P5CR* در تنش اسمزی بیشتر افزایش یافت. میزان بیان ژن *P5CS* و *P5CR* به *ACT* در ارقام گندم مورد پژوهش در سطوح تنش اسمزی ۵- و ۱۰- در مقایسه با شاهد روند افزایشی نشان داد، به گونه‌ای که مقدار افزایش بیان ژن در این دو سطح در بعضی ارقام تا دو برابر بوده است (شکل ۴). به‌طور کلی بیشترین میزان نسبی رونوشت در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار در رقم قدس (حساس به خشکی) و در سطح تنش اسمزی ۵- بار در رقم روشن (مقاوم به خشکی) مشاهده شد (شکل ۵). در شرایط غیر تنش، ژن *P5CS* در بین ارقام گندم متفاوت نبود. در پژوهشی که بر روی ارقام دیگر گندم انجام گرفت رقم حساس (اترک) بیان ژن *P5CS* بیشتری نسبت به ارقام متحمل تنش شوری (چمران و هیرمند) نشان دادند. بیان ژن *P5CS* در چهارمین برگ اترک ۱/۵ برابر بیشتر از دیگر ارقام بود و مشابه بیان برگ پرچم تحت تنش شوری بود. بیان *P5CR* در همه ارقام تحت تنش شوری افزایش داشت و الگویی مشابه با *P5CS* داشت اما از نظر شدت آن‌ها متفاوت بودند مثلاً بیشترین بیان *P5CR* ۳/۵ برابر و در *P5CS* ۸/۵ برابر بیشتر از شاهد بود (Tavakol et al. 2016). شدت بیان ژن‌ها در ارقام گندم مورد تحقیق را می‌توان به سطوح بالای بیان آن نسبت به میزان mRNA ژن هدف، میزان کمتر تخریب آن در مقایسه با mRNA، تاثیرپذیری بیان آن از نوع بافت و شرایط آزمایشی، عدم تعادل نسبت rRNA به mRNA در بین نمونه‌های مختلف و نیاز به استفاده از آغازگرهای تصادفی برای ساخت cDNA نسبت داد (Brunner et al. 2004). در پژوهشی دریافتند که تنش خشکی سبب افزایش نسخه‌برداری mRNA، ژن کد کننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز پرولین *P5CS* و *P5CR* و در نهایت افزایش میزان پرولین می‌شود (Verslues et al. 1998). گیاه به‌طور طبیعی تحت شرایط تنش شوری و یا خشکی تولید پرولین بیش از حد متعارف می‌کند (Verma and Hong 2000). در تحقیقی که سطح بیان ژن *P5CS* در رقم برنج حساس به خشکی نسبت به رقم نیمه حساس، افزایش داشته که این افزایش منجر به بالا رفتن پرولین در بافت برگ شده است (Hsu et al. 2003). در ژنوتیپ پنبه، میزان بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* در رقم Ca/H

