



علوم و تحقیقات بذر ایران

سال هشتم / شماره سوم / ۱۴۰۰ (۲۲۴ - ۲۰۹)

مقاله پژوهشی

DOI: 10.22124/jms.2021.5226

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های لوبیا تحت تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی بذر و مطالعه بیان برخی از ژن‌ها در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل

محمد محسن‌زاده گلفزانی^۱، حبیب‌ا. سمیع‌زاده لاهیجی^{۲*}، جمالعلی الفتی^۳، فاطمه مستشاری‌راد^۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۲۷

چکیده

به‌منظور تعیین ژنوتیپ متحمل و حساس به خشکی لوبیا در مرحله جوانه‌زنی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. عامل اول شامل ژنوتیپ (۲۱ ژنوتیپ)، عامل دوم تنش خشکی (با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ در ۲ سطح صفر و ۰/۱۴۸ - مگاپاسکال) بودند. نتایج تجزیه واریانس برای صفات مورد بررسی (شامل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن تر ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، سرعت رشد ساقه‌چه، سرعت رشد ریشه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، اختلاف وزن خشک و تر ریشه‌چه) نشان داد که اثر ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی، بر کلیه صفات مورد بررسی معنی‌دار بودند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش Ward، ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده تحت شرایط نرمال و تنش خشکی از نظر خصوصیات گیاهچه‌ای در چهار گروه مختلف قرار گرفتند که ژنوتیپ‌های غلاف سیاه و پاک به‌ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در شرایط تنش خشکی انتخاب شدند. بررسی الگوی بیان سه ژن *GR*، *PRX* و *APX* واکنش‌دهنده به تنش خشکی در دو ژنوتیپ پاک و غلاف سیاه لوبیا با استفاده از تکنیک Real time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تظاهر بیان سه ژن در تیمارهای صفر، ۷۲، ۱۴۴، ۱۹۲ و ۲۴۰ ساعت خشکی نشان داد که ژن‌های واکنش‌دهنده به خشکی در این پژوهش بیان بالاتری در رقم متحمل نسبت به رقم حساس داشت و میزان بیان سه ژن *PRX*، *GR* و *APX* در ساعت انتهایی تنش، در ژنوتیپ متحمل به‌ترتیب دو، چهار و شش برابر بیش‌تر از ژنوتیپ حساس بود.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی فنوتیپی، پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰، Real time PCR

mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com
hsamizadeh@yahoo.com
jamalaliolfati@gmail.com
fatememostasharirad@yahoo.com

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۴- کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی- دانشگاه گیلان.

*نویسنده مسئول: hsamizadeh@yahoo.com

مقدمه

ژنوتیپ کلزا در پاسخ به خشکی گزارش شده است که تفاوت معنی‌داری در بین ژنوتیپ‌ها، سطوح تنش و اثر متقابل ژنوتیپ × تنش برای صفات مطالعه‌شده در سطح احتمال یک درصد وجود داشت، همچنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های جوانه‌زنی این ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA و فاصله اقلیدوسی، تیمارها را در چهار گروه مجزا قرار داد و نشان داد که ژنوتیپ Hyola308 و SLM046 به ترتیب ژنوتیپ حساس و متحمل می‌باشند (Mohsenzadeh et al., 2016). نتیجه تجزیه خوشه‌ای در بررسی اثر تنش خشکی با PEG بر ژنوتیپ‌های کلزا، نشان داد که در گروه دوم حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تیمارهای حاصل از سطوح مختلف تنش PEG در ژنوتیپ متحمل در یک گروه قرار گرفتند. این نتایج تشابه عکس-العمل این ژنوتیپ به خشکی را نشان داده و مشخص می‌کند که عکس‌العمل ژنوتیپ متحمل در سطوح مختلف تنش PEG یکسان است. در این پژوهش ژنوتیپ SLM046 به‌عنوان ژنوتیپ متحمل در کلزا معرفی شد. تیمارهای که در گروه چهارم قرار گرفته بودند از نظر اکثر صفات جوانه‌زنی دارای کم‌ترین میزان بودند، که نشان-دهنده کاهش خصوصیات جوانه‌زنی این ژنوتیپ‌ها در اثر تنش خشکی ایجادشده با PEG بود (Mohsenzadeh et al., 2016). در مطالعه بین ژنوتیپ‌های کلزا، تنوع قابل ملاحظه‌ای از نظر تحمل به تنش خشکی بر اساس صفات و شاخص‌های مرحله جوانه‌زنی دیده شد که وجود این تنوع، می‌تواند برای بهبود تحمل به تنش در کلزا مورد استفاده قرار گیرد (Kamkar et al., 2008). نتایج اثر تنش خشکی بر شش ژنوتیپ کلزا و تحت سه تیمار خشکی نشان داد که با افزایش سطح خشکی در کلیه صفات جوانه‌زنی (درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی، ضریب سرعت جوانه‌زنی و نرخ یا میزان جوانه‌زنی) روند کاهشی نشان دادند، ولی این کاهش در ژنوتیپ و صفات مختلف متفاوت بود که از این تنوع در پاسخ به تنش بین ژنوتیپ‌های مختلف می‌توان در شناسایی و تولید ارقام متحمل استفاده کرد (Andalibi et al., 2005).

گلو‌تاتیون ردوکتاز (GR) یک فلاوآنزیم بوده و در تمام موجودات زنده یافت می‌شود. این آنزیم سبب احیا

حبوبات پس از غلات دومین منبع غذایی بشر محسوب می‌شوند که در بین آن‌ها لوبیای زراعی از نظر میزان و سطح زیرکشت مقام نخست را در جهان دارد. لوبیا گیاهی است که سرشار از پروتئین بوده و نقش مهمی در تأمین نیاز پروتئینی بشر دارد (Ashraf and Iram, 2005; Jafari et al., 2015). سطح زیر کشت لوبیا در ایران بر اساس آخرین آمار در سال ۲۰۱۹ حدود ۶۰ هزار هکتار و میزان تولید آن بیش از ۱۲۲ هزار تن می‌باشد (FAOSTAT, 2019). گیاهان زراعی در طول دوره رشد و نمو خود تحت تأثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرند. در این بین، تنش کم‌آبی بیش از سایر تنش‌های محیطی (شوری، سرما و گرما) رشد و عملکرد گیاهان زراعی را محدود می‌کند (Xiong et al., 2006). یکی از اثرات تنش خشکی، کاهش صفاتی مانند طول ساقه، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی است (Ahmed et al., 2002). کاهش وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش خشکی در لوبیا گزارش شده است (Ashraf and Iram, 2005). با توجه به این‌که تقریباً دو سوم از زمین‌های زیر کشت ایران در حوزه مناطق نیمه‌خشک و دیم‌خیز قرار دارند، تولید ارقام متحمل به خشکی در کشور جایگاه خاصی دارد و یکی از مهم‌ترین برنامه‌های اصلاحی کشور می‌باشد. همچنین با توجه به کشت وسیع لوبیا در ایران، بررسی خصوصیات آن به‌ویژه شناخت مکانیسم‌های مقاومت به خشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Zadeh Bagheri et al., 2014).

