

## روند تغییر پارامترهای فیزیولوژیک و بیان نیمه کمی ژن‌های *Dehydrin 1* و *CapLEA-1* در ژنوتیپ‌های نخود زراعی تحت تنش کم‌آبی

علی اصغر صدیقی<sup>۱</sup>، سعیدرضا وصال<sup>۲\*</sup>، فرج‌الله شهریاری<sup>۳</sup>، عبدالرضا باقری<sup>۴</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳، ۴. استادان گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۳۰)

### Trend of changes in physiological parameters and semi-quantification gene expression for *CapLEA-1* and *Dehydrin 1* genes in chickpea genotypes under water deficit stress

Aliasghar Sedaghati<sup>1</sup>, Saeedreza Vessal<sup>2\*</sup>, Farajollah Shahriari<sup>3</sup>, Abdoreza Bagheri<sup>3</sup>

1. M.Sc. Department of Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

2. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

3, 4. Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(Received: Feb. 5, 2017 - Accepted: Jun. 20, 2017)

#### Abstract

Water deficit is the most important abiotic stress limiting crop productivity in most arid and semi-arid areas of the world and Iran. In order to achieve precise experimental comparisons, the response of chickpea genotypes MCC508 and MCC 521 to water deficit was evaluated and then expression of the genes assessed under the same stress situation. Decreasing trend of Relative Water Content (RWC) was significantly less in MCC508 compared with MCC521, especially after 24 hours ( $p \leq 0.05$ ). Membrane Stability Index (MSI) was also higher in MCC508 whereas electrolyte leakage and Malondialdehyde (MDA) accumulation were almost stable but increased 1.2-fold relative to control after four days stress. Proline was accumulated up to 16.8 and 9.4  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$  in MCC508 and MCC521 after 4 days, which indicated an increase of 5.1 and 3.8 fold related to the control, respectively. Semi-quantification gene expression analysis for *Dehydrin 1* and *CapLEA-1* showed different response to water deficit for each genotype. Both of these genes up-regulated in tolerant genotype MCC508 with the amount of 4 and 2.1 fold compared to their respective control ( $p \leq 0.05$ ) so that the up-regulation trend steadily continued under the stress situation. However, *CapLEA-1* expression was not significantly regulated in the sensitive genotype; instead, *Dehydrin 1* regulation was significantly evident as much as 1.4 fold increase and then decreased ( $p \leq 0.05$ ). It, therefore, seems that stable, high up-regulation of *Dehydrin 1* and *CapLEA-1* genes and their function (stability of lipids and cell membrane, correct protein folding and detoxification) might be a possible reason for high tolerance response to water deficit in MCC508 compared to MCC521.

**Keywords:** chickpea, *CapLEA-1*, *Dehydrin 1*, water deficit stress.

#### چکیده

کم‌آبی مهم‌ترین تنش غیرزیستی است که تولید محصولات زراعی را در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا و ایران محدود می‌کند. به منظور انجام مقایسات کنترل‌شده ابتدا پاسخ فیزیولوژیک دو ژنوتیپ متمایز MCC508 و MCC521 نخود به تنش کم‌آبی بررسی و سپس بیان دو ژن مؤثر در همان شرایط اندازه‌گیری شد. رطوبت نسبی برگ MCC508 به‌ویژه پس از ۲۴ ساعت در حد معنی‌داری کمتر از MCC521 بود ( $p \leq 0.05$ ). در MCC508 پایداری غشا ثبات بیشتری داشت به طوری که نشت الکترولیت و میزان تجمع مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تقریباً ثابت بود. اما چهار روز تنش، باعث افزایش ۱/۲ برابری نسبت به شاهد شد. میزان تجمع پرولین چهار روز پس از تنش در MCC508 و MCC521 به ترتیب ۱۶/۸ و ۹/۴ میکرو مول بر گرم بافت تر برگ بود که نسبت به شاهد ۵/۱ و ۳/۸ برابر افزایش داشت. بیان نیمه کمی دو ژن *Dehydrin 1* و *CapLEA-1* در ژنوتیپ متحمل MCC508 به ترتیب با ۴ و ۲/۱ برابر نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p \leq 0.05$ ) و با ادامه روند تنش این افزایش ادامه داشت. بیان ژن *CapLEA-1* در ژنوتیپ حساس تغییرات معنی‌داری نشان نداد، اما بیان ژن *Dehydrin 1* در ابتدا نسبت به شاهد ۱/۴ برابر افزایش و سپس با ادامه تنش کاهش یافت ( $p \leq 0.05$ ). با توجه به نقش ژن‌های *Dehydrin 1* و *CapLEA-1* در حفظ ساختار لیپیدها و غشای سلولی، پایداری تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و سم‌زدایی به نظر می‌رسد سطح بیان بالاتر و منظم‌تر این ژنها می‌تواند یکی از دلایل احتمالی تحمل بیشتر ژنوتیپ MCC508 نسبت به MCC521 در برابر تنش کم‌آبی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تنش کم‌آبی، نخود، *Dehydrin 1* و *CapLEA-1*

## مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی است یک‌ساله، خودگرده‌افشان و دیپلوئید ( $2n=2x=16$ ) که با تولید جهانی ۸ میلیون تن، سومین حبوبات مهم دنیا می‌باشد (Malhotra & Saxena, 2002). این گیاه به دلیل تثبیت نیتروژن اتمسفر در کاهش مصرف کود نیتروژن و نیز تأمین پروتئین در جیره غذایی انسان نقش بسزایی بر عهده دارد (Mantri *et al.*, 2007). سازگاری به شرایط مختلف آب و هوایی از پتانسیل بالا در این گیاه حکایت دارد. با این‌حال، شرایط نامساعد محیطی نظیر کم‌آبی و درجه حرارت بالا در طول دوره رشد به مقدار قابل‌ملاحظه‌ای از عملکرد آن می‌کاهد (Kuper, 1998).

