تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد چهاردهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۰
۱-۱۲
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2019.2669.1693

مقاله پژوهشی

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان توتون تراریخت *AtEXPA1* به تنش خشکی

عباس نامنی[۱]، علیرضا عباسی[۲*]، منیژه سبکدست[۳]
۱. دانشجوی سابق و فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات دانشگاه تهران
۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۱۰

چکیده

تنش خشکی یکی از مخرب‌ترین تنش‌های غیرزنده محسوب می‌شود. اکسپنسین‌ها پروتئین‌های بسط دهنده دیواره سلولی هستند که قادرند دیواره سلولی را تحت روشی که وابسته به pH است، گسترش دهند. در این مطالعه نسل دوم (T2) گیاهان توتون تراریخت شده با ژن *AtEXPA1* در سه لاین تراریخته ۲، ۴ و ۷ و رقم تجاری سامسون به‌عنوان شاهد از نظر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت تنش خشکی بررسی شدند. تنش خشکی باعث کاهش صفات محتوای نسبی آب برگ (RWCL) و میزان کلروفیل برگ و همچنین افزایش صفات شاخص هدایت الکتریکی برگ (ELIL)، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ (MDAL) و میزان پرولین برگ شد. با اعمال تنش و افزایش سطوح تنشی، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPOX)، آسکوربات پراکسیداز (APOX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) در برگ افزایش یافت. در این مطالعه بر اساس صفات بیوشیمیایی، لاین ۲ و ۷ و بر اساس صفات فیزیولوژیکی، لاین ۴ در مقایسه با رقم شاهد توانسته‌اند با تنش مقابله کنند و نسبت به تنش خشکی رقم متحمل محسوب شوند.

واژه‌های کلیدی:* اکسپنسین، بسط دیواره سلولی، تنش خشکی، گیاهان تراریخت، *AtEXPA1

مقدمه

خشکی یکی از محدودیت‌های عمده در بهره‌وری کشاورزی در سراسر جهان محسوب می‌شود. برای مقابله با تنش خشکی لازم است تعدادی از سازوکارها و استراتژی‌های کاهش خطر مورداستفاده قرار بگیرد (Vurukonda et al., 2016; Chen et al., 2016). تنش خشکی به علت اینکه دسترسی محدود به آب بر صفات فیزیولوژیکی و فرآیندهای بیوشیمیایی که بر رشد و عملکرد گیاه تأثیر بسزایی دارند، اثر منفی می‌گذارد، مانع تولید محصول در گیاهان می‌شود (Kaushal and Wani., 2016; Hussain et al., 2018).

گیاهان برای مقابله با اثرات شدید تنش خشکی تغییرات خاصی در الگوهای رشد و فرایند فیزیولوژیکی دنبال می‌کنند (Fahad et al., 2017; Du et al., 2018). در سطح سلولی، گیاهان انواع پاسخ‌های مربوط به فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی خود را برای غلبه بر تنش نشان می‌دهند (Das et al., 2016; Hussain et al., 2018; Fahad et al., 2017). کمبود آب سبب کاهش پتانسیل آب و از دست دادن آماس سلولی، بسته شدن روزنه‌ها و اختلال در یکپارچگی غشا و ضعیف شدن پروتئین می‌شود. بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به کمبود آب موجب کاهش میزان فتوسنتز و کل محتوای کلروفیل گیاه می‌شود زیرا وضعیت آب گیاه در حد بسیار پایینی قرار دارد و این باعث می‌شود که تنش اسمزی را تحریک کند و منجر به تخریب کلروفیل‌ها و رنگدانه‌های فتوسنتزی و غشاهای تیلاکوئیدی برگ از طریق فوتوکسید شدن می‌شود و همچنین مانع رشد سلول‌ها نیز می‌شود

* نگارنده پاسخگو: علیرضا عباسی. پست الکترونیک: rezabbasi@ut.ac.ir

Kaushal and Wani, 2016; Fahad et al., 2017;) (Singh et al., 2018; Basu et al., 2016). تنش خشکی همچنین باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود (Hussain et al., 2018; Fahad et al., 2017; Vurukonda et al., 2016). به‌منظور مقابله با تنش اکسیداتیو، گیاهان معمولاً به دفاع آنتی‌اکسیدانی تکیه می‌کنند که از مهم‌ترین آنزیم‌ها در سیستم دفاع آنزیمی می‌توان به کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APOX) اشاره کرد (Fahad et al., 2017; Kaushal and Wani, 2016).

اکسپنسین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های سست کننده دیواره سلولی شناخته می‌شوند که وابسته به pH هستند و متناظر با گسترش دیواره سلولی رشد می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد اکسپنسین‌های شناخته‌شده باعث اختلال در پیوندهای غیر کوالانی بین میکرو فیبرهای سلولز و ماتریکس گلوکان که به میکرو فیبرها چسبیده است، می‌شوند (Wei et al., 2011a, b; Zhang et al., 2011; Wang et al., 2013; Cosgrove, 2015; Chen et al., 2017).

اولین گام ضروری در باز شدن روزنه‌ها، فعال شدن پمپ ATPase (H^+–ATPase) در غشای پلاسمایی است. عمل پمپ منجر به تجمع H^+ در خارج از سلول می‌شود و در داخل سلول پتانسیل الکتریکی منفی افزایش می‌یابد و همچنین جذب پتاسیم از طریق کانال‌های پتاسیم موجود در غشای پلاسمایی صورت می‌گیرد. عملکرد اصلی پمپ H^+ در غشای پلاسمایی ایجاد یک گرادیان الکتروشیمیایی است که نتیجه آن اسیدی شدن دیواره سلولی سلول‌های محافظ روزنه است که منجر به باز شدن روزنه می‌شود. مکانیسم احتمالی برای این اثر به این شرح است که زمانی که روزنه‌ها در حالت استراحت هستند، اکسپنسین‌ها در حالت غیرفعال قرار دارند. سیگنال‌های باز شدن روزنه باعث اسیدیته شدن دیواره سلولی و درنهایت منجر به فعال شدن اکسپنسین‌ها در دیواره سلولی می‌شود. سپس، اکسپنسین‌ها بر روی میکروفیبرهای سلولز حرکت و هیدروژن بین همی‌سلولز و سطح میکروفیبرهای سلولز را جدا می‌کنند و موجب تضعیف پلیمرهای دیواره سلولی تحت افزایش فشار turgor سلولی می‌شوند. سپس سلول محافظ متورم و روزنه باز می‌شود (Wei et al., 2011b).

