

پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در

عدس (*Lens culinaris* Medik.) تحت تنش خشکی

Morphological, physiological, biochemical and molecular responses in lentils (*Lens culinaris* Medik.) under drought stress

پویا نجیب نژاد^۱، علیرضا عباسی^۱، محمدرضا بی‌همتا^{۱*}، سجاد رشیدی منفرد^۱، عبدالرحمن رسول‌نیا^۱

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته، استاد، دکتري ژنتیک و بهنژادی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان

کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Najibnejad P¹, Bihamta M^{*1}, Abbasi A¹, Rashidi-Monfared S², Rasoulnia A¹

1- MSc Student, Professor, Professor, Phd of plant breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Associated Professor, Agricultural biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat modares university, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrghanad@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۸)

چکیده

عدس گیاهی با ارزش به لحاظ تغذیه‌ای برای انسان است، اما محصول آن توسط تنش‌های محیطی مخصوصاً خشکی تهدید می‌شود. مطالعات بسیاری اثرات تنش خشکی را بر گیاهان مختلف خانواده لگومها مورد بررسی قرار داده‌اند. در این مطالعه یک ژنوتیپ متحمل (-FLIP2002/57L) و یک ژنوتیپ حساس (FLIP2002-55L) عدس تحت سه رژیم آبی (شاهد بدون تنش، ۶۰ درصد و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی) قرار گرفته و صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و پروفایل بیان ژنی در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین، ژنوتیپ متحمل فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش تجمع پرولین و افزایش بیان ژن‌های پاسخ به خشکی را نشان داد. در مقابل، ژنوتیپ حساس حداقل تغییرات بیان ژن را تحت تنش خشکی نشان داد. این بررسی سازگاری‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی کلیدی در عدس را نشان می‌دهد و درک ارزشمندی را برای بهبود انعطاف‌پذیری به خشکی در محصولات حبوبات ارائه می‌دهند.

واژه‌های کلیدی

تنش خشکی

عدس

اسمولیت

آنزیم آنتی‌اکسیدان

ریل تایم پی‌سی آر

توالی‌یابی RNA

مقدمه

می‌گذارد. به‌طور قابل‌توجه، پروتئین‌ها و آنزیم‌های خاصی مانند پروتئین‌های LEA^2 ، پروتئازها، و آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی ROS (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)، همراه با فاکتورهای پروتئینی درگیر در انتقال سیگنال و تنظیم ژن، افزایش سنتز را در پاسخ به شرایط خشکسالی نشان می‌دهند (Labudda and Azam 2014; Nezhadahmadi et al. 2013).

در این بررسی، پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در دو ژنوتیپ عدس، یکی مقاوم به خشکی (FLIP2002-57L) و دیگری حساس به خشکی (FLIP2002555L) تحت سطوح مختلف تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفت. هدف شناسایی مکانیسم‌هایی بود که با بررسی ویژگی‌هایی مانند رشد، تغییرات بیوشیمیایی و پروفایل‌های بیان ژن، به تحمل خشکی کمک می‌کنند. هدف نهایی، افزایش درک مکانیسم‌های تحمل به خشکی در عدس و ارائه درک بیشتر برای به‌زادی یا بهبود ژنتیکی گونه‌های عدس مقاوم به خشکی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این بررسی از دو لاین عدس با نام‌های FLIP2002-57L (متحمل به خشکی) و FLIP2002-55L (حساس به خشکی)، مورد استفاده قرار گرفت (دکتر چگینی، مکاتبه شخصی). تعداد شش بذر در گلدان‌های ۶۰۰ گرمی به ارتفاع ۱۰ و قطر ۲۳ سانتی‌متر بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار و در گلخانه دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران کشت شد. خاک مورد استفاده در هر گلدان دارای نسبت به‌ترتیب ۲:۱:۱ خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ بود. هر واحد آزمایشی شامل ۱۲ گلدان بود (Gorim and Vandenberg 2017; Singh et al. 2017).

کشت در تاریخ ۱ بهمن ۱۴۰۱ انجام شد. تیمار تنش خشکی در سه سطح انجام شد. سه سطح تنش عبارتند از ظرفیت زراعی ۹۰ درصد یا سطح شاهد بدون تنش، ظرفیت زراعی ۶۰ درصد (تنش متوسط) و ظرفیت زراعی ۳۰ درصد (تنش شدید). اعمال تنش

در قرن بیست و یکم، به دلیل افزایش جمعیت جهان، تولید مواد غذایی با یک مسئله اساسی مواجه است (Patel Priyanka et al. 2019). علاوه بر مسائلی که تغییرات آب و هوایی برای تولید محصولات پایدار ایجاد می‌کند، شیوع رو به رشد تنش‌های زیستی و غیرزیستی، به‌ویژه تنش خشکی، محصولات را تهدید می‌کند و ناامنی غذایی را در جهان تشدید می‌کند (Nadeem et al. 2019). تقریباً یک سوم خاک‌ها تحت تنش خشکی قرار دارند که حفظ نمو گیاهان معمولی را دشوار می‌کند (Ye et al. 2018). کمبود ظرفیت بارندگی، توزیع نامنظم بارندگی، شدت و طول خشکسالی و سرعت پیشرفت تنش از جمله عواملی است که منجر به کمبود آب می‌شود (S. Feng et al. 2021).

عدس یک محصول زراعی مهم از خانواده حبوبات است که نقش به‌سزایی در تامین امنیت غذایی جهان دارد (Sinha et al. 2018)؛ و سرشار از مواد مغذی چون پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی مانند، آهن و روی است (Grusak and Coyne 2009)؛ علاوه بر این در تامین علوفه دام‌ها نیز نقش دارد (Singh et al. 2017). ایران نیز همانند بسیاری کشورهای دیگر، برای رفع نیازهای پروتئینی خود از حبوباتی چون نخود، لوبیا و عدس استفاده می‌کند (Salehi 2012).

تنش خشکی بر گیاهان در سطوح مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی تأثیر منفی می‌گذارد (Battaglia et al. 2018). برای مقابله با کمبود آب، گیاهان تحت تنش با افزایش محتوای قند در ریشه و برگ، تنظیم اسمزی را حفظ می‌کنند (Miranda et al., 2021). کاهش محتوای نسبی آب (RWC^1) به‌عنوان یکی از اولین علائم تنش خشکی در گیاهان ظاهر می‌شود که بر پتانسیل آب برگ تأثیر می‌گذارد و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Bijalwan et al. 2022). تنش خشکی هم‌کمیت و هم‌کیفیت پروتئین‌های گیاهی را تغییر می‌دهد و معمولاً منجر به کاهش سطح پروتئین به دلیل کاهش سنتز آن‌ها می‌شود (Farooq et al. 2009; Rahdari and Hoseini 2012). تنش خشکی همچنین باعث تغییر در پروفایل‌های بیان ژن می‌شود و بر سنتز پروتئین‌ها و mRNAهای مرتبط با پاسخ به خشکی تأثیر

² Late embryogenesis abundant¹ Relative water content

جهت اندازه‌گیری سطح برگ، از برگ‌های جوان و کاملاً رشد یافته گیاه نمونه‌برداری و سطح آن‌ها با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج^۱ اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری و شاخص سطح برگ محاسبه شد (R. Feng et al. 2013).

