

تأثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم در بیان نسبی برخی ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش سرما در نخود

سعید امینی^۱، رضا معالی امیری*^۲ و ولی الله محمدی^۳

۱، ۲ و ۳، به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۳)

چکیده

در این آزمایش برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی مانند نشت الکترولیتی غشا (ELI) و بیان نسبی ژن‌های گیرنده کینازی (RLK)، عامل رونویسی پاسخ به اتیلن (ERF) و گیرنده غشای واکوئل ۶ (VSR-6) به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی در شرایط تنش سرما (۴°C) و تیمار نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر) در دو نژادگان (ژنوتیپ) حساس (ILC533) و متحمل (Sel96Th11439) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) بررسی شد. نتایج نشان داد، در شرایط تنش سرما میزان ELI در نژادگان حساس افزایش معنی‌داری در مقایسه با نژادگان متحمل داشته که بیانگر ظرفیت ژنتیکی متفاوت دو نژادگان به تنش سرما بود. در شرایط تنش سرما نانوذرات باعث کاهش معنی‌دار در میزان ELI شده به طوری که نژادگان متحمل میزان ELI پایین‌تری در مقایسه با نژادگان‌های حساس نشان داد. بنابراین نانوذرات استفاده شده نه تنها آسیبی به غشای یاخته وارد نکرده بلکه در شرایط تنش سرما سبب کاهش آسیب‌ها نیز شدند. گیاهان متحمل در مقایسه با گیاهان حساس و همچنین گیاهان تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری در بیان نسبی ژن‌های *ERF*، *RLK* و *VSR-6* نشان دادند. بیان این ژن‌ها به احتمال در بقا یا بازیابی گیاه در شرایط تنش مؤثر است زیرا به موازات آن آسیب‌های یاخته‌ای (ELI) که در نتیجه گونه‌های فعال اکسیژن شکل می‌گیرد، کاهش می‌یابد. بنابراین افزایش بیان سریع و موقت این ژن‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر فرایند سازگاری نخود به تنش سرما به شمار آید. این که، گیاهان نخود تیمار شده با نانوذره TiO_2 آسیب کمتر و بیان نسبی بیشتر ژن‌های مؤثر در تحمل به تنش سرما را دارند، ممکن است کاربرد جدیدی برای نانوذرات فراهم کرده و منجر به ایجاد عملکرد پایدارتری در شرایط تنش در این گیاه شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش سرما، شاخص آسیب، نانوذرات TiO_2 ، نخود.

Effect of TiO_2 nanoparticles on relative expression of some genes involved in response to cold stress in chickpea

Saeed Amini 1, Reza Moali Amiri * 2 and Valiullah Mohammadi 3

1, 2 and 3, respectively, as a graduate student and Associate professors of agricultural and natural resources campus of Tehran University, Karaj

(Received: February 4, 2017- Accepted: July 4, 2017)

ABSTRACT

In this experiment, physiological responses such as electrolyte leakage index (ELI) and relative expression of *receptor-like kinase (RLK)*, *ethylene response transcription factor (ERF)* and *vacuolar sorting receptor 6 (VSR-6)* genes by Real-time PCR were studied in two genotypes of chickpea (*Cicer arietinum* L.) which are different in cold sensitivity (tolerant, Sel96Th11439 and sensitive, ILC533) during cold stress (4°C) and TiO_2 nanoparticles (NPs) (5 mg/l). The results showed that ELI content increased under cold stress conditions in sensitive genotype compared to tolerant one, which indicated their genetic capacity to cold stress. During cold stress, TiO_2 NPs caused a significant decrease in ELI, so that tolerant plants had lower ELI than sensitive ones. Therefore, the applied nanoparticles not only did not disturb the cell membrane under cold stress but also are caused to decline of damages. During cold stress, tolerant plants compared to sensitive ones, as well as in plants treated with TiO_2 NPs compared to control plants showed significant increase in transcription levels of *RLK*, *ERF* and *VSR-6* genes. An increase in expression of these genes is probably effective in the survival or recovery of plant because along with their increase, cell damages (ELI) resulted from reactive oxygen species (ROS) are decreased. Therefore, rapid and transient up-regulation of these genes particularly may be considered as functional markers in acclimation process in chickpea against cold stress. This finding that chickpea plants treated with TiO_2 show less damage and more relative expression of genes involving in cold tolerance may be establish new usage for nanoparticles and lead to the stable yield under stress in these plants.

Keywords: Chickpea, Cold stress, TiO_2 nanoparticles, Damage index, Gene expression.

* Corresponding author E-mail: rmamiri@ut.ac.ir

مقدمه

در مناطق آب‌وهوای مدیترانه‌ای، مدیریت تنش‌های خشکی و گرمای انتهایی فصل با تغییر در زمان کشت نخود (*Cicer arietinum* L.) از زمان معمول کشت (بهار) به اواخر زمستان یا پاییز روشی کارآمد است، اما می‌تواند کاهش عملکرد را نیز به دنبال داشته باشد (Berger, 2007; Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). تنش سرما می‌تواند در بسیاری از نقاط ایران که زمستان ملایمی دارند رشد و نمو، کیفیت و عملکرد نخود را کاهش دهد (Hosseini *et al.*, 2016). نتایج بررسی‌های اخیر نشان داده است، نانوذرات TiO_2 در القا جوانه‌زنی بذر، رشد گیاه، افزایش وزن خشک، ساخت (سنتز) سبزینه (کلروفیل) و ساخت‌وساز (متابولیسم) نورساخت (فتوسنتز) در گیاهان نقش ایفا می‌کنند (Singh *et al.*, 2012). بنابراین برای توسعه استفاده از نانوذرات TiO_2 در بهبود ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیک)، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان ظرفیت زیادی وجود دارد (Mingyu *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2012; Berahmand *et al.*, 2012). بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان با استفاده از نانوذرات (NPs)، ممکن است روشی اقتصادی و کم‌خطر در القا تحمل به تنش‌های محیطی باشد (Mohammadi *et al.*, 2013). با این حال برخی بررسی‌ها تأثیر منفی نانوذرات TiO_2 را بر گیاهان گزارش کرده‌اند (Asli & Neumann 2009; Castiglione *et al.*, 2011). به طوری که تأثیر آن بر گیاهان با توجه به گونه و نژادگان (ژنوتیپ) گیاهی، بافت، مراحل رشد، غلظت‌های استفاده‌شده و ویژگی‌های اختصاصی نانوذرات متفاوت بوده، بنابراین کاربرد گسترده آن‌ها در کشاورزی و علوم گیاهی هنوز نیاز به بررسی دارد (Nair *et al.*, 2010; Kurepa *et al.*, 2010). در بسیاری از تحقیقات پیشین تأثیر انواع نانوذرات (از جمله نانوذرات TiO_2) بر گیاهان در شرایط طبیعی بررسی شده و شمار اندکی از بررسی‌ها در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی انجام شده‌اند (Mohammadi *et al.*, 2014, Hasanpour *et al.*,)

