

تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بیان برخی از ژن‌های تحمل به خشکی در عدس (*Lens culinaris*)

سعید محمدی^۱ | محمدرضا بی‌همتا^۲ | علیرضا عباسی^۳ | سجاد رشیدی منفرد^۴ | عبدالرحمن رسول‌نیا^۵ | پویا نجیب نژاد^۶

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: saeed.mohammadi2475@gmail.com

۲. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mrghanad@ut.ac.ir

۳. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Rezabbasi@ut.ac.ir

۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: rashidims@modares.ac.ir

۵. دکتری ژنتیک و بهنجاری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: arasoulnia@ut.ac.ir

چکیده:

تنش خشکی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک مطرح است. با توجه به اهمیت گیاه عدس (*Lens culinaris*) و کشت دیم آن در ایران، این پژوهش با هدف بررسی پاسخ دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس به تنش خشکی در سطوح مختلف (شاهد، تنش متوسط، و تنش شدید معادل ۹۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی) انجام شد. در این مطالعه، تغییرات صفات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، و همچنین بیان نسبی ژن‌های کلیدی در مسیر تحمل به خشکی شامل *Beta Amylase*, *DREB1C*, *ABA/WDS*, *HCF136* و *MIMP* با استفاده از روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش خشکی منجر به کاهش معنی‌دار در صفاتی مانند ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، محتوای نسبی آب برگ، شاخص سطح برگ، کلروفیل و پروتئین کل برگ شد. در مقابل، صفات تراکم کرک برگ، میزان نشت الکترولیتی، تجمع پرولین و کربوهیدرات‌ها، و غلظت مالون دی‌آلدهید و هیدروژن پراکسید افزایش یافتند. تحلیل بیان ژن‌ها در ژنوتیپ متحمل نشان داد که با تشدید تنش، بیان ژن‌های *ABA/WDS* و *HCF136* به طور معنی‌داری افزایش و بیان ژن‌های *Beta Amylase*, *DREB1C* و *MIMP* کاهش یافت. این یافته‌ها بر نقش این صفات و ژن‌ها در سازوکار تحمل به خشکی در عدس تأکید دارند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی برای توسعه ارقام متحمل به خشکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، مالون دی‌آلدهید، ریل‌تایم پی‌سی‌آر، تعیین توالی RNA

Abstract

Drought stress is a major limiting factor for crop production in arid and semi-arid regions. Given the importance of lentil (*Lens culinaris*) and its rainfed cultivation in Iran, this study aimed to investigate the response of two sensitive and tolerant lentil genotypes to drought stress at different levels (control, moderate stress, and severe stress corresponding to 90%, 60%, and 30% of field capacity). Morphological, physiological, and biochemical traits, as well as the relative expression of key genes involved in drought tolerance pathways, including *Beta Amylase*, *DREB1C*, *ABAWDS*, *HCF136*, and *MIMP*, were evaluated using qRT-PCR. Results showed that increasing drought stress intensity led to significant reductions in traits such as plant height, shoot and root fresh and dry weight, relative leaf water content, leaf area index, chlorophyll, and total leaf protein. Conversely, traits like leaf hair density, electrolyte leakage, accumulation of proline and carbohydrates, and the concentrations of malondialdehyde and hydrogen peroxide increased. Gene expression analysis in the tolerant genotype revealed a significant increase in the expression of *ABAWDS* and *HCF136* genes and a decrease in the expression of *Beta Amylase*, *DREB1C*, and

MIMP genes under increasing stress. These findings highlight the role of these traits and genes in the mechanism of drought tolerance in lentil and can be utilized in breeding programs to develop drought-tolerant varieties.

Keywords: Antioxidant Enzymes, Malondialdehyde, Proline, Real time PCR, RNA sequencing

۱. مقدمه

عدس (*Lens culinaris*)، یک حبوبات دیپلوئیدی، به عنوان یکی از قدیمی‌ترین محصولات اهلی شده بشریت شناخته می‌شود (Montejano-Ramírez & Valencia-Cantero, 2024). از نظر کشاورزی، این گیاه از اهمیت قابل توجهی برخوردار است و بر اساس حجم تولید، ششمین محصول عمده حبوبات در سراسر جهان محسوب می‌شود (Erskine, 2009).

تنش خشکی یکی از فراگیرترین تنش‌های غیرزیستی است که بهره‌وری کشاورزی را در سراسر جهان محدود می‌کند (S. Feng et al., 2021). پیش‌بینی می‌شود که فراوانی، شدت و مدت آن در بسیاری از مناطق به دلیل تغییرات اقلیمی افزایش یابد (Ye et al., 2018). برای کشت عدس، به ویژه در محیط‌های نیمه‌خشک و دیم که اغلب در آنها کشت می‌شود، خشکی یک محدودیت اصلی تولید آن است. در ایران، جایی که کشاورزی با چالش‌های قابل توجهی از کمبود آب و افزایش خشکی مواجه است، درک و کاهش اثرات خشکسالی یک اولویت ملی است (Ghochanian Haghverdi et al., 2025).

برای توسعه گونه‌های عدس که برای محیط‌های کم‌آب مناسب‌تر باشند، درک کامل سازوکارهای پاسخ گیاه ضروری است. تنوع ژنتیکی قابل توجهی در ویژگی‌های سیستم ریشه، از جمله طول ریشه، مساحت سطح، حجم و قطر مشاهده شده است، و صفاتی که جذب آب را از عمق بیشتر موجب می‌شوند با عملکرد بهتر در شرایط تنش خشکی مرتبط هستند (Noor et al., 2024). تنش خشکی به طور مداوم منجر به کاهش هدایت روزنه‌ای، میزان ترقق و جذب کربن فتوسنتزی می‌شود (Zeroual et al., 2022). مطالعات مقایسه‌ای اغلب نشان می‌دهند که ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش خشکی دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر و سطوح پایین‌تری از نشانگرهای آسیب اکسیداتیو نسبت به ژنوتیپ‌های حساس هستند (Öktem et al., 2008). خشکی آبشارهای سیگنالینگ پیچیده‌ای را ایجاد می‌کند که منجر به تغییر در بیان ژن می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های رونویسی، ژن‌های متعدد پاسخ‌دهنده به خشکسالی را شناسایی کرده‌اند که فاکتورهای رونویسی (مانند *bZIP*)، آنزیم‌های دخیل در سنتز اسمولیت و دفاع آنتی‌اکسیدانی، پروتئین‌های کانال (آکوپورین‌ها) و پروتئین‌های محافظ (مانند دهیدرین‌ها، پروتئین‌های شوک حرارتی) را رمزگذاری می‌کنند (Noor et al., 2024). مطالعات مقایسه‌ای توالی‌یابی RNA بین ژنوتیپ‌های عدس مقاوم و حساس در شرایط خشکی، الگوهای بیان ژن متفاوت مربوط به فتوسنتز، محافظت اسمزی، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، مسیرهای انتقال سیگنال و متابولیسم ثانویه را برجسته کرده‌اند (Biju et al., 2023). بررسی عمیق‌تری برای درک چگونگی ترکیب مؤثر مکانیسم‌های مختلف توسط ژنوتیپ‌های متحمل، به ویژه پیوند تاب‌آوری فیزیولوژیکی با مسیرهای بیوشیمیایی خاص و الگوهای بیان ژن‌های مربوطه، مورد نیاز است.

در ایران به دلیل تنش خشکی انتهای فصل رشد که بر کشت عدس به صورت دیم تاثیر دارد، مطالعه تغییرات صفات بیوشیمیایی و بیان ژن‌های شناسایی شده مؤثر در تحمل به تنش خشکی در این گیاه دارای اهمیت بوده که سرانجام می‌تواند به منظور غربالگری، اصلاح و انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در عدس مورد استفاده قرار گیرد. هدف این تحقیق، بررسی تغییرات بیوشیمیایی بیان و نیز نقش برخی ژن‌های شناسایی شده مؤثر در تحمل به تنش خشکی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس، می‌باشد.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. مواد گیاهی و صفات ریخت‌شناسی

در این مطالعه دو لاین FLIP2002-57L (متحمل به خشکی) و FLIP2002-55L (حساس به خشکی)، با توجه به مطالعات گذشته و عملکرد آن‌ها در شرایط مزرعه‌ای برای کشت در گلخانه انتخاب شدند (مکاتبه شخصی با دکتر چگینی، مرکز تحقیقاتی کوهین دانشگاه تهران). این دو لاین در حال خالص سازی و انجام تحقیقات تکمیلی بوده و از جمله لاین‌های امید بخش عدس می‌باشند. لاین‌هایی که مقاومت آن‌ها به سرما به خوبی شناسایی شده بود و جهت بررسی‌های بیشتر جهت آماده‌سازی آن‌ها به

عنوان رقم در مرکز تحقیقاتی کوهین دانشگاه تهران مورد بررسی بودند. به همین جهت در این بررسی از این دو ژنوتیپ استفاده شد. بذر آن‌ها از بانک ژن دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. در هر گلدان پلاستیکی به ارتفاع ۱۰ و قطر ۱۲ سانتی‌متر، تعداد ۶ عدد بذر کشت شد. خاک مورد استفاده در هر گلدان دارای ترکیب ۲:۱:۱ خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ بود. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بوده که در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، اجرا گردید. ۱۲ گلدان برای هر واحد آزمایشی تعیین شد. در دوره رشد رویش گیاهان، محلول ریز مغذی (کود ریز مغذی میکروموند) (۲ گرم در لیتر آب) در دو نوبت به صورت محلول پاشی و همچنین کود NPK (کود ۲۰-۲۰-۲۰ هاروانا) (در ۳ گرم در لیتر آب همراه با آبیاری) در دو نوبت به گلدان‌ها داده شد. با رشد گیاهان به مرحله ۴۰ برگچه‌ای تنش خشکی آغاز شده و به صورت آبیاری براساس ۹۰، ۶۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی خاک گلدان، اعمال گردید. ظرفیت زراعی خاک براساس روش وزنی تعیین شد. پس از اعمال تنش با مشاهده تشدید علائم تنش از جمله پچیدگی، زرد شدن، خشکیدگی و ریزش برگچه‌ها، اعمال تنش خشکی پس از ۲ هفته پایان یافته و بعد از آن نمونه برداری از بافت هوایی و ریشه گیاهان انجام گرفت. ارتفاع بوته، وجود یا فقدان کرک، شدت سبزیگی بوته قبل از نمونه‌برداری و در طول اعمال تنش، اندازه‌گیری شد (Lentil descriptors, IBPGR, 1985). همچنین وزن تر و خشک اندام هوایی وزن تر و خشک ریشه (با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم، ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد.

۲-۲. محتوای نسبی آب برگ^۱

وزن تر آخرین برگ‌های توسعه‌یافته بلافاصله پس از نمونه‌گیری، توسط ترازوی (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در داخل لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و به همه آنها میزان یکسانی آب مقطر اضافه گردید تا برگ‌ها در آب شناور شوند. نمونه‌های به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد. بعد از آن نمونه‌ها ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت، محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد (Kumar & Elston, 1992).

۲-۳. میزان نشت الکترولیتی^۲

آخرین برگ توسعه یافته از بوته‌ها جدا و در یک لوله فالكون قرار گرفته، سپس به آن آب مقطر اضافه شد و آن‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شدند. بعد از آن با EC متر (ساخت WTW آلمان)، EC نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC1). سپس نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ ساعت قرار داده شده و به حمام آب یخ منتقل شدند و دوباره EC آن‌ها اندازه‌گیری شد (EC2). در نهایت میزان نشت الکترولیتی برای هر نمونه محاسبه شد (Valentovic et al., 2006).