صفات بیوشیمیایی

محتوای پرولین

به نمونه‌های برگ (۵ گرم) مقدار ۱۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید اضافه و در حمام یخ قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس به عصاره حاصل استیک اسید گلاسیال^۲ و اسیدنینهیدرین^۳ اضافه و خوب مخلوط شدند. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار گرفته، و بلافاصله واکنش با استفاده از حمام یخ متوقف شد. به هر یک از نمونه‌ها تولوئن^۴ اضافه و ورتکس شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شدند (پلیت‌ریدر Biotek آمریکا). جذب‌های قرائت شده در معادله خط به‌دست آمده از قرائت‌های استاندارد‌ها جایگزین شد و براساس آن، محتوای پرولین در نمونه‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Bates et al. 1973).

محتوای مالون‌دی‌آلدهید

جهت انجام آزمایش، به ۰/۲ گرم نمونه برگ ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند. به عصاره حاصل، محلول تیوباربیتریک اسید حاوی تری‌کلرواستیک اسید اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله به حمام یخ منتقل شدند. نمونه‌ها مجدد سانتریفیوژ شد. سپس جذب نمونه‌ها توسط پلیت‌ریدر، در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد (Hodges et al. 1999).

هیدروژن پراکسید

به‌صورت وزنی بود. در این روش وزن خاک موجود در گلدان‌ها اندازه‌گیری و با توجه به ظرفیت زراعی اعمال تنش انجام شد. اعمال تنش‌ها از تاریخ ۲۵ بهمن ۱۴۰۱ و در مرحله ۴۰ برگچه‌ای گیاهان آغاز شد و به مدت ۲۰ روز ادامه یافت. اعمال تنش در ۱۵ اسفند ۱۴۰۱ قطع و نمونه‌برداری از اندام‌های هوایی گیاهان در تاریخ ۱۶ اسفند ۱۴۰۱ انجام شد. جهت انجام نمونه‌برداری، گیاهان از ناحیه ساقی در نزدیکی خاک قطع و در فویل‌های آلومینیومی قرار گرفته و داخل ازت مایع قرار داده شدند. سپس نمونه‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی و بیان‌نسبی ژن‌ها به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاهان با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی (۰/۰۰۰۱) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها هر کدام در یک پاکت قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس وزن خشک نمونه‌ها با استفاده از همان ترازو اندازه‌گیری شد (Ashraf and Mahmood 1990). ارتفاع بوته، طول ریشه، شدت سبزی‌نگی، تعداد برگ و برگچه و وجود یا عدم وجود کرک بعد از قطع تنش و پیش از نمونه‌گیری اندازه‌گیری شدند (Lentil descriptors, IBPGR 1985).

محتوای نسبی آب برگ با استفاده از روش Kumar and Elston (1992) اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول $RWC = [(Fw - Dw) / (Sw - Dw)] * 100$ محاسبه شد، که در آن Fw، وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری بر حسب گرم؛ Sw، وزن اشباع برگ بعد از قرارگیری در آب مقطر بر حسب گرم؛ Dw، وزن خشک برگ بر حسب گرم است. جهت اندازه‌گیری نشت الکترولیتی ابتدا برگ کامل گیاه جدا و به یک فالكون منتقل شد. میزان ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان، EC نمونه‌ها با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری و به عنوان EC1 ثبت شد. سپس فالكون‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن بلافاصله در حمام آب یخ قرار گرفت تا خنک شوند. EC آن‌ها اندازه‌گیری و به‌عنوان EC2 ثبت شد. در نهایت میزان نشت الکترولیتی محاسبه شد (Valentovic et al. 2006).

¹ Leaf area meter

² Glacial Acetic Acid (Anhydrous) (CH₃COOH)

³ Ninhydrin Acid (C₉H₆O₄)

⁴ Toluene (C₇H₈)

جهت اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a, b و کاروتنوئید، به ۰/۵ گرم بافت برگ ۲۰ میلی‌لیتر استون ۷۰ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. عصاره فوقانی جدا شده و به پلیت منتقل شد. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه پلیت‌ریدر در طول موج ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید قرائت شد. میزان کلروفیل a, b و کاروتنوئید طبق فرمول محاسبه شد (Lichtenthaler and Wellburn 1983).

پروتئین

مقدار ۰/۲ گرم بافت گیاهی پودر شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر Tris-HCL یک مولار با پی‌اچ ۶/۸ حاوی دو درصد PVP به آن اضافه شد. نمونه‌ها سانتریفیوژ شد. عصاره بالای جدا با و به میکروتیوب جدید منتقل شد و از آن برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز استفاده شد. جهت اندازه‌گیری محتوای پروتئین از روش بردفورد استفاده شد (Bradford 1976).

فعالیت کاتالاز

جهت اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز ۱۹۹۰ میکرولیتر محلول هیدروژن پراکسید محلول در بافر فسفات در هر دو کووت^۴ دستگاه اسپکتروفتومتر^۵ (Shimadzu ژاپن) ریخته و ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئین نمونه به آن اضافه شد. سپس دستگاه در طول موج ۲۴۰ نانومتر بلانک شد. دستگاه برای مدت زمان ۱۸۰ ثانیه، با فاصله‌های زمانی ۱۰ ثانیه و زمان تاخیر صفر تنظیم شد. بعد از بلانک شدن، به هر کووت مقدار ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید خالص اضافه و قرائت در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. (Aebi, 1974).

فعالیت آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش (1987) Nakano and Asada انجام شد. ۱۹۹۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار) حاوی آسکوربیک اسید (۰/۵ میلی‌مولار)

به نیم‌گرم نمونه برگ گیاهی ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید یک درصد اضافه و نمونه‌ها سانتریفیوژ شد. ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده بالایی فالكون‌ها جدا شد و ۰/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار) به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم یدید (۱ مولار) به آن اضافه شد. محلول‌های هیدروژن پراکسید در غلظت‌های بین ۲ تا ۱۰ میلی‌مولار تهیه و نمودار استاندارد رسم شد. در نهایت میزان جذب توسط پلیت‌ریدر در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Velikova et al. 2000).

کربوهیدرات

جهت اندازه‌گیری محتوای کربوهیدرات، ۷/۵ میلی‌لیتر اتانول داغ شده به ۰/۵ گرم بافت گیاهی اضافه و نمونه‌ها ورتکس شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شد. عصاره بالایی آن جدا و به مدت یک ساعت در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مدت، بافت گیاهی باقی مانده در فالكون‌ها جدا و به پتری منتقل شد و در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا اتانول آن تبخیر شود. بافت‌های خشک شده به فالكون منتقل، و مقدار مشخصی آب به هر کدام اضافه شد. سپس در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره ژلاتینی نشاسته بدست آید. عصاره بدست آمده به فالكون جدید منتقل و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر فنول^۱ پنج درصد، ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸ درصد به نمونه اضافه و ۴۵ دقیقه مهلت داده شد تا رنگ محلول‌ها تثبیت شود. پتری‌های قرار گرفته در آون خارج شده و جرم سفید یا زرد رنگ کف آن‌ها، با آب مقطر شسته شده و به فالكون منتقل شد. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر سولفات روی^۲ پنج درصد و ۲/۳۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید باریم^۳ ۰/۳ نرمال به فالكون‌ها اضافه و ورتکس و سپس سانتریفیوژ شد. فاز بالایی جدا و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر فنول پنج درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید اضافه شد. ۴۵ دقیقه به نمونه‌های مهلت داده شد تا رنگ آن‌ها تثبیت شود. نمونه‌ها در پلیت‌ریدر در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. (Sturgeon 1990).

