

تغییر متابولیسمی مسیر اکسی لیپین در پاسخ به تنش سرما در نخود

رضا معالی امیری^{۱*}، بهزاد صادق زاده^۲، یدالله فرایدی^۳

^۱دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

^۲استادیار موسسه تحقیقات دیم مراغه

^۳مربی موسسه تحقیقات دیم مراغه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۲۲

چکیده

اکسی لیپین ها، محصولات اکسیداسیون اسیدهای چرب غشا در جهت سازگاری به تنش های زنده و غیرزنده محسوب می شوند. در این پژوهش تجمع میزان مالون دی آلدئید (به عنوان شاخص خسارت غشا)، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX)، آلن اکسید سینتاز (AOS) و میزان رونوشت ژن های *AOS*، *LOX* و آلن اکسید سیکلاز (*AOC*) به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (QPCR) در دو ژنوتیپ متحمل (*Se196Th11439*) و حساس (*ILC533*) نخود (*Cicer arietinum L.*) زراعی تحت تنش سرمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶ روز بررسی شد. تحت تنش سرما میزان مالون دی آلدئید به طور معنی داری در ژنوتیپ ها افزایش یافت طوری که در ژنوتیپ حساس بیشترین افزایش در روز ششم اعمال تنش سرما (تا ۵۷ درصد) مشاهده شد در حالی که در ژنوتیپ متحمل پس از افزایش در روز اول تغییر معنی دار نداشت. این افزایش نسبی میزان مالون دی آلدئید در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش سرما احتمالاً نقش انتقال سیگنال و القا مکانیسم های دفاعی داشت. میزان فعالیت آنزیم *LOX* و *AOS* در تیمارهای زمانی تنش افزایش معنی دار نشان داد اگرچه این میزان در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس در سطح کمتری بود. بنابراین فعالیت مسیر اکسی لیپین تحت تنش سرما در نخود احتمالاً منجر به تولید هورمون جاسمونیک اسید و در نتیجه تحریک و القا ژن های دفاعی در گیاه شود. آنالیز بیان ژن های *AOS*، *LOX* و *AOC* به کمک نرم افزار REST تایید کننده روند تغییر اجزای مسیر اکسی لیپین بود. بنابراین درجه تحمل به سرما در ژنوتیپ متحمل با کنترل میزان خسارت های سلولی و فعالیت مسیر اکسی لیپین در ارتباط است.

واژه های کلیدی: بیان ژن، تنش سرما، اکسی لیپین، لیپوکسیژناز، آلن اکسید سینتاز.

مقدمه

متداول در سیستم‌های زنده در جهت سازگاری به تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشد. محصولات حاصل از فرایندهای اکسیداسیون اسیدهای چرب در مجموع اکسی لیپین^۴ نامیده می‌شوند که به طور عمده توسط آنزیم لیپوکسیژناز^۵ (LOX)، آلن اکسید سینتاز^۶ (AOS) و آلن اکسید سیکلاز^۷ (AOC) کاتالیز می‌شوند. محصولات اولیه فعالیت آنزیم LOX، هیدروپروکسیدهای اسید چرب می‌باشند که از نظر واکنشی فعال بوده و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و خسارت به غشا و مرگ سلولی هستند (Ble'e 2002). با این حال این هیدروپروکسیدها به طور سریع تبدیل به گروهی از اکسی لیپین‌های پایدار شده که می‌توانند فعالیت‌های فیزیولوژیکی متعددی در سلول داشته باشند (Nemchenko et al., 2006). مسیر اکسی لیپین در گیاهان منجر به تولید اسید جاسمونیک^۸ شده که به دلیل نقش هورمونی آن، تنظیم کننده مهم پاسخ به محرک‌های درونی و بیرونی سلول است (Kazan 2015) به طوری که بسیاری از پاسخ‌های دفاعی و نموی گیاهان با میزان فعالیت ژن‌های این مسیر در سطح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شود (Santino et al., 2013). برخی تحقیقات نشان داده که جاسمونات‌ها به طور غیر مستقیم موجب بیان برخی از ژن‌های دفاعی در گیاهان می‌شوند (Bhardwaj et al., 2011). مشاهده شده

