

ORIGINAL ARTICLE

Drought stress effect on agricultural traits and expression of genes encoding transcription factors *DREB2A* and *ZFP252* in rice

Alireza Tarang*

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Correspondence

Alireza Tarang
Email: a_tarang@hotmail.com

How to cite

Tarang, A. (2023). Drought stress effect on agricultural traits and expression of genes encoding transcription factors *DREB2A* and *ZFP252* in rice. *Crop Biotechnology*, 13(43), 65-76.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is very sensitive to drought stress because of its limited adaptation to water-deficit conditions. Drought stress alters morphological, physiological, biochemical, and molecular responses in plant. In this study, the effects of drought stress on morphological traits and expression of transcription factor genes *DREB2A* and *ZFP252* at vegetative and reproductive stages were investigated in TH1 line (drought sensitive) and Neda (drought tolerant). Drought stress was induced by stopping irrigation at tillering and heading stages. Investigation of morphological traits showed tiller and panicle numbers as production indices were significantly higher in Neda cultivar than TH1 line. Real Time PCR Neda genotype showed a significant increase (3.217 expression ratio) in expression of transcript level of *ZFP252* at vegetative stage under drought stress. This indicates the importance of this drought stress responsive gene in acquisition of drought tolerance in this genotype at this stage. Investigation of expression level changes in TH1 line showed significant increase in *DREB2A* and *ZFP252* genes expression under drought stress at the vegetative stage. Gene expression analysis in this study suggesting that tolerant and sensitive plants may be using genetic regulations and different mechanisms to be exposed to stress conditions. Deciphering of these molecular mechanisms will aid to better understand stress tolerance and to select strategies for improving crop productivity facing climate change.

KEYWORDS

Rice, Gene expression, Drought, Transcription factors.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات زراعی و بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی *ZFP252* و *DREB2A* در برنج

علیرضا ترن^{*۱}

چکیده

برنج (*Oryza sativa*) به دلیل سازگاری محدود با شرایط کم آبی، به تنش خشکی بسیار حساس است. تنش خشکی پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی را در این گیاه تغییر می‌دهد. در این تحقیق تاثیر تنش خشکی در مراحل رویشی و زایشی بر صفات مورفولوژیک و بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی *DREB2A* و *ZFP252* در لاین برنج TH1 (حساس به خشکی) و رقم ندا (متحمل به خشکی) مورد بررسی قرار گرفت. تنش خشکی از طریق توقف آبیاری در مراحل پنجه‌زنی و خوشه‌دهی اعمال شد. نتایج بررسی صفات مورفولوژیکی نشان داد تعداد پنجه و تعداد خوشه به عنوان شاخصی برای تولید در رقم ندا به طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 بود. Real Time PCR نشان داد در رقم ندا تنش خشکی در مرحله رویشی باعث افزایش بیان ژن *ZFP252* (به نسبت ۳/۲۱۷ برابر) شد. این امر نشان دهنده اهمیت این ژن پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در این ژنوتیپ در این مرحله رشدی می‌باشد. بررسی تغییرات میزان بیان ژن‌های *DREB2A* و *ZFP252* در لاین TH1 حاکی از افزایش معنی‌دار بیان این دو ژن در نتیجه وقوع تنش خشکی در مرحله رویشی بود. آنالیز بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی در این مطالعه بیانگر آن بود که گیاهان متحمل و حساس ممکن است از تنظیمات ژنتیکی و مکانیسم‌های متفاوتی در مواجهه با شرایط تنش استفاده کنند. رمزگشایی از این مکانیسم‌های مولکولی به درک بهتر تحمل به تنش و انتخاب استراتژی‌هایی برای بهبود بهره‌وری محصول در مواجهه با تغییرات آب و هوایی کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی

برنج، بیان ژن، خشکی، فاکتورهای رونویسی.

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

نویسنده مسئول:

علیرضا ترنگ

رایانامه: a_tarang@hotmail.com

استناد به این مقاله:

ترنگ، علیرضا (۱۴۰۲). بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات زراعی و بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی *ZFP252* و *DREB2A* در برنج. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۳)، ۶۵-۷۶.

مقدمه

ژن‌ها را تسهیل کرده است (هادیارتو و تران، ۲۰۱۱). این امید وجود دارد که فناوری تراریخته بتواند تحمل به تنش را با وارد کردن ژن‌های خارجی جدید یا تغییر سطح بیان ژن‌های داخلی بهبود بخشد (یاماگوچی و بلوموالد، ۲۰۰۵). یکی از ژن‌های کاندید امیدوارکننده مورد استفاده در مهندسی تحمل به خشکی فاکتور رونویسی DREB2A می‌باشد (ساندیا، تالاکایالا و راوولا، ۲۰۲۱). فاکتورهای رونویسی DREB2A در مکانیسم‌های تنظیمی که در برخی گیاهان در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و گرمایی وجود دارد، دخیل هستند (میزوئی، شینوزاکی و شینوزاکی، ۲۰۱۲). بر طبق اظهارات هراواتی، آلنوپری و مصدر (۲۰۲۱) ژن‌های DREB2A تحمل به خشکی در بوته‌های برنج را کنترل می‌کنند. لی و همکاران (لی، ژانگ و یانگ، ۲۰۲۱) نیز اظهار داشتند ZFP252 یک تنظیم کننده رونویسی است که بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و تجمع حفاظت کننده‌های اسمزی را از طریق مسیر وابسته به ABA در راستای ایجاد تحمل به تنش‌های خشکی و اکسیداتیو در برنج تنظیم می‌کند. گزارشات متعددی در راستای تغییرات در میزان بیان این ژن در شرایط تنش خشکی وجود دارد، از آن جمله اکبرپور، خاوری‌نژاد و مومنی (۲۰۱۶) اظهار داشتند تنش خشکی سبب تغییر چندان در میزان بیان این ژن در رقم متحمل به خشکی برنج در مقایسه با شرایط نرمال آبیاری نمی‌گردد. فاکتورهای رونویسی ابزارهای قدرتمندی برای مهندسی ژنتیک هستند، زیرا فوق تظاهر یک فاکتور رونویسی می‌تواند منجر به افزایش بیان کل مجموعه ژن‌های تحت کنترل آن‌ها شود (دوبوزت، ساکوما و ایتو، ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت فاکتورهای رونویسی در واکنش گیاه برنج به خشکی، بررسی میزان تغییر در بیان ژن‌های کد کننده‌ی این فاکتورها در مواجهه با خشکی می‌تواند در افزایش درک ما از نقش و عملکرد این فاکتورها در ارقام بومی جهت استفاده از آن‌ها برای اصلاح واریته‌های برنج مقاوم و یا متحمل به تنش خشکی مفید باشد.

