

ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوسنتز پلی‌آمین‌ها در گره ریشه نخود تلقیح شده با باکتری *Mesorhizobium ciceri* تحت تنش سرما

Evaluation of relative expression of polyamines genes in root nodules of chickpea inoculated with *Mesorhizobium ciceri* under cold stress

هلن پورمظاهری^۱، رضا معالی امیری^{۱*}، سعید امینی^۱

۱- به ترتیب پژوهشگر پسادکتری، استاد، دانش‌آموخته دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Poormazaheri H¹, Maali-Amiri R^{*1}, Amini S¹

1- Postdoctoral Researcher, Professor, PhD Graduated, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

در کشت پاییزه یا بهاره، رشد و عملکرد نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تاثیر تنش سرما کاهش می‌یابد. در این آزمایش پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی گره‌های دو ژنوتیپ متحمل به سرما (Sel96th11439) و حساس به سرما (ILC533) نخود تیمار شده با باکتری *Mesorhizobium ciceri* تحت تنش سرما (۴°C) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. تحت تنش سرما میزان شاخص خسارت سلولی از جمله پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در گره ژنوتیپ متحمل کاهش معنی‌دار (تا ۵۳ درصد) و در ژنوتیپ حساس افزایش معنی‌داری (تا ۳۲ درصد) در روز ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد نشان داد. تحت تنش سرما در گره ژنوتیپ متحمل، افزایش بیان ژن‌های *CaADC*، *CaODC*، *CaSPDS* و *CaSAMDC* سبب القاء مسیر بیوسنتزی و تجمع PAs شد. نتایج نشان داد که *CaADC* نقش مؤثرتری در فعالیت این مسیر بیوشیمیایی در مقایسه با *CaODC* داشت. بیشترین افزایش بیان نسبی ژن‌های مطالعه شده در روز ششم تنش سرما مشاهده شد که با کاهش شاخص خسارت سلولی (H₂O₂) و بهبود درجه تحمل به تنش سرما مطابقت داشت. این نتایج نشان داد که در گره نخود سازوکارهای فیزیولوژیکی-مولکولی درجه تحمل به تنش سرما را تعیین می‌کند. به‌طور کلی به‌کارگیری سوبه‌های ریزوبیوم کارآمد می‌تواند در توسعه رویکردهای به‌نژادی با هدف بهبود تحمل به تنش سرما در اثر همزیستی نخود-ریزوبیوم مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پراکسید هیدروژن
پلی‌آمین‌ها
تنش سرما
نخود زراعی

به دلیل تنوع ژنتیکی وسیع در ژنوتیپ‌های نخود، شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل در این گیاه بر اساس مطالعات امکان‌پذیر است (Heidarvand et al. 2011).

تنش دمایی از جمله تنش‌های محیطی است که نقش مؤثری در پراکنش گیاهان در مناطق مختلف دارد. در حدود ۲/۳ خشکی‌های سطح زمین سالانه تحت شرایط دمایی پایین‌تر از 20°C قرار می‌گیرند که اهمیت مطالعه جامع آثار تنش سرما بر روی گیاهان را نشان می‌دهد (Larcher et al. 2001). در پایه‌ریزی استراتژی مناسب برای افزایش تحمل سرما، درک سازوکارهایی که فرآیند سازگاری به سرما و تحمل به یخ‌زدگی/ سرما را هدایت می‌کنند، ضروری است. تنش سرما القاکننده فرایندهای اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی بوده و توسط گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^1) آغاز می‌شود و با تعداد زیادی از اجزای سلول از جمله ماکرو-مولکول‌های ضروری مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و به ویژه غشاها به عنوان اولین جایگاه خسارت برهمکنش دارند (Mittler 2002). شاخص‌های مختلفی جهت اندازه‌گیری میزان خسارت سلولی تنش سرما وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها پراکسید هیدروژن (H_2O_2^2) است که در غلظت‌های کم نقش پیام‌رسانی و القاء پاسخ‌های دفاعی و در غلظت‌های بالا سبب خسارت به بخش‌های مختلف سلولی می‌شود (Gupta et al. 2013).

به‌موازات متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های حدواسط در سازگاری کارکردی (عملکردی) در پاسخ به تنش‌های محیطی مؤثرند (Moore et al. 2014). به نظر می‌رسد پلی آمین‌ها^۳ (PAs) متابولیت‌های حدواسطی هستند که در پاسخ به تنش محتوی آن‌ها افزایش می‌یابد (Alcázar and Tiburcio 2018). PAs ترکیباتی ضروری برای بقا سلول هستند و در محافظت گیاه در برابر تنش نقش کلیدی دارند. مطالعات نشان داده که در پاسخ به دمای پایین، ارقام متحمل سرما میزان PAs بالاتری در مقایسه با ارقام حساس تولید می‌کنند (Alcázar et al. 2010a). PAs در فرم پلی کاتیون توسط برهمکنش با قطعات با بار منفی DNA، RNA و

نخود زراعی با نام علمی *Cicer arietinum* L. دومین لگوم از نظر سطح زیر کشت در جهان می‌باشد. این گیاه پس از لوبیا و نخود فرنگی مهم‌ترین لگوم فصل سرد است (Karami-Moalem et al. 2018). بذر این گیاه دارای ۳۱/۲-۱۶/۴ پروتئین، ۹-۱/۶ فیبر، ۳۸/۱-۷۳/۳ کربوهیدرات و ۱/۵-۶/۸ درصد چربی می‌باشد (Derya and Anlarsal 2010). مابین کشورهای تولیدکننده نخود، ایران حائز پایین‌ترین میزان تولید در واحد سطح (۵۳۰ کیلوگرم در هکتار) می‌باشد (FAO 2019). پایین بودن عملکرد نخود در ایران، غالباً به دلیل کشت ارقام کم محصول و حساسیت آن به تنش‌های محیطی مختلف می‌باشد. علی‌رغم وسعت کشت بالای این گیاه، تولید کل در اکثر کشورهای تولیدکننده نخود بسیار کم است و یک شکاف عمیق بین پتانسیل تولید (۵ تن در هکتار) و تولید واقعی (۰/۹ تن در هکتار) وجود دارد. نخود زراعی با سطحی بیش از ۱۴/۵۶ میلیون هکتار و تولید سالانه بیش از ۱۱/۵ میلیون تن کشت می‌شود (Merga and Haji 2019). میزان تولید نخود در ایران که در مقام هفتم دنیا قرار دارد ۰/۳ میلیون تن بوده و سهم آن در بین کشورهای تولیدکننده ۲/۳ درصد می‌باشد (FAO 2019).

