

Identification and study of changes in expression pattern of some genes involved in drought tolerance in Lentil (*Lens culinaris*)

Sahar Mobasser 

MSc Graduate of Genetic and plant breeding, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Sciences and Agricultural Engineering, Tehran University, Karaj, Iran. E-mail address: Sahar.Mobasser@yahoo.com

Mohammad Reza Bihamta 

*Corresponding author. Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agronomy Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail address: mrghanad@ut.ac.ir

Ali Reza Abbasi 

Associate Professor, Department of Agronomy & Plant breeding, Faculty of Agronomy Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail address: rezabbasi@ut.ac.ir

Sajad Rashidi-Monfared 

Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail address: rashidims@modares.ac.ir

Abdolrahman Rasoulnia 

PhD of plant breeding, Department of Agronomy & Plant breeding, Faculty of Agronomy Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail address: arasounia@ut.ac.ir

Abstract

Objective

The research was conducted to study changes in expression pattern of some genes involved in drought tolerance due to the problem of terminal drought stress in rainfed lentil agriculture in Iran.

Materials and methods

In order to identify the consensus sequence of the coding sequence (CDS) of selected lentil genes; *Aquaporin PIP2*, *Fructose bisphosphate aldolase*, *Oxygen-evolving enhancer protein2*, *WRKY1* and *Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase*, expressed sequence tag (EST) and reads were identified through similar ortholog sequences in other leguminosae plants. 90, 60 and 30 percent

of field capacity were considered as control, medium and severe stress respectively. RNA was extracted from both control and severe drought stress treated plants leaf samples, cDNA was synthesized from RNA samples. Expression profiles of the genes, were determined via real time PCR technique. To represent the effect of drought stress on lentil plant, some morphological, physiological and biochemical characteristics were measured.

Results

Characteristics like plant height, shoot fresh weight, root fresh weight, shoot dry weight, root dry weight, relative water content, leaf area index, chlorophyll and protein content decreased due to drought stress. Leaf trichome density, electrolyte leakage index, proline and carbohydrate content, malondialdehyde and hydrogen peroxide increased in drought stress. Analysis of real time PCR demonstrated expression of *AQUAPIP2*, *FBA* and *WRKY1* genes were increased and expression of *XTH* and *OEE2* genes were decreased under severe drought stress condition.

Conclusions

The results show that *AQUAPIP2*, *FBA* and *WRKY1* genes are involved in drought tolerance. Due to higher expression of *AQUAPIP2* and *WRKY1* genes in the tolerant genotype, reduction of RWC in this genotype is less. Less increase in hydrogen peroxide in the tolerant genotype, partly influenced by higher expression of *AQUAPIP2* gene and higher activity of antioxidant enzymes, which was influenced by higher expression of *AQUAPIP2* gene in tolerant genotype than susceptible genotype. The increase in carbohydrate content in both genotypes was partially affected by *FBA* gene expression.

Keywords: Drought stress, lentil, ortholog sequences, susceptible genotype, tolerant genotype

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mobasser S, Bihamta MR, Abbasi AR, Rashidi-Monfared S, Rasoulnia A (2023) Identification and study of changes in expression pattern of some genes involved in drought tolerance in Lentil (*Lens culinaris*). *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (4), 61-86.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (4), 61-86.

DOI: 10.22103/jab.2023.19864.1415

Received: August 16, 2023.

Received in revised form: October 10, 2023.

Accepted: October 11, 2023.

Published online: December 30, 2023.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

شناسایی و بررسی الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی در عدس (*Lens culinaris*)

سحر مبصر 


دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه:

Sahar.Mobasser@yahoo.com


محمد رضا بی‌همتا 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،


دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mrghanad@ut.ac.ir

علیرضا عباسی 

دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: rezabbasi@ut.ac.ir

سجاد رشیدی منفرد 

استادیار، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: rashidims@modares.ac.ir

عبدالرحمن رسول‌نیا 

دکتری ژنتیک و به‌نژادی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: arasoulnia@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹

چکیده

هدف: به دلیل کمبود آب و تنش خشکی آخر فصل در کشت دیم عدس در ایران، مطالعه حاضر با هدف شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی و بررسی تغییرات آن‌ها، به منظور شناسایی نقش آن‌ها در این فرایند، در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل عدس، انجام شد.

مواد و روش‌ها: به منظور شناسایی توالی توافقی ناحیه رمزکننده ژن‌های انتخابی دخیل در تحمل به تنش خشکی گیاه عدس، ابتدا توالی‌های قطعات بیانی و خوانش ژن‌های *WRKY1*، *OEE2*، *FBA*، *AQUAPIP2* و *XTH* با استفاده از توالی‌های ارتولوگ در سایر گیاهان هم‌خانواده عدس شناسایی شدند. در پژوهش حاضر، به منظور القای تنش خشکی، از آبیاری ۶۰، ۹۰ و ۳۰

در صد ظرفیت زراعی به ترتیب برای شاهد، تنش متوسط و شدید استفاده شد. RNA گیاه عدس، از بوته‌های تحت تنش و شاهد استخراج، cDNA آن‌ها تهیه و بیان نسبی ژن‌های شناسایی شده، توسط تکنیک RT-PCR، سنجیده شد. برای درک بهتر پاسخ، تاثیر تنش خشکی بر برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه عدس، ارزیابی شد.

نتایج: با افزایش شدت تنش خشکی، ارتفاع بوته، وزن تر اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، محتوای نسبی آب برگ، شاخص سطح برگ، کلروفیل و پروتئین برگ، کاهش و تراکم کرک برگ، میزان نشت الکترولیتی، پرولین و کربوهیدرات، محتوای مالون‌دی‌آلدئید و غلظت هیدروژن پراکسید، افزایش یافتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های بیان نسبی ژن نشان داد که با افزایش شدت تنش، بیان نسبی ژن‌های *AQUAPIP2*، *FBA* و *WRKY1*، افزایش معنی‌دار و بیان نسبی *XTH* و *OEE2* کاهش معنی‌دار یافت.

نتیجه‌گیری: افزایش شدت تنش خشکی، منجر به افزایش بیان نسبی ژن‌های *AQUAPIP2*، *FBA* و *WRKY1* شد. افزایش محتوای نسبی آب برگ، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش غلظت هیدروژن پراکسید، تحت تاثیر افزایش بیان نسبی *AQUAPIP2* و *WRKY1* بود. افزایش بیان نسبی *FBA* منجر به افزایش غلظت کربوهیدرات شد. نتایج نشان می‌دهد که این سه ژن موثر در تحمل به تنش خشکی در عدس بودند.

کلیدواژه‌ها: ژنوتیپ متحمل و حساس، شدت تنش، محتوای نسبی آب برگ

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مبصر سحر، بی‌همتا محمد رضا، عباسی علیرضا، رشیدی منفرد سجاده، رسول نیا عبدالرحمن (۱۴۰۲) شناسایی و بررسی الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی در عدس (*Lens culinaris*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۶۱-۸۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors



مقدمه

افزایش رشد جمعیت و نیاز به محصولات کشاورزی و محدودیت منابع آب، مسئله کم‌آبی را به طور جدی، به عنوان یکی از چالش‌های اصلی آینده مطرح کرده‌است (Naderi et al. 2012). خشکی در دیدگاه کشاورزی عبارت است از کافی نبودن مقدار و توزیع آب قابل استفاده در دوره رشد گیاه که منجر به کاهش توان کامل ژنتیکی گیاه می‌شود (Shao et al. 2008) و یکی از غیرقابل پیش بینی ترین عوامل محیطی به دلیل تغییرات اقلیمی بوده که تولید محصول را محدود می‌کند و بر روی بقولات، تاثیر

مخرب دارد (Nadeem et al. 2019). عدس (*Lens culinaris*) یکی از مهم ترین بقولات می باشد که اغلب در سیستم های کشاورزی پایدار کشت می شود و یکی از گونه های قدیمی اهلی شده توسط انسان است که قدمت آن به دوره گندم امر، جو و نخود می رسد (Harlan 1992). قابلیت این گیاه، برای بهبود حاصل خیزی خاک از طریق تثبیت نیتروژن، منجر به کاهش استفاده از کود شده و در سیستم تناوب زراعی عدس - غلات، به افزایش عملکرد غلات کمک می کند (Idrissi et al. 2016). این گیاه، پروتئین، کربوهیدرات، فیبر و مواد معدنی را برای انسان و خوراک دام فراهم می کند (Abraham 2015) و غنی از عناصر تغذیه ای و کم مصرف می باشد (Thavarajah et al. 2011). کشت عدس در ایران بیشتر به صورت دیم و سستی انجام می شود و به همین دلیل است که از تنش خشکی بین فصل و انتهای فصل، آسیب می بیند (Sarker & Erskine 2006). خشکی آخر فصل بر روی رشد و باروری عدس تاثیر گذاشته و آن را کاهش می دهد (Sinha et al. 2018).

مطالعات مشابه در رابطه با تاثیر تنش خشکی بر روی برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی عدس نظیر ارتفاع (Mishra et al. 2018)، محتوای نسبی آب برگ^۱، (Talukdar 2013; Singh et al. 2017; Biju et al. 2018)، پرولین (Mishra et al. 2016; Ahmadpour et al. 2016; Singh et al. 2017; Sinha et al. 2018)، در زمینه تغییرات بیان نسبی ژن ها در تنش های غیر زیستی، در گیاهان هم خانواده عدس، مانند نخود (Hashemi et al. 2013; Sachdeva et al. 2020)، لوبیا (Saeidi et al. 2019; Zdražnik et al. 2019)، ماش (Tian et al. 2016; Abdullahi et al. 2018)، باقلا (Abid et al. 2017; Khan et al. 2019) انجام شده است. تظاهر ژن های زیادی در تنش خشکی به گیاه کمک می کند تا رشد و نمو را به طور بهینه انجام دهد (Singh & Laxmi 2015). در نتیجه فعال شدن یا بازداشته شدن شبکه ای از ژن ها که دامنه ای از سازوکارهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی را ایجاد می کنند، گیاه به تنش پاسخ می دهد. هنگامی که گیاه با تنش خشکی مواجه می شود، تغییراتی در الگوی بیان نسبی ژن ها مشاهده می شود. مطالعه بر روی سازوکارهای تحمل به تنش خشکی در گیاهان می تواند در درک بهتر ماهیت ژنتیکی تحمل به خشکی مفید باشد و در نهایت در بهبود صفات ژنتیکی موثر در تحمل به خشکی از طریق روش های نوین ژنتیک مولکولی کمک کند (Zare et al. 2016).