یک روش به‌گزینی تحمل به خشکی در مرحله جوانه‌زنی، بررسی واکنش ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش مصنوعی، در محیط دارای محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)، می‌باشد (Nezami et al., 2010). دستیابی به ژنوتیپ‌هایی که قادر به تحمل چنین شرایطی از تنش رطوبتی باشند، می‌تواند به‌میزان قابل‌توجهی از کاهش محصول بکاهد. در مطالعه‌ای که روی کلزا انجام شد نتایج نشان داد که تنش خشکی سبب کاهش وزن خشک ریشه ژنوتیپ حساس و همچنین افزایش معنی‌دار نسبت طول ریشه به طول ساقه، وزن تر ریشه و محتوای مالون‌دی-آلدئید در ژنوتیپ متحمل می‌شود (Pasandideh et al., 2018). همچنین در مطالعه‌ای به‌منظور گروه‌بندی ۱۰

¹. Glutathione Reductase

آن پیوند تیولی برقرار می‌کند. برای ادامه فعالیت این چرخه لازم است فرم اکسید پراکسی‌ردوکسین دوباره به فرم احیا تبدیل شود. این عمل توسط تیوردوکسین (*TRX*) و گلوئاردوکسین (*GRX*) صورت می‌گیرد. پراکسی‌ردوکسین در اندامک‌های مهمی مانند کلروپلاست، میتوکندری و سیتوسول فعال می‌شود (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004). شواهد نشان می‌دهد که تعامل پیچیده میان سیستم‌های *TRX* و *GRX* در گیاهان وجود دارد (Michelet *et al.*, 2006). عملکرد پراکسی‌ردوکسین در پاسخ به تنش در مطالعات مختلف گزارش شده است (Dietz *et al.*, 2006; Liebthal *et al.*, 2018; Vaseghi *et al.*, 2018). با توجه به سطح زیرکشت لوبیا در کشور و قرار گرفتن بیش از نیمی از کشور در شرایط خشک و نیمه‌خشک این پژوهش به منظور بررسی شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل و حساس لوبیا به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی و بررسی چگونگی تظاهر ژن‌های دخیل در تحمل به خشکی انجام گرفت که می‌تواند مقدمه‌ای برای تولید ارقام متحمل به خشکی و دستیابی به عملکرد بیش‌تر و پایدارتر در گیاه زراعی لوبیا باشد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در لوبیا با صفات مورفولوژیک

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۴، در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار اجرا شد. عامل اول شامل ۲۱ ژنوتیپ لوبیا (جدول ۱) و عامل دوم تنش خشکی با پلی‌اتیلن‌گلیکول در دو سطح (دو سطح صفر و ۰/۱۴۸ - مگاپاسکال) بودند. بذور ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و کلکسیون دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان تهیه شدند. نام و منشا ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول یک آورده شده است. برای ضدعفونی کردن بذور و جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، تعداد ۱۰ عدد از هر ژنوتیپ به‌طور کامل با آب مقطر شسته و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم قرار داده شد.

گلوئاتیون اکسیدآبه گلوئاتیون احیا^۲ همراه با اکسیداسیون NADPH می‌شود که یکی از واکنش‌های مهم سیستم خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان محسوب می‌شود (Tsai *et al.*, 2005). گلوئاتیون احیا (GSH) برای بسیاری از عملکردهای سلولی الزامی است (Noctor *et al.*, 2012). غلظت GSSG درون سلولی به‌عنوان پیامدی از استرس شدید افزایش می‌یابد (Strid, 1993). در مطالعه‌ای که روی گیاه پنبه انجام شد، بررسی رونوشت برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانت مانند *GR* در طی بهبود دوره کمبود آب^۴ افزایش یافته است که این می‌تواند نقش مهمی در حفاظت از تجهیزات سلول در مقابل فتواکسیداسیون توسط ROS بازی کند (Ratnayaka *et al.*, 2003). نشان داده شده است که توانایی GRها برای کنترل تعادل احیایی GSH/GSSG در تحمل گیاهان به تنش خشکی تعیین‌کننده است. تنش شدید باعث افزایش فعالیت GR می‌شود که افزایش این آنزیم به دلیل احیای مجدد گلوئاتیون اکسیدشده می‌باشد (Naderi *et al.*, 2014).

آسکوربات پراکسیداز^۵ (APX) یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی است که در کلروپلاست، سیتوسول، واکوئل و همچنین فضاهای آپوپلاستی سلول‌های برگ یافت می‌شود. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه‌های مهلر و گلوئاتیون-آسکوربات، نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند (Mittler, 2002)، بنابراین، خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کم‌ترین مقدار خود می‌رساند. تغییر در بیان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه لوبیا تحت تنش شوری دیده شده است (Jebara *et al.*, 2005). در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه سویا برای مقابله با تنش خشکی افزایش نشان داد (Kausar *et al.*, 2012).

پراکسی‌ردوکسین^۶ (*PRX*) توانایی واکنش مستقیم با پراکسید هیدروژن را داشته و با تامین هیدروژن مورد نیاز، آن را به آب تبدیل می‌کند. به این ترتیب پراکسی‌ردوکسین به فرم اکسیده خود درآمده و بین دو مولکول

2. GSSG

3. GSH

4. Recovery

5. Ascorbate peroxidase

6. Peroxiredoxin

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های لوبیا مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1. Name of bean genotypes studied in this experiment				
No.	نام ژنوتیپ	Genotype	منشا	Origin
1	غلاف سیاه	Ghala siyah	ایران	Iran
2	COS 16	COS 16	کلمبیا	Colombia
3	صیاد	Sayyad	کلمبیا	Colombia
4	21682	21682	ایران	Iran
5	زودراس	Zoodras	ایران	Iran
6	دهقان	Dehghan	ایران	Iran
7	پاک	Pak	ایران	Iran
8	شکופا	Shokufa	ایران	Iran
9	گلی	Goli	ایران	Iran
10	G-014	G-014	ایران	Iran
11	تلاش	Talash	ایران	Iran
12	191	191	ایران	Iran
13	124	124	ایران	Iran
14	21676	21676	ایران	Iran
15	غلاف قرمز	Ghalaf gharmez	ایران	Iran
16	اختر	Akhtar	ایران	Iran
17	21189	21189	ایران	Iran
18	درسا	Dorsa	ایران	Iran
19	ناز	Naz	ایران	Iran
20	169	169	ایران	Iran
21	D-81083	D-81083	کلمبیا	Colombia

با انتخاب ۳ بذر در هر تکرار آغاز و سپس به فاصله زمانی هر ۲ روز و برای ۴ مرتبه انجام شد، در پایان چهاردهمین روز و اتمام اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر آن‌ها به‌صورت جداگانه توسط ترازو دیجیتال اندازه‌گیری شده و سپس برای محاسبه وزن خشک، هر کدام از آن‌ها جداگانه در داخل فویل پیچیده و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون با درجه حرارت ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2016). برای محاسبه ضریب آلومتری بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه محاسبه شد (Scott *et al.*, 1984).

درصد جوانه‌زنی (G) از طریق شمارش روزانه تعداد بذرهای جوانه‌زده شده (معیار جوانه‌زنی بذرها، خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر) به تعداد کل بذرها از

در پایان این مدت، بذور ضدعفونی‌شده سه مرتبه و هر مرتبه به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر آب‌کشی و به پتری‌دیش ۱۲ سانتی‌متری منتقل و برای ایجاد خشکی ۰/۱۴۸- مگاپاسکال از پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ و برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. پتری‌دیش‌ها برای جوانه‌زنی بذور در دمای ۲۱ درجه سلسیوس، در اتاقک کشت قرار گرفتند. برای کاهش آلودگی در فواصل زمانی هر دو روز یک بار کاغذ واتمن جدید در داخل پتری-دیش‌ها قرار گرفته و دوباره با محلول پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ و آب مقطر تیمار شدند.

به‌منظور تعیین درصد جوانه‌زنی در هر پتری‌دیش تعداد بذور جوانه‌زده (با ۲ میلی‌متر رشد ریشه‌چه) به‌صورت روزانه شمارش شد و زمان پایان جوانه‌زنی زمانی بود که پس از ۲۴ ساعت هیچ بذری جوانه نزد. طول ریشه‌چه و ساقه‌چه (توسط کولیس دیجیتال) در روز ششم

بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از فرایند Real Time

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی فوتویی و صفات مورد مطالعه، دو رقم پاک (حساس) و غلاف سیاه (متحمل) انتخاب شدند. مراحل جوانه‌زنی مطابق روش قبل انجام شد. پس از جوانه‌زنی و رشد بذرها، گیاهچه‌ها به گلدان‌های محتوی خاک منتقل شده و تحت شرایط گلخانه‌ای و دمای ۱۹ درجه سلسیوس / ۲۶ درجه سلسیوس (شب/روز) رشد داده شدند. تنش خشکی روی گیاهان ۱۷ روزه که در مرحله رشد رویشی هستند، توسط روش قطع آبیاری به مدت ده روز اعمال شد، ولی گیاهان شاهد به‌طور روزانه آبیاری شدند. نمونه برداری از گیاهان، زمانی که سه برگ اولیه گیاه کاملاً باز شد و پس از ۷۲ ساعت (۳ روز)، ۱۴۴ ساعت (۶ روز)، ۱۹۲ ساعت (۸ روز) و ۲۴۰ ساعت (۱۰ روز) بعد از قطع آبیاری انجام شد (Silvente et al., 2012)، پس از نمونه‌گیری، برگ‌ها جدا و درون فویل پیچیده شده و بلافاصله توسط نیتروژن مایع فریز شده و سپس در دمای ۸۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمایشات نگه‌داری شدند. در این راستا در آزمایش حاضر بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های گلوکاتینون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و پروکسی ردوکسین مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ستون‌دار شرکت دنا زیست و مراحل آن مطابق دستورالعمل انجام شد و بررسی کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام شد (Pasandide Arjmand et al., 2017). جهت سنتز cDNA از کیت Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شده و مطابق دستورالعمل کیت یادشده عمل شد. کیت RNA تیمار شده با DNase با استفاده از اسپکتروفتومتر (22331 Eppendorph AG) تعیین شد و مقدار موردنیاز RNA تیمار شده با DNase، محاسبه شد. از آنجایی که نمونه‌های RNA ژنومی استخراج‌شده غلظت‌های متفاوتی داشتند، تمامی نمونه‌ها تا غلظت یکسانی رقیق شدند. رقیق‌سازی با توجه به نتایج اسپکتروفتومتر و طبق رابطه (۳) صورت پذیرفت.

$$n_1 V_1 = n_2 V_2 \quad (\text{رابطه ۳})$$

به‌منظور صحت ساخت cDNA برای همه نمونه‌ها کیفیت آن‌ها در PCR و با استفاده از آغازگرهای

رابطه (۱) محاسبه شد، که $n =$ تعداد بذور جوانه‌زده و $N =$ تعداد کل بذور می‌باشد (Covell et al., 1986).

$$G = n/N \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

سرعت رشد ساقچه و ریشه‌چه از رابطه (۲) محاسبه شد. در این رابطه A_i متوسط رشد ریشه‌چه و یا ساقچه‌چه و D_i تعداد روزهای پس از کاشت می‌باشد.

$$GR = \sum A_i / \sum D_i \quad (\text{رابطه ۱})$$

از تفاضل وزن خشک و تر ساقچه‌چه و ریشه‌چه، اختلاف وزن خشک و تر ساقچه‌چه و ریشه‌چه برای تمامی ژنوتیپ‌ها به‌دست آمد.

برای تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیک از نرم‌افزار SAS، نسخه ۹ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد. برای شناسایی ژنوتیپ حساس و متحمل مورد مطالعه و گروه‌بندی ارقام مشابه از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری‌شده از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2020; Mohsenzadeh Golfazani et al., 2016). برای انجام تجزیه خوشه‌ای ابتدا فاصله بین افراد با استفاده از روش مربع فاصله اقلیدوسی محاسبه شد و سپس برای هر کدام از سطوح تنش، دندروگرام با استفاده از روش‌های مختلف رسم شد. روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای شامل ادغام بر مبنای متوسط فاصله بین گروه‌ها (UPGMA)، ادغام بر اساس نزدیک‌ترین همسایه‌ها (SL)، دورترین همسایه (CL) و حداقل واریانس وارد (Ward) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. در نهایت از مقایسه کلیه روش‌ها، روش حداقل واریانس Ward با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انتخاب شد.

برای آزمون صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای و برآورد میزان انتساب اشتباه ارقام به گروه‌ها از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. به این ترتیب که گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ژنوتیپ‌های موجود در هر گروه به‌عنوان گروه‌بندی اولیه در نظر گرفته شد و با استفاده از تجزیه تابع تشخیص به‌روش خطی فیشر، صحت گروه‌بندی اولیه مورد آزمون قرار گرفت. در نهایت میزان صحت گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس توابع تشخیص در هر کدام از سطوح تنش، برآورد شد. تجزیه تابع تشخیص با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد.

چهار ژن *GR*، *APX*، *PRX* و *Actin* از بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری شد. طراحی آغازگرهای مورد استفاده توسط سایت Primer 3 Plus انجام گرفت. مشخصات آغازگر (شامل: دمای اتصال، طول پرایمر و توالی آغازگر) مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است.

اختصاصی برای ژن *Actin* کنترل شد. با مشاهده باند مورد نظر در مکان مناسب بر روی ژل مورد بررسی قرار گرفت و باندهایی با طول ۱۶۰ bp که مورد انتظار بودند، مشاهده شدند.

به‌منظور طراحی آغازگر برای واکنش Real time PCR توالی‌های موجود Complete (cDNA)، برای

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها در لوبیا

Table 2. Primer pairs used for relative expression analyses of genes in response to in bean

Gene [†]	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Size (bp)	NCBI accession number
<i>Peroxi-F</i>	CTGCTCAAAATCCGGTGCT	56	173	AJ288896
<i>Peroxi-R</i>	TCTTCCCTCTCCTTCCCCAA			
<i>GR-F</i>	TCCAGTTACCGTTCGTGTCA	52	165	DQ459504
<i>GR-R</i>	TGGACCTGATGCACCTGAAA			
<i>APX-F</i>	GGTGCTTGATGGTTCCGAAG	51/8	153	KY195569
<i>APX-R</i>	CAGAAGGCCATTGAGAAGGC			
<i>Actin-F</i>	GGCACCTCTCAACCCAAAAG	56	160	XM_006597212
<i>Actin-R</i>	GCTGACACCATCTCCAGAGT			

[†]: *APX*, Ascorbate peroxidase; *GR*, Glutathione Reductase; *Peroxi*, Peroxiredoxin

منحنی ذوب برای ژن‌ها نشان داد که هر دو جفت آغازگرهای مورد استفاده به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند.

$$\Delta CT = CT_{\text{Target Gene}} - CT_{\text{Reference Gene}} \quad (\text{رابطه ۴})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Treated}} - \Delta CT_{\text{Untreated}} \quad (\text{رابطه ۵})$$

$$RGEC = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (\text{رابطه ۵})$$

که در آن RGEC میزان تغییر نسبی بیان ژن است. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند. همچنین سطح معنی‌داری بیولوژیک دو برابر بیان نسبی در نظر گرفته شد (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2019; Pasandideh Arjmand et al., 2017b; Vahedi et al., 2019a).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیک

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (نتایج نشان داده نشد)، اثر خشکی بر تمام مؤلفه‌های مورد بررسی معنی‌دار بود. اثر متقابل ژنوتیپ در خشکی نیز در تمام مؤلفه‌های مورد بررسی معنی‌دار شد. همچنین همه مؤلفه‌های مورد بررسی تحت تأثیر ژنوتیپ قرار گرفتند.