نخود زراعی گیاهی حساس به تنش سرما می‌باشد که در ایران و مناطق مدیترانه به‌صورت بهاره کشت می‌شود. با توجه به مشکلات کشت بهاره نخود از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل، کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به نظر می‌رسد. از طرفی در کشت پاییزه و زمستانه (که به کشت انتظاری نیز معروف است)، گیاه به خوبی می‌تواند با دسترسی به آب بهتر، دوره رویشی و زایشی طولانی‌تر و انتقال بهتر آسیمیلات‌ها از بخش‌های رویشی و بهبود میزان نیتروژن مغذی بازده محصول تا بیش از دو برابر افزایش یابد (Berger 2007). در نتیجه استراتژی تغییر تاریخ کشت می‌تواند نه تنها در برابر تنش‌های انتهای فصل مفید باشد بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی‌تر بازده تولید را تا چند برابر افزایش دهد. اما مشکل عمده در این میان حساسیت ژنوتیپ‌های نخود زراعی به تنش سرما است، به‌طوری‌که تنش سرما رشد، نمو و عملکرد نخود را در بسیاری از نواحی ایران کاهش می‌دهد. با این وجود

¹ Reactive oxygen species

² Hydrogen peroxide

³ Polyamines

تثبیت زیستی نیتروژن، فرآیندی است که در آن N_2 به فرم قابل استفاده NH_3 تغییر می‌یابد. این فرآیند در طبیعت تنها توسط باکتری‌ها انجام‌پذیر است (Tejera et al. 2004). در لگوم‌ها و برخی دیگر از گیاهان، باکتری‌ها در بافت‌های کوچکی بر روی ریشه، به نام گره² زندگی می‌کنند. فرآیند تثبیت و گره‌زایی در لگوم‌ها حاصل همزیستی³ بین باکتری و گیاه است که به ریزوبیا معروف است و باعث تشکیل گره می‌شود. پس از ورود باکتری‌ها به گره ریشه فعالیت آنزیم دی نیتروژناز منجر به تثبیت نیتروژن توسط باکتری شده و NH_3 تولید شده توسط گیاه جذب می‌شود. باکتری‌های گره‌زا عضو جنس *Bradyrhizobium*، *Rhizobium*، *Mesorhizobium*، *Sinorhizobium* و *Azorhizobium* هستند که می‌توانند در اثر برهم‌کنش با ریشه لگوم‌ها، گره‌ها را تشکیل دهند که جایگاه تثبیت زیستی نیتروژن اتمسفری است (Relic et al. 1994). تنوع در عملکرد سیستم‌های همزیست به واسطه نوع سویه ریزوبیوم استفاده شده و همچنین رقم لگوم در چندین مطالعه تایید شده است (Tejera et al. 2004)، به این ترتیب با انتخاب ارقام مناسب لگوم تحت شرایط سرما و سویه‌های مطلوب ریزوبیوم می‌توان از طریق افزایش تثبیت نیتروژن، تولید محصول را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. با این وجود هنوز تحقیقی در مورد تاثیر سویه ریزوبیوم در همزیستی با نخود برای افزایش تحمل به تنش سرما انجام نشده است. تامین عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن از عوامل دخیل در ساخت متابولیت‌های دخیل در رشد و پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرما محسوب می‌شود. مسیر بیوسنتز PAs (به‌عنوان ترکیبات غنی از نیتروژن) یکی از راهبردهای دفاعی سلول در جهت بهبود پاسخ‌های دفاعی معرفی شده است. فعالیت مطلوب باکتری‌های همزیست با نخود و متعاقب آن تثبیت نیتروژن یکی از عوامل مهم در دستیابی به این هدف اصلاحی است. لذا در این تحقیق پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی گره‌های ریشه در ژنوتیپ‌های حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) گیاه نخود زراعی (*C. arietinum* L.) کشت شده در خاک‌های غنی شده با باکتری (*Mesorhizobium ciceri*) مطالعه شد. شناسایی نحوه تنظیم القایی

پروتئین در رشد، نمو و پاسخ سلول‌ها به تنش مؤثرند (Alcázar et al. 2010b). PAs بر اساس فراوانی به دو گروه رایج و غیر رایج¹ طبقه‌بندی می‌شوند. PAs رایج شامل Put، Spd و Spm هستند. PAs غیر رایج شامل هومواسپرمدین، آمینوپروپیل کاداوآرین، ترمو اسپرمین، نور اسپرمیدین (کالدین)، نور اسپرمین (ترمین)، کالدوپنتامین، هوموکالدوپنتامین، کالدوهگزامین و هوموکالدوهگزامین هستند (Alcázar and Tiburcio 2018). بنابراین به نظر می‌رسد که سازگاری به سرما در گیاهان می‌تواند یا با تنظیم میزان PAs و ژن‌های بیوسنتزکننده آن‌ها و یا با تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تغییر میزان PAs ایجاد شود (Cuevas et al. 2008). شناسایی نحوه عملکرد شبکه‌های متابولیکی و تعیین الگوی بیان ژن‌های مؤثر در این مسیرها در پاسخ به تنش سبب درک بهتر عملکرد سلول در سازگار شدن گیاهان به تنش شده و راهکاری مؤثرتر در به‌نژادی گیاهان جهت بهبود تحمل تنش می‌باشد (Kazemi-Shahandashti et al. 2014).