کلروفیل a, b و کاروتنوئید

¹ Phenol (C₆H₆O)

² Zinc sulfate (ZnSO₄)

³ Barium hydroxide (Ba(OH)₂)

⁴ Cuvette

⁵ Spectrophotometer

استفاده از توالی‌های ارتولوگ مشابه در سایر گیاهان با کمک برنامه آنالین BLAST شناسایی شدند (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). مجموع این قطعات با استفاده از نرم‌افزار Codon Code Aligner (Ver.5.0.1) با یکدیگر سرهم^۸ شدند. سپس با بررسی توالی حاصل در برنامه ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder)، این ژن‌ها شناسایی شد.

با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7 و PeriPrimer، پرایمرهای مناسب جهت بررسی بیان ژن‌های *bZIP*، *CURVATURE*، *THYLAKOID 1B*، پروتئین پورین غشاء خارجی پلاستید و زاگزانتین اپوکسیداز با استفاده از روش RT-PCR طراحی شد (جدول ۳-۱). در نهایت برای اطمینان حاصل عدم جفت شدن پرایمرهای طراحی شده با ژنی غیر از ژن مورد نظر ما، پرایمرها با نرم‌افزار آنالین OligoAnalyzer 3.1 بررسی شد. جهت نرمال‌سازی بیان ژن‌ها از ژن 18srRNA که یک ژن خانه‌دار^۹ است، استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش Real-Time PCR

استخراج RNA با استفاده از کیت ستونی شرکت پارس‌توس انجام گرفت. جهت تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از نانودراپ (Thermo scientific آمریکا) و الکتروفورز (۱ درصد) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت پارس‌توس انجام شد. کیفیت و کمیت cDNA سنتز شده نیز از الکتروفورز و نانودراپ استفاده شد. جهت انجام واکنش Real Time PCR از پرایمرهای طراحی شده به عنوان پرایمر اصلی و پرایمر 18srRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. سه تکرار بیولوژیکی، دو تکرار تکنیکی و یک کنترل منفی برای هر واکنش در نظر گرفته شد. واکنش‌های RT-PCR (Qiagen آلمان) در ۴۰ سیکل (هر سیکل ۲۰ ثانیه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، ۲۰ ثانیه دمای در دمای اتصال پرایمر و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جدول ۱). جهت انجام محاسبات مربوط به واکنش از فرمول (Livak and Schmittgen 2001) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از نرم‌افزارهای

به‌همراه ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئین نمونه در هر دو کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و دستگاه در طول موج ۲۹۰ نانومتر بلانک شد. دستگاه برای مدت زمان ۱۲۰ ثانیه، با فاصله‌های زمانی ۱۰ ثانیه یکبار و زمان تأخیر صفر تنظیم شد. بعد از بلانک کردن دستگاه، ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید به کووت حاوی نمونه اضافه و جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد.

گایاکول پراکسیداز

ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید، ۲۵ میلی‌لیتر گایاکول^۱ ۱۰ میلی‌مولار و ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار را در یک ظرف ریخته و با هم ترکیب شد. ۱۹۹۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده همراه ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی نمونه در هر دو کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موج ۴۷۰ نانومتر بلانک شد. دستگاه برای مدت زمان ۱۲۰ ثانیه و زمان تأخیر صفر تنظیم شد. سپس به کووت نمونه مقدار ۴۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید اضافه و قرائت توسط دستگاه انجام شد (Change and Maehly 1955).

بررسی بیان نسبی برخی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی

منابع روز دنیا بررسی و تعدادی ژن مؤثر در تحمل به تنش خشکی در برخی گیاهان هم‌خانواده عدس نظیر لوبیا، نخود، یونجه، باقلا، ماش و غیره انتخاب شد. سپس با مراجعه به پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)، شماره دسترسی^۲ ژن‌ها به‌دست آمد. سپس ژن‌های انتخابی با کمک هم‌ردیفی^۳ در عدس نیز یافت شدند. جهت شناسایی توالی توافقی^۴ ناحیه کدکننده^۵ ژن‌های انتخابی گیاه عدس، توالی‌های قطعات بیانی^۶ و خوانش‌های^۷ ژن‌های مورد نظر یعنی *bZIP*، *CURVATURE*، *THYLAKOID 1B*، پروتئین پورین غشای خارجی پلاستید و زاگزانتین اپوکسیداز حاصل از پروژه‌های توالی‌یابی RNA عدس در پایگاه RSA سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) با

¹ Guaiacol (C₇H₈O₂)

² Accession number

³ Alignment

⁴ Consensus

⁵ Coding DNA Sequence (CDS)

⁶ Expressed Sequence Tag (EST)

⁷ Reads

⁸ Assemble

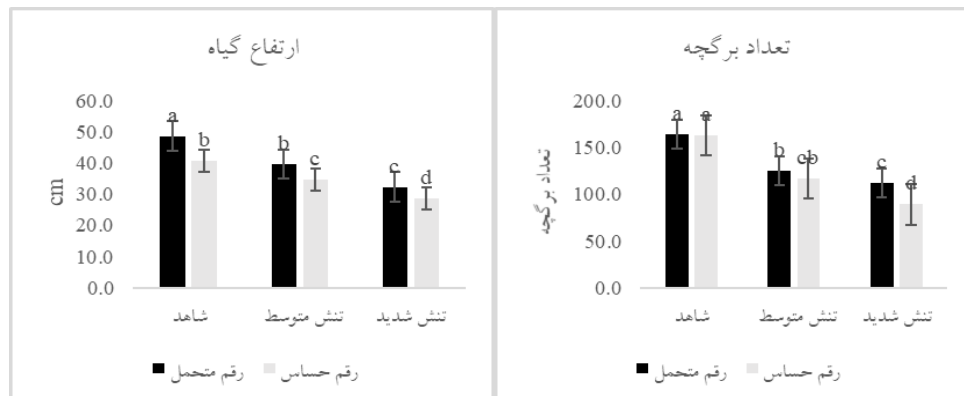
⁹ Housekeeping Gene

شد. جهت اطمینان از اینکه داده‌ها و خطاهای آن‌ها دارای توزیع نرمال هستند، از آزمون Komogorov-Smirnov در نرم‌افزار Minitab 22 استفاده شد.

R4.4.1 و SAS 9.4 استفاده شد. همچنین برای تجزیه و تحلیل داده‌های RT-PCR از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. برای رسم نمودارهای مقایسه میانگین از نرم‌افزار Excel 2021 استفاده

جدول ۱- اسامی و توالی پرایمرهای طراحی شده به منظور بررسی بیان ژن‌های منتخب

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیر شده	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
bZIP-F	5' CGGATGAGGAAACAGAAGCAC 3'	159bp	59.82
bZIP-R	5' TCAATTCACCAATCTGAGCCC 3'	159bp	57.87
CURT1B-F	5' CCAGTTGATCCAGTTGAAGCC 3'	131bp	59.82
CURT1B-R	5' ACCAGCAACAGCTATTGTACTC 3'	131bp	58.39
POR-F	5' GTCTGCTTCATACTATCATGCC 3'	139bp	58.39
POR-R	5' CCTTCACTGTGGTCAATGGA 3'	139bp	57.30
ZEP-F	5' GTGCTATTAACGGAGAGTGG 3'	144bp	57.30
ZEP-R	5' AACGGTAATTGAACTACCTGGA 3'	144bp	56.53
18srRNA-F	5' ACGTCCCTGCCCTTTGTACAC 3'	101bp	61.78
18srRNA-R	5' CACTTCACCGGACCATTCAAT 3'	101bp	57.87



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین صفات ارتفاع بوته و تعداد برگچه در گیاه عدس در دو ژنوتیپ حساس و محتمل طی سه سطح آبیاری شاهد، تنش متوسط (ظرفیت زراعی ۶۰ درصد) و تنش شدید (ظرفیت زراعی ۳۰ درصد). (مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شده است).

