

تأثیر سازگاری کوتاه‌مدت در تحمل به تنش سرما در نخودهای کابلی و دسی ایران

Effect of short-term cold acclimation on cold stress of Iranian Kabuli and Desi chickpea genotypes

سعید امینی^۱، رضا معالی امیری^{۱*}

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

Amini S¹, Maali-Amiri R^{*1}

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

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

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

در این تحقیق پاسخ‌های القا شده ژنوتیپ‌های نخود کابلی و دسی پس از دوره کوتاه مدت سازگاری (۱۰°C) به تنش سرما از طریق شاخص‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شد. سازگاری به سرما، آمادگی بیشتری را در مقابله با تنش سرما در ژنوتیپ کابلی در مقایسه با ژنوتیپ دسی ایجاد کرد به طوری که کم‌ترین میزان خسارت و بیش‌ترین میزان فعالیت سیستم دفاعی سلول در این شرایط به دست آمد. تغییر هم‌زمان الگوی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که با تغییر شاخص‌های خسارت نشت الکترولیتی غشا (ELI) و میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂) مرتبط بود، گویای آن است که فعالیت این آنزیم‌ها احتمالاً در همراهی با سایر مکانیسم‌های دفاع سلولی، تحمل به تنش سرما را در نخود افزایش داد. نتایج حاکی از وجود تفاوت در الگوی بیان دو ژن کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در ژنوتیپ‌ها تحت تیمارهای دمایی بود. افزایش معنی‌دار بیان هر دو ژن در ژنوتیپ کابلی در مقایسه با ژنوتیپ دسی الگوی کلی پاسخ‌های برنامه‌ریزی شده سلول را به موازات افزایش در فعالیت آنزیم‌ها نشان داد که با شاخص خسارت کمتر غشاء در ژنوتیپ کابلی همراه بود. بنابراین دوره‌های سازگاری کوتاه مدت سبب افزایش ظرفیت ژنتیکی تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های نخود شده به طوری که درجه تحمل در ژنوتیپ کابلی بیش‌تر از ژنوتیپ دسی بود. چنین شاخص‌هایی ممکن است در ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود به تنش سرما به همراه تیمارهای تنش کوتاه مدت که موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه پژوهش شده، مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

بیان ژن

سرما

سازگاری کوتاه مدت

شاخص خسارت

مقدمه

نخود زراعی با نام علمی *Cicer arietinum* L. پس از لوبیا و نخودفرنگی مهم‌ترین لگوم فصل سرد است و با توجه به مزایای تغذیه‌ای و غنی‌سازی خاک امروزه در ۵۲ کشور جهان به‌ویژه در نواحی خشک و نیمه خشک کشت می‌شود (Varshney et al. 2014). کشت بهاره در نواحی خشک و نیمه خشک باعث شده تا محصول در معرض تنش خشکی و گرمای انتهای فصل قرار گرفته و با کاهش بازده تولیدی همراه باشد. از طرفی درکشت پاییزه و زمستانه گیاه، با دسترسی مطلوب‌تر به آب، دوره زایشی طولانی‌تر و انتقال بهتر اسیمیلات‌ها از بخش‌های رویشی و هم‌چنین بهبود میزان ازت مغذی، بازده محصول تا بیش از دو برابر افزایش می‌یابد. در نتیجه استراتژی تغییر تاریخ کشت نه تنها گیاه را در برابر تنش‌های خشکی و گرمای انتهای فصل حمایت کند بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی‌تر می‌تواند بازده را تا چند برابر افزایش دهد (Yadav et al. 2006). با این وجود، حساسیت گیاه نخود به تنش سرما به‌عنوان مهم‌ترین چالش در کشت‌های پاییزه و زمستانه مطرح شده است. بنابراین لزوم شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما و درک مکانیسم‌های آن و اجرای برنامه‌های تحمل به تنش سرما راه‌کار اقتصادی و به لحاظ زیست محیطی قابل قبول در افزایش عملکرد نخود است (Heidarvand et al. 2011). تنش سرما مانند سایر تنش‌های زنده و غیرزنده، باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۱ می‌شود که بر روی عملکرد اثر گذاشته و به‌علت ظرفیت بالای اکسیداسیونی باعث تجزیه پلی‌ساکاریدها، دنا توره شدن پروتئین‌ها و آسیب به DNA می‌شوند (Gill and Tuteja 2010). در طبیعت القای تحمل به سرما با استقرار تدریجی گیاه در دماهای پایین اما بالای صفر درجه سانتی‌گراد ایجاد می‌شود، فرآیندی که سرما سازگاری^۲، نامیده می‌شود (Thomashow 2001). سرما سازگاری از طریق تغییرات متعدد در بیان ژن، کاهش یا توقف رشد، تغییر در ترکیب لیپیدی غشا، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های سلولی انجام می‌شود (Nayyar et al. 2005). این تغییرات، به‌طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده

و بنابراین به‌عنوان عناصر فعال در تحمل به تنش‌های محیطی به‌خصوص تنش سرما محسوب می‌شوند. بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی این گروه با تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی وجود دارد. تحت تنش سرما سلول‌ها یا خود را با شرایط جدید سازگار می‌کنند یا اینکه به‌علت عدم پاسخ مناسب از بین می‌روند. از روش‌های فیزیولوژیکی مانند شاخص نشت الکترولیتی (ELI)^۳، پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و روش‌های بیوشیمیایی مانند اندازه‌گیری آنزیم‌های سیستم دفاعی برای ارزیابی پاسخ نخود به تنش سرما استفاده شده است (Nazari et al. 2012; Kazemi Shahandashti et al. 2013). گیاهان برای دستیابی به پاسخ مناسب به تغییرات محیطی بیان بسیاری از ژن‌ها را تغییر می‌دهند. اما به‌دلیل پیچیدگی، شناخت دقیق و کاملی از پاسخ ژنتیکی و نقش ژنوم در این مسیر وجود ندارد (Amini et al. 2017). بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش سرما می‌تواند به طرز سودمندی توجیه‌کننده تغییرات متابولیکی گیاه در جریان سازگاری به سرما باشد و محققان را در روشن شدن پاسخ‌های مختلف گیاهان هدایت کند. تلاش برای اصلاح ژنوتیپ‌های نخود متحمل به سرما سال‌هاست مورد توجه محققین بوده به‌طوری‌که در برخی نواحی، ژنوتیپ‌های متحمل به سرما جهت کشت پاییزه شناسایی شده‌اند (Singh et al. 1995; Srinivasan et al. 1998). در کشور ایران علی‌رغم وجود ژرم‌پلاسماهای غنی نخود، اطلاعات محدودی در زمینه تنوع ژنوتیپ‌ها وجود دارد. به موازات کشت نخود کابلی که اکثریت سطح کشت نخود کشور را به خود اختصاص داده، نخود سیاه (نخود دسی) با صفات مناسب تغذیه‌ای از درصد فیبر بیشتری برخوردار بوده (Rossi et al. 1984) و تحمل ژنتیکی بیشتری در مقایسه با نخود کابلی به تنش‌های محیطی مانند خشکی یا آفات نشان می‌دهد (Yadav et al. 2006). تاکنون تحقیقات فراوانی در خصوص تحمل به تنش‌های خشکی و تحمل به آفات در نخود-های زراعی و وحشی انجام گرفته (Toker 2005)، لیکن در زمینه تحمل به تنش سرما در خصوص نخود سیاه گزارش‌های کمی وجود دارد (Nazari et al. 2012). هدف از این تحقیق، مطالعه میزان تحمل تنش سرما در ژنوتیپ‌های کابلی و دسی بود. نظر به

¹ Reactive Oxygen Species² Cold acclimation³ Electrolyte Leakage Index

(2013). به‌منظور سرماسازگاری کوتاه مدت، گیاهچه‌ها یک روز در این دما نگهداری شدند. سپس به دمای 10°C - به مدت ۱۵ دقیقه انتقال یافتند. تیمارهای آزمایش شامل تیمار کنترل 23°C ، تیمار سازگاری 10°C و تیمار سرما 10°C - برای گیاهان سازگار شده بود. نمونه‌گیری از برگ‌های میانی گیاهان انجام شد. نمونه‌های گیاه بلافاصله پس از نمونه‌گیری در فریزر 80°C - تا زمان آزمایش نگهداری شد.

در اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیتی از برگ‌های بخش میانی ساقه (برگ‌های این قسمت از نظر اندازه و سبزینه یکنواختی بیشتری دارند) استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلا هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab، آلمان) قرائت شد. سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC2) پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب جوش (95°C) و ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر تعیین شد و در نهایت میزان شاخص خسارت براساس فرمول زیر محاسبه شد (Popov et al. 2005).

$$I = EC1/EC2 * 100$$

استخراج H_2O_2 و سنجش آن در این آزمایش بر اساس روش Loreto and Velikova (2001) صورت گرفت. کلیه مراحل کار باید در محیط تاریک و اتاق سرد انجام شود. برای استخراج، 0.35 گرم نمونه‌های گیاهی تازه با نیتروژن مایع در هاون خرد شده تا به‌صورت پودر درآیند. پودر تهیه شده به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار پنج میلی‌لیتر محلول اسید تری کلرواستیک یک درصد (محلول در حمام یخ قرار داده شود) به ویال اضافه شد. ویال حاوی نمونه یکنواخت شده در دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ سانتریفوژ شد. سپس 0.5 میلی‌لیتر از مایع رویی به یک ویال جدید حاوی 0.5 میلی‌لیتر بافر فسفات 10 میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم اضافه شد و درپوش ویال را بسته و با چندین مرتبه سر و ته کردن، محتوای ویال یکنواخت شد (در تاریکی).

اینکه کشت‌های پاییزه در کشور اغلب در آبان ماه با روند کاهش تدریجی دما همراه می‌باشد و پس از آن دما کاهش نسبتاً شدیدی تا سطح یخ‌زدگی می‌یابد، لذا در این آزمایش دوره‌های کوتاه مدت سرما سازگاری به‌همراه دمای یخ‌زدگی با توجه الگوی تغییرات دمایی طبیعت در ارزیابی تحمل به تنش سرما استفاده شده‌است. بنابراین به‌دلیل پیچیدگی فرایند سازگاری در سلول‌های گیاهی و تنوع پاسخ‌ها که بسته به طبیعت تنش (مدت و شدت تنش) تغییر می‌کند، بررسی دینامیکی پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی سلول تحت تنش سرما ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ژنوتیپ دسی با شماره کلکسیون ۴۳۲۲، ژنوتیپ انتخابی ناحیه سرد کشور (اردبیل) و ژنوتیپ کابلی جم (از ژنوتیپ‌های زراعی و محلی رایج در کشور)، به‌ترتیب از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه تهیه شد. انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس ارزیابی‌های گذشته در خصوص تحمل به تنش سرما در ژنوتیپ‌های دسی و کابلی انجام گرفت به‌طوری که این دو ژنوتیپ تحمل بیشتری در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌های کابلی و دسی به تنش سرما نشان دادند (Nazari et al. 2013; Kazemi Shahandashti et al. 2012). با این وجود کدام یک از این ژنوتیپ‌ها تحمل بیشتری به تنش سرما تحت سازگاری‌های کوتاه مدت دارند موضوع این تحقیق قرار گرفت. بذور با هیپوکلریت سدیم تجاری ده درصد به‌مدت پنج دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در ظروف پتری با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری‌ها در شرایط بدون نور و دمای 23°C قرار گرفته و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور 200 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 23°C و رطوبت نسبی 65 درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های هر ژنوتیپ به دو قسمت تقسیم شده نیمی از آن‌ها در دمای 23°C درجه سانتی‌گراد و شرایط ذکر شده نگهداری شده و نیمی دیگر به دمای 10°C به‌عنوان دمای سازگاری نخود بر اساس پژوهش‌های پیشین منتقل شدند (Kazemi Shahandashti et al.).