۲-۴. شاخص سطح برگ^۳

برگ‌های سبز گیاه جدا و مساحت سطح آن‌ها با Leaf Area Meter (ساخت CID آلمان) اندازه‌گیری شد. سپس در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. در نهایت شاخص سطح برگ، برحسب سانتی‌متر مربع برگ گرم (cm²/gr) محاسبه شد (R. Feng et al., 2013).

۲-۵. سنجش محتوای پرولین

نیم گرم (۰/۵ گرم) بافت اندام هوایی با استفاده از ازت مایع پودر شده، و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد اضافه و در حمام یخ قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hettich آلمان) شد. دو میلی‌لیتر

¹ Relative water content (RWC)

² Electrolyte Leakage Index (ELI)

³ Leaf area index (LAI)

از عصاره حاصل برداشته و به لوله فالون جدید منتقل شد. ۲ میلی لیتر نین هیدرین^۴ و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم قرار گرفته و سپس در حمام یخ سرد شدند. پس از افزودن ۴ میلی لیتر تولوئن و ورتکس، جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت پرولین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر از روی منحنی استاندارد محاسبه و سپس به میکروگرم بر گرم وزن خشک بافت تبدیل گردید (Bates et al., 1973).

۲-۶. مالون دی آلدهید^۵

مقداری برگ پودر شده با ۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی لیتر از عصاره رویی، ۱ میلی لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید حاوی تری کلرواستیک اسید اضافه گردید. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته و سپس در حمام آب یخ سرد شد. نمونه مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب مایع رویی در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، مقدار MDA بر اساس نانومول بر گرم وزن تر با استفاده از رابطه مربوطه محاسبه گردید (Hodges et al., 1999).

۲-۷. پراکسید هیدروژن^۶

نیم گرم (۵/۰ گرم) نمونه برگ پودر شده با ۲/۵ میلی لیتر محلول TCA ۱ درصد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره رویی با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH=7) و ۵۰۰ میکرولیتر محلول پتاسیم یدید ۱ مولار ترکیب گردید. پس از انجام واکنش، میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. غلظت H₂O₂ در نمونه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از محلول‌های پراکسید هیدروژن با غلظت ۲ تا ۱۰ میلی مولار محاسبه گردید (Velikova et al., 2000).

۲-۸. کربوهیدرات

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات، ابتدا نیم گرم (۵/۰ گرم) بافت خشک شده کوبیده شده با ۵/۷ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد داغ مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در ۷۰ درجه سانتی گراد برای عصاره‌گیری قندهای محلول نگهداری شد؛ سپس مخلوط ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و عصاره رویی حاوی قندهای محلول جدا شد، در حالی که بافت باقی‌مانده پس از خشک شدن، با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر و جوشاندن در بن ماری، جهت استخراج نشاسته آماده گردید. سپس، حجمی مشخص از عصاره برای واکنش رنگی استفاده شد؛ به این صورت که به یک میلی لیتر از نمونه آماده شده، ۵/۰ میلی لیتر محلول فنل ۵ درصد و ۵/۲ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه گردید و پس از ۴۵ دقیقه برای تثبیت رنگ، میزان جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت، غلظت کربوهیدرات بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و به میکروگرم بر گرم وزن خشک نمونه تبدیل گردید (Sturgeon, 1990).

۲-۹. کلروفیل a, b و کارتنوئید

نیم گرم بافت پودر و سپس ۱۰ میلی لیتر استن ۷۰ درصد، به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hettich آلمان) شد. عصاره بخش بالایی جدا و به پلیت منتقل و جذب نمونه در طول موج ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و نیز ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئید خوانده شد. میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید محاسبه شد (Lichtenthaler & Wellburn, 1983).

^۴Ninhydrin

^۵Malondialdehyde (MDA)

^۶Hydrogen peroxide (H₂O₂)

۲-۱۰. پروتئین کل

برای سنجش پروتئین کل، ۱۰ میکرولیتر از عصاره نمونه‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر بافر بردفورد آماده شده (Bradford, 1976) در هر خانه پلیت اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه آنکوباسیون، جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه پلیتریدر قرائت گردید.

۲-۱۱. آنزیم‌های آنتی اکسیدان

به ۰/۲ گرم بافت برگ، ۱ میلی لیتر از بافر استخراج Tris-HCl یک مولار حاوی پلی وینیل پیرولیدون دو درصد اضافه و سپس هموژنیزه شد، نمونه‌ها سانتریفیوژ (در ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰) شد. بعد از آنسانتریفیوژ، عصاره بالای برداشته و به تیوب جدید ریخته شد که به منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز و همچنین غلظت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب از روش‌های (Aebi (1974)، Nakano & Asada (1987) و Chance Maehly (1995) استفاده شد.

۲-۱۲. بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی

با بررسی در منابع علمی، تعدادی ژن دخیل در تحمل به خشکی در برخی گیاهان خانواده بقولات، انتخاب و با مراجعه به پایگاه داده (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov)، شماره دسترسی آن‌ها مشخص شد. بعد از این تعدادی از این ژن‌ها با کمک هم‌ردیفی^۸ در گیاه عدس مشخص شدند. برای شناسایی توالی توافقی^۹ ناحیه رمز کننده ژن‌های انتخابی عدس، در آغاز توالی‌های قطعات بیانی^{۱۰} و خوانش^{۱۱} ژن‌های انتخابی (حاصل از پروژه‌های توالی‌یابی RNA عدس در پایگاه NCBI SRA <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) با کمک توالی‌های ارتولوگ مشابه در سایر گیاهان با کمک BLAST Offline (v.2.7.0) شناسایی و مجموع این قطعات، با استفاده از نرم‌افزار Codon Code aligner (Ver. 5.0.1) با یکدیگر سرهم گردید. در ادامه چارچوب قرائت ژن‌های مذکور با بررسی توالی حاصل در ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) شناسایی و به منظور تأیید این چارچوب و ORF موردنظر آن‌ها، از نرم‌افزار BLASTp استفاده شد. بیان ژن‌ها در تنش خشکی در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در سطوح شاهد و تنش شدید، با استفاده از تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. به منظور طراحی آغازگرهای مناسب برای تکثیر ژن‌های مورد نظر از نرم‌افزارهای Oligo7 و PerlPrimer، استفاده گردید. بعد از آن آغازگرها از نظر تشکیل Self-dimer (بیش از ۶ - kcal/mol)، Hetero primer (بیش از ۶ - kcal/mol) و Hairpin (بیش از ۶ - kcal/mol)، دمای ذوب و درصد GC، در نرم‌افزار آنلاین OligoAnalyzer3.1 مورد بررسی قرار گرفتند. جدول (۱)، آغازگرهای طراحی شده را نشان می‌دهد. بعد از این کارایی آغازگرهای مختص هر ژن با آزمایش qRT-PCR چند نمونه بررسی شد و دمای مناسب برای اتصال هر جفت آغازگر بررسی شد.

۲-۱۳. استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش Real Time

RNA نمونه‌ها به وسیله کیت شرکت دنایست استخراج شد. با استفاده از نانودراپ (ساخت Thermo scientific آمریکا) و الکتروفورز (آگارز یک درصد) بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده انجام گرفت. بعد از آن به وسیله کیت شرکت پارس توس، تیمار DNase اعمال و سنتز cDNA انجام گرفت. با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز (دناژن ایران) (آگارز دو درصد) بررسی کمیت cDNA سنتز شده انجام گرفت و همچنین برای کنترل داخلی از آغازگر ژن 18srRNA استفاده شد. واکنش‌های ریل تایم (ساخت

⁷ Accession number

^۸Alignment

^۹Consensus

^{۱۰}Coding DNA Sequence

^{۱۱}Expressed Sequence Tag

^{۱۲}Reads

Qiagen (آلمان) در ۴۰ چرخه که در هر چرخه، ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای اتصال آغازگر و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت به منظور محاسبه میزان بیان هر ژن در نمونه‌های تحت تنش نسبت به نمونه‌های شاهد، از رابطه Livak استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001).

تجزیه و تحلیل داده‌ها حاصل به وسیله نرم‌افزارهای SPSS 26، SAS 9.4، انجام گرفت. از نرم افزار Excel 2013 به منظور رسم نمودارهای مقایسه میانگین دانکن استفاده شد و همچنین از آزمون Kolmogorov-Smirnov در Minitab 17 استفاده شد تا اطمینان حاصل شود که خطای داده‌ها توزیع نرمال دارند.

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

ردیف	نام آغازگر	توالی ۵' به ۳'	حدود طول قطعه تکثیر شده
1	<i>BA -F</i>	5'CATTGTGGAATTGGGATGGT 3'	180-190 bp
2	<i>BA -R</i>	5'CGATGGTGTATGTTGATGTC 3'	180-190 bp
3	<i>DREB1C -F</i>	5'TTCCTATTCTGCAACCTCG 3'	180-190 bp
4	<i>DREB1C -R</i>	5'TCATATCCAACACTGCCTCC 3'	180-190 bp
5	<i>ABAWDS -F</i>	5'TGGTGGTTATGCTTTGTATGAG 3'	180-190 bp
6	<i>ABAWDS R</i>	5'GTGTTTCTTCTTTCCATGAGCT 3'	180-190 bp
7	<i>HCF136-F</i>	5'GAGGTGGTCTTTATCTCAGCA 3'	180-190 bp
8	<i>HCF136-R</i>	5'GTCACGAATCCATGACTTGC 3'	180-190 bp
9	<i>MIMP -F</i>	5'CCTGTGCTCTTAATCTTTGTGG 3'	180-190 bp
10	<i>MIMP -R</i>	5'GGTTTGAAGCAGCTATACGC 3'	180-190 bp
11	<i>18srRNA-F</i>	5'ACGTCCCTGCCCTTTGTACAC 3'	101 bp
12	<i>18srRNA-F</i>	5'CACTTCACCGGACCATTCAAT 3'	101 bp

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

نتایج نشان داد که تنش خشکی بر صفات مختلفی مانند ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن تر ریشه، نشت یونی، شاخص سطح برگ، محتوای کلروفیل، محتوای قندهای محلول شده است (جدول ۲). فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و نیز بیان ژن‌های *ABA/WDS* و *MIMP*، *DREB1*، *BA*، *HCF136* در ژنوتیپ‌های مختلف به تنش خشکی پاسخ داده‌اند.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف بررسی شده در دو ژنوتیپ عدس (FLIP2002-55L و FLIP2002-57L) تحت سه رژیم آبیاری (شاهد، ۶۰ درصد ظرفیت زراعی، ۳۰ درصد ظرفیت زراعی). عبارات مخفف به ترتیب: SH: Shoot Height، TC: Trichome Concentration، RFW: Root Fresh Weight، RDW: Root Dry Weight، SFW: Shoot Fresh Weight، SDW: Shoot Dry Weight، RL: Root length، ELI: Electrolyte Leakage Index، LAI: Leaf Area، RWC: Relative Water Content، SS: Soluble Sugar، MDA: Malondialdehyde، CAT: Catalase، APX: Ascorbate Peroxidase، GPX: Guaiacol Peroxidase.