نتایج و بحث

صفات دارد (شکل ۱). نتایج مشاهده شده در صفت ارتفاع بوته، با بررسی‌های انجام شده در لوبیا (Emam et al. 2012)، سویا (Sepanlo et al. 2014)، ماش (Bangar et al. 2019) و خلر (Talukdar 2013b) مطابقت دارد. تنش خشکی با کاهش فشار تورژسانس و ایجاد اختلال در رشد سلولی، و از طرفی کاهش جریان آب از آوندهای چوبی به سلول‌های در حال رشد، موجب کاهش تقسیم میتوز، افزایش طول سلول و گسترش آن می‌شوند. این موارد منجر به کاهش ارتفاع گیاه می‌شود (Anjum, Ashraf, Zohaib, Tanveer, Naeem, Ali, et al. 2017). کاهش معنی‌دار طول ریشه طی تنش خشکی در باقلا نیز مشاهده شده است. این کاهش طول ریشه به اختلال در جریان آب در آوندهای چوبی و در نتیجه آن اختلال جریان آب به سمت سلول‌های در حال

افزایش سطح تنش خشکی تاثیر معنی‌داری (۰/۰۱) بر صفات ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه، تعداد برگ و برگچه و تراکم کرک داشت. به عبارتی بین دو سطح تنش متوسط و شدید نیز در این صفات اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. از طرفی دیگر بین شاهد و تنش شدید در سایر صفات مورفولوژیکی شامل طول ریشه، وزن خشک ریشه و شدت سبزیگی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، اما بین دو سطح تنش متوسط و شدید در این صفات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱). همچنین در صفات ارتفاع بوته و تعداد برگچه، اثر متقابل ژنوتیپ در تنش نیز معنی‌دار شده بود (۰/۰۵) که اشاره به عملکرد متفاوت دو ژنوتیپ در سطوح مختلف تنش در این

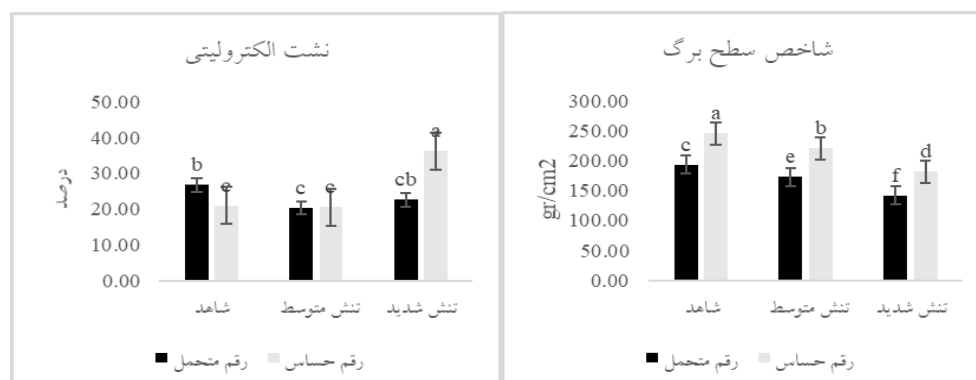
آب بر یکپارچگی غشای سلولی است (Rao and Chaitanya 2019).

با افزایش سطح تنش، محتوای پرولین و کربوهیدرات افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳). از طرفی بین محتوای پرولین در ژنوتیپ حساس و متحمل طی تنش شدید خشکی نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت که نشان از تجمع بیشتر آن در ژنوتیپ متحمل دارد. محتوای پرولین در گیاهانی که در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند افزایش می‌یابد. افزایش محتوای پرولین به محافظت از غشاء سلولی، تنظیم فشار اسمزی، مهار اکسیژن‌های منفرد، یکپارچگی پروتئین و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند (Öktem et al. 2008b; Vaseva et al. 2012; Quan et al. 2016). تنش خشکی در کلزا افزایش محتوای کربوهیدرات را نشان داده است (Abid et al. 2021; Rezayian et al. 2018). همچنین در صفات محتوای هیدروژن پراکسید و MDA نیز با افزایش سطح تنش اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. البته اختلاف معنی‌داری بین دو ژنوتیپ در این صفات مشاهده نشد. سطح مالون‌دی‌آلدهید در گیاهان تحت تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد، و سطوح پایین‌تر مالون‌دی‌آلدهید معمولاً نشان دهنده تحمل بهتر تنش اکسیداتیو است (Vaseva et al. 2012). پراکسیداسیون لیپیدی، که با محتوای MDA تعیین می‌شود، توسط گونه‌های فعال اکسیژن^۱ ایجاد می‌شود.

^۱ Reactive oxygen species (ROS)

شدن ریشه نسبت داده شده است (Ammar et al. 2015). در لوبیا چیتی کاهش معنی‌داری در وزن تر اندام هوایی مشاهده شده است (Ghalandari et al. 2019). کاهش در وزن خشک اندام هوایی با کاهش تعداد برگ‌ها و یا کاهش سطح برگ نیز همراه است (Rasti Sani et al. 2018). کاهش وزن تازه ریشه در تنش خشکی بسته به گونه گیاهی و شدت تنش می‌تواند متفاوت باشد. لوبیا چیتی تحت تنش خشکی در سه سطح شاهد، ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، ۷۳/۸ درصد کاهش در وزن تر ریشه نشان داده است (Ghalandari et al. 2019).

