Crop Biotechnology Open Access

Spring (2025) 14 (3): 31-41.
DOI: 10.30473/cb.2025.73512.2001

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of expression changes genes under drought and methanol spraying stress in Rapeseed

Haniyeh Aziziii[1], Mohammad Mohsenzadeh Golfazani[2], Ali Reza Tarang[3], Habibollah Samizadeh Lahiji[4], Ramin Seighalani[5]

1. M.Sc., Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
4. Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
5. Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Correspondence:
Mohammad Mohsenzadeh Golfazani
Email:
mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

Received: 21, Jan. 2025
Accepted: 10, May. 2025

How to cite:
Aziziii, H., Mohsenzadeh Golfazani, M., Tarang, A.R., Samizadeh Lahiji, H., & Seighalani, R. (2025). Evaluation of expression changes genes under drought and methanol spraying stress in Rapeseed . *Crop Biotechnology*, 14 (3), 31-41.
(DOI: 10.30473/cb.2025.73512.2001)

ABSTRACT

Oil crops are the second largest food reserves in the world after cereals. One of the most important sources of edible oil in the world is rapeseed. Drought stress induces a wide range of molecular disturbances in the physiological processes of plants through the production of reactive oxygen species (ROS). The enzymes antioxidants detoxify stress-induced ROS and modulate signaling responses, playing a crucial role in the tolerance of plants to abiotic stresses. To this end, the expression of glutathione reductase (*GR*), thioredoxin (*TRX)*, and glutaredoxin (*GRX*), was assessed in two genotypes of Rapeseed: the sensitive variety (Hyola 308) and the tolerant variety (SLM046) under drought stress (withholding irrigation for 72 hours), a 20% (v/v) methanol spraying treatment, and control conditions (continuous irrigation). This was conducted using the Real-Time PCR technique. Sampling was performed at the 4-6 leaf stage at 0, 8, and 24 hours after the stress was applied. Morphological observations showed that the rapeseed tolerant and sensitive genotypes regained their freshness after spraying methanol under drought stress (interruption of irrigation). The results indicate that the highest increase in glutathione reductase gene expression in the Hyola 308 variety occurred eight hours after the application of stress without methanol treatment. In contrast, the SLM 046 variety exhibited initially low expression levels during the early hours of stress, which increased significantly with methanol treatment, registering almost a fourfold increase. The expression level of the thioredoxin gene in the Hyola 308 variety peaked 8 hours after the drought stress with methanol treatment, indicating that methanol application enhanced gene expression and plant resistance. In the SLM 046 variety, thioredoxin gene expression gradually increased after the application of stress, persisting up to 24 hours post-stress. However, the gene expression initially decreased with methanol treatment but eventually reached its maximum after 24 hours. For glutaredoxin gene expression, the Hyola 308 variety showed lower levels 8 hours after the drought stress without methanol treatment compared to the baseline (0 hours). However, after 24 hours, this expression increased significantly and reached its maximum following methanol treatment at both 8 and 24 hours. Stress-induced ROS production acts as a warning signal that causes the plant to defend and adapt to the stress as the cell attempts to avoid oxidative stress and ROS accumulation. The SLM046 variety, gene expression showed a gradual increase from 0 hours of stress to 24 hours later. The application of methanol initially caused a reduction in glutaredoxin expression, followed by an increase. Methanol produces CO_2, which can partially compensate for the lack of CO_2 resulting from stress in plants and can be used as a carbon source. In general, methanol foliar application increased the gene expression levels in these two genotypes. Therefore, the expression of the desired gene can be affected by investigating and manipulating these main groups, which can undergo further investigations in experimental tests.

KEYWORDS

Glutathione reductase, Relative gene expression, Reactive oxygen species.

© 2025, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره سوم، پیاپی ۴۹، بهار ۱۴۰۴ (۴۱-۳۱)

DOI: 10.30473/cb.2025.73512.2001

«مقاله پژوهشی»

ارزیابی تغییرات بیان برخی از ژن ها تحت تنش خشکی و متانول‌پاشی در ارقام متحمل و حساس کلزا

حانیه عزیزی[۱]، محمد محسن‌زاده گلفزانی[۲]، علیرضا ترنگ[۳]، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی[۴]، رامین صیقلانی[۵]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

۴. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۵. مربی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:
محمد محسن‌زاده گلفزانی
رایانامه: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

استناد به این مقاله:
عزیزی، حانیه؛ محسن‌زاده گلفزانی، محمد؛ ترنگ، علیرضا؛ سمیع‌زاده لاهیجی، حبیب‌اله و صیقلانی، رامین (۱۴۰۴). ارزیابی تغییرات بیان برخی از ژن‌ها تحت تنش خشکی و متانول‌پاشی در ارقام متحمل و حساس کلزا ، *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۴ (۳)، ۴۱-۳۱.
(DOI: 10.30473/cb.2025.73512.2001)

