

Đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con

Đoàn Thị Bích Thảo¹, Nguyễn Xuân Thắng^{1*}, Lê Tuấn Anh¹, Lê Công Tùng¹, Nguyễn Thị Thu Hoài¹,
Lê Công Lực¹, Nông Văn Hải², Bùi Mạnh Cường¹

¹Viện Nghiên cứu ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 12/2/2019; ngày chuyển phản biện 18/2/2019; ngày nhận phản biện 20/3/2019; ngày chấp nhận đăng 8/4/2019

Tóm tắt:

Nhóm yếu tố phiên mã DREB (Dehydration Responsive Element Binding) liên quan chặt chẽ đến cơ chế phản ứng của thực vật đối với điều kiện bất thuận như hạn. Trong nghiên cứu này, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* đã được đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa ở giai đoạn cây con. Trong điều kiện gây hạn nhân tạo, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn khoảng 2,5 lần so với dòng nền không chuyển gen. Hình thái của dòng mang gen *ZmDREB2A* có biểu hiện chịu hạn tốt hơn so với dòng nền, trong đó chiều dài rễ của dòng chuyển gen lớn hơn 21-28% so với dòng nền. Khi gặp hạn, dòng chuyển gen *ZmDREB2A* cũng duy trì được hàm lượng chlorophyll (Chl) cao hơn 10% so với các dòng nền, đồng thời tích lũy được lượng chất điều hòa thẩm thấu như proline tăng 2,5-4,5 lần, carbohydrate không cấu trúc (Non Structural Carbohydrate - NSC) nhiều hơn 28-35% so với dòng nền.

Từ khóa: cây ngô, chịu hạn, chuyển gen, proline, *ZmDREB2A*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Thực vật luôn phải đối mặt với nhiều yếu tố bất thuận có trong điều kiện môi trường như hạn, mặn, nóng... Các yếu tố bất thuận đã ảnh hưởng tới khoảng 10% diện tích đất trồng và dẫn tới sự sụt giảm hơn 50% sản lượng trung bình của các cây trồng chính trên thế giới, trong đó có cây ngô [1]. Tình hình hạn hán đã, đang và sẽ tiếp tục diễn ra nghiêm trọng, khiến cho việc nghiên cứu nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng nói chung và cây ngô nói riêng ngày càng cấp thiết.

Cơ chế đáp ứng với yếu tố bất thuận của thực vật liên quan đến nhóm gen mã hóa các yếu tố phiên mã. Trong đó, DREB là một nhóm yếu tố phiên mã quan trọng, đóng vai trò chủ đạo trong đáp ứng với nhiều yếu tố bất thuận khác nhau. Thông qua yếu tố DREB có tác động *cis* và vùng bám ADN AP2/ERF, yếu tố phiên mã DREB giúp tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng đối với điều kiện hạn, mặn, nóng [2].

Gen *ZmDREB2A* mã hóa cho nhân tố phiên mã nhóm DREB ở cây ngô được tăng cường biểu hiện khi cây ngô gặp điều kiện hạn, mặn, nóng và lạnh. Nghiên cứu chuyển gen *ZmDREB2A* vào cây mô hình *Arabidopsis thaliana* cho thấy, gen này đóng vai trò điều hòa biểu hiện của các gen liên quan đến cả điều kiện hạn và nóng, làm tăng cường biểu hiện các gen mã hóa protein LEA, các gen liên quan đến sốc

nhiệt và giải độc tế bào [3]. Chuyển gen thuộc nhóm DREB cũng giúp tăng khả năng chống chịu điều kiện bất thuận ở các cây trồng khác như thuốc lá [4], lúa [5] và lúa mì [6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* ở giai đoạn cây con. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để sàng lọc và lựa chọn nguồn vật liệu phục vụ cho công tác chọn tạo giống ngô lai có khả năng chịu hạn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền tương ứng (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các dòng ngô tham gia thí nghiệm.