گزارش شده است که اکسپنسین‌ها نقش مهمی در رشد سلول‌های گیاهی، رسیدن میوه، ظهور ریشه موئینه و سایر فرایندهای رشدی که در آن موجب سست شدن دیواره سلولی می‌شود، ایفا می‌کنند. تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش شدید در میزان فتوسنتز و تعرق گیاه تحت تنش خشکی، تنظیم اکسپنسین‌ها در رابطه با حساسیت روزنه برای تغییر مقاومت گیاهان به خشکی را پیشنهاد می‌کند. در مقایسه با اثر آنزیم‌های دیواره سلولی، تخریب ساختار دیواره سلولی ناشی از اکسپنسین‌ها به حداقل می‌رسد (Gao and Lu., 2010; Wei et al., 2011b; Seader et al., 2016; Chen et al., 2017).

ژن *AtEXPA1* به‌عنوان یکی از ۳۸ ژن اکسپنسین در گیاه آرابیدوپسیس است که به‌طور خاص در سلول‌های محافظ روزنه فعالیت دارد باز شدن روزنه به‌واسطه بیان بیش‌ازحد ژن *AtEXPA1* در گیاهان تراریخته تحت کنترل پروموتر S35 تسریع می‌شود. گزارش شده است که ژن *AtEXPA1* نقش قابل‌توجهی در گسترش سلول‌های محافظ روزنه با تنظیم حرکت روزنه دارد (Gao and Lu., 2010; Wei et al., 2011b). همچنین تحقیقات نشان داده است که ژن *AtEXPA1* در تنظیم رشد گیاه تأثیر دارد. (Gao and Lu, 2010). بیان بیش‌ازحد ژن *PpEXP1* در گیاهان توتون تراریخته تحت استرس گرمائی گزارش شده است. گیاهان توتون تراریخته دارای نشت الکترولیتی پایین‌تر، سطوح پایین‌تر پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و مقدار کمتری پراکسید هیدروژن بود. از سوی دیگر، توتون‌های تراریخته دارای محتوای کلروفیل بالاتر، نرخ فتوسنتز خالص بالاتر، محتوای نسبی آب بالاتر، فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان جوانه‌زنی بالاتر در مقایسه با گیاهان وحشی بودند (Xu et al., 2014). در مطالعه قبلی، برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی نسل اول (T1) گیاهان توتون تراریخت شده با ژن *AtEXPA1* تحت تنش اسمزی بررسی گردید (Shirazi et al., 2013). به‌این‌ترتیب اکسپنسین‌ها به‌عنوان یک گروه از پروتئین‌های دیواره سلولی شناخته شده‌اند که نقش مهمی در ایجاد تحمل به خشکی در گیاهان و همچنین نقشی اساسی در کنترل رشد سلول و درنتیجه رشد گیاه ایفا می‌کند و تنظیم موفق رشد گیاه در شرایط تنشی تقریباً مهم‌ترین مباحث در زمینه مهندسی گیاهان متحمل به تنش محسوب می‌شود (Wei et al., 2011b; Marowa et al., 2016; Zhang et al., 2016). در این تحقیق سعی بر آن است که تأثیر ژن *AtEXPA1* بر

پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی توتون تراریخت نسل دوم تحت تنش خشکی موردمطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بذور نسل دوم (T2) گیاهان تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum* L.) رقم تجاری سامسون که توسط شیرازی و همکاران (Shirazi et al., 2013) با انتقال سازه pBI121:*AtEXPA1* تراریخت شده‌بودند، مورداستفاده قرار گرفت. بذرهای گیاه توتون غیر تراریخت به‌عنوان شاهد و سه لاین ۲، ۴ و ۷ حاوی ژن *AtEXPA1* به‌عنوان تراریخت مورد آزمایش قرار گرفتند. بعد از کشت در محیط MS انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و پس از گذشت نزدیک به سه هفته و با مشخص شدن گیاهان تراریخت در محیط کشت انتخابی، گیاهچه‌های چهار برگی به گلدان‌های یک‌بارمصرف حاوی پیت ماس و با گذشت چهار هفته گیاهان به گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی خاک مزرعه انتقال داده‌شدند. گلدان‌ها نیز در گلخانه گروه زارعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با دمای ۲ ±۲۵ و روشنایی ۱۶ ساعت نگهداری شدند. بعد از اندازه‌گیری درصد ظرفیت مزرعه‌ای (FC) توسط دستگاه صفحه فشاری ساخت شرکت GBC کشور استرالیا و پس از گذشت دو هفته از استقرار گیاهان در گلخانه و مرحله هشت و نه برگی، تنش خشکی در چهار سطح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد FC خاک با چهار تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. اعمال تنش تا مشاهده شدن خسارت‌های فنوتیپی که به مدت ۱۴ روز به طول انجامید، ادامه داشت که بعد از اعمال تنش نمونه‌های برگی در روز پانزدهم بعد از تنش برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از گیاهان گرفته شد.

محتوای نسبی آب برگ (RWCL) و شاخص هدایت الکتریکی برگ (ELIL) و اندازه‌گیری محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ (MDAL)

جهت بررسی میزان محتوای نسبی آب از روش اسچونفیلد و همکاران (Schonfeld et al., 1998) و همچنین جهت اندازه‌گیری میزان شاخص هدایت الکتریکی (ELI) از روش استوارت (Stuart, 1939) استفاده شد. علاوه بر آن میزان پراکسیدسیون لیپیدهای غشایی نیز اندازه‌گیری شد (Qiu et al., 2014).

اندازه‌گیری میزان محتوای رنگیزه‌های کلروفیل برگ و شاخص‌های کلروفیل فلورسانس برگ

اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل بر مبنای روش لیچتنتالر و همکاران (Lichtenthaler et al., 2001) انجام شد. همچنین شاخص‌های فلورسانس حداکثر (Fm)، فلورسانس متغیر (Fv)، بیشترین کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) و شاخص عملکردی فتوسیستم II (PI) برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌فلورسانس ساخت شرکت Hansatech اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان محتوای پرولین برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

سنجش غلظت پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) انجام شد. برای تهیه با فر استخراج از روش پاگاریا و همکاران(Pagariya et al., 2012) استفاده شد. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC ۱ .۱۱ .۱ .۶) به روش پریرا و همکاران (Pereira, 2002)، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX, EC 7. 1. 11. 1) به روش بالستراس و همکاران (Balestrasse et al., 2001)، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APOX, EC 11. 1. 11. 1) به روش رانیری و همکاران (Ranieri et al., 2003) و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) به روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) در دمای ۲۵ درجه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت ژاپن اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها

پس از اندازه‌گیری و محاسبه صفات ذکرشده داده‌های به‌دست‌آمده تجزیه شدند. تجزیه واریانس بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش SNK در سطح احتمال ۵٪ به کمک نرم‌افزار R 3.6.0 انجام گرفت. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی صفات فیزیولوژیکی

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، تمام اثرات ساده و متقابل روی صفات فیزیولوژیکی موردمطالعه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۱).

