

Araştırma Makalesi
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.,2019, 56 (2):181-185
DOI: [10.20289/zfdergi.448332](https://doi.org/10.20289/zfdergi.448332)

Melike BAKIR^{1*}

Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi

Tarım Bilim ve Teknoloji Bölümü, Talas-Kayseri

*Orcid No: 0000-0003-3465-1453

sorumlu yazar: melikecu@gmail.com

Mercimek (*Lens culinaris* M.) DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT-BINDING2A (DREB2A) Geninin Kuraklık Stresi Koşullarındaki İfadesinin Belirlenmesi

Determination of Lentil (*Lens culinaris* M.) DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT-BINDING2A (DREB2A) Gene Expression under Drought Stress Conditions

Alınış (Received): 26.07.2018

Kabul Tarihi (Accepted): 28.11.2018

Anahtar Sözcükler:

Mercimek, DREB2A, kuraklık, gen ifadesi, eş zamanlı kantitatif PCR

ÖZ

Amaç: Dehydration responsive element binding (DREB) proteinleri, bitkilerde strese yanıt ve sinyal iletiminde önemli rol oynarlar. Bu çalışmada, *DREB* gen ailesinin üyesi olan ve *LcDREB2A* olarak isimlendirilen mercimek (*Lens culinaris* M.) *DREB2A* geninin kısmi cDNA'sı izole edilmiş ve kuraklık stresi ile ilişkisi belirlenmiştir.

Materyal ve Metot: Kuraklık stresi ve *LcDREB2A* gen ifadesi arasındaki ilişkiyi anlamak için, 2 hafta süre ile yetiştirilen mercimek fidelerine 6, 13 ve 20 gün süre ile sulamama şeklinde kuraklık stresi uygulanmıştır. Kök ve yapraklarda meydana gelen gen ifadesi değişimleri eş zamanlı kantitatif PCR (Real-time qPCR) ile belirlenmiştir.

Bulgular: *LcDREB2A* gen ifadesi, Fırat87 ve Özbek çeşidinin yapraklarında artan kuraklık stresi ile artmış ve kuraklığın 20. gününde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Diğer taraftan Özbek çeşidinin köklerinde gen ifadesi seviyesi 6. günde en yüksek seviyeye ulaşırken 13. günde azalmış ve 20. günde tekrar artış göstermiştir. Fırat87 çeşidinde ise, artan kuraklık stresi ile birlikte düzenli bir artış görülmüş ve 20. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Sonuç: *LcDREB2A* geninde gözlenen doku spesifik gen ifadesi profili, bu transkripsiyon faktörünün mercimek bitkisinde kuraklık stresindeki rolünü ve kompleks regülasyonunu göstermektedir.

ABSTRACT

Objective: Dehydration responsive element binding (DREB) proteins are important transcription factors in plant stress response and signal transduction. In this study, partial cDNA of lentil (*Lens culinaris* M.) *DREB2A*, namely *LcDREB2A*, which belongs to the *DREB* gene family was isolated and identified its relationship with drought stress.

Material and Methods: Two-week-old plants were subjected to drought stress through irrigations for 6, 13 and 20 days to elucidate the relationship between the expression profile of *LcDREB2A* gene and drought stress. Changes of gene expression in lentil roots and leaves were assayed by quantitative real time PCR.

Results: The expression of *LcDREB2A* in both Fırat87 and Özbek lentil leaves increased with decreasing water contents and reached to a maximum on the 20th day of dehydration. On the other hand, in Özbek roots, the highest level of expression was observed on the 6th day of dehydration. The levels decreased on 13th day and increased on 20th day. Level of expression in Fırat87 roots decreased with increasing water contents and the greatest level of expression was observed on the 20th day of dehydration.

Conclusion: Observed tissue-specific expression profile of *LcDREB2A* suggested a complex regulation and indicated the role of this transcription factor in lentil drought response.