به دلیل مشکل کمبود آب و تنش خشکی آخر فصل در کشت دیم عدس در ایران، بررسی تغییرات بیان نسبی ژن های شناخته شده دخیل در تحمل به تنش خشکی در این گیاه و در نهایت استفاده از نتایج، جهت غربالگری و به نژادی ژنوتیپ های متحمل به خشکی در عدس در مطالعات آینده، ضروری به نظر می رسد. هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات بیان نسبی و نقش برخی ژن های شناخته شده موثر در تحمل به تنش خشکی در ژنوتیپ حساس و متحمل عدس، می باشد.

^۱. Relative Water Content (RWC)

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: لاین FLIP2002-57L (متحمل به خشکی) و FLIP2002-55L (حساس به خشکی)، برای کشت، مبنی بر عملکرد در مزرعه بر اساس سوابق و مطالعات قبلی، انتخاب شد (Personal correspondence with Dr Chegini). بذر آن‌ها از محل بانک ژن پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهیه شد. این دو لاین، در حال خالص سازی و انجام تحقیقات بر روی آن‌ها هستند و ژنوتیپ‌های امید بخش^۲ به حساب می‌آیند. شش بذر در هر گلدان پلاستیکی به ارتفاع ۱۰ و قطر ۱۲ سانتی‌متر، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در بستر کشت به نسبت ۲:۱:۱ خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ، در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار، در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کشت شد. برای هر واحد آزمایشی ۱۲ گلدان در نظر گرفته شد (Singh et al. 2017). در تاریخ ۲۹ دی ۱۳۹۹ کشت انجام شد. در طول رشد رویشی، دو نوبت محلول ریز مغذی (در هر نوبت ۲ گرم در لیتر آب) به صورت محلول پاشی و سپس دو نوبت کود NPK (در هر نوبت ۳ گرم در لیتر آب همراه با آبیاری) به گلدان‌ها داده شد. تنش خشکی در مرحله ۴۰ برگچه‌ای، به صورت آبیاری براساس ۹۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی خاک گلدان، اعمال شد. با مشاهده تشدید علائم تنش نظیر پیچیدگی، زرد شدن، خشکیدگی و ریزش برگچه‌ها، اعمال تنش خشکی قطع و سپس نمونه برداری از بافت هوایی و ریشه صورت گرفت. وزن تر و خشک اندام هوایی (با ترازوی به دقت ۰/۰۰۱ گرم، ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد)، وزن تر و خشک ریشه (با ترازوی به دقت ۰/۰۰۱ گرم، ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد) (Mafakheri et al. 2011)، ارتفاع بوته، شدت سبزیگی، تعداد برگ (Lentil descriptors, IBPGR 1985) و طول ریشه، ۲۴ ساعت بعد از قطع تنش، اندازه‌گیری شد. ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد برگچه، وجود یا عدم وجود کرک، شدت سبزیگی بوته قبل از نمونه برداری و در طول اعمال تنش، اندازه‌گیری شد.

۱- صفات فیزیولوژیک: ۱-۱- محتوی نسبی آب برگ: آخرین برگ‌های توسعه یافته، بلافاصله درون یخ قرار گرفته و وزن تر^۳ آن‌ها با ترازوی (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری، سپس نمونه‌ها در آب مقطر، به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفتند. وزن اشباع^۴ برگ‌ها اندازه‌گیری و ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفته و وزن خشک^۵ هر کدام اندازه‌گیری شد. با استفاده از رابطه یک، محتوی نسبی آب برگ محاسبه شد (Kumar & Elston 1992).

^۲. Promising lines

^۳. Fresh weight (FW)

^۴. Saturated weight (SW)

^۵. Dry weight (DW)

$$RWC = \frac{Fw - Dw}{Sw - Dw} \times 100$$

رابطه ۱)

Fw، وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه برداری (گرم)

Dw، وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آون (گرم)

Sw، وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر (گرم)

۲-۱- میزان نشت الکترولیتی^۱: برگ پنجم از بالا در فالكون قرار داده و به آن، آب مقطر اضافه شد و نمونه‌ها ۲۴

ساعت در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. با EC متر (WTW آلمان)، EC نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC1). نمونه‌ها در بن‌ماری، یک

ساعت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و بعد در حمام آب یخ قرار گرفتند و مجدداً EC آن‌ها اندازه‌گیری شد (EC2). میزان نشت

الکترولیتی از طریق فرمول زیر برای هر نمونه محاسبه شد (Valentovic et al. 2006):

$$ELI = \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

رابطه ۲)

۳-۱- شاخص سطح برگ^۲: برگ‌های سبز جدا و سطح آن‌ها با Leaf Area Meter (CID آلمان) اندازه‌گیری، سپس

۴۸ ساعت در آون در ۷۵ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. شاخص سطح برگ، برحسب سانتی‌متر

مربع برگرم (cm²/gr) از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Mafakheri et al. 2020; Feng et al. 2013):

$$\text{شاخص سطح برگ} = \frac{\text{سطح برگ}}{\text{وزن خشک برگ}}$$

رابطه ۳)

۲- صفات بیوشیمیایی: ۲-۱- پرولین^۳: ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد به ۰/۵ گرم بافت اندام هوایی

پودر شده اضافه و در حمام یخ قرار داده شد. دو میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به عصاره صاف شده

اضافه شد. نمونه در حمام آب گرم یک ساعت نگهداری و پس از آن، به حمام آب یخ منتقل شد. چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه و

ورتکس شد. جذب‌های خوانده شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر (پلیت ریدر Biotek آمریکا)، در معادله خط استاندارد، جایگزین شده

و مقدار پرولین بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمده و نهایتاً مقدار پرولین از رابطه زیر برحسب میکروگرم برگرم وزن

خشک تعیین شد. در این رابطه، W: وزن نمونه، C: غلظت (μg mL⁻¹) و V: حجم عصاره نهایی (mL) است (Kramer

1969; Bates et al. 1973).

$$M = \frac{C \times V}{W}$$

رابطه ۴)

^۱. Electrolyte Leakage Index (ELI)

^۲. Leaf area index; LAI

^۳. Proline

۲-۲- مالون دی آلدیید^۹: پنج میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار به ۰/۲ گرم برگ پودر شده اضافه و سانتریفیوژ (Hettich آلمان) (چهار درجه سانتی گراد، ۱۴۰۰۰ RPM، به مدت ۱۰ دقیقه) شد. به یک میلی لیتر عصاره حاصل از سانتریفیوژ، یک میلی لیتر محلول تیوباریتوریک اسید حاوی تری کلرواستیک اسید اضافه شد. فالكون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد، نگهداری و سپس به حمام آب یخ منتقل شدند. نمونه‌ها سانتریفیوژ (چهار درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰۰۰ RPM، به مدت ۱۰ دقیقه) شده و پس از آن، میزان جذب در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Hodges et al. 1999). جهت تعیین غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 155$ استفاده و مقدار MDA براساس واحد نانومول در گرم وزن تر محاسبه گردید:

$$\text{MDA} = \frac{\Delta A \times 1000 \times Vt}{155 \times Ws \times Vs} \quad \text{رابطه (۵)}$$

ΔA : تفاوت میزان جذب در طول موج ۶۰۰ از میزان جذب در طول موج ۵۳۲، Vt : حجم کل عصاره استخراج شده، Vs :

حجم عصاره‌ای که در سنجش وارد شد، Ws : وزن نمونه (Hodges et al. 1999; Mafakheri et al. 2011).

۲-۳- پراکسید هیدروژن: به ۰/۵ گرم نمونه برگ پودر شده، ۲/۵ میلی لیتر محلول TCA یک درصد اضافه و نمونه سانتریفیوژ (Hettich آلمان) (چهار درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰۰۰ RPM، به مدت ۱۵ دقیقه) شد. به ۰/۲۵ میلی لیتر از عصاره حاصل از سانتریفیوژ، ۰/۲۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH=7) و ۰/۵ میلی لیتر محلول پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد. محلول‌های استاندارد پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بین دو تا ۱۰ میلی مولار تهیه و نمودار استاندارد رسم و میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد (Velikova et al. 2000).