2015). بنابراین در حمایت از افزایش استفاده از نانوذرات TiO_2 باید نقش آن‌ها در شرایط تنش سرما بررسی شود. تنش سرما مانند دیگر تنش‌های محیطی القاکننده فرایندهای اکسایشی (اکسیداتیو) در یاخته‌های گیاهی است. این فرایندها با افزایش تولید ROS^1 که با بسیاری از اجزای یاخته‌ای به طور غیراختصاصی واکنش می‌دهند در ارتباط است (Mittler *et al.*, 2004). تغییر شرایط محیطی باعث تغییر در میزان حالت فیزیکی غشاء، در نتیجه تغییر عملکرد آن شده که در درک و انتقال پیام‌های محیطی و برنامه‌ریزی بیان ژن‌ها و سوخت‌وساز (متابولیسم) یاخته‌ای ایفای نقش می‌کند. چنین پاسخ‌هایی ممکن است سبب سازگاری یاخته به عامل‌های محیطی شود یا اینکه در نتیجه نبود ظرفیت ژنتیکی باعث مرگ گیاه شود (Heidarvand & Maali-Amiri 2010). افزایش میزان شاخص نشت غشا² (ELI) در شرایط تنش سرما می‌تواند به عنوان شاخص آسیب غشا به کار رود.

هر یک از عامل‌های محیطی، برنامه‌ریزی تظاهر ژن‌ها را به شکل متفاوتی تغییر می‌دهد. امروزه با استفاده از فناوری‌های جدید می‌توان با بررسی بیان ژن‌ها، بخشی از پاسخ‌های یاخته در سطح رونویسی (ترانسکریپتوم) را شناسایی کرد. درک شرایط محیطی مانند تنش سرما، به منظور ارائه پاسخ، یکی از ویژگی‌های یاخته گیاهی است که توسط گیرنده‌های چندی از جمله گیرنده‌های کینازی غنی از سرین/ترونین (RLK³) تنظیم می‌شود (Kreps *et al.*, 2002). این اطلاعات از مسیرهای پیام‌رسانی⁴ برای القا پاسخ‌های دفاعی راه‌اندازی می‌شوند. بنابراین با بررسی بیان این ژن شناخت دقیق‌تری از چگونگی درک سیگنال‌های تنش خواهیم داشت.

برنامه‌ریزی تظاهر ژن‌ها وابسته به شبکه تنظیمی گسترده‌ای است که با فعالیت عامل‌های رونویسی (TF⁵) اختصاصی مانند ERF⁶ها (از خانواده عامل‌های

1. Reactive oxygen species
2. Electrolyte leakage index
3. Receptor-like serine/threonine kinase
4. Signal transduction
5. Transcription factor

بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از دو نژادگان نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) Sel96Th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) که از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شده بودند، استفاده شد.

شرایط رشد و تیمار با نانوذرات TiO_2

بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم، قرار گرفت. بذرها در شرایط بدون نور و دمای $23^{\circ}C$ پس از ۷۲ ساعت جوانه‌زده و سپس گیاهچه‌ها به گلدان انتقال یافت. انتقال غیرمستقیم گیاهان به خاک به دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن‌ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای $23^{\circ}C$ و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. محلول پاشی نانوذره به گیاهچه‌ها به صورت پاشش (اسپری) در دوازدهمین و شانزدهمین روز آزمایش (در این شرایط گیاهچه پنج شاخه داشتند) انجام شد، گیاهان شاهد (کنترل) توسط آب محلول پاشی شدند. پودر نانوذره TiO_2 از شرکت پاک فن گستر تهران (تهیه شده از گروه Nanoyo سنگاپور) تهیه شد. ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی نانوذرات در (Mohammadi *et al.*, 2013) ارائه شده است. دروایه (سوسپانسیون) نانوذره TiO_2 (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر) در آب دو بار تقطیر شده به روش فراصوتی اولتراسونیکیشن (۳۸ W، ۱۲۰) ۲۰-۳۰ دقیقه تهیه شد. برای بررسی پاسخ‌های گیاه به تنش سرما، در روز بیست و یکم آزمایش گیاهچه‌های محلول پاشی شده و شاهد به

