Plant Production and Genetics
Vol. 4, No. 2 Autumn & Winter 2023, p. 229-242
DOI: 10.22034/PLANT.2023.139618.1073

تولید و ژنتیک گیاهی
جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۲۴۲-۲۲۹
مقاله پژوهشی

بررسی صفات بیوشیمیایی و الگوی بیان برخی ژن‌های کاندید دخیل در تحمل به خشکی دو رقم گندم نان

سیما آبیار[۱]، سعید نواب پور[۲]، نفیسه مهدی‌نژاد [۳]

۱. دانش آموخته دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲ . استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳ . دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳

چکیده

کمبود آب و به دنبال آن تنش خشکی در گیاهان به عنوان یکی از اولین و مهم‌ترین عوامل اختلال در مکانیسم‌های سلولی، عامل تنش اکسیداتیو بوده و تهدید و محدودیت جدی برای محصولات کشاورزی می‌باشد. در این پژوهش ارزیابی صفات بیوشیمیایی (میزان اکسیداسیون سلولی و کلروفیلa و b) و میزان رونویسی ¬برخی ژن‌های آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) توسط Real time PCR تحت تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی زابل به صورت آزمایش اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک¬های کامل تصادفی با سه تکرار بر روی ارقام گندم انجام گرفت. فاکتور اصلی سطوح تنش خشکی شامل ۰/۳—بار (ظرفیت زراعی به‌عنوان تیمار شاهد)، ۲- بار و ۴- بار و فاکتور فرعی ارقام گندم (کلاته و احسان) بودند. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس صفات بیوشیمیایی نشان داد که اثر تنش خشکی برای این صفات و نیز تفاوت بین ارقام معنی‌دار بود. نتایج بررسی بیان ژن¬هایCAT، APX و GR در شرایط اعمال سطوح آبیاری، روند متفاوتی را در ارقام این پژوهش از خود نشان دادند و افزایش بیان همراه با افزایش سطوح تنش خشکی داشتند. این افزایش بیان در رقم کلاته به ترتیب با (۳/۴۵، ۱۰/۱ ، ۶/۲ برابر نسبت به شاهد) برای ژن هایCAT، APX، GR طی تنش ۴- بار بیشتر از رقم احسان بود. در این پژوهش رقم کلاته از نظر اکثر صفات بررسی شده در وضعیت مطلوب‌تری قرار داشت.

کلیدواژگان: گندم، تنش خشکی، بیان ژن، ژن‌های آنتی اکسیدان

*ایمیل نویسنده مسئول: s.navabpour@gau.ac.ir

مقدمه

گندم گیاهی از تیره غلات (Poaceae) وجنس تریتیکوم بوده و به‌دلیل داشتن ویژگی‌هایی همچون توانایی تولیدزیاددرواحدسطح،ذخیره آسان وپذیرش به‌عنوان غذا درذائقه مصرف‌کننده،تبدیل به یکی ازمهم‌ترین محصولات زراعی دنیا شده است، بهره وری گندم به‌دلیل تنش‌های غیرزنده مانند خشکسالی، شوری و گرما مختل می‌شود (Costa *et al*., 2011) تغییرات آب و هوا یکی از نگرانی‌های اصلی کشاورزی امروزهاست، از اثرات مهم تغییرات آب و هوا، افزایش دما و تغییر در بارندگی است که سبب خشک سالی سرتاسری در جهان شده است (Hui-Mean *et al*., 2018). پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که تغییرات آب و هوا بر تولیدات محصولات زراعی تأثیرات منفی گذاشته و بر اساس پیش‌بینی صورت گرفته، میزان این تأثیرات در سال‌های آتی بیشتر خواهد شد(Ramirez Cabral *et al*., 2017; Asseng *et al*., 2019; Khan *et al*., 2020; Pravalie *et al*., 2020). خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که رشد گیاهان را در مناطق خشک و نیمه خشک محدود ساخته است(Li *et al*.,2013). میانگین عملکرد بیش از ۵۰ درصد از محصولات گیاهی در اثر تنش خشکی کاهش می‌یابد(Zlatev and Lidon,2012). در شرایط آب و هوایی خشک و نیمه‌خشک، گندم معمولاً در طول فصل رشد در معرض دوره‌های تنش خشکی قرار می‌گیرد (Dhanda *et al*., 2004). بنابراین تحقیق در مورد توسعه ارقام گندم متحمل در برابر خشکسالیبه‌منظور گسترش دامنه رشد گندم به مناطق خشک یا نیمه‌خشک بسیار مهم است (Lobato *et al*., 2009). تحقیقات مختلف، تاثیر کمبود آب بر رشد گیاه، فیزیولوژی و تغییرات ژنتیکی و بیوشیمیایی را نشان داده است(Zamani *et al*., 2020). از جمله اثرات دیگر خشکی می‌توان به افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر اشاره کرد که ممکن است باعث پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب غشا شود. ROSها مانند رادیکال سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال هیدروسیل و پراکسید هیدروژن برای سیستم‌های زیستی مضر هستند،زیرا آن‌ها ماکرومولکول-هایی مانند لیپیدها و پروتئین‌ها را اکسید می‌کنند و رنگدانه‌های فتوسنتزی و همچنین فتوسنتز را کاهش می-دهند (Kavas *et al*., 2013). گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب ROSها، مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است (Agarwal *et al*., 2010). فعالیت آنزیم‌های انتی اکسیدان و کاهش میزان ROS موجب حفاظت گیاه در شرایط تنش می‌گردد (Talae Ahmad and Haddad, 2010). تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی توسط Halliwell (1982) گزارش شده است. کاتالاز آنزیمی می‌باشد که تقریباً در تمامی موجودات زنده یافت می‌شود و وظیفه آن تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌باشد و باعث از بین رفتن H_2O_2 اضافی در اندامک‌های موجودات هوازی می‌شود (Yang and Poovaiah, 2002). در سلول‌های جانوری عموماً یک ژن مسئول بیان کاتالاز است، در حالی‌که در گیاهان چندین ژن کوچک عهده‌دار بیان ژن هستند. در گیاهان سه نوع آنزیم کاتالاز به نام‌های CAT1، CAT2 و CAT3 در بیان ژن نقش دارند (Luna *et al*., 2004). آنزیم‌های CAT1 و CAT2 نقش مهمی در سازگاری گیاه در برابر تنش‌های محیطی دارند و آنزیم CAT1 برای تنظیم سیگنال‌های ROS از اهمیت بیش‌تری برخوردار است (Du *et al*., 2008). آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها است که در کلروپلاست به دو فرم آیزوزیمی، متصل به غشای تیلاکوئید و محلول در استروما، حضوردارد (Edreva, 2005). Kitijima و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که آسکوربات پراکسیداز متصل به غشای تیلاکوئیدی عامل اصلی تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو است. گلوتاتیون ردوکتاز ک فلاوآنزیم بوده و در تمام موجودات زنده یافت میشود. این آنزیم سبب احیا گلوتاتیون اکسید ۳ به گلوتاتیون احیا همراه با اکسیداسیون NADPH می‌شود که یکی از واکنش‌های مهم سیستم خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان محسوب می‌شود (Tsai *et al*., 2005؛ Begara-Morales *et al*., 2015) بر اساس مطالب بیان شده، این مطالعه به‌منظور ارزیابیصفات بیوشیمیایی و بیانسه ژن *CAT1*و*APX* و*GR* در مسیر القای تحمل به خشکی در ارقام جدید گندم انجام شد، زیرا بهبود تحمل به خشکی بهعنوان یک اولویت پژوهشی در اصلاح غلات در جهان مطرح است (Khadka *et al*., 2020).