Keywords:

Lentil, DREB2A, drought, gene expression, real-time quantitative PCR

GİRİŞ

Kültürü yapılan en eski dane baklagillerden biri olan mercimek (*Lens culinaris* Medik.) (Bahl et al. 1993), içerdiği yüksek protein oranı ile önemli bir besin kaynağıdır. Dünyada mercimek ekimi, 5.4 milyon hektarlık bir alanda yapılmaktadır ve ortalama 6.3 milyon ton ürün elde edilmektedir (FAO, 2016). En çok mercimek üretimi yapılan ülkeler, Kanada, Hindistan ve Türkiye olmasına rağmen, Türkiye ihracatta Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve Avusturalya'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2016). Dünyada mercimek tarımı yapılan alanların oranında ve mercimek üretiminde son yıllarda önemli bir artış gerçekleşmiştir (FAO, 2016). Buna rağmen mercimek ekiminden elde edilen ürün miktarı, maruz kaldığı biyotik ve abiyotik stresler nedeni ile oldukça yetersiz kalmaktadır.

Kuraklık stresi, bitkilerde verim ve kalite kaybına neden olan en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Kuraklık stresinin üstesinden gelebilmek için bitkide devreye giren mekanizmaları anlamak, strese dayanıklı bitki geliştirmek için oldukça önemlidir. Kuraklık stresi, bitkilerde pek çok genin ifadesinde değişikliklere neden olur (Bartels and Sunkar 2005; Çakır, 2015). Bu genler arasında transkripsiyon faktörleri (TF), çok sayıda stres cevap geninin eş zamanlı olarak ifadesini tetikleyerek kuraklık stresine karşı oluşturulan cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Bartels and Souer, 2004; Bhargava and Sawant, 2013; Muscolo et al. 2015; Janiak et al. 2016; Singh et al. 2017).

Dehydration-responsive element-binding (DREB) proteinleri, APETALA2/ethylene-responsive element binding factor-type (AP2/ERF) ailesinde yer alan transkripsiyon faktörleridir ve dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT;A/GCCGAC) olarak bilinen *cis*-acting elemanlar aracılığı ile kuraklık ve soğuk stresine tepki olarak bir çok hedef genin ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Nakashima et al. 2009). DREB transkripsiyon faktörleri, indüklendikleri stres çeşidine göre DREB1 ve DREB2 olmak üzere iki guruba ayrılmaktadır. DREB1 genleri soğuk stresi ile indüklenmektedir ve bu genlerin ifadesinde meydana gelen artışın soğuk stresine karşı toleransın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Maruyama et al. 2004; Qin et al. 2004; Ito et al. 2006; Lata and Prasad, 2011; Kidokoro et al. 2015). DREB2 genleri ise, özellikle DREB2A genleri kuraklık stresi ile indüklenmektedir (Liu et al. 1998; Sakuma et al. 2006a, 2006b). Bugüne kadar, bezelye, çeltik, buğday, mısır, nohut, yonca, susam *Arabidopsis* gibi farklı bitkilerde yapılan pek çok çalışmada, DREB2A geninin kuraklık stresine toleransta rol aldığı bildirilmiştir (Sakuma et al. 2006a, 2006b; Qin et al. 2007, Jovanović et al. 2013; Tavakol et al. 2014; Dossa et al. 2016).

Bu çalışmanın amacı, mercimekte (*Lens culinaris* M.) dehydration responsive element binding protein (DREB2A)-like genin cDNA klonunu izole etmek ve mercimek *LcDREB2A* geninin kuraklık stresi koşullarında mercimek yaprak ve köklerinde değişen gen ifadesi seviyesini belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak, GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü tarafından geliştirilen kuraklık stresine dayanıklı Fırat-87 çeşidi ve Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen kurağa hassas Özbek çeşidi kullanılmıştır (Güneş ve ark., 2006). Çeşitlere ait tohumlar %10'luk sodyum hipoklorid ile strelize edildikten sonra, bir gün süre ile suda bekletilmiş ve ardından viyollere ekilmiştir. Kontrollü koşullarda (16 saat aydınlık/8 saat karanlık, 23 °C, %70 nem) gelişimleri sağlanmıştır. Bitkiler kuraklık stresi uygulamaları öncesinde, 3 günde bir düzenli olarak 50 ml ½ Hoagland çözeltilisi ile sulanmıştır.