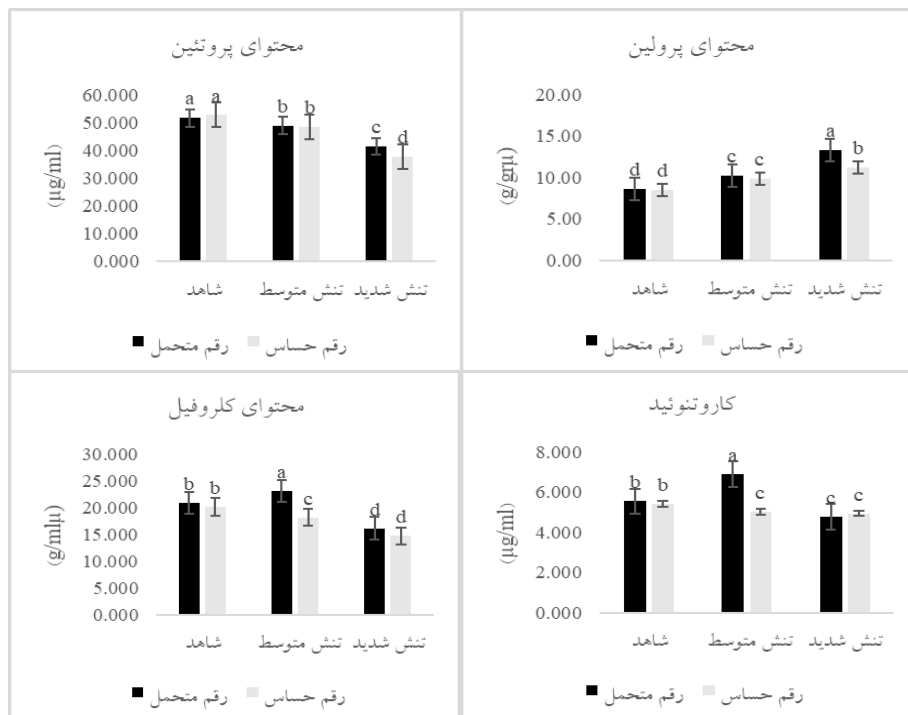
اختلاف معنی‌داری (۰/۰۱) بین شاهد و تنش شدید محتوای نسبی آب مشاهده شد. تغییرات در محتوای نسبی آب شاخص اولیه تنش گیاه است (C. Zhang et al. 2019). در بررسی‌های انجام شده بر روی بادام زمینی (Patel et al. 2022)، یونجه (C. Zhang et al. 2019)، و نخود (Talebi et al. 2013) کاهش معنی‌داری در محتوای نسبی آب برگ مشاهده شده است. در صفت شاخص سطح برگ و نشت الکترولیتی، اختلاف معنی‌داری بین اثر متقابل ژنوتیپ در تنش وجود داشت (شکل ۲). طی تنش خشکی، کاهش سطح برگ می‌تواند با سطوح بالاتری از محتوای کلروفیل و کاروتنوئید همراه باشد، اما این افزایش سطوح می‌تواند یک مکانیسم محافظتی برای کاهش پیامدهای منفی تنش نیز باشد (Talebi et al. 2013). تنش خشکی منجر به افزایش معنی‌داری در نشت الکترولیت سویا شد که نشان دهنده اثرات مضر کمبود



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین صفات نشت الکترولیتی و شاخص سطح برگ در گیاه عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل طی سه سطح آبیاری شاهد، تنش متوسط (ظرفیت زراعی ۶۰ درصد) و تنش شدید (ظرفیت زراعی ۳۰ درصد). (مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شده است).

اختلاف معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ نشان داد (شکل ۳). تحقیقات انجام شده بر روی ماشه سیاه (Baroowa and Gogoi) (Ammar et al. 2013)، لویا چشم بلبل (Carvalho et al. 2019)، باقلا (Talebi et al. 2013) و نخود (et al. 2015) با مشاهدات انجام شده در محتوای کلروفیل کل مطابقت دارد. سیب‌زمینی تحت تنش خشکی افزایش محتوای کاروتنوئید را نشان داد (Orsák et al. 2023).

غلظت MDA در گیاهان اغلب برای نشان دادن میزان آسیب اکسیداتیو رخ داده در سطح سلولی استفاده می‌شود (Mishra et al. 2016b). همچنین هیدروژن پراکسید پیش ساز ROS است و اندازه‌گیری آن در بافت‌های گیاهی تحت تنش نشان دهنده آسیب اکسیداتیو است (Öktem et al. 2008b). در این بررسی بین دو ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری در محتوای هیدروژن پراکسید وجود داشت، به عبارتی ژنوتیپ متحمل میزان کمتری هیدروژن پراکسید داشت. محتوای کلروفیل و کاروتنوئید با افزایش سطح تنش



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین صفات محتوای پروتئین، پرولین، پروتئین، کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل طی سه سطح آبیاری شاهد، تنش متوسط (ظرفیت زراعی ۶۰ درصد) و تنش شدید (ظرفیت زراعی ۳۰ درصد). (مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شده است).

برگ‌های بزرگ در طول تنش خشکی اولیه نشان دادند که نقش مهمی در کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهد (Li et al. 2013). با افزایش سطح تنش، فعالیت آنزیم GPX در گیاه نخود افزایش می‌یابد، اما تحت تنش شدید فعالیت آن کاهش می‌یابد (Bihamta et al. 2019). مطالعات بر روی ژنوتیپ‌های برنج (Jardim-Messeder et al. 2023)، عدس (Bakır and Aliyeva et al. 2020; Nasirzadeh et al. 2022)، گندم (Yıldıırım et al. 2021).

فعالیت هر سه آنزیم کاتالاز^۱، گایاکول پراکسیداز^۲ و آسکوربات پراکسیداز^۳ نیز با افزایش سطح تنش خشکی، افزایش معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ نشان داد. علاوه بر آن اثر متقابل ژنوتیپ در تنش هر سه آنزیم اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۴). به عبارتی، ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش تفاوت در فعالیت آنزیم‌ها داشتند. گیاهان شبر با برگ‌های کوچک فعالیت کاتالاز به‌طور قابل‌توجهی در برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به گیاهان با

¹ Catalase (CAT)
² Guaiacol peroxidase
³ Ascorbate peroxidase

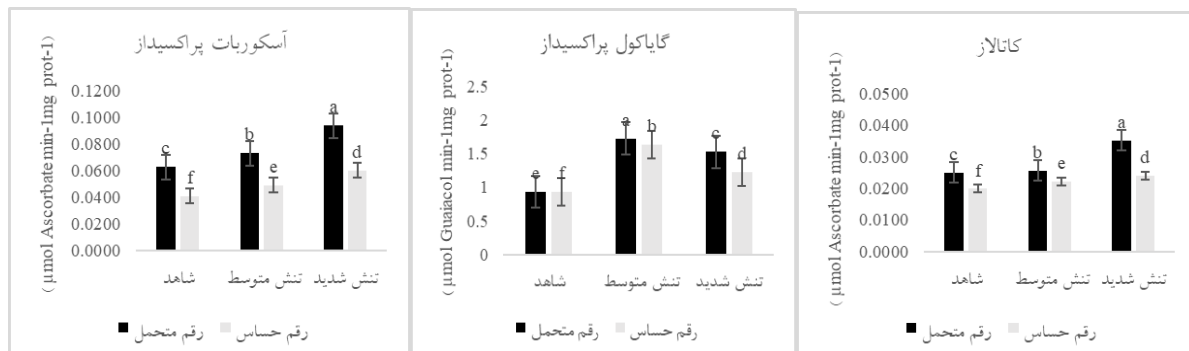
در غشای خارجی پلاستیدهای غیر سبز ریشه نخود شناسایی شده، با توجه به رنگ‌پذیری، ویژگی‌های کانال و شباهت توالی اصلی، نزدیک به خانواده پورین یوکاریوتی است (Popp et al. 1997). فقدان پروتئین CURT1 مکانیسم‌های سازگاری نور، مانند انتقال حالت و چرخه تعمیر¹ PSII را مختل می‌کند، که می‌تواند کارایی انتقال الکترون با واسطه پلاستوسیانین را کاهش دهد. این نشان می‌دهد که پروتئین‌های CURT1 برای فتوسنتز مؤثر ضروری هستند (Sandoval-Ibáñez et al. 2021). مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های CURT1 نه تنها بر تعداد لایه‌های غشایی در گرانا تأثیر می‌گذارند، بلکه بر ساختار کلی تیلاکوئید نیز تأثیر می‌گذارند. به‌عنوان مثال، در افزایش بیان CURT1، تعداد دسته‌های گرانا افزایش می‌یابد، در حالی که قطر آن‌ها کاهش می‌یابد، که نشان دهنده یک رابطه پیچیده بین سطوح CURT1 و معماری تیلاکوئید است (Armbruster et al. 2013).

