

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات در بادام (*Prunus dulcis* Mill.) در پاسخ به تنش یخ‌زدگی Expression analysis of genes involved in carbohydrate metabolism in *Prunus dulcis* Mill. in response to frost stress

صادق موسوی فرد^۱، بهروز شیران^{۲*}، علی ایمانی^۳، سعداله هوشمند^۲

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استاد، گروه باغبانی، مؤسسه اصلاح بذر و گیاه، کرج، ایران

Mousavi-Fard S¹, Shiran B^{*2}, Imani A³, Houshmand S²

1- Assistant Professor, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3- Professor, Department of Horticulture, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shiran@sku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸)

چکیده

بادام (*Prunus dulcis* Mill.) یکی از مهم‌ترین محصولات آجیلی در سراسر جهان است. طبیعت زود گلدهی بادام باعث شده است که بعد از مرتفع شدن نیاز سرمایی سریعاً به دماهای بالا واکنش نشان داده و فعالیت‌های فیزیولوژیکی را از سر می‌گیرند. لذا این محصول اغلب از سرمای دیررس بهاری آسیب می‌بیند. نتایج بررسی‌های فیزیولوژیکی و مطالعه ترانسکریپتوم بادام نشان داده است که ارقام متحمل به تنش سرما دارای مقادیر بیشتری از کربوهیدرات می‌باشند. علیرغم اهمیت ژن‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اطلاعات کمی در مورد بیان ژن‌های کلیدی در این مسیر وجود دارد. لذا در این مطالعه بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در چهار ژنوتیپ و رقم با زمان گلدهی متفاوت (دو ژنوتیپ متحمل و یک ژنوتیپ و یک رقم حساس به سرما) مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان قندهای محلول و جوانه‌زنی دانه کرده نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به‌طور معنی‌داری دارای مقادیر بالاتری از قند محلول و درصد جوانه‌زنی دانه کرده می‌باشد. مطالعه ژن‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نشان داد که سطح بیان بالاتری از *PdUGPase*، *PdSUS*، *PdPGK*، *PdPEPcK*، *PdINV*، *PdHEX1* در ژنوتیپ‌های متحمل نسبت به ژنوتیپ‌های حساس به سرما مشاهده شد که می‌تواند نقش مثبت این ژن‌ها را در تحمل به سرما نشان دهد. در مجموع استفاده از ویژگی‌های ذکر شده و ژن‌های بررسی شده می‌تواند به‌عنوان شاخصی در ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل قرار گیرد، علاوه بر این ژنوتیپ H با توجه به دیرگل و متحمل بودن به سرم‌زدگی پتانسیل معرفی به‌عنوان رقمی متحمل به سرمای دیرس بهاره را دارد.

واژه‌های کلیدی

ترانسکریپتوم
ژنوتیپ حساس
ژنوتیپ دیرگل
ژنوتیپ متحمل

مقدمه

دمای پایین یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده پراکندگی گونه‌های گیاهی است و از این رو می‌تواند عملکرد و قابلیت تولید محصولات را محدود کند (Kalberer et al. 2006). تنش دمای پایین با توجه به میزان دما به دو نوع تنش سرمازدگی ($< 20^{\circ}\text{C}$) و تنش یخ‌زدگی ($< 0^{\circ}\text{C}$) تقسیم می‌شود (Liu and Zhou 2018). بادام با نام علمی *Prunus dulcis* (Mill.) متعلق به خانواده Rosaceae و از زیر خانواده Pronoidae و از جنس *Prunus* می‌باشد. با توجه به نیاز پایین دمایی آن از اولین گونه‌های درختان میوه است که شکوفه می‌دهد. بنابراین، یخبندان‌های اواخر زمستان و اوایل بهار می‌توانند به شدت به جوانه‌ها و گل‌های آن آسیب برسانند که در نتیجه آن عملکرد این درخت را کاهش می‌دهد (Gaeta et al. 2018). لذا دیرگلدی ویژگی مطلوبی است که در اکثر برنامه‌های اصلاحی بادام مورد توجه قرار می‌گیرد (Ballester et al. 2001; Silva et al. 2005). اگرچه ایجاد ارقام دیرگل در بادام بسیار با اهمیت است اما ایجاد ارقام متحمل به سرما نیز راهکار اصلاحی دیگری است که در مقابله با سرمازدگی بادام می‌تواند راهگشا باشد (Socias i Company 1998; Mousavi et al. 2014a).

در طی واکنش و سازگاری با تنش سرمازدگی، تغییرات مختلفی در سطوح بیوشیمیایی، مولکولی و فیزیولوژیکی گیاه رخ می‌دهد. مطالعات نشان داده است که متابولیت‌های متعددی در پاسخ به تنش سرمازدگی نقش دارند که شامل آمینو اسیدها، پلی‌آمین‌ها، پلی‌اول‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌باشد (Krasensky and Jonak 2012; Ghosh et al. 2021). این ترکیبات در تسهیل تنظیم اسمزی نقش دارند و با تخریب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌نماید (Barros et al. 2012; Suzuki and Mittler 2006). از میان متابولیت‌های ذکر شده، اخیراً تمرکز ویژه‌ای برای درک نقش چندگانه کربوهیدرات‌ها در افزایش تحمل به سرما شده است (Kruse et al. 2020; Deslauriers et al. 2021). تنش سرما در القاء تجمع کربوهیدرات‌ها نقش دارد. مطالعات نشان داده است که کربوهیدرات‌ها نقش‌های متفاوتی در واکنش و سازگاری به سرما از جمله تثبیت غشاهای بیولوژیکی،

محافظت از غشای سلولی، کاهش نفوذپذیری غشاء دارند (Palma et al. 2014; Orzechowski et al. 2021).