چکیده

تنش خشکی از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال موجب طیف وسیعی از اختلالات مولکولی در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدان ROSهای ناشی از تنش را سم زدایی می‌کنند و پاسخ‌های سیگنالینگ را تعدیل می‌کنند و نقشی مهم در تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان دارند. بدین منظور بیان ژن‌های گلوتاتیون ردوکتاز *GR*، تیوردوکسین *TRX*، گلوتاردوکسین *GRX* کلروپلاستی در دو ژنوتیپ گیاه کلزا حساس (Hyola308) و متحمل (SLM046) در شرایط تنش خشکی (قطع آبیاری به مدت ۷۲ ساعت)، محلول‌پاشی با متانول ۲۰ درصد حجمی و شرایط بدون تنش (آبیاری منظم)، با استفاده از تکنیک Real Time PCR ارزیابی شد. نمونه‌برداری در مرحله ۴ تا ۶ برگی در ۰، ۸ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش انجام شد. بررسی نتایج نشان دادکه بیشترین افزایش بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در ژنوتیپ Hyola308، ساعت صفر پس از تنش بدون تیمار متانول بوده است ولی در ژنوتیپ SLM046 در ساعات اولیه اعمال تنش میزان بیان کم بوده اما با اعمال تیمار متانول میزان بیان افزایش داشت. میزان بیان ژن تیوردوکسین در Hyola 308 در ۸ ساعت پس از اعمال تنش خشکی با تیمار متانول بیشترین مقدار بوده است و به نظر می‌رسد متانول‌پاشی سبب افزایش بیان و تحمل گیاه شده است. در ژنوتیپ SLM046 نیز میزان بیان ژن پس از اعمال تنش به تدریج افزایش داشته و این افزایش تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش ادامه داشت. با اعمال تیمار متانول میزان بیان ابتدا کاهش داشته ولی با گذشت ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود رسیده است، میزان بیان ژن گلوتاردوکسین در ژنوتیپ Hyola308 در ۸ ساعت پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول نسبت به ساعت صفر تنش کم بوده است. اما پس از گذشت ۲۴ ساعت این میزان بیان افزایش داشته و با اعمال تیمار متانول در ساعات ۸ و ۲۴ به حداکثر میزان خود رسیده است. تولید ROS تحت تنش به عنوان یک سیگنال هشدار عمل می‌کند که باعث دفاع و سازگاری گیاه در برابر تنش می‌شود که سلول سعی می‌کند از طریق مسیرهای مختلف از استرس اکسیداتیو و تجمع ROS جلوگیری کند. در SLM046 میزان بیان از ساعت صفر تنش تا ۲۴ ساعت به تدریج روند افزایشی داشته است، اعمال تیمار متانول نیز ابتدا سبب کاهش و سپس افزایش بیان ژن گلوتاردوکسین شده است. به طور کلی محلول‌پاشی با متانول سبب افزایش میزان بیان ژنهای در این ژنوتیپ شد.

واژه‌های کلیدی

بیان نسبی ژن، گلوتاتیون ردوکتاز، گونه‌های اکسیژن فعال.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۴ © ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.

(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. گیاهی یکساله، آلوتتراپلوئید با ۱۹جفت کروموزوم (۲n=۳۸) و مهم‌ترین گونه زراعی خانواده براسیکاسه است که تلاقی دو گونه دیپلوئید *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* و دو برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید آن‌ها به وجود آمده است. این گیاه سومین گیاه روغنی در جهان به حساب می‌آید که برای مصارف خوراکی کشت می‌شود. روغن کلزا در مقایسه با سایر روغن‌های خوراکی به دلیل وجود اسیدهای چرب اشباع نشده و فقدان کلسترول از کیفیت بالایی برخوردار است (Tan *et al*., 2017). کنجاله کلزا نیز که محصول جانبی استخراج روغن است، به دلیل محتوای پروتئین بالا (۵۰ درصد) برای خوراک دام استفاده می‌شود و در تولید جهانی بعد از کنجاله سویا در رتبه دوم قرار دارد (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018). قرار گرفتن در معرض یک تنش خاص توسط گونه‌های گیاهی متحمل به تنش منجر به ایجاد مقاومت با گذشت زمان در برابر یک تنش خاص می‌شود (Fahad *et al*., 2017). تنش غیر زیستی یک عامل محیطی است که در نتیجه تغییرات تنش فیزیکی یا شیمیایی بر گیاهان وارد می‌شود (Fich *et al*., 2016). بنابراین برای بقا در شرایط تنش‌زا، مکانیسم‌های پیچیده‌ای در گیاهان تکامل یافته‌است تا محرک‌های محیطی را درک کرده و از طریق مسیرهای انتقال سیگنال، پیام‌ها را مخابره و به تنش‌های گوناگون پاسخ دهد که در هر یک از این مسیرها پروتئین‌های متعددی درگیر می‌باشند (Sami and Alemzadeh, 2016). کلزا به تنش‌های غیرزیستی متعدد حساس است (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018). خشکی، شوری، دماهای شدید و سمیت کادمیوم شایع‌ترین تنش‌های غیرزیستی هستند که بر رشد و نمو *B. napus* تأثیر می‌گذارند. شرایط خشکی باعث تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که منجر به اختلال غشاء، اختلال عملکرد آنزیم و اکسیداسیون و تخریب پروتئین‌ها می‌شود (Tsugane *et al*., 1999). نشان داده شده است که خشکی در کلزا منجر به کاهش فتوسنتز، کاهش زیست توده گیاهی، کاهش محتوای کلروفیل، آسیب غشاهای تیلاکوئید، کاهش روغن و پروتئین دانه شده است (Ahmar *et al*., 2019).

