

ارزیابی مسیر بیوسنتزی پرولین نخود زراعی از طریق تخریب پوترسین تحت تنش سرما

Evaluation of proline biosynthetic pathway of chickpea through putrescine degradation under cold stress

سعید امینی^۱، رضا معالی‌امیری^{۲*}، هلن پورمظاهری^۳

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)،
کرج، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- پژوهشگر پس‌دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
کرج، ایران

Amini S¹, Maali-Amiri R^{*2}, Poormazaheri H³

1- Faculty member of Seed and Plant Certification and Registration Research
Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization
(AREEO), Karaj, Iran

2- Faculty member of Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture and
Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Postdoctoral Researcher of Agronomy and Plant Breeding Department, College of
Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹)

چکیده

سازگاری متابولیکی گیاهان به تنش سرما نقش مهمی در بقا، رشد و عملکرد گیاهان زراعی دارد. پرولین به‌عنوان اسمولیت احتمالاً در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط سرما مشارکت دارد. در این پژوهش میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، پرولین، پوترسین (Put)، فعالیت آنزیم دی‌آمین اکسیداز (DAO) و بیان نسبی ژن دی‌آمین اکسیداز (DAO) در دو ژنوتیپ متحمل چهار درجه سانتی‌گراد در روز اول و ششم تنش سرما به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مطالعه شد. در ژنوتیپ متحمل میزان H_2O_2 پس از افزایش معنی‌دار در روز اول تنش، کاهش معنی‌داری در روز ششم در مقایسه با شاهد نشان داد (بیش از ۴/۷ درصد) درحالی‌که تجمع آن در ژنوتیپ حساس مشاهده شد (تا ۵۰ درصد)، نتایجی که بیانگر سازگاری نسبی به سرما در ژنوتیپ متحمل بود. تحت تنش سرما میزان متابولیت‌های پرولین و Put در ژنوتیپ متحمل به ترتیب ۱/۴۷ و ۳/۲ برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. به‌موازات افزایش میزان پرولین تحت تنش سرما، در ژنوتیپ متحمل فعالیت آنزیم DAO و بیان نسبی ژن DAO به‌عنوان مسیرهای بیوسنتز این متابولیت افزایش معنی‌داری یافت (به ترتیب تا ۱/۸۷ و ۱/۲۲ برابر). حداکثر فعالیت این مسیر در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد. تحت تنش سرما تجمع پرولین در ژنوتیپ متحمل منجر به کاهش آسیب سلولی (نتایج H_2O_2) و بهبود درجه تحمل نخود به سرما شد. چنین شاخص‌هایی در ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما مؤثر بوده و به‌کارگیری آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی

آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO)

بیان ژن DAO

پراکسید هیدروژن

پرولین

پوترسین

تحمل سرما

شده یا توسط دی‌آمین‌اکسیداز (DAO⁸) (EC 1.4.3.6) به گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA⁹) و نهایتاً پرولین تجزیه می‌شود (Madhulata et al. 2014). آنزیم DAO گروهی از آمین‌اکسیدازهای (AOs) گیاهی حاوی مس (CuAOs) است (Cona et al. 2006) که با تنظیم میزان GABA، PAs و پرولین سلولی از طریق اکسیداسیون Put و متابولیت‌های دیگر از جمله کاداوآرین (Cad¹⁰) نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک از جمله رشد، نمو، گلدهی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Angelini et al. 2010; Wimalasekera et al. 2011a,b)؛ فرایندی که مولکول پیام‌رسان H₂O₂ را نیز از طریق کاتابولیسم انتهایی¹¹ PAs تولید می‌کند (Minocha et al. 2014; Tiburcio et al. 2014).

پرولین به‌عنوان سبک‌ترین آمینو اسید آزاد سلولی، علاوه بر ایفای نقش اسموپروتکتنت در تنظیم هموستازی از جمله تعادل وضعیت انرژی و اکسایش/ احیا سلول نیز موثر است. همچنین پرولین می‌تواند به‌عنوان مولکول سیگنال در تنظیم عملکرد میتوکندری، تنظیم تکثیر سلولی یا مرگ سلول و تحریک بیان ژن‌هایی که در بازیابی تنش مؤثرند نیز نقش ایفا کند (Turchetto et al. 2009). محتوی پرولین از طریق القای فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱- پرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) در مسیر سنتز و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز (Pro DH) و پرولین ۵ کربوکسیلات دهیدروژناز (P5CDH) (Tavakoli et al. 2016) در مسیر تجزیه و همچنین از طریق مسیر تجزیه PAs توسط القای فعالیت آنزیم DAO در مسیر سنتز GABA نیز در سلول تجمع می‌یابد (Su and Bai 2008; Santa-Cruz et al. 1999). گلوتامیک اسید پیش‌ساز رایج پرولین و PAs است (Tonon et al. 2004). الکترون مورد نیاز برای سنتز پرولین از NADH و NADPH تأمین شده، تا گلوتامیک اسید به شکل دی‌پرولین اسید ۵ کربوکسیلاز درآید و سپس این ماده به پرولین تبدیل شود. در واقع سنتز پرولین از دو مسیر گلوتامات و

کشت بهاره نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) با مخاطراتی مانند خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل همراه است که منجر به کاهش بهره‌وری و تولید تا میزان ۴۰۰-۳۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌شود. کشت‌های پاییزه یا زمستانه این گیاه با توجه به بارندگی و وجود رطوبت امکان پذیر بوده، لیکن سرما عامل محدود کننده در توسعه کشت پاییزه نخود محسوب می‌شود (Kazemi et al. 2013). بنابراین بهبود تحمل به تنش سرما یکی از برنامه‌های اساسی به‌نژادی در سازگاری، بهبود تولید و عملکرد نخود زراعی است (Heidarvand et al. 2011). در طی تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما تجمع بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS¹) سبب آسیب‌های شدید به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله تخریب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، و شکستن مولکول‌های اسید نوکلئیک در سلول‌های گیاهی می‌شود (Amini et al. 2017). در جهت مقابله با ROSها و تنش اکسیداتیو القا شده توسط آن‌ها، فرایند سازگاری به تنش با تغییر میزان متابولیت‌های سلولی از طریق تنظیم تظاهر ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌ها تغییر می‌کند (Heidarvand et al. 2013). بنابراین تحت تنش‌های محیطی برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها با تغییر الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند سبب تغییر متابولیسم سلولی و هموستازی جدید شود.