مواد و روش‌ها

دراین آزمایش بذرارقام گندم مورد مطالعه پس ازضدعفونی درشرایط مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی زابل درپایان آذرماه ۱۳۹۹ کشت شدند. آزمایش به صورت اسپیلت پلات درقالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرارانجام شد. فاکتوراصلی تیمار تنش خشکی شامل ۰/۳– بار (ظرفیت زراعی به عنوان تیمارشاهد)، ۲- بار و ۴- بار که درشرایط مزرعه باکمک تانسیومترکه بطور مستمر از ابتدای کشت تاپایان فصل مستقر بود اعمالشد. کنترل سطح تیمار تنش خشکی درمرحله آبستنی (مرحله ۴۰ زادوکس) بطوردقیق انجام گرفت (Ahmadi *et al*., 2020). بدین منظور با نصب سقف متحرک از آبیاری ناخواسته درزمان بارندگی جلوگیری به عمل آمد. فاکتورفرعی شامل ارقام گندم کلاته واحسان بود. نمونه‌برداری برگ جهت ارزیابی بیان ژن-هادرزمان خمیری سخت مرحله ۸۷ مقیاس زادوکس صورت گرفت. حدودپنج گرم نمونه برگ درتیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها برداشت شد و درنیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA درفریزر منفی ۸۰ درجه-سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج‌شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cDNA با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز صورت گرفت و به‌وسیله آغازگرهای ژن خانه‌دار GAPDH با استفاده از PCR، cDNA سنتز شده آزمون گردید (Kazemi *et al*., 2010).

به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است استفاده شد. آغازگرهای موردنیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد. ازآنجایی‌که طول توالی محصولات بین ۱۳۲ و ۱۸۷ باز بود، دمای نقطه ذوب بین ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، با توجه به درصد GC و طول باندها انتخاب شد. بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از فرمول Pfaff (2001) محاسبه گردید.

$$Ratio = (E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)} \Big/ (E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}$$

در این معادله نسبت سطح بیان یک ژن هدف بر اساس راندمان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (E) برای ژن هدف و مرجع و تفاوت (Δ) نقطه تقاطع (CP) یک نمونه ناشناخته در مقابل کنترل (Δ CP control-sample) محاسبه می‌شود. ارزیابی میزان بیان ژن توسط نرم‌افزار Excel و REST انجام شد. در این آزمایش، نمونه‌ها را نسبت به یک ژن خانه‌دار که در اینجا GHAPDH بود و در تمام مراحل رشدی گیاه و تحت همه شرایط بیان یکسانی داشت می‌سنجند. رنگ مورد استفاده جهت ردیابی تکثیر نمونه سایبر گرین و کیت مورد استفاده، کیت سایبر بایو پارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) بود که با اتصال به محصولات سبب بررسی میزان تابش اشعه می‌شود. در پایان واکنش و پس از دریافت نمودارها، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت. (Moloudi *et al*., 2013).

درادامه برخی صفات مانندمیزان کلروفیلa وb وشاخص اکسیداسیون سلولی موردراندازه‌گیری قرارگرفت. برای استخراج کلروفیل ۰/۵ گرم از بافت برگ یخزده با ۱۰ میلی‌لیتراستون ۸۰ درصدمخلوط شده وبه مدت ۱۵ دقیقه باسرعت ۵۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفوژشد. سپس با استفاده ازدستگاه اسپکتروفوتومترWAP مدل UV/vis2000S، درطول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومترجذب محلول اندازه‌گیری شدومیزان کلروفیلa وb ازفرمول‌های زیرمحاسبه گردید (Porra *et al*., 1998):

$$Chl.\ a\ (mgml^{-1}) = 12.25A663.6 - 2.55A646.6 \quad [۱]$$

$$Chl.\ b\ (mgml^{-1}) = 20.31A646.6 - 4.91A663.6 \quad [۲]$$

برای اندازه‌گیری TBARM (شاخص اکسیداسیون سلولی) از روش هگگ و همکاران (Hageg *et al*., 1990) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک (15 w/v درصد) به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب کوچک حاصل از سانتریفوژ