محتوای نسبی آب برگ (RWCL)، شاخص هدایت الکتریکی برگ (ELIL)، میزان محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ (MDAL)

میزان RWCL گیاهان توتون با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافته است که بر این اساس در سطوح FC٪۲۵ و FC٪۵۰ خاک، Line 4 دارای بیشترین و رقم شاهد دارای کمترین میزان RWCL است (شکل ۱.A). همچنین در سطح FC٪۷۵ بیشترین میزان RWCL متعلق به Line 2 است. علاوه بر آن در سطح تنش شاهد بین لاین‌ها به جزء Line 7 که از مقدار کمتر RWCL برخوردار است، اختلاف آماری وجود نداشت.

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی گیاهان توتون تراریخته تحت تنش خشکی در سه لاین تراریخته به همراه رقم شاهد.

Table 1. Analysis of variance for physiological traits of transgenic tobacco plants under drought stress in four level and three transgenic lines with control cultivars.

SO.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	محتوای نسبی آب برگ RWCL	شاخص هدایت الکتریکی برگ ELIL	محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ MDAL	کلروفیل a Cha	کلروفیل a+کلروفیل b Cha+Chb
Drought (D)	**خشکی**	3	7778**	6989**	17.9**	720**	1788**
Line (L)	**لاین**	3	533**	228**	1.5**	9.8**	28.1**
D ×L	**خشکی ×لاین**	9	203**	70**	0.6**	6.3**	45.5**
Error	**خطای آزمایشی**	48	1.6	2.8	0.05	0.6	1.14
CV (%)	**ضریب تغییرات**	-	*2.1*	*2.7*	*6.1*	*4.6*	*3.4*

Table 1. Continued **جدول ۱. ادامه**

SO.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	فلورسانس حداکثر Fm	فلورسانس متغیر Fv	شاخص عملکرد فتوسیستم II PI	حداکثر عملکرد کوانتومی Fm/Fv	پرولین Proline
Drought (D)	**خشکی**	3	848278**	836686**	20.45**	0.038**	28.3**
Line (L)	**لاین**	3	280229**	317252**	2.98**	0.026**	3.6**
D ×L	**خشکی ×لاین**	9	17351**	18043**	0.37**	0.011**	1.2**
Error	**خطای آزمایشی**	48	25.34	3093	0.055	0.00083	0.03
CV (%)	**ضریب تغییرات**	-	4.5	6.3	14.5	3.7	5.4

نام صفات به ترتیب از چپ به راست: محتوای آب نسبی برگ، شاخص هدایت الکتریکی برگ، میزان محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ، محتوای کلروفیل a، مجموع کلروفیل a و b، شاخص فلورسانس حداکثر، شاخص فلورسانس متغیر، شاخص عملکرد فتوسیستم II، بیشترین کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II و میزان محتوای پرولین برگ.

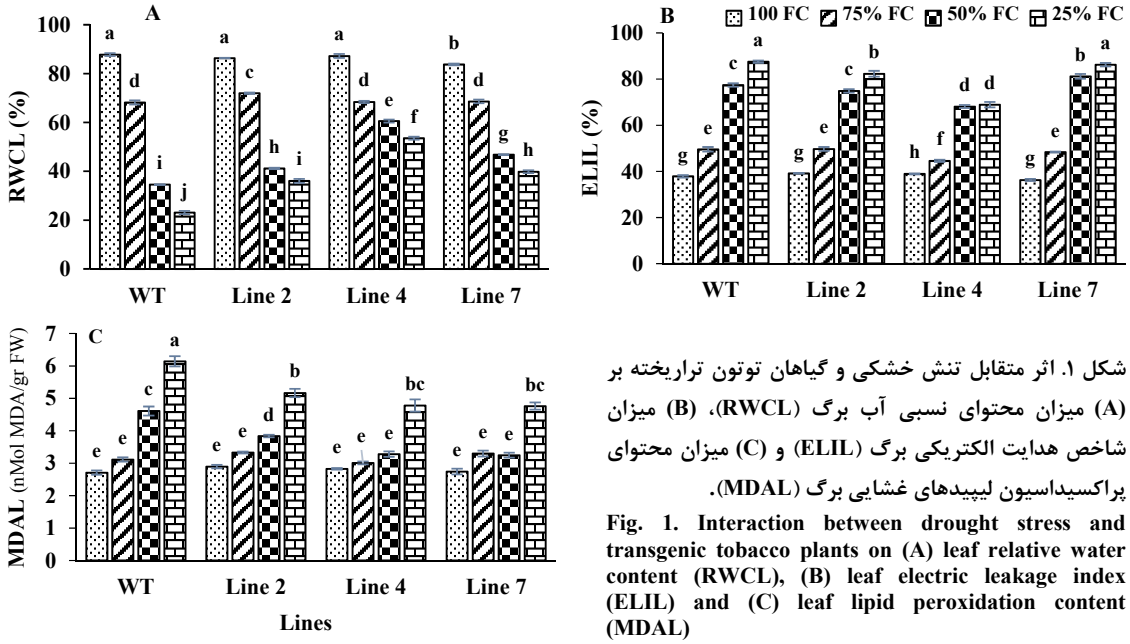
**: سطح معنی‌داری در یک درصد.

Left-to-right traits: Relative Water Content of Leaf, Electrical Leakage Index of Leaf, Malondialdehyde of Leaf of Leaf, chlorophyll content a, chlorophyll a and b, Maximum fluorescence index, Variable fluorescence index, Overall performance index of PSII photochemistry, Maximum photochemical efficiency of PSII and proline content of Leaf.

**: Significance P= 0.01

در رابطه با میزان ELIL تحت تنش خشکی باید گفت که با افزایش سطح تنش خشکی میزان ELI افزایش یافته است. بااین‌وجود بر طبق مقایسات میانگین اثرات متقابل سطوح تنش و گیاهان توتون تراریخته در Line 4 سطوح FC٪۲۵ و FC٪۵۰ خاک در مقایسه با سایر ترکیبات تیماری کمترین میزان ELIL مشاهده شد و در Line 7 و رقم شاهد بیشترین میزان ELIL مشاهده گردید (شکل ۱.B).

تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از میزان MDAL نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش، میزان MDAL افزایش یافته است که بر اساس آن، Line 4 و Line 7 در سطح تنش FC٪۲۵ نسبت Line 2 و رقم شاهد میزان MDAL کمتری دارند. همچنین بیشترین میزان MDAL در سطح تنش FC٪۲۵ و در رقم شاهد مشاهده شد (شکل ۱. C).