تیوردوکسین[1] (TRX) یکی از عوامل تنظیم‌کننده اصلی برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید است (Daloso *et al*., 2015) که نقشی اساسی در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند که گیاهان را در مقابله با تنش اکسیداتیو موفق‌تر می‌کند، برای احیا خود از فردوکسین (*FTR*) یا NADPH استفاده می‌کند و با انتقال الکترون موجب احیای ردوکتازها جهت سم‌زدایی هیدروکسی پراکسیدازها چربی و ترمیم پروتئین اکسید شونده می‌شوند (Meyer *et al*., 2009). افزایش بیان[2] *NTR* در آرابیدوپسیس افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو را سبب شد براین اساس افزایش بیان *NTR* حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim *et al*., 2017). مطالعه ژنومی برنج نشان داد که تحت شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *TRX* وجود دارد (Mignolet-Spruyt *et al*., 2016). گلوتاردوکسین‌ها (*Grxs*) پایدار در برابر حرارت، غنی از سیستئین و مولکولی پروتئین‌هایی با جرم کم (۱۰–۱۵ کیلو دالتون) هستند که ردوکس سلولی و سیگنالینگ تنظیم شده ردوکس را تنظیم می‌کنند. *Grx*ها وابسته به گلوتاتیون هستند، که ممکن است فعالیت پروتئین را با glutathionylation برگشت پذیر در حضور NADPH و گلوتاتیون ردوکتاز تعدیل کنند (Meyer *et al*., 2012). گلوتاتیون‌رداکتاز (*GR*)، آخرین آنزیم چرخه آسکوربات/گلوتاتیون نیز نقش مهمی در سازگاری با تنش اکسیداتیو بازی می‌کند. در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات و در جمع آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفای نقش می‌کند لذا افزایش در میزان فعالیت این ژن در احیا مجدد گلوتاتیون اکسید شده دارای اهمیت است (Sairam *et al*., 2002). حفظ مخزن گلوتاتیون درون سلولی در حالت کاهش یافته برجسته‌ترین نقش این آنزیم است که می‌تواند با حذف اکسیژن منفرد، سوپراکسید

1. Thioredoxin
2. NADPH-dependent thioredoxin reductase

یا حتی رادیکال‌های هیدروکسیل، یا به طور غیرمستقیم به عنوان یک عامل احیا کننده که اسید اسکوربیک را از شکل اکسید شده به شکل احیا شده آن، توسط آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز بازیافت کند (Noctor and Foyer, 1998). با توجه به دو آنزیم اصلی مسیر مهار آسکوربات/گلوتاتیون، نشان داده شد که فعالیت *GR* در طول تنش خشکی در پنبه، گیاهچه گندم، لوبیا، خزه *Tortula ruralis*، برنج، یونجه و لوبیا چشم بلبلی افزایش می‌یابد (Cruz de Carvalho, 2008).

مقاومت به خشکی صفت پیچیده‌ای است که بروز آن بستگی به برهمکنش میان صفات مختلف مورفولوژیکی و بیوشیمیایی دارد. مکانیزم‌های ژنتیکی کنترل کننده این صفات چندان شناخته شده نیستند. دستیابی به درکی درست از نحوه پاسخ گیاهان در سطح ژن به تنش خشکی برای نگهداری محصول و بهبود تولید از ضروریات است. تنش خشکی عامل مختل کننده فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیک در گیاه است (Ober, 2001). اثر خشکی اختلال فتوشیمیائی در فتوسیستم II را سبب شده و بازدارندگی در انتقال الکترون را سبب می‌شود (Lu *et al*., 2002)، بعلاوه مضاف بر محدودیت فرآیندهای نوری ورود دی اکسید کربن کاهش یافته و انتقال الکترون در اثر محدودیت CO_2 کاهش می‌یابد و قدرت تثبیت کربن محدود می‌شود (Bryk *et al*., 2000). افزایش در میزان دی اکسید کربن اثر تنش خشکی را خنثی می‌کند (Zbieć *et al*., 2003). محلول‌پاشی متانول و ترکیباتی از این قبیل همراه با کاربرد آمینواسیدهای گلایسین گلوتامات و اسپارتات از جمله راهکارهایی است که منجر به افزایش در میزان غلظت دی اکسید کربن می‌شود (Nonomura and Benson, 1992). متانول افزایش در میزان هدایت روزنه‌ای، کاهش دمای برگ، کاهش در میزان تعرق و افزایش شاخص دوام برگ را سبب می‌شود (Makhdum *et al*., 2002). به این دلیل که متانول در گیاه جذب می‌شود و به دلیل اندازه کوچکتر متانول به جای CO_2 به سرعت به CO_2 در بافت گیاه متابولیزه می‌شود (Gout *et al*., 2000). استفاده از متانول در کلزا و اثرات آن روی تغییر میزان بیان ژن در مطالعات قبلی گزارش شده است (Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2022; Ramezanzadeh Bishegahi *et al*., 2021; Taghvimi *et al*., 2024). با توجه به اثرات اثبات شده محلول‌پاشی متانول و اهمیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در جلوگیری از استرس اکسیداتیو، مطالعه فوق به منظور بررسی برخی ژنهای مسیر پیروردوکسین در گیاه کلزا انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و پژوهشگاه بیوتکنولوژی شمال کشور در سال ۱۴۰۲ انجام شد. در پژوهش حاضر از دو ژنوتیپ کلزا SLM046 و Hyola308 به ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی استفاده شد (Mirzai *et al*., 2013; Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2016; Pasandideh *et al*., 2018). پس از تهیه بذور ژنوتیپ‌های از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج، ضد عفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد انجام شد. پروسه جوانه زنی در اتاقک کشت با دمای ۲±۲۳ درجه انجام و بعد از گذشت شش روز، بذور جوانه‌زده در گلدان کشت شدند و به اتاقک کشت تحت شرایط کنترل شده (۲ ±۲۳) درجه سانتیگراد (نسبت طول دوره روشنایی به تاریکی ۱۶:۸) منتقل و مراقبت شدند. حساس و متحمل بودن، تنش خشکی و متانول پاشی و زمان به عنوان عوامل آزمایش در نظر گرفته شدند، آزمایش در قالب طرح فاکتوریل به صورت کاملا تصادفی و در سه تکرار و سه سطح شاهد (آبیاری منظم با آب مقطر)، تنش خشکی (قطع آبیاری) و محلول پاشی با متانول ۲۰ درصد حجمی صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگهای کاملا توسعه یافته گیاه کلزا در مرحله رویشی (در مرحله ۴ تا ۶ برگی)، در زمان‌های ۰، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار متانول (۲۰ درصد حجمی) از گیاهان شاهد و حساس که به طور مرتب آبیاری شده است و گیاهانی تحت تیمار تنش خشکی بودند و گیاهانی که ابتدا تحت تنش خشکی بودند و گیاهانی که ابتدا تحت تنش خشکی قرار گرفته و سپس با متانول ۲۰٪ محلول پاشی شده بودند صورت گرفت (Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2022). سپس نمونه‌های برگی در فویل آلومینیومی با ضخامت متوسط قرار داده شدند، برای قطع فعالیت‌های متابولیکی درون گیاه،