نشان داده‌اند که در شرایط خشکی، گیاهان آنزیم APX را برای حذف پراکسید هیدروژن اضافی فعال می‌کنند و آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهند.

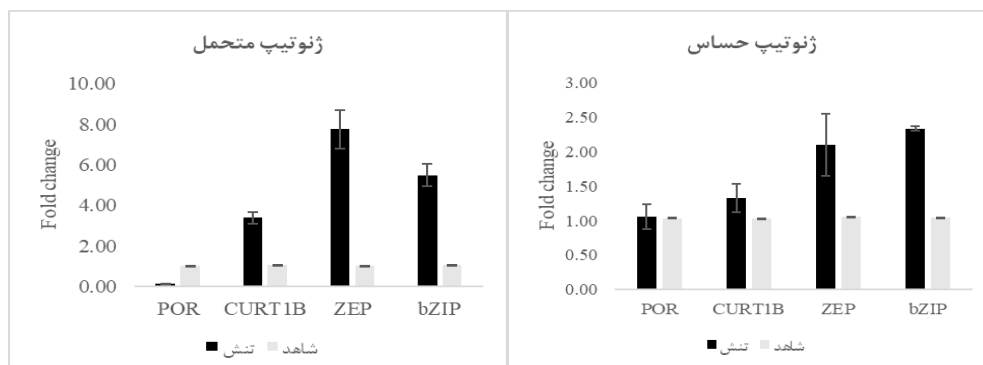
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در نرم‌افزار REST2009 (جدول ۴-۸) نشان می‌دهد که در ژنوتیپ متحمل، بیان نسبی ژن *POR* در تنش شدید نسبت به شاهد بدون تنش کاهش یافته است. از طرفی، بیان نسبی ژن‌های *CURT1B*، *ZEP* و *bZIP* به ترتیب حدود ۳، ۷ و ۵ برابر تحت تنش شدید نسبت به شاهد افزایش یافته است. (شکل ۵). در ژنوتیپ حساس، بیان نسبی ژن‌های *POR* و *CURT1B* در تنش شدید نسبت به شاهد تغییری نکرده است. اما بیان ژن‌های *ZEP* و *bZIP* افزایش داشته است. (شکل ۵).

پروتئین پورین، یک پروتئین غشای پلاستیکی خارجی، در رقم Starozagorski لوبیا شناسایی شد. افزایش بیان نسبی آن در شرایط خشکی نقشی را در حفظ نفوذپذیری غشا در برگ‌ها در طول تنش را نشان می‌دهد (Zadrazilnik et al. 2019a). پورین، که

¹ Photosystem II



شکل ۴ - نمودار مقایسه میانگین صفات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گیاه عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل طی سه سطح آبیاری شاهد، تنش متوسط (ظرفیت زراعی ۶۰ درصد) و تنش شدید (ظرفیت زراعی ۳۰ درصد). (مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شده است)



شکل ۵ - نمودار بیان نسبی ژن‌ها در تنش شدید نسبت به شاهد در ژنوتیپ حساس عدس (*POR*: outer plastidial membrane protein porin، *CURT1B*، *ZEP*: Zeaxanthin Epoxidase، *CURT1B*، *bZIP*: CURVATURE THYLAKOID 1B)

نشت الکترولیتی، محتوای MDA و هیدروژن پراکسید در هر دو ژنوتیپ با افزایش شدت تنش افزایش معنی‌داری داشت، اما مقدار آن‌ها در ژنوتیپ متحمل کمتر از ژنوتیپ حساس بود. به عبارتی، هر دو ژنوتیپ طی تنش خشکی در غشاء آسیب دیدند اما آسیب‌غشایی در ژنوتیپ متحمل کمتر بوده است. از طرفی، کمتر بودن محتوای هیدروژن پراکسید نشان از آسیب‌اکسیداتیو کمتر در ژنوتیپ متحمل و همچنین فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در آن نشان می‌دهد. علاوه بر این، بیشتر بودن محتوای پرولین نیز به آسیب‌اکسیداتیو کمتر و نیز محتوای آب نسبی بهتر در سلول‌های ژنوتیپ متحمل منجر شده است.

تجزیه داده‌ها نشان داد که ژن‌های Zeaxanthin Epoxidase و bZIP حدود ۳ تا ۴ برابر حالت بدون تنش افزایش بیان داشتند. همانطور که اشاره شد فاکتور رونویسی bZIP همانند بررسی‌های قبلی که طی تنش با افزایش بیان به بیان سایر ژن‌های مرتبط با تنش‌ها کمک می‌کند، در اینجا هم با افزایش بیان آن تحمل به تنش افزایش یافته است. از طرفی بیان نسبی ژن CURVATURE THYLAKOID 1B بدون تغییر باقی‌مانده است. همچنین ژن Outer Plastidial Membrane Protein Porin کاهش بیان نشان داده است که می‌تواند با آسیب وارد شده به عبور مواد از غشاء پلاستیدها اشاره داشته باشد. از طرفی در ژنوتیپ حساس، بیان نسبی هیچ یک از این ژن‌ها افزایش نیافت.

این مطالعه بر تعامل پیچیده فرآیندهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در ارائه تحمل به خشکی تاکید می‌کند. توانایی ژنوتیپ متحمل برای حفظ رشد بهتر و پایداری فیزیولوژیکی تحت شرایط کمبود آب با سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کارآمد، تولید اسمولیت بالاتر و بیان فعال ژن‌های مرتبط با استرس مرتبط است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تقویت چنین ویژگی‌هایی می‌تواند یک استراتژی کلیدی در پرورش واریته‌های عدس مقاوم به خشکی باشد.

با تکیه بر یافته‌های این مطالعه، تحقیقات آینده باید بر روی چندین حوزه کلیدی تمرکز کند تا درک ما از تحمل به خشکی در عدس را افزایش دهد. غربالگری طیف گسترده‌تری از ژنوتیپ‌ها از مناطق اکولوژیکی متنوع می‌تواند به اعتبار مکانیزم‌های شناسایی شده و کشف صفات یا ژن‌های جدید مرتبط با تاب‌آوری

بیان ZEP در بین گونه‌ها و بافت‌های مختلف گیاهی تحت شرایط تنش مختلف به‌طور قابل توجهی متفاوت است. به‌عنوان مثال، در برخی گونه‌ها مانند *Arabidopsis* و گوجه‌فرنگی، بیان ZEP در ریشه‌ها در طول تنش خشکی افزایش می‌یابد، در حالی که ممکن است در برگ‌ها کاهش یابد (Z. Zhang et al. 2016). در مطالعه ژن *MsZEP* از یونجه، مشخص شد که بیان *MsZEP* در بافت‌های سبز (برگ و ساقه) در مقایسه با ریشه‌ها بیشتر بود و در تیمارهای خشکی، سرما، گرما و آبسزیک اسید کاهش بیان را در اندام‌های هوایی نشان داد (Z. Zhang et al. 2016). بررسی‌ها نشان داده است که فاکتورهای رونویسی *bZIP* در تنظیم واکنش‌های تنش غیرزیستی متعدد در گونه‌های مختلف نقش دارد. آن‌ها به تعدیل مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کمک می‌کنند که گیاهان را قادر می‌سازد تا با تنش‌های محیطی مقابله کنند (M. Zhang et al. 2020). مطالعات نشان داده است که *OsZIP71* توسط تیمارهای خشکی و آبسزیک اسید القا می‌شود و باعث افزایش تحمل گیاه به این تنش‌ها می‌شود (Liu et al. 2014). در برنج، ۸۹ فاکتور رونویسی *bZIP* شناسایی شده است. برخی از آن‌ها مانند *OsZIP23*، *OsZIP46* و *OsZIP72* مقاومت به خشکی و حساسیت ABA را افزایش می‌دهند (Yang et al. 2019).