TT	Tên dòng	Ghi chú
1	K3	Dòng nền không chuyển gen
2	K3-CG	Dòng chuyển gen <i>ZmDREB2A</i>
3	K7	Dòng nền không chuyển gen
4	K7-CG	Dòng chuyển gen <i>ZmDREB2A</i>

*Tác giả liên hệ: Email: nxthang@gmail.com

Evaluation of biochemical parameters and drought resistance in *ZmDREB2A* transgenic maize at the seedling stage

Thi Bích Thao Doan¹, Xuan Thang Nguyen^{1*},
Tuan Anh Le¹, Cong Tung Le¹, Thi Thu Hoai Nguyen¹,
Cong Luc Le¹, Van Hai Nong², Manh Cuong Bui¹

¹National Maize Research Institute

²Institute of Genome Research

Received 12 February 2019; accepted 8 April 2019

Abstract:

DREB transcription factor group is related to responses of plants to abiotic stresses including drought. In this study, the *ZmDREB2A* transgenic maize lines at the seedling stage were evaluated for drought resistance and biochemical characteristics. The survival rate of *ZmDREB2A* lines were 2.5 times higher than wildtype plants in artificial drought tests. Morphological characteristics also showed the root length of *ZmDREB2A* lines were 21-28% higher than that of control groups, which indicates *ZmDREB2A* lines could suffer drought better. Moreover, the chlorophyll concentration of *ZmDREB2A* lines was 10% higher than the wildtype in drought condition. Other parameters such as proline and nonstructural carbohydrate accumulation of the transgenic lines were higher as compared to control groups.

Keywords: drought resistance, maize, proline, transgenic, *ZmDREB2A*.

Classification number: 4.6

Phương pháp nghiên cứu

Gây hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con: thí nghiệm gây hạn nhân tạo được tiến hành ở giai đoạn cây con trong nhà lưới theo phương pháp của Camacho và Caraballo (1994) [7]. Hạt ngô được gieo trong xô chứa giá thể xỉ than và đất đã tưới nước bão hòa. Tia bỏ các cây không đồng đều, giữ lại 6 cây/xô, 3 cây bên trái là dòng ngô không mang gen *ZmDREB2A* (dòng nền), 3 cây bên phải dòng ngô mang gen *ZmDREB2A*. Tiến hành không tưới nước liên tục 15 ngày khi cây có 5-7 lá nhằm gây hạn, đánh giá biểu hiện cây trong điều kiện hạn. Sau đó tưới nước trở lại trong 7 ngày và đánh

giá tỷ lệ cây sống, khả năng hồi phục sau hạn.

Xác định hàm lượng Chl: hàm lượng Chl được xác định theo phương pháp của Porra (2006) [8]. Mô lá (10 mg) được đưa vào ống eppendorf. Bổ sung 20 µl acetone 80%, nghiền bằng chày nhựa, sau đó thêm acetone 80% để đạt thể tích 1,5 ml. Ly tâm ở 2.000 vòng/phút trong 1 phút, thu 1 ml dịch nổi. Đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 646 và 664 nm. Hàm lượng Chl được tính theo công thức:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mg}) = [12,7 \times (A_{664}) - 2,69 \times (A_{646})] \times \text{hệ số pha loãng}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mg}) = [22,9 \times (A_{646}) - 4,68 \times (A_{664})] \times \text{hệ số pha loãng}$$

Xác định hàm lượng proline: hàm lượng proline được xác định bằng phương pháp so màu [9]. Mô lá (50 mg) được nghiền trong nitor lỏng, bỏ vào ống eppendorf 2 ml. Bổ sung 1,5 ml acid sulfosalicylic 3% (w/v), lắc đều, sau đó ly tâm ở 7.000 vòng/phút trong 20 phút. Thu 300 µl dịch nổi, bổ sung 600 µl axit sulfosalicylic 3%.

Thực hiện phản ứng màu bằng cách lấy 200 µl dịch trong cho vào ống eppendorf, bổ sung 200 µl axit axetic và 200 µl dung dịch ninhydrin (0,1 g ninhydrin + 2,4 ml axit axetic + 1,6 ml acid phosphoric 6M), ủ phản ứng ở 100°C trong 1 giờ, sau đó dừng phản ứng. Bổ sung 400 µl toluence vào hỗn hợp phản ứng, lắc đều, thu 200 µl dịch nổi. Tiếp tục bổ sung 800 µl toluence và đo quang phổ ở bước sóng 520 nm. Xây dựng đường chuẩn để tính hàm lượng proline.