H₂O₂ مولکول پیام‌رسان حیاتی با قابلیت مشارکت در فرایندهای فیزیولوژیک گیاهی مانند پاسخ سازگاری به تنش‌هاست (Dickinson and Forman 2002). پوترسین (Put²)، سبک‌ترین عضو خانواده پلی‌آمین‌ها (PAs³) در واقع اسمولیتی پلی‌کاتیونی است که در پویایی فرایندهای سلولی و پاسخ به تنش‌های محیطی مشارکت دارد (Handa et al. 2010). این متابولیت از پیش‌ماده ارنیتین⁴ یا سیترولین⁵ در یک مسیر بیوستیزی تولید و در ادامه توسط اسپرمیدین‌سنتتاز (SPDS⁶) به اسپرمیدین (Spd⁷) تبدیل

¹ Reactive oxygen species

² Putrescine

³ Polyamines

⁴ Ornithine

⁵ Citrulline

⁶ Spermidine Synthase

⁷ Spermidine

⁸ Diamine oxidase

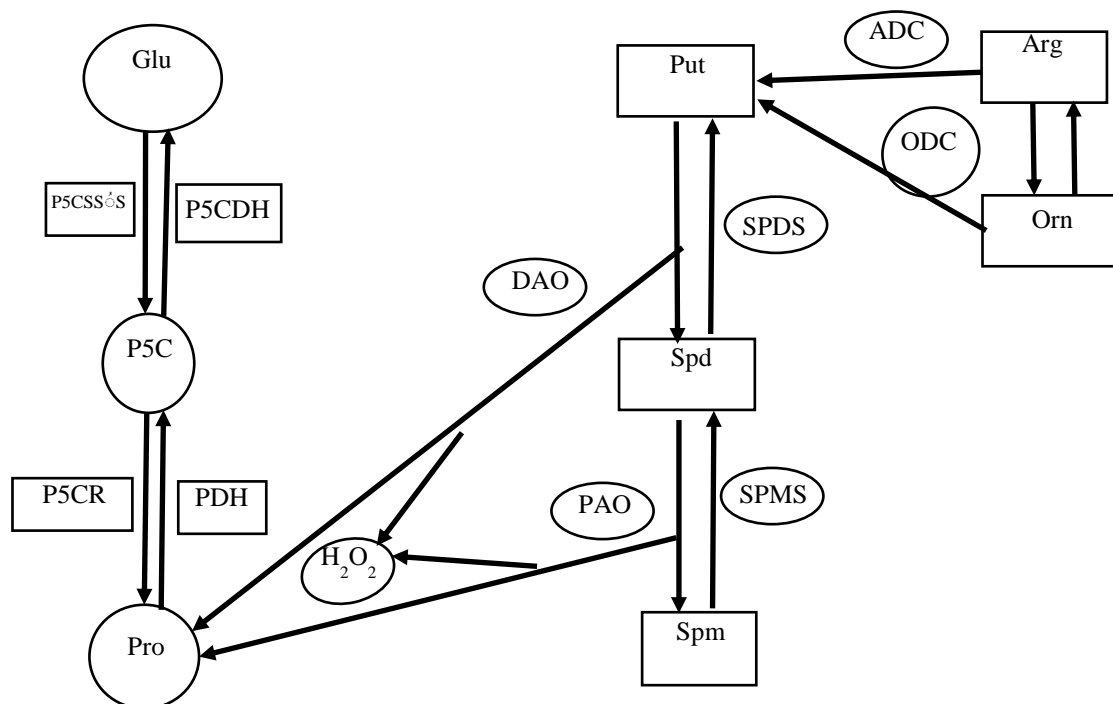
⁹ γ-Aminobutyric acid

¹⁰ Cadavarine

¹¹ Terminal catabolism

Tanon et al. (2004) گزارش کردند که تحت تنش شوری با غلظت کم نمک، محتوی پرولین به موازات محتوی Put تغییر کرده در حالی که در غلظت بالای نمک، تغییرات متفاوتی در غلظت پرولین و Put تحت تنش شوری ایجاد می‌شود. (2005) Sanchez et al. گزارش کردند که در *Lotus glaber* L. تحت تنش شوری بلند مدت، محتوی PAs دائماً به موازات تجمع پرولین تغییر نمی‌کند. در برخی گونه‌ها مانند سویا و گوجه‌فرنگی تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری با افزایش تجزیه PAs، محتوی پرولین افزایش می‌یابد (Sotiropoulos 2007). نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی در ذرت، یونجه و آرابیدوپسیس گزارش شده است (Rayapati and Stewart 1991; Kiyosue et al. 1998; Ginzberg et al. 1996). افزایش محتوی پرولین به‌عنوان اسموپروتکتنت در پاسخ به بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله خشکی (Alexieva et al. 2001)، شوری (Sairam et al. 2002) و سرما (Javadian et al. 2010) باعث محافظت از ساختار پروتئین‌ها و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود.

یا ارنیتین انجام می‌شود. همچنین گلوتامیک اسید می‌تواند مستقیماً توسط مسیر *Glutamate-Δ1-pyrroline-5-carboxylate* یا غیرمستقیم از طریق استیلاسیون ارنیتین و آرژنین به Put تبدیل شود (Alcazar et al. 2010b). در شکل ۱ مسیر بیوسنتز پرولین به‌طور شماتیک نمایش داده شده است. تجمع پرولین و تغییر محتوی PAs نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند (Su and Bai 2008). تجمع پرولین در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت بوده (Alcazar et al. 2010a) و به‌طور معمول محتوی آن تحت تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Verbruggen and Hermans 2008). برخی مطالعات به وجود همبستگی بین محتوی پرولین و PAs بدلیل وجود رابطه بین متابولیسم PAs و پرولین تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما و شوری اشاره کرده‌اند (Cao et al. 2012; Song et al. 2015). (Santa-Cruz et al. 1999) گزارش کردند که در گوجه‌فرنگی متحمل به شوری با افزایش غلظت نمک تا بیش از ۲۰۰ میلی‌مولار، محتوی Put به موازات تجمع پرولین کاهش می‌یابد.



شکل ۱- نمایش شماتیک مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان

داده‌اند. برخلاف متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های حد واسط در سازگاری کارکردی (عملکردی) در پاسخ به تغییرات محیطی مؤثرند (Kliebenstein and Osbourn 2012, Moore et al. 2014). به نظر می‌رسد پرولین و پوتریسین، متابولیت‌هایی هستند که در پاسخ به تنش محتوی آن‌ها افزایش می‌یابد (Alcazar and Tiburcio 2018). تنظیم بیان ژن‌ها نقش کلیدی در سنتز متابولیت‌ها داشته و در بقای موجودات در شرایط نامساعد محیطی نقش مؤثری ایفا می‌کند. این ارتباط بدون ایجاد ناهماهنگی در تنظیم بیان ژن‌هایی که در سنتز متابولیت‌های اختصاصی نقش دارند، انعطاف مناسبی در گیاهان برای سازگاری به تغییرات محیطی ایجاد می‌کند. مطالعات اخیر در خصوص بیان ژن‌ها نقش تنظیم بیان ژن‌ها را در بهبود تحمل سرما و ایجاد تنوع بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل از طریق ایجاد تنوع متابولیت‌های اختصاصی را نمایان ساخته‌اند (Karami moalem et al. 2018).