شکل ۱. اثر متقابل تنش خشکی و گیاهان توتون تراریخته بر (A) میزان محتوای نسبی آب برگ (RWCL)، (B) میزان شاخص هدایت الکتریکی برگ (ELIL) و (C) میزان محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی برگ (MDAL).

Fig. 1. Interaction between drought stress and transgenic tobacco plants on (A) leaf relative water content (RWCL), (B) leaf electric leakage index (ELIL) and (C) leaf lipid peroxidation content (MDAL)

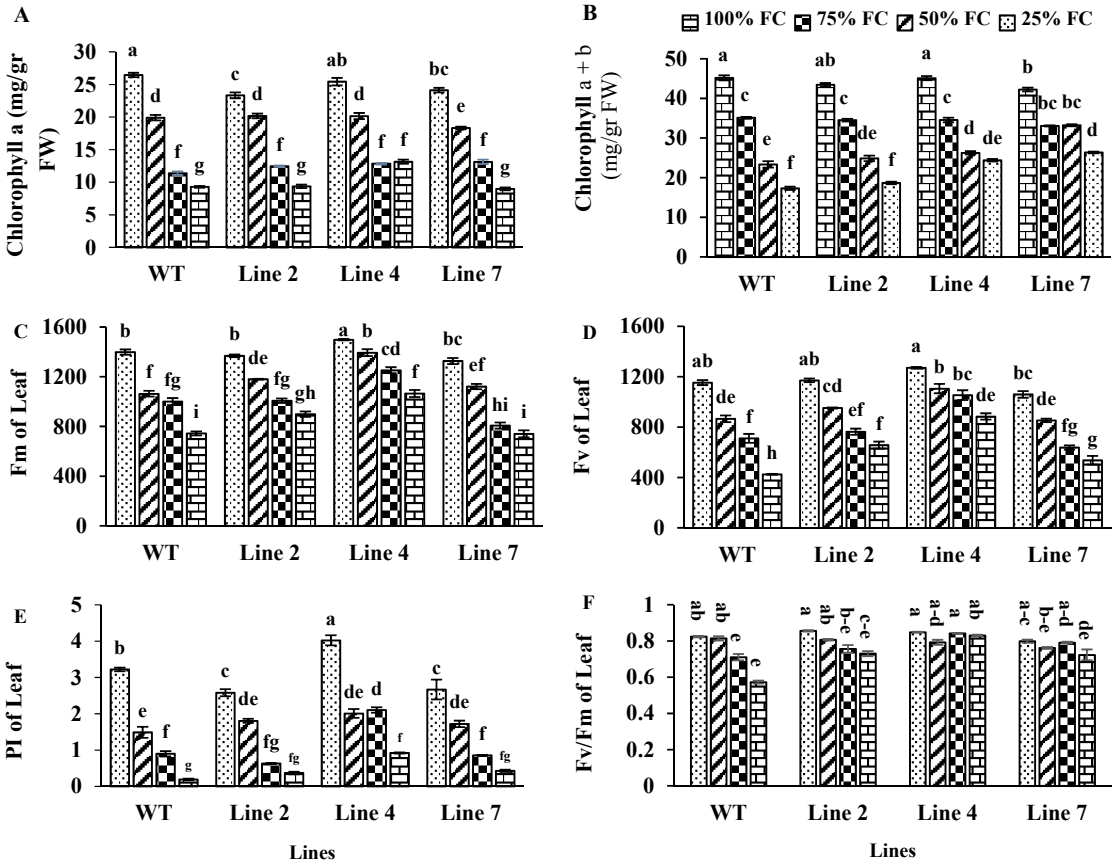
تنش خشکی باعث کم شدن آب سلولی می‌شود که تنش اسمزی را تحریک می‌کند (Kaushal and Wani., 2016). تنش خشکی بر گیاهان تأثیر منفی ازجمله کاهش محتوای آب برگ، دارد (Ali et al., 2017). سلول تحت تنش، پایداری غشای خود را از دست می‌دهد و در صورت قرار گرفتن در یک محیط آبی مواد محلول را به بیرون تراوش می‌کند (Bajji et al., 2002). کمتر بودن میزان شاخص هدایت الکتریکی به معنی انسجام بیشتر غشاء سلولی در شرایط تحت تنش است و ارقام با میزان کمتر هدایت الکتریکی به‌عنوان ارقام متحمل محسوب می‌شوند. در حقیقت میزان خسارت غشایی به‌صورت غیرمستقیم از طریق اندازه‌گیری نشت یونی در لاین‌ها محاسبه می‌گردد (Sudhakar et al., 2001). در پاسخ به ROSها، محتوای بالایی از مالون دی آلدئید گزارش شده است که یک شاخص خالص از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی محسوب می‌شود (Fahad et al., 2017). محتوای ظرفیت نسبی آب گیاهان توتون تراریخته با ژن *TaEXPA2* تحت تنش شوری در مقایسه با گیاه شاهد بهبود یافته‌بود که از دلایل آن می‌توان به تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین اشاره کرد (Chen et al., 2017). گیاهان توتون تراریخته با ژن *PpEXP1* تحت تنش گرمایی دارای نشت الکترولیتی پایین‌تر، سطوح پایین‌تر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و محتوای نسبی آب بالاتر، در مقایسه با گیاهان وحشی بودند (Xu et al., 2014). نتایج تحقیقات نشان داد که توتون تراریخته شده با ژن *TaEXPB23* میزان MDA پایین‌تری را در گیاهان تراریخته نسبت به نوع وحشی (WT) تحت تنش دارند (Han et al. 2015). با توجه به اینکه گیاهان تراریخته شده با ژن *AtEXPA1* تحت تنش اسمزی قرار گرفتند، می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین‌های کد کننده این ژن تا حدودی موجب افزایش انعطاف‌پذیری دیواره می‌شوند که رشد بیشتر دیواره سلولی را در پی دارد و بر این اساس گیاه تحت تنش می‌تواند آب بیشتری جذب کرده و محتوای نسبی آب خود را بالا ببرد. از طرف دیگر به خاطر انعطاف‌پذیری بیشتر و کشیده شدن بیشتر از حد دیواره، بسته به ژنوتیپ سطوح متفاوتی از تخریب دیواره مشاهده شد (شکل B .۱).