۲-۴- کربوهیدرات: اتانول ۸۰ درصد در بن‌ماری (۸۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. ۷/۵ میلی لیتر اتانول داغ به ۰/۵ گرم بافت برگ خشک شده کوبیده شده در هاون (۲۴ ساعت در آون، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد)، اضافه و سپس نمونه‌ها ورتکس و سانتریفیوژ (Hettich آلمان) (چهار درجه سانتی‌گراد، ۳۰۰۰ RPM، ۱۰ دقیقه) شد. عصاره صاف شده از سانتریفیوژ، جدا و یک ساعت در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این فاصله، بافت گیاهی مانده، جدا و در انکوباتور (۴۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از خشک شدن بافت، مقدار مشخصی آب مقطر به هر نمونه اضافه و در بن‌ماری جو شانه شد تا عصاره ژلاتینی نشاسته به دست آید. به یک میلی لیتر از عصاره نشاسته، ۰/۵ میلی لیتر محلول فنل پنج درصد و ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه و سپس ۴۵ دقیقه مهلت داده شد تا رنگ محلول‌ها تثبیت شود. جرم زرد یا سفید رنگ موجود در پتری‌های خارج شده از آون با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر شسته و در فالكون ۵۰ میلی لیتر به صورت جداگانه ریخته شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر سولفات روی پنج درصد و ۲/۳۵ میلی لیتر محلول هیدروکسید باریوم ۰/۳ نرمال ورتکس و به فالكون‌های حاوی نمونه اضافه و نمونه‌ها

⁹. Malondialdehyde (MDA)

سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۳۰۰۰ RPM، چهار درجه سانتی‌گراد) شد. یک میلی‌لیتر از فاز مایع جدا و ۰/۵ میلی‌لیتر فنل پنج در صد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. مهلت داده شد تا رنگ‌ها تثبیت شوند. جذب‌های خوانده شده در طول موج ۴۸۵ نانومتر در معادله خط استاندارد جایگزین و براساس آن مقدار کربوهیدرات در نمونه‌های مجهول برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمده و نهایتاً مقدار آن از رابطه زیر بر حسب میکروگرم بر گرم وزن خشک تعیین شد:

$$M = \frac{C \times V}{W} \quad \text{(رابطه ۶)}$$

W وزن خشک نمونه (گرم)، C: غلظت ($\mu\text{g mL}^{-1}$)، V: حجم عصاره نهایی (mL) (Sturgeon 1990).

۲-۵- کلروفیل a, b و کارتنوئید: به ۰/۵ گرم بافت پودر شده، ۲۰ میلی‌لیتر استن ۷۰ درصد، اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Hettich آلمان) (۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ RPM، چهار درجه سانتی‌گراد) شد. عصاره فوقانی جدا و داخل پلیت ریخته و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئید قرائت شد. میزان کلروفیل a, b و کارتنوئید طبق روابط زیر محاسبه شد (Lichtenthaler & Wellburn 1983):

$$\text{Chla} = (12.21 \times A663) - (2.81 \times A646) \quad \text{(رابطه ۷)}$$

$$\text{Chlb} = (20.13 \times A646) - (5.03 \times A663) \quad \text{(رابطه ۸)}$$

$$\text{Cartenoides} = [(1000 \times A470) - (3.27 \times \text{Cha}) - (104 \times \text{Chb})] / 229 \quad \text{(رابطه ۹)}$$

۲-۶- پروتئین کل: غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول استاندارد حاوی سرم آلبومین گاوی به همراه بافر بردفورد تهیه و منحنی استاندارد رسم شد. در هر چاهک پلیت، ۲۰۰ میکرولیتر بافر بردفورد، سپس ۱۰ میکرولیتر عصاره نمونه‌ها اضافه شد. جذب‌های خوانده شده در طول موج ۵۹۵ نانومتر در معادله خط استاندارد جایگزین، و براساس آن، مقدار پروتئین در نمونه‌های مجهول برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Bradford 1976).

۲-۷- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: یک میلی‌لیتر از بافر استخراج Tris-HCl یک مولار حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدون دو درصد به ۰/۲ گرم بافت برگ اضافه و پس از هم‌وزن‌نیزه کردن، نمونه‌ها سانتریفیوژ (Hettich آلمان) (به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۵۰۰ RPM، چهار درجه سانتی‌گراد) شدند. بعد از پایان سانتریفیوژ، عصاره بالایی برداشته و به تیوب جدید منتقل و از آن برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز و غلظت پروتئین برگ استفاده شد. سنجش فعالیت کاتالاز به روش (Aebi 1983)، انجام شد. ۱۹۹۰ میکرولیتر از بافر فسفات‌پتا سیم ۵۰ میلی‌مولار، به همراه ۱۰ میکرولیتر عصاره در هر دو کووت اسپکتروفتومتر (Shimadzu ژاپن) ریخته و دستگاه در طول موج ۲۴۰ نانومتر بلانک شد.

سپس ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید خالص به نمونه اضافه و میزان جذب قرائت شد. منحنی فعالیت کاتالاز در ۲۴۰ ثانیه و برحسب Abs min^{-1} ترسیم شد. فعالیت کاتالاز برحسب $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ محاسبه شد:

رابطه (۱۰)

$$\frac{(\text{Abs. initial} - \text{Abs. final}) \times \text{Vol. reaction mix (ml)}}{3 \times \text{Time reaction (min)} \times (\text{protein conc.}) (\text{mg/ml}) \times \text{Vol. sample}}$$

$$= 0.03958 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش (Nakano & Asada 1987)، انجام شد. ۱۹۹۰ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار حاوی آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار به همراه ۱۰ میکرولیتر عصاره در هر دو کووت ریخته و دستگاه در طول موج ۲۹۰ نانومتر بلانک شد. ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید خالص به کووت نمونه اضافه و جذب نمونه در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه گیری شد. منحنی فعالیت آسکوربات پراکسیداز برحسب Abs min^{-1} ترسیم شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز، برحسب $\mu\text{mol Ascorbate min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ محاسبه شد:

رابطه (۱۱)

$$\frac{(\text{Abs. initial} - \text{Abs. final}) \times \text{Vol. reaction mix (ml)}}{3 \times \text{Time reaction (min)} \times (\text{protein conc.}) (\text{mg/ml}) \times \text{Vol. sample}}$$

$$= 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

برای سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز، ابتدا ۱۹۹۰ میکرولیتر از محلول فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار حاوی گایاکول ۱۰ میلی مولار، به همراه ۱۰ میکرولیتر عصاره در هر دو کووت ریخته و دستگاه در طول موج ۴۷۰ نانومتر بلانک شد. سپس به کووت نمونه ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید خالص اضافه و قرائت شد. فعالیت پراکسیداز $\mu\text{mol Guaiacol min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ محاسبه شد:

رابطه (۱۲)

$$\frac{(\text{Abs. initial} - \text{Abs. final}) \times \text{Vol. reaction mix (ml)}}{3 \times \text{Time reaction (min)} \times (\text{protein conc.}) (\text{mg/ml}) \times \text{Vol. sample}}$$

$$= 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

(Chance & Maehly 1955).

بیان برخی ژن های موثر در تحمل به تنش خشکی: با بررسی در منابع علمی، تعدادی ژن موثر در تحمل به تنش خشکی در برخی گیاهان خانواده بقولات، انتخاب و با مراجعه به پایگاه داده (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov)، شماره دسترسی^{۱۰} آن ها مشخص شد. سپس برخی از این ژن ها با کمک هم ردیفی^{۱۱} در گیاه عدس پیدا شدند. به منظور شناسایی توالی

^{۱۰}. Accession number

^{۱۱}. Alignment

توافقی^{۱۲} ناحیه رمز کننده^{۱۳} ژن‌های انتخابی گیاه عدس، ابتدا توالی‌های قطعات بیانی^{۱۴} و خوانش^{۱۵} ژن‌های *Aquaporin PIP2*، *evolving enhancer protein 2 (OEE2)*، *Fructose-bisphosphate aldolase (FBA)*، *(AQUAPIP2)*، *WRKY1*، *Oxygen* و *Xyloglucan endotransglucosylasehydrolase (XTH)* حاصل از پروژه‌های توالی‌یابی آر‌ان‌ای عدس در پایگاه NCBI SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) با استفاده از توالی‌های ارتولوگ مشابه در سایر گیاهان با کمک BLAST Offline (v.2.7.0) شنا سایی و مجموع این قطعات، با استفاده از نرم‌افزار Codon Code aligner (Ver. 5.0.1) با یک‌دیگر سرهم^{۱۶} شد. در مرحله بعد، چارچوب قرائت این ژن‌ها با بررسی توالی حاصل در ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) شناسایی و به‌منظور تأیید این چارچوب و ORF موردنظر، از نرم‌افزار BLASTp استفاده شد. بیان نسبی ژن‌های مذکور در تنش خشکی در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در مرحله رویشی در برگ‌های جوان (به دلیل محدودیت در مواد، وسایل و زمان) در دو سطح شاهد و تنش شدید، با استفاده از qRT-PCR بررسی شد. جهت پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین و شناسایی جایگاه پروتئین ژن‌های پیش‌بینی شده در عدس به ترتیب، از دیتابیس Sopma و Deeploc استفاده شد. برای پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین، ابتدا با مراجعه به دیتابیس RCSB (<https://www.rcsb.org>)، پروتئین‌های مشابه به پروتئین مورد نظر، در سایر جانداران یافت شد و با مراجعه به دیتابیس Swiss prot (<https://www.expasy.org>)، مدل سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین‌های مورد نظر، رسم شد. با نرم‌افزارهای Oligo7 و PerlPrimer، آغازگرهای مناسب جهت تکثیر ژن‌ها طراحی شد. سپس آغازگرها از نظر تشکیل Self dimer، Hetero primer و Hairpin، دمای ذوب و درصد GC، در نرم‌افزار آنلاین OligoAnalyzer3.1 بررسی شدند. جدول ۱، آغازگرهای طراحی شده را نشان می‌دهد. بازده و کارایی آغازگرهای مختص هر ژن با آزمایش qRT-PCR چند نمونه بررسی شد و دمای مناسب برای اتصال هر جفت آغازگر به دست‌آمد.