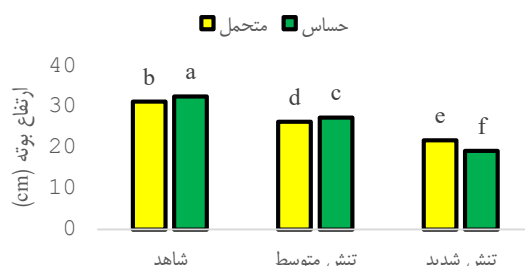
MS													
S.O.V	df	SH	TC	Number of leaves	Number of leaflets	RFW	RDW	SFW	SDW	RL	Greenness	ELI	LAI
Block	2	0.30 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.38 ^{ns}	176.16 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.84 ^{ns}	31.24 ^{ns}
Drought stress	2	195.28 ^{**}	497.8 ^{**}	10.72 ^{**}	987.50 ^{**}	0.97 ^{**}	263.83 ^{**}	35.12 ^{**}	0.62 ^{**}	8.65 ^{**}	1719.25 ^{**}	213.72 ^{**}	1812.95 ^{**}
Genotypes	1	0.03 ^{ns}	247.97 ^{**}	3.55 [*]	1184.22 [*]	0.23 ^{**}	0.001 ^{ns}	2.59 ^{**}	0.74 ^{**}	5.21 ^{**}	99.40 ^{**}	1111.40 ^{**}	11909.90 ^{**}
Genotype * Stress	2	6.92 ^{**}	17.15 ^{**}	1.72 ^{ns}	196.72 ^{ns}	0.07 ^{**}	0.00 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.14 ^{**}	5.75 ^{**}	18.65 ^{**}	114.00 ^{**}	577.43 [*]
Error	10	0.36	0.06	0.45	121.90	0.001	0.00	0.53	0.01	0.08	0.11	6.22	104.63

MS													
	df	RWC	Total chl	H ₂ O ₂	Proline	SS	Protein	MDA	Carot enoid	CAT	APX	GPX	
Block	2	2.09 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.0 ^{ns}	3.96 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.0000221 ^{ns}	0.0000151 ^{ns}	0.0000015 ^{ns}	
Drought stress	2	189.35 ^{**}	13.32 ^{**}	267.43 ^{**}	5.66 ^{**}	42.89 ^{**}	31845.92 ^{**}	4.37 ^{**}	1.47 ^{**}	0.0000855 ^{**}	0.001 ^{**}	0.92 ^{**}	
Genotypes	1	191.10 ^{**}	0.23 ^{ns}	1227.60 ^{**}	1.78 ^{**}	0.38 ^{**}	165.98 ^{**}	0.34 ^{**}	0.16 [*]	0.0 ^{**}	0.003 ^{**}	0.07 ^{**}	
Genotype * Stress	2	27.01 ^{ns}	1.95 ^{**}	3.31 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.23 ^{**}	623.24 ^{**}	0.07 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.0000125 ^{ns}	0.0000645 ^{**}	0.01 ^{**}	
Error	10	6.88	0.06	4.35	0.04	0.01	3.52	0.02	0.01	3.52	0.00000816	0.00000041	

ns، **، ***: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال خطای پنج درصد و معنی دار در سطح احتمال خطای یک درصد.

۳-۱. ارتفاع بوته و تعداد برگ و برگچه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای صفت ارتفاع بوته در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده است (جدول ۲). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ارتفاع بوته در هر دو ژنوتیپ تحت تأثیر تنش خشکی کاهش یافته است. در ژنوتیپ متحمل از ۳۱/۲۷ سانتی متر به ۲۱/۷۹ سانتی متر و در ژنوتیپ حساس از ۳۲/۵۲ سانتی متر به ۱۹/۲۳ سانتی متر کاهش یافته است. با این حال، میزان این کاهش در ژنوتیپ حساس به طور قابل توجهی شدیدتر از ژنوتیپ متحمل بود. این مهار رشد، یک پاسخ تطبیقی اولیه به کمبود آب است که مستقیماً از کاهش فشار تورژسانس سلولی ناشی می شود (Zeroual *et al.*, 2022). کاهش تورژسانس، فرآیندهای کلیدی تقسیم و طولیل شدن سلولی را متوقف می سازد (Noor *et al.*, 2024). توانایی ژنوتیپ متحمل در حفظ ارتفاع نسبتاً بالاتر، نشان دهنده موفقیت آن در مکانیسم های حمایتی زیربنایی، به ویژه تنظیم اسمزی کارآمد برای حفظ تورژسانس لازم برای رشد حداقلی است، در حالی که کاهش ارتفاع در ژنوتیپ حساس، نشان دهنده شکست در این سیستم ها است. اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای صفات تعداد برگ و تعداد برگچه معنی دار نبود. با این حال، اثرات اصلی تنش (در سطح

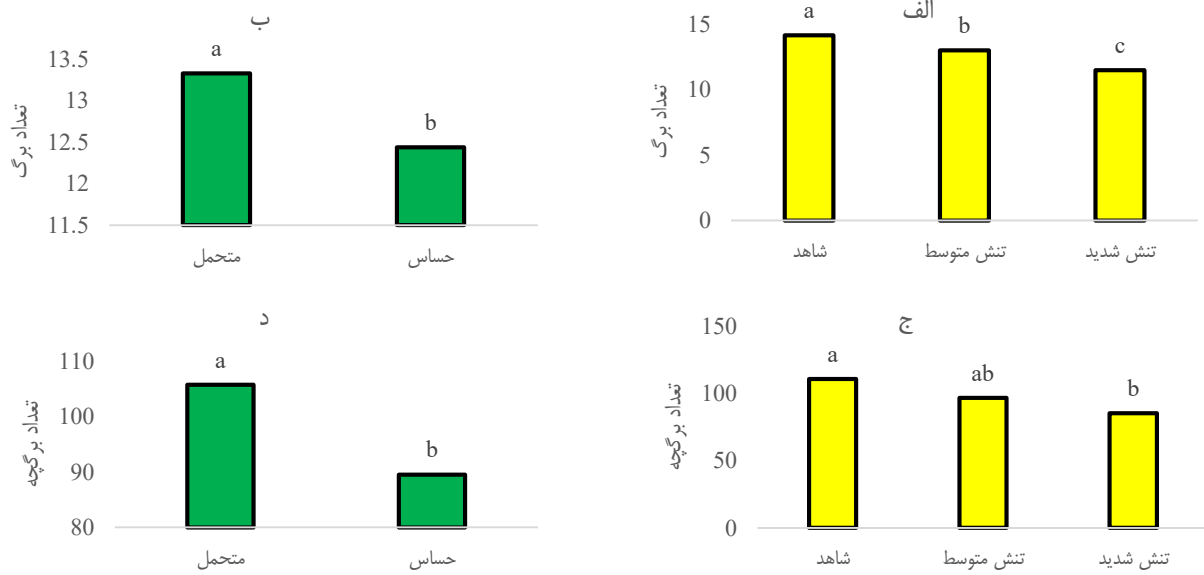


شکل ۱. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر ارتفاع بوته در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

احتمال یک درصد) و ژنوتیپ (در سطح احتمال پنج درصد) برای هر دو صفت معنی دار بودند (جدول ۲). داده ها (شکل ۲) نشان می دهند که هر دو ژنوتیپ با افزایش شدت تنش، کاهش مشابهی را در تعداد برگ و برگچه تجربه کرده اند. تعداد برگ و برگچه در ژنوتیپ متحمل به ترتیب از ۱۴ و ۱۱۲ به ۱۲ و ۹۷ و در ژنوتیپ حساس از ۱۴ و ۱۰۹ به ۱۱ و ۷۴ کاهش یافت. کاهش تعداد برگ و در نتیجه کاهش سطح کلی برگ یک استراتژی اجتناب از خشکی به منظور کاهش سطح کلی تعرق گیاه و حفظ آب محسوب می شود (Khatun *et al.*, 2021). این یک موازنه فیزیولوژیک است، به عبارتی گیاه آب را حفظ می کند اما پتانسیل فتوسنتزی خود را قربانی می سازد (X. *et al.*, 2022).

۳-۲. تراکم کرک

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای صفت تراکم کرک با سطح احتمال یک درصد معنی دار گردید (جدول ۲). تحت تنش خشکی، تراکم کرک در ژنوتیپ متحمل به طور معنی داری افزایش یافت، در حالی که در ژنوتیپ حساس کاهش یافت (شکل ۳). این یافته نشان دهنده یک استراتژی سازگاری کاملاً متفاوت است. افزایش تراکم کرک یک مکانیسم سازگاری فیزیکی شناخته شده برای بقا در



شکل ۲ - مقایسه میانگین تعداد برگ بوته عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین تعداد برگ بوته عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب)، مقایسه میانگین تعداد برگچه بوته عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (ج)، مقایسه میانگین تعداد برگ بوته عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (د). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد و ۵ درصد) با یکدیگر ندارند.

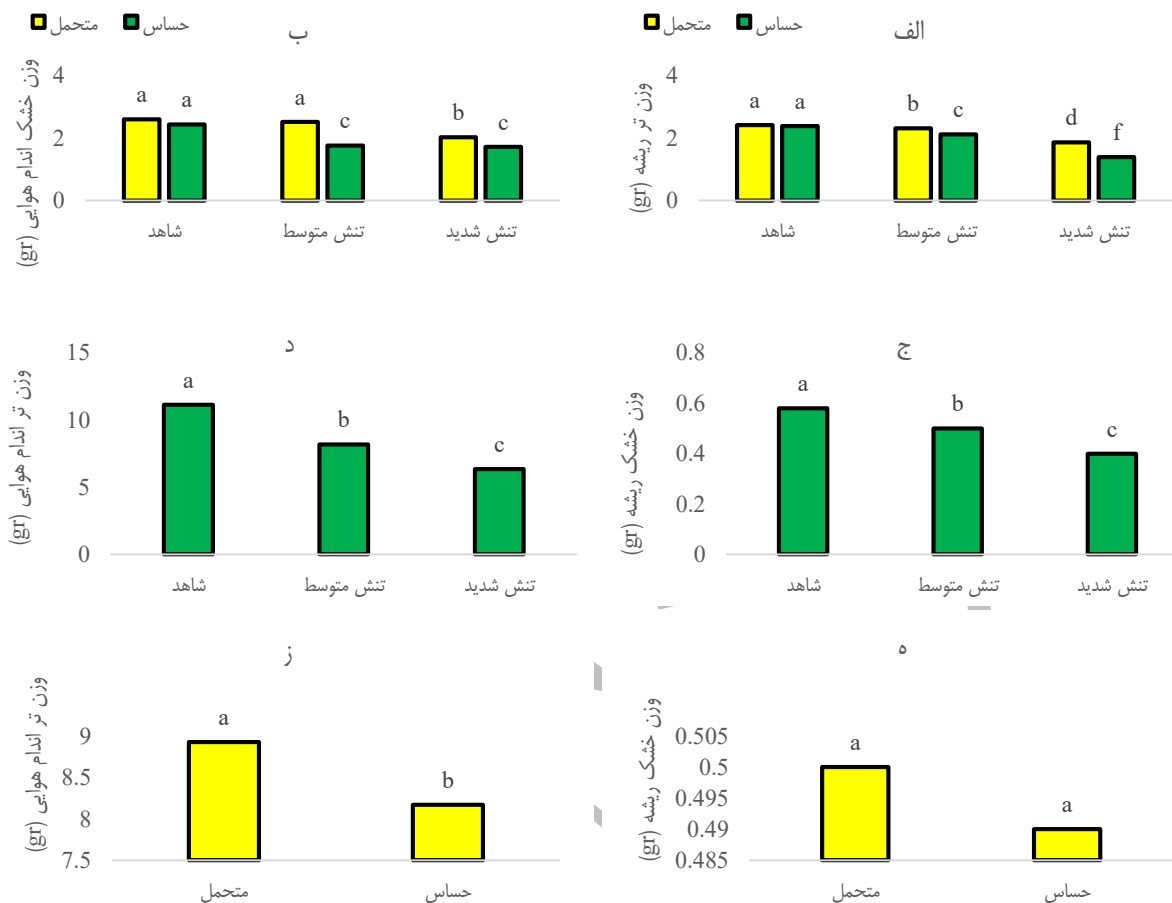
محیط‌های خشک است (Shahzad *et al.*, 2021). کرک‌ها با افزایش بازتابش تابش خورشیدی و ضخیم‌تر کردن لایه مرزی هیدرودینامیکی در سطح برگ به حفظ آب سلول‌ها کمک می‌کند (Chen *et al.*, 2022). فعال‌سازی این دفاع فیزیکی در ژنوتیپ متحمل نشان‌دهنده یک پاسخ تطبیقی فعال است. در مقابل، کاهش کرک در ژنوتیپ حساس می‌تواند نشان‌دهنده ناتوانی در اجرای این پاسخ رشدی و آغاز فرآیندهای پیری و تخریب ساختاری در پاسخ به تنش شدید باشد (Abdel-Ghany *et al.*, 2020).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر تراکم کرک در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