نتیجه‌گیری کلی

اندازه‌گیری صفات مختلف مورفولوژیکی مانند ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، تعداد برگ و برگچه و تراکم کرک با افزایش شدت تنش تغییرات قابل توجهی را در این صفات در هر دو ژنوتیپ نشان داد. این تغییرات نشان می‌دهد که تنش خشکی اثر قابل توجهی بر روی ظاهر گیاه می‌گذارد. از طرفی در صفاتی مانند ارتفاع بوته، طول ریشه و تراکم کرک تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ متحمل و حساس وجود داشت، که می‌تواند تحمل بهتر ژنوتیپ متحمل را تحت تنش نشان دهد. هر دو ژنوتیپ کاهش معنی‌داری در تعداد برگ و برگچه و نیز شاخص سطح برگ نشان دادند، به عبارتی با افزایش سطح تنش با کاهش تعداد برگچه‌های هر برگ، شاخص سطح برگ نیز کاهش یافته است. کاهش سطح برگ در ژنوتیپ متحمل به مراتب بیشتر از ژنوتیپ حساس بود، که این موضوع می‌تواند به حفظ آب بیشتر در آن کمک کند.

حفاظت‌شده و منحصر به فرد سازگاری با خشکسالی را شناسایی کند. علاوه بر این، ادغام ژن‌های تحمل به خشکی در برنامه‌های اصلاحی یا استفاده از فناوری‌های ویرایش ژن می‌تواند توسعه واریته‌های عدس انعطاف‌پذیر را تسریع کند. نقش ویژگی‌های خاک و میکروارگانیسم‌های مفید ریزوسفر در افزایش تحمل به خشکی نیز نیازمند اکتشاف است. در نهایت، بررسی اثرات عوامل استرس‌زای ترکیبی، مانند خشکسالی با دماهای بالا یا شوری، در شرایط تغییر اقلیم شبیه‌سازی‌شده، بینش‌هایی را در مورد مکانیسم‌های تحمل چند تنش فراهم می‌کند، و بهره‌وری عدس را در محیط‌های متغیر به طور فزاینده تضمین می‌کند.

کمک کند. آزمایش‌های تنش خشکی طولانی‌مدت یا مکرر برای ارزیابی پایداری پاسخ‌های مشاهده‌شده در شرایط طولانی‌مدت ارزشمند خواهد بود. ابزارهای مولکولی پیشرفته مانند تداخل CRISPR/Cas9 و RNA را می‌توان برای تأیید نقش عملکردی ژن‌های کلیدی پاسخگو به خشکی، مانند bZIP و ZEP مورد استفاده قرار داد، در حالی که مطالعات ترانسکریپتومی، پروتئومی و متابولومیک می‌توانند ارائه دهند. درک جامع تری از شبکه‌های بیان ژن، تغییرات سطح پروتئین و نقش متابولیت‌ها در تنش خشکی آزمایش‌های مزرعه‌ای برای تأیید ارتباط این یافته‌ها در محیط‌های کشاورزی دنیای واقعی ضروری است و مطالعات مقایسه‌ای با سایر گونه‌های حبوبات ممکن است مسیرهای

منابع

- Abid G, Ouertani RN, Muhovski Y, Jebara SH, Hidri Y, Ghouili E, Abdelkarim S, Chaieb O, Souissi F, Zribi F (2021) Variation in antioxidant metabolism of faba bean (*Vicia faba*) under drought stress induced by polyethylene glycol reveals biochemical markers associated with antioxidant defense. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 155:797-806.
- Aebi H (1974) Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 673-684). Elsevier.
- Aliyeva DR, Aydinli LM, Zulfugarov IS, Huseynova IM (2020) Diurnal changes of the ascorbate-glutathione cycle components in wheat genotypes exposed to drought. *Functional Plant Biology* 47:998-1006.
- Ammar MH, Anwar F, El-Harty EH, Migdadi HM, Abdel-Khalik SM, Al-Faifi SA, Farooq M, Alghamdi SS (2015) Physiological and yield responses of faba bean (*Vicia faba* L.) to drought stress in managed and open field environments. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201:280-287.
- Anjum SA, Ashraf U, Zohaib A, Tanveer M, Naeem M, Ali I, Tabassum T, Nazir U (2017) Growth and development responses of crop plants under drought stress: a review.
- Armbruster U, Labs M, Pribil M, Viola S, Xu W, Scharfenberg M, Hertle AP, Rojahn U, Jensen PE, Rappaport F (2013) Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *The Plant Cell* 25:2661-2678.
- Ashraf M, Mehmood S (1990) Response of four Brassica species to drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 30:93-100.
- Bakir M, Yıldırım C (2022) Isolation of ascorbate peroxidase (APX) gene in lentil (*Lens culinaris* Medik.) and expression analysis under drought stress conditions. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 59:439-447.
- Bangar P, Chaudhury A, Tiwari B, Kumar S, Kumari R, Bhat KV (2019) Morphophysiological and biochemical response of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] varieties at different developmental stages under drought stress. *Turkish Journal of Biology* 43:58-69.
- Baroowa B, Gogoi N (2013) Biochemical changes in two *Vigna* spp. during drought and subsequent recovery. *Indian Journal of Plant Physiology* 18:319-325.
- Bates LS, Waldren RPA, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Battaglia ML, Lee C, Thomason W (2018) Corn yield components and yield responses to defoliation at different row widths. *Agronomy Journal* 110:210-225.
- Bihamta M, Peighambari SA, Abbsi AR (2019) Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activities and Some Physiological Traits in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *Journal of Crop Breeding* 11:11-22.
- Bijalwan P, Sharma M, Kaushik P (2022) Review of the effects of drought stress on plants: A systematic approach.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Carvalho M, Castro I, Moutinho-Pereira J, Correia C, Egea-Cortines M, Matos M, Rosa E, Carnide V, Lino-Neto T (2019) Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. *Journal of Plant Physiology* 241:53001.
- Change B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidase. *Methods Enzymol* 2:764-775.
- Emam Y, Shekoofa A, Salehi F, Jalali AH, Pessarakli M (2012) Drought stress effects on two common bean