علیرغم اهمیت فرآیند متابولیک کربوهیدرات در پاسخ به تنش سرما، اطلاعات کمی در مورد جنبه‌های مولکولی این فرآیند در بادام و در بسیاری از گونه‌های دیگر Rosaceae وجود دارد. پیشرفت‌های اخیر در رویکردهای توالی‌یابی فرصتی منحصر به فرد برای مطالعه همزمان بسیاری از رونوشت‌ها و تغییرات آن‌ها در گونه‌های گیاهی فراهم کرده است (Ahmadi-Teshniz et al. 2022; Yousefzadeh et al. 2022). مطالعه قبلی ما بر روی بررسی ترانسکریپتوم بادام در پاسخ به تنش سرما، اهمیت ژن‌های دخیل در فرآیندهای مختلف به‌ویژه فرآیند متابولیک کربوهیدرات را نشان داد (Mousavi et al. 2014a; Karimi et al. 2016). علاوه بر این، گزارش‌های قبلی بیان متفاوتی از ژن‌های دخیل در فرآیند متابولیک کربوهیدرات را تحت تنش سرما نشان داده‌اند (Pang et al. 2013; Ouyang et al. 2020).

در مطالعات قبلی انجام گرفته داده‌های فیزیولوژیک نشان داد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش سرمازدگی دارای مقادیر بیشتری از کربوهیدرات‌ها هستند (Mousavi et al. 2014b). علاوه بر این آنالیز داده‌های حاصل از RNA Sequence به‌خوبی نشان داد که ژن‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در پاسخ به تنش سرمازدگی بیان‌های متفاوت دارند، لذا در این مطالعه، بیان ژن‌هایی مهم دخیل در فرآیند متابولیک کربوهیدرات که بیان افتراقی داشتند در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به سرمازدگی مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه می‌تواند مورد استفاده اصلاحگران بادام باشد. علاوه بر این، این ژن‌ها پتانسیل استفاده به‌عنوان نشانگرهای بیانی در انتخاب به کمک نشانگر را (MAS) دارا می‌باشند، که در نتیجه آن اصلاحگران با استفاده از این ژن‌ها با صرف زمان و هزینه کمتر بتوانند ارقام متحمل به تنش سرما را شناسایی نمایند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از چهار ژنوتیپ و رقم بادام شامل ژنوتیپ‌های متحمل (H و G19) و حساس به سرما (رقم شاهرود ۱۲ یا Sh12 و M3) استفاده شد. این ژنوتیپ‌ها در نهالستان کمال شهر که زیر

مجموعه مؤسسه نهال و بذر کرج بوده و در ۵۰ کیلومتری تهران واقع شده است، کشت شده‌اند. مشخصات جغرافیایی نهالستان به شرح زیر است: عرض جغرافیایی ۵۵° ۳۵' شمالی، طول جغرافیایی ۵۴° ۵۰' شرقی و ارتفاع ۱۳۱۲٫۵ متری از سطح دریا. سرمای طبیعی بهاره ($0/5 \pm 2$ °C) سالانه در این منطقه ثبت شده است که به‌عنوان شاخصی اصلاح‌کنندگان را قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل می‌نماید. بر این اساس از بین ۳۰۰ ژنوتیپ مورد مطالعه که از سراسر ایران جمع‌آوری شده و در این مکان کشت شده بودند، این ژنوتیپ‌ها (چهار ژنوتیپ و رقم) به‌عنوان متحمل و حساس به سرما با زمان گلدهی متفاوت شناسایی شدند. از نظر زمان گلدهی ژنوتیپ H و رقم شاهرود ۱۲ (Sh12) دیرگل و ژنوتیپ‌های G19 و M3 زودگل می‌باشند.

اعمال تنش سرمایی در مرحله غنچه‌ صورتی (پاپ کورن) بر مبنای نتایج مطالعات قبلی انجام شد (Mousavi et al. 2014b). جهت اعمال تنش سرمایی چندین شاخه با قطر تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از قسمت‌های میانی درختان پنج ساله در اواخر زمستان و اوایل بهار تهیه شد. در آزمایشگاه انتهای شاخه‌ها در داخل آب مقطر با قیچی تیز ضد عفونی شده با اتانول به شکل مورب بریده شده به نحوی که ارتفاع نهایی همه شاخه‌ها به ۳۵ سانتی‌متر رسید. پس از آن شاخه‌ها به ارلن حاوی محلول ساکارز ۵ درصد انتقال داده و در اتاقک‌های اعمال تنش گذاشته شد. شاخه‌های مذکور در معرض تنش سرمایی (۰°C به مدت ۳ ساعت و -۲°C به مدت ۲ ساعت) قرار گرفتند و بلافاصله پس از هر دما نمونه‌گیری از بساک‌های گل انجام شد. جهت اعمال تیمار شاهد، چند شاخه بریده در دمای ۲۰ °C نگهداری شد. انتخاب مرحله پاپ کورن و شرایط دمایی تیمارها بر اسای نتایج آزمایشات قبلی نویسندگان انتخاب شد. پس از تهیه بساک‌های جمع‌آوری شده بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت بررسی میزان سرمازدگی بساک شاخه‌هایی با گل‌های باز نشده از ژنوتیپ‌های بادام مورد مطالعه تهیه شد. پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت برخی از گل‌ها نیما باز شد. از گل‌های نیمه باز شده مقدار زیادی بساک تهیه شد و جهت اعمال تنش به اتاقک رشد قابل برنامه‌ریزی (432 L; ASL Aparatos)

اعمال تنش سرمایی در مرحله غنچه صورتی (پاپ کورن) بر مبنای نتایج مطالعات قبلی انجام شد (Mousavi et al. 2014b). جهت اعمال تنش سرمایی چندین شاخه با قطر تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از قسمت‌های میانی درختان پنج ساله در اواخر زمستان و اوایل بهار تهیه شد. در آزمایشگاه انتهای شاخه‌ها در داخل آب مقطر با قیچی تیز ضد عفونی شده با اتانول به شکل مورب بریده شده به نحوی که ارتفاع نهایی همه شاخه‌ها به ۳۵ سانتی‌متر رسید. پس از آن شاخه‌ها به ارلن حاوی محلول ساکارز ۵ درصد انتقال داده و در اتاقک‌های اعمال تنش گذاشته شد. شاخه‌های مذکور در معرض تنش سرمایی (۰°C به مدت ۳ ساعت و -۲°C به مدت ۲ ساعت) قرار گرفتند و بلافاصله پس از هر دما نمونه‌گیری از بساک‌های گل انجام شد. جهت اعمال تیمار شاهد، چند شاخه بریده در دمای ۲۰ °C نگهداری شد. انتخاب مرحله پاپ کورن و شرایط دمایی تیمارها بر اسای نتایج آزمایشات قبلی نویسندگان انتخاب شد. پس از تهیه بساک‌های جمع‌آوری شده بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت بررسی میزان سرمازدگی بساک شاخه‌هایی با گل‌های باز نشده از ژنوتیپ‌های بادام مورد مطالعه تهیه شد. پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت برخی از گل‌ها نیما باز شد. از گل‌های نیمه باز شده مقدار زیادی بساک تهیه شد و جهت اعمال تنش به اتاقک رشد قابل برنامه‌ریزی (432 L; ASL Aparatos)