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای

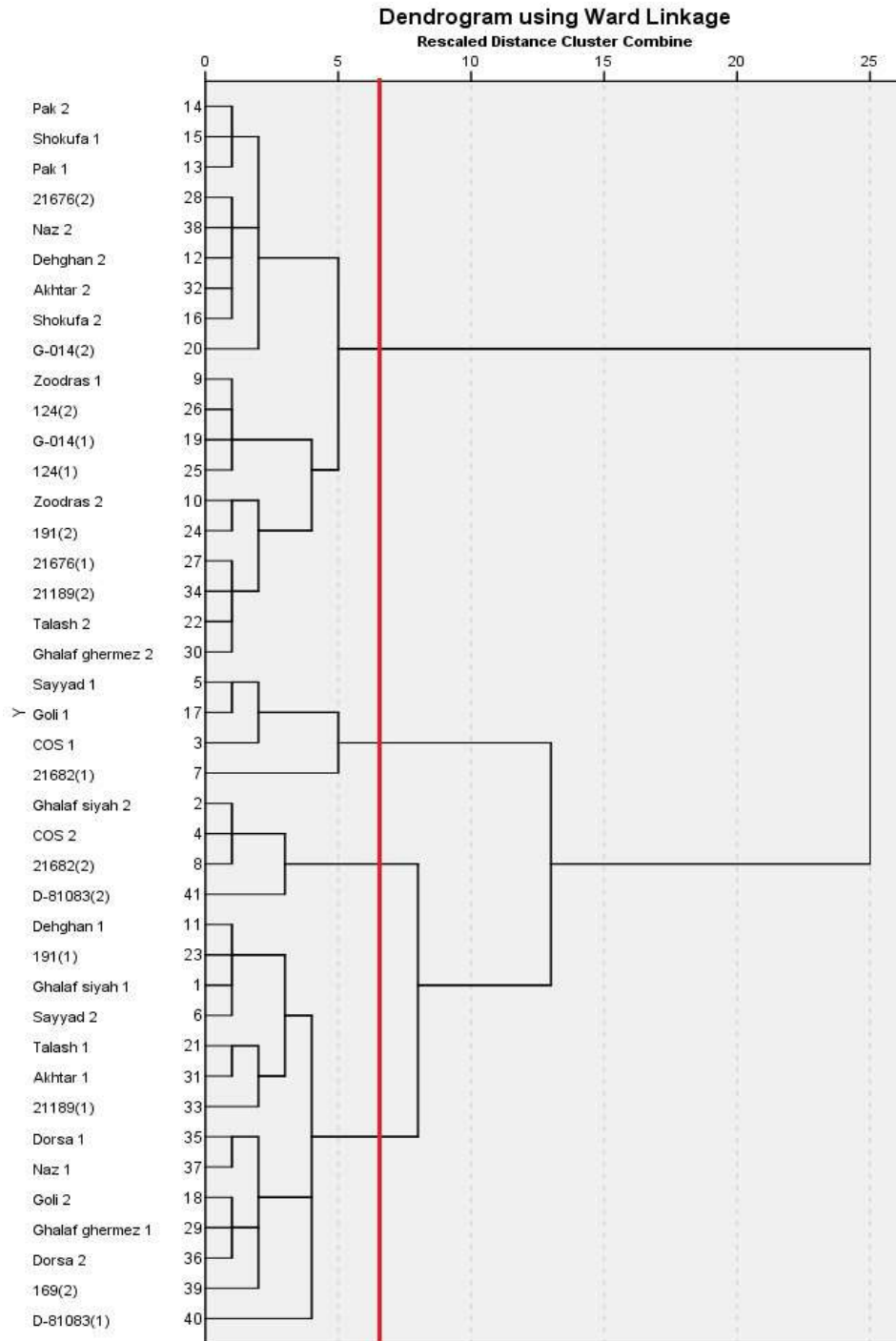
صفات اندازه‌گیری شده

با برش دندروگرام از فاصله ۷ واحد، ۴ گروه ایجاد شد (شکل ۱). گروه اول شامل ۱۹ رقم، گروه دوم و سوم هر

پس از تأیید cDNA ساخته‌شده میزان بیان ژن‌های *PRX* و *APX*، *GR* در فرایند Real Time در رقم حساس (پاک) و متحمل (غلاف سیاه) مورد مقایسه قرار گرفت. لازم به ذکر است که سه ژنی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند، در مسیر پاکسازی ROSها فعالیت می‌کنند. در این آزمایش از ژن *Actin* به‌عنوان ژن مبنا جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (Aliakbari and Razi, 2013; Marmagne et al., 2010; Mohsenzadeh Golfazani et al., 2018; Pasandideh Arjmand et al., 2017a; Vahedi et al., 2019b; Wang et al., 2011; Yang et al., 2007). با توجه به طول ژن و توالی قطعه تکثیرشده PCR سیکل تکثیر ژن‌های مورد نظر در فرایند Real Time PCR طراحی شد که در این آزمایش از مستر Real Time (Syber green Master mix) استفاده شد. چرخه حرارتی شامل ۷ دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۳۹ سیکل به‌صورت ۲۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس، ۲۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به آغازگر بر اساس جدول ۲)، و ۳۰ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سپس نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس بود (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2018). جهت نرمال‌سازی داده‌ها و به‌منظور مقایسه بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در فرایند Real time-PCR از روابط ۴ تا ۶ استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). نتایج

ارقامی که با اندیس (۱) نشان داده شده‌اند، ارقام شاهد می‌باشند. ارقام گروه اول از نظر تمامی صفات، ارزشی پایین‌تر از میانگین کل گروه‌ها داشتند.

یک شامل ۴ رقم و گروه چهارم شامل ۱۵ رقم بودند. ارقامی که با اندیس (۲) در شکل ۱ نشان داده شده‌اند، ارقامی هستند که تحت تنش خشکی قرار گرفته‌اند و



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای تیمارهای لوبیا با استفاده از معیار مربع فاصله اقلیدوسی و روش Ward (عدد ۱ بعد از اسم ژنوتیپ تیمار شاهد و عدد ۲ تیمار خشکی ۱۴۸۰- مگاپاسکال)

Figure 1. Cluster analysis of bean genotypes based on Square Euclidean distance with ward method

مانند طول ریشه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، سرعت رشد ریشه‌چه، وزن تر ریشه‌چه و وزن خشک ریشه‌چه، مقادیری بالاتر از میانگین کل را کسب کردند. علاوه بر این، با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین، رقم غلاف سیاه که در گروه سوم جای گرفته، از نظر صفات مهمی همچون طول ریشه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و وزن خشک و تر ریشه‌چه، رتبه اول را در بین سایر ارقام کسب کرد. بنابراین به دلایل فوق و همچنین مشاهدات عینی، رقم غلاف سیاه به‌عنوان متحمل‌ترین رقم به خشکی انتخاب شد. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای، به وسیله تجزیه تابع تشخیص مورد آزمون قرار گرفت. به این ترتیب که چهار گروه ایجاد شده در تجزیه خوشه‌ای به‌عنوان گروه‌بندی اولیه در نظر گرفته شده و با محاسبه توابع تشخیص کانونیک به‌روش خطی، ژنوتیپ‌ها بین گروه‌ها جابجا شدند و در نهایت گروه‌بندی دیگری حاصل شد.

برای این که نتیجه مورد آزمون قرار گیرد، از توابع کانونی اول، دوم و سوم استفاده شد و با رسم دیاگرام، پراکنش ارقام مجدداً گروه‌بندی شدند. نتایج نشان داد که گروه‌بندی ارقام به چهار گروه متفاوت بر اساس تجزیه خوشه‌ای، روش حداقل واریانس وارد دقیق بوده است، به‌طوری که ارقام موجود در چهار گروه از نظر تجزیه تابع تشخیص نیز تفاوت‌های زیادی با یکدیگر نشان دادند. همچنین تجزیه تابع تشخیص کانونی نشان داد که صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۳/۴۲ درصد بوده و تعدادی از ارقام به‌طور صحیحی گروه‌بندی نشده و باید به گروه‌های دیگری منتقل شوند.

بررسی بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش خشکی

بررسی میزان بیان *GR*، *PRX* و *APX* در روش Real time بین دو ژنوتیپ لوییا، نشان داد که این ژنوتیپ‌ها از نظر مقدار بیان این سه ژن با یکدیگر تفاوت دارند.

میزان بیان نسبی ژن *GR*

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *GR* سیتوپلاسمی در دو ژنوتیپ غلاف سیاه و پاک مورد مطالعه تحت شرایط بدون تنش و تنش خشکی نشان داد که بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به خشکی (غلاف سیاه)، با افزایش زمان تنش خشکی، افزایش پیدا کرد، به‌طوری که ۱۹۲ ساعت (۸ روز) پس از تنش به بالاترین میزان خود رسید. میزان بیان ژن *GR* در ژنوتیپ پاک، در زمان ۷۲ ساعت (۳ روز)