۱ استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش Real Time: استخراج RNA توسط کیت دنایزست انجام گرفت. بررسی کمی و کیفی آن، با نانودراپ (Thermo scientific آمریکا) و الکتروفورز (آگارز یک درصد) انجام شد. تیمار DNase اعمال و سپس سنتز cDNA توسط کیت شرکت پارس توس انجام شد. بررسی کمی و کیفی cDNA سنتز شده، با نانودراپ و الکتروفورز (دناژن ایران) (آگارز دو درصد) انجام شد، از آغازگر ژن 18srRNA (Vandemark and Saha. 2013) به عنوان

^{۱۲}. Consensus

^{۱۳}. CDS (Coding DNA Sequence)

^{۱۴}. Expressed Sequence Tag (EST)

^{۱۵}. Reads

^{۱۶}. Assemble

کنترل داخلی استفاده شد. واکنش‌های ریل‌تایم (Qiagen آلمان) در ۴۰ چرخه، در هر سیکل، ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای اتصال آغازگر و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جدول ۱. اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

Table 1. Oligonucleotide primer names and sequence

ردیف	نام آغازگر	توالی ۵' به ۳'	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	طول قطعه تکثیر شده
Row	Primer name	Primer sequence 5' to 3'	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
1	AQUAPIP2-F	5'TATATGTGGTGCTGGTGTGGT 3'	57.87	180-190 bp
2	AQUAPIP2-R	5'AGCATTCTCTTGGCATCAGTG 3'	58.39	180-190 bp
3	FBA-F	5'ACCTTGCTGAGAACAATGTCC 3'	57.87	180-190 bp
4	FBA-R	5'TCAACCTCAGATTGTCCACCA 3'	57.87	180-190 bp
5	OEE2-F	5'TTGGACAACTGATTCGGAGG 3'	57.87	180-190 bp
6	OEE2-R	5'TTTCATCCTTTACCGTTGCTG 3'	58.39	180-190 bp
7	WRKY-F	5'TATGGTTCCGTTTCAAGCTGTC 3'	58.39	180-190 bp
8	WRKY-R	5'CGGTACATGGCTCAAGTATCAC3'	60.25	180-190 bp
9	XTH-F	5'TTTATGGAACGCTGATGATTGG3'	56.53	180-190 bp
10	XTH-R	5'GCATCAAGATCACGAACTCAG3'	58.39	180-190 bp
11	18srRNA-F	5'ACGTCCCTGCCCTTTGTACAC 3'	61.78	101 bp
12	18srRNA-F	5'CACTTCACCGGACCATTCAAT 3'	57.87	101 bp

برای محاسبه میزان بیان نسبی هر ژن در نمونه‌های تحت تنش نسبت به نمونه‌های شاهد، از فرمول زیر، استفاده شد

(Livak and Schmittgen 2001):

$$\text{Fold change} = \frac{2^{-(\Delta Ct)_{\text{sample}}}}{2^{-(\Delta Ct)_{\text{Control}}}} \quad (\text{رابطه ۱۳})$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزارهای SPSS 26، SAS 9.4، انجام شد. برای رسم نمودارهای مقایسه میانگین از

Excel 2013 استفاده شد. برای اطمینان از این که خطای داده‌ها توزیع نرمال دارند، از آزمون Kolmogorov-Smirnov در

Minitab17 استفاده شد.

نتایج و بحث

افزایش شدت تنش خشکی تاثیر معنی‌داری (۰/۰۱) بر تغییرات ارتفاع، تعداد برگ و برگچه، شدت سبزیگی، طول ریشه، وزن

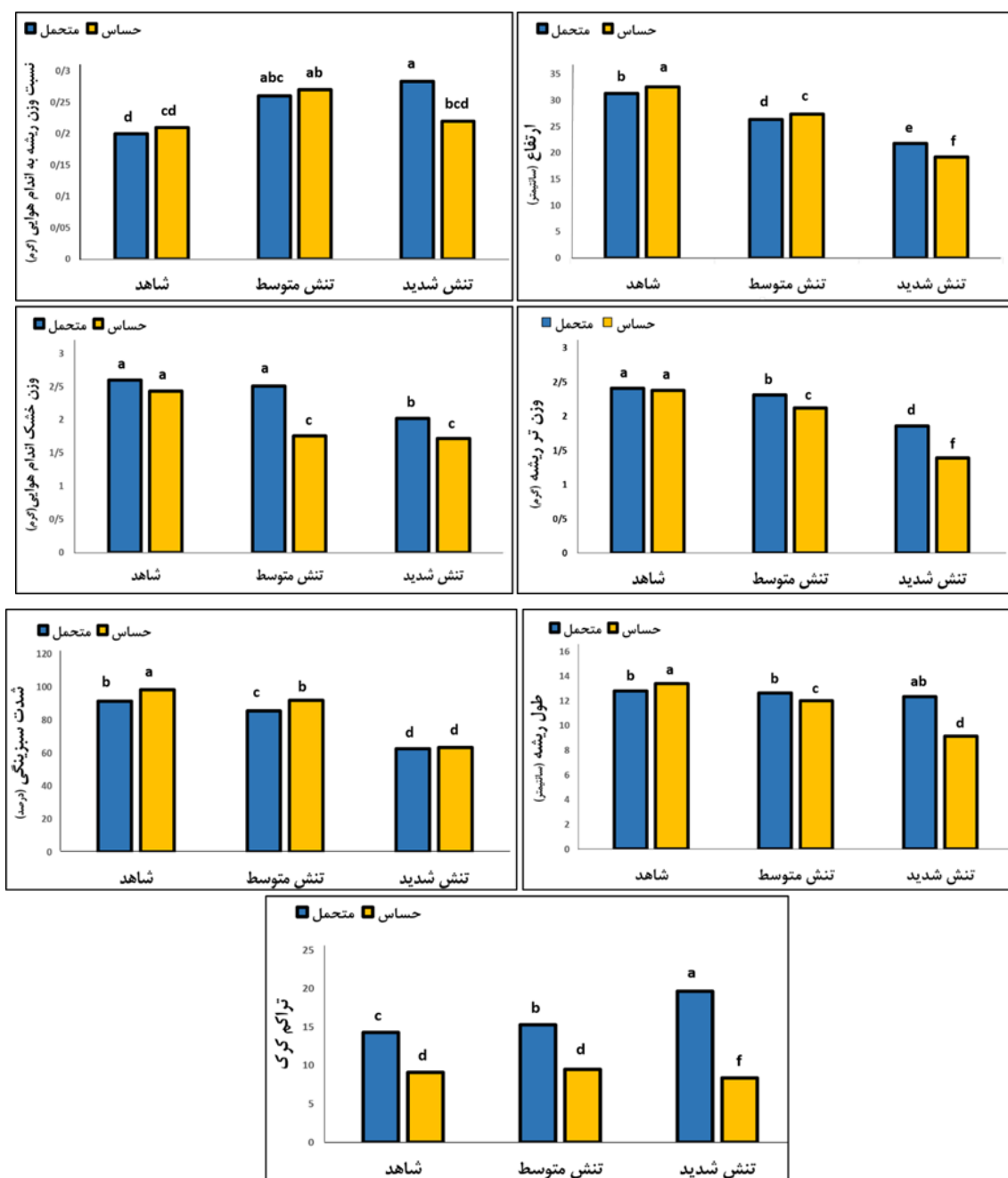
تر و خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، نسبت وزن ریشه به اندام هوایی و تراکم کرک برگ داشت. دو ژنوتیپ از نظر ارتفاع،

شدت سبزیگی، طول ریشه، کرک، وزن تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی، پاسخ‌های متفاوتی به تنش نشان دادند. میان دو ژنوتیپ

نسبت وزن تر ریشه به اندام هوایی تا تنش متوسط، به دلیل تحت تاثیر قرار گرفتن بیشتر بخش هوایی و توقف زودتر رشد اندام