رونویسی $AP2^Y$ میزان بیان ژن‌های القایی در شرایط تنش تنظیم می‌شود (Gu *et al.*, 2017; Ohama *et al.*, 2017). در شرایط تنش سرما پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متنوعی با تنظیم شبکه پیام‌رسانی توسط TFs القا می‌شود که در افزایش درجه تحمل گیاه به تنش سرما شرکت می‌کند. همچنین در شرایط تنش‌های محیطی به‌منظور تغییر مسیرهای سوخت‌وسازی میزان انتقال مواد یاخته‌ای اکسید شده به واکوئل و تخریب آن‌ها افزایش می‌یابد (Keinanen *et al.*, 2007). پروتئین‌های گیرنده غشای واکوئل (تونوپلاست) از جمله $VSR-6^A$ با نشانه‌گذاری پروتئین‌های محلول و تنظیم فرایندهای یاخته‌ای (Marty, 1999; Craddock *et al.*, 2008) نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش ایفا می‌کند (Zouhar *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد تغییر بیان نسبی ژن‌های رمزکننده این پروتئین‌ها اطلاعات سودمندی در زمینه جریان انتقال پروتئین‌ها در شرایط تنش سرما ارائه می‌کند. با توجه به تأثیر مثبت نانوذرات بر ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاهان که به احتمال تحمل گیاه نخود را در برابر آسیب اکسایشی ناشی از تنش سرما افزایش می‌دهد.

بر پایه ارزیابی‌های اولیه در زمینه معیار ۵۰ درصد جلوگیری از رشد ریشه نخود (EC_{50})، غلظت‌هایی از نانوذره TiO_2 در این آزمایش استفاده شد که تأثیر منفی بر ساختارهای یاخته‌ای نداشته و برای حیات انسان و گیاهان مخاطره ایجاد نکنند (۵ میلی‌گرم بر لیتر) (Mohammadi *et al.*, 2013). با این وجود در زمینه اینکه آیا غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند اثرگذاری‌های مثبتی را بر پاسخ به تنش سرما در سطوح فیزیولوژیکی مولکولی گیاه نشان دهد، اطلاعاتی در دسترس نبود. در این تحقیق تأثیر نانوذرات TiO_2 بر شاخص‌های آسیب غشا (ELI) و بیان نسبی ژن‌های مؤثر در مسیرهای بیوشیمیایی پاسخ به تنش سرما در دو نژادگان نخود (نژادگان متحمل Sel94Th11439 و نژادگان حساس ILC533)

6. Ethylene response factor

7. *APETALA2*

8. Vacuolar-sorting receptor 6

دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI با روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. ۲ میکروگرم RNA، ۱ 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 سی دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس ۱ میکرولیتر EDTA به لوله‌ها اضافه شد و به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شدند. لوله‌ها در دمای ۸۰°C- نگه‌داری شدند. ۵ میکرو لیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی^{۱۰} (۱) پیکومول (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات^{۱۱} با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر لوله اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid 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، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. به منظور تأیید ساخت cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار (*Actin1*) به شماره دسترسی *EU529707.1* روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA ساخت شده به ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن روی ژل ۱ درصد آگارز استفاده شد، که اندازه نوار (باند) مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار همخوانی داشت (۱۸۹ bp). ۱۲۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر RNA برای ساخت cDNA استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن‌های گیرنده‌های کینازی غنی

اتاقک رشد با دمای ۴°C منتقل شدند و نمونه‌گیری در روز اول پس از آغاز تنش سرما (برای بررسی پاسخ‌های زود هنگام گیاه) و روز ششم پس از آغاز تنش (برای بررسی پاسخ‌های دیر هنگام گیاه) انجام شد. نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۳°C نیز انجام گرفت.

اندازه‌گیری تحمل سرما بر پایه شاخص نشت الکترولیتی غشا (ELI)

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیتی از برگ‌های بخش میانی ساقه (برگ‌های این قسمت از نظر اندازه و سبزینه یکنواختی بیشتری دارند) استفاده شد. ۸۰ میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله‌آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال یافت. برای جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلأ 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 هدایت الکتریکی سنج (EC متر Inolab، آلمان) خوانده شد. میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC2) پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب جوش (۹۵°C) و ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه لرزا (شیکر) تعیین شد و در نهایت میزان شاخص آسیب بر پایه رابطه زیر محاسبه شد (Popov et al., 2005).

$$I = EC1/EC2 * 100$$

استخراج RNA، ساخت cDNA و PCR کمی

استخراج RNA کل یاخته‌ای توسط روش بایازول^۹ (فرژن پویش، تهران، ایران) از ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگ‌های خرد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی سترون شده (استریل) انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل ۱ درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 18S و 28S روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تأیید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از

10. Oligo dt
11. Deoxynucleothriphosphate

9. Biozol

سرما، نانوذرات TiO_2 پاسخ‌های مولکولی و فیزیولوژیک بررسی شده را در نخود زراعی القا کرده و به موازات کاهش در شاخص‌های آسیب، میزان تحمل به سرما را در نخود افزایش داد.

شاخص نشت الکترولیتی (ELI)

در فرآیند تنش سرما محتوای نشت الکترولیتی (ELI) به عنوان شاخص فیزیولوژیک آسیب در نظر گرفته شده که در این آزمایش از یک سو میزان آسیب غشا و از سوی دیگر تأثیر تعدیل‌کننده نانوذرات TiO_2 بر آسیب یاخته‌های گیاهی را نشان داد (Heidarvand *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2013). نتایج بررسی تفاوت‌های معنی‌داری بین گیاهان در شرایط تیمارهای آزمایشی نشان داد (شکل ۱). در شرایط تنش‌های محیطی میزان ROSها در گیاهان افزایش می‌یابد که می‌تواند باعث تغییر تعادل (هموستازی) یاخته‌ای شود (Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2014). یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک برای بررسی تأثیر تنش بر گیاه محتوای نشت الکترولیتی (ELI) است به طوری که میزان آسیب ایجاد شده را به دقت نشان می‌دهد. زیرا ELI در نتیجه آسیب ROSها بر غشای پلاسمایی به وجود می‌آید. بنابراین هنگامی که در شرایط تنش‌های محیطی ELI بررسی می‌شود، در واقع نتیجه تأثیر ROSها بر غشا نیز بررسی می‌شود. در دمای معمولی میزان ELI در گیاهان متحمل کمتر از گیاهان حساس بود (به تقریب ۲۹ درصد) به طوری که تفاوت ژنتیکی دو نژادگان را در تنظیم نشت الکترولیتی آشکار کرد. در همین شرایط میزان ELI در گیاهان متحمل تیمار شده با نانوذرات TiO_2 به طور معنی‌داری (به تقریب ۲۵ درصد) کاهش یافت (شکل ۱). در شرایط تنش سرما میزان ELI در هر دو نژادگان در شرایط طبیعی و تیمار شده با نانوذرات TiO_2 (به تقریب تا ۶۰ درصد) افزایش یافت که بیانگر حساسیت نژادگان‌های نخود به تنش سرما بود. با این وجود چنین افزایشی در میزان ELI در گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با گیاهان شاهد چشمگیر نبود و به احتمال القا و تقویت