Stres Uygulamaları

Kontrollü koşullarda (16 saat aydınlık/8 saat karanlık, 23 °C, %70 nem) 10 gün süre ile gelişimleri sağlanan bitkilere, kuraklık stresi uygulaması yapılmıştır. Kuraklık stresi uygulamaları sulamama şeklinde, 6. gün (normal kuraklık stresi), 13. gün (orta derecede kuraklık stresi) ve 20. gün (şiddetli kuraklık stresi) şeklinde uygulanmıştır. Stres uygulanmış bitkilerin yaprak su potansiyeli ölçümleri (Pressure chamber-model 600, Wescor, Inc.) gerçekleştirilmiştir.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu, TRIzol Reagent (Thermo Scientific, USA) kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için, stres uygulama zamanlarına göre yaprak su potansiyeli sonuçları değerlendirilerek -0.6 ve -1.8 MPa arasında homojen sonuç veren 5'er bitkinin yaprak ve köklerinden havuz oluşturulmuştur. Uygulamalarda 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar kullanılmıştır. İzole edilen RNA'ların Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile saflık ve konsantrasyonları belirlenmiş, RNA bütünlüğü %2'lik formaldehit agaroz jelde kontrol edilmiştir. cDNA sentezi random hexamer kullanılarak, 2 µg Toplam RNA ile Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Primer Dizaynı ve DREB2A Geninin Amplifikasyonu

DREB2A geninin amplifikasyonu için PCR primerleri Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılarak model bitki *Medicago truncatula* (DQ908959.1) DREB2A cDNA dizisinden gerçekleştirilmiştir. Dizayn edilen primerler, mercimek cDNA'larında test edilmiş ve temiz bant veren ürünler seçilmiştir. PCR reaksiyonları, 15 µl reaksiyon hacminde 200 ng cDNA, 10 pmol primerler (MtDREB2A_F 5'-ACAGAGGACTTGGGGGAAAT-3' ve MtDREB2A_R 5'-GTAAAGTCGCGCAGAAGGAC-3'), 2.5 mM dNTP, 0.1 unit Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 1.5 mM MgCl₂, 5x buffer içerecek şekilde, 94 °C-5 dk, takiben 94 °C-1dk 55 °C-1dk, 72 °C-2dk, 35 döngü ve 72 °C -10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edilerek, ExoSAP (Thermo Fisher Scientific, USA), PCR temizleme sistemi ile temizlenip, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak Applied Biosystems Prism 3500 Genetik Analiz Sisteminde sekanslanmıştır (Applied Biosystems, USA). Elde edilen dizi BLAST programı kullanılarak hizalanmış, Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılarak, mercimek DREB2A geni için primerler dizayn edilmiştir.

Real-time qPCR

LcDREB2A geninin amplifikasyonu, kontrol ve kuraklık stresi uygulanmış mercimek yaprak ve köklerinden izole edilen RNA'lerden Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) ile sentezlenen tek zincirli cDNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar, Light Cycler® SYBR Green 1 Master miksi (Roche) kullanılarak, kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 2 µl cDNA, 10 µl SYBR Green 1 Master miksi, 10 pmol primer (*LcDREB2A_F* 5'- CCTTCGGCGCGGCTTAATTT-3' ve *LcDREB2A_R* 5'- AGGACAGCTATCAGCAGCCA-3') kullanılarak toplam 20 µl hacimde LightCycler® 480 (Roche) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon koşulları; 95 °C'de 10 dk. pre-denetürasyon aşamasını takiben, 45 döngü 95°C'de 10 sn., 50 °C'de 10 sn., 72°C'de 8 sn. şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunun spesifikliğini kontrol etmek için PCR ürünleri erime eğrisi analizi ile kontrol edilmiştir. Reaksiyonlar, her bir örnek için 3 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrar içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

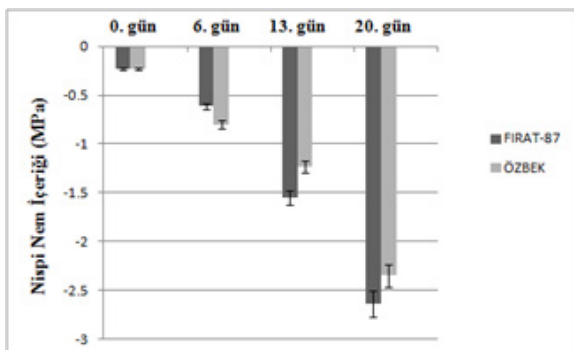
İstatistik Analizleri

Kuraklık stresi uygulanmış ve kontrol bitkilerinden elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi, Livak and Schmittgen (2001)'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre yapılmıştır. Gen ifadesine ait C_T/C_p değerlerinin normalizasyonu için "housekeeping" gen Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (GenBank no. X75327.1) (*GAPDH_F* TGGGCGAAAACCTCCACTTTG ve *GAPDH_R* GAATTGCTGCAGCCTTGTA) kontrol geni (Saha and Vandemark, 2013) kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Stresin Fizyolojik Olarak Belirlenmesi