نمونه‌ها ابتدا در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس سریعاً به فریزر ۸۰ – منتقل شدند تا جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه مورد استفاده قرار گیرند.

برای استخراج RNA از کیت ستونی استخراج RNA شرکت دنا زیست و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای حذف DNA از RNA استخراج شده از DNAse استفاده شد. جهت بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C USA (ساخت امریکا) استفاده شد. برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز ۱ درصد استفاده شد. از آنجایی که نمونه‌های استخراج شده هرکدام دارای غلظت‌های متفاوتی بودند، جهت جلوگیری از خطا، غلظت همه نمونه‌ها به ۵۰ نانوگرم رسانیده شد. سنتز cDNA مطابق با دستورالعمل کیت سنتز The Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit و به کمک آنزیم RevertAid Reverse Transcriptase (RT) انجام شد. ارزیابی صحت سنتز با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. تشکیل باندها در محدوده‌ی 157 bp نشان دهنده‌ی تکثیر توالی مورد نظر توسط آغازگرهای ژن اکتین است. جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با Real-time PCR، توالی ژن‌های *TRX*، *GR* و *GRX* و ژن رفرنس اکتین از پایگاه NCBI تهیه شد و طراحی آغازگرهای مناسب هر ژن با استفاده از برنامه Primer 3 صورت گرفت (http://Primr3.ut.ee/). توالی آغازگرها و اندازه قطعه تکثیری حاصل از واکنش هر ژن در جدول ۱ نمایش داده شده است.

برای اطمینان از عملکرد اختصاصی آغازگرها و همچنین بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (ساخت امریکا) و به‌صورت شیب دمایی انجام شد. برای واکنش qRT-PCR از دستگاه Real-Time PCR (BIORAD-IQ5) و کیت (Real Q Plus 2x Master Mix Green without Rox) (ساخت شرکت Ampliqon) استفاده شد که برای هر ژن، سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. همچنین، میکروتیوب‌های مخصوص واکنش Real time PCRنیز از شرکت سیناکلون تهیه شدند. واکنش PCR Real-time- در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت و ۴/۹ میکرولیتر ddH_2O سپس با اضافه کردن ۲ میکرولیتر از cDNA مورد نظر با هم مخلوط شدند. برای واکنش کنترل منفی (NTC) همه مواد ذکر شده بدون cDNA به کار رفت. چرخه حرارتی مورد استفاده شامل سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ °C ، سپس ۴۰ چرخه به‌صورت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای (Tm بسته به آغازگر متفاوت بود، جدول ۱) و ۳۰ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲ °C بود. آنالیز داده‌های به‌دست آمده از روش کمیت سنجی با استفاده از مدل ریاضی $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده روش لیواک و همکاران (Livak and Schmittgen, 2001) و نرم‌افزار Excell 2016 محاسبه شد.

جدول ۱. لیست توالی و خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

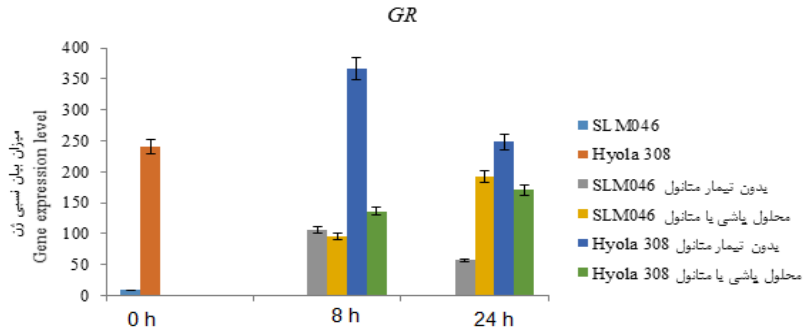
Table 1. The sequence and characteristics of the primers used in this study

ژن Gens	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال Annealing temperature (◦C)	اندازه تکثیر PCR production length	شماره دسترسی NCBI accession number
Actin(F)	TCCCGAGTATTGTTGGTCGT			
Actin(R)	TCCATGTCATCCCAGTTGCT	54	157	AF111812
TRX(F)	CTTGCCGTTTCATTGCACCT			
TRX(R)	CGAGCTTCTCTTCGCCTTTC	61	159	U59379
GR(F)	GGTGGTGAACTTGAGGATGC			
GR(R)	CAACTTCACAGCAGCATTCG	61	153	XM_013892271
GRX(F)	CTGCCCAGTCCACTCAGATA			
GRX(R)	TTCCTGTATCCGTCCACCAC	60	160	XM_013805747