Xác định hàm lượng NSC: hàm lượng NSC được xác định theo phương pháp của Ohnishi và Horie (1999) [10]. Mẫu lá (0,5 g) được nghiền nhỏ, cho vào ống falcon 50 ml, thêm 30 ml nước cất rồi đun ở 100°C trong 60 phút. Sau khi ống nguội, bổ sung 20 ml Sodium phosphate-phosphoric acid buffer (pH 7,4). Lắc ở 200 vòng/phút, nhiệt độ 40°C trong 24h. Lọc mẫu bằng giấy lọc rồi làm khô phần cặn thu được ở 135°C trong 4h. Cân lượng mẫu còn lại và tính hàm lượng NSC theo công thức:

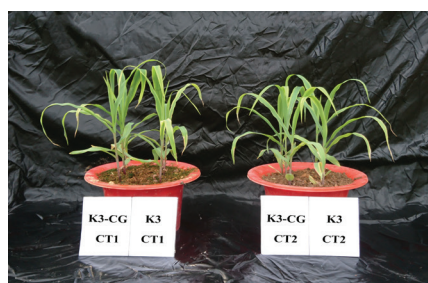
$$\text{NSC } (\%) = (\text{Khối lượng mẫu}/\text{Khối lượng mẫu sau sấy})/\text{Khối lượng mẫu} \times 100$$

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý bằng chương trình IRRISTAT 5.0 và Microsoft Excel 2013.

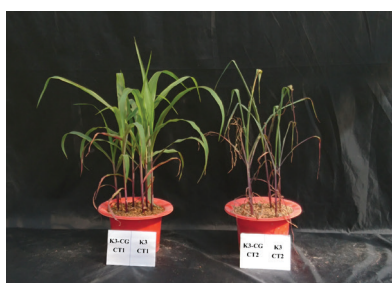
Kết quả và thảo luận

Hình thái và khả năng phục hồi của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn

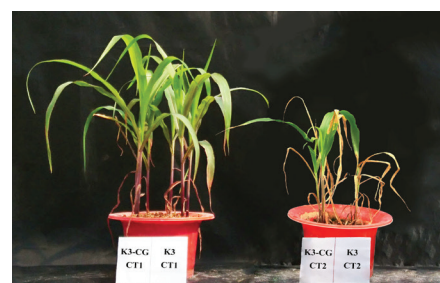
Giai đoạn trước khi xử lý hạn nhân tạo, các dòng ngô đều phát triển bình thường (hình 1A và 2A). Đến giai đoạn gây hạn, các dòng ngô thí nghiệm có biểu hiện cuộn lá ở mức độ khác nhau, sinh trưởng chậm lại so với đối chứng được tưới nước đầy đủ (hình 1B và 2B). Sau 15 ngày gây hạn, cây ngô bị hạn xuất hiện lá chết khô ở tầng lá dưới và đỉnh lá.



A: chưa xử lý hạn



B: đã xử lý hạn



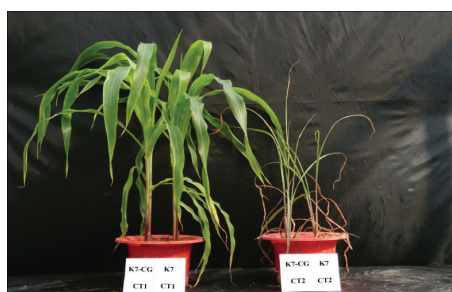
C: sau khi phục hồi

Hình 1. Hình thái các dòng ngô K3 chuyển gen và dòng nền trong giai đoạn gây hạn.

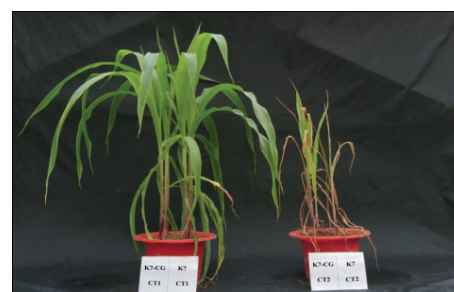
Ghi chú: 3 cây bên trái: dòng chuyển gen; 3 cây bên phải: dòng nền; công thức 1: tưới nước đầy đủ (CT1); công thức 2: gây hạn và phục hồi (CT2); K3: dòng nền; K3-CG: dòng K3 mang gen *ZmDREB2A*.