از سرین/ترونین (*RLK*)، عامل رونویسی پاسخ به اتیلین (*ERF*) و گیرنده غشای واکوئل ۶ (*VSR-6*) و همچنین ژن خانه‌دار *Actin-1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. در جدول ۱ توالی آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار ارائه شده است. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، ۳ میکرولیتر آب مقطر سترون، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پس‌رو با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA ساخت شده با غلظت ۲۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، صفحه (پلیت) مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: دو دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای $95^{\circ}C$ ، ۱۰ ثانیه در دمای $60^{\circ}C$ (دمای T_m آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ REST¹² برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار استفاده شد (Pfaffl *et al.* 2002).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق پاسخ به تنش سرما در دو نژادگان نخود (متحمل Sel94Th11439) و (حساس ILC533) و در سه سطح تنش سرما (شاهد، روز اول و ششم پس از تنش سرما) و دو غلظت نانوذره TiO_2 (شاهد و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شد. داده‌های آزمایشی بر پایه آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی در سه تکرار به کمک نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد، تیمارهای آزمایشی از نظر صفات بررسی شده تفاوت معنی‌داری ($p < 0.01$) داشتند به طوری که طی تنش

12. Relative Expression Software Tool

al., 2011). بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت انتخابی نانوذرات TiO_2 (۵ میلی‌گرم بر لیتر) در نخود نه تنها سبب آسیب از طریق تنش اکسایشی نمی‌شود، بلکه این آسیب‌ها را در شرایط تنش سرما کاهش نیز می‌دهد. سازوکار تأثیر نانوذرات TiO_2 در یاخته‌های گیاهی ناشناخته است (Laure et al., 2012)، لذا کاهش میزان ELI در شرایط تنش سرما می‌تواند در نتیجه کاهش تولید ROS به دلیل تأثیر تحریک‌کنندگی سازوکارهای مؤثر در حذف ROS به وسیله نانوذرات TiO_2 باشد. به عبارت دیگر نانوذرات TiO_2 به عنوان پیام‌رسان ممکن است در القا پاسخ‌های مولکولی در شرایط تنش سرما نقش ایفا کنند.

سامانه‌های دفاعی را در بافت‌های گیاه در شرایط تنش سرما نشان داد (شکل ۱). نتایج پژوهش‌های گذشته نشان داده است، گیاهان متحمل به سرما، آسیب غشایی کمتری در مقایسه با گیاهان حساس دارند (Nazari et al., 2012; Shahryar and Maali-Amiri, 2016). کمترین میزان ELI در گیاهان متحمل تیمار شده با نانوذرات TiO_2 و بالاترین میزان آن در گیاهان حساس شاهد در روز ششم تنش سرما مشاهده شد (شکل ۱- الف) که به ترتیب نشان‌دهنده فرایند سرماسازگاری و آسیب شدید در این گیاهان بود. نشت بیش از ۵۰ درصد از الکترولیت‌های برگ در گیاهان آسیب شدید به شمار می‌آید (Heidarvand et

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

Table 1. Primer sequences used in qPCR amplification.

Accession number	Gene	Protein	Sequence (5'-3')	T _m (°C)	Amplicon length (bp)
XM_012712002	<i>RLK</i>	Receptor-like kinase	F: CAATGTGATCAATGTGGCTCT R: TTCTGTCATCCAACACCTCAG	61	169
XM_004501500	<i>ERF</i>	Ethylene-responsive factor	F: AACAGAACCAACAACAACG R: GGGTTATGTAAGAACCACCA	61	155
XM_004487833	<i>VSR-6</i>	Vacuolar sorting receptor-6	F: GGCTGCTCTAGCTGGTTACATT R: TTTCTTACACCGTGTCTTGTCTG	62	153
EU529707.1	<i>Actin 1</i>	Actin 1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT	62	189