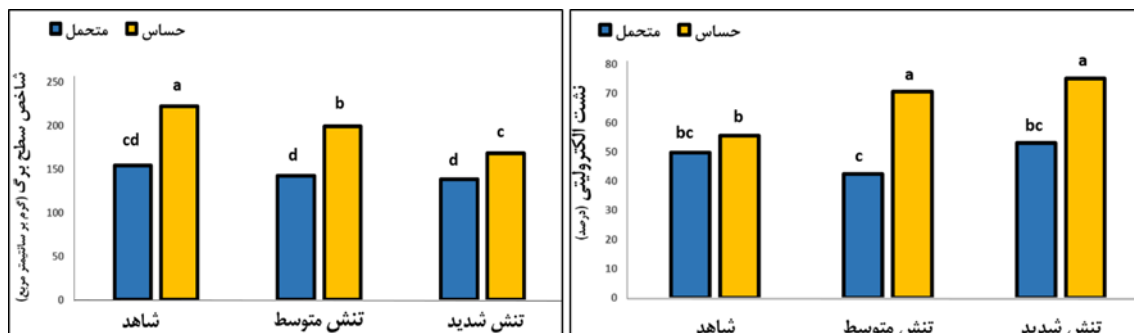
هوایی نسبت به ریشه (Chiatante et al. 2006)، افزایش یافت و این افزایش تا تنش شدید در ژنوتیپ متحمل مشاهده شد. با افزایش شدت تنش، ارتفاع بوته در هر دو ژنوتیپ، کاهش معنی‌دار یافت. در تنش آبی، فشار تورژسانس کاهش، به دنبال آن انبساط و رشد سلولی کم و در نتیجه ارتفاع بوته کاهش میابد (Tohidi 2015). نتایج تجزیه واریانس در شبدر ایرانی و شبدر برسیم نشان داد که اثر تنش خشکی و اثر ژنوتیپ بر ارتفاع بوته در چین اول و چین دوم، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (Alizadeh et al. 2017). در اثر تنش خشکی، به دلیل تجمع بیشتر بیومس تولیدی گیاه در ریشه و کاهش میزان کلروفیل II و در نهایت فتوسنتز، وزن تر و خشک اندام هوایی کاهش یافت (Viera et al. 1991; Albouchi et al. 2003). در مطالعه‌ای در چهار گونه براسیکا که به مدت ۲۴ روز تحت شدت‌های مختلف تنش خشکی قرار گرفته بودند، افزایش شدت تنش، باعث کاهش معنی‌داری در وزن تر ساقه شد (Ashraf and Mehmood 1990). اگر تنها بخشی از سیستم ریشه در معرض تنش خشکی قرار گیرد، میزان رشد برگ‌ها کاهش خواهد یافت و این کاهش رشد برگ‌ها در پاسخ به تنش خشکی در منطقه ریشه ارتباط نزدیکی با وضعیت آب برگ‌ها دارد. در مراحل اولیه رشد در شرایط تنش خشکی، کاهش رشد بخش هوایی عمدتاً ناشی از وضعیت آب برگ‌ها و قابلیت جذب آب سیستم ریشه است (Volkmar 1997). نتایج تاثیر تنش خشکی بر صفات مرفولوژیک مورد نظر، در شکل ۱ قابل مشاهده است. افزایش سطح تنش خشکی، افزایش معنی‌دار (۰/۰۵) میزان نشت الکترولیتی در هر دو ژنوتیپ را در پی داشت. این تاثیر در ژنوتیپ حساس بیشتر بود که نشان‌دهنده آسیب‌پذیری بیشتر است. در تنش خشکی، غشا در معرض افزایش نفوذ پذیری و کاهش پایداری قرار می‌گیرد (Blokhina et al. 2003). در ارقام متحمل، میزان کم نشت الکترولیتی به علت قابلیت بالای آن‌ها در حفظ ساختار غشاء سلولی می‌باشد (Khazaie et al. 2018). در مطالعه‌ای در توتون، در رقم متحمل به خشکی، میزان نشت الکترولیتی نسبت به رقم حساس، بعد از ۱۰ تا ۱۴ روز تیمار، کاهش کمتری داشت که بیانگر آن است که ارقام متحمل، کمتر در معرض آسیب‌پذیری سلولی قرار گرفتند (Xinhong et al. 2017). افزایش شدت تنش، تاثیر معنی‌داری (۰/۰۱) بر تغییرات شاخص سطح برگ در ژنوتیپ حساس داشت. همچنین تفاوت معنی‌داری در (۰/۰۵) در اثرات متقابل ژنوتیپ در تنش، وجود داشت. در تنش خشکی، ارقام متحمل با تولید برگ‌های کوچک‌تر در کل، سطح برگ کمتری در مقایسه با ارقام حساس تولید می‌کنند که منجر به کاهش هدر رفت آب و سایه‌اندازی می‌شود (Khazaie and Kafi 2003). نتایج مشابهی در لوبیا مشاهده شد (Ghanbari et al. 2015). با افزایش شدت تنش، محتوای نسبی آب برگ در هر دو ژنوتیپ، به طور معنی‌دار (۰/۰۱)، کاهش یافت. تفاوت معنی‌داری در اثرات متقابل ژنوتیپ در تنش مشاهده نشد. محتوای نسبی آب برگ بالا، یک سازوکار تحمل به تنش خشکی است و بالا بودن آن، در نتیجه تنظیم اسمزی بیشتر و کمتر کشسانی بودن دیواره سلولی می‌باشد (Ritchie et al. 1990). هنگامی که محتوای نسبی آب برگ کم شود، به دنبال آن وزن تر و خشک اندام هوایی کاهش می‌آید، چون وزن برگ کاهش یافته است. با کاهش آبیاری، محتوای نسبی آب برگ در کنگد از ۷۹/۸ به ۶۶/۵ درصد کاهش یافت (Mensah et al. 2006). نتایج حاصل، در شکل ۲ قابل مشاهده است. افزایش سطح تنش خشکی تاثیر معنی‌داری (۰/۰۱) بر کاهش کلروفیل و پروتئین کل برگ و افزایش معنی‌دار (۰/۰۱) کارتنوئید، پرولین، مالون دی‌آلدهید، غلظت هیدروژن پراکسید،

کربوهیدرات و فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز داشت. ژنوتیپها از نظر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز، پروتئین و کربوهیدرات، پاسخهای متفاوتی به سطوح مختلف تنش نشان دادند.



شکل ۱. نمودار مقایسه میانگین صفات میانگین نسبت وزن ریشه به اندام هوایی، ارتفاع، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه، شدت سبزینگی، طول ریشه و تراکم کرک عدس تحت تنش خشکی

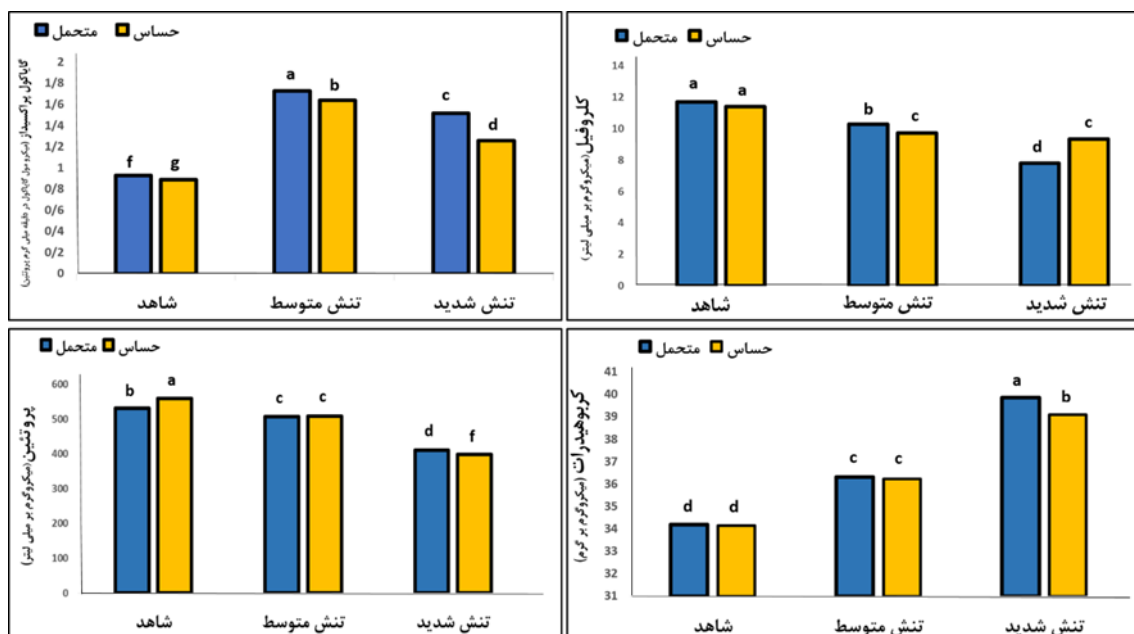
Figure 1. Root to shoot weight ratio, height, shoot dry weight, root fresh weight, greenness, root length and trichome density traits mean comparison chart of lentil in drought stress



شکل ۲. نمودار مقایسه میانگین صفات شاخص سطح برگ و میزان نشت الکترولیتی عدس تحت تنش خشکی

Figure 2. Leaf area index and electrolyte leakage index traits mean comparison chart of lentil in drought stress

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ تا تنش متوسط افزایش و از تنش متوسط تا شدید کاهش یافت (شکل ۳)، به این دلیل که با افزایش تنش، ساختار پروتئینی آنزیم گایاکول پراکسیداز، آسیب دیده و باعث کاهش فعالیت آن می‌شود (Amini et al. 2008). افزایش شدت تنش خشکی، باعث افزایش گونه‌های آزاد اکسیژن و منجر به آسیب غشای تیلاکوئید و کاهش محتوای کلروفیل می‌شود. (Kapanigowda et al. 2013). نتیجه مشابهی توسط (Fracasso et al. 2016) در ژنوتیپ‌های سورگوم گزارش شد که در اثر افزایش تنش خشکی، میزان کلروفیل به طور قابل توجهی افزایش یافت. بر اثر افزایش تنش، محتوای پروکلین در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت و این افزایش در ژنوتیپ متحمل، نسبت به حساس بیشتر بود. نتیجه مشابهی در مطالعه‌ای بر روی بادام زمینی مشاهده شد (Gunes et al. 2008). وقتی کمبود آب شدید باشد، اسمپروپروتکتنت‌هایی از قبیل کربوهیدرات و پروکلین در بافت‌های گیاه تجمع می‌یابد و به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی، اثرات کمبود آب را خنثی می‌کند (Kramer 1969; Bates et al. 1973). میزان مالون‌دی‌آلدهید در اثر افزایش تنش در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. در اثر تخریب پراکسیداسیونی اسیدهای چرب اشباع نشده، مالون‌دی‌آلدهید به وجود می‌آید که به عنوان یک نشانگر زیستی، برای تشخیص میزان صدمات اکسیداتیو لیبیدها به کار می‌رود و مقدار آن بسته به نوع تنش زیستی و غیر زیستی متفاوت است (Mittler 2002). ارقامی که در مواجهه با تنش، مالون‌دی‌آلدهید در آن‌ها به میزان کمتری افزایش می‌یابد، مقاومت نسبی بالاتری به تنش دارند (Lata et al. 2011). در برر سی در *Lycium ruthenicum* در خشکی، مالون‌دی‌آلدهید برگ‌ها و ریشه‌ها، به طور معنی‌داری افزایش یافت (Guo et al. 2018). گزارشی در نخود، به افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ در اثر تنش خشکی، اشاره دارد (Sanchez et al. 1998). کاتالاز به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و در حذف پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسی‌زوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی بر عهده دارد (Niknam et al. 2006; Simova-Stoilova et al. 2008). در مطالعه‌ای، فعالیت بیشتر کاتالاز در شرایط تنش و در واریته متحمل را دلیلی بر قابلیت بیشتر این واریته در زدودن گونه‌های فعال اکسیژن و توانایی آن در تحمل به تنش ذکر شده است (Koca et al. 2007).