۳-۳. وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه

تنش خشکی منجر به کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گردید. اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای وزن تر ریشه (در سطح احتمال یک درصد) و وزن خشک اندام هوایی (در سطح احتمال یک درصد) معنی‌دار بود (شکل ۴ - الف و ب) اما اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای وزن خشک ریشه و وزن تر اندام هوایی معنی‌دار نشده است (جدول ۲). از طرفی اثر اصلی تنش در صفت وزن خشک ریشه (شکل ۴ - ج) و اثر اصلی تنش و ژنوتیپ در صفت وزن تر اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (شکل ۴ - د و ز). وزن تر و خشک اندام هوایی در ژنوتیپ متحمل به ترتیب از ۱۱/۴۷ و ۲/۶ گرم به ۶/۶۲ و ۲/۰۲ گرم کاهش یافت. در

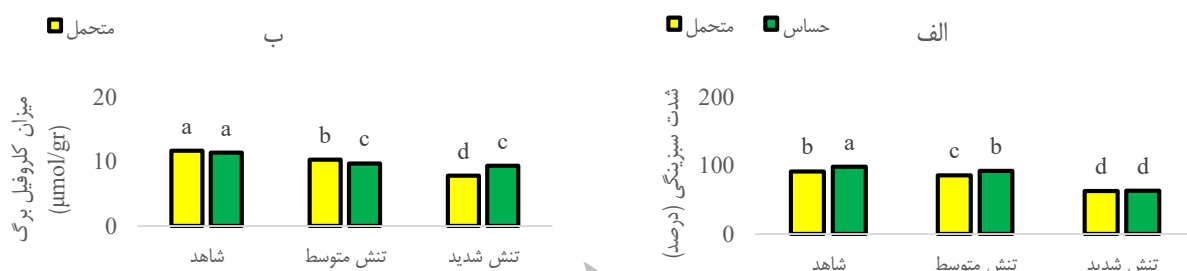


شکل ۴. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر وزن تر ریشه در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (الف)، مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر وزن خشک اندام هوایی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (ب)، مقایسه میانگین وزن خشک ریشه عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (ج)، مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (د)، مقایسه میانگین وزن خشک ریشه عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ه)، مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ز). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

ژنوتیپ حساس نیز وزن تر و خشک ساقه به ترتیب از ۱۰/۸ و ۲/۴۳ گرم به ۶/۰۶ و ۱/۷۲ گرم کاهش یافت. وزن تر و خشک ریشه نیز در شرایط شاهد در ژنوتیپ محتمل ۲/۴۱ و ۰/۶ گرم و در ژنوتیپ حساس ۲/۳۸ و ۰/۵۷ گرم اندازه‌گیری شد. وزن تر و خشک ریشه در ژنوتیپ محتمل تحت تنش شدید به ۱/۸۶ و ۰/۴۱ گرم کاهش یافت. در ژنوتیپ حساس نیز تحت تنش شدید ۱/۳۹ و ۰/۴ گرم اندازه‌گیری شد. کاهش زیست توده مورد انتظار به تنش خشکی به دلیل کاهش ظرفیت فتوسنتزی (ناشی از بسته شدن روزنه‌ها و کاهش LAI) است (Nadeem *et al.*, 2019). ژنوتیپ محتمل به دلیل حفظ بهتر کلروفیل و LAI، توانسته است نرخ فتوسنتز بالاتری را حفظ کرده و زیست توده بیشتری را تثبیت کند. این یافته نشان می‌دهد که هر دو ژنوتیپ به طور مشابهی تخصیص بیوماس به ریشه یا از دست دادن بیوماس ریشه را تجربه کرده‌اند و بر خلاف تصور رایج، ژنوتیپ محتمل لزوماً ریشه‌های بیشتری نداشته است (Ye Heng *et al.*, 2018).

۳-۴. شدت سبزی‌نگی و محتوای کلروفیل کل

در هر دو صفت شدت سبزی‌نگی و محتوای کلروفیل کل اثر متقابل ژنوتیپ در تنش در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). همانطور که در شکل‌های ۵ - الف و ب مشاهده می‌شود، هر دو شاخص در شرایط تنش کاهش یافتند (محتوای کلروفیل در ژنوتیپ متحمل از ۱۱/۷ به ۷/۸ میکرومول بر گرم و در ژنوتیپ حساس از ۱۱/۴ به ۹/۳۴ مول بر گرم). اگرچه هر دو ژنوتیپ کاهش کلروفیل را تجربه کردند، اما ژنوتیپ متحمل دچار کاهش بسیار شدیدتر و قابل توجه‌تری در محتوای کلروفیل نسبت به ژنوتیپ حساس، به ویژه در تنش شدید شد (شکل ۵ - ب). این پدیده نشان می‌دهد که کاهش کلروفیل در ژنوتیپ متحمل، نه یک آسیب، بلکه یک استراتژی سازگاری فعال برای محافظت نوری است (Kalefetoğlu Macar & Ekmekçi, 2008). در شرایط خشکی شدید، بسته شدن روزنه‌ها منجر به کاهش شدید CO₂ در دسترس برای فتوسنتز می‌شود. اگر دستگاه فتوسنتزی با همان ظرفیت به جذب انرژی نوری ادامه دهد، این انرژی اضافی منجر به تولید عظیم گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو شدید می‌شود (Qiao *et al.*).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر شدت سبزی‌نگی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (الف)، مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر محتوای کلروفیل کل در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (ب). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

بنابراین، ژنوتیپ متحمل با درک این خطر، به طور فعال دستگاه برداشت نور خود را تخریب می‌کند تا از جذب انرژی اضافی جلوگیری کرده و از آسیب نوری ممانعت به عمل آورد (Kalefetoğlu Macar & Ekmekçi, 2008). در مقابل، ژنوتیپ حساس، که فاقد این مکانیسم تنظیمی است، کلروفیل خود را حفظ می‌کند، به جذب نوری که قابل استفاده نیست ادامه می‌دهد و در نتیجه دچار تنش اکسیداتیو شدید و آسیب غشایی می‌شود.

۳-۵. شاخص سطح برگ

در شاخص سطح برگ اثر متقابل ژنوتیپ در تنش در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). شاخص سطح برگ در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت، اما این کاهش در ژنوتیپ متحمل بسیار شدیدتر بود (شکل ۶). این شاخص در ژنوتیپ متحمل از ۱۵۴/۲۴ به ۱۳۸/۵۷ سانتی‌متر مربع بر گرم کاهش یافت. در ژنوتیپ حساس نیز از ۲۲۲/۲ به ۱۶۸/۳۳ سانتی‌متر مربع بر گرم کاهش یافت. این یافته، که هم راستا با نتایج محتوای کلروفیل است، نشان‌دهنده یک استراتژی دفاعی فعال در ژنوتیپ متحمل است. LAI ظرفیت کلی کانوپی برای جذب نور و تعرق را تعیین می‌کند (Khan *et al.*, 2025). ژنوتیپ متحمل به طور فعال سطح برگ خود را کاهش می‌دهد تا سطح تعرق را پایین آورده (Khatun *et al.*, 2021) و مهم‌تر از آن، از جذب بیش از حد انرژی نوری جلوگیری کند. این یک مکانیسم محافظت نوری حیاتی است که از تولید ROS در زمانی که فتوسنتز به دلیل بسته بودن روزنه‌ها محدود شده، ممانعت می‌کند (Qiao *et al.*, 2024). در مقابل، ژنوتیپ حساس در اجرای این کاهش فعال شکست خورده و سطح برگ بیشتری را حفظ می‌کند، که منجر به جذب انرژی اضافی، تنش اکسیداتیو شدید و در نهایت آسیب فتوسنتزی می‌شود.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر شاخص سطح برگ در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۵ درصد) با یکدیگر ندارند.

۶-۳. نشت یونی

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). نشت یونی در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت، اما این افزایش در ژنوتیپ حساس به مراتب بیشتر بود (شکل ۷)، به طوری‌که در ژنوتیپ متحمل از ۴۹/۷۱ درصد در نمونه‌های شاهد به ۵۳/۱۳ درصد در نمونه‌های تحت تنش شدید افزایش یافت. در ژنوتیپ حساس نیز از ۵۵/۴۸ درصد در شرایط بدون تنش به ۷۵/۱۶ درصد در تنش شدید افزایش یافت. نشت الکترولیتی به عنوان شاخص استاندارد برای سنجش یکپارچگی و پایداری غشای سلولی استفاده می‌شود (Ifeduba *et al.*, 2024). تنش خشکی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌گردد (El Haddad *et al.*, 2023). این آسیب ساختاری، نفوذپذیری غشا را به طور غیرقابل کنترل افزایش داده و باعث می‌شود یون‌ها از سیتوپلاسم به بیرون نشت کنند (Sehgal *et al.*, 2017). اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی‌دار در اینجا نشان می‌دهد که ژنوتیپ حساس آسیب غشایی بسیار شدیدتر و گسترده‌تری را متحمل می‌شود.

۷-۳. محتوای نسبی آب برگ

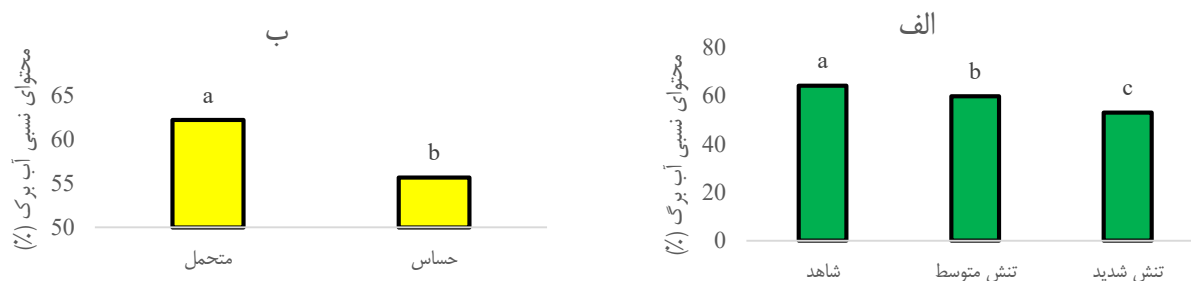


شکل ۷. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر میزان نشت یونی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

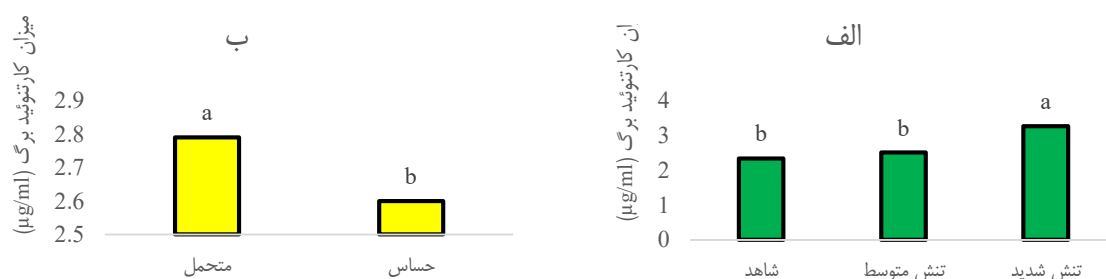
برای صفت محتوای نسبی آب برگ، اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی‌دار نبود، اما اثرات اصلی تنش و ژنوتیپ هر دو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. محتوای نسبی آب برگ در به ترتیب در ژنوتیپ متحمل و حساس از ۶۵ و ۶۳/۳۳ درصد به ۵۷/۷۸ و ۴۸/۲۳ درصد کاهش یافت. محتوای نسبی آب یک شاخص کلیدی برای ارزیابی وضعیت آبی گیاه و توانایی آن در حفظ تورژسانس بافت است (Noor *et al.*, 2024). همانطور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، RWC در هر دو ژنوتیپ تحت تنش کاهش یافت (اثر اصلی

تنش)، اما ژنوتیپ متحمل به طور مداوم و در تمام سطوح (شاهد، متوسط و شدید) RWC بالاتری را نسبت به ژنوتیپ حساس حفظ کرد (اثر اصلی ژنوتیپ).