مابین PAs، پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd)، اسپرمین (Spm) و ترمو اسپرمین (T-Spm) که در یک مسیر بیوسنتزی پشت سر هم سنتز می‌شوند، در گیاهان به فراوانی وجود دارند. میزان فعالیت آنزیم‌های کلیدی در تنظیم مسیرهای متابولیکی PAs مؤثر است (Gupta 2012). Put از منشا آرژنین (Arg) و یا ارنیتین (Orn) به ترتیب توسط آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) و آنزیم ارنیتین دکربوکسیلاز (ODC) سنتز می‌شود. Put سپس به کمک آنزیم‌های اسپرمیدین سینتاز (SPDS) و اسپرمین سینتاز (SPMS) به ترتیب به تری‌آمین Spd و تترا آمین Spm تبدیل می‌شود. SPDS، Spd را از Put و یا اس‌آدنوزیل متیونین دکربوکسیله شده (dcSAM) می‌سازد. همچنین SPMS، Spm را از Spd و dcSAM می‌سازد. تشکیل dcSAM از SAM که توسط اس‌آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز (SAMDC) انجام می‌شود، مرحله محدود کننده سرعت در مسیر سنتز PAs است. از آنجا که مسیر بیوسنتز Spd و Spm با مسیر تولید گاز اتیلن رقابت می‌کند، کنترل دقیق تنظیم PAs نقش مؤثری در تثبیت متابولیسم سلولی و افزایش ظرفیت دفاعی سلول در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد (Moschou et al. 2012).

² Nod³ Symbiosis¹ Uncommon PAs

جهت اندازه‌گیری محتوی H_2O_2 ، ۰/۵ گرم از بافت گره در ازت مایع به کمک هاون چینی کوبیده و سپس درون پنج میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (TCA) مخلوط شدند. پس از آن مخلوط هم‌وزن شده با سرعت $12000 \times g$ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و ۰/۷۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۰/۷۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر از یدید پتاسیم یک مولار، درون یک کووت اضافه و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت و محتوای H_2O_2 با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده اندازه‌گیری شد. به منظور یافتن فرمول رگرسیونی رابطه میزان غلظت H_2O_2 و طول موج جذبی، غلظت‌های متفاوت از H_2O_2 به درون فالكون‌های متعدد داده و جذب نوری قرائت شد. پس از آن توسط دستگاه فرمول رگرسیون محاسبه و با کمک آن غلظت H_2O_2 استخراج شده از نمونه محاسبه شد (Loreto and Velikova 2001).

استخراج RNA کل سلولی از بافت گره توسط روش بایازول^۱ (فرژن پویش، تهران، ایران) از ۸۰ میلی‌گرم نمونه خرده شده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام و کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل یک درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 18S و 28S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ nm استفاده می‌شود. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمتاز تیمار شد. ۲ میکروگرم RNA، ۱ میکرولیتر بافر، ۱ واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای $37^\circ C$ قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه دردمای $65^\circ C$ قرارداده و تیوب‌ها دردمای $80^\circ C$ - نگاهداری شدند. پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگودی‌تی^۲ (۱ پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه دردمای $70^\circ C$

مسیرهای متابولیسمی بیوستنز PAS در گره ریشه به‌عنوان نشانگر آگاهی‌بخش در شناسایی مکانیسم‌های دخیل در رشد و نمو گیاه تحت تنش سرمای نخود معرفی شده به طوری که منجر به استعمال باکتری‌های همزیست ریشه در محیط رشد گیاه خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود زراعی Sel96th1439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) که در مطالعات پیشین، پاسخ‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی آن‌ها به سرما مطالعه شده، استفاده شد (Heidarvand et al. 2011). بذور با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای $23^\circ C$ به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها در گلدان‌های پر شده با ورمی‌کولیت:پرلیت (۳:۱) کشت و گلدان‌ها، روزانه با محلول غذایی فاقد نیتروژن آبیاری شدند. باکتری گرم منفی *Mesorhizobium ciceri* از گره ریشه نخود موجود در مزارع نخود جداسازی شده که به‌منظور تکثیر و نگهداری سویه از سوسپانسیون حاوی محیط کشت TY (حاوی ۵ گرم تریپتون، ۳ گرم عصاره مخمر، ۱/۳ گرم نمک کلسیم کلرید $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد (Beringer 1974). بذور پیش از کشت با یک میلی‌لیتر سوسپانسیون (غلظت 10^9 cell/ml از باکتری) تیمار شد و همچنین در هفته اول پس از انتقال به گلدان سه مرتبه و هر بار به میزان یک میلی‌لیتر سوسپانسیون به محیط کشت هر گیاهچه اضافه شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران قرار داده شدند. جهت بررسی پاسخ‌گره‌ها به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) با دمای چهار درجه سانتی‌گراد منتقل و نمونه‌گیری در روز اول (۲۴ ساعت) پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام گره ریشه) و روز سوم و ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گره ریشه) انجام گرفت.

¹ Biozol

² Oligo dt

مخلوط واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت دو دقیقه در دمای °C ۹۴ و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای °C ۹۵، ۱۰ ثانیه در دمای °C ۶۰ (دمای T_m آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای °C ۷۲ انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. پاسخ‌های مولکولی گره‌های گیاهچه‌های نخود تحت تیمارهای تنش سرما (یک، سه و شش روز پس از تنش سرما) با گره‌های گیاهان تحت شرایط شاهد (دمای °C ۲۳) مقایسه شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST^۲ استفاده شد (Pfaffl et al. 2001). تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H_2O_2 وجود داشت ($P < 0.01$) (جدول ۲)، که بیانگر تمایز در تجمع ROS تحت تنش سرما در گره ریشه نخود می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین H_2O_2 در گره‌ها نشان داد که تحت تنش سرما میزان H_2O_2 در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل تا ۲/۹ برابر بیشتر بود.