تنش کم‌آبی مهم‌ترین عامل غیرزیستی کاهش تولید محصولات کشاورزی در دنیا است که باعث کاهش رشد گیاه از طریق تغییر فرایندهای مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از جمله تغییر بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌ها، نفوذپذیری غشاء سلول و وضعیت آب برگ می‌شود (Hussain, 2006; Jaleel *et al.*, 2009). راهکارهای تحمل به خشکی در گیاهان دربرگیرنده مسیرهای فنولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی مختلف است که در مواجهه با خشکی به‌صورت فرار، اجتناب و تحمل در گیاهان بروز پیدا می‌کند (Cattivelli *et al.*, 2008). شناسایی راهکارهای مولکولی و ژن‌های کلیدی که باعث بهبود تحمل نخود به شرایط تنش می‌شود می‌تواند در راستای اصلاح این گیاه به تنش خشکی و افزایش عملکرد بسیار مؤثر باشد.

در مطالعه مزرعه‌ای که روی ۱۵۰ ژنوتیپ نخود در قالب آزمون مقدماتی ارزیابی عملکرد در دو شرایط تنش خشکی (دیم) و بدون تنش (فاریاب) انجام شد، تنوع قابل‌توجهی میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در بررسی ژنوتیپ‌های برتر از نظر شاخص‌های تحمل و پاسخ به خشکی، مشخص شد

که MCC508 و MCC521 جزء ژنوتیپ‌های متمایز قرار می‌گیرند. یکی از دلایل احتمالی برتری ژنوتیپ‌های کاندیدا برای تحمل به خشکی در شرایط مزرعه‌ای، برخورداری از قابلیت فرار از خشکی (زودرسی) و اجتناب از تنش خشکی انتهایی بیان شده است (Ganjeali *et al.*, 2010).

در بررسی اولیه توسط Arefian *et al.* (2014) پنج ژنوتیپ کاندید متحمل و حساس به خشکی و شوری، به کمک نشانگرهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در مرحله گیاهچه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. نتایج نشان داد که برخی از این نشانگرها همانند میزان پرولین، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، محتوای رطوبت نسبی و نشت الکترولیت از مؤثرترین صفات در شناسایی میزان تحمل به تنش در این گیاه و در مرحله گیاهچه‌ای محسوب می‌شوند. مکانیسم‌های تحمل به شوری را می‌توان در سه سطح کل گیاه، سلولی و در سطح مولکولی مورد بررسی قرار داد (Munns & Tester, 2008). برخی ژن‌های مؤثر در تنش، پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)<sup>۱</sup> را کد می‌کنند. از دیگر محصولات ژن‌های بیان‌شده در تنش‌های شوری، خشکی و دمای پایین می‌توان به پروتئین‌های LEA<sup>۲</sup> و همچنین آنزیم‌های مرتبط با عوامل رونویسی اشاره کرد (Groover *et al.*, 2001).

پروتئین‌های LEA در دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های کم‌آبی، شوری، سرما و همچنین تنش‌های اسمزی بیان می‌شوند. این ترکیبات همانند چاپرون‌ها، با اتصال به مولکول‌های آب و پروتئین‌ها باعث پایداری ماکرومولکول‌ها، غشاء و یون‌های ناقل می‌شوند. این پروتئین‌ها بر اساس ساختمان و کارکرد در چند خانواده قرار می‌گیرند. اکثر پروتئین‌های LEA و پروتئین‌های Dehydrin در

1. Heat Shock Proteins (HSPs)

2. Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA proteins)

ظرفیت نگهداری آب خاک تعیین و رطوبت هر یک از گلدان‌ها با مقدار تقریبی ۳۰ میلی‌لیتر آبیاری روزانه در حدود ۸۰٪ ظرفیت زراعی نگهداری و سه هفته پس از سبز شدن، با قطع آبیاری، شرایط تنش کم‌آبی پیش‌رونده برای گیاهچه‌ها ایجاد شد. برای انجام آزمایش فیزیولوژیک، نمونه‌گیری‌ها از بافت برگ گیاهی در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت از زمان شروع تنش کم‌آبی انجام شد. بر اساس داده‌های حاصل از آزمایش نخست، شرایط کاشت و رشدی گیاهچه‌ها همانند آزمایش نخست بوده و نمونه‌گیری‌های آزمایش برای مطالعات بیان ژن در مقاطع زمانی صفر، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از تنش کم‌آبی انجام گرفت. درصد محتوای آب نسبی برگ (RWC%) طبق معادله زیر به دست آمد که در آن FW وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ (۴۸ ساعت در آن ۸۰ درجه سلسیوس) و TW وزن آماس برگ (۲۴ ساعت شناور در آب مقطر) است (Silva et al., 1996).

$$RWC(\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$$

جهت سنجش ضریب پایداری غشاء<sup>۳</sup> ابتدا ۱/۱ گرم برگ به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۰°C و ۱/۱ گرم برگ نیز به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰°C (هر دو حاوی ۱۰ml آب دیونیزه) قرار گرفته و میزان نشت الکتروولت آن‌ها با دستگاه EC متر تعیین و طبق معادله زیر میزان MSI آن‌ها سنجیده شد (Premachandra et al., 1990):

$$MSI = 1 - \frac{EC_{40}}{EC_{100}}$$

برای استخراج و سنجش پرولین، ۰/۲ گرم از بافت برگ در ۴ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک آبدار (W/V) ۳٪ کاملاً سائیده شده تا همگن شود و پس از انجام سانتریفیوژ، ۲ml از محلول بالای با ۲ml از