۸-۳. محتوای کاروتنوئید



شکل ۸. مقایسه میانگین محتوای نسبی آب برگ عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین محتوای نسبی آب برگ عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.



شکل ۹. مقایسه میانگین محتوای کاروتنوئید عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین محتوای کاروتنوئید عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ و ۵ درصد) با یکدیگر ندارند.

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش در محتوای کلروفیل معنی‌دار نبود، اما اثرات اصلی تنش در سطح احتمال یک درصد و ژنوتیپ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲). برخلاف کلروفیل، محتوای کاروتنوئیدها در هر دو ژنوتیپ تحت تنش افزایش یافت (شکل ۹ - الف و ب). در ژنوتیپ متحمل از ۲/۴۲ میکرومول بر گرم به ۳/۴۱ و در ژنوتیپ حساس از ۲/۲۵ میکرومول بر گرم به ۳/۱۲. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های کمی هستند که نقش حیاتی در محافظت نوری ایفا می‌کنند (Kalefetoğlu Macar & Ekmekçi, 2008). هنگامی که به دلیل بسته شدن روزنه‌ها در شرایط خشکی، CO₂ برای فتوسنتز محدود می‌شود، انرژی نوری اضافی جذب شده توسط کلروفیل باید دفع شود. کاروتنوئیدها این انرژی اضافی را به صورت گرما تلف می‌کنند و همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن را خنثی می‌سازند، و بدین ترتیب از تخریب کلروفیل و غشاهای جلولگیری می‌کنند (Kalefetoğlu Macar & Ekmekçi, 2008).

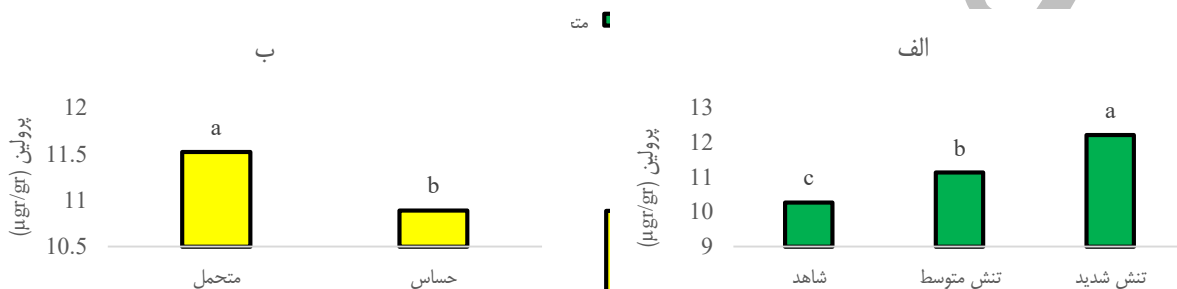
۹-۳. محتوای پرولین

تجمع پرولین فاقد اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی‌دار بود، اما اثرات اصلی تنش و ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد به معنی‌دار بودند (جدول ۲). پرولین در هر دو ژنوتیپ به شدت افزایش یافت، اما میزان تجمع در ژنوتیپ متحمل به طور قابل توجهی بالاتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۱۰ - ب). محتوای پرولین در ژنوتیپ متحمل و حساس تحت شرایط بدون تنش به ترتیب ۱۰/۶۵ و ۹/۸۹ میکروگرم بر گرم اندازه‌گیری شد. این میزان تحت تنش شدید در ژنوتیپ متحمل و حساس به ترتیب به ۱۲/۶۱ و ۱۱/۸۱ میکروگرم بر گرم افزایش یافت. پرولین یک اسمولیت سازگار چندکاره و کلیدی است که تجمع آن یکی از رایج‌ترین و مهم‌ترین پاسخ‌های گیاه به تنش‌های اسمزی (خشکی و شوری) است (Chun et al., 2018). نقش اصلی پرولین، تنظیم اسمزی است؛ با انباشته شدن در سیتوپلاسم، پتانسیل اسمزی سلول را کاهش می‌دهد و به حفظ فشار تورژسانس و جذب آب از خاک خشک کمک می‌کند.

(Ghosh *et al.*, 2021). علاوه بر این، پرولین به عنوان یک محافظ مولکولی و یک آنتی اکسیدان غیرآنزیمی عمل کرده و از ساختارهای پروتئینی و غشاهای برابر آسیب ناشی از کم‌آبی و ROS محافظت می‌کند (Zeroual *et al.*, 2022). تجمع بیشتر پرولین در ژنوتیپ متحمل نشان دهنده حفظ بهتر تورژسانس و پایداری بهتر غشا در ژنوتیپ متحمل است

۳-۱۰. محتوای قندهای محلول

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش برای محتوای قندهای محلول در معنی‌دار (در سطح احتمال ۱ درصد) بود (جدول ۲). قندهای محلول در هر دو ژنوتیپ افزایش یافتند، اما این افزایش در ژنوتیپ متحمل به طور چشمگیری و به مراتب بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۱۱). به طوریکه در ژنوتیپ متحمل از ۳۴/۲ به ۳۹/۸۶ میکروگرم بر گرم و در ژنوتیپ حساس از ۳۴/۱۵ به ۳۹/۱۱ میکروگرم بر گرم افزایش یافت. قندهای محلول، در کنار پرولین، نقش اساسی در تنظیم اسمزی دارند و با کاهش پتانسیل آب سلولی، به حفظ



شکل ۱۰. مقایسه میانگین محتوای پرولین عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین محتوای پرولین عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

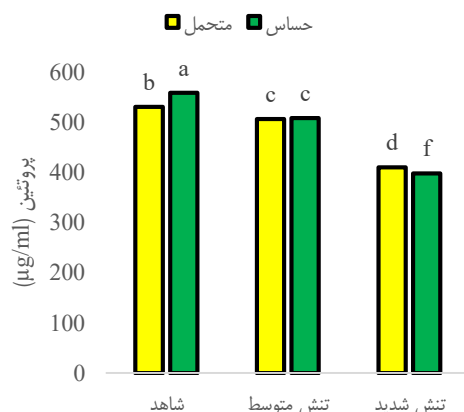
شکل ۱۱. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر محتوای قندهای محلول در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

تورژسانس کمک می‌کنند (El Haddad *et al.*, 2023). آن‌ها همچنین به عنوان مولکول‌های سیگنالینگ حیاتی در مسیرهای پاسخ به تنش و به عنوان پاک‌کن ROS عمل می‌کنند (Ghosh *et al.*, 2021). ژنوتیپ متحمل نه تنها پرولین بیشتری می‌سازد، بلکه به طور تهاجمی مسیرهای بیوستنز یا تجزیه نشاسته به قندهای محلول را نیز فعال می‌کند. این پاسخ هماهنگ یک پتانسیل اسمزی بسیار منفی و محافظت‌کننده ایجاد می‌کند که به ژنوتیپ متحمل اجازه می‌دهد در شرایط کمبود آب، آب را حفظ کرده و فرآیندهای متابولیکی حیاتی را ادامه دهد.

۳-۱۱. محتوای پروتئین کل

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش با سطح احتمال یک درصد در صفت محتوای پروتئین کل معنی دار شد (جدول ۲). پروتئین کل در هر دو ژنوتیپ تحت تنش کاهش یافت (در ژنوتیپ متحمل از ۵۳۰/۸ به ۴۱۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر)، اما این کاهش در ژنوتیپ حساس بسیار شدیدتر بود (از ۵۵۹/۰۱ به ۳۹۸/۳۶ میکروگرم بر میلی لیتر) (شکل ۱۲). کاهش پروتئین کل تحت تنش خشکی یک پدیده رایج است که به دو دلیل اصلی رخ می دهد: مهار ترجمه و سنتز پروتئین که فرآیندی بسیار پر انرژی است و در شرایط کمبود منابع متوقف می شود، و افزایش تخریب پروتئین به دلیل آسیب های اکسیداتیو یا نیاز به بازیافت اسیدهای آمینه برای تولید اسمولیت هایی مانند پرولین (Nadeem *et al.*, 2019). نتایج نشان می دهد که ژنوتیپ حساس در حال از دست دادن پروتئین های خود است. در مقابل، ژنوتیپ متحمل، اگرچه کاهش نشان می دهد، اما به طور قابل توجهی بهتر قادر به محافظت از پروتئین های عملکردی خود است.

۱۲-۳. نشانگرهای تنش اکسیداتیو



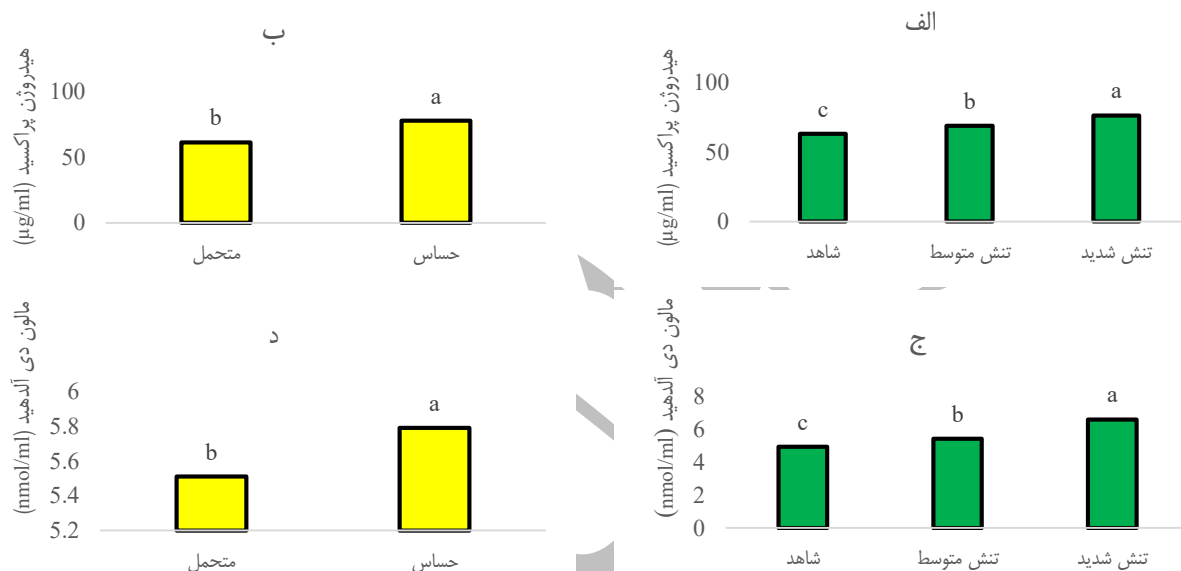
شکل ۱۲. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر محتوای پروتئین کل در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس. ستون های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

برای هر دو نشانگر کلیدی تنش اکسیداتیو، یعنی هیدروژن پراکسید و مالون دی آلدئید، اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی دار نبود، اما اثرات اصلی تنش (در سطح احتمال یک درصد) و ژنوتیپ (در سطح احتمال یک درصد) معنی دار بودند (جدول ۲). هیدروژن پراکسید یک مولکول سیگنالینگ کلیدی از خانواده ROS است، اما در غلظت های بالا به شدت سمی بوده و باعث آسیب سلولی می شود (Ibrahim & Jaafar, 2012). مالون دی آلدئید محصول نهایی و پایدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است و به عنوان شاخص مستقیم آسیب اکسیداتیو به غشاها عمل می کند (Khatun *et al.*, 2021). داده ها نشان می دهند که هر دو ماده تحت تنش در هر دو ژنوتیپ افزایش می یابند (محتوای H_2O_2 در ژنوتیپ متحمل و حساس به ترتیب از ۵۵/۵ و ۷۰/۵۸ به ۶۷/۳۳ و ۸۵/۳۸ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش و محتوای MDA در ژنوتیپ متحمل و حساس به ترتیب از ۴/۸۹ و ۴/۹۹ به ۶/۳۴ و ۶/۸۶ نانومول بر میلی لیتر افزایش می یابد)، که تأیید می کند هر دو گیاه دچار تنش اکسیداتیو شده اند (شکل ۱۳). با این حال، اثر اصلی معنی دار ژنوتیپ یافته کلیدی است. این نشان می دهد که اگرچه هر دو گیاه تنش اکسیداتیو را تجربه می کنند، ژنوتیپ حساس تحت تنش اکسیداتیو بسیار بیشتری قرار دارد،

زیرا سیستم دفاعی آن توانایی خنثی سازی هیدروژن پراکسید را ندارد. این H_2O_2 اضافی به لیپیدهای غشا حمله کرده و MDA بیشتری تولید می کند، که منجر به نشت یونی بیشتر می شود.