نتایج و بحث

نتایج بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در دو ژنوتیپ Hyola308 و SLM046 که تحت تنش خشکی و تحت تیمار متانول قرار گرفته در شکل ۱ نشان داده شد. میزان بیان در ساعت اولیه اعمال تنش (صفر تنش) در ژنوتیپ SLM046 به شدت کم بوده است، اما با گذشت زمان و پس از گذشت ۸ ساعت اعمال تنش بدون محلول پاشی متانول، میزان بیان نسبت به ساعت صفر افزایش داشته است (۱۰۵ برابر) ولی به تدریج روند نزولی در پیش گرفته و با گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بدون متانول پاشی میزان بیان نسبت به ساعت ۸ کاهش یافته (۵۶ برابر) اما هم چنان نسبت به ساعت صفر بیشتر می‌باشد. متانول پاشی نیز باعث افزایش بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز شده، بطوریکه پس از گذشت هشت ساعت از تیمار متانول (۹۵ برابر) میزان بیان نسبت به حالت تنش بدون متانول افزایش داشته و با گذشت زمان در ۲۴ ساعت پس از تیمار متانول به بیشترین مقدار خود (۱۹۱ برابر) رسیده است. بطور کلی می‌توان گفت در ژنوتیپ متحمل (SLM046) در ساعات اولیه میزان بیان کم بوده اما با اعمال تیمار متانول میزان بیان افزایش داشته است. بنظر می‌رسد متانول سبب بهبود عملکرد این ژنوتیپ با افزایش بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز شده است. میزان بیان ژن *GR* در ژنوتیپ حساس (Hyola,308) در ساعات اولیه اعمال تنش (ساعت صفر تنش) افزایش داشته (۲۴۰ برابر) و با گذشت زمان در ۸ ساعت پس از تیمار بدون متانول پاشی این میزان بیان به بیشترین حد خود رسیده است (۳۶۶ برابر) و با گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش روند نزولی (۲۴۸ برابر) در پیش گرفته است، و این روند نزولی با اعمال تنش متانول نیز همچنان ادامه داشته است. بطور کلی می‌توان گفت بیشترین میزان بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز مربوط به ژنوتیپ Hyola308 پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول است که با گذشت زمان و همچنین اعمال تیمار متانول کاهش (۷۰ برابر) یافته است. تغییر میزان بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2022).

گلوتاتیون ردوکتاز یکی از آنزیم های بالقوه سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی است که وضعیت کاهش یافته GSH را از طریق مسیر آسکوربات–گلوتاتیون حفظ می‌کند و نقش حیاتی در حفظ گروه سولفیدریل (–SH) دارد و به عنوان بستری برای گلوتاتیون عمل می‌کند. S–ترانسفرازها GR مشخص شده است و در تراریخته‌ها برای ایجاد تحمل گیاهان در برابر استرس اکسیداتیو استفاده شده است. در شرایط خشکی، گیاهان می‌توانند روزنه‌های خود را برای حفظ تعادل آب ببندند که در این حالت کاهش در میزان تثبیت CO_2 رخ می‌دهد که ناشی از کاهش و کاهش بیش از میزان در زنجیره انتقال الکترون سیکل کالوین است (Hernandez *et al.*, 2000). لذا بعد از این امر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست تحت این شرایط تولید می‌شود. همچنین مسیر نوری تنفسی هنگامی که اکسیژن‌رسانی RuBP به حداکثر می‌رسد به دلیل محدودیت در تثبیت CO_2 افزایش می‌یابد (Noctor and Foyer, 1998).



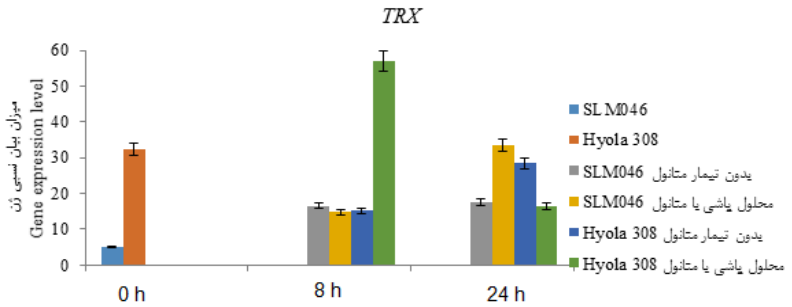
شکل ۱. الگوی بیان ژن *GR* با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308

Figure 1. Expression pattern *GR* gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308