با نیم میلی‌لیتر استون شستشو و پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار سه میلی‌لیتر اسید فسفریک (۱ درصد وزن به حجم) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیورتیک (w/v 6/0 درصد) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد. و مقدار جذب محلول حاصل را با طول‌موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری اندازه‌گیری گردید. تجزیه‌و تحلیل آماری داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسات میانگین به روش دانکن انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده ژن‌های *APX* و *GR* و *CAT1* در واکنش ReaL

Genes	Accession no.	Primer pairs 5'-3'	The length of the reaction product	Meltig Temperature (C°)
APX	AY513263.1	F: AAAGCGAAGCATCCAAAG R: CAGAGGGTCACGAGTCCA	124	59 61
GR	AY364467	F: GCACACGACCAAGCACATAT R:ATATCCGCCACCAAGAATAACG	55	59 60
CAT_1	E 16461	F:CCATCTGGCTCTCCTACTGG R:AGAACTTGGACGACGGCCCTGA	141	60 57.9
GAPDH	EF592180	F: TC'ACCACCGACTACATGACC R: ACAGCAACCTCCTTCTCACC	121	60 60

نتایج و بحث:

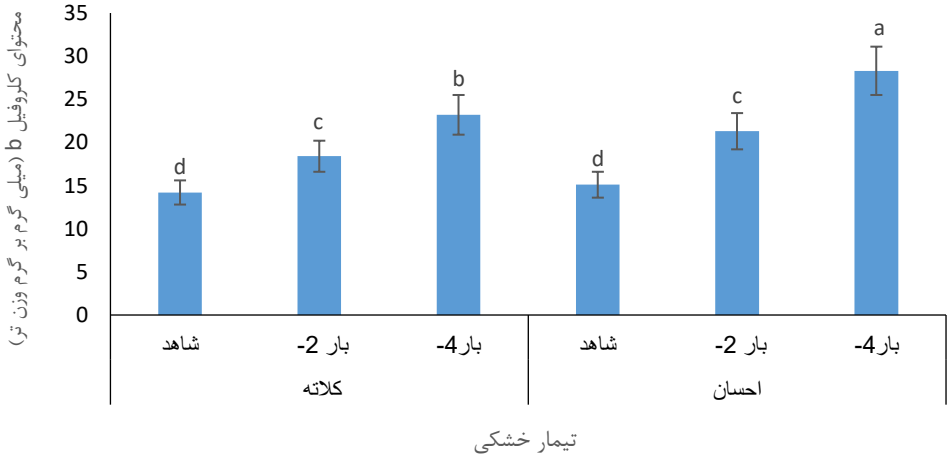
نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی (جدول۲) نشان داد اثر ژنوتیپ، تیمار تنش و اثر متقابل رقم در تنش بر روی تمامی صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

جدول۲- تجزیه واریانس برخی صفات بیوشیمیایی تحت تاثیر تنش خشکی و ارقام گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخص اکسیداسیون سلولی	کلروفیل a	کلروفیل b
بلوک	۲	۵۴^{ns}	۴۳/۱۹^{ns}	۱۲/۳^{ns}
تنش	۲	۶۳۴**	۱۴۸/۵**	۹۴/۰**
خطای اصلی	۴	۲۴	۷/۶	۶/۱
رقم	۱	۳۲۰/۰**	۵۲/۵**	۵۶/۷**
تنش × رقم	۲	۱۲۰/۰**	۴۱/۱**	۳۹/۳**
خطای فرعی	۶	۲۰/۴۶	۶/۸	۵/۶
ضریب تغییرات	-	۷/۹	۴/۳	۵/۱

ns و** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در ژنوتیپ نشان داد، در هر دو ژنوتیپ با افزایش تنش میزان شاخص اکسیداسیون سلولی افزیش یافت و رقم احسان با میزان شاخص اکسیداسیون سلولی ۲۸/۲ نانومول بر گرم بالاترین مقدار را داشت که در شرایط تنش ۴- بار مشاهده شد و اختلاف آن نیز با سایر تیمارها در سطح احتمال ۱درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. کمترین میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در رقم کلاته در شرایط عدم تنش (شاهد) مشاهده شد (۱۴/۲ نانومول بر گرم) ولی اختلاف آن با میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در رقم احسان (۱۵/۱ نانومول بر گرم)، در شرایط مشابه در سطح احتمال۱ درصد آزمون LSD معنی‌دار نگردید. غلظت Thiobarbioturic Acid Reactive Materia (TBARM) ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها دلالت بر ایجاد رادیکال‌های آزاد در بافت است. در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی آلدیید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه گیری می‌شود. اگرچه فرآیندهای تولید ROS در شرایط نرمال آهسته است، اما تنش سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود (kauret *et al.*, 2012). در شرایط تنش فرایندهای مخرب غشاء فعال شده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند. به‌عنوان‌مثال رادیکال‌های آزاد تنش اکسیداتیو حاصل از شرایط محیطی نامناسب باعث آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای‌چرب غشایی شده و رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدروکسی پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع‌کنند (Sandalio *et al.*, 2001).