A: chưa xử lý hạn



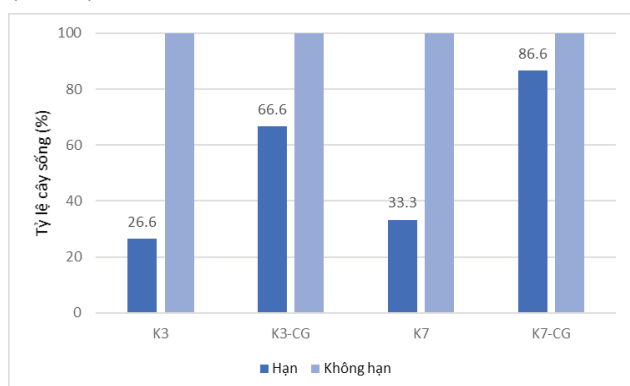
B: đã xử lý hạn



C: sau khi phục hồi

Hình 2. Hình thái các dòng ngô K7 chuyển gen và dòng nền trong giai đoạn gây hạn.

Kết thúc giai đoạn gây hạn và tưới nước trở lại, dòng ngô K3-CG và K7-CG mang gen *ZmDREB2A* có biểu hiện phục hồi sinh trưởng nhanh hơn dòng nền, thể hiện qua hình thái và tỷ lệ cây sống cao hơn (hình 1C và 2C). Tỷ lệ sống của cây K3-CG có gen *ZmDREB2A* (66,6%) cao gấp 2,5 lần so với dòng nền K3 (26,6%). Các cây K7-CG mang gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn 2,6 lần so với dòng nền (hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ cây sống của các dòng ngô K3, K7 - mang gen *ZmDREB2A* và các dòng nền tương ứng sau khi kết thúc giai đoạn hạn và được tưới phục hồi.

Đặc điểm thân lá và rễ của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn

Trong điều kiện tưới nước đủ, các cây ngô cùng nguồn sinh trưởng, phát triển đồng đều về thân lá và rễ, không có

khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa dòng K3 và K3-CG hoặc giữa dòng K7 và K7-CG. Ở điều kiện hạn nhân tạo, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có chiều dài, khối lượng của thân lá và rễ, thể tích rễ cao hơn so với dòng nền (bảng 2). Trong đó, khả năng phát triển bộ rễ trong điều kiện hạn là một đặc điểm quan trọng giúp thực vật chống chịu stress hạn. Do đó, đây là một tiêu chí quan trọng trong chọn giống chịu hạn. Ở điều kiện hạn, chiều dài rễ của dòng K3-CG giảm 11,21% so với không gây hạn, còn dòng nền (K3) giảm đến 30,69%. Tương tự, dòng K7-CG gặp hạn có chiều dài rễ giảm 9,92% so với không gây hạn. Dòng nền tương ứng (K7) có tỷ lệ giảm chiều dài rễ lên tới 25,74%. Qua kết

Bảng 2. Đặc điểm thân lá và rễ tươi của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* và dòng nền trong điều kiện hạn nhân tạo.

Dòng	Chiều dài thân lá (cm)		Chiều dài rễ (cm)		Khối lượng thân tươi (g)		Khối lượng rễ tươi (g)		Thể tích rễ (ml)	
	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn	Hạn	Không hạn
	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)		Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	
K3	51,7	72,8	28,98	16,08	23,20	30,69	3,97	11,87	66,55	0,32
K3-CG	53,5	71,5	25,17	20,60	23,20	11,21	3,84	10,76	64,31	0,84
K7	56,7	77,8	27,12	19,50	26,26	25,74	3,06	11,97	74,44	0,34
K7-CG	60,2	76,8	21,61	23,60	26,20	9,92	4,16	10,96	62,04	0,89
CV%	4,2		5,7		2,8		2,2		0,9	
LSD _{0,05}	1,99		0,92		0,168		0,02		0,013	

qua ở bảng 2 cho thấy, ở tất cả các chỉ tiêu đánh giá (chiều dài thân lá, chiều dài rễ, khối lượng rễ tươi, thể tích rễ tươi) của các dòng nền có tỷ lệ giữa gây hạn và không gây hạn cao hơn ở dòng chuyển gen tương ứng, điều đó chứng tỏ các dòng chuyển gen có khả năng sinh trưởng và phát triển hơn các dòng nền trong điều kiện hạn.

