

«مقاله پژوهشی»

بررسی بیان ژن‌های کاتالاز و *DREB-2* تحت تنش کم‌آبی در ژنوتیپ‌های ذرتخسرو مفاخری^{۱*}، مصطفی ولیزاده^۲، سید ابولقاسم محمدی^۲

۱. دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات (ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳)

Evaluation of Catalase and *DREB-2* Gene Expression in Maize (*Zea mays* L.) Genotypes under Water Deficit Stress ConditionKhosro Mafakheri^{1*}, Mostafa Valizadeh², Seyed Abolghasem Mohammadi²

1. Ph.D. of Plant Breeding-Molecular Genetic and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2. Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

(Received: Dec. 1, 2021 - Accepted: Mar. 14, 2022)

Abstract

Abiotic stresses, especially water deficit stress in plants, cause oxidative stress and as a result, they produce reactive oxygen species (ROS) and cause serious damage to the DNA, protein and internal structure of plants. Plants have enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms and systems to deal with these stresses. Currently due to climate changes, Water deficit stress is one of the problems of agricultural production. Given the importance of molecular studies and molecular and enzymatic responses of plants under abiotic stress conditions, therefore, relative expression of catalase and *DREB-2* genes were studied by RT-PCR and catalase enzymatic activity were studied in SC706 and SC260 genotypes. The experiment was performed as a split plot based on a randomized complete block design with three replications and three irrigation conditions of (normal irrigation, intermediate stress and severe water deficit stress) under field condition. Results of relative expression analysis of genes showed a significant difference between the treatments so that by increasing the intensity of water stress compared to normal irrigation, the amount of enzyme activity and relative expression of the studied genes were increased. Under severe and intermediate water deficit stress, compared to normal irrigation, *DREB-2* gene showed the highest increase with 690 and 211% respectively. In this study, based on the activity of catalase enzyme and the expression of CAT genes, *DREB2* of SC706 genotype had higher performance than SC260, more appropriate physiological-molecular behavior and more expression of genes, which indicates more tolerance of SC706 genotype than SC260. The stress conditions applied in this study are the results that can be used in molecular breeding programs of maize.

Keywords: Antioxidant enzymes, Gene expression, maize, water deficit stress.

چکیده

تنش‌های غیر زنده به‌خصوص تنش کم‌آبی در گیاهان باعث ایجاد تنش اکسایشی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و در نتیجه آسیب جدی به DNA، پروتئین و ساختار درونی گیاهان می‌شوند. گیاهان به‌منظور مقابله با این تنش‌ها دارای مکانیسم‌ها و سیستم‌های دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. هم‌اکنون با توجه به تغییرات اقلیمی، تنش کم‌آبی یکی از مشکلات اصلی تولید در بخش کشاورزی است. با توجه به اهمیت مطالعات مولکولی و پاسخ‌های مولکولی و آنزیمی گیاهان تحت شرایط تنش‌های غیر زنده، بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و *DREB-2* با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی (Real Time-PCR) و فعالیت آنزیمی کاتالاز در دو ژنوتیپ SC706 و SC260 ذرت تحت تنش کم‌آبی مورد مطالعه قرار گرفته است. آزمایش در شرایط مزرعه‌ای و به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و تنش شدید کم‌آبی اجرا شد. نتایج آنالیز بیان نسبی ژن‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارها را نشان داد به‌صورتی‌که با افزایش شدت تنش کم‌آبی نسبت به آبیاری نرمال بر میزان فعالیت آنزیمی و بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی افزوده شد. تحت تنش کم‌آبی شدید و ملایم نسبت به آبیاری نرمال ژن *DREB-2* به‌ترتیب با ۶۹۰ و ۲۱۱ درصد بیشترین درصد افزایش را نشان دادند. در این مطالعه براساس فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان بیان ژن‌های *DREB-2*، *CAT*، ژنوتیپ SC706 نسبت به SC260 از عملکرد بالاتر، رفتار فیزیولوژیکی-مولکولی مناسب‌تر و بیان بیشتر ژن‌ها برخوردار بودند که نشان دهنده تحمل بیشتر ژنوتیپ SC706 نسبت به SC260 تحت شرایط تنش‌های اعمال شده در این بررسی می‌باشد که می‌توان از این نتایج در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی ذرت بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز، تنش کم‌آبی، بیان ژن‌های کاتالاز و *DREB-2* ذرت.

مقدمه

تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده یکی از مهمترین موانع تولید محصولات کشاورزی می‌باشند که اثر این عوامل در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران بسیار چشم‌گیرتر است. به‌طور کلی تنش با تأثیر بر دوره رشدی گیاهان، باعث تغییرات در عملکرد طبیعی و فیزیولوژیکی گیاهان می‌شود. تنش‌ها باعث کاهش ظرفیت فتوسنتزی گیاهان شده و در نهایت باعث آسیب و حتی تخریب کامل گیاه می‌شوند. گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی سازوکارهای دفاعی مختلفی دارند که با تجمع مقدار بالای ترکیبات و محلول‌های سازگار، بدون تغییر در pH فیزیولوژی گیاه، باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین باعث تثبیت ساختار پروتئین و غشا تحت شرایط تنش می‌شوند که این ترکیبات در سازگاری سلول‌های گیاهی به تنش‌های مختلف نقش مهمی دارند (اشرف و فولاد، ۲۰۰۷؛ آلیا-کلین، گلستانی و کریپلانی، ۲۰۰۸). تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی در گیاهان باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌گردد (دت، واندنابل و وارنوا، ۲۰۰۰). تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده در گیاهان باعث افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل، هیدروپروکسید و... می‌شوند و در نتیجه این عوامل و عدم تعادل ایجاد شده بین غلظت گونه‌های فعال اکسیژن و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اصطلاحاً باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاهان می‌شوند (اشرف، ۲۰۰۹؛ جونز، اینالا و باگیسا، ۲۰۰۷). این حالت به DNA، پروتئین، رنگدانه‌ها آسیب رسانده و همچنین باعث پراکسیداسیون چربی‌ها شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن

می‌توانند در رویدادهای علامت‌دهی^۱ شرکت نمایند و برای تنظیم مقدار تولید گونه‌های فعال اکسیژن سازوکارهایی را در طی تنش در گیاهان فعال نمایند. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی هستند که باعث غیر فعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن شده و خسارت‌های اکسیداتیو برآمده از فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهند (کروز دی کرولا، ۲۰۰۸). مکانیسم آنزیمی شامل تولید سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) و... می‌باشد (بولر، وان‌مونتگو و اینز، ۱۹۹۲). یکی از مهمترین سد دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، آنزیم کاتالاز می‌باشد که نقش کلیدی در مهار هیدروژن پراکسید (H_2O_2) دارد (کروز دی کرولا، ۲۰۰۸). کاتالاز یک آنزیم آهن‌دار است و مسئول کاهش گونه‌های فعال اکسیژن در طی تنش می‌باشد (فویر، روول و والکر، ۱۹۸۳). این آنزیم با تجزیه سریع پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن اثرهای مخرب آن را مهار و کاهش می‌دهد (زندآلیناس، با لاگون و آربونا، ۲۰۱۷). کاتالاز در اندام پراکسی‌زوم و تا حدودی در اندام‌های میتوکندری و سیتوزول نیز وجود دارد ولی در کلروپلاست وجود ندارد (بیلاوسکی و جوی، ۱۹۸۶). این آنزیم دارای ایزوفرم‌های مختلف CAT1، CAT2، CAT3، CAT4، CAT5 است و هم جهت با پراکسید هیدروژن تولید شده در شرایط تنش می‌باشد (اسدا و تاکاشی، ۱۹۸۷). تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز در گیاهانی از جمله ذرت، گندم، جو، کنجد و سویا مؤثر بوده و تنش موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود (محرمنژاد، ۱۳۹۹؛ فاضلی، قربانعلی و نیکنام، ۱۳۸۶؛ ژانگ، هیمل و ملینز، ۲۰۰۶).

بررسی‌های مولکولی امکان تحلیل سازگاری

(آگاروال، جوشی و سوپوری، ۲۰۱۰). ژن‌های *DREB1* از جمله ژن‌های تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش‌های محیطی هستند که اعضای آن نقش اصلی را در تنش‌های غیر زنده چون خشکی، شوری و سرما دارند و در گیاهان مختلفی، مانند آراییدوپسیس، جو، برنج، گوجه‌فرنگی و آفتابگردان شناسایی شده‌اند (لیو، کاسوگا و ساکوما، ۱۹۹۸؛ ساکوما، لیو و دوبوزت، ۲۰۰۲؛ آگاروال، آگاروال و ردی، ۲۰۰۶؛ اکسیونگ و فی، ۲۰۰۶؛ بدوی، دانیلوک و بوچو، ۲۰۰۷). *DREB* ها فاکتورهای رونویسی هستند که می‌تواند همزمان بیان ژن‌های دخیل در تنش از قبیل *rd29A*, *rd17*, *kin1*, *core6.6*, *core15A*, *erd10*, ... را در شرایط تنش افزایش دهند و در نتیجه این افزایش بیان ژن‌ها، به تحمل گیاه به شرایط مختلف تنش کمک می‌کنند (آگاروال، جوشی، سوپوری و ردی، ۲۰۱۰).