Yaprak su potansiyeli değerinde meydana gelen düşüş, kuraklık stresine dayanıklılık ile ters orantı göstermektedir (Joshi and Karan, 2013). Yaprak su potansiyeli değerleri uygulanan kuraklık stresi ile orantılı olarak değişmiş, ancak kuraklığa dayanıklı Fırat 87 çeşidinde daha fazla düşüş görülmüştür. Kuraklık stresi süresince, kontrol bitkilerinin yaprak su potansiyeli değerleri 0.15 - 0.3 MPa değerleri arasında değişmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kuraklık stresi yaprak su potansiyeli (MPa) ölçümleri
Figure 1. Leaf water potential (MPa) measurements under drought stress

Mercimek DREB2A Kısmi cDNA İzolasyonu

Kuraklık stresi uygulanmış mercimek (*L. culinaris* M.) yapraklarından 506 baz çifti (bp) uzunluğunda cDNA izole edilmiştir. Elde edilen dizinin nükleotit dizi analizlerinde, mercimek *DREB2A* geninin *M. truncatula DREB2A* (DQ908959.1) ve *Pisum sativum DREB2A* (HM229349.1) dizisi ile yüksek homoloji (%82) gösterdiği görülmüştür.

Lc_DREB2A Gen İfadesi Analizleri

Kuraklık stresi koşullarında, mercimekte *LcDREB2A* geninin doku spesifik gen ifadesinde meydana gelen değişimler eş zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. *LcDREB2A* gen ifadesi yaprak ve kök dokularında farklılık göstermiştir. Fırat87 çeşidinin yapraklarında kuraklık stresi uygulaması ile paralel bir şekilde *LcDREB2A* gen ifadesinde artış görülmüştür. Özbek çeşidinde ise, 6. günde gen ifadesi artmış, 13. günde azalmış ve 20. gün de ise en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Kök dokuları karşılaştırıldığında, Özbek çeşidinde 6. günde gen ifadesinde önemli bir artış görülürken, 13.ve 20. günlerde ise gen ifadesi değişim katsayıları farklılık göstermekle birlikte her iki çeşitte de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Arabidopsis'te DREB proteinleri ve bu proteinlerin abiyotik stres koşullarına karşı oluşturdukları cevap keşfedildikten sonra, baklagilleri de içeren diğer bitkilerde homolog genler için araştırmalar başlamıştır (Nayak et al. 2009). *DREB1* sınıfı transkripsiyon faktörlerine yönelik detaylı çalışmalar yapılmasına rağmen, *DREB2* transkripsiyon faktörleri için çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Bu çalışmada, mercimek (*L. culinaris* M.) DREB-related gen ailesinin yeni üyesinin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve *LcDREB2A* olarak isimlendirilmiştir. *LcDREB2A*'nın izolasyonu ve karakterizasyonu için dizi bilgileri bilinen model baklagil bitkisi *M. truncatula* kullanılmıştır. Mercimek Viciae takımından olmasına rağmen, Trifoliae takımında yer alan *M. truncatula* dizi bilgileri temel alınarak geliştirilen primerler mercimekte başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Nükleotit dizi analizleri karşılaştırıldığında, *LcDREB2A* geninin *M. truncatula* ve *P. sativum* ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ancak, farklı takımlarda yer alan *M. truncatula* ve *P. sativum*'da *DREB2A* geninin birbirine benzerliği %99 iken, aynı takımda yer alan bezelye ve mercimek *LcDREB2A* geninin *P. sativum PsDREB2A* genine benzerliği %82 olarak bulunmuştur. Aynı takımda yer alan diğer baklagillere ait *DREB2A* geni dizi bilgileri henüz tanımlanmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır. Bu gene ait dizi bilgilerinin filogenetik çalışmalar için önem taşıdığı düşünülmektedir.