سپس مقدار جذب هر نمونه را در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. کلیه مراحل استخراج نمونه‌ها جهت بررسی فعالیت آنزیم‌ها بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی، به کمک ازت مایع ساییده و پودر شدند. ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج را به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $13000 \times g$ و در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم‌ها استفاده شد. غلظت پروتئینی نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) تعیین شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای 25°C با استفاده از اسپکتروفوتومتر دستگاه (Shimadzu, UV-160, Kyoto,) (Japan) به روش Scebba et al. (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل 3000 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ($\text{pH}=7$) 50 میلی‌مولار، پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن $3/41$ مولار و 100 میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دمای 25°C با استفاده از اسپکتروفوتومتر به روش Ranieri et al. (2003) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ($\text{pH}=7/8$) 50 میلی‌مولار، آسکوربات 5 میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن یک میلی‌مولار و عصاره پروتئینی به میزان 10 میکرولیتر بود. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین در طول موج 290 nm محاسبه شد. استخراج RNA کل سلولی توسط روش بایوزول (فرژن پویش، تهران، ایران) از 80 میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگ‌ی خرد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر 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 260 nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم *DNaseI* بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم

و *DNaseI* و 10 واحد (u) آنزیم *RNase inhibitor* مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به 10 میکرولیتر رسانده شد و به مدت 30 دقیقه در دمای 37°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 65°C قرار داده شدند. تیوب‌ها در دمای 80°C -نگهداری شدند. پنج میکرو لیتر RNA تیمار شده با *DNase* با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) ($18-20$ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به 11 میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای 70°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات با غلظت 10 میکرومول و 20 واحد آنزیم *RNase inhibitor* به هر تیوب اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به 19 میکرولیتر رسانده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای 37°C قرار داده شد. بعد از آن 200 واحد (u) آنزیم رونوشت‌بردار معکوس *Revert Aid M-Mulv* به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای 42°C قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای 70°C قرار گرفتند. به‌منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار (*Actin1*) به شماره دسترسی EU529707.1 بر روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به 200 نانوگرم بر میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل یک درصد آگارز استفاده شد. 1245 نانوگرم بر میکرولیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و هم‌چنین ژن خانه‌دار *Actin1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. در جدول ۱ توالی آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار ارائه شده است. 20 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل 10 میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، سه میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت 10 میکرومول و پنج میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت 250 نانوگرم بر میکرو لیتر بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و

سپس مقدار جذب هر نمونه را در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. کلیه مراحل استخراج نمونه‌ها جهت بررسی فعالیت آنزیم‌ها بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی، به کمک ازت مایع ساییده و پودر شدند. ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج را به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $13000 \times g$ و در دمای 4°C سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم‌ها استفاده شد. غلظت پروتئینی نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) تعیین شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای 25°C با استفاده از اسپکتروفوتومتر دستگاه (Shimadzu, UV-160, Kyoto,) (Japan) به روش Scebba et al. (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل 3000 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ($\text{pH}=7$) 50 میلی‌مولار، پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن $3/41$ مولار و 100 میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دمای 25°C با استفاده از اسپکتروفوتومتر به روش Ranieri et al. (2003) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ($\text{pH}=7/8$) 50 میلی‌مولار، آسکوربات 5 میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن یک میلی‌مولار و عصاره پروتئینی به میزان 10 میکرولیتر بود. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین در طول موج 290 nm محاسبه شد.

استخراج RNA کل سلولی توسط روش بایوزول (فرژن پویش، تهران، ایران) از 80 میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگ‌ی خرد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر 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 260 nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم *DNaseI* بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم

سرما، بیش‌ترین میزان ELI به ژنوتیپ دسی متعلق بود (۳/۷۵ برابر در مقایسه یا شاهد) در حالی‌که میزان این شاخص در ژنوتیپ کابلی تغییر معناداری در مقایسه با شرایط سازگاری نداشت، اگرچه در مقایسه با شاهد افزایش معناداری نشان داد. عدم افزایش میزان ELI تحت تنش سرما ممکن است مربوط به فعالیت مکانیسم‌های تحمل گیاه باشد که با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و خصوصیات و ترکیب شیمیایی غشاهای سلولی در ارتباط باشد (Kazemi Shahandashti et al. 2013; Heidarvand et al. 2011). پژوهش‌های پیشین نشان داده که تغییرات فیزیکی شیمیایی غشای پلاسمایی سلول، شاخص مهم برآورد تحمل به سرما در گیاهان محسوب می‌شود (Maali-Amiri et al. 2007; Heidarvand and Maali-Amiri 2013). متعاقب کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر کرده که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء (شاخص نشت الکترولیتی) تأثیر می‌گذارد. بنابراین ژنوتیپ‌های با ELI کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان می‌دهند. افزایش ELI تحت تنش سرما در ژنوتیپ دسی در اثر کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی گیاه در اثر شدت تنش و در نتیجه افزایش میزان خسارت به سلول می‌باشد. این وضعیت از ویژگی‌های گیاهان حساس به تنش سرما بوده که معمولاً سبب مرگ گیاه می‌شود.