ذرت (*Zea mays* L.) یکی از گیاهان بومی آمریکای مرکزی و جنوبی می‌باشد و سابقه زراعت آن در کشورهای مختلف دنیا به‌ویژه کشورهای اروپا، آسیا، آفریقا و اقیانوسه زیاد است (عسکری، ۱۳۸۳). ذرت از لحاظ تولید مقاوم اول را در بین غلات به خود اختصاص داده است (فائو، ۲۰۱۷). ذرت به‌دلیل نقش مهمی که در تغذیه انسان و دام دارد در عرصه جهانی از جایگاه ارزشمندی برخوردار است، در سال‌های گذشته با توجه به تغییرات اقلیمی و کاهش سطح بارندگی کشت ذرت اغلب در طی فصل زراعی تحت‌تاثیر تنش کم‌آبی قرار گرفته است. بنابراین تنش کم‌آبی یکی از معضلات اصلی تولید ذرت می‌باشد. با توجه به نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی از فاکتورهای رونویسی در شکل‌گیری پاسخ گیاهان به تنش کم‌آبی، در مطالعه حاضر میزان بیان و فعالیت آنزیم کاتالاز و ژن *DREB-2* به‌عنوان بخشی از پاسخ گیاه ذرت به تنش در دو ژنوتیپ

متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه را در شرایط تنش خشکی فراهم کرده و منجر به شناخت تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در شرایط تنش شده است (شینوزاکی و یاماگوچی-شینوزاکی، ۲۰۰۷). به محض بروز تغییرات درون‌سلولی، مسیرهای پیام‌رسان مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع می‌شود و هر یک از آن‌ها دسته‌ای از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را وادار به فعالیت می‌کنند (لیوناردیس، مارون و مازوکوتلی، ۲۰۰۷). فرآورده‌های این ژن‌ها در حفاظت از سلول و در تنظیم ژن‌های درگیر در ترانسکریپشن پاسخ به تنش وارد عمل می‌شوند (ماریوما، ساگوما و کاسوگا، ۲۰۰۴). شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش و تعیین الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به انواع تنش‌ها موجب درک بهتری از عملکرد آن‌ها در سازگار نمودن گیاهان به انواع تنش‌ها می‌شود (لورکوسکی و پاول، ۲۰۰۴). احمدی و سلیمانی (۱۳۹۳)، در بررسی الگوی بیان ژن *CAT* در ارقام حساس (*L17*) و متحمل (*Williams*) به خشکی سویا گزارش دادند بیان ژن *CAT* تحت تنش خشکی در رقم *Williams* حدود دو برابر رقم *L17* و همچنین در ریشه بیشتر از برگ بود.

گیاهان به‌منظور القای مقاومت در برابر تنش‌های غیر زنده، می‌توانند از ساختار مولکولی و بیان ژن فاکتورهای رونویسی القا شونده تحت تنش بهره بگیرند. تنظیم این فاکتورها باعث تنظیم بیان ژن‌های پایین دستی می‌گردد و نقش مهمی در پاسخ به تنش گیاهان دارند. یکی از این موتیف‌ها *DRE* می‌باشد که نقش مهمی در دهیدراته شدن و بیان ژن تحت تنش سرما و کم‌آبی دارند به‌صورتی که بیان ژن *DREB 1* تحت تأثیر شوری زیاد و *DREB-2* تحت تنش سرما و تنش کم‌آبی بیان می‌شوند

هر بوته به تصادف انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آنالیز بیان ژن به صورت آزمایش فاکتوریل (طرح دو فاکتور) براساس طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت.

استخراج RNA

به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه از نمونه‌های منجمد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA به صورت جداگانه برای هر تیمار و هر ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج RNA بافت گیاهی از روش مبتنی بر تریزول (South Korea, GenAll) و رسوب الکی استفاده شد. نمونه‌های RNA استخراج شده برای ارزیابی یکپارچگی و همچنین غلظت آن‌ها به ترتیب با ژل آگاروز ۱/۵ درصد و خوانش اسپکتروفتومتری در ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر در دستگاه NanoDrop (ThermoScientific 2000c, USA) مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ به همراه غلظت نمونه‌ها با واحد ng/μl خوانده شد. نمونه‌های دارای غلظت بالاتر از ۱۰۰ ng/μl و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ بیشتر از ۱/۹ برای انجام مطالعات بیان ژن انتخاب شدند.

ساخت cDNA

در این مطالعه برای تبدیل RNA استخراج شده به DNA مکمل (cDNA) از روش استفاده هم‌زمان OligodT و پرایمرهای تصادفی^۱ در حضور آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Reverse Transcriptase) و به کار بردن مقدار یک میکروگرم RNA برای انجام واکنش استفاده شد. جهت سنتز cDNA از RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentase, USA) استفاده شد. همچنین قبل از ساخت cDNA، براساس

SC260 و SC706 مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ژل آکریلامید و میزان فعالیت آنزیمی ژن آن و ژن DREB-2 تحت شرایط تنش کم‌آبی اعمال شده در شرایط مزرعه‌ای با به‌کارگیری تکنیک Real Time-PCR مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط آزمایش

آزمایشی بر روی ژنوتیپ‌های ذرت در شرایط مزرعه‌ای به صورت اسپلیت‌پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در ۱۲ کیلومتری شرق تبریز اجرا گردید. در این مطالعه سه سطح شرایط آبیاری و ۱۷ ژنوتیپ ذرت به عنوان دو فاکتور در نظر گرفته شدند که فاکتور اصلی سطوح تنش کم‌آبی و فاکتور فرعی ژنوتیپ‌های ذرت بودند، براساس نتایج حاصل از داده‌های مزرعه‌ای، شاخص‌های تحمل به تنش (STI, TOL, ...) (HM, ...)، تجزیه به مولفه‌های اصلی و ترسیم نمودار بای‌پلات براساس دو مولفه اول و دوم در ۱۷ ژنوتیپ ذرت تحت سه شرایط آبیاری (شکل ۲ و شکل ۳)، میزان پروتئین کل، عملکرد دانه و... دو ژنوتیپ SC 706 و SC260 به عنوان ژنوتیپ‌های مقام و حساس به کم‌آبی به منظور انجام مطالعات مولکولی و بررسی بیان ژن‌ها شناسایی و انتخاب شدند (جدول ۳). تنش کم‌آبی در سه سطح برحسب نیاز آبی گیاه در تابستان اعمال شد: الف) آبیاری نرمال؛ آبیاری هر هفت روز یکبار براساس عرف زراعی منطقه. ب) تنش ملایم؛ یکبار قطع آبیاری بعد از گلدهی. ج) تنش شدید؛ یکبار قطع آبیاری قبل از گلدهی و یکبار قطع آبیاری بعد از گلدهی تا اواسط پر شدن دانه انجام گرفت (بولانوز و ادمیدز، ۱۹۹۶). پس از اعمال سه سطح تنش (آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید) و زمان نمونه‌برداری ۲۴ ساعت پس از زمان‌های تعریف شده در سطوح تنش، نمونه‌ها از برگ‌های میانی

1. Random primer

USA) اجرا گردید. برای بهینه کردن دمای اتصال آغازگرها از روش Gradient PCR استفاده شد. همچنین صحت cDNA ساخته شده با استفاده از PCR ژن مرجع در همه نمونه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR از پلیت ۴۸ چاهکی مخصوص دستگاه با حجم واکنش نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل مواد مندرج در جدول ۲ استفاده شد. واکنش تکثیر تصادفی این ژن‌ها به صورت ۱۰ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه با دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای بهینه مندرج در جدول ۱ به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه صورت گرفت. تست نقطه ذوب در دماهای ۹۵-۶۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه نیز انجام شد.

داده‌های به دست آمده از تجزیه بیان ژن با استفاده از مدل دلتا Ct ($\Delta\Delta Ct$) تصحیح شده با بازدهی^۲ تکثیر (لیواک و سچمیتجن، ۲۰۰۱) مورد آنالیز قرار گرفتند در این آزمایش به منظور نرمال کردن داده‌ها، از ژن مرجع *18 srRNA* به صورت کنترل درونی استفاده شد و در نهایت داده‌ها در نرم افزار Excell 2013 وارد شدند. مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف (تفاوت بین تیمارهای مختلف، تفاوت بین ژنوتیپ‌های مختلف) توسط نرم‌افزار SPSS.19 صورت گرفت و برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف از آزمون دانکن استفاده شد ($P < 0.05$).

دستورالعمل شرکت سازنده کیت حذف آلودگی DNA ژنومی انجام گرفت. در نهایت برای غیرفعال کردن آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌های cDNA برای انجام واکنش تکثیر زنجیره‌ای پلیمرز^۱ استفاده شدند.

