Archive of SID

مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۶۲۱-۶۱۳)

مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و توالی یکی از ژن پاسخ‌دهنده به تنش سرما در چهار رقم گندم حساس و مقاوم

ساسان محسن‌زاده[1]*، جواد کریمی اندانی[2] و حسن محبت کار[3]
۱، ۲، ۳، استادیار، دانشجوی دکتری و دانشیار بخش زیست شناسی دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۴- تاریخ تصویب: ۸۹/۱/۲۵)

چکیده

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های محیطی هستند که این تنش‌ها چه زیستی و چه غیرزیستی به شدت بر میزان رشد و تولید آنها اثر می‌گذارند. مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی نقش دارند که شناسایی آنها می‌تواند گام مهمی برای مقابله با آثار مخرب تنش‌های مذکور باشد. در این پژوهش پاسخ‌های فیزیولوژیکی دو رقم گندم نان حساس به تنش سرما به نام‌های بیات و داراب۱ و دو رقم مقاوم به سرما به نام‌های الوند و شاهی مطالعه گردیدند و مقدار آب نسبی گیاه، کلروفیل، کارتنوئید و اسید آمینه آزاد پرولین اندازه‌گیری شد. همچنین بخشی از ژن پاسخ‌دهنده به تنش سرما از هر چهار رقم گندم جداسازی شد. نتایج نشان داد که مقدار آب نسبی گیاه، کلروفیل و کارتنوئید در تنش سرما به طور معنی‌داری کاهش یافت و این کاهش برای ارقام حساس بیشتر بود. بعلاوه تنش سرما به طور معنی‌داری مقدار اسید آمینه پرولین آزاد را افزایش داد. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک ترجمه توالی‌های ۵۰۰ نوکلئوتیدی بدست آمده از چهار رقم گندم نشان داد که آنها دارای ناحیه حفاظت شده‌ای با ۵۷ اسید آمینه حاوی ۳ زنجیره بتا-شیت و یک زنجیره آلفا-هلیکس و دارای اسید آمینه والین شماره ۱۴ و اسید آمینه گلوتامیک اسید شماره ۱۹ می‌باشند. توالی‌های به دست آمده در بانک جهانی ژن ثبت شد.

واژه‌های کلیدی: پاسخ‌های فیزیولوژیکی، تنش سرما، جداسازی ژن، عامل نسخه‌برداری، گندم.

مقدمه

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی هستند که این تنش‌ها اثرات نامطلوبی بر بقاء، رشد، کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی دارند (Knight & Knight, 2001).

سرما یکی از این تنش‌هاست که همه ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور تحمیل می کند. سرما به عنوان یک تنش اسمزی جذب آب از ریشه گیاه را محدود کرده و باعث افت پتانسیل آب و انتقال آب از سیمپلاست به آپوپلاست می‌شود که کم آبی شدیدی را به دنبال خواهد داشت. سازگاری گیاه به سرما حاصل تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متنوعی است که اساساً از تغییر در بیان تعدادی از ژن‌های مسئول در تحمل به تنش سرما ناشی می‌شود (Thomas, 1990). در پاسخ به سرما گیاهان خود را در سطوح مرفولوژی، آناتومی، فیزیولوژی و بیوشیمی تطابق می‌دهند (Zhang et al., 2002). مکانیسم‌هایی که گیاهان برای بالا بردن تحمل خود در برابر تنش‌ها به کار

* نویسنده مسئول: ساسان محسن‌زاده تلفن: ۰۹۱۷-۳۰۶۷۳۲۲ E-mail: mohsenzadeh@susc.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

می‌برند شامل سازگاری‌های فیزیکی و تغییرات سلولی و مولکولی است که بلافاصله بعد از دریافت پیام‌های تنش صورت می‌گیرد(Knight & Knight, 2001).