فرم طبیعی خود اکثراً به صورت ساختارهای غیرتاخورده قرار گرفته‌اند. از خصوصیات بارز پروتئین‌های LEA و Dehydrin آب‌دوستی و پایداری در برابر حرارت است. چنین تصور می‌شود که پروتئین‌های LEA به‌عنوان مولکول‌های متصل شونده به آب، در ترشح یون‌ها و در پایداری ماکرومولکول‌ها و غشاها از نظر فعالیت، شبیه چاپرون‌ها عمل می‌کنند (Goyal et al., 2005; Campbell & Close, 1997). هدف از مطالعه حاضر بررسی دقیق دو ژنوتیپ کاندید متحمل و حساس نخود زراعی به تنش خشکی در شرایط کاملاً کنترل‌شده در سطح فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بود که بر اساس مطالعات قبلی مزرعه‌ای نسبت به تنش کم‌آبی ارزیابی شده بودند. علاوه بر این، روند بیان نیمه‌کمی دو ژن کلیدی *CapLEA-1* و *Dehydrin1* طی چهار روز تنش کم‌آبی پیش‌رونده در این دو ژنوتیپ ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

بر اساس نتایج مطالعات انجام‌شده (Ganjeal et al., 2006, 2010) دو ژنوتیپ کاندید کاملاً متمایز نسبت به تنش کم‌آبی به نام‌های MCC508 و MCC521 انتخاب و بذور آن‌ها از بانک بذر حبوبات پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تهیه گردید. ابتدا بذور از لحاظ هم‌شکلی، یکنواختی، عدم وجود صدمات سطحی بررسی گردید. بذور انتخابی با الکل و سپس با محلول هیپوکلرید سدیم ضدعفونی و قبل از کاشت در ظروف پتری به مدت حداکثر ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۴±۱ جوانه‌دار شدند. بذور کاملاً یکنواخت از لحاظ جوانه‌زنی و برخوردار از بنیه مناسب درون گلدان‌هایی با ظرفیت یک لیتر حاوی ترکیب خاکی ۲:۱ خاک زراعی و ماسه کشت و در دمای ۲۵±۲ و با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با تراکم دو بوته در هر گلدان در اتاقک رشد نگهداری شدند. قبل از کشت بذور،

به‌منظور دستیابی به RNA با کیفیت و کمیت مناسب، از روش‌های مختلف استخراج استفاده شد که در نهایت کیت ستونی Total RNA Extraction Kit (تکاپو زیست، تهران) بهترین نتیجه را داشت. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت برگ تازه نخود، توسط هاون اتوکلاو شده و عاری از RNase در نیتروژن مایع به‌خوبی ساییده شد. پودر حاصل سریعاً به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و ۳۰۰ میکرو لیتر از نخستین بافر لیزکننده به آن افزوده شد. پس از مخلوط کردن، ۵۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. پس از افزودن ۳۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول به محلول بالایی، به ستون ویژه کیت با نام spin column منتقل و سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، پس از شستشو با بافرهای اولیه و ثانویه و سپس اتانول ۷۰٪، RNA استخراج‌شده در دمای -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ تأیید شده و غلظت و کیفیت آن نیز توسط نانودراپ (Thermo NanoDrop 2000) (uv-vis) اندازه‌گیری شد.

معرف نین‌هیدرین و ۲ml اسیداستیک گلاسیال مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب °C ۱۰۰ قرار گرفتند. مخلوط واکنش به کمک ۴ml تولوئن جدا شده و میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰nm تعیین شد. نهایتاً با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین به کمک فرمول زیر محاسبه شد (Bates et al., 1973):

$$\text{Prolin } (\mu\text{mol/gFW}) = \left( \frac{\mu\text{g prolin}}{\text{ml}} \times \frac{\text{ml toluen}}{115.5 \left( \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right)} \right) \times \frac{\text{gr sample}}{5}$$

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با استفاده از روش Heath & Parker (1968) اندازه‌گیری شد. به‌این ترتیب که ۰/۲ گرم بافت تر برگ با ۵ml تری کلرواستیک اسید ۱/۰٪ ساییده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از مخلوط کردن با محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ حاوی تیوباریتوریک اسید ۵/۰٪ (۱ به ۴)، ۳۰ دقیقه در حمام آب‌گرم °C ۹۰ قرار گرفته و پس از تعیین جذب نوری در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر OPTIMA مدل sp-3000 plus، با استفاده از رابطه زیر غلظت مالون‌دی‌آلدئید محاسبه شد:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/gFW}) = \text{A}_{532-600} / 1.55 \times 10^{-5} \text{ Mcm}^{-1} \times b$$

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده به‌منظور تکثیر ژن‌های *Actin* و *Dehydrin1*، *CapLEA-1*

آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول	دمای اتصال
CapLEA-1-F	ACAGACAACCGAAGCAAC	۱۶۴bp	۵۴
CapLEA-1-R	GGGCCATACCCTTAACCT		
Dehydrin1-F	TGGTGGCACTGGAGATG	۱۵۸ bp	۵۴/۵
Dehydrin1-R	AACTACCTGGGTTGTGGG		
Actin-F	TGTCTTGAGTGGTGGTTCTAC	۲۰۲ bp	۵۲/۷
Actin-R	TTCATCATATTCTGCCTTTG		

شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. اندازه باندهای حاصل و وضوح آن‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد برای اطمینان از درست بودن طراحی آغازگرها، اطمینان از درست بودن مراحل سنتز cDNA، اطمینان از مناسب بودن برنامه PCR و نیز عدم مشاهده باند

پس از همسان‌سازی غلظت RNA در همه نمونه‌ها، رشته مکمل (cDNA) برای ۵ میکرو لیتر RNA در هر نمونه، با استفاده از آنزیم M-Mulv و کیت دومرحله‌ای RT-PCR (سیناکلون، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده (Gao et al., 2008) و

ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از ۴ میکرولیتر نمونه، ۲ میکرولیتر گرینویور و ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری در هر چاهک با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد.