طراحی آغازگرها

به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های اصلی *DREB-2*، *Catalase (CAT)* و ژن مرجع *18S rRNA* از توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده (NCBI)^۱ استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی^۲ توالی‌ها در نرم‌افزار BioEdit (هال، ۱۹۹۹) صورت گرفت. نواحی محافظت‌شده این ژن‌ها شناسایی و طراحی آغازگر در نرم‌افزار Oligo7 (ریچلیک، ۲۰۰۷) انجام شد. در نهایت آغازگرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در ابزار Primer-BLAST سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفتند (جدول ۱).

واکنش Real-Time PCR

برای انجام آنالیز بیان ژن‌ها به روش Real-Time PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR green (Fermentase, USA) استفاده شد. در این روش ابتدا در دستگاه ترموسایکلر معمولی شرایط انجام واکنش PCR بهینه شد و شرایط بهینه حاصل در دستگاه StepOne Real Time PCR (ABI,)

1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

جدول ۱. لیست آغازگرهای طراحی شده برای دستیابی به توالی ژن‌های مورد بررسی

Primer name	Sequence	Tm	Amplicon size (bp)
DREB2-F	TCCCCATGAAGCACGCTGGC	63	120
DREB2-R	AGAGGCGCGTGCGGTTCTTT	62.5	
CAT-F	GCCAACCACAGCCATGCCACT	63	188
CAT-R	AGGACCAAGCGACCAACAGGC	62.4	
Zea-18srRNA-F	AAACGGCTACCCACATCCAAG	55	154
Zea-18srRNA-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	53	

جدول ۲. مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

ماده شیمیایی	مقدار استفاده شده	غلظت نهایی
cDNA	2 μ l	50 ng/ μ l
SYBR premix 5x	3 μ l	1x
Primer F	0.8 μ l	0.5 μ M
Primer R	0.8 μ l	0.5 μ M
ddH ₂ O	Up to 15 μ l	-

1. National Center of Biotechnological Database (NCBI)
2. Alignment
3. Efficiency corrected calculation

انجام گرفت در شرایط تنش ملایم ۹۹/۰۸ درصد و در تنش شدید ۹۹/۳۷ درصد از تغییرات توسط دو مؤلفه اول و دوم قابل تفسیر بودند و براساس این دو مولفه که بیشترین سهم تغییرات را توجیه نمودند نمودار بای‌پلات ترسیم گردید در فضای بای‌پلات ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مشخص قرار گرفتند که مرتبط با عملکرد و تحمل آنها به تنش کم‌آبی بود و از آنجایی که هبستگی بالایی بین عملکرد در شرایط تنش‌های اعمال شده و شاخص‌های تحمل به تنش با مولفه‌ها اول و دوم وجود داشت لذا ژنوتیپ‌هایی که در هر دو شکل در فضای بالایی این دو مولفه قرار می‌گیرند (منطقه A) می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش و پرمحصول پیشنهاد شوند (شکل ۲ و شکل ۳)، با توجه به زوایای خطوط بر روی بای‌پلات (شکل ۲ و شکل ۳)، براین‌اساس در شرایط تنش ملایم و شدید کم‌آبی ژنوتیپ ۱۵ (SC706) در ناحیه A قرار گرفت جزو ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا و متحمل به تنش کم‌آبی می‌باشند. در شرایط تنش شدید خشکی ژنوتیپ ۱۰ (SC260) در ناحیه D با عملکرد پایین تحت شرایط مطلوب و تنش کم‌آبی قرار دارند به‌عنوان ژنوتیپ‌های دارای عملکرد پایین در هر دو شرایط آبیاری نرمال و تنش کم‌آبی معرفی شدند. فرناندز (۱۹۹۲)، در بررسی عملکرد ژنوتیپ‌ها در دو محیط تنش و بدون تنش چهار نوع واکنش برای ژنوتیپ‌ها قائل شد؛ عملکرد بالاتر از میانگین در هر دو شرایط تنش و بدون تنش گروه (A)، عملکرد بالاتر از میانگین در شرایط بدون تنش گروه (B)، عملکرد بالاتر از میانگین در شرایط تنش گروه (C) و عملکرد پایین‌تر از میانگین در هر دو شرایط تنش و بدون تنش (گروه D).

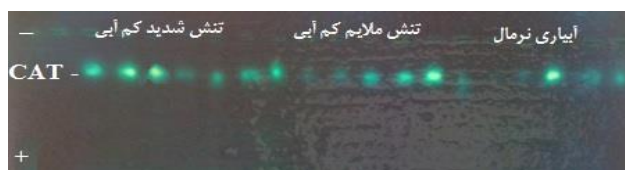
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز

پس از اعمال تنش و تهیه نمونه‌های برگ تازه، استخراج آنزیم براساس روش ولیزاده و همکاران (۲۰۱۳) از نمونه‌های برگ انجام گرفت، به‌صورتی که نمونه‌ها با نسبت ۱:۱ وزنی/حجمی، بخوبی هموژنیزه و سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور (rpm) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در ژل پلی‌آکریلامید ۷/۵ درصد با ابعاد ۱۵×۱۲×۰/۶ سانتی‌متر انجام شد. پس از برش و آماده سازی ژل، برای رنگ‌آمیزی آنزیم کاتالاز از دستورالعمل‌های موجود در روش معرفی شده توسط سولتیس و سولتیس (۱۹۹۰) استفاده شد به‌صورتی که یک ایزوفرم برای آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های ذرت مشاهده گردید (شکل ۱).

پس از عکس‌برداری از ژل‌ها در زمان تثبیت، نوارهای به‌دست آمده از آن‌ها به‌وسیله نرم‌افزار MCID Analysis Evaluation ارزیابی و به‌صورت داده‌های کمی تبدیل شدند. به این منظور "مساحت× شدت" برای هر نوار ایزوزیمی توسط این نرم‌افزار اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت دنسیتومتریک ایزوزیم مربوطه در نظر گرفته شد. تجزیه‌های آماری داده‌های ایزوزیمی پس از نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها آنالیز شدند، تجزیه‌های آماری داده‌ها با مدل خطی عمومی در نرم‌افزار SAS 9.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج حاصل از مطالعات مزرعه‌ای، شاخص‌های تحمل به تنش (YSI, STI, MP و ...)، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در سه شرایط تنش رطوبتی



شکل ۱. نمونه‌ای از الگوی ایزوفرم و فعالیت نسبی CAT در برگ‌های شش ژنوتیپ ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

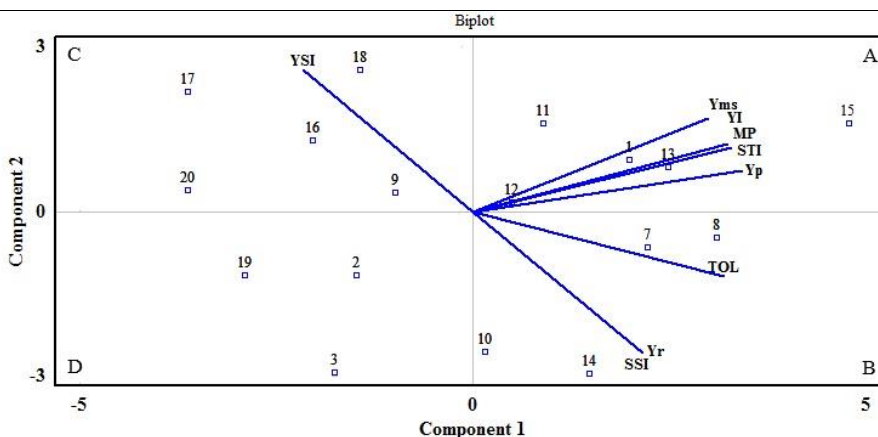
حساسیت بیشتر ژنوتیپ SC260 به تنش کم‌آبی می‌باشد. نهایتاً براساس نتایج به‌دست آمده، ارزیابی مزرعه‌ای (جدول ۳) و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، دو ژنوتیپ از هیبریدهای مورد بررسی یعنی SC706 به‌عنوان متحمل و SC260 به‌عنوان ژنوتیپ حساس شناسایی شدند و بیان ژن‌های *CAT* و *DREB-2* در مقایسه با ژن مرجع *18S rRNA* در سه تیمار تنش کم‌آبی با تکنیک RT-PCR در این دو ژنوتیپ مطالعه شد تا ارتباط بین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز با بیان ژن آن در این ژنوتیپ‌ها و سازوکار تحمل و حساسیت آنها به تنش کم‌آبی بررسی شود.