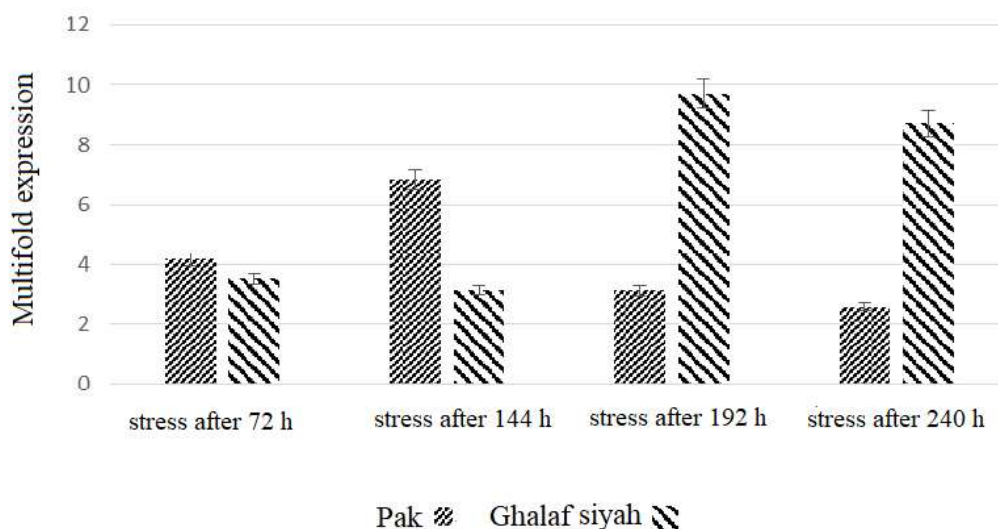
ارقام موجود در گروه دوم تنها از نظر صفات نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (۰/۳۷-) و سرعت رشد ریشه‌چه (۱/۰۲-)، ارزشی پایین‌تر از میانگین کل گروه‌ها داشتند اما در رابطه با سایر صفات، در سطحی بالاتر از میانگین کل قرار گرفتند. ارقام موجود در گروه سوم از لحاظ صفات طول ریشه‌چه (۴۷/۴۳)، وزن تر ریشه‌چه (۰/۲۶)، وزن خشک ریشه‌چه (۰/۲۶)، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (۱/۰۲) و سرعت رشد ریشه‌چه (۹/۴) در سطحی بالاتر از میانگین کل قرار گرفتند، اما از نظر صفات طول ساقه‌چه (۱۰/۷۳-)، وزن تر ساقه‌چه (۰/۶۸-)، وزن خشک ساقه‌چه (۰/۴-)، سرعت رشد ساقه‌چه (۶/۳۳-)، اختلاف وزن تر و خشک ساقه‌چه (۰/۲۹-) و اختلاف وزن تر و خشک ریشه‌چه (۰/۰۵-)، در سطحی پایین‌تر از میانگین کل قرار گرفتند. ارقام گروه چهارم تنها در صفت نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (۰/۰۸-)، در سطحی پایین‌تر از میانگین کل قرار گرفتند، اما در رابطه با سایر صفات مقادیری بالاتر از میانگین کل داشتند. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، در گروه یک ارقامی قرار دارند که در تمامی صفات در سطحی پایین‌تر از میانگین کل قرار دارند و با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین، مشاهده می‌شود که در بین ارقام این گروه، رقم پاک از نظر صفات مهمی همچون طول ریشه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و سرعت رشد ریشه‌چه، در پایین‌ترین مقدار نسبت به میانگین این صفات در شرایط تنش، قرار دارد. بنابراین با توجه به نتایج فوق و همچنین مشاهدات عینی، رقم پاک به‌عنوان حساس‌ترین رقم به تنش خشکی انتخاب شد. گیاهانی که طول ریشه اصلی و تعداد ریشه‌های جانبی کم‌تری داشته باشند، مقاومت و تحمل کم‌تری نسبت به تنش خشکی دارند (Sani et al., 2014). در اثر تنش خشکی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، کاهش یافته، ولی نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه افزایش می‌یابد، زیرا در مراحل اولیه تنش خشکی به دلیل حساسیت کم‌تر ریشه‌چه به تنش خشکی، سرعت رشد آن جهت افزایش جذب آب بیش‌تر می‌باشد. بنابراین کاهش این نسبت می‌تواند معیاری بر حساس بودن گیاه در برابر تنش خشکی باشد (Rahimi and Kafi, 2009).

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، در گروه سوم ارقامی قرار گرفته‌اند که در اکثر صفات مهم خود

اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از حضور ROSها بر سلول می‌کاهد، لذا افزایش بیان ژن مربوط به این آنزیم می‌تواند سبب تعدیل اثرات تنش خشکی بر گیاهان گردد. افزایش بیان ژن *GR* حین تنش خشکی در ژنوتیپ‌های حساس لوبیا چشم بلبلی (Torres-*et al.*, 2008)، گیاه ارزن مروری (Franklin *et al.*, 2008)، گیاه تراریخت گندم (Naderi *et al.*, 2015)، گیاه تراریخت (Zarnaghi and Valizadeh, 2014) و گیاه تراریخت توتون (Aono *et al.*, 1993)، قبلاً گزارش شده است.

پس از اعمال تنش، تقریباً شبیه غلاف سیاه بود، اما در ۱۴۴ ساعت (۶ روز) پس از تنش به بیش‌ترین مقدار خود رسید و پس از آن در روزهای هشتم و دهم میزان بیان کاهش پیدا کرد (شکل ۲).

عدم مصرف NADPH تولیدی از واکنش‌های نوری فتوسنتز به علت بسته‌شدن روزنه‌ها در تنش خشکی، می‌تواند منجر به تنش اکسیداتیو گردد (Naderi *et al.*, 2014). آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با مصرف NADPH، گلوتاتیون اکسید را به گلوتاتیون احیا تبدیل کرده و با مصرف NADPH از



شکل ۲- الگوی بیان ژن *GR* با روش Real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم لوبیا حساس (پاک) و متحمل به خشکی (غلاف سیاه)

Figure 2. Expression pattern of *GR* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible (Pak) and tolerant (Ghalaf siyah) bean genotypes

رادیکال‌های آزاد شود. علت کم‌بودن بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در ساعات ابتدایی تنش در ژنوتیپ غلاف سیاه، در واقع به این دلیل است که گیاه با کاهش بیان این ژن سعی در جلوگیری از مصرف NADPH داشته و آن را در ساعات پایانی مصرف می‌کند تا بدین روش خشکی را تحمل کند، زیرا این آنزیم با اکسیدکردن NADPH باعث احیاء گلوتاتیون می‌شود و این آنزیم یکی از آنزیم‌های چرخه گلوتاتیون-آسکوربات می‌باشد که با اکسیدکردن NADPH منجر به تجزیه پراکسید هیدروژن به آب می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد گیاه در ساعات ابتدایی احتیاجی به بیان ژن مذکور نداشته است (Carvalho and Amâncio, 2002). بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در

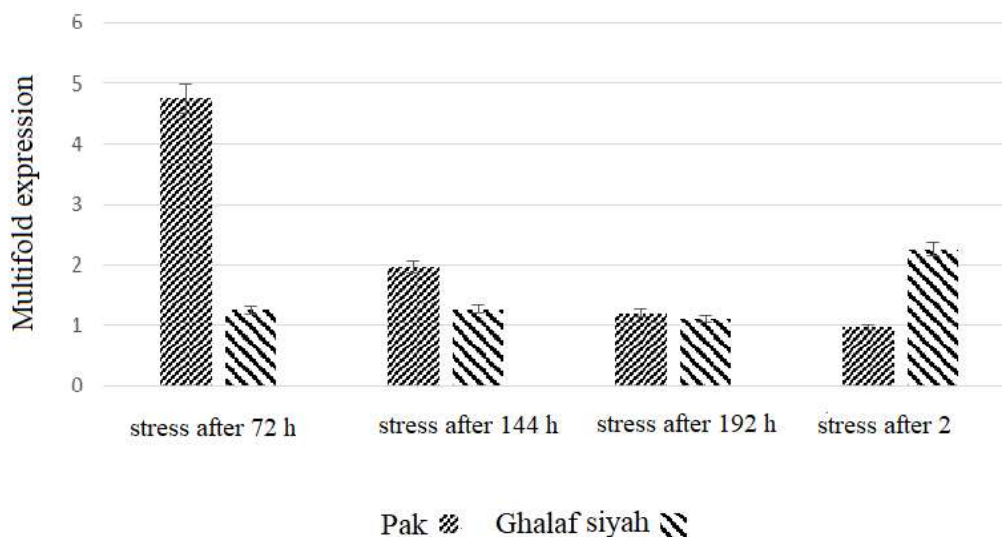
بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز سیتوپلاسمی در ژنوتیپ متحمل در ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش کم و تقریباً مشابه بوده اما در ۱۹۲ ساعت پس از تنش، میزان بیان به حداکثر مقدار خود رسید و همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، میزان بیان این ژن در این زمان، معنی‌دار می‌باشد. به نظر می‌رسد که گیاه در روزهای پایانی وقوع تنش، میزان بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز را افزایش می‌دهد تا از این طریق NADPH موجود در سلول را مصرف کرده و با تولید گلوتاتیون احیاء میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده را کاهش دهد. گلوتاتیون ردوکتاز می‌تواند به‌طور شیمیایی با سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل واکنش دهد و باعث از بین رفتن

تنش خشکی نشان داد که بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به خشکی (غلاف سیاه)، در ساعات ۷۲، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت پس از اعمال تنش، تقریباً مشابه بود، اما در ۲۴۰ ساعت پس از اعمال تنش (روز دهم) حداکثر میزان بیان خود را داشته است (شکل ۳). میزان بیان ژن *PRX* در ژنوتیپ پاک، در زمان‌های ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش تقریباً مشابه و در ساعات ۱۹۲ و ۲۴۰ ساعت پس از تنش کاهش نشان داد، به طوری که در ۲۴۰ ساعت پس از اعمال تنش، در کم‌ترین میزان خود بود.