مواد و روش‌ها

رشد گیاه و شرایط تنش خشکی

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۹ در گلخانه‌ی پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری رشت اجرا شد. بذور یک رقم برنج ایرانی ندا (متحمل به خشکی) (اکبرپور، خاوری‌نژاد و مومنی، ۲۰۱۶؛ ملازاده، ترنگ و زارع، ۲۰۱۶) و لاین TH1 (لاین حاصل از خالص‌سازی توده برنج رقم هاشمی حساس به خشکی) پس از تهیه از مؤسسه تحقیقات برنج کشور، به منظور جوانه‌زنی در

کشاورزی در قرن بیست و یکم با چالشی جدی برای دستیابی به افزایش حدوداً ۷۰ درصدی در بهره‌وری محصولات تا سال ۲۰۵۰ مواجه است (جوشی، کاران و سینگلاپاریک، ۲۰۱۶؛ وانگ، لی و مائو، ۲۰۱۶) در میان عوامل غیرزیستی مختلف که تولید محصولات زراعی را در سطح جهان به چالش می‌کشند، تنش خشکی به طور فزاینده‌ای نقش مهمی ایفا می‌کند. با افزایش فراوانی تغییرات اقلیمی جهانی، وقوع خشکی در دنیا تا پایان این قرن بیش از ۲۰ درصد افزایش خواهد یافت (سینگ و لاکسمی، ۲۰۱۵). برنج (*Oryza sativa*)، غله‌ی مقرون به صرفه شناخته شده در جهان، به عنوان یک گیاه semiaquatic، قادر است در خاک‌های غرقاب به خوبی رشد کند (ژائو و تونگ و ایزنگا، ۲۰۱۱). با این حال، این گیاه به دلیل سیستم ریشه‌ای کوچک، موم نازک کوتیکولی و بسته شدن سریع روزنه‌ها یکی از گیاهان حساس به خشکی محسوب می‌شود (جی، وانگ و سان، ۲۰۱۲). خشکی به طور قابل توجهی رشد و نمو را در نتیجه کاهش رشد ریشه مختل نموده، تعداد پنجه‌ها (اشفق، هایدن و خان، ۲۰۱۴)، ارتفاع بوته (سوکوتو و موحد، ۲۰۱۴) و ظرفیت فتوسنتزی را کاهش می‌دهد، منجر به آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست‌ها، محدود کردن واکنش‌های متابولیک و کاهش تجمع و تقسیم ماده خشک می‌شود (فاروق، وحید و لی، ۲۰۰۹). همچنین تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) در بخش‌های مختلف سلولی، مانند میتوکندری، پراکسی‌زوم‌ها و کلروپلاست‌ها، نتیجه اجتناب‌ناپذیر کمبود آب است (هانسن، گو و جونز، ۲۰۰۶). هنگامی که گیاهان برنج در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، با فعال کردن مجموعه‌ای از مکانیسم‌های تنظیمی پیچیده به آن پاسخ می‌دهند (فوکائو و گزیونگ، ۲۰۱۳). به عبارت دیگر مقاومت به خشکی در برنج یک ویژگی پیچیده است که توسط پلی ژن‌ها یا کمپلکس‌های ژنی تنظیم می‌شود. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی برای درک مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در محصولاتمانند برنج از اهمیت بالایی برخوردار است. این ژن‌های کاندید می‌توانند در توسعه‌ی سیستم‌های MAS^۱ برای تحمل به خشکی در برنامه‌های اصلاح مولکولی استفاده شوند (ندیم، ناواز و شهید، ۲۰۱۸). پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، جداسازی و شناسایی تعداد فزاینده‌ای از این

دقیقه در درجه حرارت اتاق با DNase تیمار شدند. سپس رشته‌ی اول cDNA مطابق با دستورالعمل موجود در کیت مورد استفاده برای سنتز cDNA (Thermo Scientific) سنتز شد. در اولین مرحله از ساخت cDNA ابتدا غلظت‌های نمونه‌های RNA همسان‌سازی شد و دو میکروگرم در میکرولیتر در واکنش RT-PCR قرار داده شد. این کار به منظور در اختیار گرفتن احتمال مساوی برای تمام نمونه‌های RNA با غلظت‌های مختلف برای ساخت cDNA انجام شد. حجم نهایی مخلوط پایه ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵X، ۱۱/۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز موجود در کیت، ۱/۲۵ میکرولیتر RiboLock RT (۲۰ واحد در میکرولیتر) به عنوان ممانعت کننده یا بازدارنده RNase، ۱/۲۵ میکرولیتر آغازگر هگزامر تصادفی (۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۱/۲۵ میکرولیتر RevertAid آنزیم Reverse Transcriptase از نوع M-MuLV (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) بود. کیفیت همه‌ی نمونه‌های cDNA با همه‌ی جفت آغازگرها و فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ تست شد.

طراحی آغازگر

با توجه به عملکرد ژن‌های کد کننده برخی از فاکتورهای رونویسی درگیر در تحمل به تنش خشکی، توالی ژن‌های ZFP252، DREB2A از پایگاه داده‌ی NCBI به دست آمد. سپس با استفاده از نرم افزار آنالاین Primer3 آغازگرهای اختصاصی برای این ژن‌ها طراحی شد (جدول ۱). توالی آغازگرهای طراحی شده با استفاده از بلاست مورد بررسی قرار گرفت تا از اختصاصی بودن محل اتصال آن‌ها اطمینان حاصل شود. ژن 18S rRNA (لیو، کاپور و دوان، ۲۰۱۲) به عنوان ژن مرجع (یا ژن خانه‌دار) به منظور نرمال سازی داده‌های PCR کمی مورد استفاده قرار گرفت. سپس بیان این ژن‌ها در شرایط تنش و شرایط طبیعی در دو رقم برنج مذکور، مورد بررسی قرار گرفت.