آنالیز آماری و رسم نمودارها در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 19 و Excel 2013 انجام شد. آنالیز باندهای تفکیک‌شده با سه تکرار بیولوژیک در ژل‌های آگارز جداگانه با استفاده از نرم‌افزار TotalLab صورت گرفت. در این مرحله پس از انتخاب خودکار باندها و ستون‌ها، به‌صورت دستی هر باند انتخاب و محدوده آن مشخص شد. پس از حذف پس‌زمینه، کمیت هر باند تعیین گردید. تبدیل داده‌های درصدی با روش آرک‌سینوس انجام شد و پس از بررسی معنی‌دار بودن آنالیز واریانس، میانگین‌ها به روش دانکن مقایسه و سطح معنی‌داری به‌کار رفته در کلیه تجزیه تحلیل‌ها ۵٪ در نظر گرفته شد.

برای نمونه‌های RNA (False negative)، و همچنین خلوص cDNAهای سنتز شده از نظر کیفیت و وضوح باندها روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. همچنین بیان ژن‌های مورد مطالعه در تمام نمونه‌گیری‌ها و در هر دو ژنوتیپ، با استفاده از ژن *Actin* به‌عنوان ژن خانه‌دار نرمال‌سازی شد. با توجه به نیمه کمی بودن این مطالعه، مقایسه بیان ژن‌ها در محدوده فاز نمایی مرحله تکثیر PCR برای هر ژن انجام گرفت. برای این منظور تکثیر هر ژن به‌صورت جداگانه در سیکل‌های ۲۰، ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۲ و ۳۵ مورد ارزیابی قرار گرفت و با مقایسه باندهای حاصل، با توجه به فاز نمایی و تکثیر اختصاصی (عدم حضور باندهای اضافی)، مناسب‌ترین تعداد سیکل انتخاب شد. در این راستا، تعداد سیکل بهینه برای ژن اکتین ۲۸ و برای دو ژن دیگر ۲۵ سیکل، انتخاب شد. تفکیک محصولات PCR روی

جدول ۲. شرایط دمایی، زمان و تعداد چرخه‌های واکنش PCR در مراحل مختلف تکثیر

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
واسرشت‌سازی اولیه	۹۵°C	۵ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی ثانویه	۹۴°C	۲۵ ثانیه	
اتصال	Tm- ۱/۵ °C	۳۰ ثانیه	۲۸ و ۲۵
بسط	۷۲°C	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲°C	۷ دقیقه	۱

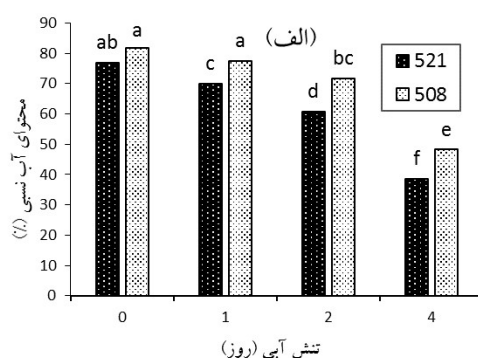
## نتایج و بحث

### مقایسات فیزیولوژیک

بیشتر بوده و با ادامه روند تنش کم‌آبی این اختلاف بیشتر و پس از یک روز معنی‌دار شد. چهار روز تنش کم‌آبی باعث کاهش ۴۶ درصدی آب نسبی برگ در این ژنوتیپ شد (شکل ۱- الف). محتوای آب نسبی برگ به‌عنوان داده‌ای جهت تعیین میزان تحمل ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به تنش شوری و کم‌آبی معرفی شده است (Terzi & Kadioglu, 2006). قدرت حفظ آب موجود در برگ در شرایط تنش کم‌آبی، در ژنوتیپ‌های حساس به تنش کم‌آبی کاهش می‌یابد، بنابراین این آب موجود در برگ از طریق

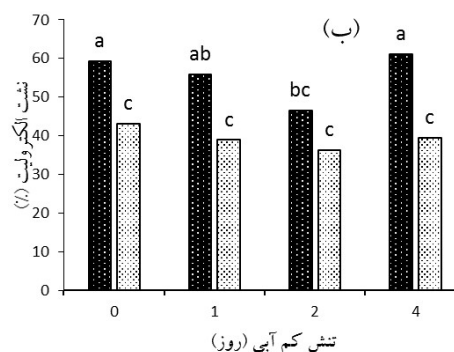
محتوای آب نسبی برگ در هر دو ژنوتیپ با افزایش مدت‌زمان تنش کم‌آبی در طول چهار روز، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ( $p \leq 0/05$ ). این کاهش در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل در چهار روز پس از تنش بیشتر از زمان‌های نمونه‌گیری دیگر بود. در این میان، رطوبت نسبی در ژنوتیپ MCC521 با ۵۵٪ کاهش، نسبت به ژنوتیپ دیگر افت بیشتری داشت. رطوبت نسبی برگ در ژنوتیپ MCC508 از ابتدا

کم‌آبی، به همراه بیشتر بودن مواد محلول و متابولیت‌ها سبب افزایش مقاومت این گیاهان به تنش کم‌آبی می‌شود (Guerfel *et al.*, 2008). در این آزمایش در بیشتر مراحل نمونه‌گیری نشت الکترولیت ژنوتیپ MCC521 نسبت به ژنوتیپ MCC508 به صورت معنی‌داری بیشتر بود ( $p \leq 0.05$ ) که بیانگر ضریب پایداری غشای (MSI) کمتر در این ژنوتیپ می‌باشد (شکل ۱-ب). میزان نشت الکترولیت ژنوتیپ MCC521 در طول تنش کم‌آبی تفاوت معنی‌داری نداشت که می‌تواند نشان‌دهنده ثبات و پایداری غشا در شرایط تنش کم‌آبی باشد. بیشترین اختلاف معنی‌دار میان دو ژنوتیپ در این پارامتر، چهار روز پس از تنش کم‌آبی ایجاد شد که تفاوت آن‌ها به بیش از ۲۰ درصد می‌رسد (شکل ۲-ب).