رقم حساس، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش، افزایش و بر اساس نتایج شکل ۲ این افزایش معنی‌دار می‌باشد. نقش آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در گیاهان تراریخته نیز، برای افزایش مقاومت به تنش ثابت شده است و کاهش فعالیت این آنزیم حساسیت گیاه را به تنش اکسیداتیو به دنبال داشته است (Allen, 1995).

میزان بیان نسبی ژن *PRX*

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *PRX* سیتوپلاسمی در دو ژنوتیپ غلاف سیاه و پاک تحت شرایط بدون تنش و



شکل ۳- الگوی بیان ژن *PRX* با روش Real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم لوبیا حساس (پاک) و متحمل به خشکی (غلاف سیاه)

Figure 3. Expression pattern of *PRX* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible (Pak) and tolerant (Ghalaf siyah) bean genotypes

پس از اعمال تنش در حداکثر میزان خود قرار دارد و طبق شکل ۳، این افزایش بیان معنی‌دار می‌باشد که دلیلی بر مقابله گیاه با پراکسید هیدروژن تولیدی می‌باشد.

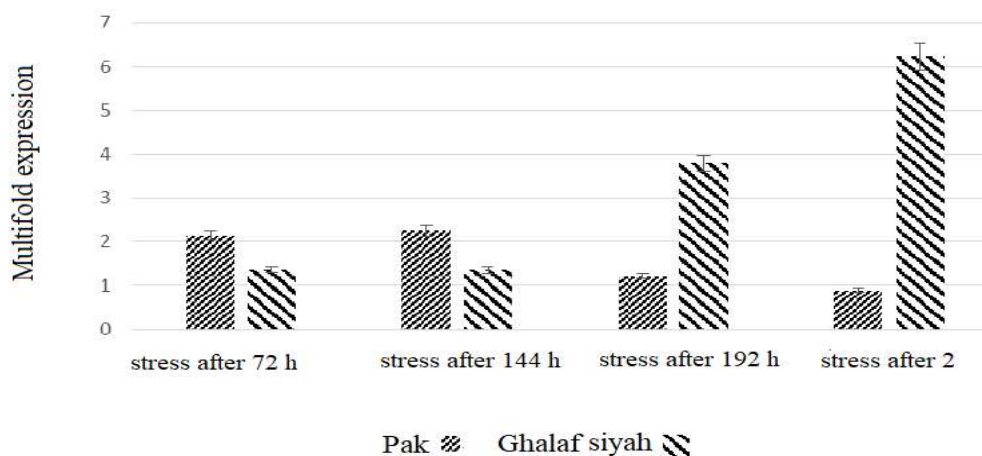
میزان بیان نسبی ژن *APX*

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *APX* در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به خشکی در پژوهش حاضر نشان داد که در رقم متحمل (غلاف سیاه)، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش، بیان مشابه و تقریباً در یک سطح بوده است اما ۱۹۲ ساعت پس از اعمال تنش، میزان بیان رو به افزایش گذاشته، به طوری که ۲۴۰ ساعت پس از اعمال تنش به بیش‌ترین میزان خود رسید (شکل ۴). در ژنوتیپ حساس (پاک)، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش، بیان

پروکسی‌ردوکسین آنزیمی است که توانایی واکنش با پراکسید هیدروژن را داشته و آن را به آب تبدیل می‌کند که در نتیجه این واکنش، پروکسی‌ردوکسین به فرم اکسید خود تبدیل گشته و بین دو مولکول آن پیوند دی سولفیدی برقرار می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیان ژن پروکسی‌ردوکسین در ژنوتیپ غلاف سیاه ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت پس از اعمال تنش، روند یکنواختی را طی می‌کند، اما ۲۴۰ ساعت پس از اعمال تنش، میزان آن دو برابر می‌شود. به نظر می‌رسد که در ژنوتیپ غلاف سیاه از طریق افزایش بیان ژن پروکسی‌ردوکسین سعی در مقابله با افزایش میزان این گونه فعال اکسیژن (H_2O_2) شده است. در ژنوتیپ حساس، میزان بیان این ژن ۷۲ ساعت

رقم حساس کاهش یافته، به طوری که در روز دهم به کم‌ترین مقدار خود رسید.

این ژن مشابه و در سطح بالایی قرار داشته، اما ۱۹۲ و ۲۴۰ ساعت پس از اعمال تنش میزان بیان ژن *APX* در

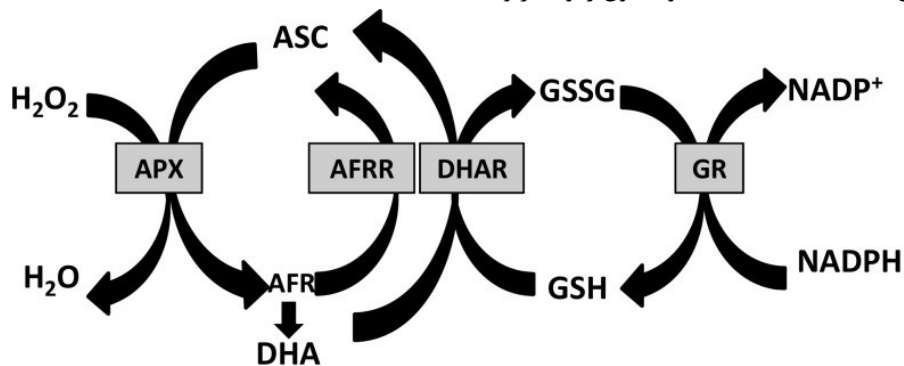


شکل ۴- الگوی بیان ژن *APX* با روش Real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم لوبیا حساس (پاک) و متحمل به خشکی (غلاف سیاه)

Figure 4. Expression pattern of *APX* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible (Pak) and tolerant (Ghalaf siyah) bean genotypes

آسکوربات پراکسیداز در طول تنش خشکی در گیاهچه‌های گندم، یونجه و برنج افزایش می‌یابد (Sharma and Dubey, 2005). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتاتیون ردوکتاز در دوره‌های زمانی مختلف در برگ‌های لوبیا که تحت تنش ملایم اسمزی ناشی از PEG قرار داشتند، نشان داد که افزایش معنی‌داری در فعالیت هر دو آنزیم دیده می‌شود (Jiang and Zhang, 2002).

چرخه آسکوربات گلوکاتاتیون تقریباً در تمام اجزای سلول‌های گیاهی یافت شده، علاوه بر این میل ترکیبی بالای آسکوربات پراکسیداز برای پراکسید هیدروژن، نشانگر نقش بسیار مهم آن در کنترل سطح ROS می‌باشد (شکل ۵). آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند *APX* و گلوکاتاتیون که در غلظت‌های بالا در کلروپلاست‌ها و دیگر اجزای سلولی یافت می‌شوند، در مکانیزم‌های دفاعی گیاهان طی تنش‌های اکسیداتیو بسیار مهم هستند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که فعالیت گلوکاتاتیون ردوکتاز و



شکل ۵- چرخه گلوکاتاتیون- آسکوربات

Figure 5. Glutathione-Ascorbate cycle (Gaafar and Seyam, 2018)

۲۴۰ ساعت پس از تنش، میزان بیان تا حد زیادی افزایش یافته است و طبق شکل ۴ این افزایش معنی‌دار می‌باشد که دلالت بر مقابله گیاه با تنش خشکی از طریق تبدیل

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در رقم متحمل، میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از تنش، تا حد زیادی مشابه است اما ۱۹۲ و