توانایی گیاهان در افزایش تحمل به تنش سرما طی فرایند سازگاری^۱ با تغییرات متعدد در بیان ژن، متابولیسم، فیزیولوژی و مورفولوژی همراه بوده که این تغییرات شامل افزایش یا کاهش بیان ژن‌ها، کاهش یا توقف رشد، تغییر در ترکیب لیپیدی غشا، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار (مثل پرولین و بتائین و پلیول و قندهای محلول) و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی سلول و به طور کلی تغییر متابولیت‌های اولیه و ثانویه هستند (Heidarvand and Maali 2013; Kazemi Shahandashti et al., 2014). این تغییرات، به طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده و بنابراین به عنوان عناصر فعال^۲ در تحمل به تنش‌های محیطی به خصوص تنش سرما محسوب می‌شوند. با این وجود سازگاری به سرما به محدوده وسیعی از سازوکارهای سلولی مربوط می‌شود و مشخص نیست که چند ژن در تعیین تحمل به سرما درگیر است (Rakei et al., 2016). بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی این گروه با تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی وجود ندارد. اجزایی از سلول که عموماً به طور مستقیم تحت اثر نوسانات دمایی قرار دارند غشاها و پروتئین‌ها هستند. اکسیداسیون اسیدهای چرب^۳ واکنش متابولیک

⁴ Oxylipin

⁵ Lipoxygenase

⁶ Allene oxide synthase

⁷ Allene oxide cyclase

⁸ Jasmonic acid

¹ Acclimation

² Functional element

³ Fatty acids

شناخت مکانیسم‌ها و عوامل موثر در تحمل نخود به تنش و اتخاذ روش‌های موثرتر برای بهبود تحمل یاری می‌دهد. سنجش میزان اثر عوامل مختلف در تحمل به تنش‌های غیر زنده مانند سرما از روش‌های متعددی از جمله اندازه‌گیری سطوح رونویسی ژن‌ها و روش‌های فیزیولوژیکی انجام می‌شود. بنابراین یافتن رابطه بین پاسخ‌های مختلف گیاه در سطوح ژنتیکی و فیزیولوژیکی حائز اهمیت بوده و به ارزیابی بهتر گیاه و همچنین درک بعضی از ساز و کارهای متابولیکی گیاه کمک می‌کند. در این پژوهش، میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر اکسی‌لیپین به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (QPCR) و همچنین برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه نخود تحت تنش سرما چهار درجه سانتی‌گراد پس از یک، سه و شش روز اعمال تنش در ژنوتیپ‌های متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC533) نخود کابلی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی و تیمار سرما

بذور دو ژنوتیپ متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC533) به تنش سرما نخود کابلی از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور تهیه شد. بذور در محلول هیپوکلیت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی

که جاسمونات‌ها در اثر ایجاد تنش در دو فاز پاسخ سریع در اوایل تنش و پاسخ دیر در مدتی پس از تنش افزایش می‌یابند (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). آنها همچنین می‌توانند تحریک کننده افزایش فعالیت دو آنزیم مهم در مسیر اکسی‌لیپین یعنی آنزیم LOX و آنزیم آلن اکسید سیتاز AOS در هنگام تنش در گیاه شوند (Wasternack 2007).

گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) به عنوان دومین لگوم خوراکی کشور، دارای تنوع مورفولوژیکی بالا ولی تنوع ژنتیکی ضعیف، حساس به سرما بوده و تحت تنش سرما تولید آن محدود می‌شود (Mantri et al., 2007). جلوگیری از این کاهش عملکرد (که حتی عملکرد را به ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌رساند) نقش مهمی در رویارویی با افزایش جمعیت و تامین نیازهای پروتئینی در کشورهای فقیر و در حال توسعه دارد. با توجه به این که در نواحی جغرافیایی با خصوصیات آب و هوای مدیترانه‌ای، کشت پاییزه گیاه نخود به دلیل حساسیت به سرما و کشت بهاره آن به دلیل خشکی آخر فصل از پتانسیل عملکرد مناسبی برخوردار نیست (Habibpour et al., 2012)، لذا شناخت عوامل و فرایندهایی که موجب بهبود عملکرد این محصول در مواجهه با تنش‌های محیطی می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین مقایسه بین ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه و اینکه چطور یک ژنوتیپ تحمل بالاتر و در نتیجه پایداری عملکرد بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر را دارد ما را در

¹ Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

شده و پس از شستشو ۵ الی ۱۰ بذر در پتری دیش بر روی کاغذ صافی و آب مقطر جوانه زدند. گیاهچه‌ها به گلدان (نسبت ماسه، خاک رس و کود برگ ۱:۳:۱) انتقال داده شد و در اتاقک رشد در گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۲۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵ درصد به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. بخشی از گیاهان در چنین شرایطی حفظ شده و بخشی دیگر به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و به مدت ۶ روز در آن دما نگهداری شد. نمونه‌برداری‌ها در روز اول، سوم و ششم تحت تیمار دمایی ۴ درجه سانتی-گراد انجام شد. نمونه‌های کنترل یا شاهد در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با شرایط فوق‌الذکر قرار داشتند.