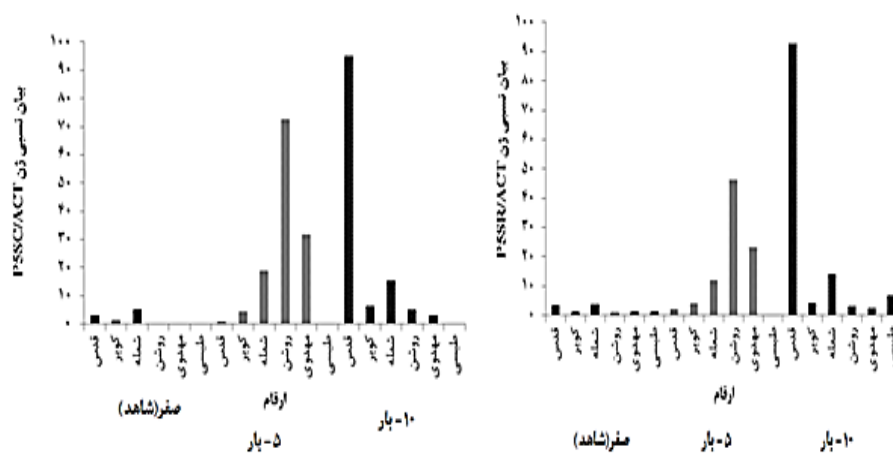
مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش تنش اسمزی میزان مالون دی‌آلدئید در سطح ۵- و ۱۰- بار نسبت به شاهد افزایش داشته است بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید از سطح تنش اسمزی ۱۰- بار به میزان $0.313 \text{ M}\mu\text{g W.F.}$ و کم‌ترین آن مربوط به تیمار شاهد $0.065 \text{ M}\mu\text{g W.F.}$ مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در سطوح بالای تنش بوده است (جدول ۳). بین ارقام مورد مطالعه برای این صفت بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید به‌ترتیب با میانگین 0.263 و $0.248 \text{ M}\mu\text{g W.F.}$ مربوط به گندم مهدوی و طوسی و کم‌ترین مقدار آن مربوط به $0.141 \text{ M}\mu\text{g W.F.}$ مربوط به شعله مشاهده شد (جدول ۴). یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اثر آسیب گونه‌های فعال اکسیژن، مالون دی‌آلدئید است. پایین بودن میزان مالون دی‌آلدئید، نشان‌دهنده پایین بودن آسیب وارده در اثر تنش به غشای سلولی است که خود به معنای مقاوم‌تر بودن گیاه به تنش وارده است (Hasanuzzaman et al. 2014). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش اسمزی \times ارقام نشان داد که بیشترین میانگین را رقم شعله در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار به خود اختصاص داد (شکل ۳). افزایش محتوی MDA در شرایط تنش خشکی و بالا بودن مقادیر آن در ارقام حساس و نیمه حساس نشان‌دهنده تولید مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن در این ارقام می‌باشد. پائین بودن میزان تولید MDA در ارقام مقاوم به خشکی کویر، روشن می‌تواند نشان‌دهنده مقاومت بهتر این ارقام در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است (جدول ۴) و به‌عبارتی تولید MDA در این ارقام می‌تواند به‌علت جذب نوری کمتر، مصرف انرژی جذب شده در فرایند فتوسنتز و غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن به وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاه باشد. از آنجایی که پراکسیداسیون چربی‌های غشاء بیان‌کننده میزان خسارت اکسیداتیو می‌باشد (Zhang and Kirkham 1996) و در نهایت منجر به کاهش یکپارچگی غشاء می‌شود (Smirnov. 1993)، لذا اغلب از این ویژگی به‌عنوان یک شاخص جهت بیان میزان افزایش خسارت اکسیداتیو استفاده می‌شود (Demiral and Turkan 2005).

تراریخت کردن گیاه توتون به وسیله ژن *P5CS* نشان داد که میزان پرولین در گیاه تراریخته افزایش می‌یابد (Nanjo et al. 1999; Verma and Hong 2000). سطح بیان نسبی ژن‌های *P5CS* (۲ ایزوم؛ *OsP5CS1* و *OsP5CS2*) و *P5CRmRNA* های، و همچنین تجمع پرولین در کشت سوسپانسیون کالوس KDML105 (برنج تایلندی)، به میزان قابل توجهی در پاسخ به تنش شوری و خشکی افزایش پیدا کرد (Somboonwatthanaku et al. 2010). نتایج حاصل با نتایج مطالعات پیشین که گزارش شده است هم‌خوانی دارد.