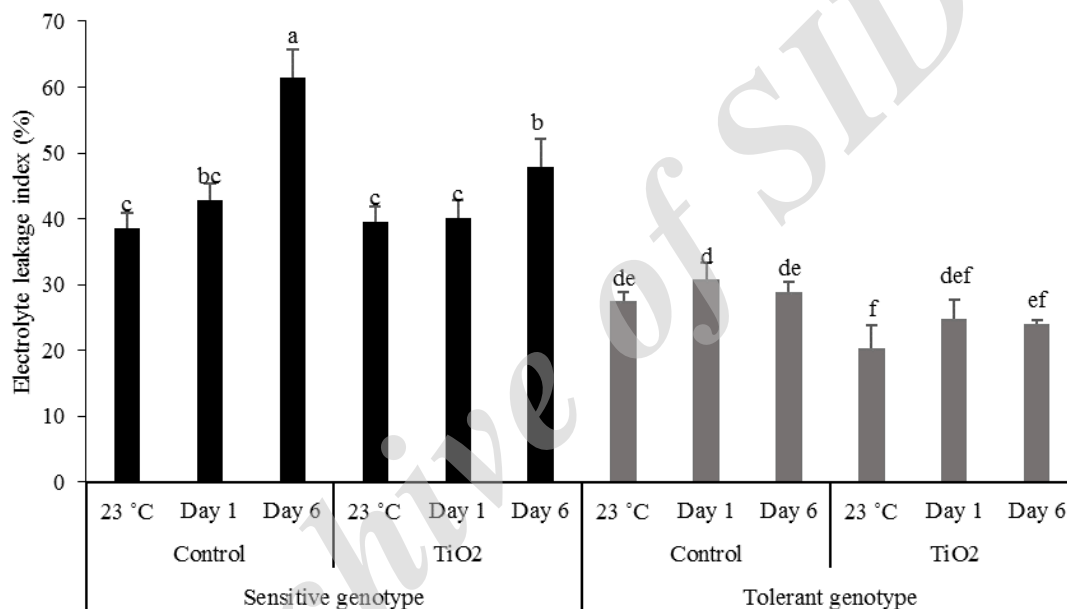
کرده و تأییدکننده برنامه‌ریزی سریع و موقت ژنگان در این شرایط است. بررسی الگوی بیان نسبی ژن‌ها در شرایط تنش سرما می‌تواند برخی از این سازوکارها را در گیاه نخود نشان دهد. تجزیه بیان نسبی ژن *RLK* نشان داد، بیان این ژن در شرایط تنش سرما در نژادگان متحمل در روز اول تنش افزایش (۷/۹ برابر) و در روز ششم تنش در مقایسه با دمای معمولی کاهش (۵/۲ برابر) یافت، در حالی که در نژادگان حساس عکس این روند (کاهش ۶/۸ برابری در روز اول و افزایش ۵/۳ برابری در روز ششم) مشاهده شد (شکل ۲- الف، ب). به نظر می‌رسد که گیاهان متحمل، به سرعت تغییرپذیری محیطی را درک کرده و آمادگی لازم برای رویارویی با تنش سرما را در یاخته ایجاد می‌کنند. تجزیه واریانس بیان نسبی ژن *RLK* در هر دو نژادگان حساس و متحمل تیمار شده با نانوذرات TiO_2 در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با دمای معمولی (از

بیان نسبی ژن‌های بررسی شده تحت تیمارهای آزمایش

تحقیقات گذشته نیز گویای تأثیر القاکننده یا مهارکننده نانوذرات TiO_2 بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان بوده که وابسته به گونه، رقم، نژادگان، بافت و غلظت نانوذره استفاده شده است (Nair et al., 2010; Kurepa et al., 2010)، اما به کارگیری آن‌ها در شرایط تنش سرما نشان می‌دهد، این ترکیب‌ها ممکن است در برنامه‌ریزی دوباره ژنگان (ژنوم) شرکت کنند. در این زمینه تغییر قابل تشخیص در عملکرد غشای یاخته‌ای نقش حدواسطی بین مسیرهای آسیب و دفاع ایفا کرده به طوری که احتمال دارد تنظیم‌کننده بیان نسبی ژن‌های پاسخ به سرما باشند که باید با جزئیات بیشتری بررسی شود. از سویی به نظر می‌رسد که این پاسخ‌های دفاعی القایی بوده، به طوری که تحت تیمارهای دمایی و زمانی تغییر

(ELI) به کمترین میزان خود رسید. نتایج تحقیقات نشان داده، در شرایط تنش‌های محیطی پروتئین‌های RLK می‌توانند دامنه گسترده‌ای از پاسخ‌های یاخته‌ای را القا کنند که احتمال دارد در نتیجهٔ دمین‌های غنی از سرین/ ترئونین سیتوپلاسمی آن باشد (Shiue and Beeliker 2001). بنابراین افزایش رونوشت ژن *RLK* در نژادگان متحمل که تحمل بیشتری به سرما نشان می‌دهد، بیانگر تحریک فعالیت ژنگان در سطح رونویسی به‌ویژه در گیاهان تیمارشده با نانوذرات TiO_2 و آماده‌سازی گیاه برای رویارویی با تنش سرما بوده که پیامد آن کاهش میزان آسیب یاخته‌ای است.

۶/۲ تا ۹/۱ برابر) افزایش یافت (شکل ۲- الف، ب). درک شرایط محیطی مانند تنش سرما به‌منظور ارائهٔ پاسخ، یکی از ویژگی‌های یاخته‌های گیاهی است که به‌وسیلهٔ گیرنده‌های کینازی تنظیم می‌شود (Kreps *et al.*, 2002). به‌نظر می‌رسد که نانوذرات TiO_2 تحریک‌کنندهٔ گیرنده‌های کینازی غشا برای ارائهٔ پاسخ دفاعی کارا تر یاخته به تنش سرما حتی در نژادگان حساس هستند. مابین تیمارها بالاترین میزان بیان نسبی این ژن در گیاهان متحمل تیمارشده با نانوذرات TiO_2 در روز ششم تنش سرما مشاهده شد (شکل ۲- الف)، همان شرایطی که در آن میزان آسیب یاخته‌ای



شکل ۱. تأثیر نانوذرات TiO_2 بر میزان نشت الکترولیتی غشا (ELI) در دو نژادگان حساس (ILC533) و متحمل (Sel96Th11439) نخود تحت تیمارهای دمایی طبیعی (23°C)، روز اول و ششم تنش سرما (4°C). حرف‌های مختلف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

Figure 1. Effect of TiO_2 NPs on electrolyte leakage index in leaves of susceptible and tolerant chickpea genotypes during optimum temperature (23°C), the first and sixth days of cold stress (4°C). The error bars represent the standard deviation ($\pm\text{SD}$) for replicates. Different letters indicate significant differences based on Duncan's multiple range tests.