براساس بررسی الکتروگرامی برای آنزیم‌های *CAT* در ژنوتیپ‌های ذرت، یک ایزوزیم *CAT* مشاهده شده که این ایزوزیم اکثراً فعالیت بیشتر در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال نشان دادند. وجود *CAT* منفرد و مستقر در پراکسی‌زوم در اکثر گیاهان گزارش شده است (گابری، ۲۰۱۰). میانگین داده‌ها و درصد تغییرات در این ژنوتیپ‌ها برای آنزیم کاتالاز نشان داد با افزایش شدت تنش از نرمال به ملایم و تنش شدید شدت فعالیت آنزیم افزایش یافت. مقایسه میانگین برای ایزوزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌صورت جداگانه برای هر سه سطح آبیاری مورد بررسی انجام شد ($P \leq 0.05$).

همچنین تحت دو شرایط تنش ملایم و شدید در این بررسی ژنوتیپ SC706 بالاترین میزان MP را نشان داد. معیار MP در شناسایی هیبریدهای متحمل به تنش نسبت به شاخص‌های SSI و TOL بهتر عمل می‌کنند (مقدم و هادی‌زاده، ۱۳۷۹). میزان بالای عددی این شاخص نشان دهنده تحمل نسبی به تنش است. همچنین شاخص‌های MP، STI و YSI به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش توسط (فرناندز، ۱۹۹۲) پیشنهاد شدند. در حالت کلی براساس نتایج این مطالعه و شاخص‌های تحمل به تنش ژنوتیپ SC706 متحمل و ژنوتیپ SC260 نسبت به تنش اعمال شده حساس بودند. در مطالعه‌ای با بررسی هیبریدهای ذرت با شاخص‌های تحمل تحت شرایط تنش کم‌آبی ملایم و شدید، براساس نتایج به‌دست آمده هیبریدهای متحمل و حساس را شناسایی کردند (سیدزوار، نوروزی و اهری‌زاد، ۱۳۹۴). براساس نتایج به‌دست آمده در حالت کلی با افزایش شدت تنش نسبت به آبیاری نرمال محتوای پروتئین محلول نیز نوسان نشان داد، چرا که فقط ژنوتیپ SC260 سطح پروتئین محلول کل تحت تنش شدید کم‌آبی بالاتر از سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد در صورتی که در تنش ملایم کم‌آبی نسبت به آبیاری نرمال محتوای پروتئین محلول کاهش نشان داد و این رفتار فیزیولوژیکی نشان دهنده

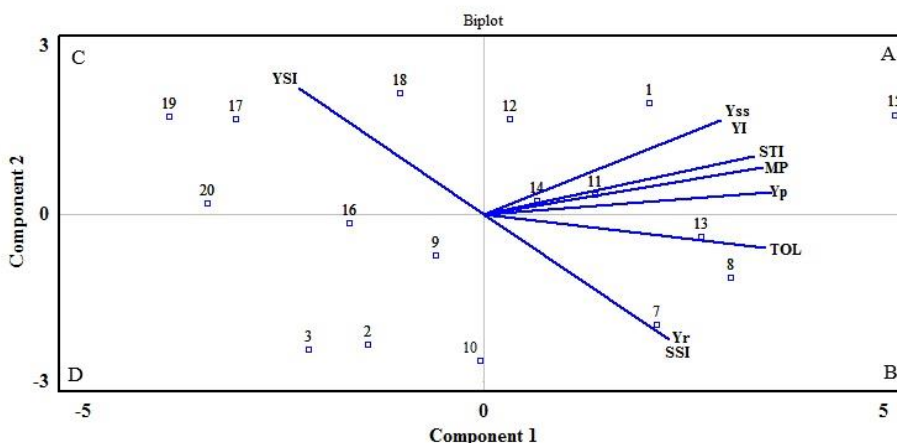
جدول ۳. میانگین برخی از ویژگی‌های مهم در دو ژنوتیپ ذرت مورد بررسی تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

شرایط آبیاری	ژنوتیپ‌های ذرت	محتوای پروتئین محلول (µg/plant fresh wt.)	عملکرد دانه در بوته (Kg/m ²)	وزن ۱۰۰ دانه (gr)	ارتفاع بوته (cm)	ارتفاع بلال (cm)	میانگین حساسی (MP)	تحمل تنش (STI)	شاخص پایداری عملکرد (YSI)
نرمال	SC706	1.82 ^a	1.96 ^a	35.02 ^a	206.17 ^a	96.66 ^{ab}	---	---	---
	SC260	1.29 ^b	1.07 ^b	28.29 ^b	185.75 ^b	86.08 ^b	---	---	---
تنش ملایم	SC706	1.59 ^a	1.49 ^a	30.73 ^a	179.92 ^a	89.25 ^a	1.73	2.14	0.77
	SC260	1.26 ^b	0.75 ^b	23.17 ^b	169.58 ^b	74.50 ^b	0.91	0.58	0.71
تنش شدید	SC706	1.79 ^{ab}	1.01 ^a	28.25 ^a	164.92 ^a	83.41 ^a	1.49	1.44	0.52
	SC260	1.93 ^a	0.49 ^b	22.52 ^b	143.67 ^{ab}	55 ^b	0.78	0.39	0.45



شکل ۲. نمایش بای‌پلات ۱۷ ژنوتیپ ذرت در ۹ شاخص تحمل به تنش کم‌آبی ملایم براساس مولفه‌های اصلی اول و دوم ((۱۵): (SC706) و (۱۰: SC260))

Yms=عملکرد تحت شرایط تنش ملایم کم‌آبی؛ Yp=عملکرد پتانسیل؛ TOL=شاخص تحمل تنش؛ MP=میانگین حساسی؛ YSI=شاخص پایداری عملکرد؛ STI=شاخص تحمل تنش؛ SSI=شاخص حساسیت تنش. YI=شاخص عملکرد؛ Yr=نرخ کاهش عملکرد.



شکل ۳. نمایش بای‌پلات ۱۷ ژنوتیپ ذرت در ۹ شاخص تحمل به تنش کم‌آبی شدید براساس مولفه‌های اصلی اول و دوم ((۱۵): (SC260) و (۱۰: SC706))

Yss=عملکرد تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی؛ Yp=عملکرد پتانسیل؛ TOL=شاخص تحمل تنش؛ MP=میانگین حساسی؛ YSI=شاخص پایداری عملکرد؛ STI=شاخص تحمل تنش؛ SSI=شاخص حساسیت تنش. YI=شاخص عملکرد؛ Yr=نرخ کاهش عملکرد.

اشرف، ۲۰۱۹). همچنین در مطالعات متعددی افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در ذرت گزارش شده است (محرم‌نژاد، ۱۳۹۹، اشرف، رشاد و حسین، ۲۰۱۵؛ نجوم، وانگ و فروغ، ۲۰۱۱) که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

جدول ۴. مقایسه میانگین و تغییرات (داخل پراتنر) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو ژنوتیپ ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

تنش	CAT	ژنوتیپ‌های ذرت	تنش ملایم کم‌آبی	تنش شدید کم‌آبی
آبیاری نرمال	0.0055 ^b	SC260	0.0038 ^b (24.2)	0.0024 ^b (33.3)
تنش ملایم کم‌آبی	0.0066 ^b (20)	SC706	0.0061 ^a (50)	0.0069 ^a (85)
تنش شدید کم‌آبی	0.011 ^a (100)			

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

تجزیه واریانس داده‌های بیان نسبی ژن‌های *CAT* و *DREB-2* در دو ژنوتیپ *SC706* و *SC260* تحت تنش کم‌آبی نشان داد برای ژن‌ها، بین سطوح تنش و ژنوتیپ‌های ذرت اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۵). تحت تنش کم‌آبی شدید و ملایم نسبت به آبیاری عادی ژن *DREB-2* به‌ترتیب با ۶۹۰ و ۲۱۱ درصد بیشترین درصد افزایش بیان را نشان دادند. در حالت کلی با افزایش شدت تنش کم‌آبی نسبت به آبیاری نرمال بر میزان بیان ژن‌های مورد بررسی افزوده شد (جدول ۶).

مقایسه میانگین بیان ژن‌های مورد بررسی نشان داد در تیمار تنش شدید کم‌آبی بالاترین سطح بیان ژن قابل مشاهده است (جدول ۷). مقایسه میانگین برای اثر متقابل ژنوتیپ×تنش کم‌آبی نشان داد در هر دو ژن مورد بررسی میزان بیان ژن در ژنوتیپ

نتایج نشان داد با افزایش تنش از ملایم به شدید نسبت به آبیاری نرمال به‌ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ درصد افزایش بیان نشان دادند. همچنین با افزایش شدت از نرمال به تنش ملایم و شدید نسبت به آبیاری نرمال ژنوتیپ *SC706* افزایش فعالیت منظم و بیشتری در آنزیم *CAT* دیده شد و شدت این افزایش نسبت به ژنوتیپ *SC260* بسیار بیشتر بود به‌عبارت بهتر اینکه اختلاف بین فعالیت *CAT* در تنش‌های مختلف در *SC706* کمتر بود (جدول ۴)، اما شدت فعالیت در *SC706* بیشتر ژنوتیپ *SC706* نسبت به *SC260* در این مطالعه تحت تنش اعمال شده می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش رطوبتی به گمان بسیار به‌منظور نگهداری فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت شرایط تنش شدید می‌باشد (سوفو، اسکوپ و نوزاسی، ۲۰۱۵). افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گونه‌های متحمل بیشتر از گونه‌های حساس تحت تنش‌های مختلف محیطی است (وانگ، کیم و لی، ۲۰۰۹).