Đánh giá các đặc điểm hình thái giữa hai dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* cho thấy, dòng K7-CG có khả năng sinh trưởng, phát triển và chịu hạn cao hơn dòng K3-CG. Ở điều kiện hạn, dòng K7-CG có chiều dài rễ lớn nhất trong các dòng ngô thí nghiệm (23,6 cm), cao hơn 14,5% so với dòng K3-CG. Bên cạnh đó, chiều dài thân lá của dòng K7-CG (60,2 cm) lớn hơn 12,5% so với chiều dài thân lá của dòng K3-CG (53,5 cm).

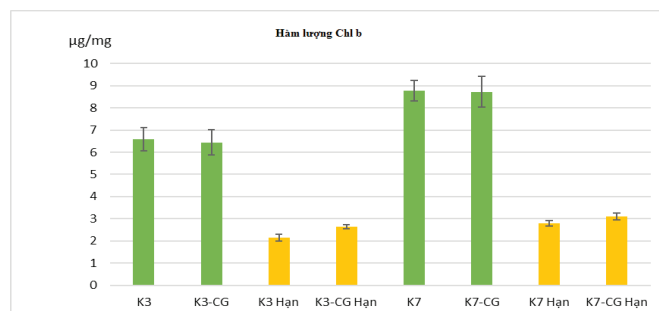
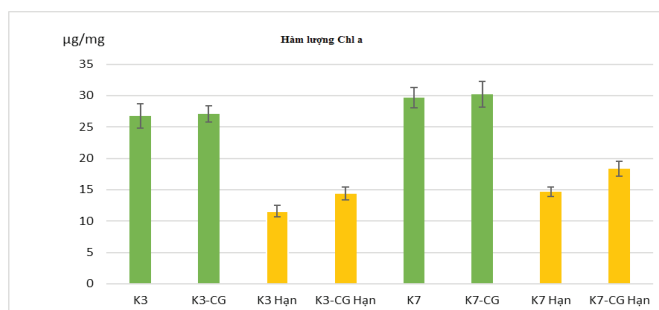
Khả năng tích lũy sinh khối của các cây chuyển gen *ZmDREB2A* cao hơn so với cây không chuyển gen, thể hiện qua khối lượng thân lá và rễ khô (bảng 3). Ở điều kiện hạn nhân tạo, dòng K3-CG và K7-CG có tổng sinh khối khô cao hơn so với dòng nền tương ứng 2,48 và 2,2 lần. Các dòng ngô nền K3, K7 có tỷ lệ giảm mạnh về khối lượng thân khô (87,15-89,5%), rễ khô (83,33-76,27%), trong khi các dòng chuyển gen tương ứng tỷ lệ này thấp hơn rõ rệt.

Bảng 3. Khối lượng thân, rễ khô, tổng sinh khối khô của các dòng ngô mang gen *ZmDREB2A* và dòng nền trong điều kiện hạn nhân tạo.

Dòng	Khối lượng thân khô (g)			Khối lượng rễ khô (g)			Tổng sinh khối khô (g)		
	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)	Hạn	Không hạn	Tỷ lệ giảm so với không hạn (%)
K3	0,59	5,62	89,50	0,09	0,54	83,33	0,68	6,16	88,96
K3-CG	1,53	5,63	72,82	0,16	0,55	70,91	1,69	6,18	72,65
K7	0,74	5,76	87,15	0,14	0,59	76,27	0,88	6,35	86,14
K7-CG	1,72	5,77	70,19	0,22	0,6	63,33	1,94	6,37	69,54
CV%	0,8			4,7			1		
LSD _{0,05}	0,019			0,012			0,028		

Đánh giá một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* trong điều kiện hạn nhân tạo

Hàm lượng Chl của các dòng ngô trong điều kiện hạn giảm mạnh so với điều kiện bình thường (hình 4). Khi tưới đủ nước, hàm lượng Chl a không có khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa cây chuyển gen *ZmDREB2A* và cây không chuyển gen. Hàm lượng Chl a ở các dòng ngô nằm trong khoảng 27-30 µg/mg ở điều kiện bình thường. Trường hợp gặp stress hạn, hàm lượng Chl a ở dòng K3, K3-CG đạt lần lượt 11,6 và 14,4 µg/mg, tương ứng với mức giảm 58 và 48% so với điều kiện không hạn. Dòng K7, K7-CG có hàm lượng Chl a là 14,6 và 18,3 µg/mg, tương ứng giảm 51 và 40% so với điều kiện tưới đầy đủ.