میزان جاری بودن غشاء سلولی، بستگی به درصد اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع و دما دارد. دما یکی از عوامل مهمی است که بر سیالیت، پایداری و انعطاف‌پذیری غشاء اثرگذار است. به همین دلیل از غشاء به عنوان حسگر اولیه زیستی تنش سرما نام می‌برند (Taiz & Zeiger, 2002). به طور کلی، دمای پایین، فعالیت طبیعی مراحل فیزیولوژیکی را مختل کرده و باعث آسیب‌های برگشت ناپذیر در گیاهان و اختلال سراسری در مراحل سلولی و متابولیکی می‌شود. گونه‌های مختلف گیاهی مقاومت بسیار متنوعی به تنش‌های سرمایی دارند (Ingram & Bartels, 1996). تجمع پرولین در گیاهان در پاسخ به تنش‌های متنوع محیطی از قبیل خشکی، شوری، سرما و دمای بالا بخوبی مشخص شده است. پرولین دو نقش اساسی در تحمل به تنش‌های مذکور ایفا می کند که عبارتند از نقش آنها در کاهش پتانسیل اسمزی و حفاظت از ماکرومولکول های خاص. به نظر می رسد نقش اصلی پرولین در واقع حفاظت آنزیمی در مقابل کم آبی و حفظ حالت طبیعی آن باشد (Thomas, 1990). در گیاهانی مثل سیب زمینی، جو و گندم، مشخص شده است که میزان پرولین آزاد در گیاهان مقاوم به تنش یخ زدگی افزایش می‌یابد (Dörffling et al., 1990).

میزان فتوسنتز و محتوی کلروفیل در گیاهان در اثر تنش سرما آسیب جدی می بیند و کاهش معنی‌داری نشان می دهد، که علت آن تغییرات اجزاء پروتئینی و لیپیدی غشاء تیلاکوئید در اثر تنش سرماست (Mostowska, 1997). تنش کم آبی که می‌تواند ناشی از خشکی، شوری و سرما باشد، محتوای رنگدانه‌هایی مثل کلروفیل، کارتنوئید و آنتوسیانین را کاهش می‌دهد (Lichtenthaler, 1987). در ابتدای تنش‌های محیطی میزان سنتز کارتنوئید در برگ به علت نقش آنها در حفاظت در مقابل رادیکال‌های آزاد افزایش یافته اما با گذشت زمان و در تطابق گیاه با تنش میزان آن کاهش پیدا می‌کند (Groppa & Benavides, 2008).

پروتئین DREB[1] یکی از عوامل نسخه‌برداری مخصوص عالم گیاهی است که در بسیاری از گیاهان نقش کلیدی را در تحمل به تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما ایفاء می کند. این پروتئین با داشتن توالی حفاظت شده ای شامل ۶۰ تا ۷۰ اسید آمینه به نام ناحیه AP2 به توالی خاصی از DNA در بالا دست ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما متصل و باعث بیان چندین ژن دیگر می‌شود (Agarwal et al., 2006). عوامل رونویسی DREB توالی خاصی به نام DRE۲ را روی پروموتر ژن‌های القاء شونده توسط تنش شناسایی می کنند. شناسایی DREB در سال ۱۹۹۸ بر روی گیاه آرابیدوپسیس انجام گرفت و دو cDNA مختلف DREB1A و DREB2A کلون شدند(Liu et al., 1998). ژن کد کننده پروتئینی DREB1A و دو همولوگ آن تحت تنش سرما و ژن کد کننده پروتئینی DREB2A و همولوگ آن تحت تنش‌های خشکی و شوری القاء می‌شوند. همچنین با مطالعه آرابیدوپسیس تراریخته، عملکرد محصولات این ژن‌ها ارزیابی شدند. برخی پژوهشگران خصوصیات توالی DRE و توالی حفاظت شده ناحیه AP2 در آرابیدوپسیس را بررسی کردند (Sakuma et al., 2002).

در این پژوهش پاسخ های فیزیولوژیکی مانند میزان وزن خشک، محتوی آب نسبی گیاه (RWC[3])، مقادیر کلروفیل a، b، a+b و کارتنوئید و مقدار پرولین آزاد چهار رقم حساس و مقاوم گندم نان به تنش سرما مورد مطالعه قرار می‌گیرد و همچنین ژن عامل نسخه برداری مربوط به ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما در هر چهار رقم گندم جداسازی و خصوصیات آن تعیین می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش دو رقم گندم نان حساس به تنش سرما به نام های بیات و داراب۱ و دو رقم مقاوم به سرما به نام‌های الوند و شاهی مطالعه گردیدند. بذر ارقام مذکور از بانک ژن گیاهی واقع در کرج تهیه شد. این

1. Dehydration responsive element binding
2. Dehydration responsive element
3. Relative water content

www.SID.ir

Archive of SID

بذرها ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و سپس در گلدانهای مجزا برای طراحی نمونه‌های شاهد و تیمار در ۳ تکرار کاشته شدند. نمونه‌ها در اتاقک کشت با شرایط طول روز ۱۶ ساعت، طول شب ۸ ساعت، دمای روز ۲۲ درجه سانتی‌گراد، دمای شب ۱۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ درصد قرار داده شدند. برای القاء تنش سرما، گیاهچه‌های ۱۶ روزه، هر روز ۵ ساعت و به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. گلدانهای شاهد نیز به منظور مقایسه تأثیر سرما بر گیاهچه گندم در شرایط عادی و بدون تنش قرار داده شدند.