تبخیر سطحی و یا تعرق، کاهش یافته و در نتیجه گیاه دچار کم‌آبی می‌شود (Beck *et al.*, 2007). کاهش رطوبت نسبی برگ به‌ویژه در ژنوتیپ‌های حساس نخود به تنش کم‌آبی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Bhushan *et al.*, 2011). داده‌های حاصل از سنجش این پارامتر تأیید کننده متحمل بودن ژنوتیپ MCC508 و حساسیت بیشتر ژنوتیپ MCC521 نسبت به تنش کم‌آبی می‌باشد (شکل ۱-الف).

در گیاهان ذرت، سویا و گندم، محتوای نسبی آب برگ به‌عنوان کمیتی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش کم‌آبی معرفی شده است (Figueiredo *et al.*, 2001; Galle *et al.*, 2002; Helal & Samir, 2008). در این گیاهان، همبستگی مثبتی میان محتوای نسبی آب برگ و میزان مواد محلول و متابولیت‌ها وجود دارد. بالاتر بودن محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش

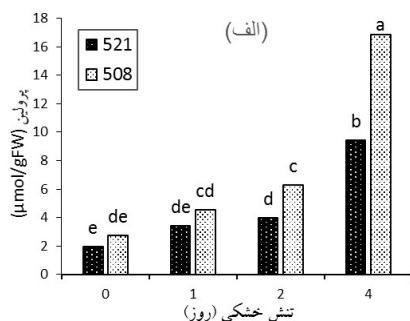


شکل ۱. تأثیر چهار روز تنش کم‌آبی بر (الف) درصد تغییرات مقدار آب نسبی برگ و (ب) نشت الکترولیت، در ژنوتیپ‌های نخود ( $p \leq 0.05$ ).

میزان تخریب غشاء در شرایط تنش کم‌آبی در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش کم‌آبی کمتر از ژنوتیپ‌های حساس باشد. با ادامه روند تنش کم‌آبی، مقدار تولید پرولین در دو ژنوتیپ نسبت به شاهد به صورت معنی‌دار افزایش یافت ( $p \leq 0.05$ )، به طوری که چهار روز تنش کم‌آبی باعث تجمع بالاترین میزان پرولین در هر دو ژنوتیپ شد. این میزان تجمع پرولین در ژنوتیپ MCC508 و MCC521 به ترتیب

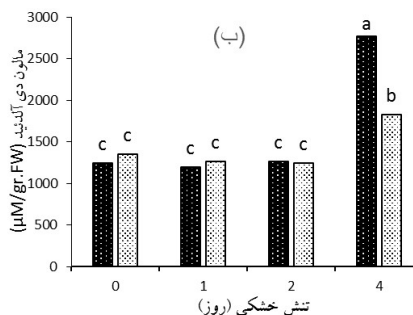
تنش کم‌آبی از طریق افزایش تولید مواد تخریب‌کننده غشاء از جمله پراکسید هیدروژن، سبب تخریب غشاء سلولی گشته و در نتیجه ضریب پایداری غشاء در شرایط تنش کم‌آبی کاهش می‌یابد. گیاهان متحمل به تنش کم‌آبی مکانیسم‌هایی برای مقابله با تخریب غشاء دارند که یکی از این مکانیسم‌ها تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز است (Groover *et al.*, 2001). بنابراین انتظار می‌رود

از تنش کم‌آبی، میزان تجمع مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌صورت معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت ( $p \leq 0.05$ ). پر اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع منجر به ایجاد محصول ثانویه‌ای به نام مالون‌دی‌آلدئید می‌گردد که از آن به‌عنوان شاخصی جهت تعیین میزان پر اکسیداسیون لیپیدها و میزان نفوذپذیری غشاء استفاده می‌شود (Eraslan *et al.*, 2007). همان‌طور که در شکل ۲-ب مشخص است، ژنوتیپ MCC521 با افزایش ۵۵ درصدی نسبت به شاهد، بیشترین افزایش MDA را نشان داد که بیانگر میزان نفوذپذیری بیشتر غشاء نسبت به ژنوتیپ دیگر است. از سوی دیگر افزایش MDA در ژنوتیپ MCC508، به میزان ۱۷ درصد بود که می‌تواند بیانگر ثبات بیشتر این ژنوتیپ در شرایط تنش کم‌آبی باشد.



۱۶/۸ و ۹/۴ میکرومول پرولین در یک گرم بافت برگ بود که در مقایسه با شاهد به ترتیب ۵/۱ و ۳/۸ برابر افزایش یافته است. دو روز تنش کم‌آبی نیز باعث اختلاف معنی‌دار تجمع این اسیدآمین‌ها در هر دو ژنوتیپ نسبت به هم شده است (شکل ۲-الف).

از آنجاکه پرولین در تنظیم اسمزی، ذخیره کردن انرژی و نیتروژن نقش دارد (Bates *et al.*, 1973) و از عوامل مؤثر در تحمل به تنش‌های شوری و کم‌آبی در گیاهان می‌باشد (Amini & Ehsanpour, 2005). تجمع سریع‌تر و بیشتر پرولین در ژنوتیپ MCC508 می‌تواند بیانگر تحمل بیشتر این ژنوتیپ در شرایط تنش کم‌آبی باشد (شکل ۲-الف). نتایج تحقیق حاضر مطابق با مطالعات دیگران (Arefian *et al.*, 2014; Najaphy *et al.*, 2010) بود که تأییدکننده تجمع بیشتر این اسیدآمین‌ها در ژنوتیپ‌های متحمل نخود به تنش‌های غیر زیستی می‌باشد. در تحقیق حاضر، تنها چهار روز پس



شکل ۲. تغییرات مقدار پرولین (برحسب میکرومول بر گرم وزن تر بافت برگ) (الف) و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (برحسب میکرومولار بر گرم وزن تر بافت برگ) (ب) در دو ژنوتیپ نخود زراعی تحت تنش کم‌آبی ( $p \leq 0.05$ ).

بیشتر رطوبت نسبی برگ و نهایتاً تحمل بیشتر ژنوتیپ MCC508 نسبت به MCC521 در شرایط تنش کم‌آبی شده باشد.