میزان محتوای کلروفیل برگ و شاخص‌های کلروفیل- فلورسانس Fm، Fv، Fv/Fm و PI

نتایج تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از محتوای کلروفیل برگ تحت تنش خشکی نشان داد که میزان محتوای کلروفیل a با اعمال تنش خشکی و افزایش سطح تنش، کاهش می‌یابد (شکل A.۲). بر طبق این داده‌ها بیشترین میزان محتوای کلروفیل a در سطح FC٪۱۰۰ در رقم شاهد و Line 4 و کمترین میزان در سطح FC٪۲۵ در رقم شاهد، Line 2 و

Line 7 مشاهده شد. در سطح FC٪۲۵ بیشترین میزان محتوای کلروفیل a متعلق به Line 4 است. علاوه بر آن میزان مجموع کلروفیل a و b با اعمال تنش خشکی و افزایش سطح تنش، کاهش یافت که دراین‌ارتباط Line 4 و Line 7 در سطح FC٪۲۵ دارای بیشترین میزان محتوای مجموع کلروفیل a و b است (شکلB . ۲).

همچنین بررسی‌های سه شاخص مهم و کلیدی Fv، Fm و PI نشان داد که این شاخص‌ها تحت تنش خشکی کاهش می‌یابند. شاخص PI که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کلروفیل فلورسانس است نشان داد که Line 4 در سطوح تنشی شدید توانسته است عملکرد فتوسیستم II خود را نسبت به دیگر لاین‌ها افزایش دهد (شکل ۲.E). به‌طورکلی و با توجه به نمودارهای مقایسه میانگین این شاخص‌ها می‌توان گفت که Line 4 تحت تنش خشکی توانسته است میزان این شاخص‌ها را در سطح بالاتری نگه دارد (شکل ۲. C، D و E). همچنین نسبت Fv/Fm نشان داد که تغییرات قابل‌توجهی در لاین‌های تراریخته به وجود نیامده است ولی در رقم شاهد این تغییرات کاهشی بوده و کاملاً مشهود است (شکل ۲.F).



شکل ۲. اثر متقابل تنش خشکی و گیاهان توتون تراریخته بر میزان محتوای کلروفیل a برگ (A)، مجموع کلروفیل a و b برگ (B)، شاخص Fm (C)، شاخص Fv (D)، شاخص PI (E) و شاخص Fv/Fm (F)

Fig. 2. Interaction between drought stress and transgenic tobacco plants on: of leaf chlorophyll a content (A), total chlorophyll a and b (B), Fm index (C) Fv index (D) PI index (E) and Fv/Fm index (F)

میزان محتوای کلروفیل که نشانه فوتوکسید شدن است، تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد (Vurukonda et al., 2016; Basu et al., 2016). همچنین بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به کمبود آب موجب کاهش میزان فتوسنتز گیاه می‌شود (Kaushal and Wani, 2016). تحت تنش خشکی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند میزان فتوسنتز خالص و کل محتوای کلروفیل، کاهش می‌یابد زیرا وضعیت آب گیاه در حد بسیار پایین قرار دارد (Singh et al., 2018). تنش خشکی به رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و غشاهای تیلاکوئیدی آسیب می‌زند. همچنین محتویات کلروفیل در شرایط تنش

خشکی کاهش می‌یابد (Fahad et al., 2017). آرابیدوپسیس تشدید بیان شده با ژن *RhEXPA4* نشان داد که ریشه‌های جانبی و محتوای کلروفیل برگ بعد از تنش شوری افزایش یافته است (Lü et al., 2013). بیان بیش‌ازحد ژن *PpEXP1* در گیاهان توتون تراریخته تحت استرس گرمائی میزان محتوای کلروفیل بالاتر و نرخ فتوسنتز خالص بالاتری نسب به گیاهان شاهد نشان دادند (Xu et al,. 2014). لاین‌های تراریخته که در این مطالعه استفاده شده است علاوه بر ژن *AtEXPA1* که به توتون وارد شده است خود گیاه توتون نیز دارای ژن اکسپنسین است پس می‌توان این نتیجه را گرفت که میزان اکسپنسین در گیاهان تراریخته بیشتر از شاهد بوده و بدین ترتیب در لاین‌های تراریخته تحت تنش، تقسیم سلولی کمتر تحت تأثیر تنش قرارگرفته‌اند و بر این اساس با رشد و تقسیم سلولی دیگر اندامک‌های سلول ازجمله کلروپلاست نیز تکثیر می‌شوند؛ همچنین بر اساس تحقیقات صورت گرفته که نشان می‌دهد تنش خشکی هر دو فتوسیستم دستگاه فتوسنتزی را خسارت می‌زند و محتوای کلروفیل را کاهش می‌دهد (Chen et al., 2016). می‌توان این‌گونه استنباط کرد که گرچه تنش خشکی باعث آسیب به سیستم فتوسنتزی گیاه می‌شود ولی در لاین‌های تراریخته این مطالعه به علت تأثیر محدود تنش خشکی بر تقسیم و رشد سلول‌ها و به دنباله آن میزان کل کلروپلاست در برگ گیاه خسارت کمتری نسبت به گیاه شاهد داشته است که باعث بالا نگه‌داشتن میزان محتوای کلروفیل برگ در گیاهان تراریخته نسبت به گیاه شاهد می‌شود. توانایی حفظ عملکرد سیستم فتوسنتزی گیاه تحت تنش خشکی و شوری و تحمل به آن اهمیت زیادی دارد. شناخت روابط پیچیده بین کلروفیل فلورسانس و سیستم فتوسنتزی درک ما را از فرایندهای بیوفیزیکی فتوسنتز بالا می‌برد که از مهم‌ترین این شاخص‌ها می‌توان به نسبت Fv/Fm (حداکثر راندمان فتوشیمیایی)، PI (شاخص عملکردی کل فتوسیستم II) اشاره کرد (Kalaji et al., 2014; Czyczyło-Mysza et al., 2013). تجزیه‌وتحلیل کلروفیل فلورسانس یکی از قوی‌ترین تکنیک‌های فیزیولوژی و اکوفیزیولوژی در گیاهان است که به‌طور گسترده از آن استفاده می‌کنند. با اندازه‌گیری کلروفیل فلورسانس، اطلاعاتی در مورد تغییرات کارایی فتوسنتز و اتلاف گرما می‌توان به دست آورد (Athar et al., 2015). لطفی و همکاران (Lotfi et al., 2015) با بررسی اثر تنش خشکی بر روی کلزا نشان دادند که با اعمال تنش خشکی میزان شاخص Fv/Fm کاهش پیدا می‌کند که این کاهش نشان‌دهنده کارایی پایین فتوسیستم دو تحت تأثیر تنش خشکی است. در مطالعه‌ای که روی چغندرقند صورت گرفته است نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش نسبت Fv/Fm در طی دوره اولیه تنش خشکی شده است که نشان‌دهنده آن است که گیاه تحت تنش خشکی آسیب کمی می‌بیند و به‌طورجدی از اعمال تنش خشکی رنج نمی‌برند (Li et al., 2013).