برای اندازه‌گیری محتوی آب نسبی گیاه ابتدا وزن تازه برگ دوم گیاه گندم در ۴ رقم مذکور و برای نمونه شاهد و تنش دیده در سه تکرار اندازه‌گیری شد. سپس این قطعات در آب و در تاریکی مطلق به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای تعیین وزن اشباع قرار داده شدند. سپس با قرار دادن نمونه‌ها در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد وزن خشک آنها اندازه‌گیری گردید. آن‌گاه از طریق فرمول زیر درصد آب نسبی گیاه محاسبه گردید (Mohsenzadeh et al., 2003):

$$\text{درصد آب نسبی گیاه} = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تازه})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع})} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید با روش Lichtenthaler (1987) صورت گرفت. استخراج و اندازه‌گیری اسید آمینه پرولین آزاد با روش Bates (۱۹۷۳) انجام شد. صفات اندازه‌گیری شده با تجزیه واریانس ارزیابی شدند سپس مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه های دانکن انجام شد. برای آنالیزهای مربوطه از نرم‌افزار SPSS 13 و به منظور ترسیم نمودارها از اکسل ۲۰۰۳ استفاده گردید.

جداسازی و تعیین خصوصیات عامل رونویسی DREB در ارقام گندم شامل استخراج DNA، طراحی آغازگرهای اختصاصی، پی سی آر، ژل الکتروفورز، عبور از ستون به منظور خالص سازی محصول پی سی آر، تعیین توالی DNA تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیک و تأیید ناحیه AP2 با نرم افزارهایی از قبیل BLAST، ProDom، PROSITE، SMART، CDD، CDART، BLOCKS و Pfam و ثبت توالی‌ها در بانک جهانی ژن NCBI صورت گرفت. همسانه‌سازی با نرم‌افزار Multalin انجام شد. استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته (Sumer et al., 2003) و از برگ گیاهچه‌های ۱۶ روزه گندم صورت گرفت. با بهره گیری از نرم‌افزار الیگو۵ و هم آرایی توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک جهانی ژن[۴] یک جفت آغازگر مناسب به قرار زیر طراحی گردید و توسط شرکت آلمانی MWG ساخته شد.

5′-TATGGATTGCCTTGATGAACA-3′ به عنوان توالی پیشرو

5′-GACTCCGATTCATCCTTCCC-3′ به عنوان توالی وارونه.

برنامه زمانی و دمایی واکنش پی‌سی‌آر به صورت دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به صورت ۹۴، ۵۳ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۱ دقیقه و دمای نهائی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شده بود. با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول پی‌سی‌آر شرکت Roche نمونه‌ها برای تعیین توالی آماده شدند.

نتایج و بحث

میزان وزن خشک

مقایسه میزان وزن خشک در چهار رقم گندم در دو حالت شاهد و تنش سرما نشان داد که در ارقام حساس و مقاوم به سرما، وزن خشک کاهش می‌یابد. با القاء تنش سرما، مطابق آنچه در شکل ۱ دیده می‌شود، میزان وزن خشک در همه نمونه‌ها نسبت به شاهد کاهش نشان می‌دهد، ولیکن این کاهش در مورد داراب۱ که رقمی حساس به سرما می‌باشد بیشترین و در رقم شاهی که خیلی مقاوم به سرماست کمترین مقدار است. در مورد گندم‌های نان الوند، بیات، داراب۱ و شاهی به ترتیب نمونه تنش نسبت به شاهد ۱۴، ۱۷، ۲۴ و ۱۳ درصد کاهش مقدار وزن خشک را نشان می‌دهد و این اختلاف مشاهده شده از نظر آماری کاملاً معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۱$) بود.

نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج سایر محققین در مورد اثر تنش سرما بر کاهش وزن خشک

www.SID.ir

Archive of SID

مطابقت دارد (Lawlor, 1995; Wang et al., 2003). این کاهش وزن خشک، هم می‌تواند به دلیل اثر تنش کم آبی بر رشد و هم به دلیل کاهش متابولیسم ریشه تحت اثر سرما باشد که بر جذب اثر منفی دارد، لذا وزن خشک، جهت تعیین اثر تنش کم آبی بر روی رشد گیاه، معیار مناسبی است (Bray, 1997; Boyer, 1982). همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد ارقام داراب ۱ و بیات که جزء ارقام حساس به سرما هستند به طور معنی‌داری وزن خشک بخش هوائی کمتری نسبت به دو رقم مقاوم شاهی و الوند دارند اما رقم داراب ۱ این کاهش را بیشتر نشان می دهد.

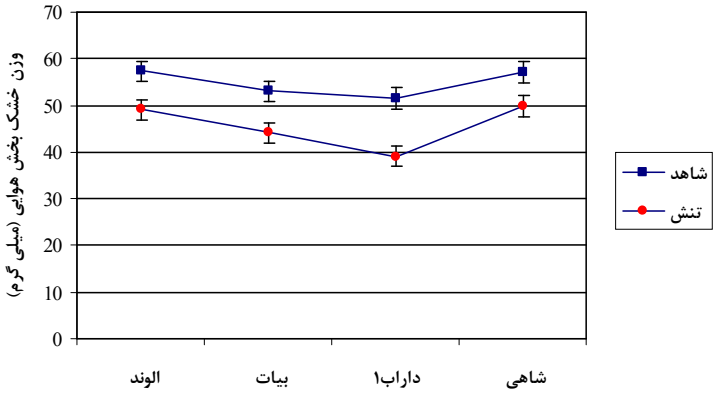
میزان آب نسبی گیاه

نتایج موجود نشان می‌دهد که القاء تنش سرما، میزان RWC را در تمامی نمونه‌ها به طور معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۱$) کاهش داده است. این کاهش RWC برای ارقام حساس به سرما یعنی بیات و داراب۱ اندکی بیشتر است که این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. شکل ۲ نمودار حاصل از میانگین سه تکرار را نشان می‌دهد.

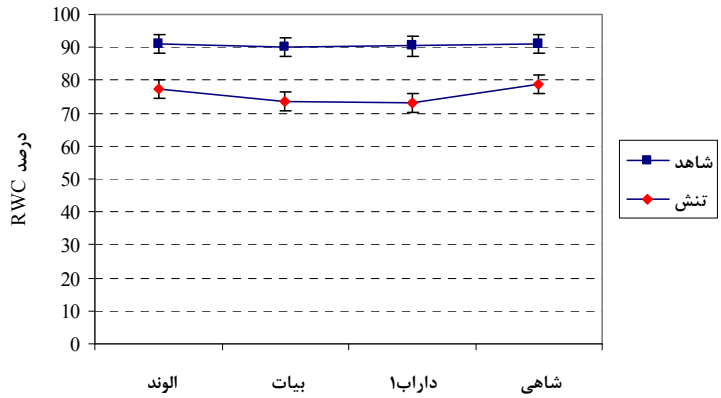
نتایج نشان داد که هرچه گیاه به تنش سرما مقاومت بیشتری داشته باشد، در واقع قدرت جذب و حفظ آب بیشتری در شرایط تنش سرما داشته و لذا افت میزان RWC در آن کمتر است. این یافته‌ها با نتایج سایرین مشابه بود (Gill et al., 2002).

اثر تنش سرما بر مقدار کلروفیل a، b و مقدار کارتنوئید

شکل‌های ۳ تا ۶ نشان دهنده مقادیر کلروفیل a، b، a+b و کارتنوئید می باشند. نتایج نشان می‌دهند که در تنش سرما نسبت به شاهد، مقدار کلروفیل a، b، a+b و مقدار کارتنوئید کاهش معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) داشته است. تنش‌ها بطور قابل توجهی محتوای کلروفیل را نسبت به گیاهان شاهد کاهش می‌دهند. این کاهش، در سایر پژوهش‌ها به افزایش نشت غشاء سلولی در حین تنش نسبت داده شده است و بر اساس نظر سایر پژوهشگران افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و پروکسیلاز نیز در این امر نقش دارد (Lichtenthaler, 1987; Ashraf et al., 1994; Parry et al., 2002).