هدف این پژوهش بررسی پاسخ‌های متابولیکی و مولکولی سازگاری به تنش سرما در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود (*C. arietinum* L.) کابلی است. شناسایی نحوه تنظیم القایی برخی مسیرهای متابولیسمی پاسخ به تنش از جمله پرولین و Put ممکن است ارزیابی آن‌ها را به عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش متابولیکی در برنامه‌های اصلاحی نخود معرفی نماید. همچنین بررسی ارتباط احتمالی بین منابع ایجاد آسیب تنش و عوامل دفاعی سلول به درک بهتر نحوه بهبود تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود (*C. arietinum* L.) کابلی (Sel96th11439) (Saeed et al. 2011) متحمل به سرما با منشاء یکباردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های (ILC482×ILWC182) و ILC533 حساس به سرما منشاء گرفته از مصر که اجداد آن هنوز ردیابی نشده‌اند (Saeed et al. 2011; Heidarvand et al. 2011) که از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شدند، استفاده شد. بذور با هیپوکلیت سدیم ۱۰

این متابولیت به عنوان تعدیل‌کننده اسمزی با محافظت از ساختارهای درون سلولی در طی تنش‌های محیطی نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش در گیاهان دارد (Janmohammadi et al. 2012). از پرولین به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای تحمل به دمای پایین و سازگاری به سرما استفاده شده (Janmohammadi et al. 2012) و ارتباط مثبت و معنی‌دار آن با تحمل سرما گزارش شده است (Javadian et al. 2010). گزارش‌ها نشان داده که ژنوتیپ‌های گندمی که با تأخیر وارد مرحله زایشی شدند، محتوی پرولین بالاتری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند و با عبور ژنوتیپ‌های گندم از مرحله رویشی به زایشی و مشاهده حلقه‌های مضاعف کاهش معنی‌داری در محتوی پرولین مشاهده شد (Janmohammadi et al. 2012).

بیان ژن فرایند مولکولی مهمی است که بین تنوع ژنتیکی و رخ نمود^۱ جانداران ارتباط برقرار می‌کند و تنظیم آن نقش مهمی در تنوع صفات و تکامل گونه‌ها ایفا می‌کند (Wang et al. 2018). همچنین تغییرات بیان ژن‌ها در پایه‌ریزی تنوع رخ نمود بسیاری از موجودات ایفای نقش می‌کند (Konishi et al. 2006, Hung et al. 2012). بنابراین مقایسه محتوی رونوشت در بافت، زمان و یا شرایط خاص، الگوهای اختصاصی بیان ژن در آن مرحله را مشخص می‌کند و تعیین وظایف فیزیولوژیک ژن‌ها را تسهیل می‌کند (Weiberg and Karlovsky 2009). ترنسکرپتومیکس یا تجزیه مقایسه‌ای بیان ژن در سطح RNA در یک بافت، زمان و یا شرایط خاص، عنصری کلیدی در ژنومیکس کارکردی (Functional genomics) است که درک ما را از نحوه عمل ژن‌ها افزایش می‌دهد (Weiberg and Karlovsky 2009). بنابراین مطالعه تنظیم بیان ژن‌ها، شناخت کارکرد آن‌ها و سازوکارهای مولکولی تنظیمی سامانه‌های زیستی را تسهیل می‌کند.

QPCR^۲ برای بررسی خصوصیات متنوع اختصاصی ژنتیکی مؤثر در تنظیم بیان ژن‌ها در اکثر جانداران مورد استفاده قرار گرفته است (Amini et al. 2017). این مطالعات دیدگاه منطقی و عمیقی در زمینه اساس ژنتیکی تنوع طبیعی در سطح mRNA ایجاد کرده و نقش بیان ژن‌ها در ایجاد تنوع رخ نمود را مورد بررسی قرار

^۱ Phenotype

^۲ Quantitative PCR

نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4°C با سرعت $12000 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج 390nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-Loreto and Velikova.) اندازه‌گیری شد (160, Kyoto, Japan 2001). نتایج به صورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش کمی Put به روش (Walter and Geun 1987) انجام شد. ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در دو میلی‌لیتر محلول پرکلریک اسید (PCA^2) چهار درصد حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوپتان^۳ (۵ میلی‌گرم در لیتر از اسیدکلریدریک ۲ نرمال) هموژنیزه شد. پس از یک ساعت قرارگیری در 4°C ، از فیلتر (پالایشگر) ۴۵ درصد میکرونی عبور داده شد. بر روی دو دهم میلی‌لیتر از این محلول، یک میلی‌لیتر بافر کربنات با $\text{pH}=9$ و یک میلی‌لیتر محلول دانسیل کلراید^۴ (۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر استون) اضافه و مخلوط شد. پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول پرولین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دانسیل کلراید اضافی حذف شد و سپس ۴۰۰ میکرولیتر تولوئن به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و پس از سانتریفیوژ $5000 \times \text{g}$ به مدت دو دقیقه فاز آلی برداشته و این محلول برای ارزیابی Put توسط HPLC استفاده شد. به منظور ارزیابی کمی Put ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی به ستون Chrompack-Nederland در دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 تزریق شد. دکتور این دستگاه از نوع UV است که در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از نمونه‌های استاندارد برای تعیین وجود Put و غلظت سنجی آن استفاده شد.

بر اساس روش (López-Gómez et al. 2014)، پس از پودر کردن ۰/۴ گرم بافت برگی در ۱/۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7.5$) نمونه‌ها سانتریفیوژ (4°C ، ۲۰ min، $10000 \times \text{g}$) و مایع رویی برداشته شد. واکنش سنجش

درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده 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 بیست و سه درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ شبانه روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های سایز ۱۲ (با قطر دهانه دوازده سانتی‌متر و ارتفاع ده سانتی‌متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به 0.25 حجمی) انتقال یافت. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور دویست میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ قرار داده شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها (با ارتفاع حدود بیست سانتی‌متر و دارای حداقل پنج شاخه به طول پنج تا هشت سانتی‌متر) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اسپادانا، ایران) با دمای 4°C به‌عنوان دمای LT_{50} ^۱ نخود (Nayyar et al. 2005; Kazemi-Shahandashti et al. 2013) منتقل شدند و نمونه‌گیری از برگ‌های میانی هر گیاهچه به‌عنوان برگ‌های فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (۲۴ ساعت پس از آغاز تنش سرما، جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) انجام شد (Rakei et al. 2016). نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد نیز به‌عنوان گیاهان شاهد انجام گرفت (سن فیزیولوژیکی تمام گیاهان یگسان در نظر گرفته شد (Hurry and Kazemi-Shahandashti et al. 2014; Huner 1991)). بنابراین در این پژوهش اثر سه نوع تیمار دمایی (شامل گیاهچه‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌ها یک روز و شش روز پس از شروع تنش سرما) در دو ژنوتیپ متحمل و حساس بررسی شد.

مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم نمونه تازه برگی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس ۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید یک درصد (محلول در حمام یخ) به تیوب اضافه شد و تیوب‌ها تا یکنواخت شدن نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. تیوب حاوی

² Perchloric acid (ClO_4H)

³ 1,7-diaminoheptane

⁴ Dansyl chloride

¹ Lethal temperature 50

میکرولیتر از این محلول در شیشه مخصوص HPLC ریخته شد و سپس محتوی پرولین به مدت شش دقیقه برای هر نمونه در دستگاه HPLC قرائت شد (Palma et al. 2015).

استخراج RNA کل سلول به روش ترايزول با ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگ‌ی خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد (شکل ۱). تشکیل دو باند RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۵S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific model 1000) در طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (Ambion, Texas, USA) تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شدند. تیوب‌ها در ۸۰°C- نگاه‌داری شدند. به‌منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) (۱۸-۲۰ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات (dNTPs) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid (Bio-RAD California, USA) M-Mulv به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. به‌منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار *Actin1* (Peng et al. 2010)، (*Actin1*) ژنوم نخود بر روی cDNA سنتز شده، پس از رقیق‌سازی و

فعالیت آنزیم DAO حاوی ۶۳۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵، ۷۰ میکرولیتر محلول واکنش (۶/۲۵ میکرولیتر انان-دی‌متیل‌آیلین^۱، ۲/۵ میلی‌گرم ۴-آمینوآنتی‌پیرین^۲، ۲۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیداز (۱/۴۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برگ‌ی و ۱۰۰ میکرولیتر Put (۳/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵) بود. میزان فعالیت این آنزیم در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

پس از پودر کردن ۰/۲ گرم بافت برگ‌ی در چهار میلی‌لیتر محلول ECA (حاوی اتانول، کلروفرم و هیدروکلریک اسید HCl ۰/۱ مولار) به نسبت ۱۲:۵:۱ (حجمی/حجمی/حجمی) از فیلتر پارچه‌ای عبور داده شد و به داخل فالكون منتقل شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها (۴°C، ۱۰ min، ۱۰۰۰۰ × g)، مایع رویی به فالكون‌های جدید منتقل و با ۱/۵ میلی‌لیتر آب و ۲/۳ میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط شد. نمونه‌ها مجدداً سانتریفوژ (۴°C، ۱۰ min، ۲۰۰ × g) شدند و دو میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به داخل تیوب منتقل شد و به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شد (Palma et al. 2015). به هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات (Na₂CO₃) و سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول دنسیل‌کلراید (۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر استون) افزوده شد. سپس برای انجام کامل واکنش، نمونه‌ها به مدت ۲۰ ساعت در اتاق تاریک قرار گرفتند. ۱۰۰ میکرولیتر Spd (۱۰۰ میلی‌گرم Spd در یک میلی‌لیتر آب) برای انجام واکنش دانسیلاسیون به هر نمونه افزوده شد و برای انجام کامل واکنش نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار گرفتند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر تولوئن به منظور استخراج مشتقات دانسیل افزوده شد. سپس سانتریفوژ (۴°C، ۵ min، ۵۵۰۰ × g) انجام و فاز بالایی برداشته و به تیوب جدید انتقال یافت. محتوی تیوب در دستگاه Speed back خشک شد. ۵۰ میکرولیتر استونیتریل به هر تیوب اضافه و سانتریفوژ (۴°C، ۱۰ min، ۱۰۰۰۰ × g) شد. ۳۰

¹ NN-dimethylaniline

² 4-aminoantiprine

سریال رقت (۱، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰) کارایی PCR در تمام آغازگرها در حدود ۱/۹ تا ۲ بود و شیب خط رگرسیون بین و ۳/۲۳- و ۳/۴۲- بود (*Actin1*) (Pfaffl 2001). نسبت بیان نسبی هر توالی با توجه به شاخص Cq محاسبه شده که میانگین کارایی PCR ژن‌های خانه‌دار مورد نظر در Plate را در بر می‌گیرد. با توجه به نتایج منحنی‌های استاندارد، از نرم‌افزار REST می‌توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه‌دار (*Actin1*) در هر نمونه مشخص با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ به‌عنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (Livak and Schmittgen 2001). در این روش بیان ژن مورد نظر با بیان *Actin1* که یک ژن خانه‌دار تنظیم شده است نرمال شده و بیان دائم آن توسط نرم‌افزار geNorm v3.4 تأیید شد. سپس از مقادیر نرمال شده برای مقایسه بیان متفاوت ژن‌ها در نمونه‌های مختلف استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن اختصاصی *DAO* و ژن خانه‌دار *Actin1* با استفاده از تارنمای اختصاصی Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) به آدرس (<https://www.idtdna.com>) برای دستیابی به آغازگرهای دارای خصوصیات مناسب انجام گرفت. در جدول ۱ نام آغازگرهای ژن‌های اختصاصی و خانه‌دار، توالی و شماره دسترسی آن‌ها ارائه شده است.

این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با نمونه‌گیری تصادفی و سه تکرار زیستی برای آزمایش‌های بخش فیزیولوژی و دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای آزمایش‌های بخش بیان نسبی ژن *DAO* انجام شد و آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن ($p < 0.01$) و با نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

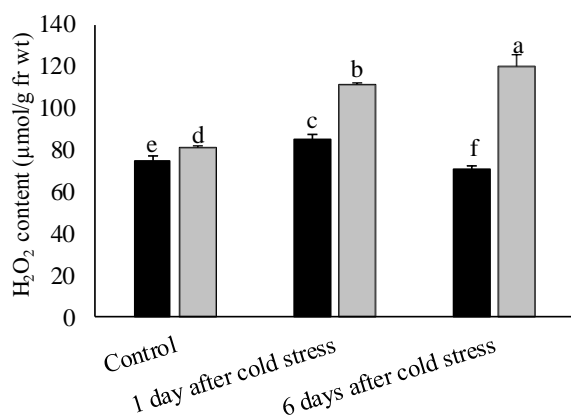
رساندن غلظت cDNA به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر (توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز یک درصد) استفاده شد. نتایج حاکی از مطابقت اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار (۱۸۹ جفت‌باز) بود. ۱۱۴۵ نانوگرم در میکرولیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen (Invitrogen)، سه میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۲۰) بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 (Bio-RAD) منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۷°C T_m آغازگر و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C. تایید اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب انجام شد. منحنی ذوب با خنک شدن تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در ثانیه ثبت شد، سپس در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند و سپس با گرمایش آهسته با سرعت ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در ثانیه تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. فلورسانس به‌طور مداوم در طول دوره افزایش آهسته دما برای نظارت بر تفکیک رنگ Evagreen اندازه‌گیری شد. ترسیم سیگنال‌های فلورسانس به‌طور خودکار در زمان واقعی و در مقابل دما برای ایجاد منحنی‌های ذوب انجام گرفت. بر اساس منحنی‌های استاندارد رسم شده حاصل از پنج