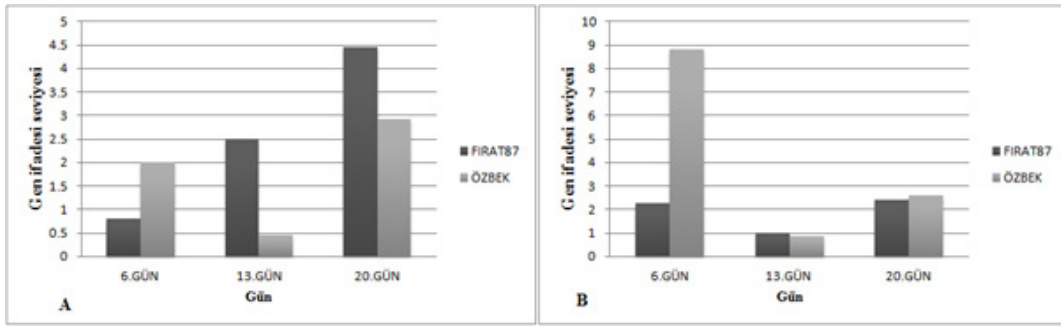
Kuraklık stresi koşullarında, mercimekte *LcDREB2A* geninin doku spesifik gen ifadesi analizleri eş zamanlı kantitatif PCR (Real-time qPCR) ile gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresi koşullarında, mercimekte *LcDREB2A* geninin doku spesifik gen ifadesinde meydana gelen değişimler eş zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. *LcDREB2A* gen ifadesi yaprak ve kök dokularında farklılık göstermiştir. Fırat87 çeşidinin yapraklarında kuraklık stresi uygulaması ile paralel

bir şekilde *LcDREB2A* gen ifadesinde artış görülmüştür. Özbek çeşidinde ise, 6. günde gen ifadesi artmış, 13. günde azalmış ve 20. gün de ise en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Kök dokuları karşılaştırıldığında, Özbek çeşidinde 6. günde gen ifadesinde önemli bir artış görülürken, 13. ve 20. günlerde ise gen ifadesi değişim katsayıları farklılık göstermekle birlikte her iki çeşitte de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bezelyede 7 ve 10 gün süre ile sulamama şeklinde gerçekleştirilen kuraklık stresi ile *PsDREB2A* geninin yapraklarda 10. günde en yüksek seviyeye ulaşırken köklerde 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Bu çalışma ile benzer şekilde, *PsDREB2A* gen ifadesinin yaprak ve kökte farklı ifade olduğu bildirilmiştir (Jovanović et al. 2013). Kasımpatı (*Dendranthema vestitum*) bitkisinde uygulanan kuraklık stresi ile 6. saatte *DvDREB2A* geninin en yüksek seviyeye ulaştığı ancak 4 ve 12.

saatlere göre önemli bir farkın oluşmadığı bildirilmiştir (Liu et al. 2008). *Eruca vesicaria* subsp *sativa*'da ise, *EvDREB2A* geninin en yüksek ifade seviyesinin yapraklarda, en düşük ise çiçek tomurcuklarında olduğunu bildirmişlerdir (Huang et al. 2016). *DREB2A* transkripsiyon faktörünün aşırı ifade edilmesi ile, bitkilerde kuraklık stresi karşı önemli dayanıklılıkların sağlandığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Sakuma, 2006a, 2006b; Qin et al. 2007; Agarwal et al. 2010; Chen et al. 2016). Bu çalışma ile, mercimek *LcDREB2A* genine ait dizi bilgileri literatürde ilk defa elde edilmiş ve *LcDREB2A* geninin mercimekte kuraklık stresi koşullarındaki rolü belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezine sağladığı laboratuvar imkânı ve desteği için teşekkür ederiz.



Şekil 2. *LcDREB2A* geninin kuraklık stresi uygulanmış mercimek yaprak (A) ve köklerinde (B) meydana gelen gen ifadesi değişim seviyesi

Figure 3. The gene expression level of *LcDREB2A* gene in lentil leaf (A) and root (B) under drought stress conditions