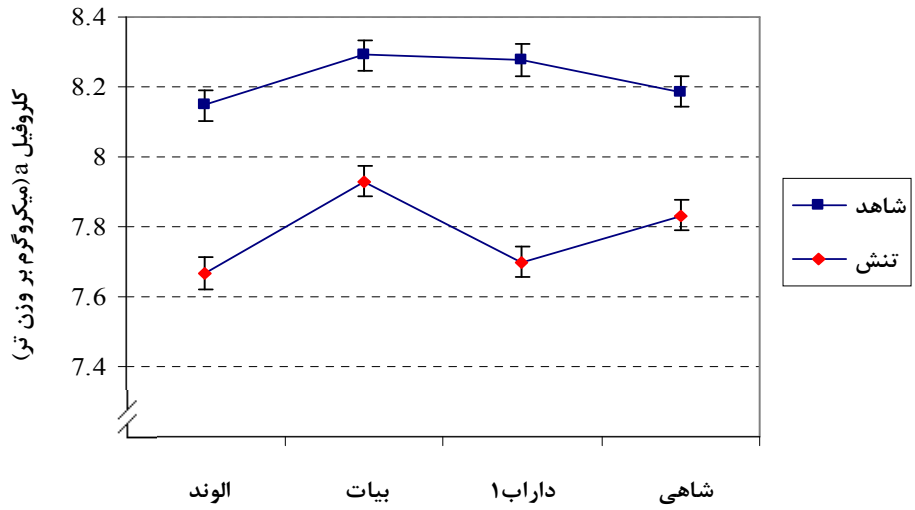
شکل ۱- مقایسه وزن خشک چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± (std×t^2 0.025) است.



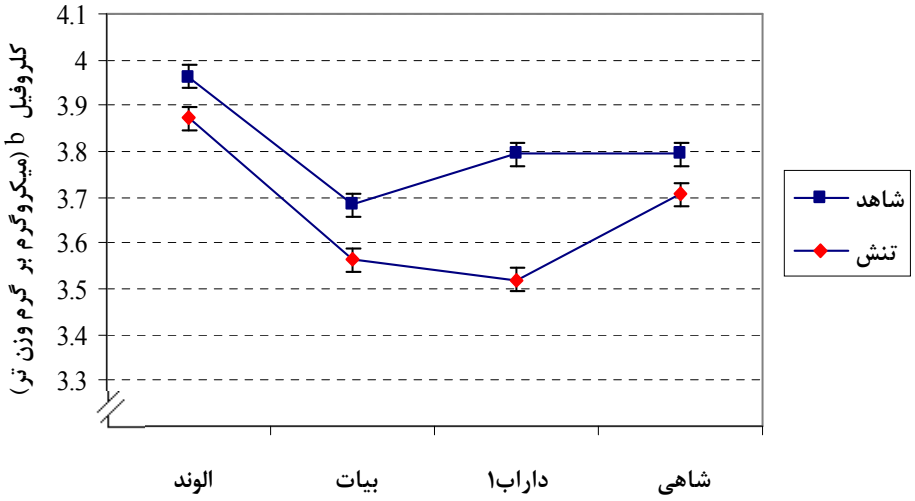
شکل ۲- مقایسه مقدار RWC چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± (std×t^2 0.025) است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- میانگین مقدار کلروفیل a چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± (std×t^2 0.025) است.



شکل ۴- میانگین مقدار کلروفیل b چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± (std×t^2 0.025) است.

مقایسه ارقام حساس و مقاوم در شکل‌های ۳ تا ۶ نشان می‌دهد که تنها مقدار کلروفیل a رقم مقاوم بیات نسبت به ارقام حساس شاهی و الوند در شرایط تنش به طور معنی‌داری بالاتر مانده است اما کلروفیل b عکس آنرا نشان می‌دهد. بنابراین اختلاف معنی‌داری در میزان کلروفیل a+b بین رقم مقاوم بیات و ارقام حساس وجود ندارد. مقدار کارتنوئید هر دو رقم مقاوم بیات و داراب۱ به طور معنی‌داری بیشتر از دو رقم حساس می‌باشند که با توجه به نقش کارتنوئیدها در پاسخ به تنش‌ها از جمله جمع‌کنندگی[1] رادیکال‌های آزاد قابل توجیه می‌باشد. نمودار کلروفیل b نشان می‌دهد که مقدار این کلروفیل در رقم مقاوم بیات کمتر از ارقام حساس شاهی و الوند است و اختلاف بین نمونه‌های شاهد و تنش نیز کم می‌باشد. این به دلیل نقش کمتر کلروفیل b در تنش‌ها و ارتباط بیشتر آن به مقدار محصول باشد (Hassanzadeh et al., 2009).