جعبه‌های مخصوص کشت داده شدند. نشاها در مرحله‌ی ۲ الی ۳ برگی به گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۲۵×۲۵ به تعداد ۳ بوته در هر گلدان منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل رقم در دو سطح (رقم ندا و لاین TH1)، تنش در سه سطح (بدون تنش، تنش در مرحله رویشی و زایشی) بود. جهت اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی، در مرحله‌ی آغاز پنجه‌زنی آبیاری به مدت ۲۰ روز، قطع شد. بوته‌های شاهد به طور معمول آبیاری شدند. در مرحله زایشی پس از مشاهده‌ی مرحله آبستنی و در سن ۸۰ روزگی برای لاین TH1 و در سن ۹۰ روزگی برای رقم ندا (به دلیل داشتن مرحله رویشی بلندتر) به مدت ۱۸ روز جهت اعمال تنش خشکی اقدام به قطع آبیاری گلدان‌ها شد. در هر دو مرحله رویشی و زایشی پس از اعمال تنش خشکی و با مشاهده علایم تنش از قبیل لول شدن برگ‌ها، خشک شدن و ترک برداشتن خاک گلدان‌ها نمونه‌برداری از برگ‌ها انجام شد. برگ‌ها تا زمان استخراج RNA در ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. همچنین صفات مورفولوژیک شامل تعداد پنجه در هر کپه، تعداد خوشه در بوته، ارتفاع بوته، وزن خوشه در بوته، طول و عرض برگ پرچم، مساحت برگ پرچم، وزن تر و وزن خشک بوته، در ارقام حساس و متحمل به خشکی در شرایط تنش و شرایط نرمال آبیاری مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. وزن تر و خشک نیز پس از رسیدن کامل بوته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل با استفاده از معرف ترایزول (اینویترژن) از نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تحت تنش در مراحل رشدی رویشی و زایشی استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ (NanoDrop2000) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی احتمالی با DNA ژنومی نمونه‌های RNA، از آنزیم DNase I استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها به مدت ۱۵

جدول ۱. مشخصات و توالی آغازگرها

شماره دسترسی	نام ژن	دمای اتصال (°C)	طول محصول PCR (جفت باز)	نوع آغازگر	توالی آغازگر
AP014957.1	DREB2A	۶۱	۱۴۷	F	ACCTCATTGGGTCAGGAAGAAG
				R	TTCTTGGACCCCTTGGCTG
AP014968.1	ZFP252	۶۶	۱۶۰	F	AGGTGGTGGTGGAGACGAAA
				R	TCGTAGTGGCATCGCTTGTG
AK059783	18S rRNA	۶۱	۲۰۰	F	ATGGTGGTGACGGGTGAC
				R	CAGACACTAAAGCGCCCGTA

آنالیز بیان ژن با استفاده از Real Time PCR

واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR (iCycler IQ5 real-time PCR, Bio-Rad) و با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی، در راستای مشخص کردن میزان بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی مورد بررسی انجام شد. شرایط دمایی اتصال آغازگرها و محتویات مخلوط پایه توسط PCR متداول قبل از انجام واکنش Real Time PCR بهینه‌سازی شد. جهت حصول دمای اتصال مناسب از گرادیان دمایی ۵۰ الی ۶۴ درجه سانتیگراد در شرایط PCR گرادیانت استفاده شد. کیت مورد استفاده (Thermo scientific maxima SYBR Green/ ROX qPCR master mix) حاوی سه تیوب ۱/۲۵ میلی‌لیتری از مخلوط پایه واکنش و آب عاری از نوکلئاز بود که این مخلوط پایه واکنش دارای تمامی اجزای مورد نیاز برای انجام واکنش بود. جهت بدست آوردن کارایی تکثیر و همچنین تعیین غلظت مناسب برای رقیق‌سازی نمونه‌های cDNA جهت استفاده در واکنش نهایی، برای تمام ژن‌ها منحنی استاندارد ترسیم شد. هر واکنش در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط پایه‌ی سایبرگرین، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله‌ی واسرشت سازی اولیه ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. تعیین کمیت به وسیله افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبر گرین به DNA دو رشته‌ای در انتهای هر سیکل انجام گرفت. در انتهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، عمل گسستن رشته‌های DNA و ایجاد منحنی ذوب به وسیله حرارت دادن آهسته نمونه‌ها از ۵۴ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ثبت مستمر کاهش در فلورسنس در نتیجه افتراق دو رشته DNA انجام شد. برای هر یک از نمونه‌ها، چرخه آستانه (Ct) که در آن افزایش فلورسنس ثبت شده در حد بالاتر از خط پایه برای اولین بار قابل تشخیص می‌گردد، تعیین شد (نویدشاد، سالکده و رویان، ۲۰۱۵).

آنالیزهای آماری

به منظور تعیین بیان نسبی از نرم افزار REST که آنالیز داده‌ها را با استفاده از مدل فافل انجام می‌دهد، استفاده شد. مدل ریاضی فافل کمیت نسبی یک ژن هدف را در مقایسه با ژن مرجع تعیین می‌کند. از مزایای استفاده از این مدل استفاده از کارایی تکثیر بدست آمده از منحنی‌های استاندارد برای تک تک ژن‌ها و محاسبه از طریق رابطه زیر می‌باشد (فافل، هورگان و دمپله، ۲۰۰۲).

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}} \quad (1) \text{ معادله}$$

که در آن، Etarget کارایی تکثیر ژن هدف، Eref کارایی تکثیر ژن مرجع و ΔCPtarget و ΔCPref از طریق کم کردن Ct نمونه شاهد از Ct نمونه تنش یافته به دست می‌آیند. محاسبه کارایی تکثیر از طریق فرمول زیر انجام می‌شود.

$$E = 10^{\left[-\frac{1}{slope}\right]} \quad (2) \text{ معادله}$$

که در آن slope از منحنی‌های استاندارد حاصل می‌شود. محاسبات و تجزیه‌های آماری داده‌های مورفولوژیک با استفاده از نرم افزارهای SAS نسخه ۹.۱ (SAS Institute, 2002) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

صفات زراعی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین رقم ندا و لاین TH1 از نظر تمام صفات مورد بررسی بجز طول برگ پرچم و وزن تر اختلاف معنی‌داری وجود داشت. صفت ارتفاع بوته به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت. این نتایج با اظهارات عبدالله و همکاران (عبدالله، پاوار و کاله، ۲۰۱۵) مبنی بر کاهش ارتفاع بوته در گیاهان زراعی با افزایش شدت و مدت تنش خشکی مطابقت دارد. کاهش در ارتفاع بوته به دلیل کاهش طول سلول ناشی از کمبود آب است که باعث کاهش تورگور سلولی می‌شود (یوپادهییا و پاندا، ۲۰۱۹). اثر متقابل رقم در تنش خشکی نیز برای صفات وزن تر، وزن خشک، وزن خوشه، طول برگ پرچم و مساحت برگ پرچم معنی‌دار شد (جدول ۲). کاهش معنی‌دار القا شده توسط تنش خشکی در مساحت سطح برگ، ارتفاع بوته و بیوماس در کولتیوارهای برنج توسط کادام و همکاران (کادم، تامیلسلوان و لاواس، ۲۰۱۷) به اثبات رسیده است. تنش خشکی بر میتوز، طول

غیرزیستی با کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش تولید بیوماس تر و خشک، گیاهان زراعی را متأثر می‌سازد.