#### بررسی بیان ژن‌های مؤثر در تنش کم‌آبی

پس از تأیید حساس و متحمل بودن ژنوتیپ‌ها در شرایط آزمایشی نخست و تعیین زمان‌های مناسب نمونه‌گیری، بیان دو ژن کلیدی نخود تحت تنش کم‌آبی مورد بررسی قرار گرفت. سطوح بیان ژن‌های

به‌طور کلی نتایج حاصل از آزمایش فیزیولوژیک تأییدکننده تحمل بیشتر ژنوتیپ MCC508 در شرایط تنش کم‌آبی بود. پارامترهای نشت الکترولیت و MDA هم‌راستا با یکدیگر پایداری بیشتر غشا در این ژنوتیپ را نشان دادند. از سوی دیگر روند افزایش پرولین تجمع یافته، نشان‌دهنده سازگاری مناسب‌تر این ژنوتیپ در شرایط تنش است. علاوه بر پرولین، تجمع دیگر اسمولیت‌ها و همچنین دیگر مکانیسم‌های پاسخ گیاه به تنش از جمله مواردی است که می‌تواند باعث حفاظت

کام‌آبی در ژنوتیپ متحمل نخود افزایش یافته بود. پروتئین‌های فراوان در اواخر دوره جنین‌زایی (LEA) در حفاظت و کمک به پایداری ماکرو مولکول‌ها شامل کلروفیل و کمپلکس پروتئین-کلروفیل نقش دارد و همچنین این پروتئین‌ها به دلیل مولکول‌های آبی که در خود دارند از خشک شدن غشاء و سایر پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند (Webb *et al.*, 1996). در دیگر مطالعات نیز بیان ژن‌های خانواده LEA تحت تنش‌های سرمایی و کام‌آبی در گیاهان دیگر مانند گندم افزایش نشان داد (Kume *et al.*, 2005; Seki *et al.*, 2002). این ژن، کدکننده پروتئین‌های بسیار آب‌دوست می‌باشد که از آسیب‌های غشایی و کام‌آبی جلوگیری می‌کند (Webb, *et al.*, 1996). بر اساس داده‌های این آزمایش، افزایش معنی‌دار بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل MCC508 می‌تواند یکی از دلایل اصلی توانایی این ژنوتیپ در حفظ رطوبت نسبی برگ، جلوگیری از تخریب ساختار غشا و میزان کمتر نشت الکترولیت باشد. بر این اساس به نظر می‌رسد کارکرد پایدار پروتئین‌ها در شرایط تنش از دلایل مهم و احتمالی تحمل به کام‌آبی در ژنوتیپ متحمل MCC508 باشد که با افزایش معنی‌دار این ژن همراه بوده است (شکل ۴- الف).

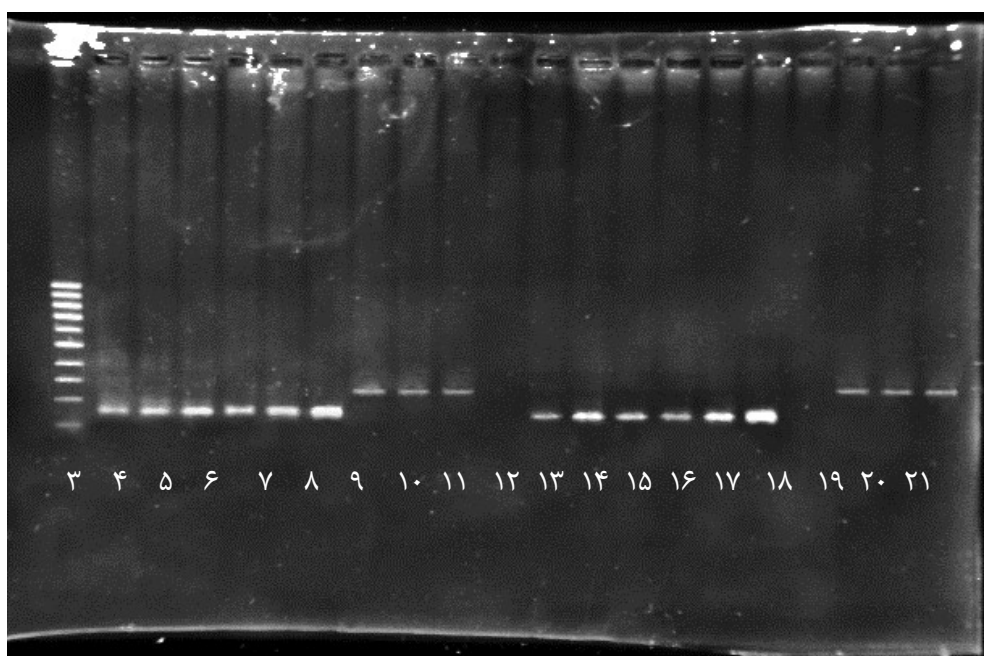
در طبقه‌بندی کلی، پروتئین‌های دهیدرین بخشی از گروه بزرگی از پروتئین‌هایی هستند که تحت عنوان LEA شناخته می‌شوند (Rodriguez, 2005). این پروتئین‌ها دارای وزن مولکولی ۹ تا ۲۰۰ کیلو دالتون هستند و بر اساس موتیف‌های حفظ‌شده به پنج گروه طبقه‌بندی می‌شوند (Choi & Close, 2000) به نظر می‌رسد دهیدرین‌ها به‌عنوان نقش چابرونی در پایداری ویزیکول‌ها، پروتئین‌ها و ساختار غشایی، تنظیم اسمزی و سم‌زدایی در گیاهان تحت تنش نقش ایفا می‌کنند، اما عملکرد دقیق آن‌ها تاکنون مشخص نشده است (Wise & Tunnacliffe, 2004). در بررسی Guo *et al.* (2009) یکی از