شکل ۳. نمودار مقایسه میانگین صفات میزان گایاکول پراکسیداز، کلروفیل، پروتئین و کربوهیدرات عدس تحت تنش خشکی

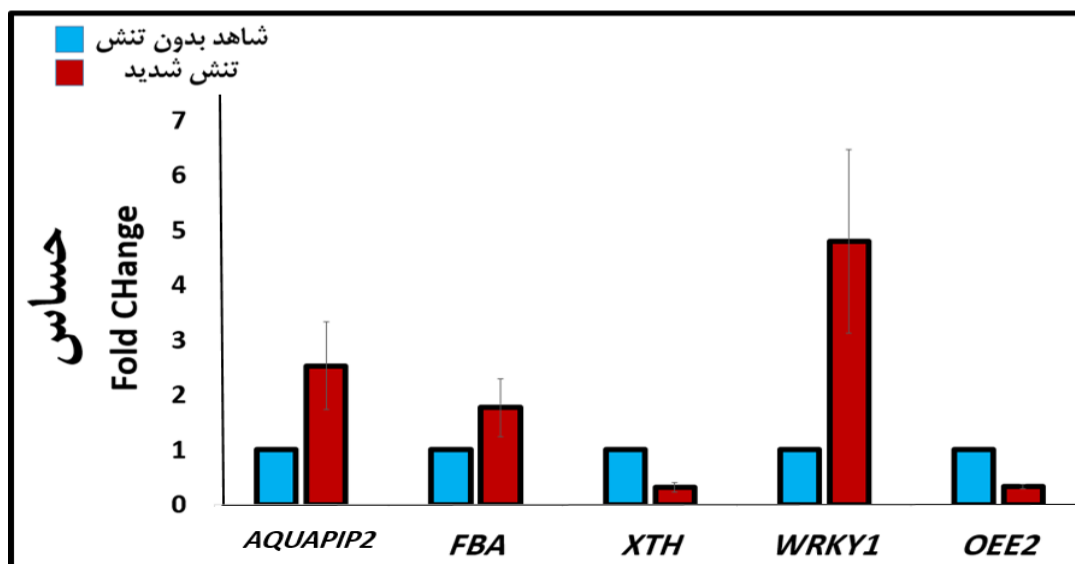
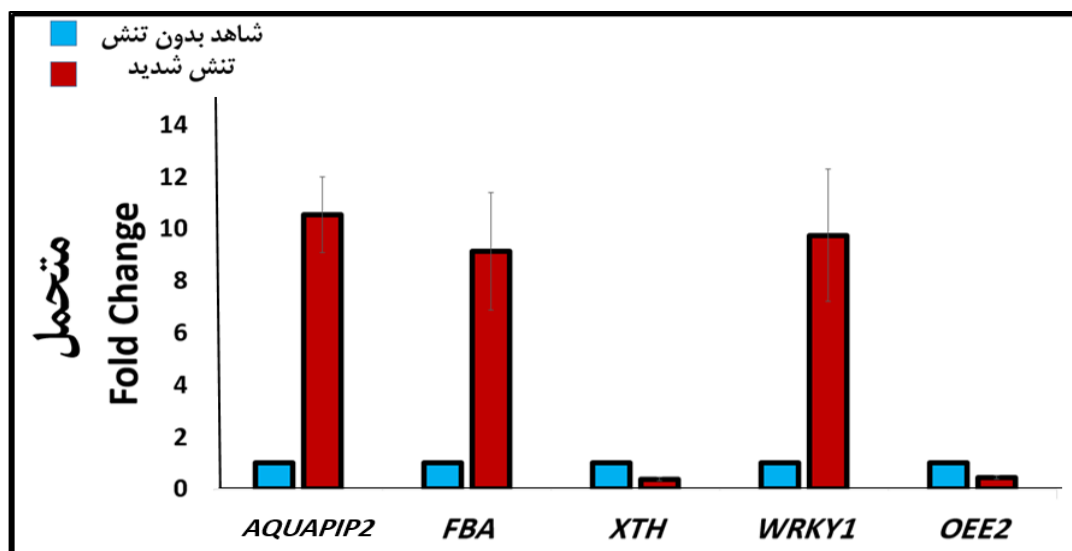
Figure 3. Guaiacol peroxidase, chlorophyll, protein and carbohydrate content traits mean comparison chart of lentil in drought stress

بررسی بیان نسبی ژن‌های موثر در تنش خشکی: با توجه به شکل ۴، ژن‌های *FBA*، *AQUAPIP2* و

WRKY1، با افزایش شدت تنش، در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش نسبی بیان و دو ژن *XTH* و *OEE2* کاهش نسبی بیان داشتند. بیان نسبی *OEE2*، *WRKY1*، *XTH*، *FBA*، *AQUAPIP2* در نمونه‌های تیمار تحت تنش شدید نسبت به شاهد، در ژنوتیپ متحمل، به ترتیب، حدود ۱۰، ۹، ۰/۳، ۹، ۰/۴ برابر و در ژنوتیپ حساس به ترتیب حدود ۲/۵، ۲، ۰/۳، ۵، ۰/۴ برابر بود.

AQUA PIP2: میزان بیان نسبی این ژن در شرایط تنش شدید خشکی به طور معنی‌داری (۰/۰۵) افزایش یافت. انتقال

آب در غشا توسط آکوپورین کنترل می‌شود (Tyerman et al. 2002). در مطالعه‌ای، افزایش بیان نسبی *TaAQP 7* منجر به افزایش متابولیسم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش تجمع گونه‌های آزاد اکسیژن و آسیب غشایی شده و در نتیجه، تحمل به تنش خشکی را در توتون تراریخت القا می‌کند (Zhou et al. 2012). بیان نسبی این ژن، بر پتانسیل اسمزی، جوانه‌زنی بذر، رسیدگی میوه، تقسیم سلولی و محتوای نسبی آب برگ، تاثیر می‌گذارد (Alexandersson et al. 2005; Zhuang et al. 2015; Wang et al. 2017).



شکل ۴. نمودار بیان نسبی ژن‌ها در تنش شدید نسبت به شاهد (کنترل) در دو ژنوتیپ

Figure 4. Gene expression in both genotypes under drought stress compared to control

FBA^{17} : میزان بیان نسبی این ژن در شرایط تنش شدید خشکی به طور معنی‌داری (۰/۰۱) افزایش یافت. در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس افزایش بیان نسبی معنی‌داری (۰/۰۵) مشاهده شد. این آنزیم در گیاهان دو ایزوفرم کلروپلاستی و سیتوسلی دارد (Lebherz et al. 1984; Lu et al. 2012). ایزوفرم کلروپلاستی آنزیم ضروری در چرخه کالوین است که متابولیت‌های لازم برای چرخه بیوسنتز نشاسته را بیوسنتز می‌کند (Sonnewald et al. 1994). در مقایسه، ایزوفرم سیتوسلی یکی از اجزای بیوسنتز ساکارز و مسیر گلوکوئوژنز است که در آن، تولید FBP را کاتالیز می‌کند (Fan et al. 2009). FBA تجمع فروکتوز

¹⁷ . Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

۶-۱ بیس فسفات و سدوفسفات ۷-۱ بیس فسفات^{۱۸} در چرخه کالوین در پلاستیدها را کاتالیز می کند (Flechner et al. 1999). میزان mRNA ژن *FBA* در پاسخ به سرما و هیدروژن پراکسید در *Codonopsis lanceolate* و در *Sesuvium portulacastrum* به شوری زیاد، خشکی و آبسیزیک اسید افزایش یافت (Purev et al. 2008; Fan et al. 2009). **XTH**: بیان نسبی این ژن در شرایط تنش شدید خشکی به طور معنی داری (۰/۰۵) کاهش یافت. این آنزیم، برش زنجیره های زایلوگلوکان^{۱۹} و تبدیل قطعات جدید با انتهای کاهشی به دیگر زایلوگلوکان یا به آب را انجام می دهد. XTH ها یک نوع سست کردن دیواره سلولی را که منجر به توسعه دیواره سلولی با برش و ساخت دوباره پیوند دیواره ای XG و یا در بعضی موارد با پیوند دادن دوباره با دیگر زنجیره های XG ترشح شده جدید، کاتالیز می کنند (Fry et al. 1992; Nishitani and Tominaga 1992; Thompson et al. 1997). آنزیم های XTH با بازسازی دیواره سلولی در فرآیندهای تقسیم سلولی و یا رشد، نقش بالقوه را در پاسخ به تنش خشکی، نشان می دهند. کاهش بیان نسبی این ژن در اثر تنش خشکی منجر به کاهش رشد طولی و ارتفاع در هر دو ژنوتیپ شد. همبستگی بین سطوح فعالیت این آنزیم و رشد طولی، در گیاهان مختلف مانند آرابیدوپسیس، تنباکو، گوجه فرنگی، برنج، نخود فرنگی و خیار مشاهده شده است (Pritchard et al. 1993; Antosiewicz et al. 1997; Uozu et al. 2000).

WRKY1: میزان بیان نسبی این ژن در شرایط تنش شدید خشکی به طور معنی داری (۰/۰۵) افزایش یافت. عوامل رونویسی *WRKY* می توانند به طور موثری با المنت های W-box ترکیب شده و رونویسی ژن های پایین دست را فعال یا مهار کنند. پروتئین های *WRKY* می توانند مستقیماً بیان نسبی ژن های موثر در تحمل به خشکی را تنظیم کنند. برای مثال، در سورگوم *SbWRKY30*، بیان نسبی ژن دخیل در پاسخ به خشکی *SbRD19* را با اتصال به المنت W-box راه انداز *SbRD19* تنظیم می کند و سلول گیاهی را از آسیب گونه های آزاد اکسیژن، حفظ کرده و باعث افزایش تحمل به تنش خشکی می شود (Yang et al. 2020).