² Relative expression software tool

قرار می‌گیرد و پس از آن روی یخ سرد گذاشته شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات^۱ با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده و به مدت پنج دقیقه در دمای °C ۳۷ قرار داده شد. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به این محلول افزوده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای °C ۴۲ قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۷۰ قرار گرفتند. به منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار (*Actin1*) بر روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل یک درصد آگارز استفاده شد. طراحی آغازگر مسیر بیوسنتز PAS (*ADC*، *ODC*، *SPDS*، *SAMDC*) و همچنین ژن خانه‌دار *Actin1* که توالی آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمده (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام شد. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، سه میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسر و با غلظت ۱۰ میکرومول و پنج میکرولیتر نمونه cDNA ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن

¹ Deoxynucleothriphosphate

جدول ۱- ویژگی آغازگر ژن‌های مسیر بیوشیمیایی PAS نخود در کمیت‌سنجی سطوح RNA تحت تنش سرما.

Accession N.	Gene	Primer length (bp)	Sequence (5'-3')	T_m (°C)	Amplicon length (bp)
XM_004507452	<i>CaADC</i>	20 21	F:GTAGGGCCATTGTGTCTCAT R:GAGAGCCCTTCTCCCAAATAC	58	115
XM_004500845	<i>CaODC</i>	23 22	F:CACTCATTGGTACACTAGCTTCA R:GACTCGGATTACACGGGTTAG	58	130
XM_004489799	<i>CaSPDS</i>	21 21	F: GATGAGTGTGCCTACCAAGAG R: CCCATCTCCTCCACCAATAAC	58	93
EU924157	<i>CaSAMDC</i>	22 22	F:CGACGATGTTGACTCCTATGTT R:TCAGTATGGGTGGGATTGAAAG	58	116
EU529707	<i>CaActin1</i>	20 20	F:CTACGAATTGCCTGATGGAC R:CCTCCTGAAAGGACGATGTT	57	189

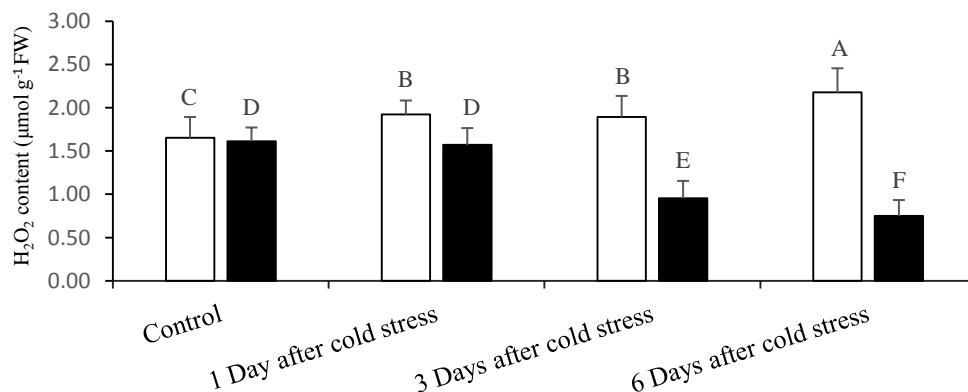
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیان نسبی ژن *CaADC* تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد در گره هردو ژنوتیپ متحمل و حساس به‌طور پیوسته افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان بیان نسبی این ژن در گره ژنوتیپ متحمل و حساس در روز ششم تنش سرما به‌ترتیب بیش از ۱۵ و شش برابر در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۲). بیان این ژن در گره ژنوتیپ متحمل، در روز ششم تنش سرما در مقایسه با ژنوتیپ حساس تا بیش از ۵۰ درصد بیشتر بود. بنابراین روند افزایشی در گره ژنوتیپ حساس کندتر از گره ژنوتیپ متحمل بود که حاکی از پاسخ با تاخیر و البته ظرفیت محدود ژنتیکی گره ژنوتیپ حساس در جهت ایجاد تحمل به سرما بود. نتایج بیان نسبی ژن *CaADC* با نتایج مطالعات قبلی بیان این ژن که تحت تنش شوری بررسی شده، مطابقت داشت و بیانگر نقش احتمالی این ژن در بیوستنز Put و تنظیم مسیر متابولیتی PAS در سطح رونویسی بود (Bouchereau et al. 1999). نتایج بررسی مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *CaODC* نشان داد که بیان این ژن تحت تنش سرما در هر دو ژنوتیپ به‌طور پیوسته تا روز سوم تنش سرما به‌ترتیب، ۷۷ و ۲۶ درصد کاهش یافت (شکل ۳)، در حالی‌که در روز ششم تنش سرما در گره هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش معنی‌داری (به‌ترتیب شش و سه برابر) در مقایسه با شاهد یافت.

در گره ژنوتیپ متحمل محتوی H_2O_2 در روز اول تغییر چندانی نداشت و پس از آن کاهش معنی‌داری در روز سوم و ششم تنش یافته، به‌طوری‌که حداقل میزان آن در روز ششم تنش مشاهده و تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد کمتر شد در حالی‌که تجمع آن در گره ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا ۵۳٪) (شکل ۱). در این مطالعه الگوی متمایزی در تجمع ROS در گره دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش سرما مشاهده شد، به‌طوری‌که مقایسه شاخص خسارت تاییدکننده درجه متفاوت تحمل سرما در گره این ژنوتیپ‌ها بود. عدم تغییر معنی‌دار در روز اول تنش سرما در گره ژنوتیپ متحمل، بیانگر نقش پیام‌رسانی H_2O_2 در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهان می‌باشد (Moschou et al. 2008; López-Gómez et al. 2017).