به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی (۰/۵ گرم از نمونه گل + ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪) به ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده [۱۵۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪ v/v (حجمی:حجمی)] اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه روی حمام جوش قرار داده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (UNICAM UN/VIS spectrometer) قرائت شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد گلوکز رسم و میزان قندهای محلول نمونه‌ها بر اساس میلی‌گرم در هر گرم وزن تر محاسبه شد.

به مایع رویی اضافه شد و سانتریفیوژ (10 min, 40 c, 1000rpm) شد. در نهایت، پس از افزودن لیتیم کلراید (8M) و سانتریفیوژ، پلت حاصل با اتانول شسته و در آب تیمار شده با DEPC حل شد. هرگونه آلودگی DNA با استفاده از تیمار DNaseI حذف شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر و همچنین ژل ۱/۵ درصد آگارز مخصوص RNA (حاوی فرمالدئید) ارزیابی شد. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (#K1621) کیت ساخت شرکت فرمنتاز و بر مبنای دستورالعمل کیت صورت گرفت.

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه (جدول ۱) با استفاده واکنش PCR در زمان واقعی (Real-Time PCR) مورد بررسی قرار گرفت. واکنش qRT-PCR با استفاده از مخلوط واکنش (Takara) حاوی SYBR Green و پرایمر اختصاصی صورت گرفت. واکنش برای هر نمونه در دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام شد. از ژن اکتین که یک پروتئین ساختاری است به عنوان کنترل درونی (Housekeeping gene) استفاده شد. بررسی کمی نتایج حاصل از روش Real-Time PCR با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene Q در مقایسه با ژن اکتین، با استفاده از روش (2001) Livak and Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) تجزیه و تحلیل شد.

مطالعه قبلی نشان داده است که چندین ژن دخیل در متابولیسم کربوهیدرات به طور متفاوتی در بافت بساک و تخمدان بادام تحت شرایط تنش سرما بیان می‌شوند (Mousavi et al. 2014a). برای انجام مطالعه بیشتر در مورد ژن‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات با بیان متفاوت در بافت بساک، شش ژن شامل Phosphoenolpyruvate Hexokinase 1 (*PdHEX 1*)، UDP-Glucose Carboxykinase (*PdPEPcK*)، Pyrophosphorylase (*PdUPGase*)، Pyrophosphorylase (*PdPGK*)، Phosphoglycerate Kinase (*PdINV*) و Invertase (*PdSUS*) انتخاب شد. بررسی بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به سرما مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA کل از بساک بادام با استفاده از روش Rubio-Piña and Zapata-Pérez (۲۰۱۱) با برخی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱ [w/v] CTAB; 0.1 M Tris-HCl [pH 8]; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA [pH 8]; ۱۰۰ [w/v] PVP; 70 µl of β-mercaptoethanol) را به ۶۵ °C میلی گرم نمونه کاملاً پودر و نرم شده اضافه شد و در دمای ۶۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۸۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه و سانتریفیوژ (10 min, 40 c, 1000rpm) شد. در ادامه، ۸۰۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم (۱:۱ V/V) به مایع رویی اضافه شد و یک بار دیگر سانتریفیوژ (10 min, 40 c, 1000rpm) شد. سپس حجم مساوی از کلروفرم/ایزوامیل الکل سرد (۲۴:۱)

جدول ۱- پرایمر ژن‌های مورد مطالعه، طول قطعات تکثیر شوند و دمای اتصال در واکنش Real Time PCR

Gene name (abbreviation)	Product length	Primer sequence (5'→3')	Annealing
<i>PdHEX-1</i>	183	F:GGGAAAAACAGAGGACAGTGG	58.77
		R:AGTGAGAGGCAGCAAGAAGG	59.68
<i>PdINV</i>	103	F:CATCGGCACTCGTTTCTTG	59.9
		R:TGGCAGTCAACCGTCTTCTC	59.97
<i>PdPEPcK</i>	139	F:CCAACGGCAACATTCTCAGC	60.11
		R:TTCCACCAGACCAGCCAGT	60.77
<i>PdPGK</i>	189	F:TCCAATCCCATCCACCCATC	59.15
		R:CTCAGTCGGTTCGTCTCTGG	59.83
<i>PdSUS</i>	164	F:TCCTCAATCGCCACCTTTCTTC	60.62
		R:ATCCTCAGCCTTCCCCAAAAC	60.27
<i>PdUGPase</i>	139	F:CCTGTGATGAAGGGTTCTAGTTC	60.62
		R:TCCAGGCCAATAATGTCAGGC	60.41
<i>Actin</i>	116	F:TCCTGAAGAGCACCCAGTTC	59.31
		R:GGCAACATACATAGCAGGC	58.32

رقم شاهرود ۱۲ (Sh12) و ژنوتیپ M3 (به‌عنوان ژنوتیپ‌های حساس به سرما) به‌ترتیب ۲۴ و ۵ درصد بود. شکل ۱ نشان‌دهنده جوانه‌زنی دانه‌گرفته در ژنوتیپ‌های H و M3 به‌ترتیب در دمای $^{\circ}\text{C}$ -۲ است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ارقام مختلف در درختان میوه در ویژگی جوانه‌زنی دانه‌گرفته اختلاف‌های معنی‌دار دارند (Moheb et al. 2018; Sorkheh et al. 2018)، انتخاب ارقام متحمل به سرمازدگی بر مبنای آزمون جوانه‌زنی دانه‌گرفته در شرایط تنش سرمایی هنوز محل بحث می‌باشد، نتایج این مطالعه نشان داد که ارقام متحمل پس از اعمال تنش یخ‌زدگی دارای جوانه‌زنی بالاتری در مقابل ارقام حساس می‌باشند. با این وجود به‌نظر می‌رسد ارتباط معنی‌داری بین این ویژگی با تحمل به تنش یخ‌زدگی وجود داشته باشد.