کاتالاز (*CAT*) از سری آنزیم‌های احیا کننده است که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز می‌کند و از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کند (احمدی و سلیمانی، ۱۳۹۱). در مطالعه‌ای دیگری یک ایزوفرم برای آنزیم کاتالاز در لاین‌های ذرت گزارش کردند (محرم‌نژاد، سوفالیان و ولی‌زاده، ۲۰۱۹). در بررسی اثر تنش خشکی (۶۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) با شاخص‌های فیزیو-بیولوژیکی در ۸ رقم ذرت تحت شرایط تنش خشکی، نتایج نشان داد میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (*POD*، *CAT* و *SOD*) در همه ارقام ذرت در شرایط کمبود آب به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (شفیق، اکرم و

پاسخ بیوشیمیایی مناسب آغاز می‌شود و هر یک از آن‌ها دسته‌ای از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را فعال می‌کنند (لیوناردیس، مارون و مازوکوتلی، ۲۰۰۷). فرآورده‌های این ژن‌ها در حفاظت از سلول و در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش وارد عمل می‌شوند (ماریوما، ساکوما و کسوغا، ۲۰۰۴). شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش و تعیین الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به انواع تنش‌ها موجب درک بهتری از عملکرد آن‌ها در سازگار نمودن گیاهان به انواع تنش‌ها می‌شود (لورکوسکی و پاول، ۲۰۰۴).

احمدی و سلیمانی (۱۳۹۳)، الگوی بیان ژن *CAT* در ارقام حساس (L17) و متحمل (Williams) به خشکی سویا را با استفاده از RT-PCR بررسی و گزارش کردند که بیان ژن *CAT* تحت تنش خشکی در رقم Williams حدود دو برابر رقم L17 و همچنین در ریشه بیشتر از برگ بود. در آزمایش الگوی بیان ژن آنزیم SOD به روش qRT-PCR در دو لاین اینبرد ذرت HK1532 (متحمل به خشکی) و HKIPC3-3 (حساس به خشکی) تحت تنش خشکی و در شرایط طبیعی بررسی شد نتایج نشان داد رونویسی Mn-SOD و Fe-SOD در لاین متحمل به میزان بیشتری نسبت به لاین حساس انجام می‌شود (شیرینگا، شارما و کوما، ۲۰۱۴). در مطالعه‌ای، اثر تنش خشکی در بیان نیمه کمی ژن‌های رمزکننده *CAT* و *APX* و فعالیت آنزیمی آنها در دو لاین جو دو ردیفه CB-20315 (متحمل) و CB-20213 (حساس) در مرحله پنجه‌دهی در گلخانه و تحت‌تأثیر سه تیمار شاهد، تنش خشکی و سیلیکون- خشکی (۲ میلی‌مولار سیلیکات سدیم/ کیلوگرم خاک) بررسی کردند، آنالیز نیمه کمی RT-PCR اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد به‌صورتی که بیشترین میزان بیان ژن *CAT* و *APX* در تیمار سیلیکون- خشکی دیده شد (مخلصیان، حداد و گروسی، ۲۰۱۴).

در یک سلول متحمل در یک زمان ممکن است

SC706 بالاتر از ژنوتیپ SC260 بود. بیان ژن *CAT* در ژنوتیپ SC706 با افزایش شدت تنش به‌مراتب بیشتر از SC260 بود (شکل ۴ و شکل ۵). همچنین بیان ژن *DREB-2* (شکل ۶ و شکل ۷) در SC706 با افزایش شدت تنش به‌مراتب بیشتر از SC260 بود. با توجه به شاخص‌های مورد مطالعه (جدول ۳) و بررسی میزان بیان ژن‌های *CAT*، *DREB-2* SC706 نسبت به SC260 از رفتار فیزیولوژیکی-مولکولی مناسب‌تر و بیان بیشتر ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ژن *DREB-2* برخوردار بودند که می‌توان تحمل بیشتر SC706 نسبت به SC260 تحت شرایط مختلف تنش کم‌آبی ملایم و شدید اعمال شده در شرایط این مطالعه را بدین وسیله توجیه نمود.

براساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان کرد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش کم‌آبی، از طریق افزایش فعالیت و بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (*CAT*) و ژن *DREB-2* و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش‌های کم‌آبی موجب سازگاری گیاه به تنش شده و مانع از کاهش بیشتر عملکرد دانه در گیاه ذرت می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی در ارقام متحمل به کم‌آبی در ذرت در مطالعات متعددی گزارش شده است (اشرف، رشاد و حسین، ۲۰۱۵؛ محرم‌نژاد، سوفالیان و ولیزاده، ۲۰۱۹)، که با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. بررسی‌های مولکولی امکان تحلیل سازگاری متابولیکی و فیزیولوژیکی گیاه را در شرایط تنش کم‌آبی فراهم آورده و اطلاعات به‌دست آمده از این بررسی‌ها به درک بهتر سازوکارهای مولکولی و شناسای تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در شرایط تنش شده است (شینوزاکی، یاماگوچی-شینوزاکی، ۲۰۰۷).

پس از اعمال تنش‌های مختلف بر روی گیاهان و بروز تغییرات درون‌سلولی، مسیرهای پیام‌رسان‌های مختلفی به‌منظور تبدیل پیام تنش اعمال شده به یک

و یان، ۲۰۲۲).

شناسایی ژن‌های کاندیدای مربوط به لاین‌های متحمل و حساس به تنش کم‌آبی به کمک بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در تحمل تنش کم‌آبی در حالت اعمال تیمار تنش رطوبتی نسبت به آبیاری نرمال، به منظور شناسایی مکانسیم‌های مولکولی دخیل در تحمل ژنوتیپ‌های ذرت می‌تواند راهکار و سرآغاز خوبی برای مقابله با تنش کم‌آبی در این گیاه استراتژیک باشد. در شرایط تنش خشکی، با افزایش غلظت ABA در سلول‌های مزوفیل برگ، روزنه‌ها بسته می‌شوند و به تبع آن غلظت CO₂ در بافت مزوفیل برگ کاهش می‌یابد.

به دنبال این وضعیت، واکنش تاریکی فتوسنتز متوقف شده و محصولات حاصل از واکنش نوری ATP و NADPH، مصرف نخواهند شد. در چنین وضعیتی به دلیل عدم اکسیداسیون مولکول NADPH، مصرف NADP⁺ جهت دریافت الکترون کاهش یافته و مولکول‌های اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به‌عنوان پذیرنده الکترون عمل می‌کند و رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید می‌کنند (سایرام و ساکسنا، ۲۰۰۰). این گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان پیام‌رسان، در مسیر انتقال پیام تنش‌های غیر زیستی ایفای نقش می‌کنند.

از آنجایی که در این مطالعه افزایش بیان ژن آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز در ژنوتیپ SC706 نسبت به ژنوتیپ SC260 با اعمال تنش خشکی و تحت شرایط تیمارهای تنش کم‌آبی نسبت به آبیاری نرمال افزایش بیان نشان دادند و میزان این افزایش در ژنوتیپ SC706 بیشتر از ژنوتیپ SC260 بود. گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در ذرت منتشر شده است (آنجوم، اشرف و تانور، ۲۰۱۷؛ یوسفی، نصرالله‌زاده و محرم‌نژاد، ۱۳۹۶؛ محرم‌نژاد، ۱۳۹۹).

تعداد زیادی ژن درگیر در مقاومت فعال شوند. این ژن‌ها ممکن است در فرایند حفاظت اسمزی، چپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، پروتئازها، پروتئین‌های پیام‌رسان، آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل نسخه‌برداری درگیر باشند، بسیاری از محققان معتقدند بسیاری از ژن‌های القا شده در تنش شوری در تنش خشکی و دمای پایین نیز القا می‌گردند (ساکوما، لیو و دوبوزت، ۲۰۰۲). یکی از مهمترین ژن‌های تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش‌های محیطی *DREB*^۱ است که اعضای آن نقش اصلی را در تنش‌های غیر زیستی چون خشکی، شوری و سرما دارند و در گیاهان مختلفی، مانند آراییدوپسیس، جو، برنج، گوجه‌فرنگی و آفتابگردان شناسایی شده‌اند (لیو، کاسوگا و ساکوما، ۱۹۹۸؛ ساکوما، لیو و دوبوزت، ۲۰۰۲؛ آگاروال، آگاروال و ردی، ۲۰۰۶؛ اکسیونگ و فی، ۲۰۰۶؛ بدوی، دانیلوک و بوچو، ۲۰۰۷).