طبق شکل ۲ میزان بیان ژن تیوردوکسین در ژنوتیپ متحمل SLM046 در ساعات اولیه تنش (صفر تنش) پایین بوده است (۵ برابر)، با گذشت زمان در ۸ ساعت بدون تیمار متانول به تدریج میزان بیان افزایش یافته (۱۶ برابر) و این افزایش تا ساعت در ۲۴ ساعت بدون تیمار متانول همچنان ادامه داشته است (۱۷ برابر). سپس ۸ ساعت پس از تیمار متانول میزان بیان ابتدا اندکی کاهش داشته (۱۴ برابر) و با گذشت زمان در ۲۴ ساعت پس از متانول پاشی به حداکثر میزان خود (۳۳ برابر) رسیده است. بطور کلی می‌توان گفت در ژنوتیپ متحمل در ابتدای تنش میزان بیان ژن تیوردوکسین کم بوده و به تدریج با تیمار متانول پاشی میزان بیان به حداکثر میزان خود رسیده است و می‌توان گفت متانول سبب افزایش مقاومت این ژنوتیپ کلزا در برابر خشکی شده است. در ژنوتیپ حساس Hyola308 میزان بیان در ساعات اولیه اعمال تنش (صفرتنش) نسبت به ژنوتیپ متحمل بیشتر بوده است (۳۲ برابر)، با گذشت در ۸ ساعت پس از تنش بدون متانول میزان بیان نسبت به ساعتهای اولیه کاهش داشته (۱۵ برابر) و پس از گذشت ۸ ساعت پس از تنش با تیمار متانول به بیشترین میزان خود رسیده است (۵۶ برابر) و پس از گذشت ۲۴ ساعت از تنش با تیمار متانول میزان بیان کاهش یافته (۱۶ برابر) و حتی از ساعت صفر تنش نیز کمتر می‌شود. بطور کلی می‌توان گفت بیشترین میزان بیان ژن *TRX* در ژنوتیپ حساس مربوط به تیمار ۸ ساعت پس از اعمال تنش با متانول می‌باشد و متانول‌پاشی سبب افزایش بیان و مقاومت در این ساعت شده است. تغییر میزان بیان ژن تیوردوکسین در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Vahedi *et al.*, 2019). مطالعه ژنومی برنج نشان داد که تحت شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *TRX* وجود دارد (Nuruzzaman *et al.*, 2012).

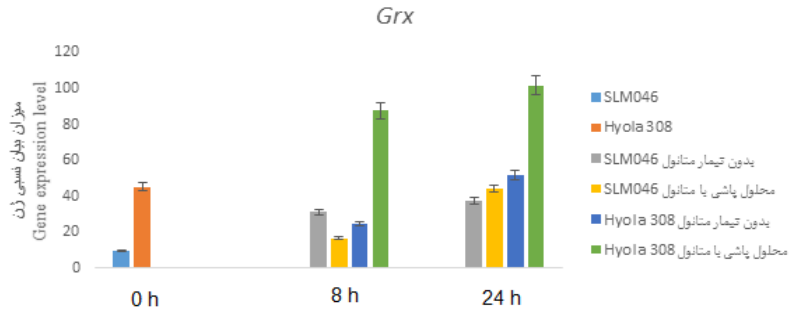
تیوردوکسین یکی از عوامل تنظیم کننده اصلی برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید است (Daloso *et al.*, 2015) که نقشی اساسی در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند که گیاهان را در مقابله با تنش اکسیداتیو موفق تر می‌کند، برای احیا خود از فردوکسین (*FTR*) یا NADPH استفاده می‌کند و با انتقال الکترون موجب احیای ردوکتازها جهت سم زدایی هیدروکسی پراکسیدازها چربی و ترمیم پروتئین اکسید شونده می‌شوند (Meyer *et al.*, 2012). افزایش بیان *NTR* در آرابیدوپسیس افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو را سبب شد در این مطالعه این نتیجه حاصل شد که افزایش بیان *NTR* به حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim *et al.*, 2017).

میزان بیان ژن گلوتاردوکسین در ژنوتیپ متحمل SLM046 در ساعات اولیه اعمال تنش خشکی کم بوده است (۹ برابر) اما پس از گذشت ۸ ساعت از اعمال تنش خشکی بدون تیمار متانول این میزان بیان افزایش داشته (۳۱ برابر) و تا ساعت ۲۴ نیز به روند افزایشی خود (۳۷ برابر) ادامه داده است (شکل ۳).



شکل ۲. الگوی بیان ژن *TRX* با روش Real Time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308

Figure 2. Expression pattern *TRX* gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308.



شکل ۳. الگوی بیان ژن *GRX* با روش Real Time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه های SLM046 و Hyola308

Figure 3. Expression pattern GRX gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308.

محلول‌پاشی با متانول ابتدا سبب کاهش (۱۶ برابر) و سپس افزایش بیان ژن گلوتاردوکسین شده است (۴۴ برابر). بطور کلی می‌توان گفت اعمال تنش متانول سبب افزایش بیان ژن گلوتاردوکسین در ژنوتیپ متحمل کلزا شده است. میزان بیان ژن *GRX* در ژنوتیپ حساس Hyola308 در ساعت صفر تنش نسبت به ژنوتیپ متحمل بیشتر بوده است (۴۵ برابر) اما پس از گذشت ۸ ساعت پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول میزان بیان کاهش داشته و کمتر از ساعات صفر تنش است (۲۴ برابر) و پس از تیمار متانول در همین ساعت به میزان ۸۷ برابر رسید.