افزایش قندهای محلول در در جوانه‌های گل بادام تحت تنش یخ‌زدگی

قندهای محلول کل در جوانه‌های گل بادام تحت تنش یخ‌زدگی اندازه‌گیری شد. مقدار قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۲) که نشان‌دهنده میزان متفاوت قند محلول در ارقام حساس و متحمل می‌باشد.

در این مطالعه از طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار جهت ارزیابی آسیب سرمازدگی ناشی از تنش سرما و میزان قندهای محلول کل استفاده شد. در آزمایش دوم که به‌منظور بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی کریوهدرات‌ها انجام شد، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 و اکسل مورد تجزیه و تحلیل واریانس قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون فیشر P-LSD در سطح آماری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر تنش سرمایی بر کاهش جوانه‌زنی دانه‌گرفته

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که جوانه‌زنی دانه‌گرفته در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دماهای مختلف تفاوت معنی‌داری ($P\text{-value} < 0.01$) دارند که نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار ژنوتیپ بر میزان جوانه‌زنی دانه‌گرفته در اعمال تنش ($^{\circ}\text{C}$ -۲) و بدون اعمال تنش ($^{\circ}\text{C}$ ۲۰) می‌باشد (جدول ۲ و ۳). درصد جوانه‌زنی گرده پس از تیمار سرما ($^{\circ}\text{C}$ -۲) در ژنوتیپ‌های H و G19 (به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به سرما) به‌ترتیب ۷۹ و ۴۲/۳۳ درصد بود (جدول ۳). در حالی‌که درصد جوانه‌زنی دانه‌گرفته در

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دماهای کنترل و $^{\circ}\text{C}$ -۲

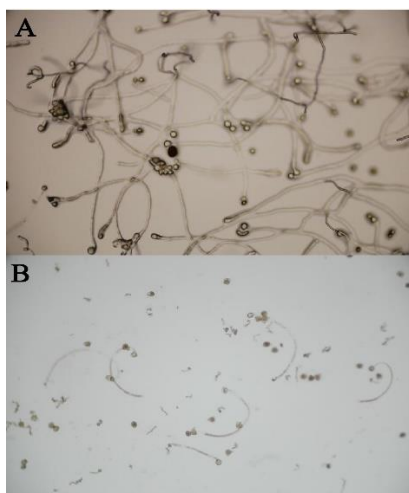
منابع تغییرات	درجه آزادی	کنترل ($^{\circ}\text{C}$ ۲۰)	تیمار سرمایی ($^{\circ}\text{C}$ -۲)
ژنوتیپ	۳	۹۶۷/۶۷**	۲۹۸۴/۰۸**
خطا	۸	۱۶/۰۸	۱۰/۰۸
CV%		۵/۱۳	۸/۷۶

***: معنی‌داری در سطح ۱ درصد

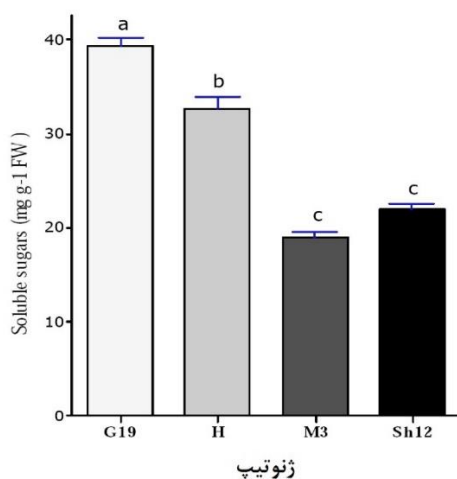
جدول ۳- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دماهای کنترل و $^{\circ}\text{C}$ -۲

ژنوتیپ/رقم	کنترل ($^{\circ}\text{C}$ ۲۰)	تیمار سرمایی ($^{\circ}\text{C}$ -۲)
H	۹۷/۶۷ ^a *	۷۹ ^a
Sh12	۸۵/۳۳ ^b	۲۴ ^c
G19	۷۴/۳۳ ^c	۴۲/۳۳ ^b
M3	۵۵/۳۳ ^d	۵ ^d *

*: میانگین‌ها با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در آزمون فیشر P-LSD ندارند ($P \leq 0.05$)



شکل ۱- جوانه‌زنی دانه‌گرده در محیط کشت. A و B نشان‌دهنده جوانه‌زنی دانه‌گرده در ژنوتیپ‌های H و M3 در تیمار سرمایی (-2°C) می‌باشد.



شکل ۲- مقدار قندهای محلول در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس بادام مورد مطالعه

می‌تواند از آسیب حاصل از تنش سرمزدگی و یخ‌زدگی بکاهد (Honty et al. 2008; Turhan and Ergin 2012). نتایج مطالعه‌ای که بر روی تغییرات قندهای محلول در اسپوره‌های ارقام انتخابی گلابی در جریان خواب درخت انجام شد، نشان داد که میزان قندهای محلول در جوانه‌های ارقام حساس کمتر از ارقام متحمل به سرما بود (Honty et al. 2008).

بررسی بیان ژن‌های درگیر در فرآیند متابولیک کربوهیدرات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

تجزیه واریانس نشان داد بیان ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل و در دماهای کنترل و تنش یخ‌زدگی اختلاف معنی‌داری دارند ($P < 0.01$)، که نشان‌دهنده واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها به تنش یخ‌زدگی است (جدول ۴).