در مطالعه‌ای با بررسی و ارزیابی الگوی بیان و تجزیه عملکردی خانواده ژنی کاتالاز (CAT) در گندم نان تحت تنش غیر زنده گزارش کردند بر اساس داده‌های رونویسی منتشر شده قبلی، الگوهای بیان ۱۰ ژن TaCAT در مراحل مختلف رشد (مرحله‌های رشد گیاهچه، رویشی، زایشی و پس از گرده‌افشانی)، بافت‌ها (ریشه، برگ/شاخه، و سنبله) و تحت تنش‌های مختلف زنده و غیر زنده، تجزیه و تحلیل الگوهای بیان ژن‌ها نشان داد آن دسته از ژن‌های TaCAT متعلق به زیرگروه‌های مشابه، الگوهای بیان مشابهی داشتند. نتایج حاصل از آزمایش‌های RT-qPCR نشان داد که بیشتر ژن‌های TaCAT به‌طور قابل‌توجهی توسط اکثر تنش‌های غیر زنده القا می‌شوند به‌عنوان مثال، تحت تنش گرمایی، سطح بیان TaCAT3-A1/B/U به روشی وابسته به زمان افزایش یافت، سطح بیان برگ‌ها تحت تنش گرمای افزایش نشان داد (ژانگ، ژانگ

جدول ۵. تجزیه واریانس بیان ژن آنزیم کاتالاز و ژن *DREB-2* در دو ژنوتیپ ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		<i>DREB-2</i>	<i>CAT</i>
تنش کم‌آبی	2	44129156**	0.014
ژنوتیپ	1	24980365**	0.091*
تنش کم‌آبی × ژنوتیپ	2	349391	0.009
خطا	6	838562	0.008
ضریب تغییرات C.V (%)		22.44	8.17

** و *: به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۶. مقایسه میانگین بیان ژن آنزیم کاتالاز و ژن *DREB-2* در دو ژنوتیپ ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

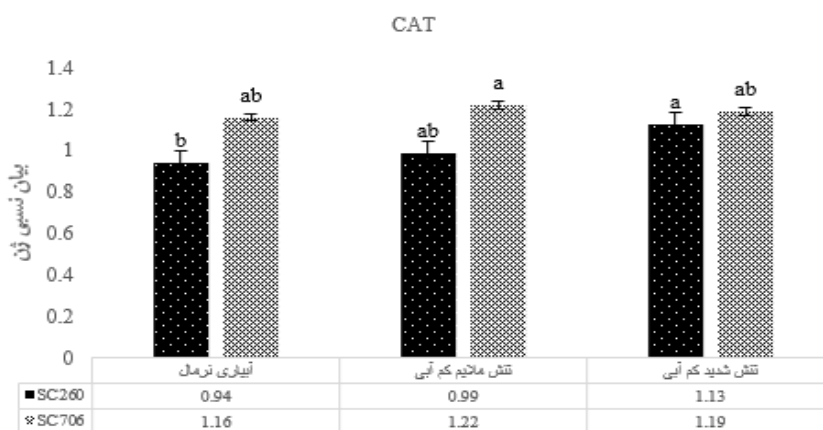
تیمار تنش کم‌آبی	Mean	
	<i>DREB-2</i>	<i>CAT</i>
آبیاری عادی	1110.90 ^c	1.05 ^a
تنش ملایم کم‌آبی	3463.90 ^b	1.10 ^a
درصد تغییرات بیان ژن تحت تنش ملایم	211.8	4.8
تنش شدید کم‌آبی	7667.40 ^a	1.17 ^a
درصد تغییرات بیان ژن تحت تنش شدید	690.2	11.4

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

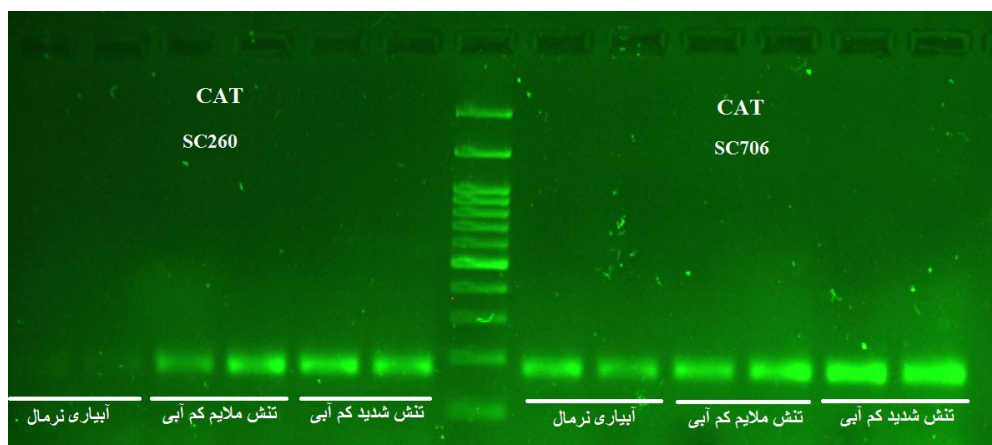
جدول ۷. مقایسه میانگین بیان ژن آنزیم کاتالاز و ژن *DREB-2* در دو ژنوتیپ ذرت

ژنوتیپ‌های ذرت	Mean	
	<i>DREB-2</i>	<i>CAT</i>
SC260	2637.90 ^b	1.02 ^b
SC706	5523.50 ^a	1.19 ^a

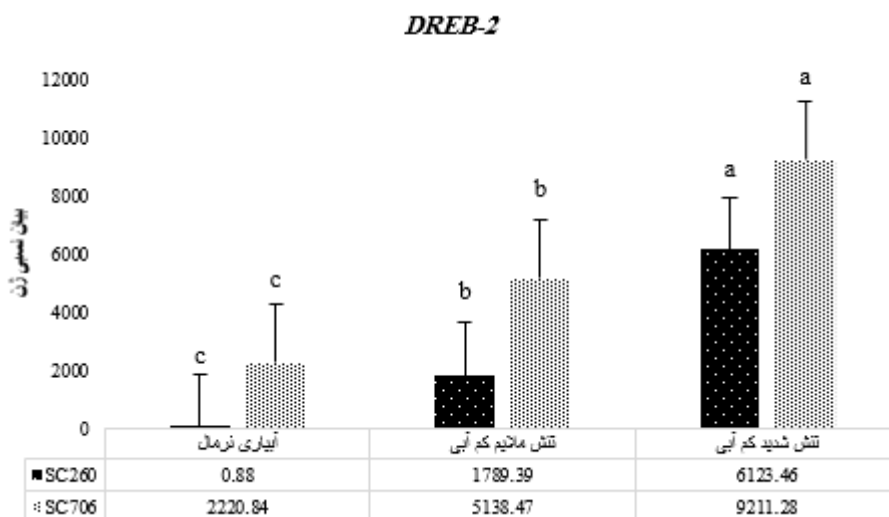
میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.



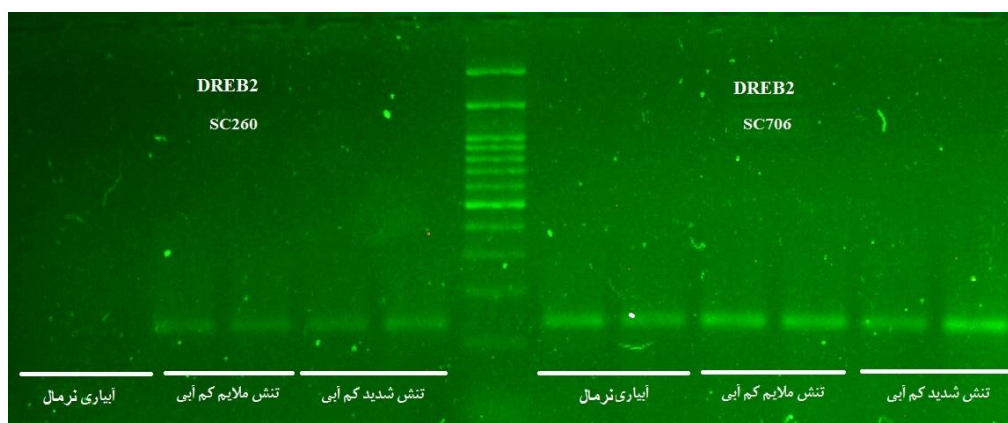
شکل ۴. تغییرات بیان ژن *CAT* در دو ژنوتیپ SC260 و SC706 ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی



شکل ۵. تصویر محصول RT-PCR بیان ژن CAT در دو ژنوتیپ SC260 و SC706 ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی



شکل ۶. تغییرات بیان ژن DREB-2 در دو ژنوتیپ SC260 و SC706 ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی



شکل ۷. تصویر محصول RT-PCR بیان ژن DREB-2 در دو ژنوتیپ SC260 و SC706 ذرت تحت سه شرایط آبیاری نرمال، تنش ملایم و شدید کم‌آبی