گلوتاردوکسین‌ها (GRXs) آنزیم‌های کلیدی تیول (thiol) هستند. آن‌ها به عنوان آنزیم‌های احیاکننده متابولیکی و سیستم‌های جاروب ROS عمل می‌کنند. همچنین تغییرات احیا پس از رونویسی در پروتئین‌ها را بر پایه تیول تنظیم می‌کنند. گلوتاردوکسین و تیوردوکسین گروه‌های اصلی ردوکتازهای تیول هستند (Meyer *et al.*, 2012). گلوتاردوکسین‌ها با استفاده از NDPH، گلوتاتیون ردوکتار (GR) و گلوتاتیون (GSH) احیا می‌یابد (Holmgren and Aslund, 1995). گلوتاردوکسین در بسیاری از عملکردهای متابولیکی از جمله کنترل برنامه‌های رشد گیاهان و نقش مولکول‌های علامت دهی کلیدی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Rouhier *et al.*, 2004; Nicolas Rouhier and Jacquot, 2005). بررسی پروفایل بیان ژنی در آرابیدوپسیس با اعمال تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف نشان داد که ژن GRX نقش مهمی را در مقاومت به تنش ایفا می‌کند (Belin *et al.*, 2015). در آزمایش دیگری انتقال ژن *GRX* به آرابیدوپسیس سبب افزایش مقاومت گیاه به سرما شد (Hu *et al.*, 2015). در پژوهش حاضر در ساعت ۲۴ پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول میزان بیان در ژنوتیپ Hyola308 مجدداً افزایش داشته (۵۱ برابر) و با اعمال تیمار متانول نیز به بیشترین میزان خود رسیده است (۱۰۱ برابر). بیشترین میزان بیان ژن گلوتاردوکسین در ژنوتیپ حساس و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش با تیمار متانول و کمترین مقدار بیان مربوط به ساعت صفر تنش در ژنوتیپ متحمل بوده است. تغییر میزان بیان ژن گلوتاردوکسین در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Vahedi *et al.*, 2019).

نتیجه گیری نهایی

مشاهدات مورفولوژیکی در این پژوهش نشان داد که هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس گیاهان کلزا، طراوت خود را پس از محلول پاشی متانول تحت تنش قطع آبیاری به دست آوردند. تنش خشکی طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی را از سطوح فیزیولوژیکی تا مولکولی تحریک می‌کند و سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بخش‌های مختلف سلولی مانند کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها می‌شود. تولید ROS تحت تنش به‌عنوان یک سیگنال هشدار عمل می‌کند که باعث دفاع و سازگاری گیاه در برابر تنش می‌شود که سلول سعی می‌کند از استرس اکسیداتیو و تجمع ROS جلوگیری کند. میزان بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در ساعت ۸ تنش بدون

متانول‌پاشی (۳۶۶ برابر)، ژن تیوردوکسین در ۸ ساعت پس از محلول‌پاشی متانول (۵۶ برابر) و ژن گلوتاردوکسین در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی متانول (۱۰۱ برابر) در ژنوتیپ Hyola308 دارای بیشترین میزان بیان بود. در ژنوتیپ SLM046 میزان بیان هر سه ژن گلوتاتیون ردوکتاز، تیوردوکسین، گلوتاردوکسین در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی نسبت به ساعات ابتدای افزایش پیدا کرد و به طور کلی محلول‌پاشی با متانول سبب افزایش میزان بیان ژن‌های در این ژنوتیپ شد. نتایج نشان‌دهنده بیان بالای ژن‌های *GRX* و *TRX* در ژنوتیپ حساس Hyola308 در ساعت صفر تنش بود (به ترتیب ۴۵ و ۳۲ برابر). این بیان در ابتدا ممکن است به دلیل پاسخ سریع به تنش باشد، اما پس از گذشت ۸ ساعت تحت تنش بدون تیمار متانول، میزان بیان به طور قابل توجهی کاهش یافت (ژن‌های *GRX* و *TRX* به ترتیب ۲۴ و ۱۵ برابر)، که نمایانگر عدم توانایی این ژنوتیپ در حفظ سطح بیان ژن در شرایط طولانی‌مدت است. در مقابل، ژنوتیپ متحمل SLM046 بیان ژن *GR* را در شرایط مشابه به میزان پایینی نشان داد (۸ برابر)، اما پس از محلول‌پاشی متانول در ساعت ۸، بیان این ژن به طور قابل توجهی افزایش یافت (۹۵ برابر) و در ساعت ۲۴ (۱۹۱ برابر) به اوج خود رسید. این نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل قادر به تطبیق با تنش و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی مؤثر در مقایسه با ژنوتیپ حساس است. با توجه به تأثیرات مثبت تیمار متانول، مشخص شد که این ترکیب می‌تواند به طور قابل توجهی موجب افزایش بیان ژن گلوتاردوکسین در هر دو ژنوتیپ گردد. در ژنوتیپ متحمل، پاسخ به تنش و تیمار متانول مشهود بود، به طوری که بیان ژن *GRX* در ساعت‌های مختلف به‌ویژه پس از ۲۴ ساعت، افزایش یافت (۴۴ برابر). این افزایش می‌تواند بهبود مقاومت به تنش را در این ژنوتیپ تقویت کند. در ژنوتیپ حساس، اگرچه بیان ژن *TRX* نیز تحت تأثیر تیمار متانول قرار گرفت، اما این ژنوتیپ نتوانست به مدت زمان طولانی‌تر این بیان را حفظ کند که نشان‌دهنده ضعف‌های موجود در سیستم‌های دفاعی این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود. به طور کلی، یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که تیمار متانول می‌تواند به‌عنوان یک محرک مؤثر در بهبود بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان عمل کند، به خصوص در ژنوتیپ‌های متحمل که می‌توانند از این افزایش بیان برای مقابله با تنش‌های محیطی بهره‌برداری کنند. این مطالعه می‌تواند راهنمایی برای برنامه‌های به نژادی در زمینه تلاش برای افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی با استفاده از ترکیبات شیمیایی باشد. در نهایت، این نتایج بر اهمیت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل در کشت گیاهان تأکید می‌کند تا در شرایط متغیر و نامطلوب محیطی، عملکرد و پایداری تولیدات کشاورزی افزایش یابد. به طور کلی به نظر می‌رسد متانول سبب تولید CO_2 می‌شود که تا حدی می تواند کمبود CO_2 حاصل از تنش را در گیاهان جبران کند و به عنوان منبع کربن استفاده شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

Ahmar, S., Liaqat, N., Hussain, M., Salim, M. A., Shabbir, M. A., Ali, M. Y., ... Rizwan, M. (2019). Effect of abiotic stresses on Brassica species and role of transgenic breeding for adaptation. *Asian J. Res Crop Sci, 3*(1), 1-10 .