شدن و گسترش سلولی اثر گذاشته و در نهایت منجر به کاهش صفات مرتبط با رشد و عملکرد می‌شود. همچنین این تنش

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات زراعی در رقم ندا و لاین TH1 تحت تنش خشکی در مراحل رویشی و زایشی

میانگین مربعات

وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	وزن خوشه	تعداد خوشه	تعداد پنجه	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	درجه آزادی	منابع تغییر
۱۵۶/۸۷**	۲۸۷/۰۳ ^{ns}	۱۱۲/۱۳**	۰/۶۲**	۲۱/۲۳ ^{ns}	۲۰۲/۹۸**	۱۵/۸۹*	۱۹/۱۲**	۸۶/۸۱**	۱	رقم
۸۲/۵۵ ^{ns}	۱۰۶۸/۴۷**	۳۹۵/۵۷**	۰/۰۰۵ ^{ns}	۵۸۹/۸۷**	۱۷/۹۲ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۱۰/۶۱*	۶۸/۹۴*	۲	تنش خشکی
۱۷۱/۲۸*	۷۵۷/۳۵*	۳۵/۱۸*	۰/۰۰۰ ^{ns}	۷۳/۹۵**	۱۴۸/۲۳**	۰/۰۷ ^{ns}	۰/۵۲ ^{ns}	۴۳/۸۷ ^{ns}	۲	رقم × تنش خشکی
۲۸/۵۷	۲۰۸/۵۴	۷/۰۱	۱/۰۱	۹/۱۹	۹/۸۹	۱/۹۸	۱/۷۶	۴۲/۱۵	۱۲	خطا
۱۰/۲۷	۸/۵۲	۹/۸۵	۴/۹۲	۱۰/۸۱	۱۱/۷۱	۸/۷۹	۱۳/۸	۸/۴۶		ضریب تغییرات (%)

^{ns}: غیرمعنی‌دار، *^{*}: معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، **^{**}: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

کاهش سطح برگ در محصولات زراعی خود را نشان می‌دهد. بنابراین، اثرات منفی کمبود آب بر تغذیه‌ی معدنی و متابولیسم باعث کاهش سطح برگ می‌شود (زاین، اسماعیل و محمود، ۲۰۱۴). کاهش سطح برگ، رول شدن برگ، پژمردگی، پیری زودرس و بسته شدن روزنه‌ها نیز از دیگر صفات مورفولوژیکی مرتبط با تنش خشکی هستند که در نهایت منجر به کاهش در عملکرد می‌شوند (پاندا، میشا و بهاراء، ۲۰۲۱). وزن تر نیز در شرایط تنش خشکی (۶۵/۸۴ گرم) در مقایسه با شرایط نرمال (۸۵/۱۸ گرم) کاهش پیدا کرد که می‌تواند مبین ظرفیت نامناسب حفظ آب توسط گیاه برنج در شرایط کم‌آبی باشد (جدول ۳).

جدول ۳. میانگین صفات مورد بررسی در شرایط تنش خشکی و

شرایط نرمال

تنش خشکی	تعداد پنجه	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن تر خشکی (گرم)
نرمال	۱۲/۹۶ ^a	۱۰۸/۷۴ ^a	۳۱/۵۶ ^a	۲۴/۱۸ ^a	۸۵/۱۸ ^a
تنش	۱۱/۴۹ ^b	۱۰۲/۵۴ ^b	۲۳/۷۳ ^b	۱۸/۷۴ ^b	۶۵/۸۴ ^b

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

نتایج حاصل از صفات زراعی مورد بررسی در رقم ندا و

لاین TH1

وزن خوشه در بوته و وزن خشک بوته در رقم ندا به ترتیب با داشتن میانگین ۳۴/۸۹ گرم و ۴۱/۵۸ گرم به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 بود. طول برگ پرچم در لاین TH1 (۲۸/۲۳)

نتایج حاصل از صفات زراعی مورد بررسی در شرایط

تنش خشکی و شرایط نرمال

خشکی به طور معنی‌داری بر رشد گیاهان مورد مطالعه در این پژوهش اثر گذاشت، به گونه‌ای که تعداد پنجه (۱۱/۴۹) و ارتفاع بوته (۱۰۲/۵۴ سانتی‌متر) در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط نرمال (تعداد پنجه: ۱۲/۹۶، ارتفاع بوته: ۱۰۸/۷۴) کاهش یافت و این نشان دهنده‌ی آن است که تنش خشکی بر متغیرهای اندازه‌گیری شده اثر کاهشی دارد. این نتایج همسو با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققین مبنی بر کاهش معنی‌دار تعداد پنجه و ارتفاع بوته در صورت اعمال تنش خشکی در مرحله رشدی رویشی می‌باشد (لفیتی، بلوم و آلتین، ۲۰۰۳). کاهش محتوای آب، تقلیل پتانسیل آب برگ و کاهش آماس در طی تنش کاهش رشد سلولی را به دنبال خواهد داشت که این موضوع همراه با پیری برگ منجر به کاهش ارتفاع بوته می‌شود (جلیل، مانیوانان و وحید، ۲۰۰۱).

همچنین با توجه به جدول ۳ مشخص شد طول (۲۳/۷۲ سانتی‌متر) و مساحت برگ پرچم (۱۸/۷۴ سانتی‌متر مربع) در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط نرمال (طول برگ پرچم: ۳۱/۵۶ سانتی‌متر، مساحت برگ پرچم: ۲۴/۱۸ سانتی‌متر مربع) به طور معنی‌داری کاهش یافت. پتانسیل کم آب ناشی از خشکسالی رشد برگ را محدود می‌کند (ژو، ژو و هو، ۲۰۲۰). همچنین اختلال در جریان آب به سمت سلول‌های آوند چوبی و فشار تورگور کمتر به دلیل کمبود آب، به شکل رشد ضعیف سلول و

طول گلدهی تأثیر مضری بر گرده افشانی دارد و در نتیجه بذرها را ضعیف کرده، اندازه و تعداد دانه را کاهش می‌دهد. بنابراین تنش خشکی در مرحله‌ی رشد زایشی با هر شدتی (خفیف یا شدید)، بدان دلیل که در انتقال مواد جذب شده از برگ به اندام‌های تولیدمثلی (خوشه و دانه) اختلال ایجاد می‌کند، تولید نهایی دانه را کاهش می‌دهد (حسن، داهو و هانگینگ، ۲۰۲۳). طول و مساحت برگ پرچم تنش در لاین TH1 نیز به ترتیب با میانگین ۲۴/۱۴ و ۱۵/۱۸ در شرایط تنش خشکی و میانگین ۳۲/۳۱ و ۲۳/۱۸ در شرایط عدم کاهش معنی‌داری نشان دادند. این امر می‌تواند منجر به کاهش راندمان تولید به دلیل کاهش کارایی فتوسنتز گردد. به دلیل اینکه برگ پرچم نقش مهمی در فتوسنتز برنج دارد، کاهش طول یا عرض برگ پرچم که منجر به کاهش مساحت برگ پرچم شود می‌تواند کارایی فتوسنتز را تحت تأثیر قرار دهد. این امر می‌تواند یکی از دلایل کاهش تعداد دانه پر در گیاه شود، کاهش تعداد دانه پر در گیاه نیز به نوبه‌ی خود موجب کاهش وزن خوشه گیاه شد (صفایی چائیکار، ربیعی و سمیع‌زاده، ۲۰۰۸). علاوه بر این مقایسه وزن تر بوته شرایط تنش خشکی (۶۸/۴۸ گرم) با شرایط نرمال (۷۱/۹۷ گرم) در لاین حساس به خشکی TH1 حاکی از کاهش معنی‌دار آن بود، که می‌تواند مبین ظرفیت نامناسب حفظ آب توسط این لاین حساس به خشکی در شرایط کم آبی باشد (جدول ۵).