بیان ژن‌های مربوطه، اثر می‌گذارند (گوپتا و کاور، ۲۰۰۵). این شرایط باعث القای بیان و یا ممانعت از بیان ژن‌های خاصی می‌شوند (کاسوگا، لیو و میورا، ۱۹۹۹). نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش میزان بیان ژن‌های *DREB-2* و *CAT* و افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز، مانع از خسارات اکسایشی به سلول‌های گیاهی شدند و این افزایش بیان ژن‌ها افزایش فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ SC706 نسبت به SC260 تحت شرایط تنش‌های اعمال شده بسیار بالاتر بود. در بررسی اثر تنش خشکی (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و ژن *TaNAC2A* در پنج ژنوتیپ‌گندم دورم گزارش کردند، در حالت کلی با افزایش سطوح تنش خشکی میزان بیان ژن *NAC* و همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پنج ژنوتیپ مورد بررسی افزایش یافت (نعیمی، فهمیده و فاخری، ۱۳۹۹). همچنین در مطالعه‌ای با بررسی بیان ژن‌های *CAT* و *DREB1* در سه رقم سویا (DPX، ساری و WE6) در سه مرحله رشدی (گلدهی، غلاف‌بندی و پر شدن دانه) و در سه شرایط تنش خشکی (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A) نشان داد در طول تنش میزان بیان ژن کاتالاز ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داشت، بیان ژن *DREB1* نیز مشابه با ژن کاتالاز بود و رقم DPX بیشترین بیان ژن *DREB1* را در سطح اول تنش در مرحله غلاف‌بندی و کم‌ترین کاهش را در سطح دوم تنش در همین مرحله نشان داد (مازندرانی، رحیم‌مالک و نواب‌پور، ۱۳۹۱). احمدی و سلیمانی (۱۳۹۳)، در بررسی بیان ژن *CAT* در دو رقم حساس (L17) و متحمل (Williams) به خشکی سویا با استفاده از RT-PCR گزارش کردند بیان ژن کاتالاز در تنش خشکی در رقم Williams حدود دو برابر رقم L17

همچنین افزایش فعالیت دنسیتومتریک کاتالاز در گندم تحت تنش خشکی توسط (نادری، ولیزاده و تورچی، ۲۰۱۴) گزارش شده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در مطالعه‌ای تغییرات بیان ژن کاتالاز (*CAT*) و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام عدس تحت تنش خشکی بررسی و گزارش کردند تأثیر تنش خشکی (شاهد، تنش مرحله رویشی و تنش در مرحله زایشی) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو مرحله رویشی و زایشی معنی‌دار بود. بررسی الگوی بیان ژن *CAT* به روش Real Time PCR و تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد تنش خشکی منجر به افزایش بیان ژن مورد مطالعه شد و این افزایش بیان ژن *CAT* تحت اثر تنش خشکی در رقم L7 در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی بیشتر از دو رقم کیمیا و گچساران بود (رحیمی، کوهی‌ده‌کوردی و دانش‌شهرکی، ۱۳۹۹). در این مطالعه نتایج نشان داد با افزایش شدت تنش بر میزان بیان ژن *DREB-2* در دو ژنوتیپ SC706 و SC260 افزوده شد و این روند افزایشی در ژنوتیپ SC706 بسیار بیشتر از ژنوتیپ SC260 بود چرا که در SC706 میزان بیان ژن *DREB-2* با افزایش شدت تنش از نرمال به تنش ملایم و شدید به ترتیب ۱۳۱ و ۳۱۴ درصد افزایش بیان نشان دادند. (لاتا و پراسادا، ۲۰۱۱)، ژن‌های *DREB*ها، تنظیم‌کننده‌های مرکزی پاسخ به تنش‌های محیطی و تحمل شرایط نامطلوب هستند که گیاه در معرض آن قرار دارد. در حالت کلی ژن‌های *DREB* از مسیر غیر وابسته به اسیدآبسیزیک در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند، و با دخالت مستقیم و غیرمستقیم در واکنش‌های بیوشیمیایی به افزایش ثبات غشا کمک می‌کنند. این حالت موجب تحمل بهتر و بیشتر تنش کم‌آبی در گیاه می‌شود. تنش‌های غیر زیستی از طریق ایجاد تغییراتی در مسیر متابولیسم کربوهیدرات‌ها بر افزایش یا کاهش سطح

فووس و سینگ، ۲۰۰۱). پروتئین‌های DREB-2 در شرایط طبیعی رشدی بیان می‌شود و در مرحله ابتدایی پاسخ به تنش اسموتیک از طریق تغییرات پس از ترجمه فعال می‌شود (صبوری، علیزاده و امیدی، ۱۳۸۴). براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان گفت ژنوتیپ SC706 نسبت به SC260 از رفتار فیزیولوژیکی-مولکولی مناسب‌تر و بیان بیشتر ژن آنزیم آنتی‌اکسیدان و ژن DREB-2 برخوردار بودند که می‌توان مقاومت و تحمل بیشتر ژنوتیپ SC706 نسبت به SC260 تحت شرایط مختلف و تیمارهای تنش کم‌آبی ملایم و شدید اعمال شده در شرایط این مطالعه را بدین وسیله توجیه نمود، هرچند ژن‌های CAT و DREB-2 از ژن‌های پراهمیت در تنش کم‌آبی محسوب می‌شوند، لذا افزایش بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ SC706 که یک ژنوتیپ با عملکرد بالا و مقاوم به تنش است، دور از انتظار نبود. هرچند در مطالعات مختلف در گیاهان مختلف تحت سطوح مختلف تنش این ژن‌ها پاسخ‌های متفاوتی نشان داده‌اند. در نتایج پژوهش حاضر نیز در تنش ملایم بعد از اعمال تنش، میزان بیان ژن CAT در ژنوتیپ SC706 افزایش یافت ولی در تنش شدید مجدداً میزان بیان ژن کاهش نشان داد که می‌توان گفت در این شرایط با افزایش شدت تنش احتمالاً آنزیم‌های دیگر و یا مکانیسم‌های مولکولی دیگری در پاسخ به تنش فعال شوند و یا ظرفیت تولید آنزیم به سبب آسیب‌های فراوان به سازوکار تأمین انرژی لازم کاهش یافته باشد. نهایتاً به‌منظور نتیجه‌گیری بهتر و کامل و دقیق‌تر در خصوص واکنش ژنوتیپ‌های مختلف ذرت تحت شرایط تنش کم‌آبی بهتر است در کنار این ژن‌ها در مطالعاتی دیگر ژن‌های سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز، گلوکاتایون‌ردوکتاز و پراکسیداز و ژن‌های دخیل در مکانیسم‌های غیر آنزیمی نیز

و همچنین در ریشه بیشتر از برگ بود. فرآورده ژن‌های بیان شده تحت تنش‌ها نه تنها در حفاظت از سلول از تنش عمل می‌نمایند، بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش وارد عمل می‌شوند (ماریوما، ساکوما و کاسوگا، ۲۰۰۴). گزارش شده است که در گیاهان، یک عامل رونویسی می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌ها را از طریق اتصال اختصاصی به عنصر cis-acting در ناحیه پروموتور ژن‌های هدف، کنترل نماید (ناکاشیما و شینوزاکی، ۲۰۰۵)، خانواده‌های زیادی از این ژن‌ها تحت‌تاثیر تنش قرار می‌گیرند که از جمله آنها می‌توان DREB را نام برد (ساکوما، لیو و دوبوزت، ۲۰۰۲). مطالعات مولکولی در گیاهان نشان داده تنش‌های محیطی ژن‌هایی را تحریک می‌کنند که اعمال گوناگونی دارند اغلب ژن‌هایی که در پاسخ به کم‌آبی بیان می‌شوند توسط هورمون اسید آبسزیک (ABA) تحریک می‌شوند. عناصر عملگر هم‌سو در راه‌اندازی ژن‌هایی که مشخصاً در پاسخ به تنش بیان می‌شوند و عوامل رونویسی که بر بیان این ژن‌ها مؤثر هستند، شناسایی شده‌اند. عوامل رونویسی که به عنصر عملگر هم‌سوی DRE/CRT متصل می‌شوند، جداسازی DREB1/CBF و DREB2 نام‌گذاری شده‌اند. این نوع واحد رونویسی یک گروه ژن‌های تنظیمی (regulon) نامیده می‌شود (صبوری، علیزاده و امیدی، ۱۳۸۴). یکی از این گروه ژن تنظیمی DREB (برای، ۱۹۹۷) هست. بیان ژن‌های DREB که توسط خشکی تحریک می‌شوند، سبب بیان ژن‌های متنوعی می‌شود که در تحمل به تنش خشکی شرکت می‌کنند (ستوکینگر، گیلور و زوماشو، ۱۹۹۷؛ سانگوان، فووس و سینگ، ۲۰۰۱). در مقایسه با ژن‌های DREB/CBF، بیان بیشتر DREB2 در گیاهان ترانس‌ژنیک، سبب بهبود تحمل به تنش شده است. بنابراین، پروتئین‌های DREB2 به فعال سازی پس از ترجمه نیازمندند (سانگوان،

مولکولی مقاومت به تنش‌ها را افزایش دهد و احتمال اصلاح به کمک این روش‌ها تحت شرایط تنش را فراهم آورد.