در بین همه ژنوتیپ‌ها، G19 دارای بالاترین میزان قندهای محلول (۳۹ میلی‌گرم در گرم بافت تازه) بود، در حالی که M3 حاوی کمترین مقدار قندهای محلول (۱۹ میلی‌گرم در گرم بافت تازه) بود. در مجموع، میزان قندهای محلول در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس بیشتر بود، اگرچه اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های حساس در مقدار قندهای محلول وجود نداشت. بر اساس نتایج این مطالعه ارتباط مستقیمی بین میزان قند محلول و تحمل به یخ‌زدگی وجود دارد به گونه‌ای که ارقام دارای قند بالاتر، متحمل‌تر به تنش یخ‌زدگی می‌باشند. گیاهان برای تحمل به سرما مکانیسم‌های متعددی دارند که از جمله آن‌ها از دست دادن تدریجی آب، و افزایش غلظت مواد درونی مانند میزان قندهای محلول می‌باشد و به این ترتیب گیاه

بررسی رونوشت‌های ژن *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (*PdPEPcK*) نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از اعمال تنش سرمایی در دمای 0°C بیان این ژن به صورت معنی‌داری نسبت به دمای کنترل افزایش یافته بود (شکل ۳C). بیان *PdPEPcK* در دمای 2°C در ژنوتیپ‌های متحمل *G19* و *H* همچنان به مقدار زیاد به صورت افزایش بیانی نسبت به دمای 0°C مشاهده شد. در ژنوتیپ و رقم حساس *Sh12* و *M3* در دمای 2°C کاهش بیان را نسبت به دمای 0°C نشان داد. بیشترین بیان این ژن در ژنوتیپ‌های متحمل و در دمای 2°C مشاهده شد (شکل ۳C).

بررسی رونوشت‌های ژن *PdPGK* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها به جز رقم شاهرود ۱۲ (*Sh12*) (رقم حساس) پس از اعمال تنش سرمایی در تیمار 0°C بیان ژن به صورت معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش یافت (شکل ۳D). بیان *PdPGK* در دمای 2°C در ژنوتیپ متحمل *H* همچنان به صورت افزایش بیانی نسبت به دمای 0°C بود، اگرچه میزان بیان در ژنوتیپ *G19* نسبت به تیمار 0°C کاهش یافته بود. میزان بیان این ژن در ژنوتیپ حساس *M3* نسبت به تیمار 0°C کاهش داشت. بیشترین بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل *H* و در دمای 2°C مشاهده شد (شکل ۳D). بررسی رونوشت‌های ژن *PdSUS* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از اعمال تنش سرمایی در تیمار 0°C بیان ژن به صورت معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش یافته بود (شکل ۳E). بیان *PdSUS* در تیمار دمایی 2°C در ژنوتیپ‌های متحمل *H* و *G19* به صورت کاهش بیانی نسبت به دمای 0°C مشاهده شد، اگرچه نسبت به تیمار دمایی کنترل هنوز افزایش بیانی بود.

بررسی ژن *PdHEX1* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از ۳ ساعت تنش سرمایی در دمای 0°C بیان این ژن به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۳A). بیان *PdHEX1* در دمای 2°C در ژنوتیپ‌های متحمل *G19* و *H* همچنان به صورت افزایش بیانی بود، در حالی که در ژنوتیپ‌های حساس در این دما نسبت به دمای 0°C کاهش بیان را نشان داد. بیشترین بیان این ژن در ژنوتیپ *G19* و در دمای 2°C مشاهده شد (شکل ۳A). بررسی رونوشت‌های ژن *PdINV* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از اعمال تنش سرمایی در دمای 0°C بیان این ژن به صورت معنی‌داری افزایش یافته بود (شکل ۳B). بیان *PdINV* در دمای 2°C در ژنوتیپ‌های متحمل *G19* و *H* همچنان به صورت افزایش بیانی بود اگرچه در ژنوتیپ *G19* اختلاف معنی‌داری با میزان بیان در دمای 0°C وجود نداشت. در ژنوتیپ و رقم حساس شاهرود ۱۲ (*Sh12*) و *M3* در دمای 2°C کاهش بیان را نسبت به دمای کنترل نشان داد. بیشترین بیان این ژن (fold change ۱۰/۲) در ژنوتیپ *H* و در دمای 2°C مشاهده شد (شکل ۳B).

بررسی رونوشت‌های ژن *PdINV* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از اعمال تنش سرمایی در دمای 0°C بیان این ژن به صورت معنی‌داری افزایش یافته بود (شکل ۳B). بیان *PdINV* در دمای 2°C در ژنوتیپ‌های متحمل *G19* و *H* همچنان به صورت افزایش بیانی بود اگرچه در ژنوتیپ *G19* اختلاف معنی‌داری با میزان بیان در دمای 0°C وجود نداشت. در ژنوتیپ و رقم حساس *Sh12* و *M3* کاهش بیان را نسبت به دمای کنترل نشان داد. بیشترین بیان این ژن (fold change ۱۰/۲) در ژنوتیپ *H* و در دمای 2°C مشاهده شد (شکل ۳B).

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان ژن‌های درگیر در فرآیند متابولیک کربوهیدرات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت تنش سرمایی

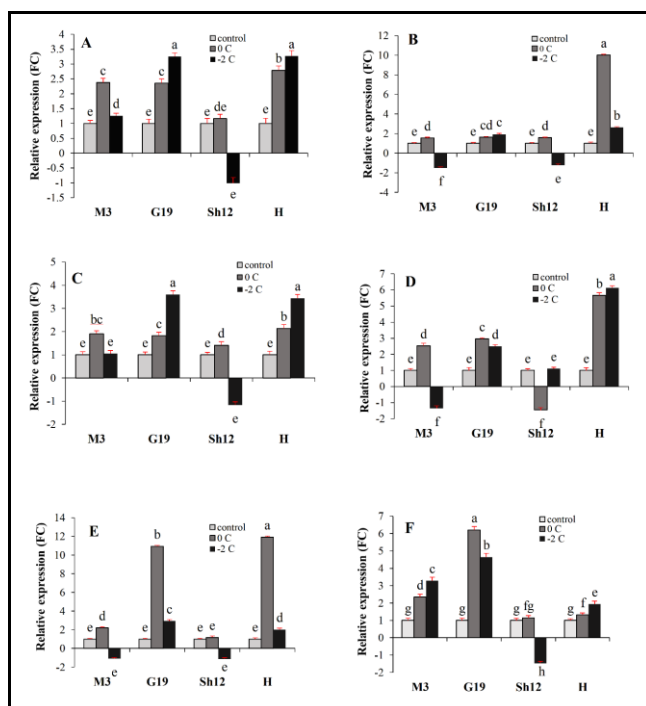
Source	DF	<i>PdHEX1</i>	<i>PdINV</i>	<i>PdSUS</i>	<i>PdPEPcK</i>	<i>PdPGK</i>	<i>PdUGPase</i>
Genotype	3	4.31 **	23.63 **	37.01 **	2.38 **	14.51**	13.74**
Temperature	2	4.60 **	22.65 **	97.38 **	5.26 **	18.04**	13.05**
Genotype*Temperature	6	1.12 **	16.62 **	24.84 **	1.81 **	4.26 **	4.42**
Error	24	0.016	0.041	0.070	0.017	0.025	0.0325
CV%		7.18	11.81	9.99	8.54	8.67	9.21