OEE2: میزان بیان نسبی این ژن در شرایط تنش شدید خشکی به طور معنی داری (۰/۰۱) کاهش یافت. این پروتئین مرتبط با واکنش نوری و یک جز مهم کمپلکس پروتئینی Oxygen evolving در فتوسنتز II می باشد. کمپلکس Oxygen Evolving گیاهان تکامل یافته تر، حاوی شش پروتئین داخلی (D1، D2، CP47، CP43 و زیر واحدهای آلفا و بتای سیتوکروم b559) و سه پروتئین خارجی (۱۸، ۲۳، ۳۳ kDa) می باشد که نقش ضروری در تقویت فتوسنتزی اکسیژن، ایفا می کنند (Papageorgiou and Murata 1995). در آزمایشی در چغندر قند، تعداد *OEE* در برگ های چغندر قند در تنش خشکی، کاهش پیدا کرد (Hajheidari et al. 2005). در نخود، بیان نسبی ژن پروتئین تقویت کننده اکسیژن در تنش خشکی کاهش

¹⁸. Sedoheptulose-1,7-biphosphate

¹⁹. Xyloglucan (XG)

یافت (CEVIK et al. 2019). پیش بینی ساختار ثانویه و سه بعدی پروتئین، به درک بهتر ساختار و عملکرد پروتئین حاصل از این ژن‌ها کمک می‌کند. در جدول ۲، پروتئین‌های مشابه با پروتئین هر ژن در سایر جانداران با در صد تشابه بالا، ساختار ثانویه پیش‌بینی شده برای پروتئین فرضی هر ژن و ویژگی‌ها و جایگاه فرضی آن‌ها، بیان شده است. پروتئین مشابه به پروتئین AQUAPIP2 در عدس، پروتئین AQUASoPIP2 در اسفناج (با میزان تشابه ۷۲ درصد)، است. مدل سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین این ژن، هموترامر بوده و ساختار ثانویه آن دارای یک پیوند دی‌سولفیدی، یک پیوند گاما ترن، ۱۱ پیوند آلفا هلیکس و ۱۲ پیوند بتا ترن است و جایگاه این پروتئین در غشای سلول پیش‌بینی شده است. پروتئین حاصل از ژن *FBA* در عدس، مشابه پروتئین *FBA* در آرابیدوپسیس (با میزان تشابه ۵۷ درصد)، می‌باشد. ساختار سه بعدی فرضی برای این پروتئین، هموترامر بوده و ساختار ثانویه فرضی آن دارای چهار پیوند گاماترن، ۱۶ پیوند آلفا هلیکس و ۱۵ پیوند بتا ترن می‌باشد و جایگاه این پروتئین در سیتوسل پیش‌بینی شده است. نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. پروتئین‌های مشابه، درصد تشابه با پروتئین مورد نظر و ویژگی‌های ساختار ثانویه مدل‌های پیش‌بینی شده

Table 2. Similar proteins to selected ones, similarity and predicted secondary structural features

جایگاه	β -turn	α -helix	γ -turn	دی سولفید	البگومر	میزان تشابه	جاندار	پروتئین مشابه	ژن
Position				Disulfide bond	Oligomer	%Similarity	Organism	Similar protein	Gene
غشای سلول Cell membrane	12	11	1	1	هموترامر Homotetramer	72	<i>Spinacia oleracea</i>	AQUASoPIP2	<i>AQUAPIP2</i>
سیتوسل Cytosol	15	16	4		هموترامر Homotetramer	57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FBA	<i>FBA</i>
دیواره سلولی Cell wall	25	11	2	2	مونومر Monomer	85	<i>Populus tremula</i>	XTH	<i>XTH</i>
نوکلئوس Nucleus	5				مونومر Monomer	60	<i>Arabidopsis thaliana</i>	WRKY1	<i>WRKY1</i>
غشای تیلاکوئید Thylakoid membrane	22	10	2		مونومر Monomer	95	<i>Pisum sativum</i>	C2S2M2-typePSII-LHCII	<i>OEE2</i>

نتیجه‌گیری: ژن‌های *AQUAPIP2*، *FBA*، *WRKY1*، *XTH* و *OEE2* عدس با هم‌ردیفی توالی‌های ارتولوگ در سایر گیاهان، شناسایی شدند. برای سنجش میزان بیان نسبی این ژن‌ها در شاهد و تنش شدید خشکی، از qRT-PCR استفاده شد. تجزیه تحلیل داده‌های qRT-PCR نشان داد که میزان بیان نسبی ژن‌های *AQUAPIP2*، *FBA* و *WRKY1* در تنش شدید نسبت به شاهد در هر دو ژنوتیپ، افزایش معنی‌دار داشت. بیان *XTH* و *OEE2* در تنش شدید، نسبت به شاهد، در هر دو ژنوتیپ، کاهش معنی‌داری داشت. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیک نشان داد که با افزایش شدت تنش، کاهش در

ارتفاع، تعداد برگ، تعداد برگچه و شدت سبزینگی، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه، هم‌چنین با افزایش سطح تنش، افزایش در تراکم کرک مشاهده شد. نسبت ریشه به اندام هوایی تا تنش متوسط افزایش و از تنش متوسط تا تنش شدید، کاهش یافت. نتایج تجزیه واریانس در داده‌های فیزیولوژیکی نشان داد که با افزایش شدت تنش، کاهش در شاخص سطح برگ و محتوای نسبی آب برگ و افزایش در میزان نشت الکترولیتی وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس در داده‌های بیوشیمیایی نشان داد که با افزایش شدت تنش، میزان کارتنوئید برگ، پرولین، کربوهیدرات، مالون‌دی‌آلدهید، غلظت پراکسید هیدروژن، فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسید و آسکوربات پراکسیداز، افزایش و میزان کلروفیل و پروتئین کاهش یافت. افزایش بیان نسبی *AQUAIP2* منجر به افزایش محتوای نسبی آب برگ شد. افزایش بیان نسبی این ژن و *WRKY1*، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و در نتیجه کاهش غلظت هیدروژن پراکسید و افزایش تحمل به تنش خشکی را در پی داشت. افزایش بیان نسبی *FBA* منجر به افزایش غلظت کربوهیدرات و کاهش بیان نسبی *OEE2* منجر به کاهش محتوای کلروفیل و در نهایت فتوسنتز شد. کاهش بیان نسبی *XTH*، کاهش رشد طولی و ارتفاع بوته در عدس را در پی داشت. ژن‌های *WRKY1*، *AQUAIP2* و *FBA* در تحمل به تنش خشکی در عدس موثر بودند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران/ پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. نویسندگان از مدیریت و داوران گرامی مجله، بابت راهنمایی و رهنمودها و ارائه نظرات و پیشنهادهای ارزشمندشان صمیمانه تشکر می‌کنند.

منابع

علیزاده بهزاد، مصطفوی خدا داد، زامیان محمد (۱۳۹۵) بررسی میزان تحمل به خشکی در ارقام شبدر برسیم و ایرانی. مجله زراعت و اصلاح نباتات ۱۲، ۶۷-۷۶.

References

- Abdullah-Al-Rahad M, Rahman MS, Akter T et al. (2018) Varietal screening of mung bean against whitefly and aphid. *J Biosci Agric Res* 18, 1478-1487.
- Abebe T, Skadsen RW, Kaeppler HF (2004) Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. *Crop Sci* 44, 942-950.
- Abid G, Muhovski Y, Mingeot D et al. (2017) Identification and characterization of two faba bean (*Vicia faba* L.) WRKY transcription factors and their expression analysis during salt and drought stress. *J Agric Sci* 155, 791.
- Abraham R (2015) Lentil (*Lens culinaris* Medikus) Current status and future prospect of production in Ethiopia. *Adv Plant Agric Res* 2, 45-53.
- Aebi HE (1983) Catalase. *Meth Enzym Anal* 8, 273- 286.

- Albouchi A, Béjaoui Z, El Aouni MH (2003) Influence d 'un stress hydrique modéré ou sévère sur la croissance de jeunes plants de *Casuarina glauca* Sieb. Colloq congr sci chang. Planét Sécher 14, 137-142.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S et al. (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59, 469-484.
- Alizadeh B, Mostafavi K, Zamanian M (2017) Study of Drought Tolerance of Berseem and Persian Cultivars of Clover. *J Agr Plant Breed* 12(4), 67-76 (In Persian).
- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH et al. (1997) Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiol* 115, 1319-1328.
- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH et al. (1997) Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase-related proteins during development and after wind stimulation. *Plant Physiol* 115, 1319-1328.
- Ashraf M, Mehmood S (1990) Response of four Brassica species to drought stress. *Environ Exp Bot* 1, 93-100.
- Bates LS, Waldern RP, Tear ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207.
- Biju S, Fuentes S, Gupta D (2018) The use of infrared thermal imaging as a non-destructive screening tool for identifying drought-tolerant lentil genotypes. *Plant Physiol Biochem* 127, 11-24.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot* 91, 179-194.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Cevik S, Akpinar G, Yildizli A et al. (2019) Comparative physiological and leaf proteome analysis between drought-tolerant chickpea *Cicer reticulatum* and drought-sensitive chickpea *C. arietinum*. *J Biosci* 44, 1-13.
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzymol* 2, 764-775.
- Chiatante D, Di Iorio A, Sciandra S et al. (2006) Effect of drought and fire on root development in *Quercus pubescens* Willd. and *Fraxinus ornus* L. seedlings. *Environ Exp Bot* 56, 190-197.
- Fan W, Zhang Z, Zhang Y (2009) Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Cell Rep* 28, 975-984.
- FAOSTAT (2008) Available at: <http://faostat.fao.org/>.
- FAOSTAT (2016-2019) Available at: <http://faostat.fao.org/>.