Belin, C., Bashandy, T ,.Cela, J., Delorme Hinoux, V., Riondet, C., & Reichheld, J. (2015). A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in A rabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment, 38*(2), 299-314 .

Bryk, R., Griffin, P., & Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature, 407*(6801), 211-215 .

Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior, 3*(3), 156-165.

Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., ... Nunes-Nesi, A. (2015). Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 112*(11), E-1392-E1400

Elferjani, R., & Soolanayakanahally, R. (2018). Canola responses to drought, heat, and combined stress: shared and specific effects on carbon assimilation, seed yield, and oil composition. *Frontiers in Plant Science, 9*, 1224.

Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., ... Saud, S. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science, 8*, 1147.

Fich, E. A., Segerson, N. A., & Rose, J. K. (2016). The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Review of Plant Biology, 67*(1), 207-233.

Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rébeillé, F., Nonomura, A. R., Benson, A. A., & Douce, R. (2000). Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant physiology, 123*(1), 287-296.

Hernandez, L., Pellegrini, C., & Malla, L. (2000). Effect of foliar applications of methanol on growth and yield of sunflower (*Helianthus animus* L.). *Int. J Exp Bot, 66*(2000), 1-8.

Holmgren, A., & Aslund, F. (1995). Glutaredoxin *Methods in enzymology*, 252, 283-292. Elsevier.

Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S. A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C., ... Hirschi, K. D. (2015). Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Horticulture Research, 2*.

Kim, M. R., Khaleda, L., Jung, I. J., Kim, J. Y., Lee, S. Y., Cha, J.-Y., & Kim, W.-Y. (2017). Overexpression of chloroplast-localized NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC) enhances tolerance to photo-oxidative and drought stresses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Biology, 60*, 175-180.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods, 25*(4), 402-408.

Lu, Q., Lu, C., Zhang, J., & Kuang, T. (2002). Photosynthesis and chlorophyllafluorescence during flag leaf senescence of field-grown wheat plants. *Journal of plant physiology, 159*(11), 1173-1178 .

Makhdum, I., Nawaz, A., & Shabab, M. (2002). Physiological response of cotton to methanol foliar application.

Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., & Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & redox signaling, 17*(8), 1124-1160

Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics, 43*(1), 335-367 .

Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., ... Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of experimental botany, 67*(13), 3831-3844.

Mirzai, M., Moeini, A., & Ghanati, F. (2013). Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars.

Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, S. H., & Lahiji, H. S. (2016). Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination stages based on multivariate statistical methods .

Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei, M. M., Samizadeh Lahiji, H., Ashery, S., & Raza, A. (2022). Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. *3 Biotech, 12*(9), 217.

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology, 49*(1), 249-279.

Nonomura, A., & Benson, A. (1992). The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(20), 9794-9798 .

Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., Satoh, K., Al-Shammari, T., Shimizu, T., Sasaya, T., ... Kikuchi, S. (2012). The thioredoxin gene family in rice: Genome-wide identification and expression profiling under different biotic and abiotic treatments. *Biochemical and biophysical research communications, 423*(2), 417-423.

Ober, E. (2001). The search for drought tolerance in sugar beet. *British sugar beet review, 69*, 40-43.

Pasandideh, M., Samizadeh, H.-A., & Mohsenzadeh, M. (2018). The effect of drought stress on some morphological and physiological characters in canola seedling (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Seed Sciences and Research, 5*(2), 95-108.

Ramezanzadeh Bishegahi, S., Mohsenzadeh, M., & Samizadeh, H. (2021). Effect of methanol foliar application on expression changes of some mitochondrial genes in canola under drought stress. *Iranian Journal of Field Crop Science, 52*(3), 113-128 .

Rouhier, N., Gelhaye ,E., & Jacquot, J.-P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61*, 1266-1277 .

Rouhier, N., & Jacquot, J.-P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine, 38*(11), 1413-1421.

Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science, 16(5)*, 1037-1046.

Sami, Z., & Alemzadeh, A. (2016). Isolation and molecular characterization of a novel Na+/H+ antiporter gene, AlNHX2, from'Aeluropus littoralis' and comparison of AlNHX1 and AlNHX2. *Plant Omics, 9*(3), 205-212 .

Taghvimi, P., Golfazani, M .M., Taghvaei, M. M., & Lahiji, H. S. (2024). Investigating the effect of drought stress and methanol spraying on the influential genes in the Calvin cycle and photorespiration of rapeseed (Brassica napus). *Functional Plant Biology, 51*(3 .(

Tan, M., Liao ,F., Hou, L., Wang, J., Wei, L., Jian, H., ... Liu, L. (2017). Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. *Euphytica, 213*(2), 1-15.

Tsugane, K., Kobayashi ,K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., & Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis mutant* that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell, 11*(7), 1195-1206.

Vahedi, R., Mohsenzadeh Golfazani ,M., Pasandideh Arjmand, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2019). Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*). *Crop Biotechnology, 9*(27), 15-28.

Zbieć, I., Karczmarczyk, S., & Podsiadło, C. (2003). Response of some cultivated plants to methanol as compared to supplemental irrigation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 6*(1), 1-7.