۳-۱۳. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی

اثر متقابل ژنوتیپ در تنش در فعالیت آنزیم کاتالاز معنی دار نبود، اما اثرات اصلی تنش و ژنوتیپ (در سطح احتمال یک درصد) معنی دار بودند (جدول ۲). فعالیت کاتالاز، که عمدتاً در پراکسی زومها H_2O_2 با غلظت بالا را حذف می کند (Cruz de Carvalho, 2008)، در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت، اما در ژنوتیپ متحمل به طور مداوم بالاتر بود (شکل ۱۴-الف و ب). فعالیت کاتالاز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در شرایط بدون تنش به ترتیب $0.25 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ و 0.19

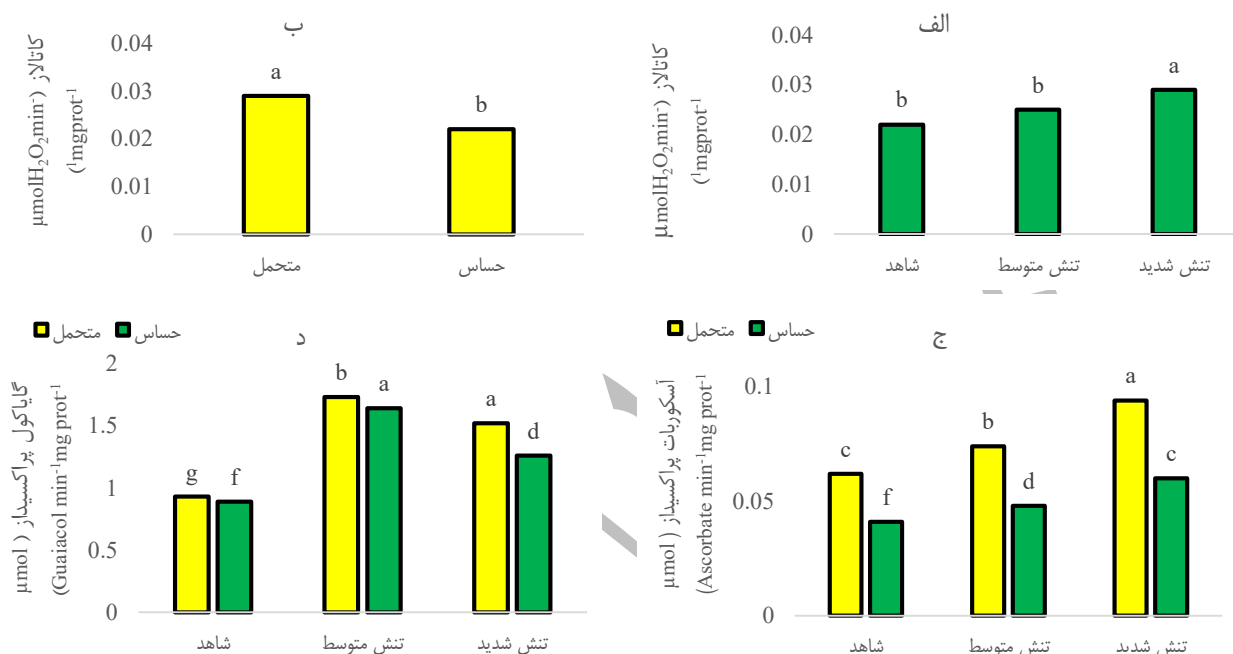


شکل ۱۳. مقایسه میانگین محتوای هیدروژن پراکسید عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین محتوای هیدروژن پراکسید عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب)، مقایسه میانگین محتوای مالون دی آلدیید عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (ج)، مقایسه میانگین محتوای مالون دی آلدیید عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (د). ستون های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

اندازه گیری شد. میزان فعالیت آن در تنش شدید $0.35 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ و 0.24 بود. این نشان دهنده یک پاسخ دفاعی عمومی و پایه ای است که در ژنوتیپ متحمل قوی تر است (Sofa *et al.*, 2015).

آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز برخلاف کاتالاز، اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی دار (در سطح احتمال یک درصد) نشان دادند (جدول ۲). فعالیت این دو آنزیم در ژنوتیپ متحمل به شدت و به طور چشمگیری افزایش یافت (فعالیت APX و GPX در ژنوتیپ متحمل از 0.62 و 0.93 به $0.94 \mu\text{mol Ascorbate min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ و $0.94 \mu\text{mol Guaiacol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ، در حالی که در ژنوتیپ حساس افزایش بسیار ناچیزی در فعالیت APX داشت یا افزایش فعالیت GPX آن به مراتب کمتر بود (فعالیت APX و GPX در ژنوتیپ حساس از 0.41 و 0.89 به $0.41 \mu\text{mol Ascorbate min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ و $0.41 \mu\text{mol Guaiacol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ (شکل ۱۴-ج و د). آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز آنزیم های با میل ترکیبی بالا برای H_2O_2 هستند که در اندامک های مختلف از جمله کلروپلاست و سیتوزول، وظیفه تنظیم دقیق و پاکسازی

H₂O₂ را بر عهده دارند (Anjum *et al.*, 2016). اثر متقابل ژنوتیپ در تنش معنی دار در اینجا نشان می‌دهد که تفاوت اساسی بین دو ژنوتیپ، توانایی ژنوتیپ متحمل در فعال‌سازی اختصاصی این مسیرهای پاکسازی پیشرفته و با کارایی بالا است (Nadeem *et al.*, 2019)، در حالی که ژنوتیپ حساس در این فعال‌سازی شکست می‌خورد. این پاسخ آنزیمی برتر در ژنوتیپ متحمل، توضیح می‌دهد که چرا با وجود تولید ROS، سطوح H₂O₂ و MDA پایین‌تری دارد و در نتیجه آسیب غشایی و تخریب کلروفیل



شکل ۱۴. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز، عدس در سطح شاهد، تنش متوسط و تنش شدید (الف)، مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز عدس در دو ژنوتیپ حساس و متحمل (ب)، مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (ج)، مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در دو ژنوتیپ حساس و متحمل عدس (د). ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری (آزمون دانکن در سطح ۱ درصد) با یکدیگر ندارند.

کمتری را تجربه می‌کند.

۱۴-۳. بررسی بیان ژن‌های موثر در تنش خشکی

۱۴-۳-۱. High Chlorophyll Fluorescence 136

بیان نسبی ژن *HCF136* در هر دو ژنوتیپ تحت تنش شدید افزایش یافت. این افزایش در ژنوتیپ متحمل ۱/۹۲ برابر و در ژنوتیپ حساس ۱/۵۳ برابر بود (شکل ۱۵). ژن *HCF136* برای مونثاژ، پایداری و تعمیر مرکز واکنش فتوسیستم II (PSII) حیاتی است (Meurer *et al.*, 1998). فتوسیستم II اولین و حساس‌ترین بخش زنجیره فتوستتزی است که تحت تنش خشکی آسیب می‌بیند و به منبع اصلی تولید ROS تبدیل می‌شود (Zadraznik *et al.*, 2019). افزایش بیان *HCF136* در هر دو ژنوتیپ نشان‌دهنده یک مکانیسم فعال تعمیر و نگهداری است؛ گیاه در تلاش است تا واحدهای آسیب‌دیده PSII را جایگزین کند (Plöschinger *et al.*, 2016). بیان بالاتر در ژنوتیپ متحمل نشان‌دهنده ظرفیت تعمیراتی قوی‌تر است (Zadraznik *et al.*, 2019). این موضوع نشان می‌دهد که چرا ژنوتیپ متحمل کلروفیل خود را بهتر حفظ کرده و آسیب اکسیداتیو کمتری را تجربه می‌کند.

۱۴-۳-۲. بتا آمیلاز^{۱۳}

^{۱۳}Beta amylase (BA)

بیان نسبی ژن *بتا/میلانر (BA)* در هر دو ژنوتیپ به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۱۵). این کاهش در ژنوتیپ حساس ۰/۱۴ برابر و در ژنوتیپ متحمل ۰/۳۱ بود. این یافته در نگاه اول با افزایش شدید قندهای محلول متناقض است، زیرا BA نشاسته را به قند (مالتوز) تجزیه می‌کند (Yang et al., 2023). با این حال، برخی ایزوفرم‌های BA (مانند BAM1) به طور خاص در سلول‌های نگهبان روزنه بیان می‌شوند و کاهش بیان آن‌ها منجر به تجمع نشاسته در این سلول‌ها و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود، که یک مکانیسم کلیدی حفظ آب است. بنابراین، کاهش کنترل‌شده بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل می‌تواند یک پاسخ تنظیمی فعال برای کمک به بستن روزنه‌ها باشد (Prasch et al., 2015). در مقابل، کاهش بسیار شدیدتر در ژنوتیپ حساس به احتمال زیاد نشان‌دهنده یک فروپاشی کلی در متابولیسم پایه است.

۳-۱۴-۳. میواینوزیتول مونوفسفاتاز

بیان نسبی ژن *MIMP* نیز در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت (شکل ۱۵). این کاهش در ژنوتیپ متحمل ۰/۳۰ برابر و در ژنوتیپ حساس ۰/۴۹ بود. میواینوزیتول مونوفسفاتاز آنزیمی در مسیر متابولیسم اینوزیتول است. این مسیر هم برای تولید اسمولیت‌ها و هم برای سیگنالینگ تنش حیاتی است (Nourbakhsh et al., 2015). میواینوزیتول مونوفسفاتاز و سایر فسفاتازها، این مولکول‌های سیگنالینگ (مانند *InsP3*) را تجزیه کرده و سیگنال تنش را خاتمه می‌دهند (Jia et al., 2019). بنابراین، سرکوب شدیدتر *MIMP* در ژنوتیپ متحمل یک مکانیسم بازخورد منفی پیشرفته است. این سرکوب باعث می‌شود سیگنال‌های *InsP3* و Ca^{2+} برای مدت طولانی‌تری فعال بمانند و پاسخ‌های دفاعی پایین‌دستی را قوی‌تر تحریک کنند. ژنوتیپ حساس، با سرکوب کمتر *MIMP*، سیگنال تنش را زودتر خاموش می‌کند و قادر به اجرای یک پاسخ دفاعی کامل نیست (Joshi-Saha & Reddy, 2015).