1. Scavenging

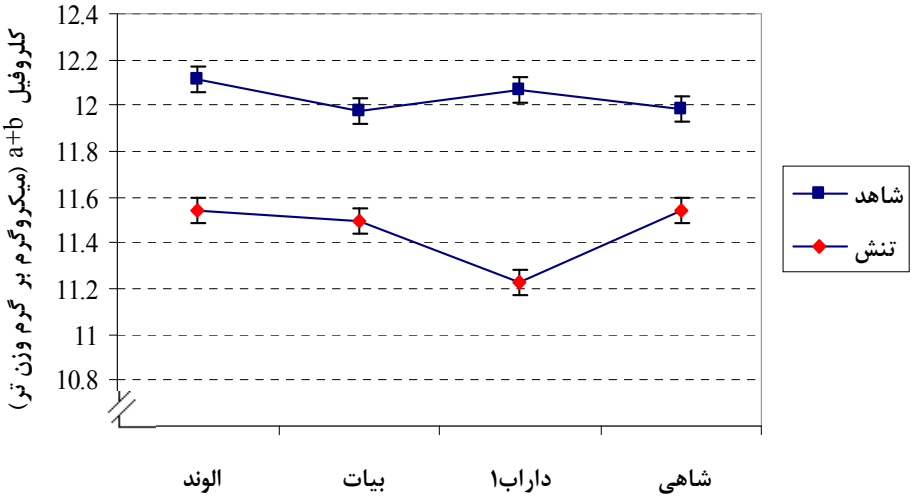
www.SID.ir

Archive of SID

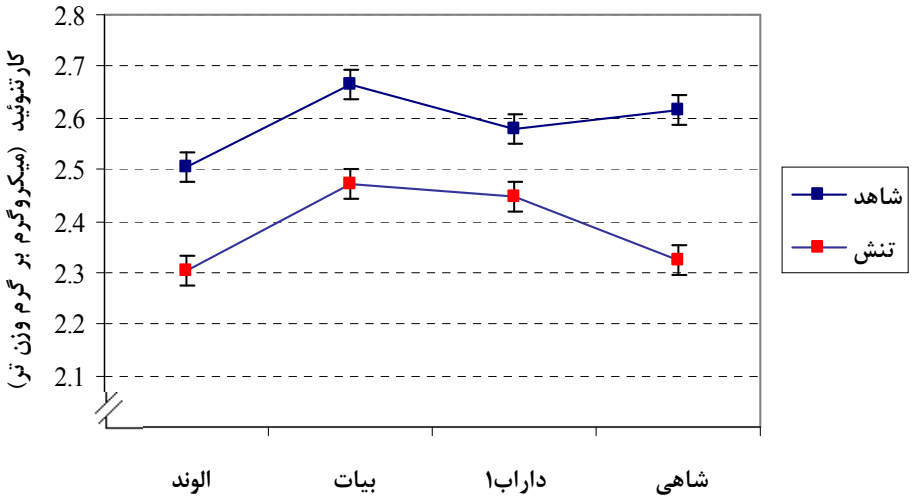
اثر تنش سرما بر میزان پرولین برگ

تنش سرما به طور معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۱$) مقدار پرولین آزاد را بیش از دو برابر افزایش داده است و در ارقام مقاوم این افزایش اندکی بیشتر است (شکل۷). ولیکن بین نمونه‌های گندم حساس و مقاوم با اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد و ممکن است اعمال تنش سرمای شدیدتر در میزان پرولین آزاد، اختلاف معنی‌دار ایجاد کند. برخی از پژوهشگران به افزایش پرولین آزاد در ارقام مقاوم (Ronde et al., 2000) و برخی به افزایش آن در ارقام حساس (Porgali & Yurekli, 2005) و برخی نیز به عدم تفاوت آن اشاره نموده‌اند(Singh & Rai, 1981).

افزایش پرولین از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در هنگام مواجهه با تنش‌های اسمزی از قبیل خشکی، شوری و سرماست و گیاهانی که مقاومت بیشتری به تنش‌های اسمزی دارند، میزان تولید پرولین بیشتری خواهند داشت.