**: معنی‌داری در سطح ۱ درصد

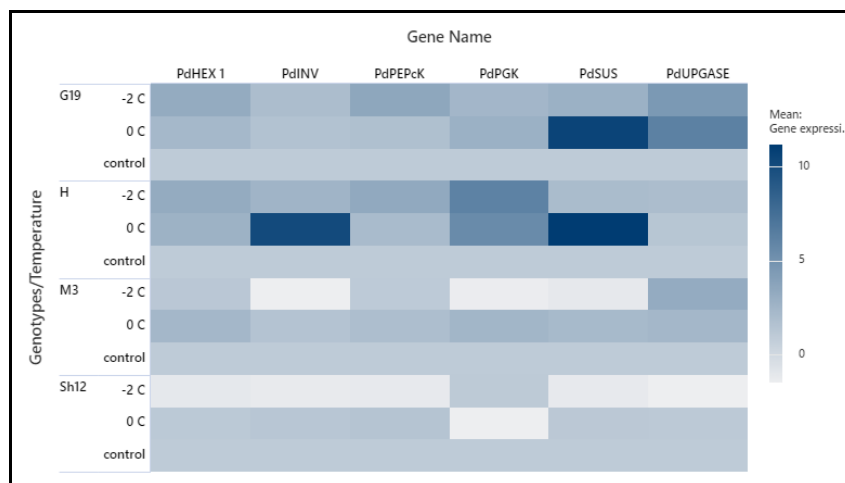
(2020). تنظیم اسمزی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی است (Holland et al. 1999; Ritonga and chen 2020). تجمع کربوهیدرات‌ها بخشی از برنامه‌ریزی‌های پیچیده گیاه است که پس از قرار گرفتن در معرض تنش سرمایی در جهت انجام تنظیم اسمزی اعمال خواهد شد (Klemens et al. 2013). مطالعات متعدد بیان متفاوت ژن‌های دخیل در فرآیند متابولیسم کربوهیدرات را در پاسخ به تنش سرما گزارش نموده اند (Mousavi et al. 2014a) با این حال، اطلاعات کمی در مورد الگوهای بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات‌ها در بادام به‌ویژه در بساک، وجود دارد. هگزوکینازها (HXKs) (EC 2.7.1.1) آنزیم‌های مهمی هستند که در سیتوزول، میتوکندری و پلاستیدهای گیاهان عالی وجود دارند. این آنزیم‌ها در فسفوریلاسیون قندهای هگزوزی مانند گلوکز و فروکتوز که در طی کاتابولیسم ساکارز تولید می‌شوند، درگیر می‌باشند (Galina et al. 1995; Schnarrenberger 1990).

میزان بیان این ژن در ژنوتیپ‌های حساس نسبت به تیمار دمایی 0°C کاهش بیان داشت. بیشترین بیان این ژن در ژنوتیپ‌های متحمل H و G19 در تیمار دمایی 0°C مشاهده شد (شکل ۳E). بررسی رونوشت‌های ژن *PdUGPase* نشان داد که در همه ژنوتیپ‌ها پس از اعمال تنش سرمایی در تیمار 0°C بیان ژن به‌صورت معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش یافته بود، اگرچه میزان افزایش بیان در ژنوتیپ متحمل H در مقایسه با ژنوتیپ متحمل G19 کمتر بود (شکل ۳F). بیان *PdUGPase* در تیمار دمایی 0°C -۲ در ژنوتیپ‌های متحمل H و G19 به‌ترتیب به‌صورت افزایش و کاهش بیانی نسبت به دمای 0°C بود، اگرچه نسبت به تیمار دمایی کنترل هنوز افزایش بیانی بود. میزان بیان این ژن در ژنوتیپ و رقم حساس M3 و Sh12 نسبت به تیمار دمایی 0°C به‌ترتیب به‌صورت افزایش و کاهش بیانی بود. بیشترین بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل G19 در تیمار دمایی 0°C مشاهده شد (شکل ۳F).

گیاهان از طریق فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین سلولی و مولکولی به تنش‌ها پاسخ می‌دهند (Ritonga and chen



شکل ۳- میزان بیان رونوشت ژن‌های (A) *PdHEX 1* (B) *PdINV* (C) *PdPEPcK* (D) *PdPGK* (E) *PdSUS* (F) و *PdUGPase* در بافت بساک بادام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه



شکل ۴- پروفایل بیانی رونوشت ژن‌های (A) *PdHEX 1*، (B) *PdINV*، (C) *PdPEPcK*، (D) *PdPGK*، (E) *PdSUS* و (F) *PdUGPase* در بافت بساک بادام در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه. ارزش نسبی سیگنال به صورت نوار رنگی آبی در سمت راست Heatmap ارائه شده است که در آن رنگ آبی کم‌رنگ نشان‌دهنده کاهش بیان و رنگ آبی پررنگ نشان‌دهنده افزایش بیان است.

و در مقابل کاهش بیان در رقم حساس به سرما (Sh12) مشاهده شده است، می‌تواند نقش این آنزیم‌ها را در مکانیسم تحمل به تنش سرما در بادام نشان دهد.

فسفوگلیسرآت کیناز (PGK; EC 2.7.2.3) تبدیل برگشت پذیر ۱، ۳-بیس فسفوگلیسرآت و ۳-فسفوگلیسرآت را در تولید یا استفاده از ATP کاتالیز می‌نماید (Troncoso-Ponce et al. 2012). این ژن از دسته ژن‌های زود پاسخ (early-responsive gene) به تنش سرما، شوری و خشکی است (Hashimoto and Komatsu 2007). آنزیم PEPcK در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و فرایندهای دیگری از جمله تنش‌های اکسیداتیو نقش دارد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، میزان بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های متحمل در مرحله اولیه تنش سرما (۰ °C) و ادامه تنش در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس به سرما بیشتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده نقش مثبت این ژن‌ها در تحمل بادام به تنش سرما باشد (شکل ۴).