تحقیقات در گیاهان نشان می‌دهند که تحت تنش سرما، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تجمع می‌یابند. تجمع ROSها با اکسیداسیون ترکیبات سلولی از جمله پروتئین و چربی‌های غشاء سبب افزایش نشت الکترولیتی غشا و خسارت به آنها می‌شود (Popov et al. 2006).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: دو دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰°C (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST^۱ استفاده شد (Pfaffl et al. 2001).

نتایج و بحث

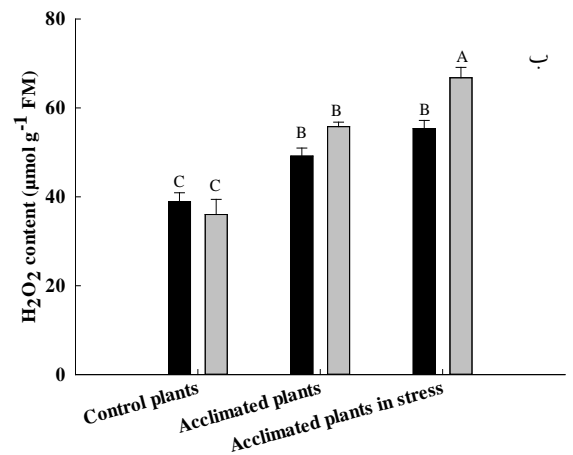
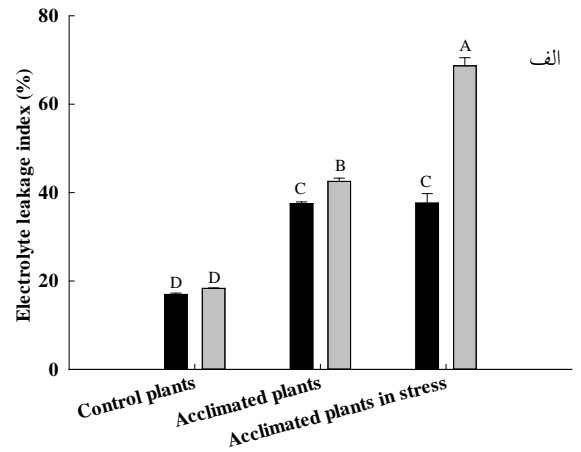
نتایج این تحقیق نشان داد که میزان خسارت غشایی بر اساس شاخص ELI در تیمارهای دمایی مورد آزمایش، تفاوت معناداری داشتند. میزان شاخص نشت الکترولیتی در هر دو ژنوتیپ تحت شرایط سازگاری در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معناداری یافت (بیش از دو برابر) به طوری که این افزایش در ژنوتیپ دسی به طور معناداری بیشتر بود که می‌توان آن را در اثر اختلافات غشای سلولی در اثر کاهش دما از جمله افزایش میزان ROS قلمداد کرد (شکل ۱- الف). این افزایش بیانگر آن است که گیاه تنش دمای پایین را درک کرده و پاسخ‌های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است. اما با این وجود افزایش میزان ELI در شرایط سازگاری به معنای خسارت تلقی نمی‌شود زیرا میزان شاخص خسارت بیش از ۵۰ درصد بافت گیاهی به‌عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش محسوب می‌شود. دماهای سازگاری معمولاً بیشتر از دمای حداقل رشد گیاه بوده و در محدوده فیزیولوژیکی قرار دارد یعنی در این شرایط دمایی گیاه هنوز می‌تواند به دلیل فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی با شرایط نامساعد محیطی مقابله کرده و به رشد خود (حتی با تاخیر زمانی) ادامه دهد (Kazemi Shahandashti et al. 2014). تحت تنش

^۱ Relative Expression Software Tool

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در کمیت‌سنجی نسبی سطوح RNA تحت تنش سرما

شماره دسترسی	نام ژن	طول محصول (جفت‌باز)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	توالی (۳'-۵')
AJ276265.1	<i>Ascorbate peroxidase</i>	148	59.58 60.48	CCTTTCACCCCGGTAGAGAGGACAAGC GACCACCGGACAAAACAATATCTTGATCG
EU529707.1	<i>Actin</i>	189	58.17 59.14	CTACGAATTGCCTGATGGAC CCTCCTGAAAGGACGATGTT
AJ131046.1	<i>Catalase</i>	161	61.33 60.5	TGCCCGCAGATGGATAGA GGTTGGCGAGGACCTTAACT