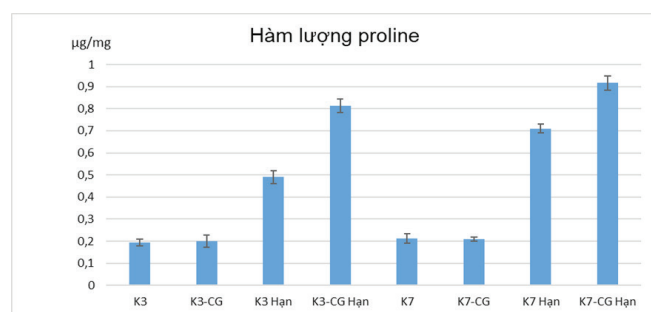
Hình 4. Hàm lượng Chl a và b của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Với vai trò là nhóm sắc tố phụ, hàm lượng Chl b thấp hơn so với Chl a. Hàm lượng Chl b ở các dòng chuyển gen và dòng nền tương đương nhau khi được tưới đầy đủ. Dưới điều kiện hạn, hàm lượng Chl b ở mẫu K3 và K3-CG giảm xuống còn 2,1 và 2,6 µg/mg, trong khi ở K7 và K7-CG là 2,78 và 3,09 µg/mg.

Tác động của hạn làm giảm mạnh hàm lượng Chl không chỉ ở ngô mà còn ở nhiều loài cây khác nhau [11, 12]. Tuy nhiên, các cây chuyển gen *ZmDREB2A* (K3-CG, K7-CG) duy trì được hàm lượng Chl a và b cao hơn so với cây không chuyển gen khoảng 10%.

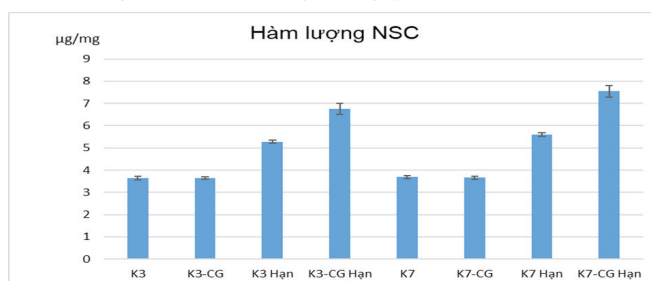
Một trong những cơ chế liên quan đến khả năng chịu hạn của cây trồng là sự tích lũy các chất hòa tan như proline. Proline là axit amin giúp điều hòa áp suất thẩm thấu tế bào, được tăng cường tích lũy khi thực vật gặp điều kiện bất thuận như hạn [13].

Hàm lượng proline tự do ở dòng ngô đạt mức 2 µg/mg trong điều kiện bình thường và tăng mạnh trong điều kiện hạn (hình 5). Dưới tác động của hạn, hàm lượng proline tự do trong dòng ngô K3, K3-CG tăng lần lượt 2,5 lần và 4 lần so với điều kiện bình thường, đạt mức 0,49 và 0,81 µg/mg. Dòng K7 và K7-CG gặp hạn có hàm lượng proline là 0,71 và 0,92 µg/mg, tương ứng gấp 3,55 và 4,5 lần so với điều kiện không hạn. Sự gia tăng hàm lượng proline tự do là một đáp ứng với điều kiện hạn xảy ra ở cả cây chuyển gen và không chuyển gen. So sánh giữa các dòng thí nghiệm, các dòng chuyển gen *ZmDREB2A* tổng hợp lượng proline tự do nhiều hơn so với dòng nền.



Hình 5. Hàm lượng proline của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Kết quả trên tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới về hạn ở cây ngô. Jain và cs (2010) [14] đã sử dụng sorbitol để gây hạn nhân tạo *in vitro*, cho thấy tương quan tuyến tính giữa nồng độ sorbitol trong môi trường và hàm lượng proline ở lá ngô. Nghiên cứu của Efeoğlu và cs (2009) [15] trên 3 giống ngô Doge, Luce, Vero cũng cho thấy, hàm lượng proline tăng lên đáng kể khi gây hạn nhân tạo bằng cách không tưới nước trong 12 ngày.