UGPase یک آنزیم کلیدی تولید کننده UDP-گلوکز است که در مجموعه‌ای از مسیرهای متابولیکی مرتبط با سنتز ساکارز و سلولز نقش دارد (Ciereszko et al. 2001). در پاسخ به تنش سرما، افزایش بیان چندین ژن کدکننده آنزیم‌های کلیدی که در سنتز و متابولیسم ساکارز نقش دارد به‌عنوان بخشی از مکانیسم‌های سازگاری به تنش سرما پیشنهاد شده است (Couée et al. 2006; Klimov et al. 2002; Oliver et al. 2005).

القاء این آنزیم در گیاهان تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است (Sarowar et al. 2008). افزایش بیان رونوشت این آنزیم در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش سرما و کاهش بیان در ژنوتیپ‌های حساس مؤید نقش این آنزیم در تحمل به تنش سرما از طریق تنظیم اسمزی گیاه می‌باشد.

اینورتاز (INV) و سوکروز سینتاز (SUS) آنزیم‌های کلیدی هستند که مستقیماً در سنتز و یا تجزیه ساکارز نقش دارند (Dorion et al. 1996; Wang and Ruan 2016). اینورتاز به‌صورت اختصاصی در بساک فعال است و همچنین نقش آن در باروری دانه گرده گیاهان تحت تنش سرمایی و گرمایی مشخص شده است (Aloni et al. 2001). در مطالعات پیشین، بیان افتراقی رونوشت همولوگ اینورتاز (*PdINV*) تحت تنش یخ زدگی مشاهده شد (Mousavi et al. 2014a). در این مطالعه نیز افزایش بیان *PdINV* و *PdSUS* در تمام ژنوتیپ‌ها در مرحله اولیه تنش سرما (۰ °C) مشاهده شد. با این وجود، در تنش ۲- °C افزایش بیان این ژن‌ها به‌طور منحصراً به فرد در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما مشاهده شد (شکل ۴). در مقابل در رقم حساس به سرما شاهرود ۱۲ (Sh12) میزان بیان کاهش یافت. با توجه به گزارش‌هایی که اشاره به نقش این آنزیم‌ها در تنش سرما را نشان می‌دهد (Klimov et al. 2002; Oliver et al. 2005) و از طرفی در این مطالعه، بیان بالای *PdSUS* و *PdHEX1* تحت تیمار یخ‌زدگی در ژنوتیپ‌های متحمل

متابولیسم کربوهیدرات در پاسخ به تنش یخ زدگی در مطالعات قبلی نشان داده شده است. در این مطالعه، میزان قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل از نظر قند محلول اختلاف معنی‌داری با ارقام حساس دارند، از طرفی میزان بیان ژن‌های *PdHEX1*، *PdINV*، *PdPEPcK*، *PdPGK*، *PdSUS* و *PdUGPase* که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دخیل می‌باشد نیز در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما بیشتر بود. لذا به‌طور کلی می‌توان نتیجه نمود که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش یخ زدگی از طریق افزایش قندهای محلول و تنظیم اسمزی تحمل خود را در برابر تنش یخ‌زدگی افزایش می‌دهند. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند دیدگاه جدیدی را در مورد مکانیسم‌های پیچیده در طول تنش سرمازدگی بادم فراهم کند، بنابراین ممکن است برای بهبود ارقام بادم در برابر سرمای دیررس بهاره مفید باشد.

(Dong et al. 2020). نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *UGPase* در بادم تحت تنش سرما به شدت القاء می‌شود. اما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما (G19 و H) در تنش 2°C - بیشتر از ژنوتیپ و رقم حساس (M3 و Sh12) بود (شکل ۴). بیان بالای این ژن ممکن است همراه با سایر ژن‌ها با تحمل بادم در برابر تنش سرما مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان در مواجهه با تنش سرما با تغییرات بیوشیمیایی از جمله بیان پروتئین‌های مرتبط با تنش سرما، مانند دهیدرین‌ها و تجمع قندها به‌ویژه ساکارز سازگاری خود را افزایش می‌دهند (Turhan and Ergin 2012). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که نقش کربوهیدرات‌ها در حفاظت از یخ‌زدگی گونه‌های مختلف گیاهی با استفاده از مکانیزم تنظیم اسمزی بسیار برجسته و با اهمیت می‌باشد. بیان افتراقی ژن‌های دخیل در

منابع

Ahmadi-Teshniz F, Shiran B, Mousavi-Fard, S, Fallahi H, Banović Đeri B (2022) Identification and profiling of conserved microRNAs in different developmental stages of crown imperial (*Fritillaria imperialis* L.) using high-throughput sequencing. *Molecular Biology Reports* 49:1121–1132.

Aloni B, Peet M, Pharr M, Karni L (2001) The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiologia Plantarum* 112:505-512.

Ballester J, Socias i Company R, Arús P, De Vicente M (2001) Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding* 120:268-270.

Barros PM, Gonçalves N, Saibo NJ, Oliveira MM (2012) Functional characterization of two almond C-repeat-binding factors involved in cold response. *Tree physiology* 32:1113-1128.

Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski L (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 354:67-72.

Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* 57:449-459.

Deslauriers A, Garcia L, Charrier G, Buttò V, Pichette A, Paré M (2021) Cold acclimation and deacclimation in wild

blueberry: Direct and indirect influence of environmental factors and non-structural carbohydrates. *Agricultural and Forest Meteorology* 301:108349.

Dong W, Ma X, Jiang H, Zhao C, Ma H (2020) Physiological and transcriptome analysis of *Poa pratensis* var. anceps cv. Qinghai in response to cold stress. *BMC Plant Biology* 20(1):1-8.

Dorion S, Lalonde S, Saini HS (1996) Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiology* 111:137-145.

Gaeta L, Stellacci AM, Losciale P (2018) Evaluation of three modelling approaches for almond blooming in Mediterranean climate conditions. *European Journal of Agronomy* 97:1-10.

Galina A, Reis M, Albuquerque M, Puyou A, Puyou M, De Meis L (1995) Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochemical journal* 309:105-112.