بررسی صفات بیوشیمیایی

در این بخش با توجه به حجم بالای نمونه‌ها، ادامه آزمایش در دو سطح خشکی ۵۰ و ۱۰۰ ظرفیت مزرعه‌ای انجام گرفت. بر طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش‌های صفات بیوشیمیایی نشان داده شد که تمام اثرات ساده به جزء اثر ساده لاین در صفت فعالیت آنزیم CAT که معنی‌دار نشده بود در سطح احتمال ۱٪ ازنظر آماری معنی‌دار شده است. همچنین اثرات متقابل سطح خشکی و لاین‌ها به جزء صفت فعالیت آنزیم APOX که در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود، در سطح احتمال ۱٪ ازلحاظ آماری معنی‌دار شدند (جدول ۲).

میزان محتوای پرولین برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

داده‌های حاصل از سنجش میزان پرولین برگ نشان داد که با اعمال تنش خشکی میزان پرولین افزایش می‌یابد (شکل ۳.A). با توجه به نمودار مربوط به میزان پرولین می‌توان نتیجه گرفت که رقم شاهد میزان پرولین بیشتری را در برگ‌ها خود تولید کرده است که بر اساس آن بیشترین میزان پرولین برگ در سطح FC٪۲۵ خاک در رقم شاهد مشاهده می‌شود. در رابطه با میزان پرولین برگ در لاین‌های تراریخته، نتایج نشان می‌دهد که لاین‌های تراریخته نسبت به رقم شاهد نتوانسته‌اند از پرولین برای مقابله با تنش خشکی استفاده زیادی کنند.

در رابطه با تجزیه‌وتحلیل داده‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، نتایج نشان می‌دهد که در سطح تنشی FC٪۵۰ و سطح شاهد، با افزایش سطح خشکی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. بر این اساس، میزان فعالیت آنزیم CAT در سطح شاهد در تمام لاین‌ها یکسان ولی در سطح تنش، Line 7 بیشترین میزان

فعالیت این آنزیم را نشان می‌دهد (شکل ۳.A). همچنین میزان فعالیت آنزیم GPOX نشان داد که Line 2 و Line 4 ازنظر میانگین عددی بیشترین فعالیت در سطح شاهد و Line 7 و Line 2 بیشترین فعالیت در سطح تنش را دارا می‌باشند (شکل ۳.B). بیشترین میزان فعالیت آنزیم APOX در سطح FC٪۵۰ در هر سه لاین تراریخته مشاهده شد (شکل ۳.C). در سطح شاهد، فعالیت آنزیم PPO در تمام گیاهان اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی در سطح تنشی Line 4 توانسته است میزان این فعالیت را افزایش دهد (شکل ۳.D).

سنتز پرولین منجر به تنظیم اسمزی، تخریب رادیکال آزاد و تثبیت ساختارهای سلولی در سلول‌های گیاهی می‌شود. گزارش شده است که افزایش سطح پرولین باعث تنش خشکی در گیاهان می‌شود (Kaushal and Wani., 2016). تجمع پرولین منجر به افزایش اسمولیته سلول می‌شود که سلول را به نفوذ آب یا کاهش پخش آب تحریک می‌کند که فشار لازم برای وسعت سلولی را فراهم می‌کند، درنتیجه تحت تنش اسمزی یکپارچگی غشا برای جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها حفظ می‌شود (Chen Li, 2007). در این تحقیق، گیاهان توتون تراریخته به‌خوبی نتوانستند از تجمع پرولین برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از تنش خشکی استفاده کنند و در مقابل فقط رقم شاهد از این منظر موفق بوده است.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی گیاهان توتون تراریخته تحت تنش خشکی در سه لاین تراریخته به همراه رقم شاهد.
Table 2. Analysis of variance for biochemical traits of transgenic tobacco plants under drought stress in four level and three transgenic lines with control cultivars.

SO.V	منابع تغییر	df	CAT	GPOX	APOX	PPO
Drought (D)	**خشکی**	1	2361.9**	0.31**	0.03**	0.00013**
Line (L)	**لاین**	3	90.61^{ns}	0.01**	0.009**	0.00002**
D ×L	**خشکی ×لاین**	3	159.10**	0.011**	0.002*	0.000018**
Error	**خطای آزمایشی**	24	32.30	0.00052	0.0006	0.000001
CV (%)	**ضریب تغییرات**	-	*9.097*	*8.907*	*12.287*	*8.321*

نام صفات از چپ به راست: فعالیت آنزیم کاتالاز، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز.

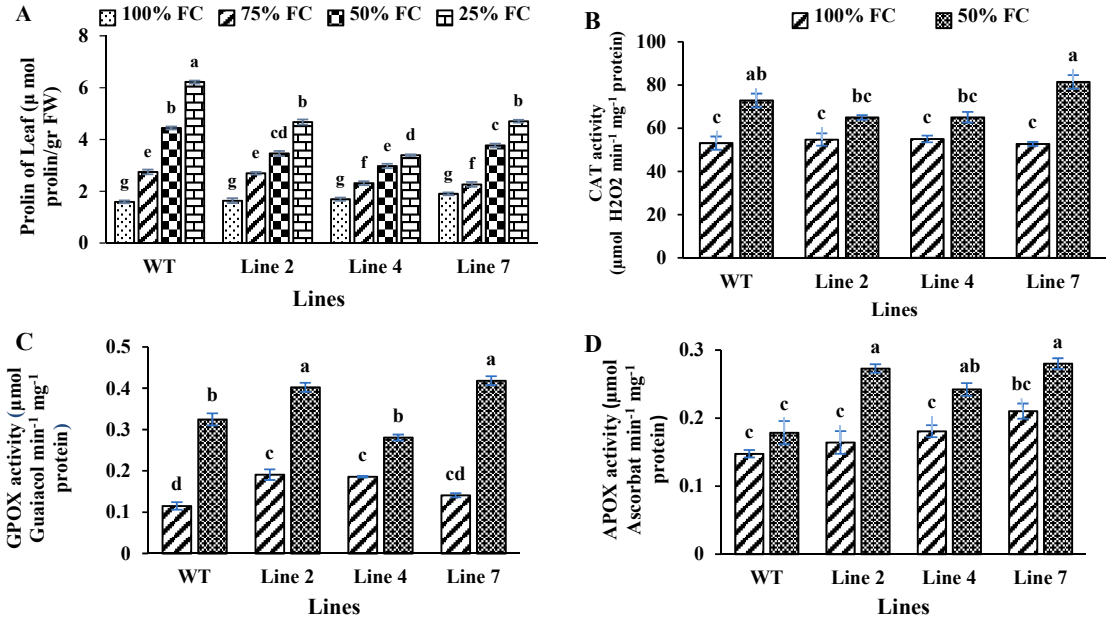
ns، * و **: به ترتیب عدم‌معنی‌داری ٪ و معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد.