جدول ۵. تأثیر تنش خشکی بر صفات مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1

رقم	تنش خشکی	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	وزن خوشه در بوته (گرم)
TH1	بدون تنش	۳۲/۳۱ ^a	۲۳/۱۸ ^a	۷۱/۹۷ ^{bc}	۳۷/۰۳ ^{bc}	۲۸/۸۵ ^b
TH1	تنش خشکی	۲۴/۱۴ ^b	۱۵/۱۸ ^b	۶۸/۴۵ ^{bc}	۳۲/۹۳ ^c	۱۹/۹۳ ^c
ندا	بدون تنش	۳۰/۸۱ ^a	۲۵/۱۷ ^a	۹۸/۱۸ ^a	۴۴/۹۸ ^a	۴۰/۰۵ ^a
ندا	تنش خشکی	۲۹/۲۹ ^a	۲۲/۲۹ ^a	۹۶/۲۳ ^a	۴۲/۱۹ ^a	۳۹/۷۳ ^a

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A

در این پژوهش به منظور بررسی و پیش‌بینی عملکرد ژن‌های ZFP252 و OsDREB2A الگوی بیان آن‌ها تحت تنش خشکی در دو رقم ندا و لاین TH1، در دو مرحله‌ی رشدی

سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم ندا (۲۷/۰۵ سانتی‌متر) نبود، ولی عرض برگ پرچم رقم ندا (۱/۳۸ سانتی‌متر) به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 (۰/۹۹ سانتی‌متر) بود. تأثیر عرض برگ پرچم در افزایش مساحت برگ پرچم بیشتر از طول برگ پرچم بود، به‌طوری‌که میانگین مساحت برگ پرچم در رقم ندا (۲۳/۷۳ سانتی‌متر مربع) به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین TH1 (۱۹/۱۸ سانتی‌متر مربع) شد. این امر می‌تواند موجب افزایش بهبود جذب نور و راندمان فتوسنتز در رقم ندا گردد. ارتفاع لاین TH1 با میانگین ۱۲۴/۱۹ سانتی‌متر نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم ندا با میانگین ۹۴/۸۴ سانتی‌متر بود (جدول ۴).

جدول ۴. میانگین صفات مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1

رقم	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	تعداد پنجه	تعداد خوشه	طول برگ پرچم (سانتی‌متر)	عرض برگ پرچم (سانتی‌متر)	مساحت برگ پرچم (سانتی‌متر مربع)	وزن خوشه در بوته (گرم)	وزن خشک (گرم)
TH1	۱۹۹ ^a	۱۰/۴۳ ^b	۱۰/۱۳ ^b	۲۸/۲۳ ^a	۰/۹۹ ^b	۰/۹۹ ^b	۲۴/۳۹ ^c	۳۴/۹۷ ^b
ندا	۹۸/۸۴ ^b	۱۳/۵۴ ^a	۱۲/۵۱ ^a	۲۷/۰۵ ^a	۱/۳۸ ^a	۱/۳۸ ^a	۲۳/۷۳ ^a	۴۱/۵۸ ^a

تیمارهای با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نمی‌باشند.

بررسی اثرات متقابل صفات زراعی مورد بررسی در رقم ندا و لاین TH1 با تنش خشکی

طول برگ پرچم، مساحت برگ پرچم و وزن خوشه در بوته در لاین TH1 در شرایط اعمال تنش خشکی کاهش نشان داد (جدول ۵)، اما هیچ یک از این صفات در رقم ندا تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفتند. لاین TH1 به ترتیب با میانگین ۱۹/۹۳ و ۲۸/۸۵ گرم در شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال، کاهش معنی‌دار وزن خوشه را نشان داد. به نظر می‌رسد مخرب‌ترین اثر تنش خشکی در مرحله‌ی گلدهی اثر بر عملکرد دانه باشد. گزارش شده است یک دوره کوتاه تنش خشکی در مرحله گلدهی با افزایش پوکی دانه، کاهش تعداد دانه در خوشه، کاهش طول و وزن خوشه و رشد ضعیف سنبلیچه، عملکرد دانه برنج را به شدت کاهش می‌دهد (حسن، داهو و هانگینگ، ۲۰۲۳). اختلال رشد در مرحله‌ی زایشی و عدم انتقال و تخصیص کربوهیدرات‌ها و قندها به دانه، دلیل اصلی کاهش وزن خوشه در شرایط تنش گزارش شده است. همچنین تنش خشکی در

مطالعات صورت گرفته افزایش بیان این ژن در گیاهان تراریخت منجر به افزایش و القای مقاومت به تنش‌های غیر زیستی می‌شود. در همین راستا مطابق با نتایج به دست آمده از این پژوهش، زو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند بیان ژن ZFP252 در برنج در شرایط تنش شوری و خشکی افزایش می‌یابد. پروتئین‌های انگشت روی نوع C₂H₂ با ۱۷۶ عضو در آرآبیدوپسیس و ۱۸۹ عضو در برنج یکی از بزرگترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی در گیاهان را تشکیل می‌دهند (آگاروال، آرورا و رای، ۲۰۰۷؛ سیفتسی-ایلماز و میتلر، ۲۰۰۸). بسیاری از این پروتئین‌ها دارای حداقل یک دومین انگشت روی C₂H₂ حاوی موتیف بسیار حفاظت شده QALGGH می‌باشند. این پروتئین‌ها در طیف وسیعی از نمو گیاه و پاسخ به تنش‌ها درگیر هستند. مشخص شده است تحمل به خشکی و شوری در برنج از طریق تنظیم ژن‌های درگیر در سیگنالینگ ABA و هموستازی ROS کنترل می‌شود (هوانگ، چائو و گائو، ۲۰۰۹). ژن‌های انگشت روی C₂H₂ متعددی در برنج، مانند ZFP252 (گزو، هوانگ و گئو، ۲۰۱۱)، ZFP179 (سان، گئو و یانگ، ۲۰۱۰) و *OsMSR15* (ژانگ، ژانگ و لی، ۲۰۱۶)، وقتی که در گیاهان فوق تظاهر می‌یابند، نقش مثبتی در بهبود تحمل به تنش خشکی و شوری ایفا می‌کنند. همچنین مشخص شده است فوق تظاهر ZFP182 تحمل برنج به شوری، خشکی و سرما را افزایش می‌دهد (هوانگ، سان و گزو، ۲۰۱۲). ZFP36 نیز در دفاع آنتی اکسیدانتی القا شونده توسط ABA و تحمل به تنش آب درگیر است (ژانگ، لیو و ون، ۲۰۱۴) و می‌تواند با *OsLEA5* برای تنظیم همزمان فعالیت پروموتور *OsAPX1*، کدکننده‌ی یک آسکوربات پراکسیداز که تمایل بالایی برای H₂O₂ (یک نوع ROS) دارد، اثر متقابل ایجاد کند. گزارشی هم مبنی بر نقش کلیدی ZFP179 در پاسخ‌های گیاه به تنش شوری و افزایش توانایی حذف ROS وجود دارد (سان، گئو و یانگ، ۲۰۱۰).

بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A در لاین THI و ندا در مرحله زایشی

نتایج حاصل از بررسی الگوی بیان فاکتورهای رونویسی در مرحله‌ی رشدی زایشی نشان داد که بیان ژن DREB2A در پاسخ به تیمار خشکی در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه بدون تغییر باقی ماند. نتایج به دست آمده از این تحقیق همسو با نتایج ملازاده و همکاران (ملازاده، زارع و ترنگ، ۲۰۱۴)، بیانگر آن هستند که *OsDREB2A* ممکن است در مرحله‌ی رشدی زایشی نقش کلیدی در تحمل نسبت به

رویشی و زایشی با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. این ژن‌ها، جزء ژن‌های القا شونده توسط تنش خشکی هستند و افزایش بیان آن‌ها ممکن است سبب بهبود تحمل به تنش گردد.

بیان ژن‌های ZFP252 و DREB2A در لاین THI و ندا در مرحله رویشی

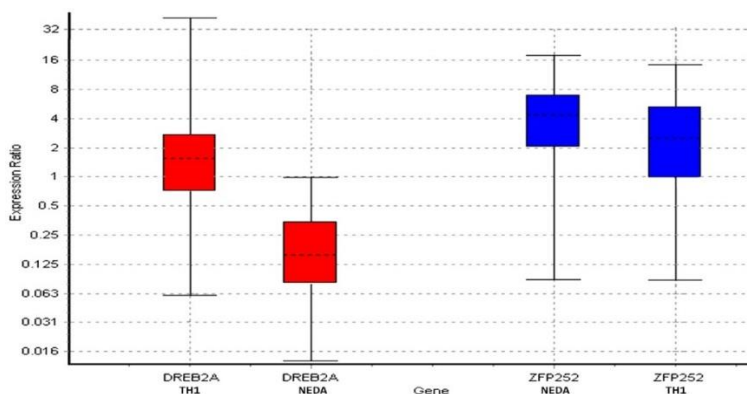
همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بیان ژن *OsDREB2A* در لاین THI در مرحله‌ی رشدی رویشی به طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش خشکی افزایش یافت، که این نتایج مطابق با یافته‌های کوئی، ونجیائو و ژانگ (۲۰۱۱) بود. نتایج حاصله بیانگر آن می‌باشد که در میان ژن‌های *DREB*، *OsDREB2A* ممکن است نقش مهمی در پاسخ برنج به خشکی در مرحله‌ی رشدی رویشی در لاین THI ایفا نماید. گیاهان به منظور حفظ انرژی در شرایط تنش‌های غیرزیستی، پتانسیل اسمزی درون سلولی خود را با تجمع اسمولیت‌هایی مانند قندهای محلول و پرولین آزاد کاهش می‌دهند و بدین وسیله از ساختارهای سلولی خود محافظت می‌کنند. در همین راستا Cui و همکاران (کوئی، ونجیائو و ژانگ، ۲۰۱۱) گزارش نمودند فوق تظاهر *OsDREB2A* تحت کنترل یک پروموتور پاسخگو به ABA در گیاه برنج باعث افزایش محتویات قندهای محلول و پرولین در مرحله‌ی رشدی گیاهچه‌ای شد و در نتیجه تحمل به تنش اسمزی و شوری را افزایش داد، که این امر بیانگر آن است که انتقال این ژن پتانسیل بهبود رشد و نمو برنج را دارد. همچنین کریسنوواتی و همکاران (کریسنوواتی، ارنوواتی و یولیانتی، ۲۰۲۲) نیز اظهار داشتند ژن‌های *OsDREB2A* نقش مهمی در تنظیم تحمل به خشکی ایفا می‌کنند و به طور گسترده به عنوان مارکر تحمل به خشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. علیرغم افزایش بیان این ژن در لاین THI نتایج به دست آمده حاکی از کاهش بیان آن در رقم ندا در نتیجه اعمال تنش خشکی در مرحله‌ی رشدی رویشی بود که این امر مؤید این مهم است که واریته‌های مختلف برنج به دلیل پیچیدگی برهمکنش بین عوامل تنش و فرآیندهای مختلف مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که بر رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارند، پاسخ‌های متفاوتی به تنش‌های غیرزیستی دارند (واده‌و، کوماری و شارما، ۲۰۱۰). همچنین بیان ژن ZFP252 با اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی در مقایسه با شرایط نرمال در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۶ و شکل ۱). مطالعات متعدد بر نقش مثبت ژن‌های ZFP در تحمل به تنش‌ها تأکید داشته‌اند و طبق

اکبرپور، خاوری و مومنی (۲۰۱۶) می‌باشد که اظهار داشتند تغییری در میزان بیان فاکتور رونویسی ZFP252 در پاسخ به تنش خشکی در رقم متحمل به خشکی ندا نسبت به دیگر ارقام حساس به خشکی، مشاهده نشد. این امر نشان دهنده‌ی این مهم می‌باشد که پاسخ‌های متفاوتی توسط گیاهان برای تحمل به خشکی استفاده می‌شود و مکانیسم‌های متفاوتی حتی در بین لاین‌های متحمل، تحمل به خشکی را میانجی‌گری می‌کنند.