680 (مقاوم به خشکی) نسبت به رقم 148 Ca/H (حساس به خشکی) بیشتر بوده است (Parida et al. 2008). علاوه بر این، میزان بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* در گلرنگ رقم A₁ متحمل به خشکی بیشتر از رقم NIRA حساس به خشکی بوده است (Thippeswamy et al. 2010). به وسیله تراریختی گیاه آرایدوپسیس با آنتی سنس cDNA ژن *P5CS* نشان دادند که نقش این آنزیم در بیوسنتز پرولین کلیدی است، زیرا در این روش با ممانعت از تولید آنزیم *P5CS* مقدار پرولین در این گیاهان در سطح معنی‌داری کاهش یافت (Nanjo et al. 1990). هم چنین با



شکل ۴- الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای *P5CS* و *P5CR* و *ACT* بر روی ژل آگاروز، لدر 100bp DNA ladder



شکل ۵- بیان رونوشت *P5CS* و *P5CR* به *ACT* تحت تنش اسمزی در رقم گندم.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی تحت تنش خشکی

صفات	مالون دی آلدئید	پرولین (برگ)	پرولین (ریشه)	بیان نسبی ژن	بیان نسبی ژن
	Mμ/g W.F	Mμ/g W.F	Mμ/g W.F	<i>P5CR</i>	<i>P5CS</i>
مالون دی آلدئید	۱				
پرولین (برگ)	۰/۰۱۳	۱			
پرولین (ریشه)	۰/۳۸۸**	-۰/۰۱۰	۱		
<i>P5CR</i> بیان نسبی ژن	-۰/۰۳۲	-۰/۰۴۴	-۰/۰۲۹	۱	
<i>P5CS</i> بیان نسبی ژن	-۰/۰۴۳	-۰/۰۴۸	۰/۰۰۸	۰/۹۷۴**	۱

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح ۵ درصد و ۱ درصد.

اسیدیته سیتوزول و بازدارندگی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Sivakumar et al. 2000) و همچنین منبعی برای کربن و نیتروژن حین تنش غیر زیستی می‌باشد. دلیل دوم وجود یون‌های معدنی همچون سدیم و پتاسیم و اسمولایت‌های آلی دیگر نیز که می‌توانند در تنظیم اسمزی نقش داشته باشند. دلیل سوم کدبندی سنتز پرولین و انتقال آن است که می‌تواند در ناکار آمدی حفاظت از غشا نقش داشته باشد. چهارمین دلیل مطالعات گونه‌های مختلف در شرایط فنولوژیکی مختلف نشان می‌دهد که تجمع پرولین به منظور ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به گونه و شرایط فنولوژیکی گونه وابسته است (Lemos et al. 2011). لذا در ارقام مختلف گندم پرولین در شرایط تنشی یکسان در مقادیر مختلفی تجمع می‌یابد. در ارقام متحمل کویر و روشن گرچه میزان مالون دی آلدئید تقریباً مشابه است اما میزان پرولین ریشه در کویر ۴ برابر پرولین ریشه رقم روشن است (شکل ۳ و ۴). لذا می‌توان نتیجه گرفت که دیگر عوامل محافظت‌کننده و آنتی اکسیدان‌ها نیز با رادیکال‌های آزاد مقابله نموده‌اند تا آسیب کمتری به غشا سلول‌ها وارد شود.

نتیجه‌گیری کلی

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود مقدار پرولین ارقام متحمل به خشکی نسبت به ارقام مقاوم به خشکی در شرایط تنش اسمزی ۱۰- بار مقاوم‌تر، به‌خاطر تجمع بیشتر پرولین تحت شرایط تنش اسمزی باشد. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش اسمزی×ارقام نشان داد که بیشترین میانگین را رقم روشن (مقحم به خشکی) در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار به خود

بیش‌ترین ضریب همبستگی مثبت و معنی‌دار مربوط به میزان بیان نسبی ژن *P5CS* با بیان نسبی ژن *P5CR* (**۰/۹۷۴) و میزان مالون دی آلدئید به پرولین ریشه (**۰/۳۸۸) و کم‌ترین ضریب همبستگی منفی پرولین ریشه با پرولین برگ را مشاهده شد (جدول ۵).