- Feng R, Zhang Y, Yu W et al. (2013) Analysis of the relationship between the spectral characteristics of maize canopy and leaf area index under drought stress. *Acta Ecol Sin* 33, 301-307.
- Flechner A, Gross W, Martin WF, Schnarrenberger C (1999) Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-biphosphate and sedoheptulose-1,7-biphosphate cleavage in the Calvin cycle. *FEBS Lett* 447, 200-202.
- Fracasso A, Trindade L, Amaducci S (2016) Drought tolerance strategies highlighted by two *Sorghum bicolor* races in a dry-down experiment. *J Plant Physiol* 190, 1-14.
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF et al. (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem* 282, 821-828.
- Ghanbari AA, Mousavi S H, Pessarakli M (2015) Accumulation of reserve compounds in common bean seeds under drought stress. *J Plant Nutr* 38, 609-623.
- Gopesh GC, Vandemark GJ (2013) Stability of expression of reference genes among different lentil (*Lens culinaris*) genotypes subjected to cold stress, white mold disease, and *Aphanomyces* root rot. *Plant Mol Biol Rep* 31, 1109-1115.
- Gunes A, Inal A, Adak MS et al. (2008) Effect of drought stress implemented at pre-or post-anthesis stage on some physiological parameters as screening criteria in chickpea cultivars. *Russ J Plant Physiol* 55, 59-67.
- Guo YY, Yu HY, Yang MM et al. (2018) Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. Seedling. *Russ J Plant Physiol* 65, 244-250.
- Haake V, Zrenner R, Sonnewald U, Stitt M (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J* 14, 147-157.
- Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H et al. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5, 950-960.
- Harlan JR (1992) *Crops and Man*. CSSA16, 63-262.
- Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A et al. (2005) Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct Integr Genom* 5, 104-116.
- Heide H, Kalisz HM, Follmann H (2004) The oxygen evolving enhancer protein1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *J Plant Physiol* 161, 139-149.
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R et al. (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13, 535-551.
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R et al. (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 13, 535-551.

- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604-611.
- IBPGR, 1985. IBPGR/ ICARDA Lentil Descriptors. International Board For Plant Genetic Resources (IBPGR), AGPG 85/117, Rome, Italy.
- Idrissi O, Udupa SM, De Keyser E et al. (2016) Identification of quantitative trait loci controlling root and shoot traits associated with drought tolerance in a lentil (*Lens culinaris* Medik.) recombinant inbred line population. *Front Plant Sci* 7, 1174.
- Kapanigowda MH, Perumal R, Djanaguiraman M et al. (2013) Genotypic variation in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] exotic germplasm collections for drought and disease tolerance. *Springer Plus* 2, 1-13.
- Khan MA, Alghamdi SA, Ammar MH et al. (2019). Transcriptome profiling of faba bean (*Vicia faba* L.) drought-tolerant variety hassawi-2 under drought stress using RNA sequencing. *Electron J Biotechnol* 39, 15-29.
- Kim EY, Choi YH, Lee JI et al. (2015) Antioxidant activity of oxygen evolving enhancer protein1 purified from *Capsosiphon fulvescens*. *J Food Sci* 80, 1412-1417.
- Koca H, Bor M, Özdemir F et al. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ Exp Bot* 60, 344-351.
- Kramer PJ (1969) *Plant and Soil water Relationships: A Modern synthesis*. McGraw-Hill, Inc. New York.
- Kumar A, Elston J (1992) Genotypic differences in leaf water relations between *Brassica juncea* and *B. napus*. *Ann Bot* 70, 3-9.
- Lata C, Jha S, Dixit V et al. (2011) Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars [*Setaria italica* (L.)]. *Protoplasma* 248, 817-828.
- Lebherz HG, Leadbetter MM, Bradshaw RA (1984) Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. *Int J Biol Chem* 259, 1011-1017.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11, 591-592.
- Livak K J, Schmittgen T D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu W, Tang X, Huo Y et al. (2012) Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in Arabidopsis reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene* 503, 65-74.

- Mensah JK, Obadoni BO, Eruotor PG, Onome-Irieguna, F (2006) Simulated flooding and drought effects on germination, growth, and yield parameters of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Afr J Biotechnol* 5, 1249-1253.
- Mishra BK, Srivastava JP, Lal JP (2018) Drought resistance in lentil (*Lens culinaris* Medik.) in relation to morphological, physiological parameters and phenological developments. *Int J Curr Microbiol App Sci* 7, 2288-2304.
- Mishra BK, Srivastava JP, Lal JP, Sheshshayee MS (2016) Physiological and biochemical adaptations in lentil genotypes under drought stress. *Russ J Plant Physiol* 63, 695-708.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7, 405-410.
- Nadeem M, Li J, Yahya M et al. (2019) Research progress and perspective on drought stress in legumes. *Int J Mol Sci* 20, 2541.
- Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28, 131-140.
- Niknam V, Razavi N, Ebrahimzadeh H, Sharifizadeh B (2006) Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. *Biol Plant* 50, 591-596.
- Nishitani K, Tominaga R (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Int J Biol Chem* 267, 21058-21064.
- Obiadalla-Ali H, Fernie AR, Lytovchenko A et al. (2004) Inhibition of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism. *Planta* 219, 533-540.
- Obiadalla-Ali H, Fernie AR, Lytovchenko A et al. (2004) Inhibition of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism. *Planta* 219, 533-540.
- Öktem HA, Eyidoğan F, Demirba D et al. (2008) Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. *J Plant Biochem Biotechnol* 17, 15-21.
- Papageorgiou GC, Murata N (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res* 44, 243-252.
- Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC et al. (1993) Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J Exp Bot* 44, 1281-1289.
- Purev M, Kim MK, Samdan N, Yang DC (2008) Isolation of a novel fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene from *Codonopsis lanceolata* and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Mol Biol* 42, 179-186.

- Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday A S (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Sci* 30, 105-111.
- Sachdeva S, Bharadwaj C, Singh RK et al. (2020) Characterization of ASR gene and its role in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PloS one* 15.
- Saeidi K, Zare N, Baghizadeh A, Asghari-Zakaria R (2019) *Phaseolus vulgaris* genome possesses CAMTA genes, and phavu CAMTA1 contributes to the drought tolerance. *J Genet* 98, 1-14.
- Sarker A, Erskine W (2006) Recent progress in the ancient lentil. *J Agric Sci* 144, 19-29.
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water deficit stress induced anatomical changes in higher plants. *CR Biol* 331, 215-225.
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T et al. (2008) Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environ* 54, 529-36.
- Singh D, Laxmi A (2015) Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Front Plant Sci* 6, 895.
- Singh D, Singh CK, Taunk J et al. (2017) Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC Genom* 18, 206.
- Sinha R, Pal AK, Singh AK (2018) Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress. *Indian J Plant Physiol* 23, 772-784.
- Sonnewald U, Lerchl J, Zrenner R, Frommer W (1994) Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17, 649-658.
- Sturgeon RJ (1990) Monosaccharides. In *Methods in plant biochemistry* 2, 1-37.
- Talukdar D (2013) Comparative morpho-physiological and biochemical responses of lentil and grass pea genotypes under water stress. *J Nat Sci Biol Med* 4, 396-402.
- Thavarajah D, Thavarajah P, Sarker A et al. (2011) A global survey of effects of genotype and environment on selenium concentration in lentils (*Lens culinaris* L.): Implications for nutritional fortification strategies. *Food Chem* 125, 72-76.
- Thompson EJ, Smith CR, Fry CS (1997) Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: Evidence from ¹³C/³H dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochem* 327, 699-708.
- Tian X, Li S, Liu Y, Liu X (2016) Transcriptomic profiling reveals metabolic and regulatory pathways in the desiccation tolerance of Mungbean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). *Front Plant Sci* 7, 1921.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25, 173-194.
- Uozu S, Tanaka-Ueguchi M, Kitano et al. (2000) Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol* 122, 853-860.

- Valentovic P, Luxova M, Kolarovic L, Gasparikova O (2006) Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environ* 52, 184.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci J* 151, 59-66.
- Vieira CCJ (1991) Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de *Gomphrena officinalis* Mart (Amaranthaceae). MS Thesis, University of São Paulo.
- Volkmar KM (1997) Water stressed nodal roots of wheat: Effects on leaf growth. *Funct Plant Biol* 24, 49-56.
- Wang C, Wang L, Yang C, Wang Y (2017) Identification, phylogeny, and transcript profiling of aquaporin genes in response to abiotic stress in *Tamarix hispida*. *Tree Genet Genomes* 13, 1-14.
- Yang Z, Chi X, Guo F et al. (2020) SbWRKY30 enhances the drought tolerance of plants and regulates a drought stress-responsive gene, SbRD19, in sorghum. *J Plant Physiol* 246, 153142.
- Zadražnik T, Moen A, Šuštar-Vozlič J (2019) Chloroplast proteins involved in drought stress response in selected cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *3 Biotech* 9, 1-15.
- Zeng Y, Tan X, Wang B et al. (2013) Sequence analysis and expression of one fructose-bisphosphate aldolase gene in *Camellia oleifera*. *J Green Sci Technol* 1, 30-36.
- Zeng Y, Tan X, Zhang L, Jiang N et al. (2014) Identification and expression of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase genes and their relations to oil content in developing seeds of tea oil tree (*Camellia oleifera*). *PloS one* 9(9), e107422.
- Zhang G, Liu Y, Ni Y et al. (2014) Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. *PloS one* 9(5), e97322.
- Zhou S, Hu W, Deng X at al. (2012) Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PloS one* 7(12), e52439.
- Zhuang L, Liu M, Yuan X et al. (2015) Physiological effects of aquaporin in regulating drought tolerance through overexpressing of *Festuca arundinacea* aquaporin gene FaPIP2. *J Am Soc Hortic Sci* 140, 404-412.