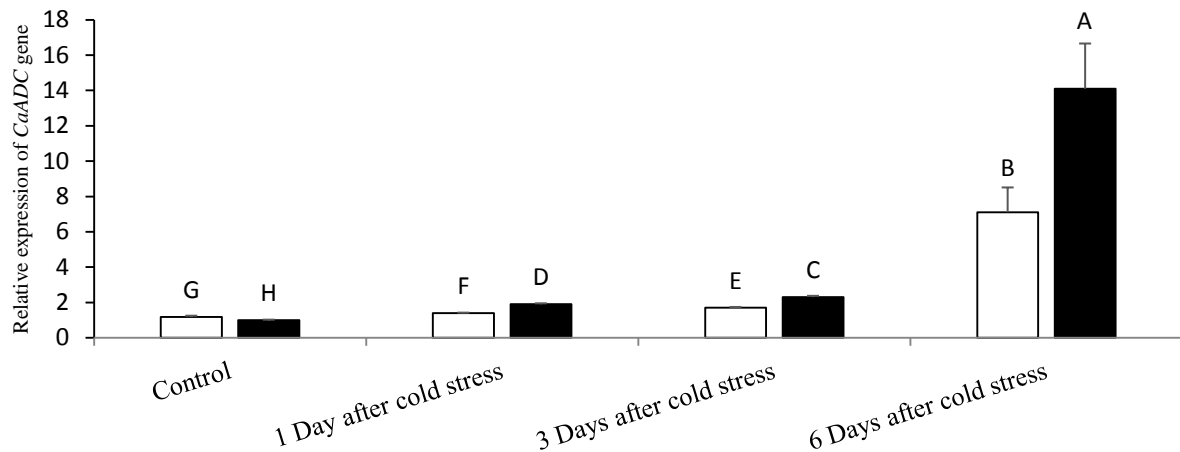
جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص خسارت (H_2O_2) در گره دو ژنوتیپ

حساس و متحمل نخود تحت تنش سرما		
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات H_2O_2
ژنوتیپ	۱	۲/۸۴۳۲**
دما	۳	۰/۱۳۹۸**
ژنوتیپ × دما	۳	۰/۵۷۵۷**
خطا	۱۶	۱
ضریب تغییرات (%)	۱/۴	

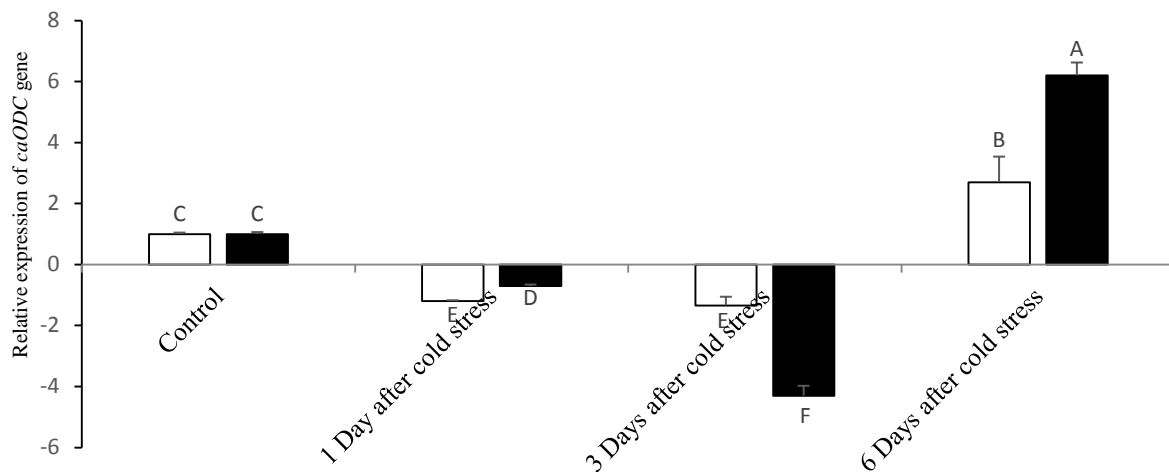
** بیانگر معنی‌داری در سطح یک درصد است.



شکل ۱- الگوی تغییر میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) گره ریشه در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط شاهد، روز اول، سوم و ششم تنش سرما $4^{\circ}C$.



شکل ۲- الگوی تغییر بیان نسبی ژن *CaADC* گره ریشه در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط شاهد، روز اول، سوم و ششم تنش سرما ۵°C.



شکل ۳- الگوی تغییر بیان نسبی ژن *CaODC* گره ریشه در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط شاهد، روز اول، سوم و ششم تنش سرما ۵°C.

مختلف هر دو ژن *ADC* و *ODC* و نقش تکمیلی آن‌ها (Alcázar et al. 2006; Hummel et al. 2004; Liu and Moriguchi 2007) اشاره دارد، تایید می‌شود. بنابراین تحت تنش سرما بیوسنتز Put وابسته به هر دو مسیر *CaADC* و *CaODC* در گره‌ها می‌باشد ولی احتمالاً مسیر غالب *CaADC* در مقایسه با *CaODC* می‌باشد که با نتایج مطالعه‌ای در گره ریشه *Phaseolu vulgaris* در اثر همزیستی با *Rhizobium tropici* تحت تنش شوری مطابقت دارد (López-Gómez et al. 2014b).

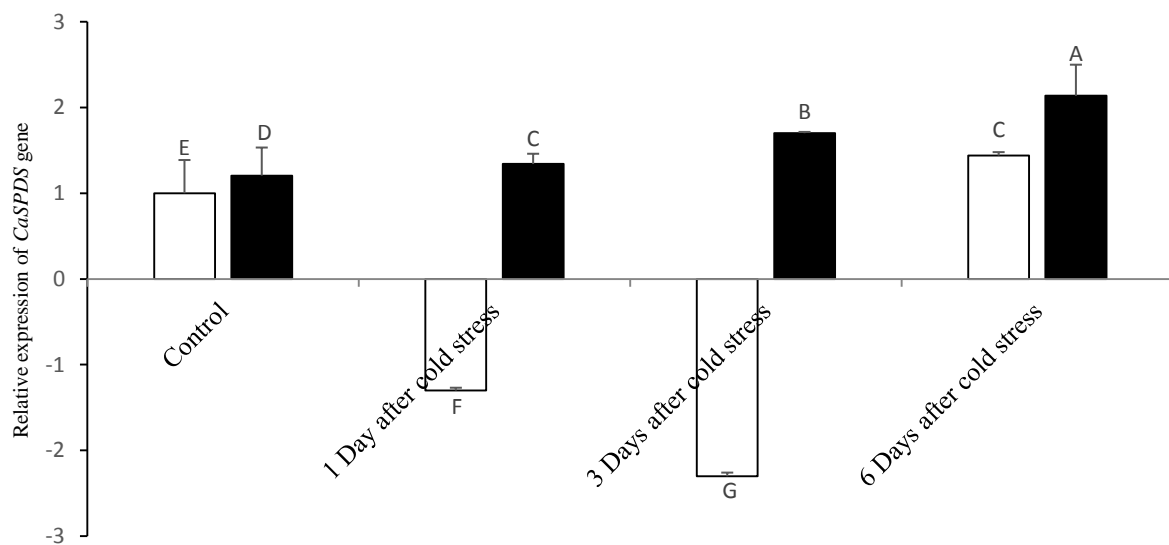
بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، میزان بیان نسبی توالی رمز کننده ژن *CaSPDS* در ژنوتیپ متحمل تحت تنش در مقایسه با