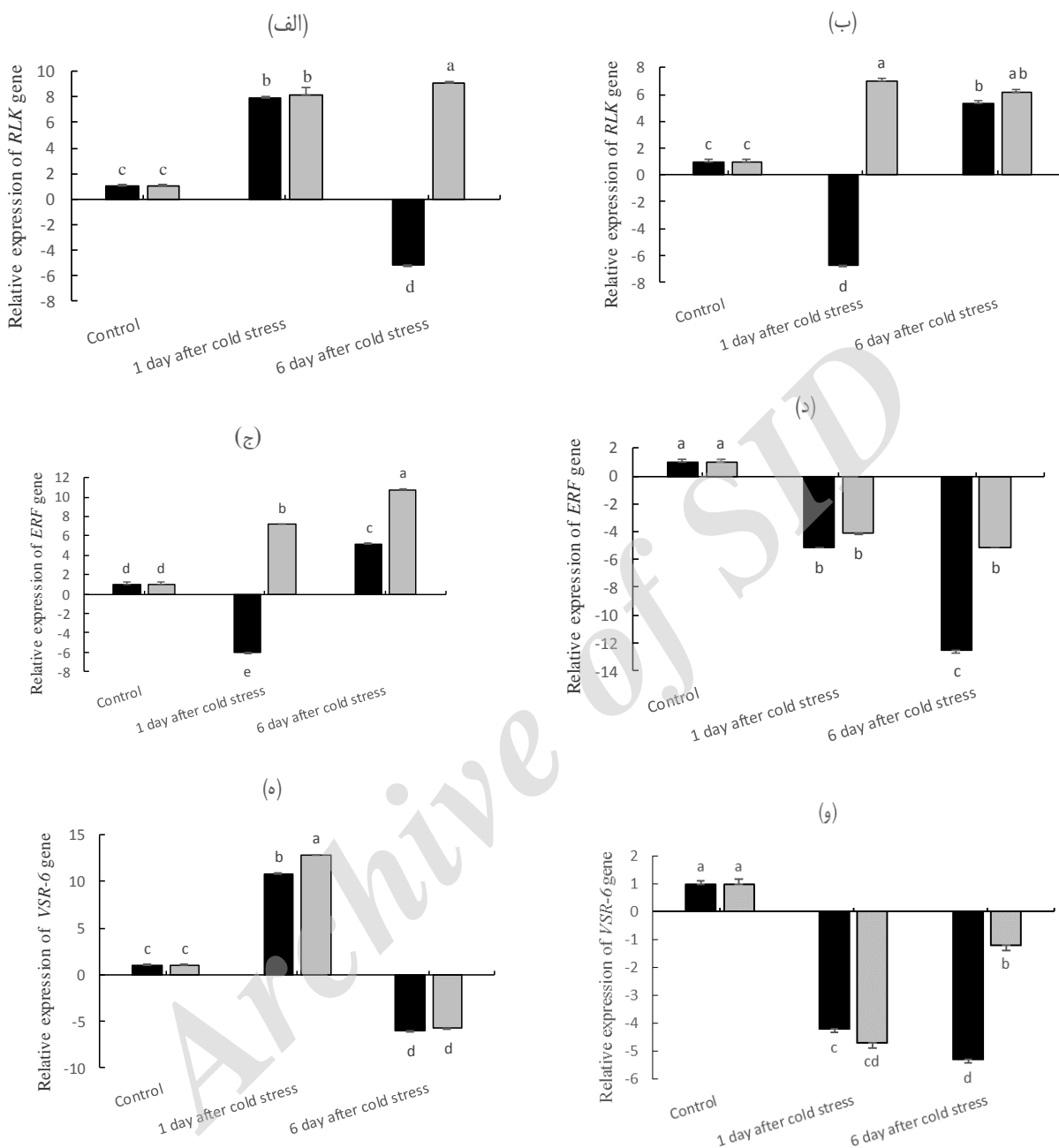
(شکل ۲- ج)، در این شرایط در نژادگان حساس کاهش معنی‌داری در بیان نسبی این ژن مشاهده شد (شکل ۲- د). نتایج بررسی‌ها نشان داد، این TF می‌تواند به عنصرهای سیس^{۱۳} همانند جعبه GCC و تکرار ^{14}C (مسیر مستقل از ABA) متصل و در بیان

شبکهٔ تنظیم رونویسی و فعالیت ژن‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی وابسته به کارکرد عامل‌های رونویسی (TFs) اختصاصی مانند ERFها است که سطوح بیان ژن‌های القایی تنش را تنظیم می‌کنند. نتایج نشان داد، در شرایط تنش سرما در نژادگان متحمل تیمارشده با نانوذرات TiO_2 بیان نسبی این ژن از ۵/۲ تا ۱۰/۸ برابر افزایش یافت

13. Cis element
14. C-repeat

دخالته کند (Singh et al., 2002).

ژن‌های پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرما



شکل ۲. الگوی بیان نسبی ژن‌های *serine/threonine receptor-like kinase (RLK)*، *ethylene-responsive-element-binding protein (ERF)* و *vacuolar-sorting receptor-6 (VSR-6)* در گیاهان شاهد (ستون سیاه) و گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 (ستون خاکستری) نژادگان‌های متحمل (الف، ج، ه) و حساس ILC533 (ب، د، و) نخود در شرایط شاهد ($23^{\circ}C$)، روز اول و روز ششم تنش سرما ($4^{\circ}C$). حرف‌های مختلف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد.

Figure 2. The relative gene expression of *serine/threonine receptor-like kinase (RLK)*, *ethylene-responsive-element-binding protein (ERF)*, and *vacuolar-sorting receptor-6 (VSR-6)* in the leaves of control plants (black column) and TiO_2 NPs-treated plants (grey column) tolerant (a, g and h) and susceptible (b, d and v) chickpea genotypes during optimum temperature ($23^{\circ}C$), the first and sixth days after cold stress ($4^{\circ}C$). Different letters indicate significant differences based on Duncan's multiple range tests.