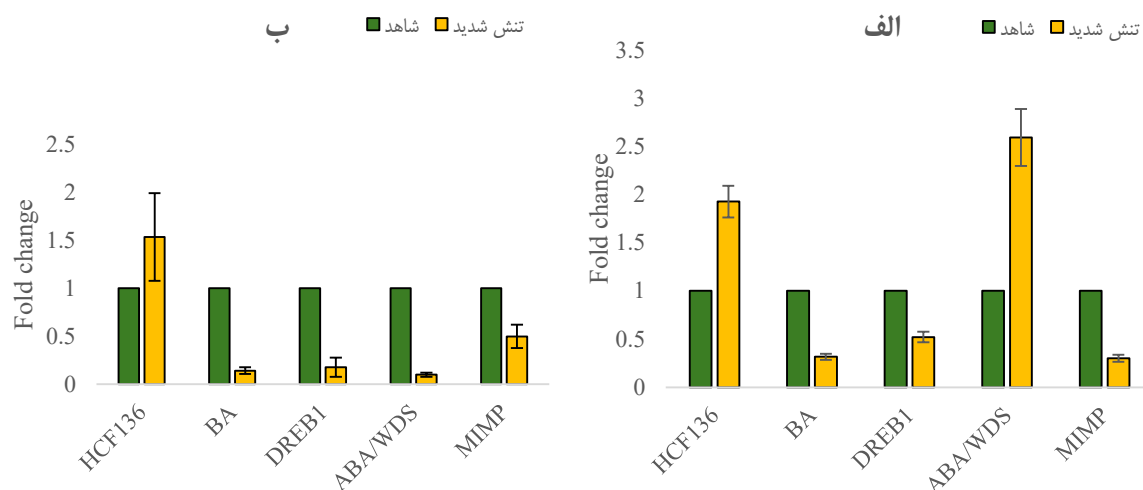
۳-۱۴-۴. *DREB1C*

بیان نسبی این ژن در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت (متحمل ۰/۵۲ برابر؛ حساس ۰/۱۷ برابر) (شکل ۱۵). این یافته ممکن است در ابتدا متناقض به نظر برسد، زیرا *DREB*‌ها به عنوان فعال‌کننده تحمل به خشکی شناخته می‌شوند (Joshi et al., 2016). با این حال، خانواده *DREB* بسیار بزرگ است. تشدید بیان *DREB1* می‌تواند منجر به کوتولگی و کاهش محصول شود (Singh & Laxmi, 2015). بنابراین، کاهش بیان *DREB1* در هر دو ژنوتیپ (به ویژه در ژنوتیپ متحمل) می‌تواند یک اقدام تنظیمی هوشمندانه برای اولویت‌بندی مسیرهای مرتبط با خشکی و جلوگیری از اتلاف منابع باشد (Kidokoro et al., 2009).

۳-۱۴-۵. *(ABA/WDS) Abscissic acid/Water deficit stress*

این ژن یک پاسخ کاملاً واگرا و تعیین کننده نشان داد. بیان نسبی *ABA/WDS* در ژنوتیپ متحمل به شدت افزایش (۲/۵۹ برابر) و در ژنوتیپ حساس به شدت کاهش (۰/۰۹ برابر) یافت (شکل ۱۵). این ژن، که بخشی از خانواده پروتئین‌های ASR است، هسته مرکزی مسیر سیگنالینگ وابسته به ABA را تشکیل می‌دهد (Liu et al., 2023). این پروتئین‌ها دارای نقش دوگانه هستند: هم به عنوان فاکتور رونویسی و هم به عنوان چاپرون مولکولی برای محافظت فیزیکی از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در برابر تخریب ناشی از کم‌آبی (Yacoubi et al., 2021). فعال‌سازی شدید این ژن در ژنوتیپ متحمل، برتری آن را در دو بخش نشان می‌دهد؛ فعال‌سازی سیگنالینگ ABA برای بستن روزنه‌ها و سایر دفاع‌ها، و محافظت چاپرونی از پروتئین‌های کلیدی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان. کاهش شدید آن در ژنوتیپ حساس، دلیل اصلی ناتوانی آن در محافظت از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و در نتیجه، فروپاشی غشا و مرگ سلولی است.

۴. نتیجه‌گیری



شکل ۱۵ – نمودارهای بیان نسبی ژن‌ها در تنش شدید نسب به شاهد. (الف) ژنوتیپ متحمل، (ب) ژنوتیپ حساس. *High Chlorophyll 136 HCF136*, *Abscisic acid/water ABA/WDS*, *Dehydration-responsive element binding protein 1 DREB1*, *Beta amylase BA*, *Fluorescence (myo-inositol monophosphatase MIMP deficit stress*

نتایج این تحقیق، تفاوت‌های مکانیسمی عمیقی را در استراتژی‌های پاسخ به تنش خشکی بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس عدس آشکار می‌سازد. ژنوتیپ حساس یک پاسخ غیرفعال و فروپاشی متابولیکی را نشان داد. اگرچه این ژنوتیپ تلاش‌های اولیه‌ای برای سازگاری عمومی (مانند کاهش تعداد برگ و افزایش کاروتنوئید) نشان داد، اما در نقاط کلیدی تنظیم مولکولی شکست خورد. مهم‌تر از همه، این ژنوتیپ نه تنها نتوانست مسیر سیگنالینگ حیاتی وابسته به ABA (یعنی ژن *ABA/WDS*) را فعال کند، بلکه بیان این ژن دچار فروپاشی شد. این شکست مولکولی منجر به ناتوانی در فعال‌سازی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی با میل ترکیبی بالا (APX و GPX) گردید. در نتیجه، H₂O₂ تجمع یافته و منجر به آسیب اکسیداتیو گسترده، پراکسیداسیون شدید لیپیدی، از دست دادن کامل یکپارچگی غشا و تخریب پروتئین‌ها شد.

در مقابل، ژنوتیپ متحمل یک استراتژی دفاعی فعال، چندلایه و هماهنگ را اجرا کرد. این استراتژی در سطح ریخت‌شناسی با فعال‌سازی دفاع فیزیکی (افزایش کرک) و حفظ بهتر تورژسانس (حفظ ارتفاع) آشکار شد. این برتری فیزیولوژیکی توسط یک دفاع بیوشیمیایی قدرتمند پشتیبانی می‌شود که شامل تجمع همزمان و بیشتر اسمولیت‌ها (پرولین و قندهای محلول) برای تنظیم اسمزی و محافظت چاپرونی، و یک پاسخ آنتی‌اکسیدانی بسیار برتر از طریق فعال‌سازی شدید آنزیم‌های APX و GPX برای خنثی‌سازی ROS. نکته قابل توجه، این ژنوتیپ به جای حفظ دستگاه فتوسنتزی، از یک استراتژی محافظت نوری فعال از طریق تخریب کلروفیل و

کاهش شاخص سطح برگ برای جلوگیری از تولید ROS استفاده کرد. در نهایت، این دفاع هماهنگ توسط یک شبکه تنظیمی هوشمند مولکولی هدایت می‌شود که شامل؛ افزایش شدید بیان *ABA/WDS* برای ایجاد محافظت چاپرونی و سیگنالینگ ABA، افزایش بیان *HCF136* برای تعمیر فعالانه فتوسیستم II آسیب‌دیده، و تنظیم دقیق مسیرهای سیگنالینگ (مانند سرکوب *MIMP*) برای طولانی‌تر کردن سیگنال تنش. در مجموع، تحمل در ژنوتیپ مورد بررسی نه از طریق یک مکانیسم واحد، بلکه از طریق یک پاسخ تنظیمی برتر، فعال‌سازی هماهنگ مسیرهای محافظت اسمزی و آنتی‌اکسیدانی، و توانایی حفظ یکپارچگی ساختاری و مولکولی در مواجهه با تنش اکسیداتیو حاصل می‌شود.