تحت تنش سرما، افزایش بیان ژن *CaADC* در مقایسه با کاهش بیان ژن *CaODC* تا روز سوم نشان داد که *CaADC* مسئول پاسخ به تنش سرما بوده، در حالی که *CaODC*، احتمالاً در پاسخ به تنش سرما تحت تیمارهای آزمایش تا روز سوم نقشی نداشته باشد (Bouchereau et al. 1999; Do et al. 2013). بیان نسبی ژن *CaODC* در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل حداکثر دو برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. چنین نتایجی نشان داد که افزایش بیان *CaADC* از طریق تجمع محتوی Put سبب تحمل سرما در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس شده است. این نتایج توسط گزارش‌های پیشین که به تشدید بیان ایزوفرم‌های

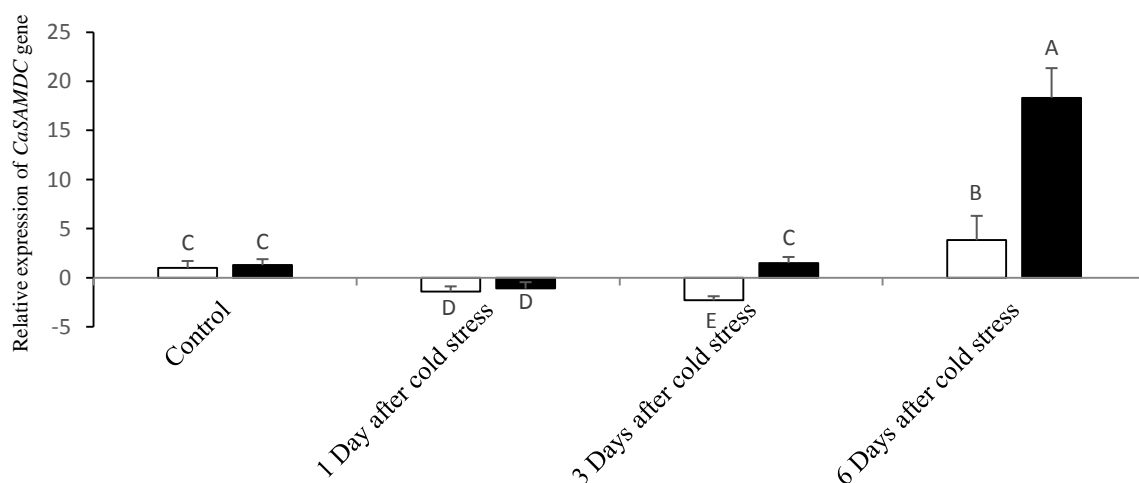
متحمل در امتداد با برنامه‌ریزی مجدد ژنوم و افزایش سطح رونویسی آن انجام شده است، فرایندی که درجه تمایز آن را از ژنوتیپ حساس نشان داد (Poormazaheri et al. 2020).

میزان بیان نسبی توالی رمزکننده ژن *CaSAMDC* در ژنوتیپ متحمل تحت تنش سرما در روز اول تنش سرما در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته و مجدداً در روز سوم و ششم تنش سرما به طور معنی‌داری افزایش یافت (به تقریب حداکثر تا بیش از ۱۴ برابر)، به طوری‌که در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل حداکثر میزان بیان نسبی این ژن مشاهده شد.

شاهد به طور پیوسته افزایش (تقریباً حداکثر تا بیش از دو برابر) یافت، در حالی‌که در ژنوتیپ حساس بیان نسبی این ژن تا روز سوم تنش سرما به طور پیوسته کاهش و در روز ششم تا بیش از ۱/۵ برابر افزایش یافت. میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (حداکثر تا بیش از ۱/۵ برابر در روز ششم پس از تنش سرما) (شکل ۴). بر اساس گزارشات گیاهان تراریخت شده با ایزوفرم‌های ژن *SPDS* تحمل بهبود یافته‌ای به تنش‌های زیستی و غیرزیستی داشته‌اند (Wen et al. 2008; Rodríguez-Kessler et al. 2008). یافته‌ها نشان داد که افزایش محتوی Spd تحت تنش سرما مخصوصاً در ژنوتیپ



شکل ۴- الگوی تغییر بیان نسبی ژن *CaSPDS* گره ریشه در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط شاهد، روز اول، سوم و ششم تنش سرما ۴°C.



شکل ۵- الگوی تغییر بیان نسبی ژن *CaSAMDC* گره ریشه در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط شاهد، روز اول، سوم و ششم تنش سرما ۴°C.