نتایج آزمایش ELI تحت تیمار سازگاری، چنین افزایشی در میزان H_2O_2 گویای نقش سیگنالینگ این مولکول در مقایسه با نقش خسارت سلولی آن است. این نتایج احتمالاً با مقایسه تغییر میزان H_2O_2 تحت تنش سرما در ژنوتیپ‌های دسی و کابلی در مقایسه با تیمار شاهد و سازگاری تایید می‌شود. بیش‌ترین میزان H_2O_2 در ژنوتیپ دسی تحت تنش سرما در مقایسه با تیمارهای دیگر مشاهده شد. این نتایج می‌تواند بیانگر فعال‌سازی موثرتر ساز و کارهای مقابله با ROSها در ژنوتیپ کابلی باشد. نتایج سطوح مختلف H_2O_2 در کنار میزان شاخص آسیب غشایی (ELI) نشان داد که ژنوتیپ کابلی به‌طور موثرتری از ژنوتیپ دسی توانسته اثرات تنش سرما را تحمل کند. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که آنزیم‌های CAT و APX موثرتر از سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند سطوح H_2O_2 را تحت تاثیر قرار دهند (Cook et al. 2004). همان‌طور که شناخته شده ملکول‌های فعال در ساز و کارهای سلولی، پروتئین‌ها هستند و جنبه عملکردی آن‌ها بیش‌تر به فعالیت پروتئین‌های آنزیمی وابسته است تا به حضور پروتئین‌ها (Pandy et al. 2007)، بنابراین در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیدازسنجیده شد. نتایج نشان داد که دو ژنوتیپ پاسخ متفاوت نسبت به سرما نشان دادند. سطوح فعالیت CAT در تمامی حالات در ژنوتیپ کابلی بیش از دسی بود (شکل ۲- الف). تحت تیمار سازگاری، برخلاف ژنوتیپ دسی، میزان فعالیت CAT در ژنوتیپ کابلی افزایش یافت (تا ۲۸ درصد) که احتمالاً بیانگر ظرفیت ژنتیکی این ژنوتیپ در جبران کمبود سطح اولیه آنتی‌اکسیدانت‌ها در مقابله با تنش سرما بود. تحت تنش سرما میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ کابلی تغییر معناداری با شرایط سازگاری نداشت در حالی که میزان فعالیت آنزیم در ژنوتیپ دسی به کمترین میزان آن تحت تیمارهای آزمایشی رسید، کاهش فعالیت که به دنبال افزایش میزان ROSها در سلول انجام می‌گیرد. بنابراین به‌نظر می‌رسد فعالیت آنزیمی CAT و نتایج H_2O_2 و ELI با هم در تقابل هستند. عدم افزایش معنادار میزان شاخص‌های خسارت در ژنوتیپ کابلی تحت تنش سرما بخشی به دلیل پایداری میزان فعالیت آنزیم CAT می‌باشد که در دوره سازگاری در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافته بود. بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ کابلی

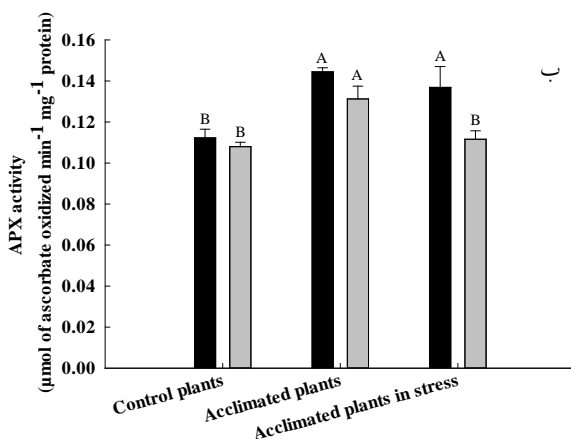
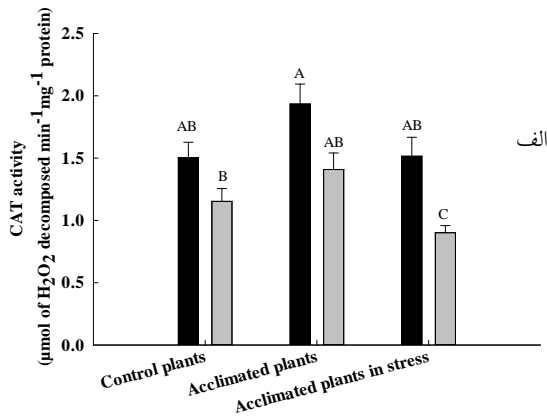


شکل ۱- تغییر میزان شاخص نشت الکترولیتی (ELI) (الف) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) (ب) تحت شرایط کنترل، سازگاری و تنش سرما در ژنوتیپ نخود کابلی (ستون سیاه) و ژنوتیپ دسی (ستون خاکستری). حروف مختلف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

بنابراین مطالعه تغییر میزان H_2O_2 در درک مکانیسم‌های تحمل به تنش سرما بسیار ارزشمند است. آزمون مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف معناداری بین تیمارها نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ‌های گیاه تحت تنش‌های دمایی بود (شکل ۱- ب).

میزان H_2O_2 تحت شرایط شاهد مابین ژنوتیپ‌ها تفاوت معناداری نشان نداد. تیمار سرما سازگاری سبب افزایش معنادار میزان H_2O_2 در هر دو ژنوتیپ در مقایسه با تیمار شاهد داشت به طوری که این افزایش در ژنوتیپ دسی بیشتر از ژنوتیپ کابلی بود (به ترتیب ۲۶ و ۵۴ درصد در ژنوتیپ‌های کابلی و دسی). مطالعات نشان داده که تغییر میزان ROSها تحت تنش‌های محیطی، به‌عنوان مولکول‌های سیگنال سلولی، فعالیت مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در دفاع سلول را ایجاد کند (Sewelam et al. 2016). با توجه به

کاهش خسارت در گیاه نخود می‌تواند در مدت زمان کوتاهی پس از شروع سازگاری به سرما آغاز شود که این مدت کوتاه می‌تواند گیاهچه‌های نخود را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. در بسیاری موارد تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، در پی تجمع رونوشت مربوط به ژن‌های آن‌ها رخ می‌دهد.