پراکسید هیدروژن به آب دارد. در واقع ژنوتیپ متحمل در ساعات ابتدایی تنش میزان بیان ژن *APX* پایینی داشته، اما در روزهای انتهایی که اثرات تنش شدت می‌گیرد و میزان تولید ROS در گیاه افزایش می‌یابد، میزان بیان ژن‌هایی همچون آسکوربات پراکسیداز که در مکانیزم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش از آنزیم‌های اصلی هستند، افزایش می‌یابد. در ژنوتیپ حساس این روند بالعکس است و گیاه در روزهای ابتدایی با افزایش بیان ژن‌های دفاع-کننده از گیاه در برابر تنش، تمام توان دفاعی خود را به کار می‌گیرد. در بررسی نقش تنش خشکی در دو رقم گندم (متحمل و حساس به خشکی) گزارش شد که رقم متحمل با تجزیه بیش‌تر پراکسید هیدروژن و مهار آن توسط آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و عملکرد کارآمد آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه گلوکوتایون-آسکوربات، آسیب غشاء کم‌تر و محتوای مالون‌دی‌آلدئید پایین‌تری (MDA) در مقایسه با رقم حساس دارند و در نتیجه به خشکی سازگارند (Naderi Zarnaghi and Valizadeh, 2014). تحت شرایط تنش خشکی افزایش *APX* در گندم نیز گزارش شده است (Zhang et al., 1999). افزایش حجم خزانه آنتی‌اکسیدانت‌های محلول در آب آسکوربات پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز در شرایط تنش خشکی سبب می‌شود که سلول از پتانسیل احیا بالایی برخوردار شده و تحمل گیاه به شرایط دشوار افزایش یابد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش تجزیه واریانس نشان داد اثر تنش بر تمام صفات مورد بررسی در لوبیا، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای، در گروه سوم، ژنوتیپ‌هایی قرار دارند که در اکثر صفات مهم مقادیری بالاتر از میانگین کل را دارا بودند و با بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین و مشاهدات عینی، رقم غلاف سیاه رتبه اول را نسبت به سایر ژنوتیپ‌های برای تحمل به تنش خشکی کسب کرد و می‌توان این ژنوتیپ را به‌عنوان ژنوتیپ متحمل لوبیا معرفی کرد. ژنوتیپ‌های گروه یک ژنوتیپ‌هایی هستند که در تمامی صفات در سطحی پایین‌تر از میانگین کل قرار دارند و ژنوتیپ پاک که در این گروه قرار داشت به‌عنوان ژنوتیپ حساس لوبیا در این پژوهش معرفی شد. صحت گروه‌بندی حاصل از

تجزیه خوشه‌ای، به وسیله تجزیه تابع تشخیص با $93/42$ درصد تائید شد. با توجه به نقش و اهمیت ژن‌های *PRX*، *APX* و *GR* در تنظیم میزان ROS حاصل از متابولیسم طبیعی گیاه و تنش، همکاری ژن‌های مذکور در مدیریت تنش اکسیداتیو اهمیت به‌سزایی دارد. تجمع ROS در طی تنش خشکی نقاط کلیدی متابولیسم و مکانیسم‌های دفاعی سلول را مورد حمله قرار می‌دهند و متعاقب آن تنش اکسیداتیو در سلول شدت بیش‌تری می‌یابد، ژنوتیپ غلاف سیاه، بر خلاف ژنوتیپ پاک در ساعت پایانی تنش می‌تواند با افزایش بیان ژن *GR* و *APX*، نسبت $NADPH$ به $NADP^+$ را کاهش و نسبت GSH به $GSSG$ را افزایش داده و از تنش خشکی جلوگیری کند. در ژنوتیپ پاک برخلاف غلاف سیاه با توجه به کاهش بیان ژن‌های *GR* و *APX* در روزهای انتهایی تنش مقدار $NADPH$ افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند تنش اکسیداتیو را به‌دنبال داشته باشد. پروکسی‌ردوکسین نیز یکی از آنزیم‌های است که توانایی حذف پراکسید هیدروژن را دارد، همان‌طور که دیده شد روند افزایش بیان ژن *PRX* در ژنوتیپ غلاف سیاه در ۲۴۰ ساعت پس از تنش می‌تواند نشان‌دهنده کاهش H_2O_2 در مقابله با تنش خشکی باشد و تحمل ژنوتیپ غلاف سیاه به شرایط تنش خشکی را بالا ببرد، اما افزایش بیان ژن *PRX* در ژنوتیپ حساس در ۷۲ ساعت و سپس کاهش نشان‌دهنده عدم توانایی ژنوتیپ پاک در مقابله با تنش می‌باشد. به‌طور کلی در این بررسی در ساعات ابتدایی تنش میزان بیان هر سه ژن در ژنوتیپ متحمل پایین بود ولی در ژنوتیپ حساس افزایش بیان و سپس کاهش بیان مشاهده شد، بنابراین در ژنوتیپ پاک برخلاف غلاف سیاه این امر می‌تواند آسیب به گیاه را به‌دنبال داشته باشد و عدم تعادل در بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سبب کاهش کارایی مکانیسم‌های جمع‌آوری‌کننده ROS می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان تشکر می‌گردد.

منابع

- Achary, V., Murali, M., Reddy, C.S., Pandey, P., Islam, T., Kaul, T. and Reddy, M.K. 2015. Glutathione reductase a unique enzyme: molecular cloning, expression and biochemical characterization from the stress adapted C 4 plant, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *Molecular Biology Reports*, 42: 947-962. **(Journal)**
- Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science*, 163 :117-123. **(Journal)**
- Aliakbari, M. and Razi, H. 2013. Isolation of *Brassica napus* MYC2 gene and analysis of its expression in response to water deficit stress. *Molecular Biology Research Communications*, 2: 63-71. **(Journal)**
- Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant physiology*, 107: 1049. **(Journal)**
- Andalibi, B., Zangani, E., and Haghazari, A. 2005. Effects of water stress on germination indices in six rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.). *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 36: 457-463. (In Persian)**(Journal)**
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. 1993. Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant and Cell Physiology*, 34: 129-135.**(Journal)**
- Ashraf, M. and Iram, A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200: 535-546. **(Journal)**
- Carvalho, L.C. and Amâncio, S. 2002. Antioxidant defence system in plantlets transferred from in vitro to ex vitro: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. *Plant Science*, 162: 33-40. **(Journal)**
- Covell, S, Ellis, R.H., Roberts, E.H. and Summerfield, R.J. 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes: I. A comparison of chickpea, lentil, soybean and cowpea at constant temperatures. *Journal of experimental botany*, 37: 705-715. **(Journal)**
- Dietz, K-J., Jacob, S., Oelze, M-L., Laxa, M., Tognetti, V., Nunes de Miranda, S.M., Baier, M. and Finkemeier, I., 2006. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of experimental botany*, 57: 1697-170. **(Journal)**
- FAOSTAT 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Gaafar, R.M. and Seyam, M.M. 2018. Ascorbate–glutathione cycle confers salt tolerance in Egyptian lentil cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24: 1083-1092. **(Journal)**
- Jafari, M., Moosavi, S.S., Chaichi, M., Ahmadvand, Q. and Abdollahi, M. 2015. Evaluation of variability and heritability of effective traits on yield in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under non-stress and moisture stress conditions before pod formation. *Applied Field Crops Research*, 28: 59-66. (In Persian)**(Journal)**
- Jebara, S., Jebara, M. Limam, F. and Elarbi, A.M. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of plant physiology*, 162: 929-936. **(Journal)**
- Jiang, M. and Zhang, J. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of experimental botany*, 53: 2401-2410. **(Journal)**
- Kamkar, B, Ghaffari, H. and Entesari, M. 2008. The Study of Temperature and Salinity Effects on germination Components of Canola Cultivars. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15: 1-12. (In Persian)**(Journal)**
- Kausar, R., Takahiro Makino, Z.H. and Komatsu, S. 2012. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Molecular Biology Reports*, 39: 10573-10579. **(Journal)**
- Liebthal, M., Maynard, D. and Dietz, K-J. 2018. Peroxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxidants and redox signaling*, 28: 609-624. **(Journal)**
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 2(5): 402-408. **(Journal)**