به طوری که با کاهش میزان آسیب‌ها در روز ششم تنش، میزان بیان نسبی این ژن نیز کاهش یافت. نتایج بررسی‌های گذشته نشان داده است، افزایش بیان این ژن در شرایط تنش ممکن است به دلیل انتقال مواد یاخته‌ای به واکوئل به منظور تخریب این مواد در جهت تغییر مسیرهای سوخت‌وسازی و حفاظت مطلوب از گیاه باشد (Keinanen et al., 2007). از دست رفتن پروتئین AtVSR3 سبب تجمع نیتریک اکسید، پراکسید هیدروژن و مولکول‌های مؤثر در تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌های برگ می‌شود (al., Zouhar et al., 2010). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، القای این ژن به ویژه در گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 نقش مؤثری در الگوی پاسخ‌های سازگاری به تنش سرما ایفا می‌کند.

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش درک برخی سازوکارهای پاسخ گیاه نخود به تنش سرما را امکان‌پذیر می‌سازد. سنجش‌های فیزیولوژیکی (مانند محتوای ELI) می‌تواند در توصیف میزان آسیب‌های یاخته‌ای و بررسی الگوی پاسخ‌های دفاعی مؤثر باشد. در شرایط تنش، گیاهان متحمل در مقایسه با گیاهان حساس و همچنین گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معناداری در بیان نسبی ژن‌های بررسی شده در این پژوهش نشان دادند، به موازات کاهش ELI می‌تواند در بقا یا بازیابی گیاه مؤثر باشد. بنابراین همراه با پاسخ‌های فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی افزایش بیان سریع و موقت این ژن‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر فرایند سازگاری نخود به تنش سرما به کار رود. نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند به عنوان نقطه آغاز در بررسی دیگر ژن‌ها و پروتئین‌های مؤثر در بهبود پاسخ گیاه نخود به تنش سرما باشد. غلظت نانوذرات TiO_2 استفاده شده در این تحقیق نه تنها آسیبی به یاخته‌های گیاهی و غشای پلاسمایی وارد نکرد، بلکه در القا پاسخ‌های یاخته‌ای و کاهش میزان آسیب‌های یاخته‌ای (از جمله ELI) تأثیر مثبت نشان داد. پاسخ‌های متمایز زود هنگام و

القا بیان این ژن در روز اول و ششم تنش سرما که با به کارگیری نانوذرات TiO_2 نیز تحریک شد، نشان‌دهنده پاسخ‌های زود هنگام و دیر هنگام این ژن در شرایط تنش سرما است. در نژادگان حساس به موازات افزایش میزان آسیب یاخته‌ای کاهش معنی‌دار در بیان نسبی ژن *ERF* رخ داد که به احتمال تأیید کننده ضعف سامانه‌های دفاعی گیاه در برابر تنش سرما بود که هم در پاسخ‌های زود هنگام و هم در پاسخ‌های دیر هنگام مشاهده شد. ژن‌های *APETALA2* (*AP2*)، *TF*‌هایی هستند که افزون بر ایفای نقش در رشد و نمو گیاه در پاسخ‌های دفاعی نیز مؤثرند نیز (Gu et al., 2017; Ohama et al., 2017)، بنابراین به دلیل تنظیم شبکه پیام‌رسانی، این *TF*‌ها که پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متنوعی را در پایین دست خود در شرایط تنش سرما القا می‌کنند، می‌توانند در افزایش درجه تحمل گیاه به تنش سرما در برنامه‌های اصلاحی مؤثر باشند. نتایج گویای آن است که بررسی دقیق‌تر تأثیر نانوذرات بر *TF*‌های گیاهان در گسترش کاربرد نانوذرات در کشاورزی مؤثر خواهد بود. در نژادگان متحمل بیان نسبی ژن *VSR-6* در روز اول تنش سرما در مقایسه با دمای معمولی تا ۱۲/۸ برابر افزایش یافت به طوری که این افزایش در گیاهان تیمار شده با نانوذرات TiO_2 بیشتر بود. با این وجود در روز ششم تنش سرما میزان بیان این ژن تا ۶/۱ برابر در مقایسه با دمای معمولی کاهش یافت (شکل ۲-۵). این ژن رمزکننده *VSR-6* از خانواده پروتئین‌های گیرنده غشای واکوئل است که در فرایند نقل و انتقال پروتئین‌ها به مقصد مورد نظر نقش دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که پاسخ به تنش در گیاهان افزون بر ساخت پروتئین‌های سوخت‌وسازی (متابولیکی) و دفاعی، به جریان نقل و انتقال پروتئین‌ها در مسیرهای یاخته‌ای نیز وابسته است که احتمال دارد پس از درک تنش سرما و افزایش میزان نسبی آسیب‌های یاخته‌ای در نژادگان متحمل نخود شکل بگیرد. کاهش بیان نسبی این ژن در روز ششم تنش سرما در مقایسه با روز اول تنش سرما نشان داد که این واکنش‌ها در گروه پاسخ‌های زود هنگام قرار داشت

متحمل تر هستند، کاربرد جدیدی برای نانوذرات TiO_2 فراهم کرده و ممکن است منجر به ایجاد عملکرد پایدار در این گیاه در شرایط تنش شوند. از آنجاکه اغلب عملکرد گیاهان زراعی وابسته به پیشگیری یا مهار آسیب در شرایط مزرعه است، ممکن است نتایج این آزمایش کاربردهای جدیدی از نانوذرات TiO_2 در تحمل به تنش سرما را داشته باشد.