شکل ۲- تغییر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) (الف) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (ب) تحت شرایط کنترل، سازگاری و تنش سرما در ژنوتیپ نخود کابلی (ستون سیاه) و ژنوتیپ دسی (ستون خاکستری). حروف مختلف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

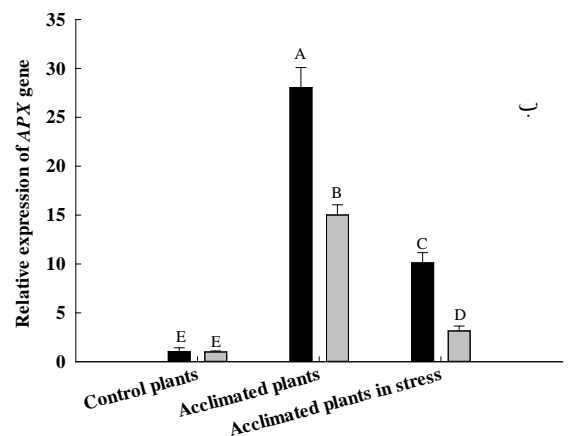
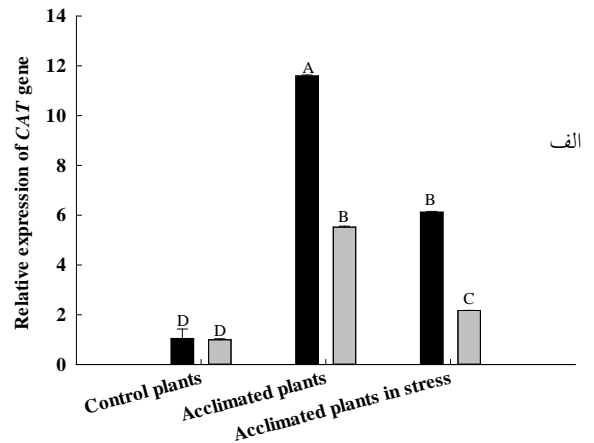
به‌منظور مطالعه این موضوع، بیان ژن‌های *CAT* و *APX* بررسی شد (شکل ۳- الف و ب). در مقایسه با تیمار شاهد، بیان نسبی ژن کاتالاز تحت تیمار سازگاری در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد اما این افزایش در ژنوتیپ کابلی بیش‌تر بود (تا ۱۱ برابر) به‌طوری‌که به بیش‌ترین میزان آن تحت تیمارهای آزمایش رسید. تصور می‌شود که با کاهش دما آنزیم *CAT* تمایل زیادی در استقرار مجدد تعادل سلولی در سطح رونوشت دارد که بیانگر برنامه‌ریزی مجدد ژنوم نخود در پاسخ به تنش سرما می‌باشد،

می‌تواند در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما موثر بوده که به دنبال افزایش میزان ROSها در سلول انجام می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد در ژنوتیپ دسی، افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت آنزیم *CAT* شده‌است. با این وجود تحت تیمار سازگاری، به علت ایجاد تطابق نسبی و موقتی اختلافات معنادار نبوده اما در عوض تحت تیمار سرما، تغییرات فعالیت آنزیمی در دو ژنوتیپ شدید بود. نتایج این آزمایش با دیگر نتایج به‌دست آمده در خصوص اینکه *CAT* قادر به کاهش خسارت سلولی پس از تجمع ROSها است مطابقت داشت (Nejadsadeghi et al. 2014). روند کلی تغییر در فعالیت آنزیم *APX* مشابه *CAT* بود. تحت تیمار سازگاری پس از یک افزایش معنادار در میزان فعالیت این آنزیم در هر دو ژنوتیپ، فعالیت آنزیم تحت تنش سرما در ژنوتیپ دسی کاهش معناداری داشت به‌طوری‌که به سطح فعالیت در شرایط کنترل نزدیک شد در حالی که در ژنوتیپ کابلی میزان فعالیت *APX* تحت تنش سرما تغییر معناداری در مقایسه با تیمار سازگاری نداشت (شکل ۲- ب). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در طی تنش می‌تواند بیانگر نیاز سلول به آن‌ها در حذف ROSها از جمله H_2O_2 باشد. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها (*APX* و *CAT*) در ژنوتیپ کابلی در مقایسه با ژنوتیپ دسی، احتمالاً نشان دهنده آمادگی بیشتر آن در رویارویی با تنش سرما می‌باشد. پژوهش‌ها نشان داده که فعالیت هم‌زمان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سبب کاهش میزان ROS شده و نوعی تعادل در وضعیت فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول گیاهی به‌وجود می‌آورد. تغییر در چنین تعادلی سبب القاء مکانیسم‌های جبرانی از جمله تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی تحت تنش‌های محیطی می‌شود (Apel and Hirt 2004). بنابراین به‌نظر می‌رسد تحت تنش سرما در نخود آنزیم‌های *CAT* و *APX* با همکاری یکدیگر سبب کاهش میزان خسارت‌های سلولی می‌شوند، فرضیه‌ای که با نتایج H_2O_2 و ELI تایید می‌شود. چنین نتایجی بیانگر موفقیت‌های محدود در بهبود تحمل به سرما از طریق انتقال تک ژن به گیاهان حساس به تنش سرما می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که پاسخ سریع به تنش سرما و در نتیجه آن

ROSها، فتوستتوز، سنتز و تخریب پروتئین‌ها اشاره کرد. شناسایی این ژن‌ها نه تنها به درک تحمل به تنش بلکه به توسعه برنامه‌های اصلاحی در جهت تولید گیاهان متحمل به تنش کمک می‌کند (Kazemi Shahandashti et al. 2014).