$$C = D/E$$

اندازه گیری فعالیت آنزیم LOX

تمام مراحل استخراج بر روی یخ و بر اساس روش (Kazemi Shahandashti et al., 2013) انجام شد. برگ‌ها در داخل هاون چینی با استفاده از ازت مایع پود شدند. یک دهم گرم بافت برگ پس از پودر شدن توسط هاون در ازت مایع به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ۲ میلی‌لیتر به آن بافر استخراج شامل محلول (۰/۱ مولار Tris-HCl، pH=۸/۵) حاوی یک درصد پلی‌وینیل‌پیرولیدین^۱ (PVP)، کلرید کلسیم (CaCl₂) یک میلی‌مولار، ۵ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول^۲ (DTT) و ۱۵ درصد گلیسرول افزوده شد. پس از ورتکس نمونه و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۱۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به تیوب منتقل شده و از این عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم LOX استفاده شد.

شده و پس از شستشو ۵ الی ۱۰ بذر در پتری دیش بر روی کاغذ صافی و آب مقطر جوانه زدند. گیاهچه‌ها به گلدان (نسبت ماسه، خاک رس و کود برگ ۱:۳:۱) انتقال داده شد و در اتاقک رشد در گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۲۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵ درصد به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. بخشی از گیاهان در چنین شرایطی حفظ شده و بخشی دیگر به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و به مدت ۶ روز در آن دما نگهداری شد. نمونه‌برداری‌ها در روز اول، سوم و ششم تحت تیمار دمایی ۴ درجه سانتی-گراد انجام شد. نمونه‌های کنترل یا شاهد در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با شرایط فوق‌الذکر قرار داشتند.

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون سلولی بر اساس مالون دی‌آلدهید

میزان پراکسیداسیون ژنوتیپ‌های نخود براساس تجمع مالون دی‌آلدهید برگ با استفاده از تیوباریتوریک اسید تعیین شد (Heath and Packer 1968). سیصد میلی‌گرم نمونه برگگی از بخش میانی ساقه در ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار Tris-HCl، pH=۷/۶) کوبیده شد تا یک محلول یکنواخت به دست آید. سپس سه میلی‌لیتر از این محلول با دو میلی‌لیتر محلول تیوباریتوریک اسید حاوی اسید تری کلرواستیک در لوله آزمایش مخلوط شد و در حمام آب

¹ Polyvinylpyrrolidone

² Dithiothreitol

(mM) و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر که برای ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. محلول لیپوکسیژناز شامل یک میلی گرم آنزیم LOX (15000 واحد بر میلی گرم) در ۱۰ میلی لیتر بافر برات با pH=۹ می باشد. در نهایت به میزان ۳ میلی لیتر از محلول واکنش دهنده را با ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم استخراجی مخلوط و در طول موج ۲۳۴ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

۸۰ میلی گرم از بافت برگ که با کمک هاون چینی استریل به خوبی در نیتروژن مایع کوبیده شده بودند برای استخراج RNA کل به روش بایوزول استفاده شد (Kazemi et al., 2013). غلظت RNA پس از هر استخراج، با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه روی ژل یک درصد آگارز، الکتروفورز شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA و مشاهده باندهای مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S تیمار آنزیمی DNase بر اساس روش پیشنهادی شرکت ترموساینتیفیک^۱ برای تمامی نمونه ها اعمال شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد آنزیم RNase (u) inhibitor مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس یک

محلول سوبسترا شامل ۵۰ میلی گرم لینولئیک اسید یا لینولنیک اسید است که به ۵۰ میلی گرم توئین ۲۰ اضافه شد و با ۱۰ میلی لیتر بافر Na₂HPO₄ (pH=۸/۷) مخلوط شد و پس از بهم خوردن تحت اولتراسونیک قرار گرفت. محلول با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر NaOH یک میلی مولار شفاف شد و با اضافه کردن بافر استخراج حجم آن به ۲۵ میلی لیتر رسید. سنجش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به روش اسپکتروفتومتری و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. نوع و میزان مواد استفاده شده شامل ۲۸۵۰ میکرولیتر بافر Na₂HPO₄، ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۳۰ میکرولیتر سوبسترا بود و دستگاه اسپکتروفتومتر روی طول موج ۲۳۴ نانومتر تنظیم شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم AOS