(Mohsenzade et al. 2006) بیان کردند که افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول و پرولین یک پاسخ نسبت به تغییرات میزان محتوای نسبی آب و نشت الکترولیت غشای سلولی می‌باشد که باعث افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود. همچنین وجود همبستگی مستقیم بین کاهش غلظت مالون دی آلدئید و افزایش تحمل به تنش شوری در گندم گزارش شده است (Esfandiari et al. 2008). در حالی که گیاه تنش خشکی را تحمل می‌کند، تجمع پرولین می‌تواند از آسیب‌های غشایی کاسته و MDA را نیز کاهش دهد (Ozden et al. 2009). در مقالات همبستگی مثبت و منفی بین پرولین و میزان مالون دی آلدئید گزارش شده‌است (Chutipajit et al. 2011). که این نوسانات می‌تواند به دلایل زیر باشد: آسیدآمین پرولین فقط برای ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیست. پرولین نقش‌های فیزیولوژیکی متنوعی داشته لذا با اهداف زیادی سنتز می‌شود که در گیاهان تحت تنش اسمزی این عملکردها عبارتند از پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی (Ashraf and Foolad 2007)، محافظت‌کننده اسمزی (Okuma et al. 2002)، گیر انداختن رادیکال‌های آزاد (Shao et al. 2008)، ممانعت از واسرشتگی ماکرومولکول‌ها (Okuma et al. 2004)، تنظیم

سطح تنش اسمزی سبب تخریب غشاهای سلولی و افزایش غلظت مالون دی آلدئید برگ شد که شدت تخریب غشا سلولی به ترتیب در رقم شعله و طوسی بیش از ارقام دیگر بود. نوارهای تشکیل شده برای هر نمونه نسبت به نوار اکتین، نشانه‌ای از میزان نسبی رونوشت ژن‌های مورد نظر است. با اعمال تنش خشکی توسط پلی اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ در ارقام، میزان بیان نسبی رونوشت ژن‌های مورد بررسی افزایش یافت. هر چند این افزایش بیان ژن، در رقم‌ها مختلف یکسان نبود. ژن‌های P5CS، P5CR در سطح تنش اسمزی ۱۰- بار در رقم قدس (حساس) بیشترین بیان رونوشت نسبی را نشان داد. افزایش بیان هر دو ژن P5CR و P5CS در مسیر بیوسنتز پرولین منجر به افزایش تحمل تحت تنش اسمزی می‌شود.

اختصاص داد. افزایش غلظت پرولین تحت تنش نشان‌دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد رقم گندم متحمل به خشکی علی‌الرغم عدم تنظیم اسمزی متابولیسم خود را تحت تنش حفظ کرده که نشان‌دهنده تحمل واقعی به تنش است. در اینجا نیز رقم شعله و طوسی با وجود افزایش مقدار پرولین به ترتیب در ریشه و برگ در نتیجه تنظیم اسمزی نمود مناسبی از لحاظ عملکرد تحت تنش نشان داد و بعنوان یک رقم مقاومت متوسط به خشکی شناخته شد، این رقم از طریق تجمع کربوهیدرات‌های محلول نیز تا حدی تنظیم اسمزی را انجام داده است، اما ارقام روشن و کویر که به عنوان ارقام مقاوم‌تر شناخته می‌شوند تجمع معنی‌دار پرولین را نشان ندادند، لذا نمود بهتر آن‌ها در شرایط خشکی ممکن است به دلیل سایر مکانیسم‌های مقاومت به تنش باشد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که افزایش

منابع

Aranjuelo I, Molero G, Erice G, Christophe Avice J, Nogues S (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Journal of Experimental Botany* 62: 111-123.

Arndt SKK, Clifford SC, Wanek W, Jones HG, Popp M0 (2001) Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to Progressive drought stress. *Tree Physiology* 21:705-715.

Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental Botany* 59: 206-216.

Beemaroo S, Cheruth A, Paramasivam JM, Ashok K, Ramamurthy S, Rajaram P (2007) Drought-induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Acta Botanica* 66: 43-56.

Biglouie MH, Assimi MH, Akbarzadeh A (2010) Effect of water stress at different stages on quantity and quality traits of virginia (flue cured) tobacco type. *Plant Soil Environment* 2: 67-75.

Borsani O, Valpuesta V, Butella MA (2001) Evidence for the role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030.

Brunner AM, Busov VB, Strauss SH (2004) Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 9: pp.49-56.

Chutipaijit S, Cha-um S, Sompornpailin K (2011) High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. *Australian Journal of Crop Science* 5: 1191-1198.

Demiral T, Turkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257.

Fakhem Rezaei Sh, Zare Nahandi F (2012) Interaction of abscisic acid and osmolytes in creation of drought stress resistance. *Specialized scientific journal Agriculture Olive* 32: 2-9. (In Farsi).

Fita A, Rodriguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: a new paradigm for increasing food production. *Frontiers in Plant Science* 6:978.

Emam Y (2011) *Cereal Crop Production*. Shiraz University Press 4th ed, Pp 190. (In Farsi).

Esfandiari EA, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H, Shahabivand S (2008) The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11:1916-1922.

Ghorbanli M, Gafarabad M, Amirkian T, Allahverdi Mamaghani B (2013) Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydro ascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. *Iranian Journal of Plant Physiology* 3: 651-658.

Ginzberg I, Stein H, Kapuling Y (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1 -pyrroline-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology* 38: 755-764.

Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR

- data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions- specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* 60: 487-493.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Gill SS, Fujita M (2014) Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance* 18: 209-249.
- Hashemi nasab H, Assad MT, Aliakbari A, Sahhafi SR (2012) Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotype. *Journal of Agricultural Science* 8: 20.
- Heath RL, Pacher L (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif.: College of Agriculture, University of California, 1-32.
- Hsu SY, Hsu YT, Kao CH (2003) The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biology Plant* 46: 73-78.
- Huang B, Yi B, Duan Y, Sun L, Yu X, Guo J, Chen W (2008) Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Molecular biology reports* 35: 601-12.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi- Shinozald K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is up regulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1323-1335.
- Kramer PJ (1983) *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York, 489.
- Leinhose V, Bergman H (1995) Changes in the yield lignin content and protein pattern barley induced by drought stress. *Angewandte Botanik* 69:206-210.
- Lemos JM, Vendruscolo ECG, Schuster I, dos Santos MF (2011) Physiological and Biochemical Responses of Wheat Subjected to Water Deficit Stress at Different Phenological Stages of Development. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 1: 22-30.
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline Mechanisms of StressSurvival. *Antioxid Redox Signal* 19: 998-1011.
- Magne C and Larher F (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118.
- Martin M, Miceli F, Morgan JA, Scalet M, Zerbi G (1993) Synthesis of osmotically active substances in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 171: 176-184.
- Michel BE (1983) Evaluation of the Water Potentials of Solutions of Polyethylene Glycol 8000. *Plant Physiology* 72:66-70.
- Mohsenzade S, Malboobi MA, Razavi K, Farrahi Aschtiani S (2006) Physiological and molecular responses of (*Aeluropus lagopoides*) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 56: 374-322.
- Movahhedi Dehnavi M, Ranjbar M, Yadavi AR, Kavusi B (2011) Effect of cycocel on proline, soluble sugars, protein, oil and fatty acids of flax (*Linum usitatissimum* M.) plants under drought stress in a pot trial. *Stresses in Crop Sciences* 3: 129-138.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1990) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic transporters *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 185-193.
- Nanjo T, Yoshiba Y (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* 18:185-193.
- Norouzi M, Toorchi M, Mohammadi SA (2008) Effect of water deficit on growth, grain yield, and osmotic adjustment in rape seed. *Journal of Food Agriculture and Environment* 6: 312-318.
- Okuma E, Soeda K, Fukuda M, Tada M, Murata Y (2002) Negative correlation between the ratio of K⁺ to Na⁺ and proline accumulation in tobacco suspension cells. *Soil Science and Plant Nutrition* 48: 753-757.
- Okuma E, Murakami Y, Shimoishi Y, Tada M, Murata Y (2004) Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 1301-1305.
- Ozden M, Demirel U, Kahraman A (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae* 119: 163-168.
- Parida AS, Dagaonkar VS, Phalak MS, Aurangabadkar LP (2008) Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 619-627.
- Rayapati PJ, Stewart CR (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology* 95: 787-791.
- Rodrigues FA, de Laia ML, Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176: 286-302.
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stress. *Molecular and General Genetics* 254: 104-109.
- Shao H, Chu L, Shao M, Jaleel CA, Hong-mei M (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies* 331:433-441.
- Sivakumar P, Sharmila P, Pardha Saradhi P (2000) Proline Alleviates Salt-Stress-Induced Enhancement in Ribulose-1,5-Bisphosphate Oxygenase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 512-515.