کاندید موردنظر در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس گیاه نخود پس از گذشت صفر، ۲ و ۴ روز از تنش بررسی شد. پس از همسان‌سازی غلظت RNA ها و پس از ساخت cDNA متناظر، در میزان بیان ژن *Actin* در نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های مختلف پس از تنش تغییراتی مشاهده نشد که می‌تواند تأییدی مجدد برای مناسب بودن این ژن به‌عنوان کنترل داخلی برای آزمایش RT-PCR به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن در مقاطع زمانی مختلف باشد (شکل ۳). همچنین نتایج حاصل حاکی از طراحی صحیح آغازگرها و تکثیر اختصاصی ژن موردنظر بود و هیچ باند اضافی دیده نشد. در نمونه‌ها و کنترل منفی نیز هیچ‌گونه باند اضافی مشاهده نشد (شکل ۳، چاهک‌های ۱۱ و ۱۸). همان‌طور که در شکل‌های ۳ و ۴ مشخص است، به‌طور کلی در هر دو ژنوتیپ با ادامه روند تنش کام‌آبی، نسبت بیان این دو ژن در حال افزایش است. دو و چهار روز تنش کام‌آبی به ترتیب باعث افزایش ۱۹ و ۲۱ درصدی نسبت بیان ژن *CapLEA-1* در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ MCC521 شد. از سوی دیگر این روند تغییرات بیان در ژنوتیپ متحمل MCC508 در همان مقاطع زمانی به ترتیب باعث افزایش نسبت شدت بیان ۴۳ و ۲۲۳ درصدی ژن *CapLEA-1* شد (شکل ۴). تفاوت بیان ژن در این دو ژنوتیپ در مورد ژن *Dehydrin1* بسیار بیشتر بود، به‌طوری‌که دو و چهار روز تنش کام‌آبی به ترتیب باعث افزایش نسبت شدت بیان این ژن به میزان ۱/۴ و ۰/۶ برابر نسبت به شاهد در ژنوتیپ حساس شد. از سوی دیگر، افزایش معنی‌دار بیان این ژن در ژنوتیپ MCC508 در همان مقاطع زمانی به ترتیب ۱/۲۴ و ۴ برابر نسبت به شاهد بود. بنابراین پاسخ ژنوتیپ متحمل MCC508 به چهار روز تنش کام‌آبی، افزایش ۲ و ۴ برابری بیان ژن‌های *CapLEA-1* و *Dehydrin1* بود (شکل ۴). نتایج حاصل از این آزمایش با گزارش‌های قبلی (Marjani *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2009) منطبق بود که در مطالعات آن‌ها نیز بیان هر این دو ژن در پاسخ به تنش

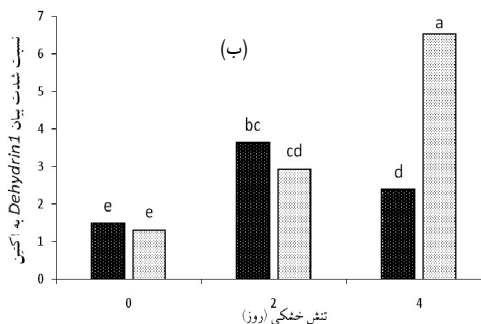
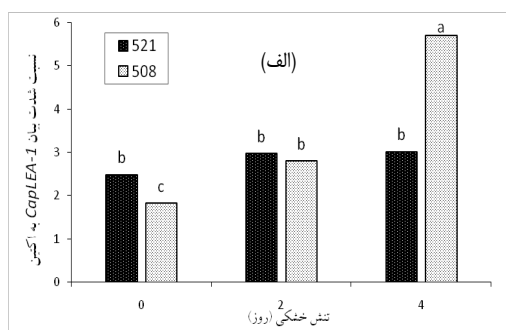


که کارکرد آن حفظ ساختار پروتئین‌ها و غشای سلولی و همچنین سم‌زدایی ناشی از تنش است، می‌تواند یکی از دلایل احتمالی تحمل بالاتر این ژنوتیپ به تنش کم‌آبی باشد.

دلایل احتمالی تحمل ژنوتیپ متحمل نخود به ۴۸ ساعت تنش کم‌آبی، به افزایش بیان این ژن نسبت داده شده است. در مطالعه حاضر نیز افزایش بسیار معنی‌دار بیان ژن دهیدرین در ژنوتیپ MCC508



شکل ۳. روند بیان ژن‌های *Dehydrin1* و *CapLEA-1* در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس نخود در پاسخ به تنش کم‌آبی. چاهک ۱: سایز مارکر؛ چاهک‌های ۲ تا ۷: بیان ژن *CapLEA-1* در ژنوتیپ MCC521 (سه چاهک نخست) و ژنوتیپ MCC508 (سه چاهک دوم) به ترتیب در زمان‌های صفر، دو و چهار روز پس از تنش؛ چاهک‌های ۸ تا ۱۰: بیان ژن خانه‌دار *Actin* در ژنوتیپ متحمل MCC508 در سه زمان تنش؛ چاهک ۱۱: کنترل منفی برای ژنوتیپ متحمل MCC508؛ چاهک‌های ۱۲ تا ۱۷: بیان ژن *Dehydrin1* در ژنوتیپ MCC521 (سه چاهک نخست) و ژنوتیپ MCC508 (سه چاهک دوم) به ترتیب در زمان‌های صفر، دو و چهار روز پس از تنش؛ چاهک ۱۸: کنترل منفی برای ژنوتیپ حساس MCC521؛ چاهک‌های ۱۹ تا ۲۱: بیان ژن خانه‌دار *Actin* در ژنوتیپ حساس MCC521 در سه زمان تنش.



شکل ۴. تغییرات بیان ژن‌های *CapLEA-1* (الف) و *Dehydrin1* (ب) در ژنوتیپ‌های متحمل MCC508 و حساس MCC521 نخود زراعی در پاسخ به صفر، دو و چهار روز تنش کم‌آبی.