- cultivars with contrasting growth habits. *Archives of Agronomy and Soil Science* 58:527-534.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture* 153-188.
- Feng R, Zhang Y, Yu W, Hu W, Wu J, Ji R, Wang H, Zhao X (2013) Analysis of the relationship between the spectral characteristics of maize canopy and leaf area index under drought stress. *Acta Ecologica Sinica* 33:301-307.
- Feng S, Sikdar A, Wang J, Memon M, Li B, Ma H, Lv G (2021) Response of *Amorpha fruticosa* seedlings to drought and rewatering in arid and semi-arid environment. *Pak. J. Bot* 53:419-424.
- Ghalandari S, Kafi M, Goldani M, Bagheri A (2019) The effect of drought stress on some of morphological and physiological traits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Iranian Journal Pulses Research* 10:114-125.
- Gorim LY, Vandenberg A (2017) Evaluation of wild lentil species as genetic resources to improve drought tolerance in cultivated lentil. *Frontiers in Plant Science* 8:273342.
- Grusak MA, Coyne CJ (2009) Variation for seed minerals and protein concentrations in diverse germplasm of lentil. *North America Pulse Improvement Association, 20th Biennial Meeting* 11.
- 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.
- Jardim-Messeder D, Caverzan A, Balbinott N, Menguer PK, Paiva ALS, Lemos M, Cunha JR, Gaeta ML, Costa M, Zamocky M (2023) Stromal ascorbate peroxidase (OsAPX7) modulates drought stress tolerance in rice (*Oryza sativa*). *Antioxidants* 12:387.
- Kumar A, Elston J (1992) Genotypic differences in leaf water relations between *Brassica juncea* and *B. napus*. *Annals of Botany* 70:3-9.
- Labudda M, Azam FMS (2014) Glutathione-dependent responses of plants to drought: a review. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 83.
- Li Z, Peng Y, Ma X (2013) Different response on drought tolerance and post-drought recovery between the small-leaved and the large-leaved white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:213-222.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Portland Press Ltd*.
- Liu C, Mao B, Ou S, Wang W, Liu L, Wu Y, Chu C, Wang X (2014) OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 84:19-36.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods* 25:402-408.
- Miranda MT, Da Silva SF, Silveira NM, Pereira L, Machado EC, Ribeiro RV (2021) Root osmotic adjustment and stomatal control of leaf gas exchange are dependent on citrus rootstocks under water deficit. *Journal of Plant Growth Regulation* 40:11-19.
- Mishra BK, Srivastava JP, Lal JP, Sheshshayee MS (2016) Physiological and biochemical adaptations in lentil genotypes under drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 63:695-708.
- Nadeem M, Li J, Yahya M, Sher A, Ma C, Wang X, Qiu L (2019) Research progress and perspective on drought stress in legumes: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 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 and Cell Physiology* 28:131-140.
- Nasirzadeh L, Sorkhilaleloo B, Majidi Hervean E, Fatehi F (2021) Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression profiles under drought stress in tolerant, intermediate, and susceptible wheat genotypes. *Cereal Research Communications* 49:83-89.
- Nezhadahmadi A, Prohdan ZH, Faruq G (2013) Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal* 2013.
- Öktem HA, Eyidoğan F, Demirba D, Bayraç AT, Öz MT, Özgür E, Selçuk F, Yücel M (2008) Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 17:15-21.
- Orsák M, Kotíková Z, Hnilička F, Lachman J (2023) Effect of long-term drought and waterlogging stress on photosynthetic pigments in potato. *Plant, Soil & Environment* 69.
- Patel J, Khandwal D, Choudhary B, Ardehana D, Jha RK, Tanna B, Yadav S, Mishra A, Varshney RK, Siddique KHM (2022) Differential physio-biochemical and metabolic responses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under multiple abiotic stress conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 23:660.
- Patel Priyanka J, Trivedi Goral R, Shah Rupal K, Saraf M (2019) Rhizospheric microflora: a natural alleviator of drought stress in agricultural crops. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 1: Rhizobacteria in Abiotic Stress Management* 103-115.
- Popp B, Gebauer S, Fischer K, Flügge UI, Benz R (1997) Study of structure and function of recombinant pea root plastid porin by biophysical methods. *Biochemistry* 36:2844-2852.
- Quan W, Liu X, Wang H, Chan Z (2016) Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties. *Frontiers in Plant Science* 6:1256.
- Rahdari P, Hoseini SM (2012) Drought stress: a review.
- Rao DE, Chaitanya KV (2019) Morphological and physiological responses of seven different soybean (*Glycine max* l. merr.) cultivars to drought stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 22:355-362.
- Rasti Sani, M, Ganjeali A, Lahouti M, Mousavi Kouhi SM (2018) Morphological and physiological responses of two common bean cultivars to drought stress. *Journal of Plant Process and Function* 6:37-46.

- Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2018) Differential responses of phenolic compounds of *Brassica napus* under drought stress. *Iranian Journal of Plant Physiology* 8:2417-2425.
- Salehi M (2012) The study of drought tolerance of lentil (*Lens culinaris* Medik) in seedling growth stages. *Int J Agron Plant Prod* 3: 38-41.
- Sandoval-Ibáñez O, Sharma A, Bykowski M, Borràs-Gas G, Behrendorff JBYH, Mellor S, Qvortrup K, Verdonk JC, Bock R, Kowalewska Ł (2021) Curvature thylakoid 1 proteins modulate prolamellar body morphology and promote organized thylakoid biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118:e2113934118.
- Sepanlo N, Talebi R, Rokhzadi A, Mohammadi H (2014) Morphological and physiological behavior in soybean (*Glycine max*) genotypes to drought stress implemented at pre-and post-anthesis stages. *Acta Biologica Szegediensis* 58:109-113.
- Singh D, Singh CK, Taunk J, Tomar RSS, Chaturvedi AK, Gaikwad K, Pal M (2017) Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC Genomics* 18:1-20.
- Sinha R, Pal AK, Singh AK (2018) Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress. *Indian Journal of Plant Physiology* 23:772-784.
- Sturgeon RJ (1990) Monosaccharides. In *Methods in plant biochemistry* (Vol. 2, pp. 1-37). Elsevier.
- Talebi R, Ensafi MH, Baghebani N, Karami E, Mohammadi K (2013) Physiological responses of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to drought stress. *Environmental and Experimental Biology* 11:9-15.
- Talukdar D (2013) Comparative morpho-physiological and biochemical responses of lentil and grass pea genotypes under water stress. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine* 4:396.
- 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 and Environment* 52:184.
- Vaseva I, Akiscan Y, Simova-Stoilova L, Kostadinova A, Nenkova R, Anders I, Feller U, Demirevska K (2012) Antioxidant response to drought in red and white clover. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:1689-1699.
- 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 Science* 151:59-66.
- Yang S, Xu K, Chen S, Li T, Xia H, Chen L, Liu H, Luo L (2019) A stress-responsive bZIP transcription factor OsbZIP62 improves drought and oxidative tolerance in rice. *BMC Plant Biology* 19:1-15.
- Ye H, Roorkiwal M, Valliyodan B, Zhou L, Chen P, Varshney RK, Nguyen HT (2018) Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes. *Journal of Experimental Botany* 69:3267-3277.
- 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.
- Zhang C, Shi S, Liu Z, Yang F, Yin G (2019) Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. *Journal of Plant Physiology* 232:226-240.
- Zhang M, Liu Y, Cai H, Guo M, Chai M, She Z, Ye L, Cheng Y, Wang B, Qin Y (2020) The bZIP transcription factor GmbZIP15 negatively regulates salt-and drought-stress responses in soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 21:7778.
- Zhang Z, Wang Y, Chang L, Zhang T, An J, Liu Y, Cao Y, Zhao X, Sha X, Hu T (2016) MsZEP, a novel zeaxanthin epoxidase gene from alfalfa (*Medicago sativa*), confers drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 35:439-453.