خشکی در برنج نداشته باشد. همچنین مشخص گردید بیان ژن ZFP252 در لاین TH1 در شرایط تنش خشکی در مرحله زایشی در مقایسه با شرایط نرمال به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد که این امر نشان از حساسیت این ژن به تنش خشکی در لاین TH1 در مرحله‌ی زایشی دارد. بررسی بیان این ژن در رقم ندا در شرایط تنش خشکی در مرحله زایشی در مقایسه با شرایط نرمال نیز تغییری را نشان نداد (جدول ۷ و شکل ۲). این نتایج مطابق با یافته‌های

جدول ۶. نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله رویشی

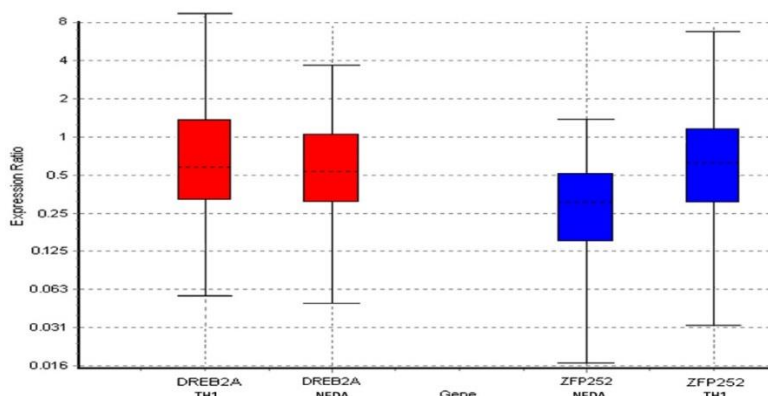
ژن	رقم	نسبت بیان	احتمال فرض یک	خطای استاندارد	حدود اطمینان ۹۵٪	تغییر بیان
DREB2A	TH1	۱/۵۳۸	۰/۳۷۸	۰/۴-۳۹۵/۰۰۲	۰/۳-۱۹۴/۱۵۴	افزایش
ZFP252	TH1	۲/۰۷۵	۰/۰۸۹	۰/۶-۶۴۲/۸۶۶	۰/۱-۱۹۲/۳۵۱	افزایش
DREB2A	ندا	۰/۱۵۲	۰/۰۰۰	۰/۰-۰۵۵/۴۶۲	۰/۰-۰۱۹/۸۲۸	کاهش
ZFP252	ندا	۳/۲۱۷	۰/۰۰۸	۰/۸-۹۵۱/۸۰۴	۰/۱۳-۲۹۹/۹۸۹	افزایش



شکل ۱. نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله رویشی

جدول ۷. نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله زایشی

ژن	رقم	نسبت بیان	احتمال فرض یک	خطای استاندارد	حدود اطمینان ۹۵٪	تغییر بیان
DREB2A	TH1	۰/۵۲۰	۰/۰۷۷	۰/۱-۱۹۵/۵۵۷	۰/۲-۰۹۰/۸۸۷	بدون تغییر
ZFP252	TH1	۰/۲۶۳	۰/۰۰۱	۰/۰-۱۰۳/۷۰۴	۰/۱-۰۳۳/۲۸۳	کاهش
DREB2A	ندا	۰/۵۸۸	۰/۱۴۹	۰/۰-۴۴۲/۸۷۹	۰/۱-۳۷۳/۰۰۴	بدون تغییر
ZFP252	ندا	۰/۸۱	۰/۳۵۶	۰/۱-۵۹۰/۱۹۷	۰/۱-۵۳۵/۳۷۱	بدون تغییر



شکل ۲. نسبت بیان ژن‌های DREB2A و ZFP252 در لاین TH1 و رقم ندا در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال در مرحله زایشی

شرایط تنش خشکی، تفاوت قابل توجهی با لاین TH1 نشان داد. آنالیز بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی در این مطالعه نیز بیانگر آن بود که گیاهان متحمل و حساس ممکن است از تنظیمات ژنتیکی و مکانیسم‌های متفاوتی در مواجهه با شرایط تنش استفاده کنند. رمزگشایی از این مکانیسم‌های مولکولی به درک بهتر تحمل به تنش و انتخاب استراتژی‌هایی برای بهبود بهره‌وری محصول در مواجهه با تغییرات آب و هوایی کمک می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر تفاوت ارقام برنج منتخب برای چندین صفت مورفولوژیکی مهم و تغییر در سطح بیان دو ژن کدکننده فاکتورهای رونویسی DREB2A و ZFP252 که در شبکه‌های تنظیمی تحمل به خشکی در برنج دخیل بودند در دو مرحله رویشی و زایشی در بافت برگ مورد بررسی قرار گرفت. رقم ندا به دلیل عدم کاهش صفات مورفولوژیک مورد بررسی و عملکرد بالاتر در

Reference

- Abdullah, T., Pawar, D. D., Kale, K. D., Dingre, S. K. (2015). Water and nutrient use efficiencies of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drip fertigation. *Agriculture for Sustainable Development*, 3(1): 52-56.
- Agarwal, P., Arora, R., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Takatsuji, H., Kapoor, S. & Tyagi, A. K. (2007). Genome-wide identification of C₂H₂ zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Molecular Biology*, 65: 467-485.
- Akbarpour, M., Khavari-Nejada, R. A., Moumeni, A. & Najafic, F. (2016). Molecular and physiological performance in response to drought stress in Iranian rice cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(1): 158-165.
- Ashfaq, M., Haider, M. S., Khan, A. S. & Allah, S. U. (2014). Breeding potential of the basmati rice germplasm under water stress condition. *African Journal of Biotechnology*, 11: 6647-6657.
- Chrisnawati, L., Ernawati, E., Yulianty. & Hariri, M. R. (2022). Polymorphism analysis of drought tolerance gene OsDREB2A in Indonesian local rice from Lampung, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23: 12.
- Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2008). The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Science*, 65: 1150-1160.
- Cui, M., Wenjiao, Zh., Zhang, Q., Xu, Zh., Zhu, Zh., Duan, F. & Wu, R. (2011). Induced over-expression of the transcription factor *OsDREB2A* improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1384-1391.
- Dubouzet, G. J., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33: 751-763.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J., Ito, O. & Siddique, K. H. M. (2009). Advances in drought resistance of rice. *Critical Reviews in Plant Science*, 28:199-217.
- Fukao, T. & Xiong, L. Z. (2013). Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex?. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 196-204.
- Hadiarto, T. and Tran, L. S. (2011). Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30: 297-310.