جدول ۱- توالی‌های آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (QPCR)

Accession number	Gene name	Protein name	Sequence (5'-3')	T_m (°C)	Amplicon length (bp)
AJ009825	<i>DAO</i>	Diamine oxidase	F: CTGTGCCTACTGCTGAGAAA R: TGAACCTTGTGTTGATGACTA	57	101
EU529707.1	<i>Act1</i>	Actin1	F: CTACGAATTGCTGATGGAC R: CCTCTGAAAGGACGATGTT	57	189

نتایج و بحث

یافت به طوری که این افزایش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی دار بود، چنین نتایجی بیانگر پاسخ‌های ژنتیکی مطلوب ژنوتیپ متحمل در جهت حفظ محتوی GABA برای مقابله با آثار مخرب ROS سلولی است (شکل ۳).



شکل ۲- تغییر میزان H₂O₂ در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (23 °C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (4 °C). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

در ژنوتیپ متحمل میزان Put در مقایسه با شاهد در روز اول افزایش نسبی غیر معنی دار و در روز ششم تنش افزایش ۱۱۶٪ داشت در حالی که در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش افزایش میزان این متابولیت در مقایسه با ژنوتیپ متحمل کمتر بود (تا ۱۴٪) (شکل ۳- الف). این نتایج با یافته‌های آزمایش در گیاهان زراعی که در آنها تحت تنش سرما میزان Put آزاد افزایش یافته، هماهنگ است (Zhang et al. 2013). بنابراین به نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی داری بین میزان آسیب سرما (از جمله نتایج H₂O₂) و افزایش میزان Put وجود داشته، به طوری که این نتایج با گزارش Kim et al. (2002) در مورد اثر اسپری پاشی Put بر تسریع افزایش پایداری غشای گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما هم‌خوانی داشت. آمین‌آکسیدازها (AOs) در مسیر تجزیه پلی‌آمین‌ها، با اتصال به رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و خنثی‌سازی آنها، H₂O₂ نیز تولید می‌کنند (Groppa and Benavides 2008). این فرایند در هموستازی سلول و بهبود

تفاوت معنی داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H₂O₂، پرولین، Put، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن DAO ($p < 0.01$) وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده در دو ژنوتیپ حساس و متحمل

نخود زراعی در سطوح مختلف تنش سرما					درجه آزادی	منابع تغییر
میانگین مربعات						
DAO	DAO	Proline	Put	H ₂ O ₂		
۱/۶۵**	۱/۸۰**	۱۳۸۸**	۳۱۶۷۲۲**	۳۳۲۷/۶۴**	۱	ژنوتیپ
۴/۵۴**	۳/۰۵**	۳۱/۸۲**	۷۶۷/۵۱**	۷۴۸/۹۸**	۲	دما
۰/۸۶**	۰/۵۶**	۱/۲۹**	۲۳۰/۵۴**	۶۶۴/۸۸**	۲	ژنوتیپ × دما
۰/۰۱۲	۰/۰۶	۰/۰۱۶	۵/۵۳	۱	۱۲	خطا
۵/۹۱	۱۷/۷۰	۲/۶۶	۹/۱۰	۱/۱		ضرب

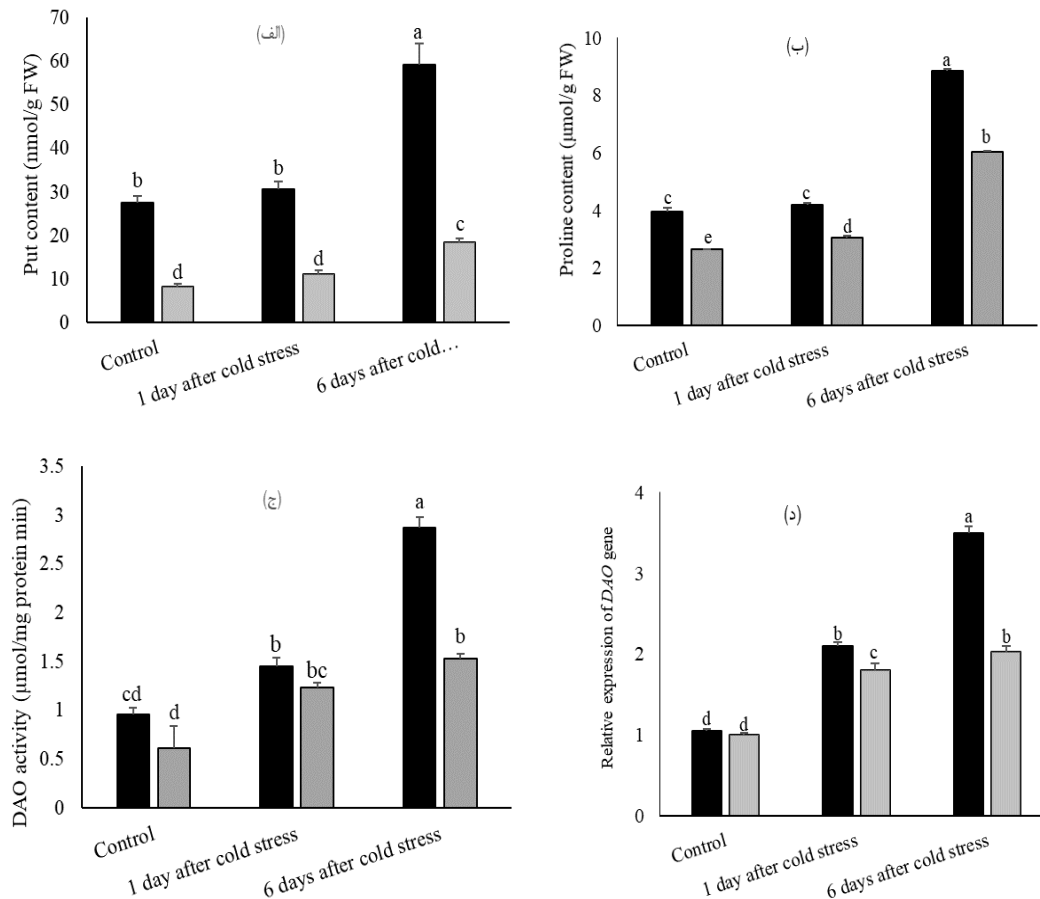
** بیانگر معنی داری در سطح یک درصد است.