چندین کشور نظیر تونس اثرات مثبت سویه‌های ریزوبیوم در جهت بالا بردن تولید محصولات در همزیستی نخود-ریزوبیوم مورد بررسی قرار گرفته و اهمیت سویه ریزوبیوم در بهبود پتانسیل محصولات از طریق فرآیند تثبیت نیتروژن پیشنهاد شده است (Vadez et al. 2000). نقش سویه ریزوبیوم و نوع گیاه میزبان در بهبود عملکرد همزیستی در مورد سایر لگوم‌ها نظیر نخود فرنگی (Fesenko et al. 1994; Oliveira et al. 2017) نیز گزارش شده است. بنابراین از طریق بهبود تثبیت نیتروژن و احتمال بهبود سطح تحمل به شرایط تنش به افزایش بهره‌وری در بخش کشاورزی می‌توان اقدام کرد (Aydi et al. 2004). ارتباط بین سطح تجمع PAS و همزیستی در این است که باکتری‌های همزیست (ریزوبیا)، به میزان پنج تا ده برابر بیش‌تر از سایر اندام‌های گیاه PAS را در گره ریشه حبوبات ذخیره می‌کنند. میزان PAS به فعالیت نیتروژناز ریزوبیا بستگی دارد و بسیاری از مطالعات تجمع پلی‌آمین‌هایی مانند هموسپرمیدین در گره ریشه *Phaseolus medicago sativa* (López-Gómez et al. 2014a) و *vulgaris vulgaris* (López-Gómez et al. 2014b) یا تجمع ۴-آمینوبوتیل کاداورین^۱ در گره ریشه *Vigna angularis* (Fujihara et al. 1995) و *P. vulgaris* (López-Gómez et al. 2014b) را در افزایش تحمل به تنش توسط توانایی ریزوبیا در تثبیت نیتروژن گزارش کرده‌اند و بالاتر بودن میزان PAS در گره ریشه ژنوتیپ متحمل احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت آنزیم نیتروژناز، منجر به افزایش تحمل تنش سرما ژنوتیپ متحمل در برابر ژنوتیپ حساس شده است. نتایج این پژوهش از مشارکت و القا متمایز بیان ژن‌های مسیر بیوستنز PAS (*CaADC*, *CaODC*, *CaSPDS*، *CaSAMDC*) در بهبود تحمل نخود تحت تنش سرما حمایت می‌کند، نتایجی که توسط شاخص‌های خسارت (نتایج H_2O_2) نیز به اثبات رسیده است. این یافته که در گره‌های گیاهچه نخود مسیر متابولیک PAS به‌عنوان اسموپروتکتنت سلولی فعالیت شدیدتری دارند، سبب کاهش میزان آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) و در نتیجه تحمل بیشتر به تنش سرما می‌شود. تامین عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن از عوامل دخیل در ساخت متابولیت‌های دخیل در

از سوی دیگر میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ حساس تا روز سوم تنش سرما در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و مجدداً در روز ششم تنش سرما به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (به تقریب حداکثر تا بیش از چهار برابر). با این وجود میزان بیان این ژن در روز ششم تنش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (به تقریب حداکثر تا بیش از شش برابر) (شکل ۵).

کمتر بودن میزان بیان نسبی این ژن در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیانگر ظرفیت ژنتیکی محدود ژنوتیپ حساس بوده که منجر به پاسخ ضعیف و با تاخیر این ژن تحت تنش سرما شده است. تطابق تغییر بیان نسبی این ژن با تغییر محتوی Spd و Spm نقش احتمالی محصول این ژن در مشارکت با محصولات ژن‌های *CaSPDS* و *CaSPMS* را در سنتز این متابولیت‌ها اثبات می‌کند (López-Gómez et al. 2020; Poormazaheri et al. 2016).

بنابراین افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوستنز PAS با القاء تجمع PAS سبب تحمل بهتر سرما در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس نخود شده است. گزارش‌های پیشین نیز وجود ارتباط مابین افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوستنز PAS در بهبود تحمل به تنش شوری در آزمایشات همزیستی با *P. vulgaris* را تایید کرده‌اند (Hernandez-Lucero et al. 2008; López-Gómez et al. 2016). با این وجود در برخی مطالعات، بیان ژن *SAMDC* تحت تنش افزایش یافته اما به دلیل سایر تنظیمات در سطح فعالیت آنزیمی تجمع Spd و Spm افزایش نیافته است (Tiburicio et al. 2014). در گیاهان اغلب القا بیان ایزوفرم‌های مختلف ژن *SAMDC* به موازات افزایش بیان ایزوفرم‌های ژن‌های *ADC* و *SPMS* تحت تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (Liu et al. 2009; Wang et al. 2011a). در گیاهان تراریخت نیز، تشدید بیان ژن‌های مسیر بیوستنز PAS از طریق تجمع این گروه متابولیتی سبب افزایش تحمل تنش شده است (Gill and Tuteja 2010; Wang et al. 2011b).

با انتخاب ارقام مناسب لگوم تحت شرایط سرما و سویه‌های مطلوب ریزوبیوم می‌توان از طریق افزایش تثبیت نیتروژن، تولید محصول را به‌میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. اخیراً در

¹ 4-aminobutylcadaverine (4-ABcad)

احتمالاً کاربرد جدیدی را در استعمال باکتری‌های همزیست ریشه نخود جهت بهبود تحمل سرما در برنامه‌های کشاورزی پایدار پیشنهاد می‌کند. به نظر می‌رسد مطالعه این فرایندها که غالباً با القای سامانه‌های دفاعی همراه است، به درک بهتر نحوه بهبود تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد. با توجه به چالش‌های زیست‌محیطی، آثار استعمال باکتری‌های همزیست ریشه بر عملکرد و کیفیت نخود باید به‌طور جامع مطالعه شود.

رشد و پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرما محسوب می‌شود. در این پژوهش مسیر بیوسنتز PAs (به‌عنوان ترکیبات غنی از نیتروژن) یکی از راهبردهای دفاعی سلول در جهت بهبود پاسخ‌های دفاعی معرفی شد. فعالیت مطلوب باکتری‌های همزیست با نخود و متعاقب آن تثبیت نیتروژن احتمالاً از عوامل مهم در دستیابی به این هدف اصلاحی می‌باشد که نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد. این نتایج به نقش بیوسنتزی PAs به‌عنوان نشانگرهایی آگاهی‌بخش در شناسایی باکتری‌های همزیست مطلوب تحت تنش سرما اشاره می‌کند. این یافته‌ها

منابع

Alcázar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF (2006) Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology Plantarum* 128:448-455.

Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Altabella T (2010a) Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology Biochemistry* 48: 547-552.

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Tiburcio AF (2010b) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231: 1237-1249.

Alcázar R, Tiburcio AF (Eds.) (2018) Polyamines: Methods and Protocols. Humana Press.

Aydi S, Drevon JJ, Abdelly C (2004). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:833-840.

Berger JD (2007) Ecogeographic and evolutionary approaches to improving adaptation of autumn-sown chickpea (*Cicer arietinum* L.) to terminal drought: the search for reproductive chilling tolerance. *Field Crops Research* 104: 112-122.

Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Gen Microbiol* 84: 188-198.

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125.

Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcazar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A (2008) Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* 148: 1094-1105.

Derya Yucel, Anlarsal AE (2010) Determination of selection criteria with path coefficient analysis in chickpea

(*Cicer arietinum* L.) breeding. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 16: 42-8.

Do PT, Degenkolbe T, Erban A, Heyer AG, Kopka J, Köhl KI, Zuther E (2013). Dissecting rice polyamine metabolism under controlled long-term drought stress. *PLoS One* 8: e60325.

FAO (2019) The global economy of pulses. Food and Agriculture Organization of United Nations Rome.

Fesenko AN, Provorov NA, Orlova IF, Simarov BV (1994). The role of the pea (*Pisum sativum* L.) cultivar genotype and *Rhizobium leguminosarum* strain in the effectiveness of symbiosis. *Genetika* 30:725-729.

Fujihara S, Abe H, Yoneyama T (1995). A new polyamine 4-aminobutylcadaverine – occurrence and its biosynthesis in root-nodules of adzuki bean plant *vigna angularis*. *Journal of Biology Chemistry* 270: 9932-9938.

Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry* 48: 909-930.

Gupta A (2012). Analysis of fruit characteristics in transgenic tomatoes with RNAi mediated silencing of ACC synthase genes and over expression of polyamine biosynthesis genes.

Gupta K, Dey A, Gupta B (2013). Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol Plant* 35: 2015-2036.

Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 157-163.

Hernández-Lucero E Ruiz O, Jiménez-Bremont JF (2008) Effect of salt stress on polyamine metabolism in two bean cultivars. *Plant Stress* 2: 96-102.

Hummel I, Gouesbet G, El Amrani A, Aïnouche A, Couée I (2004) Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression

- during development and response to environmental stress. *Gene* 342: 199-209.
- Karami-Moalem S, Maali-Amiri R, Kazemi-Shahandashti SS (2018) Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry* 122: 31-39
- Kazemi-Shahandasht SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology* 171: 1106-1116.
- Larcher W (2001) *Okophysiologie der Pflanzen*: (SE Ulmer) ed (p. 302). Stuttgart: Eugen Ulmer.
- Liu JH, Moriguchi T (2007) Changes in free polyamines and gene expression during peach flower development. *Biology Plantarum* 51: 530-532.
- Liu JH, Ban Y, Wen XP, Nakajima I, Moriguchi T (2009) Molecular cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from peach (*Prunus persica*). *Gene* 429:10-17.
- López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Iribarne C, Lluch C (2014a). Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant and soil* 374: 149-159.
- López-Gómez M, Cobos-Porras L, Hidalgo-Castellanos J, Lluch C (2014b) Occurrence of polyamines in root nodules of *Phaseolus vulgaris* in symbiosis with *Rhizobium tropici* in response to salt stress. *Phytochemistry* 107:32-41.
- López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Lluch C, Herrera-Cervera A (2016) 24-Epibrassinolide ameliorates salt stress effects in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* and regulates the nodulation in cross-talk with polyamines. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 212-221.
- López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Muñoz-Sánchez JR, Marín-Peña AJ, Lluch C, Herrera-Cervera JA (2017) Polyamines contribute to salinity tolerance in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* by preventing oxidative damage. *Plant Physiology and Biochemistry* 116: 9-17
- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787.
- Merga B, Haji J (2019) Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture* 5: 1615718.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science* 7: 405-410.
- Moore BD, Andrew RL, K€ulheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytology* 201: 733-750.
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* 147: 1845-1857.
- Moschou PN, Wu J, Cona A, Tavladoraki P, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA (2012) The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 63:5003-5015.
- Oliveira RS, Carvalho P, Marques G, Ferreira L, Nunes M, Rocha I, Freitas H (2017). Increased protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with *arbuscular mycorrhizal* fungi and nitrogen-fixing bacteria under water deficit conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:4379-4385.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR.
- Poormazaheri H, Maali-Amiri R, Amini S (2020). Evaluation of symbiotic effects of *Mesorhizobium cicer* on cold stress tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) 16th National Conference of Agronomy and Plant Breeding Ahvaz Iran from 25th to 27th Januray.
- Relic B, Perret X, Estrada-García MT, Kopcinska J, Golinowski W, Krishnan HB, Pueppke SG, Broughton WJ (1994) Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Molecular Microbiology* 13: 171-178.
- Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF (2008) Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 805-814.
- Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C (2004) Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant physiology* 161: 329-338.
- Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M, Alcázar R (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240: 1-18.
- Vadez V, Sinclair TR, Serraj R (2000) Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiologia Plantarum* 110: 215-223.
- Wang BQ, Zhang QF, Liu JH, Li GH (2011a) Overexpression of *PtADC* confers enhanced dehydration and drought tolerance in transgenic tobacco and tomato: Effect on ROS elimination. *Biochemistry and Biophysical Research Communes* 413: 10-16.
- Wang J, Sun PP, Chen CL, Wang Y, Fu XZ, Liu JH (2011b) An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62: 2899-2914.
- Wen XP, Pang XM, Matsuda N, Kita M, Inoue H, Hao YJ, Moriguchi T (2008) Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. *Transgenic Research* 17: 251-263