دیر هنگام نژادگان‌ها تحت تیمار نانوذرات TiO_2 بیانگر راهبرد (استراتژی) چندگانه دفاعی یاخته‌های خود به تنش سرماست. به نظر می‌رسد پس از جذب و درک نانوذرات TiO_2 ، شدت و یا مدت پیام‌رسانی تنش سرما تغییر کرده به طوری که بر پایه ظرفیت ژنتیکی، گیاه متحمل در مقایسه با نژادگان حساس پاسخ‌های دفاعی مطلوب‌تری نشان داده است. این یافته که گیاهان خود تیمار شده با نانوذرات TiO_2 به تنش سرما

REFERENCES

1. Arora, S., Sharma P., Kumar, S., Nayan, R., Khanna, PK. & Zaidi, MGH. (2012). Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*. *Plant Growth Regulation*, 66(3), 303-310
2. Asli, S. & Neumann, P. M. (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, cell & environment*, 32(5), 577-584.
3. Berahmand, A. A., Panahi, A. G., Sahabi, H., Feizi, H., Moghaddam, P. R., Shahtahmassebi, N. & Gallehgir, O. (2012). Effects silver nanoparticles and magnetic field on growth of fodder maize (*Zea mays* L.). *Biological trace element research*, 149(3), 419-424.
4. Berger, J. D. (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(1), 112-122.
5. Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Geri, C. & Cremonini, R. (2011). The effects of nano- TiO_2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6), 2443-2449.
6. Craddock, C. P., Hunter, P. R., Szakacs, E., Hinz, G., Robinson, D. G. & Frigerio, L. (2008). Lack of a Vacuolar Sorting Receptor Leads to Non-Specific Missorting of Soluble Vacuolar Proteins in Arabidopsis Seeds. *Traffic*, 9(3), 408-416.
7. Feizi, H., Moghaddam, P. R., Shahtahmassebi, N. & Fotovat, A. (2012). Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO_2) on wheat seed germination and seedling growth. *Biological trace element research*, 146(1), 101-106.
8. Gu, C., Guo, Z. H., Hao, P. P., Wang, G. M., Jin, Z. M. & Zhang, S. L. (2017). Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm. *Botanical Studies*, 58(1), 6.
9. Hasanpour, H., Maali-Amir, R. & Zeinali, H. (2015). Effect of TiO_2 nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(6), 779-787.
10. Heidarvand, L. & Amiri, R. M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 419-431.
11. Heidarvand, L. & Maali-Amiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of plant physiology*, 170(5), 459-469.
12. Heidarvand, L., Amiri, R. M., Naghavi, M. R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B. & Alizadeh, K. H. (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 157-163.
13. Hosseini, M., Maali-Amiri, R., Mahfoozi, S., Fowler, D. B. & Mohammadi, R. (2016). Developmental regulation of metabolites and low temperature tolerance in lines of crosses between spring and winter wheat. *Acta physiologiae plantarum*, 38(4), 1-13.
14. Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A. & Ramezani, S. S. (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(13), 1106-1116.
15. Keinänen, S. I., Hassinen, V. H., Kärenlampi, S. O. & Tervahauta, A. I. (2007). Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone. *Tree Physiology*, 27(9), 1243-1252.
16. Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X. & Harper, J. F. (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology*, 130(4), 2129-2141.
17. Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J., & Smalle, J. A. (2010). Uptake

- and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano letters*, 10(7), 2296-2302.
18. Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M. & Carriere, M. (2012). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): influence of diameter and crystal phase. *Science of the total environment*, 431, 197-208.
 19. Marty, F. (1999). Plant vacuoles. *The Plant Cell*, 11(4), 587-599.
 20. Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Xiaoqing, L., Liang, C. & Fashui, H. (2007). Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. *Biological trace element research*, 119(2), 183-192.
 21. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
 22. Mohammadi, R., Maali-Amiri, R., & Abbasi, A. (2013). Effect of TiO₂ nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biological trace element research*, 152(3), 403-410.
 23. Mohammadi, R., Maali-Amiri, R. & Mantri, N. L. (2014). Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russian journal of plant physiology*, 61(6), 768-775.
 24. Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y. & Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant science*, 179(3), 154-163.
 25. Nazari, M., Amiri, R. M., Mehraban, F. H. Zeinah. & Khaneghah, H. (2012). Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 183-189.
 26. Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in Plant Science*, 22(1), 53-65.
 27. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & 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(9), e36-e36.
 28. Popov, V. N., Orlova, I. V., Kipaikina, N. V., Serebriiskaya, T. S., Merkulova, N. V., Nosov, A. M. & Los, D. A. (2005). 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(5), 664-667.
 29. Shahryar, N. & Maali-Amiri, R. (2016). Metabolic acclimation of tetraploid and hexaploid wheats by cold stress-induced carbohydrate accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 204, 44-53.
 30. Shiu, S. H. & Bleecker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci stke*, 113(re22), 1-13.
 31. Singh, D., Kumar, S., Singh, S. C., Lal, B. & Singh, N. B. (2012). Applications of liquid assisted pulsed laser ablation synthesized TiO₂ nanoparticles on germination, growth and biochemical parameters of Brassica Oleracea var. Capitata. *Science of Advanced Materials*, 4(3-4), 522-531.
 32. Singh, K. B., Foley, R. C. & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
 33. Stampoulis, D., Sinha, S. K. & White, J. C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9473-9479.
 34. Wei, C., Zhang, Y., Guo, J., Han, B., Yang, X. & Yuan, J. (2010). Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences*, 22(1), 155-160.
 35. Zheng, L., Hong, F., Lu, S. & Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological trace element research*, 104(1), 83-91.
 36. Zouhar, J., Muñoz, A. & Rojo, E. (2010). Functional specialization within the vacuolar sorting receptor family: VSR1, VSR3 and VSR4 sort vacuolar storage cargo in seeds and vegetative tissues. *The Plant Journal*, 64(4), 577-588.