Ghosh UK, Islam MN, Siddiqui MN, Khan MA (2021) Understanding the roles of osmolytes for acclimatizing plants to changing environment: a review of potential mechanism. *Plant Signaling & Behavior* 16:1913306.

Hashimoto M, Komatsu S (2007) Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress *Proteomics* 7:1293-1302.

Henny R (1977) Effect of sucrose level, medium composition and pH on the in vitro germination of pollen from *Spathiphyllum floribundum* (Linden & Andre) N. e

- Br. mauna Loa and Vriesea malzinei E. morr. In: Proceedings of the... annual meeting.
- Holland N, Sala J, Menezes H, Lafuente M (1999) Carbohydrate content and metabolism as related to maturity and chilling sensitivity of cv. fortune mandarins. *Journal of agricultural and food chemistry* 47:2513-2518
- Honty K, Sárdi É, Stefanovits-Bányai É, Tóth M (2008) Frost induced changes in enzyme activities and carbohydrate content in the spurs of some pear cultivars during the dormancy. *International Journal of Horticultural Science* 19:14:41-4.
- Imani A, Barzegar K, Piripireivatlou S, Masomi SH (2011) Storage of apple pollen and in vitro germination. *African Journal of Agricultural Research* 6:624-629.
- Kalberer SR, Wisniewski M, Arora R (2006) Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Science* 171:3-16.
- Karimi M, Ghazanfari F, Fadaei A, Ahmadi L, Shiran B, Rabei M, Fallahi H (2016) The Small-RNA Profiles of Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Reproductive Tissues in Response to Cold Stress. *PloS one* 11:e0156519.
- Klemens PA, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE (2013) Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 163:1338-1352.
- Klimov S, Popov V, Dubinina I, Burakhanova E, Trunova T (2002) The decreased cold-resistance of chilling-sensitive plants is related to suppressed CO₂ assimilation in leaves and sugar accumulation in roots. *Russian journal of plant physiology* 49:776-78.
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany* 63:1593-1608.
- Kruse EB, Revolinski S, Aplin J, Skinner DZ, Murray TD, Edwards CG, Carter AH (2020) Carbohydrate accumulation and differential transcript expression in winter wheat lines with different levels of snow mold and freezing tolerance after cold treatment. *Plants* 9:1416.
- Liu Y, Zhou J (2018) MAPping kinase regulation of ICE1 in freezing tolerance. *Trends in plant science* 23:91-93.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402-408.
- Moheb MB, Imani A, Shamili M (2018) The evaluation of almond progenies of cold-susceptible and cold-tolerant parents (Filippo-Ceo $\times$ Shahrood-12). *Scientia horticulturae* 234:176-183.
- Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, Fallahi H, Ebrahimie E, Imani A, Houshmand S (2014a) De novo transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress. *PloS one* 9:e104541.
- Mousavi SS, Shiran B, Imani A, Houshmand S, Ebrahimie E (2014b) Investigation of some physiological indices related to frost damage in almond genotypes with different flowering time. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing* 4:235-247 (in Farsi).
- Oliver SN, Van Dongen JT, Alfred SC, Mamun EA, Zhao X, Saini HS, Fernandes SF, Blanchard CL, Sutton BG, Geigenberger P (2005) Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant, Cell & Environment* 28:1534-1551.
- Orzechowski S, Sitnicka D, Grabowska A, Compart J, Fettke J, Zdunek-Zastocka, E (2021) Effect of Short-Term Cold Treatment on Carbohydrate Metabolism in Potato Leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22:7203.
- Ouyang L, Leus L, De Keyser E, Van Labeke MC (2020) Cold acclimation and deacclimation of two garden rose cultivars under controlled daylength and temperature. *Frontiers in plant science* 11:327.
- Palma F, Carvajal F, Lluch C, Jamilena M, Garrido D (2014) Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. *Plant Science* 217:78-86.
- Pang T, Ye CY, Xia X, Yin W (2013) De novo sequencing and transcriptome analysis of the desert shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, during cold acclimation using Illumina/Solexa. *BMC genomics* 14:1-5.
- Ritonga FN, Chen S (2020) Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants* 9:560.
- Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic journal of Biotechnology* 14:11.
- Sarowar S, Lee JY, Ahn ER, Pai HS (2008) A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. *Journal of Plant Biology* 51:341-6.
- Schnarrenberger C (1990) Characterization and compartmentation, in green leaves, of hexokinases with different specificities for glucose, fructose, and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta* 181:249-255.
- Silva C, Garcia-Mas J, Sánchez A, Arús P, Oliveira M (2005) Looking into flowering time in almond (*Prunus dulcis* (Mill) DA Webb): the candidate gene approach. *Theoretical and applied genetics* 110:959-968.
- Socias i Company R (1998) Fruit tree genetics at a turning point: the almond example. *Theoretical and Applied Genetics* 96:588-601.
- Sorkheh K, Azimkhani R, Mehri N, Chaleshtori MH, Halász J, Ercisli S, Koubouris GC (2018) Interactive effects of temperature and genotype on almond (*Prunus dulcis* L.) pollen germination and tube length. *Scientia horticulturae* 227:162-168.
- Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126:45-51.
- Troncoso-Ponce M, Rivoal J, Venegas-Calderón M, Dorió S, Sánchez R, Cejudo FJ, Garcés R, Martínez-Force E (2012) Molecular cloning and biochemical characterization of three phosphoglycerate kinase isoforms from developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Phytochemistry* 79:27-38.
- Turhan E, Ergin S (2012) Soluble sugars and sucrose-metabolizing enzymes related to cold acclimation of sweet

cherry cultivars grafted on different rootstocks. The Scientific World Article ID 979682, 7 pages.

Wang L, Ruan YL (2016) Critical roles of vacuolar invertase in floral organ development and male and female fertilities are revealed through characterization of GhVIN1-RNAi cotton plants. *Plant Physiology* 171:405-23.

Yousefzadeh K, Houshmand S, Shiran B, Mousavi-Fard S, Zeinali, H, Nikoloudakis N, Fanourakis D (2022) Joint effects of developmental stage and water deficit on essential oil traits (content, yield, composition) and related gene expression: A case study in two *Thymus* species. *Agronomy* 12:1008.