Left-to-right traits: Left-to-right attributes: catalase activity, guaiacol peroxidase activity, ascorbate peroxidase activity and polyphenoloxidase activity.

Ns, * and**: represent Non-significance and at a probability level of 5% and 1%, respectively

تنش‌های غیرزنده، مانند خشکی، سرما و شوری، منجر به تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شوند که بسیار واکنش‌پذیر و سمی هستند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT) نقش مهمی در پاسخ به تنش دارند (Han et al. 2015). نکته قابل‌توجه این است که تولید ROSها تحت شرایط تنش، بستگی به‌شدت و مدت‌زمان تنش، گونه گیاهی، ژنوتیپ و همچنین مرحله رشدی گیاه دارد؛ بنابراین تفاوت در نتایج محققین قابل توجیه است (Chaitanya et al., 2002). گیاهان برای از بین بردن ROSها و کاهش آسیب ناشی از تنش اکسیداتیوی از سیستم دفاعی خود که از دو جزء آنزیمی و غیر آنزیمی تشکیل شده است، استفاده می‌کنند. فعالیت‌های بالا آنزیم‌های آنتی-اکسیدان با تحمل به تنش اکسیداتیو در گیاه ارتباط دارد. (Kaushal and Wani., 2016). سطوح فعالیت بالاتر آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در کاهش تجمع ROS نقش داشتند و ممکن است به تعدیل برخی ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های آنتی-اکسیدان مربوط باشد (Chen et al., 2017). نتایج محققان نشان داد که بیان بیش‌ازحد ژن *TaEXPB23* در توتون تحت تنش اکسیداتیو اثر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Han et al. 2015). گیاهان توتون تراریخته شده با ژن *PpEXP1* دارای فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهان وحشی داشتند (Xu et al., 2014). میزان بیان ژن‌های GPOX در گیاهان زیادی مطالعه‌شده‌است که نتایج نشان می‌دهد میزان رونوشت این ژن‌ها در تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش می‌یابد (Hebette et al., 2007). فعالیت بالای آنزیم‌های پراکسیداز باعث

کاهش آسیب‌های سلولی در شرایط تنش اکسیداتیو شده و می‌توانند به‌عنوان یک مکانیسم حفاظتی مؤثر در برابر تنش در نظر گرفته شود (Rostami and Rahemi, 2013). آنزیم PPO می‌تواند تجمع فنل‌ها را تحت تنش خشکی کاهش دهد و احتمالاً گیاهان با فعالیت PPO بالا متحمل به خشکی می‌باشند (Agarwal and Pandey., 2004).



شکل ۳. اثر متقابل تنش خشکی و گیاهان توتون تراریخته میزان محتوای پرولین برگ (A)، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (B)، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX) (C)، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APOX) (D) و میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) (E).

Fig. 3. Interaction between drought stress and transgenic tobacco plants on: catalase prolin of leaf (A), catalase activity (CAT) (B) guaiacol peroxidase activity (GPOX) (C), ascorbate peroxidase activity (APOX) (D) and polyphenol oxidase activity (PPO) (E).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از داده‌های مربوط به صفات RWCL، ELIL و MDAL نشان داد که گیاهان تراریخته وضعیت بهتری در مقایسه با رقم شاهد داشتند؛ به‌طوری‌که لاین ۴ و لاین ۲ در هر سه صفت از برتری خوبی برخوردار بودند و لاین ۷ به جزء در صفت MDAL تقریباً مشابه رقم شاهد رفتار کرده است. علاوه بر این تحت تنش خشکی میزان محتوای کلروفیل a و مجموع کلروفیل a و b کاهش یافت که در لاین‌های تراریخته در مقایسه با رقم شاهد میزان بالاتری نشان دادند. بین لاین‌های تراریخته، Line 4 از وضعیت بهتری برخوردار بود و توانسته بود پایداری کلروفیل برگ خود را در سطح بالایی نگه دارد. همچنین داده‌های حاصل از نتایج شاخص‌های کلروفیل فلورسانس نشان داد که لاین تراریخته تحت تنش از وضعیت بهتری نسبت به رقم شاهد برخوردارند و در بین لاین‌های تراریخته Line 4 رفتاری مشابه با رقم‌های متحمل به تنش خشکی نشان داده است.

بر اساس داده‌های اثرات متقابل گیاهان تراریخته و سطوح تنش، مطالعات ما نشان داد که گیاهان توتون تراریخت شده با ژن *AtEXPA1* تحت تنش خشکی توانسته‌اند به‌خوبی از

سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی خود برای مقابله با رادیکال-های آزاد استفاده کرده‌اند و انتقال ژن *AtEXPA1* بر روی فعالیت این آنزیم اثر مثبت داشته است.

بر طبق تجزیه‌وتحلیل صفات اندازه‌گیری شده در این مطالعه نتیجه گرفتیم که اکسپنسین‌ها نقش کلیدی در تحمل گیاه به تنش خشکی از طریق سست کردن دیواره سلولی که علت آن حذف ارتباطات هیدروژنی بین هموسلولز و میکرو فیبرهای سلولزهای دیواره سلولی است، دارا است. این فرایند باعث انعطاف‌پذیر شدن دیواره سلولی می‌شود که نتیجه آن کاهش خسارت‌های تنش خشکی از طریق افزایش آماس سلولی، حفظ آب درون سلول، کاهش خسارت به دستگاه فتوسنتزی گیاه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و تحمل شدید به تنش خشکی است.

سپاسگزاری

در آخر بر خود واجب می‌دانم از تمامی افراد ازجمله پدر و مادرم و خانواده عزیزم و همچنین از دوستان عزیزم آقای مهندس محسن رحیمی، خانم مهندس الهام ودودپرست و خانم مهندس هانیه حصارکی و همچنین مهندس مجتبی زمانی، مهندس حمید بهشتی، مهندس جمشید مرادی، مهندس سید امین کاظمی، مهندس علی جمالی و دیگر دوستان که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

Ali, S., Rizwan, M., Qayyum, M.F., Ok, Y.S., Ibrahim, M., Riaz, M., Arif, M.S., Hafeez, F., Al-Wabel, M.I., Shahzad, A.N., 2017. Biochar soil amendment on alleviation of drought and salt stress in plants: a critical review. Environmental Science and Pollution Research. 24, 12700-12712.

Athar, H., Zafar, Z.U., Ashraf, M., 2015. Glycinebetaine improved photosynthesis in canola under salt stress: evaluation of chlorophyll fluorescence parameters as potential indicators. Journal of Agronomy and Crop Science. 201, 428-442.

Bajji, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Plant Growth Regulation. 36, 61-70

Balestrasse, K.B., Gardey, L., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. Functional Plant Biology. 28, 497-504.