- Hansen, J. M., Go, Y. M. & Jones, D. P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 215-234.
- Hassan, M. A., Dahu, N., Hongning, T., Qian, Z., Yueming, Y., Yiru, L. & Shimei W. (2023) Drought stress in rice: morpho-physiological and molecular responses and marker-assisted breeding. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1215371.
- Herawati, R., Alnopri, A., Masdar, M., Simarmata, S., Sipriyadi, S. & Sutrawati, M. (2021). Identification of drought tolerant markers, DREB2A and BADH2 genes, and yield potential from single-crossing varieties of rice in Bengkulu, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(2): 785-793.
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Lan, H., Sun, H., Wang, Z., Bao, Y., Wang, J., Tang, H. & Zhang, H. (2012). A TFIIIA type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 80: 337-350.
- Huang, X. Y., Chao, D. Y., Gao, J. P., Zhu, M. Z., Shi, M. & Lin, H. X. (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes and Development*, 23: 1805-1817.
- Jaleel, J. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Jasim al juburi, H., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Journal of Agricultural Biology*, 11: 100-105.
- Ji, K., Wang, Y., Sun, W., Lou, Q., Mei, H., Shen, Sh. & Chen, H. (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, 169: 336-344.
- Joshi, R., Karan, R., Singla-Pareek, S. L. & Pareek, A. (2016). Ectopic expression of Pokkali phosphoglycerate kinase-2 (*OsPGK2-P*) improves yield in tobacco plants under salinity stress. *Plant Cell Reports*, 35: 27-41.
- Kadam, N., Tamilselvan, A., Lawas, L. M. F., Quinones, C., Bahuguna, R. N., Thomson, M. J., Dingkuhn, M., Muthurajan, R., Struik, P. C., Yin, X. & Jagadish, S. V. (2017). Genetic control of plasticity in root morphology and anatomy of rice in response to water deficit. *Plant physiology*, 174: 2302-2315.
- Lafitte, R., Blum A. & Altin, G. (2003). Using secondary traits to help identify drought tolerant genotypes. In: Fischer, K. S., Lafitte, R., Fukai, S., Altin, G. and Hardy, H. (Eds.). Breeding rice for drought-prone environment. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. pp: 37-48.
- Li, J., Zhang, M., Yang, L., Mao, X., Li, J., Li, L., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Li, Z., Zhao, H., Li, X., Lei, L., Sun, J. & Zou, D. (2021). *OsADR3* increases drought stress tolerance by inducing antioxidant defense mechanisms and regulating *OsGPX1* in rice (*Oryza sativa* L.). *The crop Journal*, 9: 1003-1017.
- Liu, C. M., Kachur, S., Dwan, M. G., Abraham, A. G., Aziz, M., Hsueh, P., Huang, Y., Busch, J. D., Lamit, L. J., Gehring, C. A., Keim, P. & Price, L. B. (2012). FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology*, 12: 255-265.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Y. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica Biophysica Acta*, 1819: 86-96.
- Mollazadeh, A., Tarang, A., Zare, N., Pourebrahim, M., Seighalani, R. & Ghasemi M. (2016). Expression analysis of five critical transcription factors (TFs) *OsHHLH148*, *OsZIP72*, *OsMYB2*, *OsNAC6* and *TRAB1* in response to drought stress in contrasting Iranian rice genotypes. *Plant Omics Journal*, 9(5): 327-333.
- Mollazadeh, A., Zare, N., Tarang, A., Asghari, R. & Seighalani, R. (2014). The study of expression of transcription factors in response to drought stress in rice. M.Sc. Dissertation. University of Mohaghegh Ardabili. Iran.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Comertpay, G. & Yildiz, M. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32: 261-285.
- Navidshad, B., Salekdeh, H., Royan, M. & Malecky, M. (2015). Effects of feed restriction and dietary fat type on mRNA expression of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) in broilers. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 9(4): 279-286. (in Persian).
- Panda, D., Mishra, S. S. and Behera P. K. (2021). Drought tolerance in rice: focus on recent mechanisms and approaches. *Rice Science*, 28 (2): 119-132.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Oxford University Press* 30: 1-10.

- Safaei Chaeikar, S., Rabiei, B., Samizadeh, H. & Esfahani, M. (2008). Evaluation of tolerance to terminal drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Science*, 9: 315-331. (in Persian).
- Sandhya, A., Talakayala, A., Ravula, M., Mahankali, V., & Ankanagari, S. (2021). Drought tolerance enhancement with co-overexpression of DREB2A and APX in indica rice (*Oryza sativa* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 12(2): 1-25.
- Singh, D. & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*, 6:895.
- Sokoto, M. B. & Muhammad, A. (2014). Response of rice varieties to water stress in Sokoto, Sudan Savannah, Nigeria. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2: 68-74.
- Sun, S. J., Guo, S. Q., Yang, X., Bao, Y. M., Tang, H. J., Sun, H., Huang, J. & Zhang, H. (2010). Functional analysis of a novel Cys₂/His₂-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2807-2818.
- Upadhyaya, H. & Panda, S. K. (2019). Drought stress responses and its management in rice. In book: *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. Hasanuzzaman, M., Fujita, M. & Biswas, J. K. (Eds.). Woodhead publishing. 177-200.
- Wadhwa, R., Kumari, N. & Sharma, V. (2010). Varying light regimes in naturally growing *Jatropha curcus*: pigment, proline and photosynthetic performance. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 6: 67-80.
- Wang, J., Li, Q., Mao, X., Li, A. & Jing, R. (2016). Wheat transcription factor *TaAREB3* participates in drought and freezing tolerances in *Arabidopsis*. *International Journal of Biological Science*, 12: 257-269.
- Xu, D. Q., Huang, J., Guo, S. Q., Yang, X., Bao, Y. M., Tang, H.J. & Zhang, H. (2008). Overexpression of a *TFIIIA*-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters*, 582: 1037-1043.
- Yamaguchi, T. & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 10: 615-620.
- Zain, N. A. M., Ismail, M. R., Mahmood, M., Puteh, A. & Ibrahim, M. H. (2014). Alleviation of water stress effects on MR220 rice by application of periodical water stress and potassium fertilization. *Molecules*, 19: 1795-1819.
- Zhang, H., Liu, Y., Wen, F., Yao, D., Wang, L., Guo, J., Ni, L., Zhang, A., Tan, M. & Jiang, M. (2014). A novel rice C₂H₂-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 65: 5795-5809.
- Zhang, X., Zhang, B., Li, M. J., Yin, X. M., Huang, L. F., Cui, Y. C., Wang, M. L. & Xia, X. (2016). *OsMSR15* encoding a rice C₂H₂-type zinc finger protein confers enhanced drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 59: 271-281.
- Zhao, K., Tung, C. W., Eizenga, G. C., Wright, M. H., Ali, M. L., Price, A. H., Norton, G. J., Islam, M. R., Reynolds, A., Mezey, J., McClung, A. M., Bustamante, C. D. & McCouch S. R. (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communication*, 2: 467.
- Zhu, R., Wu, F., Zhou, S., Hu, T., Huang, J. & Gao Y. (2020). Cumulative effects of drought–flood abrupt alternation on the photosynthetic characteristics of rice. *Environmental Experimental Botany*, 169: 1–14.