نتایج سنجش بیان ژن *APX* نشان داد که تحت تیمار سازگاری میزان بیان این ژن در ژنوتیپ کابلی و دسی در مقایسه با شاهد افزایش بیان داشته (به ترتیب تا ۲۸ و ۱۵ برابر). تحت تنش سرما ژن آسکوربات پراکسیداز کاهش معناداری در مقایسه با تیمار سازگاری نشان داد (شکل ۳-ب). در حالی که در ژنوتیپ کابلی و دسی، میزان بیان این ژن در مقایسه با شاهد افزایش بیان ۱۰ و ۳ برابری داشت. نتایج افزایش رونوشت‌های این ژن تایید کننده میزان فعالیت آن تحت تیمارهای آزمایشی بود به طوری که این افزایش به موازات فعالیت آنزیم کاتالاز سبب کاهش میزان خسارت‌های سلولی در ژنوتیپ کابلی در مقایسه با ژنوتیپ دسی شد. نکته دیگر افزایش چند برابری میزان رونوشت‌های ژن *APX* در مقایسه با ژن *CAT* تحت تیمارهای آزمایشی به خصوص تحت تیمار سازگاری بود. مطالعات گذشته نشان داده که تمایل آنزیم *APX* برای حذف H_2O_2 بیش‌تر از آنزیم *CAT* بوده لذا تحت تنش‌های محیطی به‌عنوان اولین سد دفاعی فعالیت می‌کند. مطالعات نشان داده که کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نقش مکمل در مقابله با H_2O_2 دارند به طوری که کاهش کاتالاز موجب تولید آسکوربات پراکسیداز می‌شود (Karami-moalem et al. 2018). بنابراین افزایش چندبرابری میزان رونوشت آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با آنزیم کاتالاز احتمالاً منطبق بر همین اصل می‌باشد. بنابراین در این آزمایش به نظر می‌رسد میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانته کاتالاز و پراکسیداز موجود در سلول با میزان رونویسی ژن‌های آن مرتبط باشد. همچنین تغییر در تحمل به تنش سرما می‌تواند با تغییر در سطوح بیان ژن‌ها، میزان فعالیت آنزیم‌ها و سطوح مختلف پراکسید هیدروژن مرتبط باشد. اگرچه روند بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های نخود شباهت زیادی با روند افزایش فعالیت آنزیم‌ها بود ولیکن میزان تغییرات در رونوشت‌های ژنی بیش از میزان تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌ها بود. تحقیقات گذشته بیانگر نقش متعدد تغییرات پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه در فعالیت پروتئین‌ها و

نتایجی که با افزایش فعالیت آنزیمی *CAT* تایید می‌شود. تحت تنش سرما سطح رونوشت این ژن در مقایسه با تیمار سازگاری در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت (به ترتیب تا ۴۷ و ۶۰ درصد در ژنوتیپ کابلی و دسی) اگرچه هنوز میزان رونوشت‌های این ژن در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهد. در دوره سازگاری، تغییرات فیزیولوژیکی بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهی رخ می‌دهد که منجر به القا یا مهار بیان ژن‌های خاص می‌شود.



شکل ۳- تغییر میزان بیان نسبی ژن کاتالاز (*CAT*) (الف) و آسکوربات پراکسیداز (*APX*) (ب) تحت شرایط کنترل، سازگاری و تنش سرما در ژنوتیپ نخود کابلی (ستون سیاه) و ژنوتیپ دسی (ستون خاکستری). حروف مختلف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

نتایج نشان داد که ژنوتیپ کابلی یک نوع واکنش تحمل در سطح رونوشت ارائه کرده که سبب افزایش تحمل به تنش سرما از طریق افزایش فعالیت آنزیم *CAT* شد. مطالعات نشان داده که ژن‌های متعددی در دوره سازگاری به تنش‌های محیطی تنظیم شده که از آن جمله به ژن‌های درگیر در متابولیسم، حذف

ایجاد کند. بنابراین به نظر می‌رسد گیاه نخود پتانسیل سازگاری به تنش سرما را داشته و این ظرفیت با افزایش دوره سازگاری ممکن است ارتقا یابد. این مسئله در بسیاری از نواحی ایران که دارای دمای پایین نه خیلی سرد پاییز هستند، شرایط کشت پاییزه نخود زراعی را در اثر القای سازگاری به تنش سرما فراهم می‌آورد. ژنوتیپ‌های مختلف نخود دسی ممکن است پاسخ‌هایی از حساسیت تا تحمل نشان دهند. هم‌چنین تغییرات دمایی در مزرعه و آزمایشگاه پاسخ‌های متفاوتی را در گیاهان نشان می‌دهند. هرچند گزارشات ارایه شده حاکی از تحمل بیش‌تر ژنوتیپ‌های نخود دسی نسبت به کابلی بوده اما اغلب این مطالعات به مقایسه این دو نوع نخود در سطح مزرعه پرداخته است. با توجه به این که شرایط مزرعه همانند شرایط کنترل شده آزمایشگاهی نیست و حوزه وسیع تغییرات و تنش‌های محیطی را داراست، لذا مقایسه در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند پاسخ گیاه به یک تنش خاص را به‌صورت مطلوب ارزیابی نماید (Mittler and Blumwald 2010; Nagar et al. 2011). نتایج این آزمایش نشان داد که پاسخ سریع به تنش سرما و حذف H_2O_2 در گیاه نخود می‌تواند در مدت زمان کوتاهی پس از شروع تنش آغاز شود که این مدت کوتاه می‌تواند برخی از گیاهان را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. اما با توجه به وجود تغییر در مکانیسم‌های متعدد پاسخ سلولی لزوم بررسی‌های گسترده در سطوح پروتئینی و فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی در این گیاه به موازات مطالعه ژن‌های مهم درگیر در تنش سرما بیش از پیش احساس می‌شود. در این آزمایش دوره‌های کوتاه مدت سرما سازگاری به‌همراه دمای یخ‌زدگی ممکن است در ارزیابی تحمل به تنش سرمای نخود به‌دلیل کاهش دوره آزمایش و هم‌چنین هزینه‌های تحقیقاتی به‌عنوان راهکار مناسب مدنظر محققین قرار گیرد

منابع

Amini S, Maali-Amiri R, Mohammadi R, Kazemi-Shahandashti SS (2017) cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO_2 nanoparticles during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 111:39-49.