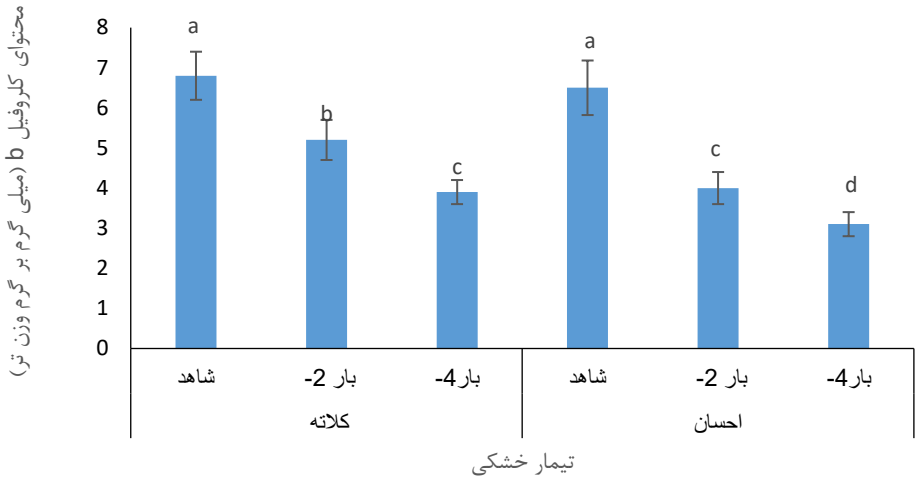


شکل۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در رقم بر روی میزان شاخص اکسیداسیون سلولی گندم
(میانگین‌هایی که با حروف یکسان نمایش داده شده‌اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال۱۵ درصد آزمون LSD ندارند).

مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در رقم برای محتوای کلروفیل a نشان داد (شکل ۲) برای دو ژنوتیپ با افزایش تنش مقدار کلروفیل a کاهش یافت و رقم احسان با محتوای کلروفیل a، ۳/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کمترین مقدار را داشت که در شرایط تنش ۴- بار مشاهده شد و اختلاف آن با سایر تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد آزمون LSD معنی‌دار شد. بالاترین میانگین محتوای کلروفیل a در تیمار شاهد در رقم کلاته مشاهده شد که برابر با ۶/۸ ۶ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود که اختلاف آن با سایر سطوح در سطح احتمال ۱درصد آزمون LSD معنی دار شد، ولی با تیمار شاهد در رقم احسان اختلاف معنی‌داری نشان نداد. کلروفیل رنگدانه‌ای است که مسئولیت اصلی آن دریافت انرژی نورانی برای استفاده در فتوسنتز می‌باشد، یکی از اثرات تنش‌های محیطی، ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو توسط گونه‌های فعال اکسیژن (پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال سوپراکسید) می‌باشد. تولید گونه-

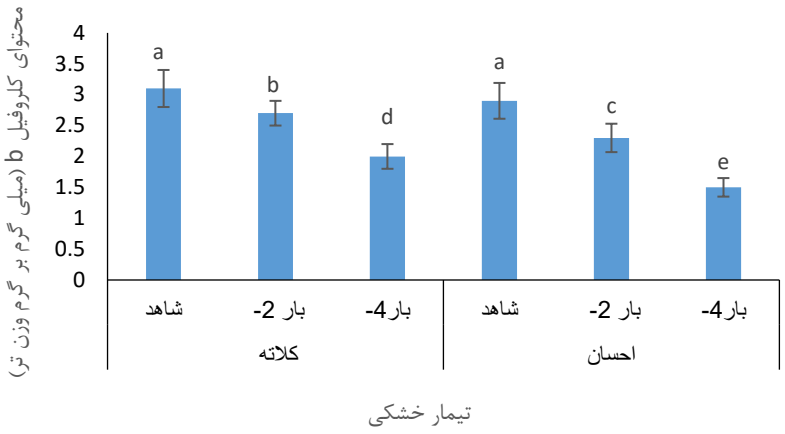
های اکسیژن فعال سبب تخریب کلروفیل به دلیل جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تخریب پروتئین‌ها می‌شود (Kovacik *et al*., 2014). کمبود آب موجب تغییر در محتوای کلروفیل می‌شود، Navabpour و Najafi (2023) در مطالعات خود نشان دادند که محتوای کلروفیل a و b در ژنوتیپ‌های مختلف گندم با افزایش شدت تنش خشکی کاهش می‌یابد.

کاهش مقدار کلروفیل در اثر تنش خشکی می‌تواند به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و در نمیجه پراکسیدتسیون لیپید-های غشا و تولیدرنگدانه‌های کروفیل باشد، همچنین تنش خشکی می‌تواند باعث افزایش آنزیم‌های کلروفیلاز و در نتیجه تجزیه کلروفیل شود (Bouchemal *et al*., 2017).



شکل۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در رقم بر روی محتوای کلروفیل a در گندم
(میانگین‌هایی که با حروف یکسان نمایش داده شده‌اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد آزمون LSD ندارند.)