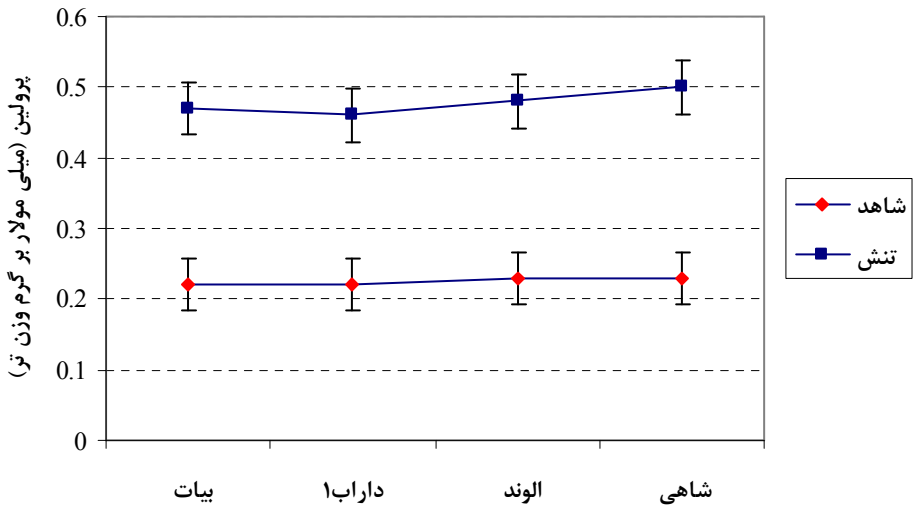
شکل ۵- میانگین مقدار کلروفیل b+a چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± ($std\times t^2$ 0.025) است.



شکل ۶- میانگین مقدار کارتنوئید چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما
هر عدد میانگین سه تکرار ± ($std\times t^2$ 0.025) است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- میانگین مقدار پرولین آزاد برگ چهار رقم گندم در شرایط شاهد و تنش سرما

دلیل احتمالی افزایش سطح پرولین در طی تنش کم آبی می‌تواند مربوط به تغییراتی باشد که در فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز و تجزیه پرولین اتفاق می‌افتد که این تغییرات از طریق سطوح ژنتیکی و وقایع انتقال پیام روی می‌دهد (Rajendra & Kandpal, 1981). تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند پرولین هم باعث نگهداری آب سلول و حفظ فشار تورگر می‌شوند و هم در حفاظت از ماکرومولکول‌ها، مولکول‌های پروتئینی، ساختارهای سلولی و در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نقش دارند (Kavi Kishor & Sangam, 2005).

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

توالی‌های بدست آمده ژن DREB و ناحیه AP2 آن با تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک تائید شد. شکل ۸ توالی آمینواسید ترجمه شده از ناحیه AP2 گندم نان الوند را به عنوان نمونه نشان می‌دهد. این منطقه با ۵۷ اسید آمینه حاوی ۳ زنجیره بتا-شیت و یک زنجیره آلفا-هلیکس است و دارای اسید آمینه والین شماره ۱۴ و اسید آمینه گلوتامیک اسید شماره ۱۹ می‌باشد که از مشخصات ناحیه AP2 است. بررسی ساختار بخشی از ژن DREB چهار رقم حساس و مقاوم گندم نشان داد که آنها حدود ۹۸ درصد همسانی داشته و در توالی‌های شماره ۶۲، ۱۰۴، ۳۱۴، ۴۳۹، ۴۴۲ و ۴۶۴ با یکدیگر اختلاف دارند. با توجه به آنکه ژن DREB یک عامل رونویسی است و بیان چندین ژن را تنظیم می‌کند، انتقال آن به گونه‌های حساس به سرما ممکن است بیان چندین ژن موثر در تحمل به سرما را افزایش داد. زیرا تحمل به سرما تحت تنظیم یک ژن نمی‌باشد و افزایش تحمل به سرما از طریق انتقال چند ژن نیز مشکل است (Fowler & Thomashow, 2002).

ثبت توالی‌ها

توالی‌ها با شماره‌های دسترسی FC556845، FC556846، FC556847 و FC556850 به ترتیب برای ارقام گندم نان الوند، بیات، داراب۱ و شاهی در بانک جهانی ژن NCBI ثبت گردید.