آنزیم‌ها به‌خصوص تحت تنش‌های محیطی می‌باشد (Heidarvand and Maali-Amiri 2010). بنابراین بسیاری از رونوشت‌های ژنی به‌دلیل نقص در فعالیت این مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن که در اثر تنش ایجاد می‌شود قادر به تولید محصول فعال نخواهند بود به‌طوری که همواره میزان تغییرات در سطوح رونوشت با میزان تغییرات در میزان فعالیت آنزیم مشابه نمی‌باشد. با این وجود ارتباط بین فعالیت و بیان ژن آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در ژنوتیپ کابلی بیشتر از دسی بود به‌طوری که مشاهده شد بیش‌ترین فعالیت با بیش‌ترین میزان بیان هم‌خوانی داشت. این نتایج تایید کننده ظرفیت ژنتیکی مطلوب ژنوتیپ کابلی در مقایسه با دسی بوده که تحت تنش سرما سبب کاهش میزان خسارت‌های سلولی در آن شد. مقایسه این داده‌ها در کنار شاخص نشت الکترولیتی و سطوح H_2O_2 نشان داد که فعالیت بیش‌تر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کنار سایر عوامل دخیل در پاسخ تحمل گیاهان می‌تواند موجب بروز تحمل بیش‌تر ژنوتیپ کابلی در مقایسه با دسی شود. افزایش فعالیت و رونوشت هر دو ژن در ژنوتیپ کابلی که تحمل بیشتری به سرما نشان داد، بیانگر تحریک تولید متابولیت‌ها و پروتئین‌های دخیل در ساز و کارهای تحمل در راستای آماده‌سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر علاوه بر بروز کم‌ترین خسارت در دمای کنونی می‌باشد. نتایج شاخص‌های خسارت نشان داد که تنوعی در پاسخ ژنوتیپ‌ها به سرما وجود دارد و این تنوع منعکس‌کننده ساز و کارهای متمایز درونی گیاه و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت ژن‌ها باشد و با توجه به پاسخ‌های معنادار ژنوتیپ‌ها در ELI و H_2O_2 ، پاسخ‌های متفاوت تحمل به تنش سرما حتی در زمان کوتاه اعمال تنش سرما نیز قابلیت ارزیابی دارد. چنین مطالعاتی می‌تواند در ارزیابی سریع‌تر ژنوتیپ‌ها به تنش سرما و کاهش هزینه‌های آزمایش مفید باشد. در این آزمایش دمای $10^\circ C$ به‌عنوان تیمار سازگاری کوتاه مدت توانست سازوکارهای افزایش تحمل را در ژنوتیپ کابلی

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
Bradford MM (1976) A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
Cook D, Fowler S, Fiehn O, F. Thomashow M (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in

- configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Plant Biology* 101:15243-15248.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170:459-469.
- 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.
- Heidarvand L, Maali Amiri R (2010) What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress? *Acta Physiologiae Plantarum* 32:419-431.
- 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-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (2013) 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.
- Kazemi-Shahandashti 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.
- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene production by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127:1781-1787.
- Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova IV, Yur'eva NO, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG, Deryabin AN, Trunova TI, Los DA, Nosov AM (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the D12-desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:678-685.
- Mittler R, Blumwald E (2010) Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61:443-462.
- Nagar V, Chohan A, Raina SK (2011) Comparative studies on morphological and biochemical characters of chickpea genotypes under chilling stress. *Journal of Environmental Biology* 32:189-194.
- Nayyar H, Bains TS, Sanjeev K (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 54: 275-285.
- Nazari MR, Habibpour Mehraban F, Maali Amiri R, Zeinali Khaneghah H (2012) Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:183-189.
- Nejadsadeghi L, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ramezanpour S, Sadeghzade B (2014) Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry and Biophysics* 70:399-408.
- Pandey A, Chakraborty S, Datta A, Chakraborty N (2007) Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular and Cellular Proteomics* 7:88-107.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, Serebriiskaya TS, Merkulova NV, Nosov AM, Trunova TI, Tsydendambaev VD, Los DA, (2006) The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl- lipid $\Delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 52:664-668.
- Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54:2529-25240.
- Rossi M, Germondari I, Casini P (1984) Comparison of chickpea cultivars: chemical composition, nutritional evaluation and oligosaccharide content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 32:811-814.
- Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104:747-52.
- Sewelam N, Kazan K, Schenk PM (2016) Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Singh KB, Malhotra RS, Saxena MC (1995) Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild *Cicer* species. *Crop Sciences* 35: 1491-1497.
- Srinivasan A, Johansen C, Saxena NP (1998) Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genotypic variation in pod set. *Field Crops Research* 57:181-193.
- Thomashow MF (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!. *Plant Physiology* 125:89-93
- Toker C (2005) Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:1-5.
- Varshney RK, Thudi M, Nayak SN, Gaur PM, Kashiwagi J, Krishnamurthy L, Jaganathan D, Koppolu J, Bohra A, Tripathi S, Rathore A (2014) Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 127:445-462.
- Yadav SS, Kumar J, Yadav SK, Singh S, Yadav VS, Turner NC, Redden R (2006) Evaluation of helicoverpa and drought resistance in desi and kabuli chickpea. *Plant Genetic Resources* 4:198-203.