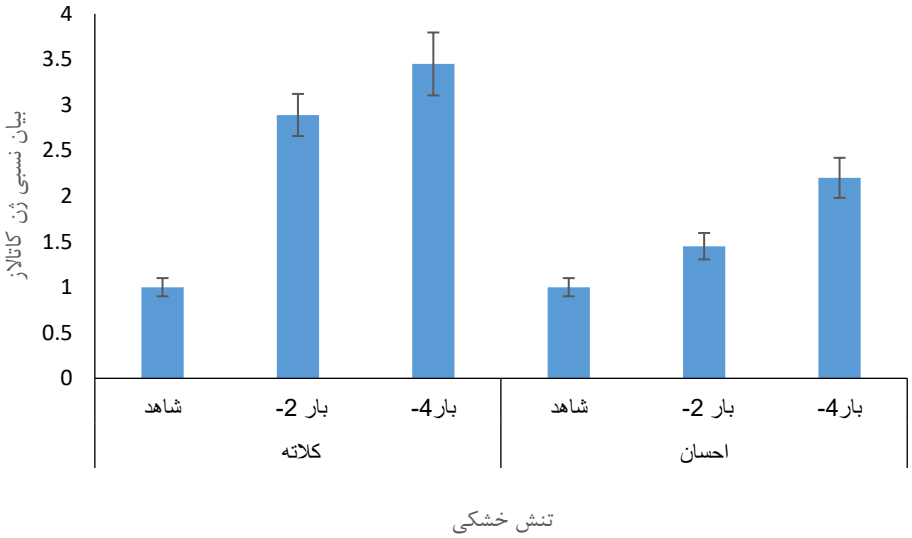
نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در رقم نشان داد (شکل۳) با افزایش تنش محتوای کلروفیل b کاهش یافت. بیشترین محتوای کلروفیل b، ۳/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود که در رقم کلاته و در تیمار شاهد (عدم کاربرد تنش) مشاهده شد ولی اختلاف آن با محتوای کلروفیل b در رقم احسان در تیمار شاهد در سطح احتمال ۱درصد آزمون LSD معنی‌دار نگردید. کمترین مقدار محتوای کلروفیل b برای دو رقم در تیمار ۴- بار مشاهده شد که رقم احسان با محتوای کلروفیل b، ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کمترین مقدار را دارا بود و اختلاف آن با ژنوتیپ‌های دیگر در سطح احتمال ۱ درصد آزمون LSD معنی‌دار گردید.میزان کلروفیل، یکی از فاکتورهای اصلی تأثیرگذار بر ظرفیت فتوسنتزی است. واکنش در بین گونه‌های مختلف گیاهی بسیار متفاوت است، به‌طوری که در شرایط تنش، میزان کلروفیل کاهش یا افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می-ماند که این تغییر، به میزان و مدت تنش بستگی دارد. تحت شرایط تنشخشکی، نگهداری کلروفیل برای فتوسنتز امری ضروری است.میزان کلروفیل در شرایط تنش کاهش می-یابد، ولی این کاهش در ژنوتیپ‌های متحمل گندم، کمتر از ژنوتیپ‌های حساس می‌باشد (Tas and Tas, 2007). بر اساس پژوهش‌هایی که توسط (Emadi *et al*., 2013) بر روی گندم انجام شد، مشخص شد که ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی، دارای میزان کاروتنوئید و کلروفیل بیشتری هستند که علت آن، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقایسه با ارقام حساس بیان نمودند. Lou و همکاران (۲۰۱۸) طی مطالعه‌ای که روی گندم داشتند به نتایج مشابهی رسیدند.



شکل۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در رقم بر میزان کلروفیل b در گندم

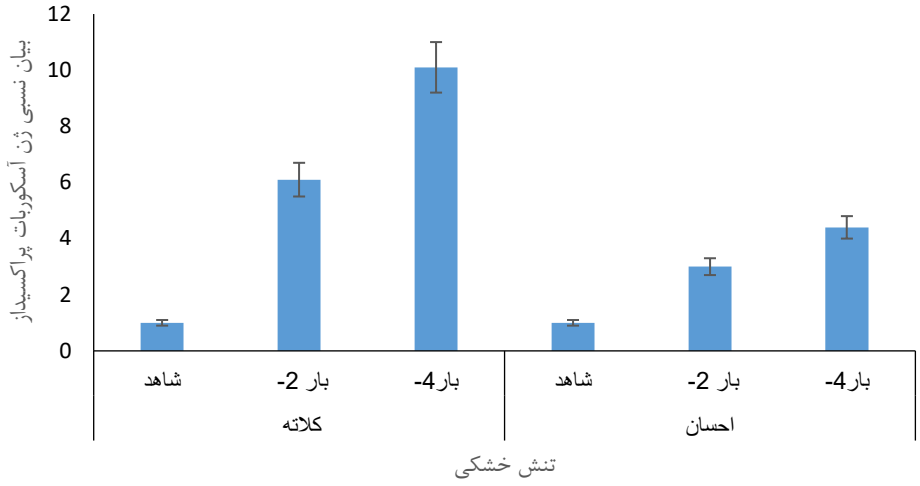
(میانگین‌هایی که با حروف یکسان نمایش داده شده‌اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد آزمون LSD ندارند).

بیان ژن CAT (شکل۴) تحت تأثیر تنش افزایش یافت و بیشترین مقدار بیان این ژن برای هر دو رقم گندم در تیمار تنش ۴- بار بود و در رقم کلاته بیشتر از رقم احسان بود، که بیان آن برابر ۳/۴۵ برابر نسبت به شرایط کنترل داشت. با اعمال خشکی به گیاه در حال رشد، فعالیت‌های آنزیمی سیستم آنتی‌اکسیدانی آن نیز دستخوش تغییر قرار می‌گیرد. این سیستم که وظیفه کلیدی در برابر دفع ROSها را بر عهده دارد، در رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش نیز مشارکت می‌کند افزایش فعالیت کاتالاز در گندم تحت تنش خشکی گزارش شده است و این افزایش خصوصاً در واریته‌های مقاوم بالاتر بوده است (Simonovicova *et al.*, 2010). تنش خشکی در ارقام گندم دوروم سبب افزایش بیان ژن کاتالازشده است (Hassanpour *et al.*, 2015). Movludi و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقات خود نتایج مشابهی را گزارش کردند.