میزان تجمع H₂O₂ که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (Kazemi Shahandashti and Maali, 2018)، تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (حداکثر بیش از ۶۹٪ در روز ششم تنش). در ژنوتیپ متحمل میزان H₂O₂ پس از افزایش معنی دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش یافته، به طوری که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد به طور معنی داری کمتر شد (بیش از ۴/۷٪)، در حالی که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد به طور پیوسته افزایش یافت (تا ۵۰٪) (شکل ۲). بنابراین درجه تحمل به تنش سرما در دو ژنوتیپ نخود با یکدیگر متفاوت بوده به طوری که این نتایج بیانگر ارتباط احتمالی تأثیر پاسخ‌های دفاعی ژنوتیپ‌های نخود می‌باشد.

در گیاهان بخشی از سازگاری به تنش در اثر تنظیم میزان پرولین از طریق مسیرهای بیوسنتزی آن و یا فعالیت مسیر تخریب پلی‌آمین‌ها مانند Put ایجاد می‌شود (Su and Bai 2008). نتایج نشان داد که در شرایط شاهد میزان متابولیت‌ها و فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۳ الف، ب، ج). تحت تنش سرما میزان پرولین، Put، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن DAO در هر دو ژنوتیپ افزایش

نقش می‌کند (Kamiab et al. 2014). اگرچه مسیر بیوستیز پرولین از پیش‌ماده گلوتامیک اسید نقش مهمی در تنظیم محتوی این متابولیت دارد، با این وجود مسیر تجزیه PAS نیز بخشی از مسیر تنظیم محتوی پرولین در سلول است (Su and Bai 2008). نتایج نشان داد تحت تنش محتوی پرولین در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت به طوری که بیشترین محتوی آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا بیش از ۲ برابر) (شکل ۳ ب).

تحمل سرما نقش حیاتی دارد. افزایش نسبی میزان H_2O_2 در پاسخ‌های زود هنگام و کاهش معنی‌دار آن در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل (شکل ۱) بیانگر نقش پیام‌رسانی H_2O_2 در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی می‌باشد که با افزایش میزان Put مطابقت داشت. پرولین یکی از ترکیبات سازگار ساز سلولی است که در حفاظت از اجزای سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش ایفای



شکل ۳- تغییر میزان پوتریسین (Put) (الف) و پرولین (ب)، فعالیت آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) (ج) و بیان ژن دی‌آمین‌اکسیداز (*DAO*) (د) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمایی طبیعی ($23^{\circ}C$)، روز اول و روز ششم تنش سرما ($4^{\circ}C$). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

حذف آثار نامطلوب خسارت اکسیداتیو و بازگشت به حالت طبیعی است. نتایج این پژوهش با یافته‌های پیشین در گیاهان زراعی و درختان میوه که در آنها تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما و شوری محتوی پرولین افزایش یافته، مطابقت دارد (Aziz et al. 1998; Su and Bai. 2008; Shang et al. 2011;)

در ژنوتیپ حساس هم محتوی پرولین در روز ششم تنش در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت (تا بیش از ۱/۳ برابر)، اگرچه تجمع آن در ژنوتیپ متحمل هم در شرایط شاهد و هم تحت تنش به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳ ب). افزایش محتوی پرولین در ژنوتیپ حساس بیانگر تلاش سلول به‌منظور

Fraxinus angustifolia کالوس (Santa-Cruz et al. 1999) و *Loutus glaber* (Tonon et al. 2004) و (Sanchez et al. 2005) تحت تنش شوری نیز مؤید نتایج این آزمایش است. اثر مثبت اسپری پاشی Put و اثر منفی تیمار آمینوگوانیدین (مهارکننده DAO) بر تجمع پرولین در گیاهان زراعی تحت تنش های محیطی (Aziz et al. 1998; Su and Bai 2008; Li et al. 2014) که بر فرایندهای سلولی از جمله تنظیم اسمزی و فشار تورگر، تعویق پیری، پایداری غشاء سلولی تأثیر می گذارد بیانگر نقش مسیر تجزیه Put در سنتز این اسموپروتکتنت (پرولین) است. مطابق با الگوی تغییر Put و پرولین تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ متحمل و حساس در مقایسه با شاهد به طور تدریجی افزایش یافت (حداکثر تا بیش از سه برابر) و در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل به بالاترین میزان رسید (شکل ۳-ج). فعالیت آنزیم DAO در بذر برنج تحت تنش سرما مانند نتایج این آزمایش روند افزایشی بود (Sheteiwy et al. 2017). اگرچه تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد فعالیت DAO در ژنوتیپ حساس نیز روند افزایشی داشت (حداکثر تا ۲/۵ برابر)، اما این روند صعودی در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل کندتر بود (شکل ۳-ج). نرخ کند افزایش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل احتمالاً به دلیل ضعف سامانه های دفاعی ژنوتیپ حساس در بهبود تحمل سرما در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود، نتایجی که با روند تغییر Put تحت تنش سرما مطابقت داشت. الگوی تغییر H_2O_2 در ژنوتیپ متحمل در شرایط شاهد و تحت تنش سرما برخلاف فعالیت DAO بود که احتمالاً به دلیل کارایی مطلوب ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در حذف H_2O_2 توسط فعالیت سامانه آنتی اکسیدانی است (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). این نتایج با یافته های (Duan et al. 2008) که گزارش کردند، تحت تنش شوری همزمان با افزایش میزان Put فعالیت آنزیم DAO افزایش یافته و میزان این پلی آمین با فعالیت آنزیم DAO در ارتباط است، همخوانی داشت. بنابراین به نظر می رسد که فعالیت DAO تحت تنش سرما وابسته به غلظت Put در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما به منظور پاسخ به آسیب های سلولی (نتایج H_2O_2) بوده، اگرچه در ژنوتیپ متحمل