بررسی شود تا دیدی کامل از پاسخ مولکولی تحت تنش کم‌آبی در شرایط مزرعه به‌دست آید و از این ژن‌ها و ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی ذرت بهره گرفته شود و میزان دانش درباره مکانیسم

REFERENCES

- Agarwal, P.K.A., Agarwal, P., Reddy, M.K., & Sopory, S.K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25(12), 1263-1274.
- Agrawal, P.K., Joshi, A.J., Sopory, S.K., & Reddy, M.K. (2010). Overexpression of gdtbatranscription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Plant Molecular Biology Reports* 37(2): 1125-1135.
- Ahmadi, J., & Soleimani, V. (2014). Expression pattern of GmOSBP, CAT and GmBZIP genes under saline stress in soybean (*Glycin max* L.). *Genetic Novin.*, 10 (1), 107-114. (in persian).
- Anjum, S. A. Ashraf, U. Tanveer, M. Khan, I. Hussain, S. Shahzad, B. Zohaib, A. Abbas, F. Saleem, M. F. & Ali, I. (2017). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1-12.
- Anjum, S. A. Wang, L. C. Farooq, M. Hussain, M. Xue, L. L. & Zou, C. M. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 197 (3): 177-185.
- Alia-Klein, N., Goldstein, R. Z., Kriplani, A. Logan, J., Tomasi, D., Williams, B., Telang, F., Shumay, E., Biegon, A., Craig, I. W., & Henn, F. (2008). Brain monoamine oxidase a activity predicts trait aggression. *Journal of Neuroscience*, 28 (19), 5099-5104.
- Asada, K. D. & Takahashi, M. B. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam. 227-287.
- Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress esistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59 (2), 206-216.
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidant as markers. *Biotechnology Advances*, 27(1), 84-93.
- Ashraf, M. A. Rasheed, R. Hussain, I. Iqbal, M. Haider, M. Z. Parveen, S. & Sajid, M. A. (2015). Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zea mays* L.) under water-deficit conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61 (4), 507-523.
- Askari, A. H. (2004). Effescts of planting date and plant density on yield components of maize in Hormozgan. *Agricultural of Science and Natural Resource*, 12, 11-19. (in persian).
- Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M., & Sarhan, F. (2007). The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Molecular Genetic and Genomic*, 277(5), 533-554.
- Bielawski, W. & Joy, K. W. (1986). Reduced and oxidised glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta*, 169(2), 267-272.
- Bolanos, J., & Edmeades, G. O. (1996). The importance of the anthesis-silking

- interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Research*. Elsevier, 48 (1), 65-80.
- Bowler, C., Van Montagu, M., & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 43 (1), 83-116.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156-165.
- Dat, J., Vandenamee, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*, 57(5), 779-795.
- Fazeli, F., Ghorbanli, M., & Niknam, V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, 51(1), 98-103.
- FAO. (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Fernandez, G. C. J. (1992). Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In *Proceeding of the Symposium*. Taiwan, 13, 257-270.
- Foyer, C. K., Rowell, J., & Walker, D. (1983). Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, 157 (3), 239-244.
- Gaber, M.A. (2010). Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling*, 5, 369-374.
- Gupta, A., & Kaur, N. (2005). Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*. 30 (5): 761-776.
- Gunes, A., Inala, A., Bagcia, E. G., Cobana, S., & Pilbeam, D. J. (2007). Silicon mediates changes to some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown under toxicity. *Scientia Horticulturae*, 113(2), 13-119.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17 (3), 287-291.
- Lata, C. & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4731-4748.
- Leonardis, A.M.D., Marone, D., Mazzucotelli, E., Neffar, F., Rizza, F., Fonzo, N.D., Cattivelli, L., & Mastrangelo, A. M. (2007). Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Sciences*, 172 (5), 1005-1016.
- Lorkowski, S., & Paul, C. (2004). High-throughput analysis of mRNA expression: microarrays are not the whole story. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 14 (3), 377-403.
- Livak, K. ABI Prism 7700 Sequence Detection System [Internet]. User Bulletin 2 (1997) [cited 1997]. Available from: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04303859.pdf>.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10 (8), 1391-1406.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95-98.

- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3. *The Plant Journal*, 38 (6), 982-993.
- Mazandarani, A., Rahim Malek, M., Navab-Pour, S., & Ramezani, S. (2012). Evaluation of Chlorophyll Content and Genes Expression (*Catalase* and *DREB1*) in Soybean Cultivars Under Drought Stress Condition. *Agricultural Biotechnology*, 13 (1), 45-58. (in persian).
- Moharramnejad, S., Sofalian, O., Valizadeh, M., Asghari, A., Shiri, M.R., & Ashraf, M. (2019). Response of maize to field drought stress: Oxidative defense system, osmolytes' accumulation and photosynthetic pigments. *Pak J Bot.*, 51 (3), 799-807.
- Moharramnejad, S. (2020). Investigation of tolerance to water deficit tension of 11 corn hybrids (*Zea mays* L.) in the seedling stage by measuring antioxidant defense system and physiological traits. *Scientific Journal of Crop Physiology, I.A.U. Ahvaz.*, 12, 77-89. (in persian).
- Moghaddam, A., & Hadizadeh, M. H. (2000). Response of corn hybrids and their parental lines to drought using different stress tolerant indices. *Iranian Journal of Seed Seedling*, 2(3), 25-38. (in persian).
- Mokhlesian, S., Haddad, R., Garoosi, G., & Ghannadnia, M. (2014). Study of the Enzymatic Response and Relative Gene Expression of Catalase and Ascorbate Peroxidase to Drought Stress in Barley Plant under Silicon Effect. *Crop Biotechnology*, 4 (8), 11-20.
- Naderi, R., Valizadeh, M., Toorchi, M., & Shakiba, M. R. (2014). Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Biologica Szegediensis*, 58 (2), 95-101.
- Naeemi, T., Fahmideh, L., & Fakheri, B.A. (2020). Assessment of TaNAC2A Gene Expression and Ascorbate Peroxidase, Catalase Enzymes of Five Durum Wheat Genotypes (*Triticum turgidum* L.) Under Drought Stress. *Journal of Crop Breeding*, 12(33), 20-28.
- Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 126 (1), 445-462.
- Rahimi, M., Koochi Dehkordi, M., & Danesh Shahraki, A. (2020). Changes in CAT gene expression of and catalase enzyme activity under drought stress in lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars. *Iranian Journal of Pulses Research*, 11(1), 100-111. (in Persian).
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis *DREBs*, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 290(3), 998-1009.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., & Dhindsa, R. S. (2001). Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *The Plant Journal*, 27 (1), 1-12.
- Sairam, R. K., & Saxena, D. C. (2000). Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184 (1), 55-61.
- Sabori, M., Alizadeh, H., & Omid, M. (2005). an overview of the molecular process of plant response to drought, salinity and cold. *Genet 3rd Millennium*, 4(3), 839-850. (in Persian).
- Seyedzavar, J., Norouzi, M., & Aharizad, S. (2015). Evaluating Tolerance

- Indices of some New Maize Hybrids Imposed to Drought Stress. *Journal of Crop Ecophysiology*, 9(4), 503-520. (in Persian).
- Shafiq, S., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2019). Assessment of physio-biochemical indicators for drought tolerance in different cultivars of maize (*Zea mays* L.). *Pak J Bot.*, 51(4), 1241-1247.
- Shiriga, K., Sharma, R., Kumar, K., Yadav, S.K., Hossain, F., & Thirunavukkarasu, N. (2014). Genome-wide identification and expression pattern of drought responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene*, 2, 407-417.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115 (2), 327-334.
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1990). Isozymes in Plant Biology. *Dioscorides Press*, Portland. p: 259.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., & Thomashow, M.F. (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceeding of the National Academy of Science*, 94 (3), 1035-40.
- Sofa, 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 (6), 13561-13578.
- Rychlik, W. (2007). OLIGO 7 primer analysis software. PCR primer design. 35-59.
- Valizadeh, M., Moharamnejad, S., Ahmadi, M., & Mohammadzadeh Jalaly, H. (2013). Changes in activity profile of some antioxidant enzymes in alfalfa half-sib families under salt stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 801-809.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P., & Kwak, S. S. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (7), 570-577.
- Xiong, Y., & Fei, S. (2006). Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta*, 224 (4), 878-888.
- Yousefi, M., Nasrollazadeh-Asl, V., & Moharramjejad, S. (2017). Evaluation of grain yield, chlorophyll content, osmotic materials, total phenol and activity In response to drought stress (*Zea mays* L.) maize catalase enzyme. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 46 (12), 1-14. (in persian).
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science*, 8, 953.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., & Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, 24, 452-481.
- Zhang, Y., Zheng, L., Yun, L., Ji, L., Li, G., Ji, M., & Zheng, X. (2022). Catalase (CAT) Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.): Evolution, Expression Pattern and Function Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 542.