- Marmagne, A., Brabant, P., Thiellement, H. and Alix, K. 2010. Analysis of gene expression in resynthesized Brassica napus allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New phytologist*, 186: 216-227. **(Journal)**
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Lemaire, S.D. 2006. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynthesis Research*, 89: 225-245. **(Journal)**
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410. **(Journal)**
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9: 490-498. **(Journal)**
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Hassani Kumleh, H., Samizadeh Lahiji, H., Vahedi, R. and Ramezanzadeh Bishegahi, S. 2019. The effect of iron toxicity on some of morphological traits, relative gene expression of G6PDH and peroxidase enzyme activity in resistant and susceptible genotypes of Rice (*Oryza sativa*). *Cereal Research*, 9: 207-220. (In Persian)**(Journal)**
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Aghaeepour, S., Samiezadeh Lahiji, H. and Abdollahi, Sh. 2020. Studying expression of some genes associated with drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research*, 9: 299-314. (In Persian)**(Journal)**
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, S.H. and Samizadeh Lahiji, H. 2016. Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages based on multivariate statistical methods. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 3: 53-65. (In Persian)**(Journal)**
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Kordrostami, M., Samizadeh Lahiji, H., Hassani Kumle, H. and Rezadoost, M.H. 2018. The effect of iron stress on the relative expression level of *SOD*, *MDHR* and *GPXI* genes in tolerant and sensitive genotypes of Rice. *Crop Biotechnology*, 8: 1-13. (In Persian)**(Journal)**
- Naderi Zarnaghi, R. and Valizadeh, M. 2014. Investigation the activity of Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase enzymes in wheat genotypes under drought tension in flowering stage. *Crop Physiology Journal*, 6: 85-97. (In Persian)**(Journal)**
- Naderi Zarnaghi, R., Valizadeh, M. and Firoozi, S. 2014. Effect of free amino acids on the yield quality and quantity of forage varieties Gole-Sefid (*Vicia panonica*) in rainfed conditions. *Iranian Dryland Agronomy Journal*, 3: 127-139. (In Persian)**(Journal)**
- Nezami, A., Khamadi, N., Khajehosiny, M. and Bagheri, A. 2010. Evaluation of Drought Tolerance in Cold Hardy Lentils (*Lens culinaris medik.*) at Germination Stage. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8: 138-146. (In Persian)**(Journal)**
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J. Marquez-Garcia, B., Guillaume, Q. and Christine, H.F. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35: 454-484. **(Journal)**
- Pasandide Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H. and Mohsenzadeh Golfazani, M. 2017. The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Crop Biotechnology*, 7: 31-42. (In Persian)**(Journal)**
- Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H. and Mohsenzadeh Golfazani, M. 2017a. The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Crop Biotechnology*, 7: 31-42. (In Persian)**(Journal)**
- Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H. and Mohsenzadeh Golfazani, M. 2017b. The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Crop Biotech*, 7: 31-42. (In Persian)**(Journal)**
- Pasandideh, M., Samizadeh, H. and Mohsenzadeh, M. 2018. The effect of drought stress on some morphological and physiological characters in canola seedling (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 5: 95-108. (In Persian)**(Journal)**
- Rahimi, Z. and Kafi, M. 2009. Effects of drought stress on germination characteristics of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 2: 87-91. (In Persian)**(Journal)**
- Ratnayaka, H.H., Molin, W.T. and Sterling, T.M. 2003. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of experimental botany*, 54: 2293-2305. **(Journal)**

- Sani Rasti, M.S., Lahouti, M. and Ganjeali, A. 2014. Effect of drought stress on some morphophysiological traits and chlorophyll fluorescence of red bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Pulses Reseach, 5: 103-116. (In Persian)(**Journal**)
- Scott, S.J., Jones, R.A. and Williams, W.A. 1984. Review of data analysis methods for seed germination 1. Crop science, 24: 1192-1199. (**Journal**)
- Sharma, P. and Dubey, R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant growth regulation, 46: 209-22. (**Journal**)
- Silvente, S., Sobolev A.P. and Lara, M. 2012. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. PLoS ONE, 7: e38554. (**Journal**)
- Strid, Å. 1993. Alteration in expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. Plant and Cell Physiology, 3: 953-949. (**Journal**)
- Tsai, Y-C., Hong, C-Y., Liu, L-F. and Kao, C.H. 2005. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. Journal of plant physiology, 162: 291-299. (**Journal**)
- Vahedi, R., Mohsenzadeh, Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M. and Samizadeh Lahiji, H. 2019a. Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*). Crop Biotech, 9: 15-28. (In Persian)(**Journal**)
- Vahedi, R., Mohsenzadeh, Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M. and Samizadeh Lahiji, H. 2019b. Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*). Crop Biotechnology, 9: 15-28. 31-42. (In Persian)(**Journal**)
- Vaseghi, M.J., Chibani, K., Telman, W., Liebthal, M.F., Gerken, M., Schnitzer, H., Mueller, S.M. and Dietz, K.J. 2018. The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. Plant Biology, 7: 1-28. (**Journal**)
- Wang, N., Qian, W., Suppanz, I., Wei, L., Mao, B., Long, Y., Meng, J., Müller, A.E. and Jung, C. 2011. Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the FRIGIDA homologue BnaA. FRI. a. Journal of experimental botany, 62: 5641-5658. (**Journal**)
- Xiong, L., Wang, R-G., Mao, G. and Koczan, J.M. 2006. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant physiology, 142: 1065-1074. (**Journal**)
- Yang, B., Srivastava, S., Deyholos, M.K. and Kav, N.N.V. 2007. Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Science, 173: 156-171. (**Journal**)
- Zadeh Bagheri, M., Javanmardi, Sh., Alozadeh, O. and Kamelmanesh, M.M. 2014. Effects of drought on grain yield and some physiological characteristics of red beangenotypes. Journal of Plant Ecophysiology, 6: 1-11. (In Persian)(**Journal**)
- Zhang, J., Nguyen, H.T. and Blum, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. Journal of experimental botany, 50: 291-302. (**Journal**)



Grouping of some bean genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages and the expression investigating of some genes in resistant and susceptible

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani¹, Habibollah Samizadeh^{2*}, Jamalali Olfati³, Fateme Mostashari-rad⁴

Received: August 18, 2021

Accepted: October 18, 2021

Abstract

In order to study the effects of drought stress induced by polyethylene glycol 6000 on germination components of 21 bean genotypes, a randomized complete design with factorial arrangement of one drought level (-0.148 MPa) and control level (0), in 3 replication and with the purpose of determining the resistance and susceptible genotype, was conducted. Results of anova indicate that all genotypes in all studied components (root, shoot, fresh weight of root and shoot, dry weight of root and shoot, growth rate root and shoot, root to shoot length ratio, difference of fresh and dry weight root, difference of fresh and dry weight shoot) were affected significantly by drought stress. Genotype effect and also the interaction between genotype and drought, was significant for all studied components. According to results of cluster analysis with the ward method, all genotypes in normal and drought conditions, were placed into four different groups, the Ghalaf Siyah and Pak genotypes were chosen as resistance and susceptible genotypes in drought stress conditions. In this study the expression patterns of three drought induced-genes was investigated in two Ghalaf Siyah (resistant genotype) and Pak (sensitive genotype) using Real time PCR technique. After RNA extraction and cDNA synthesis, expression of three genes, including, GR, PRX and APX were studied in the seedling stage of Ghalaf Siyah and Pak genotype under drought stress for control, 72, 144, 192 and 240 hours of the treatments. The results indicated that in Ghalaf Siyah genotype the drought induced-genes generally had higher expression than Pak cultivar. Expression of three genes PRX, GR and APX at the 240 h in the tolerant genotype, it was two, four and six more than the sensitive genotype.

Keywords: Phenotypic evaluation; polyethylene glycol 6000; Real time PCR

How to cite this article

Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizadeh, H., Olfati, J. and Mostashari-rad, F. 2021. Grouping of some bean genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages and the expression investigating of some genes in resistant and susceptible. Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(3): 209-224. (In Persian)(**Journal**)
DOI: [10.22124/jms.2021.5226](https://doi.org/10.22124/jms.2021.5226)

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit <http://jms.guilan.ac.ir/>

1. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com
2. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. hsamizadeh@yahoo.com
3. Associate Professor, Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. jamalaliolfati@gmail.com
4. MS, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. fatememostasharirad@yahoo.com

*Corresponding author: hsamizadeh@yahoo.com