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., Pereira, A., 2016. Plant adaptation to drought stress. F1000Research. 5, 1554-1564.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207.

Chen, D., Wang, S., Cao, B., Cao, D., Leng, G., Li, H., Yin, L., Shan, L., Deng, X., 2016. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. Frontiers in Plant Science. 6, 1241-1256.

Chen, L.J., Zou, W.S., Wu, G., Lin, H.H., Xi, D.H., 2018. Tobacco alpha-expansin *EXPA4* plays a role in Nicotiana benthamiana defence against Tobacco mosaic virus. Planta. 247, 355-368.

Chen, Y.L., Li, Q.Z., 2007. Prediction of apoptosis protein subcellular location using improved hybrid approach and pseudo-amino acid composition. Journal of Theoretical Biology. 248, 377-381.

Chen, Y., Han, Y., Kong, X., Kang, H., Ren, Y., Wang, W., 2017. Ectopic expression of wheat expansin gene *TaEXPA2* improved the salt tolerance of transgenic tobacco by regulating Na^+/K^+ and antioxidant competence. Physiologia Plantarum. 159, 161-177.

Cosgrove DJ. 2015. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. Current Opinion in Plant Biology. 25, 162–172.

Czyczyło-Mysza, I., Tyrka, M., Marcińska, I., Skrzypek, E., Karbarz, M., Dziurka, M., Quarrie, S.A., 2013. Quantitative trait loci for leaf chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll and carotenoid contents in relation to biomass and yield in bread wheat and their chromosome deletion bin assignments. Molecular Breeding. 32, 189-210.

Das, A., Eldakak, M., Paudel, B., Kim, D.W., Hemmati, H., Basu, C., Rohila, J.S., 2016. Leaf proteome analysis reveals prospective drought and heat stress response mechanisms in soybean. BioMed Research International. Vol. 2016. Article ID 6021047, 37-59.

Du, M., Ding, G., Cai, Q., 2018. The Transcriptomic responses of *Pinus massoniana* to drought stress. Forests. 9, 326-341.

Fahad, S., Bajwa, A.A., Nazir, U., Anjum, S.A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M.Z., 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. Frontiers in Plant Science. 8, 1147-1163.

Gao, X., Liu, K., Lu, Y.T., 2010. Specific roles of *AtEXPA1* in plant growth and stress adaptation. Russian Journal of Plant Physiology. 57, 241-246.

Han, Y., Chen, Y., Yin, S., Zhang, M., Wang, W., 2015. Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. Journal of Plant Physiology. 173, 62–71.

Hussain, M., Farooq, S., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M., Nawaz, A., 2018. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. Agricultural Water Management. 201, 152-166.

Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S.I., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Dąbrowski, P., Elsheery, N.I., 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. Photosynthesis Research. 122, 158-121.

Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57, 315-319.

Kaushal, M., Wani, S.P., 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology. 66, 35-42.

Li, G.L., Wu, H.X., Sun, Y.Q., Zhang, S.Y., 2013. Response of chlorophyll fluorescence parameters to drought stress in sugar beet seedlings. Russian Journal of Plant Physiology. 60, 342-337.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. F4.2.1-F4.2.6

Lotfi, R., Pessarakli, M., Gharavi, P., Khoshvaghti, H., 2015. Physiological responses of Brassica napusto fulvic acid under water stress: Chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity. The Crop Journal. 3, 434-439.

Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J., Zhang, C., 2013. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to Arabidopsis. Planta. 237, 1547-1559.

Marowa, P., Ding, A., Kong, Y., 2016. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. Plant Cell Reports. 35, 949-965.

Pagariya, M. C., Devarumath, R. M., & Kawar, P. G. 2012. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane. Plant science, 184, 1-13.

Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in Crotalaria juncea. Plant and Soil. 239, 123-132.

Qiu, H., Zhang, L., Liu, C., He, L., Wang, A., Liu, H.L., Zhu, J.B., 2014. Cloning and characterization of a novel dehydrin gene, SiDhn2, from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. Plant Molecular Biology. 84, 707-718.

Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Sodi, A.M., Soldatini, G.F. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. Journal of Experimental Botany. 54, 2529-2540.

Schonfeld, M.A., Johnson, R.C., Carver, B.F., Mornhinweg, D.W., 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. Crop Science. 28, 526-531.

Seader, V.H., Thornsberry, J.M., Carey, R.E., 2016. Utility of the Amborella trichopoda expansin superfamily in elucidating the history of angiosperm expansins. Journal of Plant Research. 129, 199-207.

Shirazi, M., Abbasi, A.L., Taleei, A.L., Sarvestani, R., 2013. Transformation of Tobacco (*Nicotiana tobacum*) plantswith a pBI121: *AtEXPA1* construct. Iranian Journal of Crop Science. 44, 371-377. [In Persian with English summary].

Singh, B., Norvell, E., Wijewardana, C., Wallace, T., Chastain, D., Reddy, K.R., 2018. Assessing morphological characteristics of elite cotton lines from different breeding programmes for low temperature and drought tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science. 204, 467-476.

Stuart. N.W., 1939. Comparative cold hardiness of scion roots from fifty apple varieties. Proceedings. American Society for Horticultural Science. 37, 330-334.

Sudhakar, C., Lakshmi, A., Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science. 161, 613-619.

Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research. 184, 13-24.

Wang, T., Park, Y.B., Caporini, M.A., Rosay, M., Zhong, L., Cosgrove, D.J., Hong, M., 2013. Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110, 16444–16449.

Wei, P., Chen, S., Zhang, X., Zhao, P., Xiong, Y., Wang, W., Chen, J., Wang, X., 2011a. An α-expansin, *VfEXPA1*, is involved in regulation of stomatal movement in *Vicia faba* L. Chinese Science Bulletin. 56, 3531-3537.

Wei, P.C., Zhang, X.Q., Zhao, P., Wang, X.C., 2011b. Regulation of stomatal opening by the guard cell expansin *AtEXPA1*. Plant Signaling & Behavior. 6, 740-742.

Xu, Q., Xu, X., Shi, Y., Xu, J., Huang, B., 2014. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass *PpEXP1* gene exhibit enhanced tolerance to heat stress. PLoS One. 9, e100792.

Zhang, T., Li, Y., Zhou, Y., Zhang, L., 2016. Cloning and expression analysis of a homologous expansin gene *EXP2* in *Picea wilsonii*. Journal of Forestry Research. 27, 247-255.

Zhang, X.Q., Wei, P.C., Xiong, Y.M., Yang, Y., Chen, J., Wang, X.C., 2011. Overexpression of the Arabidopsis α-expansin gene *AtEXPA1* accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. Plant Cell Reports. 30, 27-36.