نسبت داد. در مجموع، با در نظر گرفتن کارکردهای این دو ژن در حفظ ساختار لیپیدها و غشای سلولی، پایداری تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و سم‌زدایی، احتمالاً به‌نظر می‌رسد بتوان این موارد را از جمله دلایل احتمالی RWC بیشتر، تجمع MDA و نشسته الکترولیت کمتر در ژنوتیپ MCC508 نسبت به MCC521 تحت شرایط تنش کم‌آبی در نظر گرفت.

با توجه به نتایج حاصل از دو آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که سطح بیان بالای ژن‌های *Dehydrin 1* و *CapLEA-1* در ژنوتیپ متحمل و روند منظم افزایش آن احتمالاً در ایجاد تحمل نسبت به تنش کم‌آبی در ژنوتیپ MCC508 نقش داشته باشد. از سوی دیگر یکی از دلایل حساسیت MCC521 را می‌توان به سطح پایین‌تر بیان و همچنین روند نامنظم بیان این ژن در شرایط تنش

## REFERENCES

- Amini F, Ehsanpour A (2005) Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na + /K + changes in two tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress, Am. J. Biochem. Biotechnol. 1: 212-216.
- Arefian M, Vessal S, Bagheri A (2014) Biochemical changes in response to salinity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) during early stages of seedling growth. The J. Anim. Plant Sci. 24 (6): 1849-1857.
- Bates LS, Waldran RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water studies. Plant Soil 39: 205-208.
- Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. J. Biosci. 32: 501-510.
- Bhushan D, Jaiswal DK, Ray D, Basu D, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2011) Dehydration-responsive reversible and irreversible changes in the extracellular matrix: comparative proteomics of chickpea genotypes with contrasting tolerance. J. Proteome Res. 10: 2027-2046.
- Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. New Phytol. 137(1): 61-74.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo A M, Francia E, Mare C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Res. 105: 1-14.
- Choi DW, Close TJ (2000) A newly identified barley gene, *Dhn12*, encoding a YSK2 DHN, is located on chromosome 6H and has embryo-specific expression. Theor. Appl. Genet. 100: 1274-1278.
- de Silva M, Purcell LC, King CA (1996) Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. Crop Sci. 36: 611-616
- Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A (2007) Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. Scientia Horticulturae 114: 5-10.
- Figueiredo MVB, Bezerra-Neto E, Burity HA (2001) Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. Brazilian J. Microbiol. 32: 195-200.
- Galle A, Csiszár J, Tari I, and Erdei L (2002) Changes in water and chlorophyll fluorescence parameters under osmotic stress in wheat cultivars. Acta Biologica Szegediensis 46: 85-86.
- Ganjali A, Bagheri A, Porsa H (2010) Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm for drought resistance. Iranian J of Pulses Res. 7:185-196.

- Ganjeali A, Kafi M, Bagheri A, Shahriyari F (2006) Screening for drought tolerance in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). Iranian J of Pulses Res. 3:103-122.
- Gao WR, Wang XS, Liu QY, Peng H, Chen C, Li JG, Zhang JS, Hu SN, Ma H (2008) "Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.)." Biochem. Biophys. Res. Commun. 376(3): 578-583.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochemistry J. 388: 151-157.
- Groover A, Kapoor A, Lakshumi OS, Agarwal S, Sahi C, Katiar AS, Agrol M, Dubey H (2001) Understanding molecular alphabet of the plant abiotic stress responses. Curr. Sci. 80: 206-216.
- Guerfel M, Baccouri O, Boujnah D, Cha W, Zarrouk M (2008) Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Scientia Horticulturae 1: 1-7.
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, Von Korff M, Varshney R K, Graner A, Valkoun J (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. J. Exp. Bot. 60: 3531-3544.
- Heath RL, Parker L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 125: 189-198.
- Helal RM, Samir MA (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Aust. J. Crop Sci. 1: 31-36.
- Hussain SS (2006) Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. In: Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 43: 189-210.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int. J. Agric. Biol. 11: 100-105.
- Kume S, Kobayashi F, Ishibashi M, Ohno R, Nakamura C, Takumi S (2005) Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Leagenes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. Genes Genet. Syst. 80: 185-197.
- Kuper PJC (1998) Adaptation mechanisms of green plants to environmental stress: The role of plant sterols and the phosphatidyl linolenoyl cascade in the functioning of plants and the response of plants to global climate change. In: Csermely P(ed) Stress of Life: From Molecules to Man, New York, 851: 209-215.
- Malhotra RS, Saxena MC (2002) Strategies for overcoming drought stress in chickpea, ICARDA caravan 17: 20-22.
- Mantri NL, Ford R, Coram TE, Pang ECK (2007) Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. BMC Genomics 8: 303-316.
- Marjani A, Farsi M, Majidi Hervan E, Ganjeali A (2014) Comparative analysis of *LEA* and *Dehydrin* genes in response to drought stress in chickpea phenological different stages. Int. J. Biosci. 4(4): 49-57.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-681.
- Najaphy A, Khamssi NN, Mostafaie A, Mirzaee H (2010) Effect of progressive water deficit stress on

- proline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 7033-7036.
- Premachandra G, Saneoka H, Ogata S (1990) Cell membrane stability, an indicator of drought tolerance, as affected by applied nitrogen in soybean. *J. Agric. Sci.*, 115: 63-66.
- Rodriguez EM, Svensson JT, Maatrasi M, Choi DW, Close TJ (2005) Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor. Appl. Genet.* 110: 852- 858.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279-292.
- Terzi R., Kadioglu A. (2006). Drought stress tolerance and the antioxidant enzyme system. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 89-96.
- Webb MS, Gilmour SJ, Thomashow MF, Steponkus PL (1996) Effects of COR6.6 and COR15am polypeptides encoded by COR (Cold- Regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on dehydration-induced phase transitions of phospholipid membranes. *Plant Physiol.* 111: 301-312.
- Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Sci.* 9: 13-17.