Hình 6. Hàm lượng NSC của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền.

Bên cạnh proline, hàm lượng các dạng NSC cũng thường gia tăng khi thực vật gặp stress hạn, với vai trò điều hòa áp suất thẩm thấu. Ở điều kiện tưới nước đầy đủ, hàm lượng NSC ở dòng chuyển gen *ZmDREB2A* và dòng nền tương đương nhau. Khi gặp hạn, dòng K3-CG có hàm lượng NSC lần lượt đạt 6,76 µg/mg, cao hơn 28% so với dòng K3 (5,27 µg/mg). Hàm lượng NSC trong điều kiện hạn ở dòng K7-CG là 7,55 µg/mg, cao hơn 35% so với dòng K7 (5,6 µg/mg) (hình 6).

Như vậy, khi gặp stress hạn, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* (K3-CG, K7-CG) có hàm lượng Chl, proline và NSC cao hơn dòng nền (K3, K7). Giữa hai dòng chuyển gen, các chỉ số này ở dòng K7-CG cao hơn so với dòng K3-CG. Kết quả phân tích sinh hóa phù hợp với những đánh giá về đặc điểm hình thái của các dòng ngô tham gia thí nghiệm.

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng chịu hạn của dòng ngô K3-CG, K7-CG mang gen *ZmDREB2A* cùng dòng nền tương ứng (K3, K7) ở giai đoạn cây con. Kết quả cho thấy, các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* có tỷ lệ sống cao hơn khoảng 2,5 lần so với dòng nền. Các đặc điểm

hình thái và sinh hóa liên quan đến khả năng chịu hạn ở dòng chuyển gen (K3-CG, K7-CG) biểu hiện tốt hơn dòng nền (K3, K7). Do đó, đây là những nguồn vật liệu tiềm năng cho công tác chọn tạo giống ngô chịu hạn.

Đề nghị tiếp tục đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô chuyển gen *ZmDREB2A* ở các giai đoạn sinh trưởng khác (trước và sau trổ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.A. Bray, J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk (2000), *Responses to abiotic stresses*, in *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Biologists.
- [2] C. Lata, M. Prasad (2011), "Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants", *Journal of Experimental Botany*, **62**(14), pp.4731-4748.
- [3] F. Qin, et al. (2007), "Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L.", *The Plant Journal*, **50**(1), pp.54-69.
- [4] M. Kasuga, et al. (2004), "A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer", *Plant and Cell Physiology*, **45**(3), pp.346-350.
- [5] S.J. Oh, et al. (2005), "Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth", *Plant Physiology*, **138**(1), pp.341-351.
- [6] Y.G. Shen, et al. (2003), "An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress", *Theoretical and Applied Genetics*, **106**(5), pp.923-930.
- [7] R.G. Camacho, D.F. Caraballo (1994), "Evaluation of morphological characteristics in Venezuelan maize (*Zea mays* L.) genotypes under drought stress", *Scientia Agricola*, **51**(3), pp.453-458.
- [8] R.J. Porra (2006), "Spectrometric assays for plant, algal and bacterial chlorophyll", *Advances in Photosynthesis and Respiration*, **25**, pp.95-107.
- [9] L. Bates, R. Waldren, I. Teare (1973), "Rapid determination of free proline for water-stress studies", *Plant and Soil*, **39**(1), pp.205-207.
- [10] M. Ohnishi, T. Horie (1999), "A proxy analysis on nonstructural carbohydrate in rice [*Oryza sativa*] plant by using the gravimetric method", *Japanese Journal of Crop Science* (Japan).
- [11] A. Mafakheri, et al. (2010), "Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars", *Australian Journal of Crop Science*, **4**(8), pp.580-585.
- [12] P. Manivannan, et al. (2007), "Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **59**(2), pp.141-149.
- [13] M.M.F. Mansour (2000), "Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress", *Biologia Plantarum*, **43**(4), pp.491-500.
- [14] M. Jain, S. Tiwary, R. Gadre (2010), "Sorbitol-induced changes in various growth and biochemical parameters in maize", *Plant Soil Environment*, **56**, pp.263-267.
- [15] B. Efeoğlu, et al. (2009), "Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery", *South African Journal of Botany*, **75**(1), pp.34-42.