شکل۴- تغییرات بیان ژن کاتالاز تحت تیمار سطوح مختلف تنش خشکی در دو رقم گندم

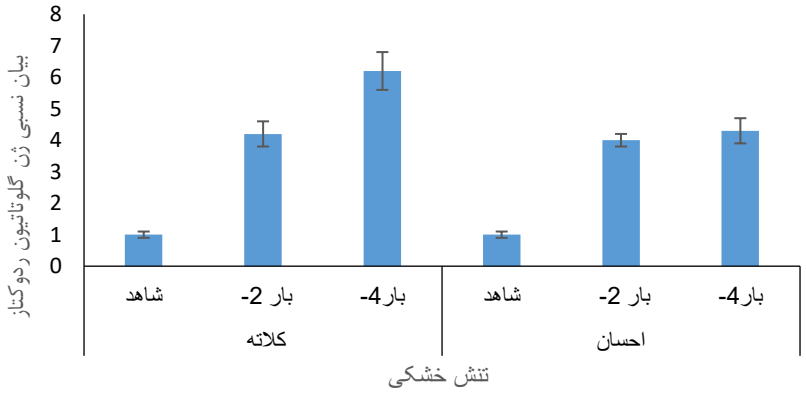
بررسی بیان ژنAPX تحت تنش خشکی نشان داد (شکل۵) که میزان بیان ژن در رقم کلاته بیشتر از احسان بود و بیشترین مقدار بیان ژن هم در رقم کلاته طی تنش۴- با ۱۰/۱ برابر نسبت به شاهد به دست آمد. در هر دو رقم با افزایش شدت تنش خشکی از ۲- بار به ۴- بار میزان بیان ژن افزایش یافت. آنزیم APX نقش کلیدی در سمزدایی H_2O_2 و حذف مالوندیآلدهید دارد و در نهایت سبب حفظ ثبات و پایداری دیواره سلولی می شود(Hojati *et al.*, 2011) APX با استفاده از آسکوربات بهعنوان دهنده الکترون، باعث تجزیه بیشتر پراکسید هیدروژن میشود و افزایش در فعالیت این آنزیم، باعث تجزیه بیشتر و مؤثرتر پراکسید هیدروژن میشود که در نتیجه مقاومت بیشتر نسبت به تنش اکسیداتیو را در پی خواهد داشت (Ozkur *et al.*, 2009). در پژوهشی که (Derogar *et al.*, 2019) بر روی گیاه گندم تحت تنش خشکی انجام دادند نشان داده شد که فعالیت آنزیمCAT با APX همبستگی منفی دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۵- تغییرات بیان ژن آسکوربات پراکسیداز تحت تیمار سطوح مختلف تنش خشکی در دو رقم گندم

بیان ژن GR تحت تنش خشکی با افزایش شدت تنش افزایش یافت و این افزایش بیان در رقم کلاته بیشتر از احسان بود. رقم کلاته با ۶/۲ برابر نسبت به شاهد طی تنش ۴- بار بیشترین مقدار بیان ژن طی تنش خشکی نشان داد. در رقم احسان طی تنش ۲- و ۴- بار بیان ژن GR تقریبا مشابه بود. آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) با حفظ ذخایر گلوتاتیون کاهش یافته (GSH) آسکوربات (AsA) و نسبت گلوتاتیون(GSH) به گلوتاتیون اکسید شده (GSSG)که در تعیین مقاومت گیاه به تنش های غیرزیستی و زیستی تعیینکنندهتر است، نقش مهمی ایفا می کند (Wang *et al.*, 2011). از دیگر فعالیتهای ژن گلوتاتیون نقش آن در القای فعالیت چرخه اسید گلی اکسیلیک در روند تبدیل اسیدهای چرب به قند و تولید انرژی سلولی است، همچنین فعالیت ژن گلوتاتیون پراکسیداز نقش بسیار مهمی در حفاظت غشا سلولی به ویژه در شرایط تنش دارد (Herbette *et al.*, 2002). با توجه بهنقش غشا سلولی در تبادل انتخابی مواد و یونها، مکانیزمهای حفاظتی و نقش گلوتاتیون در حفاظت غشا سلولی و جلوگیری از پراکسیداسیون چربیهای غشایی بسیار مهم میباشد (Jung *et al.*, 2002). Pour-Aboughadareh و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند، کمبود آب ناشی از استرس پلی اتیلن گلیکول به طور قابل توجهی فعالیت آنتی اکسیدانی

را در مجموعه‌ای از توده های گندم دوروم ایران افزایش دادکه با نتایج این مطالعه مشابه بود.



شکل۶- تغییرات بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز تحت تیمار سطوح مختلف تنش خشکی در دو رقم گندم

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه تاثیر تنش خشکی بر خصوصیات بیوشیمیایی و میزان بیان ژن‌های CAT1 و APX و GR در پاسخ به تنش خشکی در دو رقم گندم که سطح زیر کشت زیادی در شمال کشور دارند مورد بررسی قرار گرفت. سه تیمار آبیاری شامل ۰/۳- بار (به عنوان تیمار شاهد)، ۲- و ۴- بار و دو رقم گندم نان رایج شامل کلاته و احسان مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد تنش خشکی و نوع رقم به‌کار رفته نقش اساسی در تغییرات صفات بیوشیمیایی دارد. ازآنجایی‌که میزان کلروفیل به‌عنوان یکی از اولین شاخص‌هایی که تحت تأثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، کاهش آن با افزایش میزان تنش خشکی بیان‌گر افزایش شدت تنش است. همچنین ارزیابی مقدار سطح اکسیداسیون سلولی نیز شاخص مطلوبی جهت بررسی تنش اکسیداتیو بوده که مقدار آن نیز با افزایش میزان خشکی افزایش یافت. با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از جمله بیان ژن‌های کاتالاز و آسکوبات پراکسیداز وگلوتاتیون ردوکتاز نقش مهمی در راهکار دفاعی گیاه گندم در برابر تنش خشکی ایفا می‌کند. ارقام مورد استفاده نیز از نظر صفات مطالعه شده با یکدیگر متفاوت بودند و رقم کلاته از نظر اکثر صفات بررسی شده در وضعیت مطلوب‌تری قرار داشت. همانطور که انتظار می‌رفت سیستم دفاعی گیاه در برابر تنش خشکی، موسوم به سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط تیمارهای خشکی اعمال شده فعال شد و رقم‌های کلاته از نظر میزان بیان ژن در وضعیت قابل قبولی نسبت به رقم احسان داشت. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود رقم کلاته متحمل به تنش خشکی بوده که می‌توان پس از انجام سایر آزمایش‌های تکمیلی از آن‌ها در پروژه‌های اصلاحی بعدی به‌عنوان ارقام مطلوب در تحمل به تنش خشکی بهره برد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه زابل که در اجرا و به انجام رساندن این پژوهش مساعدت و همکاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

Ahmadi, G. H., Siosemarde, A., Sohrabi Y., Jalal kamali., & M. Reza. (2020). Evaluation of response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) lines to terminal drought stress. *Applied Research in Field Crops*, *33* (1), 23-43.