(Cao et al. 2012; Palma et al. 2016; Song et al. 2015). همخوانی بین الگوی تجمع پرولین و کاهش معنی دار خسارت سلولی در روز ششم تنش به خصوص در ژنوتیپ متحمل بیانگر نقش پرولین در حذف ROSها است (شکل های ۲ و ۳ ب). بنابراین پرولین به عنوان اسموپروتکتنت غیر آنزیمی با حذف ROSها در پاسخ به تنش ایفای نقش می کند (Kamiah et al. 2014). به نظر می رسد عدم افزایش معنی دار پرولین در پاسخ زود هنگام ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد، به دلیل فعالیت بیشتر سایر سامانه های دفاعی برای بهبود تحمل به سرما باشد (شکل ۲). این یافته ها با گزارشات پیشین در خصوص اینکه پرولین در پاسخ های دیر هنگام گیاه به تنش های محیطی تجمع یافته و در شرایط بازایی پس از تنش، محتوی افزایش یافته آن به عنوان منبع نیتروژن و بهبود دهنده علائم تنش مؤثر است، همخوانی دارد (Aziz et al. 1998). با توجه به هماهنگی تغییر الگوی پرولین با سایر متابولیت ها و اجزا دفاعی سلول همزمان با کاهش خسارت های سلولی در این آزمایش، به نظر می رسد که تحت تنش سرما شبکه ای از پاسخ های دفاعی به منظور بهبود تحمل به تنش سرما در نخود فعال شده است. در ژنوتیپ متحمل نخود با توجه به کاهش معنی دار میزان H_2O_2 تحت تنش سرما، احتمالاً همکاری پرولین با سایر متابولیت ها در کاهش خسارت اکسیداتیو مؤثر بوده است. از دیدگاه فیزیولوژیک، مسیر کاتابولیسم PAS در گیاهان به دلیل ایفای نقش Put به عنوان پیش ساز بخشی از پرولین تجمع یافته تحت تنش، در همکاری با مسیر عمده بیوستتزی پرولین با پیش ساز گلوتامیک اسید در بهبود پاسخ نخود به تنش سرما نقش دارد. بنابراین افزایش محتوی پرولین تحت تنش و همچنین در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با حساس (شکل ۳ ب) بیانگر وجود ارتباط مسیر متابولیسمی PAS و پرولین از طریق سنتز ATP و NADH می باشد (Su and Bai. 2008). گزارش شده که در سویا تحت تنش شوری، بخشی از پرولین تجمع یافته از طریق مسیر تجزیه PAS سنتز شده است (Su and Bai 2008). وجود همبستگی بین پرولین و PAS در گونه های دیگر از جمله گیاهچه های گوجه فرنگی تحت تنش سرما (Song et al. 2015)، سویا (Su and Bai, 2008)، کلزا (Aziz and Larher, 1995)، گوجه فرنگی (Aziz et al. 1998)

روز ششم تنش سرما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به طور معنی داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (حداکثر تا بیش از ۱/۷ برابر در روز ششم پس از تنش سرما) (شکل ۳ د). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به ترتیب بیش از ۲/۲ و ۳/۵ برابر افزایش یافت (شکل ۳ د). این نتایج بیانگر القاء مؤثرتر فعالیت ژنوم در سطح رونویسی به منظور آماده سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین تر به موازات بروز کمترین خسارت می باشد. همچنین بیان این ژن با نتایج میزان پرولین تحت تنش مطابقت داشت، که نشان می دهد بیان این ژن با تنظیم میزان این متابولیت در سطح رونویسی مسئول پاسخ به سرما در نخود بوده، مشاهداتی که توسط نتایج شاخص آسیب سلولی نیز تایید شد. این یافته ها با نتایج Tanou et al. (2014) که گزارش کردند که تحت تنش شوری بیان نسبی ژن های مسیر تجزیه PAS (DAO و PAO) در نارنج (*Citrus aurantium L.*) افزایش یافته، هماهنگ است. همچنین موتاسیون در ژن *CuAO* سبب حساسیت آراییدوپسیس به تنش اسمزی شد (Wimalasekera et al. 2011b). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، القای بیان این ژن در گیاهان متحمل در اثر برنامه ریزی مجدد بیان ژن ها و هموستازی سلولی نقش مؤثری در ایجاد الگوی پاسخ های سازگاری به تنش سرما ایفاء می کند.

نتیجه گیری کلی

ارتباط شاخص آسیب سلولی (H_2O_2) و میزان متابولیت های اندازه گیری شده (Put و پرولین) در این آزمایش ناهمسو بود، به طوری که تجمع این متابولیت ها در ژنوتیپ متحمل به موازات فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن *CaDAO*، با کاهش آسیب سلولی در ارتباط بود. به نظر می رسد این فرایندها غالباً همراه با القای سامانه های دفاعی خواهد بود. پاسخ های متمایز زودهنگام و دیرهنگام ژنوتیپ ها به تنش سرما بیانگر راهبرد چندگانه دفاعی سلول نخود به تنش سرما است. نتایج نشان داد که در نخود تجمع بیشتر پرولین به عنوان اسموپروتکتنت سلولی با کاهش میزان آسیب های سلولی و تحمل بیشتری به تنش سرما همراه بود و این موضوع احتمالاً می تواند در برنامه های اصلاحی مد نظر قرار گیرد.

با فعالیت شدیدتر این آنزیم به دلیل تجمع بیشتر Put با کاهش شدیدتر H_2O_2 همراه بود. پژوهش ها نشان داده که در گوجه فرنگی سازگار شده به سرما فعالیت DAO در رقم متحمل به طور چشمگیری در مقایسه با حساس افزایش یافت (Song et al. 2015). بنابراین افزایش معنی دار فعالیت آنزیم تجزیه کننده Put از طریق کارتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش های غیرزیستی از جمله سرما نقش داشته باشد (Shelp et al. 2012a). تحت تنش های محیطی کاتابولیس Put علاوه بر ایفاء نقش در سازوکارهای دفاعی در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو (از جمله جوانه زنی، استحکام دیواره سلولی، نمو ریشه، رسیدن میوه و پیری)، شار کربن، چرخه TCA و پیام رسانی سلولی مشارکت دارد (Tavladoraki et al. 2012). همچنین اگرچه مسیر بیوستتزی PAS نقش مهمی در تنظیم میزان این متابولیت ها دارد، مسیر تجزیه آن ها نیز از یک سو به دلیل ارتباط با مسیرهای متابولیسمی متعدد آمینواسیدها و از سوی دیگر تولید مولکول های پیام رسان پرولین و H_2O_2 در هموستازی آن ها مؤثر است (Moschou et al. 2012). بنابراین نتایج این پژوهش، الگوی متمایز فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ های حساس و متحمل و همچنین پاسخ های زودهنگام و دیرهنگام به سرما در نخود زراعی را نشان داده، به طوری که مطالعه فعالیت این آنزیم به عنوان عامل مؤثر در یکی از دو مسیر تولید Put و پرولین در شرایط آزمایش تایید کننده اختلافات در تجمع این متابولیت ها به عنوان شاخص های تحمل در برابر عوامل آسیب های سلولی (نتایج H_2O_2) در ژنوتیپ های نخود تحت تنش سرما است.