۵. منابع

- امینی، زهره، حداد، رحیم، مرادی، فواد. (۱۳۸۷). بررسی اثر تنش کم آبی بر نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسند در مراحل رشد زایشی گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.). *علوم آب و خاک*. ۱۲ (۴۶). ۶۵-۷۴. doi: 20.1001.1.24763594.1387.12.46.7.6
- خزاعی، مسعود، گلوی، محمد، دهمرده، مهدی، موسوی نیک، سیدمحسن، زمانی، غلامرضا، مهدی نژاد، نفیسه و همکاران. (۱۳۹۷). تأثیر تنش خشکی بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در سه ژنوتیپ ارزن دم‌روبا (*Setaria italica* L.). *فرآیند و کارکرد گیاهی*. ۷ (۲۷). ۲۶-۲۸. doi: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.18.9
- حسینعلی پور، بهاره، راهنما، افراسیاب و فرخیان فیروزی، احمد. (۱۳۹۹). اثر تنش خشکی بر رشد و معماری ریشه گندم در مرحله رشد رویشی. *علوم گیاهان زراعی ایران*. ۵۱ (۱). ۶۳-۷۵. doi: 20.1001.1.20084811.1399.51.1.6.5
- قوچانیان حق وردی، الهام، خزیمه نژاد، حسین، مقری فریز، علیرضا و خراشادی زاده، امید (1403). Efficiency of Machine Learning Techniques for Predicting Vapor Pressure Deficit in Arid and Semi-Arid Regions (Case Study: South Khorasan Province). *مجله پژوهش‌های خشکسالی و تغییر اقلیم*. 2(4), 85-102. doi: 10.22077/jdcr.2024.8327.1082
- Abdel-Ghany, S. E., Ullah, F., Ben-Hur, A., & Reddy, A. S. N. (2020). Transcriptome analysis of drought-resistant and drought-sensitive sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes in response to PEG-induced drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 772.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 673–684). Elsevier.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., & Vasudhevan, P. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002–19029.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207.
- Biju, S., Fuentes, S., & Gupta, D. (2023). Novel insights into the mechanism (s) of silicon-induced drought stress tolerance in lentil plants revealed by RNA sequencing analysis. *BMC Plant Biology*, 23(1), 498.
- 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(1–2), 248–254.
- Chance Maehly, A. C. (1995). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 2, 764–775.
- Chen, J.-J., Sun, Y., Kopp, K., Oki, L., Jones, S. B., & Hipps, L. (2022). Effects of water availability on leaf trichome density and plant growth and development of *Shepherdia* × *utahensis*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 855858.
- Chun, S. C., Paramasivan, M., & Chandrasekaran, M. (2018). Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2525.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156–165.
- El Haddad, N., En-Nahli, Y., Choukri, H., Aloui, K., Mentag, R., El-Baouchi, A., Hejjoui, K., Rajendran, K., Smouni, A., & Maalouf, F. (2023). Metabolic mechanisms underlying heat and drought tolerance in lentil accessions: implications for stress tolerance breeding. *Plants*, 12(23), 3962.
- Erskine, W. (2009). Global production, supply and demand. *The Lentil: Botany, Production and Uses*, 4–12.
- 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(6), 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 rewetting in arid and semi-arid environment. *Pak. J. Bot.*, 53(2), 419–424.
- Feng, X., Zhong, L., Tian, Q., & Zhao, W. (2022). Leaf water potential-dependent leaflet closure contributes to legume leaves cool down and drought avoidance under diurnal drought stress. *Tree Physiology*, 42(11), 2239–2251.
- Ghochanian Haghverdi, E., Khozaymeh Nezhad, H., Moghri Friz, A., & Khorashadizadeh, O. (2025). Efficiency of Machine Learning Techniques for Predicting Vapor Pressure Deficit in Arid and Semi-Arid Regions (Case Study: South Khorasan Province). *Journal of Drought and Climate change Research*, 2(4), 85–102. <https://doi.org/10.22077/jdcr.2024.8327.1082>
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., & Khan, M. A. R. (2021). Understanding the roles of osmolytes for acclimatizing plants to changing environment: a review of potential mechanism. *Plant Signaling & Behavior*, 16(8), 1913306.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (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.
- Ibrahim, M. H., & Jaafar, H. Z. E. (2012). Primary, secondary metabolites, H₂O₂, malondialdehyde and photosynthetic responses of *Orthosiphon stamineus* Benth. to different irradiance levels. *Molecules*, 17(2), 1159–1176.
- Ifeduba, A. M., Zhen, S., Pandey, J., & Vales, M. I. (2024). Leaf Membrane Stability under High Temperatures as an Indicator of Heat Tolerance in Potatoes and Genome-Wide Association Studies to Understand the Underlying Genetics. *Plants*, 13(16), 2175.
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., Liang, K., Ke, Q., Lin, W., & Huang, J. (2019). The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3999.
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029.
- Joshi-Saha, A., & Reddy, K. S. (2015). Repeat length variation in the 5'UTR of myo-inositol monophosphatase gene is related to phytic acid content and contributes to drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5683–5690.
- Kalefetoğlu Macar, T., & Ekmekçi, Y. (2008). PSII photochemistry and antioxidant responses of a chickpea variety exposed to drought. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 63(7–8), 583–594.
- Khan, A. A., Wang, Y.-F., Akbar, R., & Alhoqail, W. A. (2025). Mechanistic insights and future perspectives of drought stress management in staple crops. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1547452.
- Khatun, M., Sarkar, S., Era, F. M., Islam, A. K. M. M., Anwar, M. P., Fahad, S., Datta, R., & Islam, A. K. M. A. (2021). Drought stress in grain legumes: Effects, tolerance mechanisms and management. *Agronomy*, 11(12), 2374.
- Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z. K., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., & Shinozaki, K. (2009). The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(4), 2046–2057.
- Kumar, A., & Elston, J. (1992). Genotypic differences in leaf water relations between *Brassica juncea* and *B. napus*. *Annals of Botany*, 70(1), 3–9.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. Portland Press Ltd.
- Liu, H., Ding, Q., Cao, L., Huang, Z., Wang, Z., Zhang, M., & Jian, S. (2023). Identification of the Abscissic Acid-, Stress-, and Ripening-Induced (ASR) Family Involved in the Adaptation of *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze to Saline-Alkaline and Drought Habitats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15815.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Meurer, J., Plücker, H., Kowallik, K. V., & Westhoff, P. (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*.
- Montejano-Ramírez, V., & Valencia-Cantero, E. (2024). The importance of lentils: An overview. *Agriculture*, 14(1), 103.
- 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(10), 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(1), 131–140.
- Noor, M. M. Al, Tahjib-Ul-Arif, M., Alim, S. M. A., Islam, M. M., Hasan, M. T., Babar, M. A., Hossain, M. A., Jewel, Z. A., Murata, Y., & Mostofa, M. G. (2024a). Lentil adaptation to drought stress: response, tolerance, and breeding approaches. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1403922.
- Noor, M. M. Al, Tahjib-Ul-Arif, M., Alim, S. M. A., Islam, M. M., Hasan, M. T., Babar, M. A., Hossain, M. A., Jewel, Z. A., Murata, Y., & Mostofa, M. G. (2024b). Lentil adaptation to drought stress: response, tolerance, and breeding approaches. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1403922.
- Nourbakhsh, A., Collakova, E., & Gillaspay, G. E. (2015). Characterization of the inositol monophosphatase gene family in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 725.
- Öktem, H. A., Eyidoğan, F., Demirba, D., Bayraç, A. T., Öz, M. T., 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.
- Plöschinger, M., Schwenkert, S., Von Sydow, L., Schröder, W. P., & Meurer, J. (2016). Functional update of the auxiliary proteins PsbW, PsbY, HCF136, PsbN, TerC and ALB3 in maintenance and assembly of PSII. *Frontiers in Plant Science*, 7, 423.
- Prasch, C. M., Ott, K. V., Bauer, H., Ache, P., Hedrich, R., & Sonnewald, U. (2015). β -amylase1 mutant Arabidopsis plants show improved drought tolerance due to reduced starch breakdown in guard cells. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 6059–6067.
- Qiao, M., Hong, C., Jiao, Y., Hou, S., & Gao, H. (2024). Impacts of drought on photosynthesis in major food crops and the related mechanisms of plant responses to drought. *Plants*, 13(13), 1808.
- Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2017). Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes varying in heat and drought sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1776.
- Shahzad, M., Khan, Z., Nazeer, W., Arshad, S. F., Ahmad, F., Farid, B., Shahid, M. R., & Riaz, H. (2021). Effect of drought on trichome density and length in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Bioresource Management*, 8(1), 15.
- Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*, 6, 895.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561–13578.
- Sturgeon, R. J. (1990). Monosaccharides. In *Methods in plant biochemistry* (Vol. 2, pp. 1–37). Elsevier.
- 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(4), 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 Science*, 151(1), 59–66.
- Yacoubi, I., Hamdi, K., Fourquet, P., Bignon, C., & Longhi, S. (2021). Structural and functional characterization of the aba-water deficit stress domain from wheat and barley: An intrinsically disordered domain behind the versatile functions of the plant abscisic acid, stress and ripening protein family. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2314.
- Yang, T., Li, H., Li, L., Wei, W., Huang, Y., Xiong, F., & Wei, M. (2023). Genome-wide characterization and expression analysis of α -amylase and β -amylase genes underlying drought tolerance in cassava. *BMC Genomics*, 24(1), 190.
- Ye, H., Roorkiwal, M., Valliyodan, B., Zhou, L., Chen, P., Varshney, R. K., & Nguyen, H. T. (2018). Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes. *Journal of Experimental Botany*, 69(13), 3267–3277.
- Ye Heng, Y. H., Manish Roorkiwal, M. R., Babu Valliyodan, B. V., Zhou LiJuan, Z. L., Chen PengYin, C. P., Varshney, R. K., & Nguyen, H. T. (2018). *Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes*.
- Zadrazilnik, 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(9), 331.
- Zeroual, A., Baidani, A., & Idrissi, O. (2022a). Drought stress in lentil (*Lens culinaris*, Medik) and approaches for its management. *Horticulturae*, 9(1), 1.

Zeroual, A., Baidani, A., & Idrissi, O. (2022b). Drought stress in lentil (*Lens culinaris*, Medik) and approaches for its management. *Horticulturae*, 9(1), 1.

چکیده گسترده

Drought stress represents one of the most formidable abiotic challenges to global agricultural productivity, particularly in arid and semi-arid regions where water scarcity is a pervasive issue. The escalating frequency, intensity, and duration of drought events, exacerbated by climate change, pose a significant threat to food security and sustainable agricultural practices worldwide. Lentil (*Lens culinaris*), a diploid legume, stands as a cornerstone of global food systems, ranking as the sixth most important pulse crop by production volume. Its nutritional density, providing substantial plant protein, complex carbohydrates, dietary fiber, and essential micronutrients, underscores its critical role in human diets. In Iran, where rainfed lentil cultivation is prevalent and water scarcity is a national concern, understanding and mitigating the adverse effects of drought on this vital crop is paramount. This study was designed to elucidate the multifaceted responses of lentil to varying degrees of drought stress, focusing on two distinct genotypes: one previously identified as drought-sensitive (FLIP2002-55) and another as drought-tolerant (FLIP2002-57).

The experimental design employed a factorial arrangement based on a randomized complete block design with three replications, conducted under controlled greenhouse conditions. Drought stress was incrementally applied at three distinct levels: control (90% field capacity), moderate stress (60% field capacity), and severe stress (30% field capacity). Subsequently, comprehensive measurements were taken on a wide array of morphological, physiological, and biochemical traits, alongside an investigation into the relative expression of key drought-responsive genes using quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

Morphological assessments revealed significant reductions in plant height, shoot and root fresh and dry weights, and leaf area index across both genotypes as drought intensity increased. Physiological analyses demonstrated a significant decline in relative leaf water content (RWC) with escalating drought stress in both genotypes, although the tolerant genotype generally maintained higher RWC values, indicative of better osmotic adjustment and cell wall elasticity. Electrolyte leakage, a direct measure of membrane damage, significantly increased in both genotypes under drought, with a more pronounced increase observed in the sensitive genotype. This highlights the superior membrane stability of the tolerant genotype under stress. Biochemical

investigations revealed a consistent pattern of stress-induced changes. Increasing drought intensity led to a significant decrease in chlorophyll and total leaf protein content, consistent with oxidative damage to photosynthetic machinery and protein degradation. Conversely, the concentrations of carotenoids, proline, total carbohydrates, malondialdehyde (MDA), and hydrogen peroxide (H₂O₂) significantly increased.

Furthermore, the activities of key antioxidant enzymes, including catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and guaiacol peroxidase (GPX), were evaluated. While the overall trend showed increased antioxidant enzyme activity under moderate stress, particularly in the tolerant genotype, severe stress sometimes led to a decline, possibly due to enzyme denaturation or overwhelming oxidative load. The tolerant genotype consistently demonstrated a more robust and sustained antioxidant defense system compared to the sensitive genotype, which is critical for detoxifying ROS and mitigating oxidative damage.

At the molecular level, qRT-PCR was employed to assess the relative expression of five key genes implicated in drought tolerance pathways: Beta Amylase (*BA*), Dehydration-Responsive Element-Binding protein (*DREB1C*), ABA-WDS induced protein (*ABAWDS*), High Chlorophyll Fluorescence 136 (*HCF136*), and myo-inositol monophosphatase (*MIMP*). In the tolerant genotype, severe drought stress significantly upregulated the expression of *ABAWDS* and *HCF136* genes by approximately 2.5-fold and 2-fold, respectively, compared to control conditions. *ABAWDS* is associated with abscisic acid (ABA) signaling, a crucial hormone in drought response, mediating stomatal closure and root growth adjustments. The increased expression of *HCF136*, a gene involved in photosystem II stability, suggests an adaptive mechanism to maintain photosynthetic efficiency under stress. Conversely, the expression of *Beta Amylase*, *DREB1C*, and *MIMP* genes significantly decreased in the tolerant genotype under severe drought. While Beta Amylase is involved in starch degradation for sugar accumulation, its downregulation might indicate a shift in carbohydrate metabolism or a genotype-specific response. Similarly, the reduced expression of *DREB1C*, a transcription factor typically associated with stress gene activation, and *MIMP*, involved in myo-inositol metabolism, in the tolerant genotype under severe stress warrants further investigation to fully understand their nuanced roles in this specific context. In the sensitive genotype, *HCF136* showed a modest increase (approximately 1.5-fold), while the other genes (*ABAWDS*, *DREB1C*, *BA*, and *MIMP*) exhibited a general downregulation or minimal change, indicating a less effective molecular response to drought compared to the tolerant genotype.

These findings collectively underscore the intricate interplay of morphological, physiological, biochemical, and molecular mechanisms contributing to drought tolerance in lentil. The tolerant genotype's superior performance across multiple parameters – including better maintenance of water status, reduced membrane damage, enhanced antioxidant defense, and specific gene expression patterns – highlights its adaptive capacity. The differential gene expression profiles, particularly the upregulation of *ABAWDS* and *HCF136* in the tolerant genotype, provide valuable molecular markers for drought resilience. This comprehensive analysis not only deepens our understanding of drought tolerance mechanisms in *Lens culinaris* but also offers critical insights for future lentil breeding programs. By leveraging these identified traits and genetic markers, it is possible to develop and select new drought-tolerant lentil varieties, thereby enhancing crop productivity and ensuring food security in regions increasingly threatened by water scarcity. Further research should focus on validating these findings in field conditions and exploring the functional genomics of these candidate genes to accelerate the development of climate-resilient lentil cultivars.

غیر قابل اعتماد