Talae Ahmad, S., & R. Haddad. (2010). The effect of silicon on the activity of antioxidant enzymes and the content of osmotic regulators in two genotypes of bread wheat under drought stress conditions. *Journal of Seedling and Seed Agriculture*, *2*, 201-225 (In persian).

Agarwal, P., Agarwal, P.K. Joshi, A.J. SoporyS.K., & Reddy, M.K. (2010). Over expression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress responsive genes. *Molecular Biology Reports*, *37*, 1125-1135.

Ahmad, P. C. A., Jeleel, C. A., Azooz, M. M., & Nabi, G. (2010). Generation of biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, *108*(3), 942-949.

Asseng, S., Martre, P., Maiorano, A., Rötter, R. P., O'Leary, G. J., Fitzgerald, G. J., & Ewert, F. (2019). Climate change impact and adaptation for wheat protein. *Global Change Biology*, *25*(1), 155-173.

Begara-Morales, J.C., Sanchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Perez, C., Valderrama, R., Padilla, M.N., Lopez-Jaramillo, J., Luque, F., Corpas, F.J., & Barroso, J.B. (2015). Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*, *66*(19), 5983-5996.

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

Costa, R.C.L, Lobato A.K.S, Silveira, J.A.G., & Laughinghouse, I.V. (2011). ABAmediatedproline synthesis in cowpea leaves exposed to waterdeficiency and rehydration.*Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *35*, 309-317.

Derogar, H., Fakheri, B., Mehdinezhad, N., & Mohammadi, R. (2019). Evaluation of some biochemical traits in cultivars and wild species of wheat under drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12(3), 685-696.

Dhanda, S.S., Sethi G.S., & Behl, R.K. (2004). Indices of drought tolerance inwheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal Agron Crop Science*, *190*, 6–12. doi:10.1111/j.1439-037X.2004.00592.x.

Du, YY., Wang, P.C., Chen, J., & Song, C.P. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(10): 1318–1326.

Edreva A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, *Ecosystems and Environment*, *106*, 119-133.

Emadi, N., Balouchi, H.R., & Jahan, B.S. (2012). Effect of drought stress and plant density on yield, yield components and some morphological characters of pinto bean (cv. CO S16) in Yasouj region. *Journal of Crop Production*, *5* (2), 1 -17.

Hassanpour-Lescokelaye, K., Ahmadi, J., Daneshyan, J., & Hatami, S. (2015). Changes in chlorophyll, protein and antioxidant enzymes on durum wheat under drought stress. *Journal of Crop Breeding*, *7*(15), 76-87. (In Persian).

Hagege, D., Nouvelot, A., Boucaud, J., & Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, *1*, 86-89.

Halliwell, B. (1982). The toxic effects of oxygen on plant tissue. In: Oberley, L.W. (ed.), Superoxide dismutase. CRC press Inc. Boca Raton. USA.

Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J.L., Drevet, J.R., & Roeckel Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from Lycopersicon esculentum and Helianthus annuus are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European journal of biochemistry*. *269*, 2414 – 2420.

Hui-Mean, F., Yusop, Z., & Yusof, F. (2018). Drought analysis and water resource availability using standardised precipitation evapotranspiration index. *Atmospheric Research*, *201*, 102-115.

Hojati, M., Modarres-Sanavy, A.M.M., Karimi, M., & Ghanati, F. (2011). Responses of growth and antioxidant systems in Carthamus tinctorius L. under water deficit stress. *Acta Physiologia Plantarum*, *33*, 105-112.

IPCC, A. (2013). Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 1535.

Kaur, G., Singh, H.P., Batish, D.R., & Kumar, R.K. (2012). Growth, photosynthetic activity and oxidative in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. *Journal of Environmental Biology*, *33*, 265-269.

Kavas, M., Baloğlu, M. C., Akca, O., Köse, F. S., & Gökçay, D. (2013). Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of Biology*, *37*(4), 491-498

Kazemi, G., Navabpour, S., & Ramezanpour, S.S. (2010). Evaluation of catalase gene expression and morphological traits in two wheat cultivar under salt stress. *Modern Genetic Journal*, *1*, 79-87. (In Persian)

Khadka, K., Earl, H. J., Raizada, M. N., & Navabi, A. (2020). A physio-morphological trait-based approach for breeding drought tolerant wheat. *Frontiers in plant science*, *11*, 715.

Khan, M.A., Tahir, A., Khurshid, N., Ahmed, M., & Boughanmi, H. (2020). Economic effects of climate change-induced loss of agricultural production by 2050: a case study of Pakistan. S*ustainability*, *12*(3), 1216.

Kitijima K, Mulkey S, Samaniego M., & Wright S. (2002). Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species. *American Journal of Botany*, *88*, 1925-1932.

Kovacik, J., Klejdus, B., Babula, P., & Jarosova, M. (2014). Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient barely plants. *Journal of Plant Physiology*, *171*, 260-268.

Li, Z., Peng, Y., & Ma, X. (2013). Different response on drought tolerance and postdrought recovery between the small-leafed and the large leafed white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*, 213-222.

Lobato, A.K.S, Luz, L.M, Costa Santos, R.C.L, Filho, B.G, Meirelles, A.C.S, OliveiraNeto, C.F, Laughinghouse, H.D, Neto, M.A.M, Alves, G.A.R, Lopes,M.J.S., & Neves, H.K.B. (2009). Si exercises influence on nitrogen components inpepper subjected to water deficit. *Res Journal Biolog Science*, *4*,1048–1055.