KAYNAKLAR

- Agarwal P, Agarwal PK, Joshi AJ, Sopory SK, Reddy MK (2010) Overexpression of *PgDREB2A* transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Molecular Biology Replication* 37:1125-1135.
- Bahl PN, Lal S, Sharma BM (1993) An overview of the production and problems in southeast Asia". In: Erskine W, Saxena MC. (Ed) *Lentil in South Asia. Proceedings of the seminar on lentils in South Asia, ICARDA, Aleppo, Syria.* pp. 1-10.
- Bartels D, Souer E (2004) Molecular responses of higher plants to dehydration. In: Hirt H, Shinozaki K (Ed). *Plant Responses to Abiotic Stress.* Berlin: Springer-Verlag, pp. 9–38.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23–58.
- Bhargava S, Sawant K (2013) Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 2013;132: 21–32.
- Çakır B (2015) Asmada (*Vitis vinifera* cv. Sultan Çekirdeksiz) Bax İnhibitor-1 Geninin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49: 249-254. DOI: 10.20289/zfdergi.69696
- Chen H, Liu L, Wang L, Wang S, Cheng X (2016) VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal Plant Resources.* 129:263-273.
- Dossa K, Wei X, Li D, Fonceka D, Zhang Y, Wang L, Yu J, Boshou L, Diouf D, Cissé N, Zhang X (2016) Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress. *BMC Plant Biology* 16:171 DOI 10.1186/s12870-016-0859-4
- FAOSTAT (2016). <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/QC/QC/E>. 4 Temmuz 2018
- Güneş A, Adak S, İnal A, Alpaslan M, Eraslan F, Çiçek N, Kayan N, Soylu B (2006) Mercimek ve Nohut Bitkilerinde Kuraklığa Bağlı Oksidatif Stres ve Fizyolojik Tolerans Mekanizmalarının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara.
- Huang BL, Zhang XK, Li YY, Li DY, Ma MY, Cai DT, Wu WH, Huang BQ (2016) Cloning and characterization of the dehydration-responsive element-binding protein 2A gene in *Eruca vesicaria* subsp *sativa* Huang. *Genetics and Molecular Research* 15 (3): gmr. 15038540
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K. Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiology* 47:141–153.
- Janiak A, Kwaśniewski M, Szarejko I (2016) Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany* 1003–1014 DOI:10.1093/jxb/erv512

- Joshi R, Karan R (2013) Physiological, biochemical and molecular mechanisms of drought tolerance in plants, In: Gaur RK, Sharma P, (Ed). Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress. Boca Raton, FL: CRC Press;pp. 209–231.
- Jovanović Z, Stanisavljević N, Mikić A, Radović S, Maksimović V (2013) The expression of drought responsive element binding protein (*DREB2A*) related gene from pea (*Pisum sativum* L.) as affected by water stress. Australian Journal of Crop Science 7:590-1596.
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint Phyu Sin Htwe N, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. Plant Journal 81:505–518.
- Lata C, Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress response in plants. Journal of Experimental Botany 62:4731-4748.
- Liu L, Zhu K, Yang Y, Wu J, Chen F, Yu D (2008) Molecular cloning, expression profiling and transactivation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). Journal of Plant Resources 121:215-226.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell 10:1391–1406.
- Livak JK, Schmittgen DT (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25:402–408.
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/ CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. Plant Journal 38:982–993.
- Muscolo A, Junker A, Klukas C, Weigelt-Fischer K, Riewe D, Altmann T (2015) Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. Journal of Experimental Botany 5467–5480
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory Networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. Plant Physiology 149:88–95.
- Nayak S, Balayi J, Upadhyaya H, Hash C, Kishor P, Chattopadhyay D, Rodriguez L, Blair M, Baum M, McNally K, This D, Hoisington D, Varshney R (2009) Isolation and sequence analysis of DREB2A homologues in three cereal and two legume species. Plant Science 177:460-467.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran Lam Son P, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. Plant Journal 50:54–69.
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. Plant Cell Physiology 45:1042–1052.
- Saha GC, Vandemark GJ. (2013) Stability of expression of reference genes among different lentil (*Lens culinaris*) genotypes subjected to cold stress, white mold disease, and aphanomyces root rot. Plant Molecular Biology Reporter 31:1109–1115.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. Plant Cell 18:1292–1309.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. PNAS 103:18822–18827.
- Singh D, Sing CK, Taunk J, Tomar RSS, Chaturvedi AK, Gaikwad K, Pal M (2017) Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. BMC Genomics 18:206. DOI 10.1186/s12864-017-3596-7
- Tavakol E, Sardaro ML, Shariati JV, Rossini L, Porceddu E (2014) Isolation, promoter analysis and expression profile of DREB2 in response to drought stress in wheat ancestors. Gene 549:24-32.