ژن *DAO* (*CuAO*) رمز کننده آنزیم DAO یکی از اجزای این مسیر بیوستتزی در شبکه متابولیک پاسخ به تنش های محیطی است (Wimalasekera et al. 2011b). به منظور دستیابی به اساس مولکولی چگونگی تغییر متابولیت پرولین در پاسخ به تنش سرما، بیان نسبی ژن *DAO* بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی توالی رمز کننده آنزیم DAO در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد به طور پیوسته افزایش یافت (تقریباً حداکثر تا بیش از ۳/۳ برابر) (شکل ۳ د) که حاکی از مؤثرتر بودن این مسیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در جهت القا تحمل به سرما بود. در روز اول و همچنین

منابع

- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Tiburcio AF (2010a). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231: 1237-1249.
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Altabella T (2010b). 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, Tiburcio AF (Eds.). (2018) Polyamines: Methods and Protocols. Humana Press.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* 24:1337-1344.
- Amini S, Maali-Amiri R, Mohammadi R, Kazemi-Shahandashti SS (2017) cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO₂ nanoparticles during cold stress. *Plant Physiology Biochemistry* 111:39-49.
- Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P, Tisi A (2010) Plant amine oxidases "on the move": an update. *Plant Physiology Biochemistry* 48:560-564.
- Aziz A, Larher F (1995) Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. *Plant Science* 112:175-186.
- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F (1998) Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum* 104:195-202.
- Cao S, Cai Y, Yang Z, Zheng Y (2012) MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and gamma-aminobutyric acid contents. *Food Chemistry* 133:1466-1470.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11:80-88.
- Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol* 64:1019-1026.
- Duan J, Li J, Guo S, Kang Y (2008) Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165:1620-1635.
- Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Zilberstein A (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology* 38:755-764.
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34:35-45.
- Handa AK, Nambesan S, Mengiste T, Laluk K, AbuQamar S, Mattoo AK (2010, July). Polyamine spermidine is an upstream negator of ethylene-regulated pathogenesis of *Botrytis cinerea* in tomato leaf. In *III International Symposium on Tomato Diseases* 914:109-112.
- 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 (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170:459-469.
- Hung HY, Shannon LM, Tian F, Bradbury PJ, Chen C, Flint-Garcia SA, Holland JB (2012) ZmCCT and the genetic basis of day-length adaptation underlying the post domestication spread of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:E1913-E1921.
- Hurry VM, Huner NPA (1991) Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiology* 96:491-497.
- Janmohammadi M, Abbasi A, Sabaghnia N (2012) Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Acta Agriculture Slovenica* 99:31.
- Javadian N, Karimzadeh G, Mahfoozi S, Ghanati F (2010) Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russ. Journal of Plant Physiology* 57:540-547.
- Kamiab F, Talaie A, Khezri M, Javanshah A (2014) Exogenous applications of free polyamines enhance salt tolerance of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. *Plant Growth Regul* 72:257-268.
- 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, Ramezanpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Molecular Biology Reporter* 40:893-903.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R (2018) Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *Journal of Plant Physiology* 226:123-135.
- 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 Plant of Physiology* 171:1106-1116.
- Kim TE, Kim SK, Han TJ, Lee JS, Chang SC (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Physiologia Plantarum* 115:370-376.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8:1323-1335.
- Kliebenstein DJ, and Osbourn A (2012) Making new molecules evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current opinion in plant biology* 15:415-423.

- Konishi S, Izawa T, Lin SY, Ebana K, Fukuta Y, Sasaki T, and Yano M (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* 312:1392-1396.
- Li Z, Peng Y, Zhang XQ, Ma X, Huang LK, Yan YH (2014) Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. *Molecules* 19:18003-18024.
- 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.
- López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Iribarne C, Lluch C (2014) Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant Soil* 374:149-159.
- 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.
- Madhulatha P, Gupta A, Gupta S, Kumar A, Pal RK, Rajam MV (2014) Fruit-specific over-expression of human S-adenosylmethionine decarboxylase gene results in polyamine accumulation and affects diverse aspects of tomato fruit development and quality. *Journal of plant biochemistry and biotechnology* 23:151-160.
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in plant science* 5:175.
- Moore BD, Andrew RL, K€ulheim C, and Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist* 201:733-750.
- 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.
- Nayyar H, Satwinder K, Kumar S, Singh KJ, Dhir KK (2005) Involvement of polyamines in the contrasting sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) to water deficit stress. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46.
- Palma F, Carvajal F, Ramos JM (2015) Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. *Postharvest Biology and Technology* 99:131-140.
- Palma F, Carvajal F, Jamilena M, Garrido D (2016) Putrescine treatment increases the antioxidant response and carbohydrate content in zucchini fruit stored at low temperature. *Postharvest Biology and Technology* 118:68-70.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e36.
- Rakei A, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ranjbar M (2016) DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma* 253:61-76.
- Rayapati PJ, Stewart CR (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology* 95:787-791.
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri SK, Nazaryan R (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Molecular Biology Reporter* 29:848-858.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163:1037-1046.
- Sanchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* 168:541-546.
- Sanchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* 168:541-546.
- Santa-Cruz A, Acosta M, Rus A, Bolarin MC (1999) Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:65-71.
- Shang H, Cao S, Yang Z, Cai Y, Zheng Y (2011) Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59:1264-1268.
- Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ (2012a) Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science* 193:130-135.
- Sheteiwy M, Shen H, Xu J, Guan Y, Song W, Hu J (2017) Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5-aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 137:58-72.
- Song Y, Diao Q, Qi H (2015) Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. *Plant Growth Regulation* 75:21-32.
- Sotiropoulos TE (2007) Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. *Biologia plantarum* 51:177-180.
- Su GX, Bai X (2008) Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Plant Cell Environment* 52:796.
- Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Molassiotis A (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ* 37:864-885.
- Tavakoli M, Poustini K, Alizadeh H (2016) Proline accumulation and related genes in wheat leaves under salinity stress. *Journal of Agricultural Science* 18:707-716.

- Tavladoraki P, Cona A, Federico R, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Agostinelli E (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino acids* 42:411-426.
- 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.
- Tonon G, Kevers C, Faivre-Rampant O, Graziani M, Gaspar T (2004) Effect of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on proline and free polyamine levels in embryogenic *Fraxinus angustifolia* callus. *Journal of Plant Physiology* 161:701-708.
- Turchetto-Zolet AC, Margis-Pinheiro M, Margis R (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular Genetics and Genomics* 281:87-97.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35:753-759.
- Walter HJP, Geuns JM (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology* 83:232-234.
- Wang X, Chen Q, Wu Y, Lemmon ZH, Xu G, Huang C, Tian F (2018) Genome-wide analysis of transcriptional variability in a large maize-teosinte population. *Molecular plant* 11:443-459.
- Weiberg A, Karlovsky P (2009) Components of variance in transcriptomics based on electrophoretic separation of cDNA fragments (cDNA-AFLP). *Electrophoresis* 30:2549-2557.
- Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GFE (2011b) *COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1)* of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant* 4:663-678.
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011a) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181:593-603.
- Zhang X, Shen L, Li F, Meng D, Sheng J (2013) Hot air treatment-induced arginine catabolism is associated with elevated polyamines and proline levels and alleviates chilling injury in postharvest tomato fruit. *Journal of Science Food Agriculture* 93:3245-3251.