Lou, L., Li, X., Chen, J., Li, Y., Tang, Y., & Lv J. (2018). Photosynthetic and ascorbate-glutathione metabolism in the flag leaves as compared to spikes under drought stress of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS One*, *13*(3), 1-18.

Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., & Foyer, C. H. (2004). Drought controls on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Jornal of Expermental Botany*, *56*, 417- 423.

Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S.S., & Sadeghipour, H. (2013). Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *1*(2), 58-64.

Movludi, A., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Davari, M., & Parmoon, G.H. (2014). The effect of water deficit and nitrogen on the antioxidant enzymes activity and quantum yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Notulae Botanicae Hortical Agrobotanici Cluj-Napoca*, *42*, 398-404.

Navabpour,S., & Najafi,H. (2023). Evaluation of some biochemical traits and expression of two genes from the MYB family in two wheat cultivars under drought stress. *Plant genetic research*, *9*(2),10-22.

Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M. Turkan, I. (2009). Physiochemical and antioxidant responses of the perennial Xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany*, *66*, 487- 492.

Pfaff, C. L., Parra, E. J., Bonilla, C. A. R. O. L. I. N. A., Hiester, K., McKeigue, P. M., Kamboh, M. I., & Shriver, M. D. (2001). Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(1), 198-207.

Pour-Aboughadareh, A.; Etminan, A.; Abdelrahman, M.; Siddique, K.; & Tran, L.S.P. (2020). Assessment of biochemical and physiological parameters of durum wheat genotypes at the seedling stage duting polyethylene glycol-induced water stress. *Plant Growth Regulation*, *92*, 81-93.

Porra, R.J., Thompson, W.A., & Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, *975*, 384-394.

Pravalie, R., Sîrodoev, I., Patriche, C., Roșca, B., Piticar, A., Bandoc, G., & Iordache, Ș. 2020. The impact of climate change on agricultural productivity in Romania. A country-scale assessment based on the relationship between climatic water balance and maize yields in recent decades. *Agricultural Systems*, *179*, 102767.

Ramirez-Cabral, N.Y., Kumar, L., & Shabani, F. (2017). Global alterations in areas of suitability for maize production from climate change and using a mechanistic species distribution model (CLIMEX). *Scientific Reports*, *7*(1), 1-13.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., & Del Rio, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, *52*(364), 2115-2126.

Simonovicova, A., Barteková, J., Janovová, Ľ., & Luptáková, A. (2010). Behaviour of Fe, Mg and Ca in acid mine drainage and experimental solutions in the presence of Aspergillus niger species isolated from various environment. *Nova Biotechnologica et Chimica*, *10*, 63-69.

Tas, S., & Tas, B. (2007). Some physiological responses of drought stress in wheat genotypes with different ploidity in Turkiye. *World Journal of Agricultural Sciences*, *3*(2), 178-183.

Tsai, Y-C., Hong, C-Y., Liu, L-F., & Kao, C.H. (2005). Expression of ascorbate peroxidase glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H2O2. *Journal of plant physiology*, *162*, 291- 299

Wang, Y., & Frei, M. (2011). Agriculture, Ecosystems and Environment Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *141*, 271–286.

Yang, T., & Poovaiah, B.W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 99, 4097-4102.

Zamani, S., Naderi, M. R., Soleymani, A., & Nasiri, B. M. (2020). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) biochemical properties and seed components affected by potassium fertilization under drought conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*, 110017.

Zlatev, Z., & Lidon, F.C. (2012). An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *24*, 57-72.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol.4 , No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 229-242 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۲۴۲-۲۲۹**

Research Article DOI: 10.22034/PLANT.2023.139618.1073

Investigating biochemical traits and expression of some candidate genes involved in drought tolerance in two varieties of bread wheat

Sima Abyar[1], Saied Navabpour[2], Nafiseh Mahdinezha[3]

1. Ph.D. graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Resources, Gorgan, Iran
2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 23-08-2023

Accepted: 04-12-2023

Abstract

Water deficit, followed by drought stress in plants, is one of the first and most important causes of disruption in cellular mechanisms, oxidative stress, and is a serious threat and limitation for agricultural products. In this research, evaluation of biochemical traits (cellular oxidation rate and chlorophyll a and b) and the transcription rate of some antioxidant genes including catalase (*CAT*), ascorbate peroxidase (*APX*) and glutathione reductase (*GR*) evaluated by real time PCR under the influence of different levels Drought stress was conducted in the research farm of Zabol Agricultural College in the form of a split plot experiment in the form of a block design with three replications on wheat cultivars (Kalate and Ehsan). The first factor of cultivars and the second factor of irrigation levels included 0.3 times (crop capacity as a control treatment), 2 times and 4 times. The results of variance analysis of biochemical traits showed that the effect of drought stress was significant for these traits as well as the difference between cultivars. The results of examining the expression of *CAT*, *APX* and *GR* genes in the conditions of applying irrigation levels showed a different trend in the cultivars of this research and they had an increase in expression along with an increase in drought stress levels, and this increase in expression in Kalate variety was 3.45, respectively, 10.10, 6.2 times compared to control) for *CAT*, *APX*, *GR* genes during stress was -4 times more than Ehsan variety. In this research, Kalate cultivar was in a more favorable condition in terms of most of the investigated traits.

Keywords: Wheat, drought stress, gene expression, antioxidant gene

Citation: Abyar,S., Navabpour, F., & Mahdinezha, N. (2023 Investigating biochemical traits and expression of some candidate genes involved in drought tolerance in two varieties of bread wheat. *Plant Production and Genetics*, 4(2), 229-242. https://doi.org/10.22034/PLANT.2023.139618.1073.

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Corresponding Author Email: s.navabpour@gau.ac.ir