A Y R G V R Q R T **W** G K W *V* A E I R *E* P **N R G N** R L W L G S F

P T A V E A A R A Y D D A A R A M Y G **A K A R V N F**

شکل ۸- توالی آمینواسید ترجمه شده از ناحیه AP2 گندم نان الوند به عنوان نمونه. این منطقه حاوی ۳ زنجیره بتا-شیت و یک زنجیره آلفا-هلیکس است که به ترتیب با فونت کوچک نشان داده شده است. اسید آمینه والین شماره ۱۴ و اسید آمینه گلوتامیک اسید شماره ۱۹ با فونت ایتالیک نمایان است.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Agarwal, P. K., 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*, 21, 1263-1274.
2. Ashraf, M. Y., Azim, A. R., Khan, A. H. & Ala, S. A. (1994). Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat (*Triticum aesativum* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 16, 185-191.
3. Bates, L. S. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
4. Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science,* 218, 443-448.
5. Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Science*, 2, 48–54.
6. Dörffling, K. S., Schulemberg, G. & Lesselich, H. (1990). Abscisic acid and proline levels in cold hardened winter wheat leaves in relation to variety-specific differences in freezing resistance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 165, 230–239.
7. Fowler, S. & Thomashow, M. F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14, 1675-1690.
8. Gill, P., Sharma, A. D. Singh, P. & Bhullar, S. (2002). Osmotic stress-induced changes in germination growth and soluble sugar content of *Sorghum bicolar* (L.) moench seeds. *Plant Physiology*, 28, 12-25.
9. Groppa, M. D. & Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34, 35–45.
10. Hassanzadeh, M., Ebadi, A., Panahyan-e-Kivi, M., Eshghi, A. G., Jamaati-e-Somarin, Sh., Saeidi, M. & Zabihi-e-Mahmoodabad, R. (2009). Evaluation of drought stress on relative water content and chlorophyll content of sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes at early flowering stage. *Research Journal of Environmental Sciences,* 3(3), 345-350.
11. Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology,* 47, 377–403.
12. Kavi Kishor, P. B. & Sangam, S. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants. *Current Science*, 88, 424-438.
13. Knight, H. & Knight, M. R. (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Science*, 6, 262–267.
14. Lawlor, D. H. (1995). The effects of water deficit on photosynthesis. In N. Smirnoff (Ed.), *Environment and plant metabolism flexibility and acclimation*. (pp. 129-156). BIOS Scientific Publishers, Oxford.
15. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorphylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods enzymology*, 148, 350-382.
16. 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, 1391–1406.
17. Mohsenzadeh, S., Farrahi-aschtiani, S., Malboobi, M. A. & Ghanati, F. (2003). Effects of drought and chlorocholine chloride on seedling and photosynthesis of two cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pajouhesh-Va-Sazandegi*, 60, 56–64. (In Farsi)
18. Mostowska, A. (1997). *Environmental factors affecting chloroplasts*. In: M. Pessarakli (ed.) Handbook of photosynthesis, 407–426.
19. Parry, M. A. J. Andralojc, P. J., Khan, S. H. & Lea, P. J. (2002). Rubisco activity: effects of drought stress. *Annuals of Botany,* 89, 833-839.
20. Porgali, Z. B. & Yurekli, F. (2005). Salt stress-induced alterations in proline accumulation, relative water content and superoxide dismutase (SOD) activity in salt sensitive *Lycopersicon esculentum* and salt-tolerant *L. pennellii*. *Acta Botanica Hungarica*, 47(1-2), 173-182.
21. Rajendra, P. & Kandpal, C. S. (1981). Alternations in the activities of the enzymes of proline metabolism in Ragi leaves during water stress. *Journal Biology Science*, 3, 361-370.
22. Ronde, J. A., Mescht, A. & Steyn, H. S. F. (2000). Proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. *African Crop Science Journal,* 8, 85- 91.
23. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP_2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 998-1009.
24. Singh, G. & Rai, V. K. (1981). Free proline accumulation and drought resistance in*Cicer arietinum* L. *Biologia Plantarum*, 23(2), 86-90.
25. Sumer, A., Duran, A. & Yenilmez, G. (2003). Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material

www.SID.ir

Archive of SID

of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 461a-461f.
26. Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3th ed). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
27. Thomas, H. (1990). Osmotic adjustment in *lolium perenne*: its heritability and the nature of solute accumulation , *Annals of Botany*, 66, 521-530.
28. Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*, 50, 571-599.
29. Wang, W. Vinocur, B. & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures. *Plantarum*, 218, 1-14.
30. Zhang, Y. Q., Liu, C. M., Shen, Y. J., Kondoh, A., Tang, C. Y. & Tanaka, T. (2002). Measurement of evapotranspiration in a winter wheat field. *Hydrological process*, 16, 2805-2817.

www.SID.ir