- Slama I, Messedi D, Ghanaya T, Savoure A, Abdely C (2005) Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany* 56: 231-238.
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Somboonwathanaku I, Dorling S, Leung S, McMaanus MT (2010) Proline biosynthetic gene expression in tissue cultures of rice (*Oryza sativa* L.) in response to saline treatment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 103: 369-376
- Sivritepe N, Erturk U, Yerlikaya C, Turkan I, Bor M, Ozdemir F (2008) Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia Plantarum*. 52: 573-576.
- Sivritepe N, U Erturk, C Yerlikaya, I Turkan, M Bor and F Ozdemir (2008): Response of the cherry rootstock to water stress induced. *Biologia Plantarum* 52: 573-576.
- Stines AP, Naylor DJ, Hoj PB, van Heeswijk R (1999) Proline Accumulation in Developing Grapevine Fruit Occurs Independently of Changes in the Levels of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase mRNA or Protein. *Plant Physiology* 120:923-931.
- Tale Ahmad S, Hadad R (2010) Effect of silicon on antioxidant enzymes activities and osmotic adjustment contents in two bread wheat genotypes under drought stress conditions. *Seed and Plant Production* 26: 207-225. (In Farsi).
- Thippeswamy M, Chandraobulreddy P, Sinilal B, Kumar MS, Sudhakar C (2010) Proline accumulation and the expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in two safflower cultivars. *Biology Plant* 54: 386-390.
- Tavakoli M, Poustini K, Alizadeh H (2016) Proline accumulation and related genes in wheat leaves under salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 18: 707-716.
- Van Den Berg L, Zeng Y (2006) Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *South African Journal of Botany* 72: 284-286.
- Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M (1993) Osmoregulation of a Pyrroline-5- Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 103: 771-781.
- Verma DPS, and Hong Z (2000). Removal of feedback inhibition of Delta1 –Pyrroline-5- Carboxylate Synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*. 122: 1129-1136.
- Verslues PE, Ober ES, Sharp RE (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials, Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology* 116: 1403-1412.
- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, and Gutierrez L (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions- specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*. 60:487-493.
- Yamchi A, Rastgar Jazii F, 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 Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8: 31-40.
- Yoshihara Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. *Plant and Cell Physiology* 38: 1095-1102.
- Zhang J, Kirkham MB (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132: 361-373.
- Zolala J, Farsi M, Moghaddam Matin M, Bahrami AR, Ghabooli M (2008) The comparison of cel I endonuclease gene expression in some Apiaceae plants using semi-quantitative RT-PCR. *Agricultural Sciences and Technology Journal* 22: 4-11. (In Farsi).