استخراج آنزیم بر اساس روش (Yang et al., 2011) انجام شد. یک گرم برگ پودر شده توسط نیتروژن مایع تهیه شده با ۳ میلی لیتر از محلول استخراج شامل (بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، DDT ۵ میلی مولار، PMSF ۰/۱ میلی مولار، pH= ۷/۲) مخلوط شد و مخلوط در ۱۲۰۰۰×g برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی جمع آوری و برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۷)، ۲۰۰ میکرولیتر محلول هیدرو پروکسید که شامل ۰/۴ میلی لیتر محلول لیپوکسیژناز ۰/۲ میلی لیتر از لینولنیک اسید (25

¹ ThermoScientific

شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم افزار REST^۲ استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایشی بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در سه تکرار به کمک نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تحقیقات گذشته نشان داده که ژنوتیپ متحمل Sel96TH11439 در مقایسه با ژنوتیپ حساس ILC533 دارای مکانیسم‌های متمایزی در پاسخ به تنش سرما می‌باشد که برخی از آن احتمالا مرتبط با مسیر اکسی‌لیپین است (Heidarvand and Maali-Amiri 2013; Kazemi et al., 2014). اختلاف در تحمل به تنش سرما در دوره‌های طولانی‌تر^۳ تنش بیانگر ظرفیت ژنتیکی و برنامه‌ریزی مجدد ژنوم در ژنوتیپ‌های نخود می‌باشد (Khazaei et al., 2015). با توجه به نقش خسارت‌زایی تنش سرما به غشا سلولی از طریق خسارت به لیپیدها در این تحقیق میزان پراکسیداسیون غشا (MDA) به عنوان شاخص خسارت سلولی اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تیوب‌ها جهت نگهداری، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت ترموساینتیفیک برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 انجام شد (جدول ۱). در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت بایورد^۱ و کیت حاوی رنگ فلورسنت SYBR BioPars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده شد. بیست میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. برای هر واکنش سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل شده و با شرایط زیر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد: ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد، ۱۰ ثانیه در دمای Tm آغازگر و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. به این صورت که هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه

² Relative expression software tool

³ Long term stress

¹ BioRAD

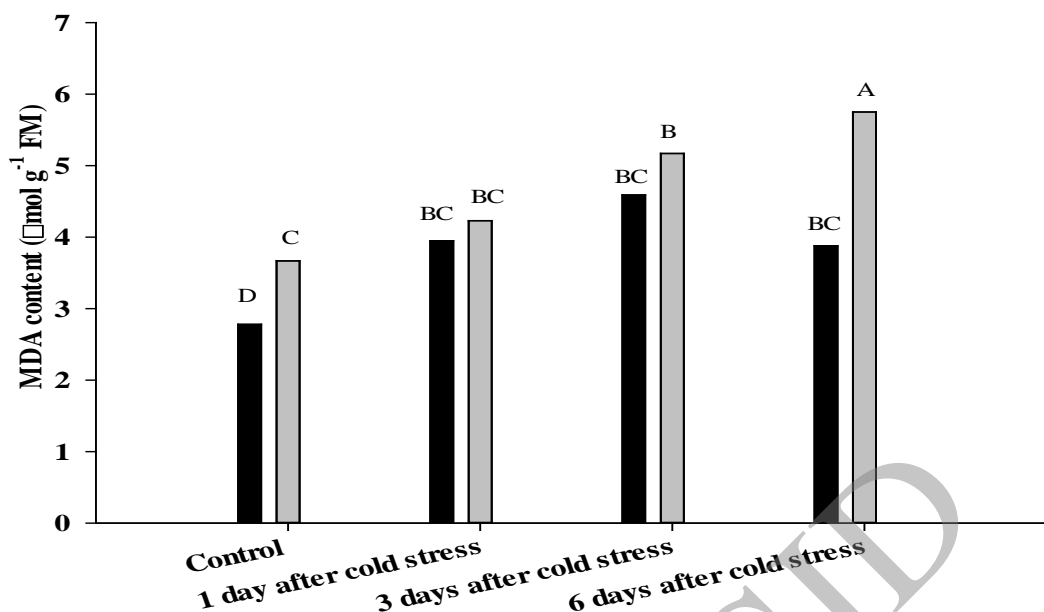
جدول ۱- توالی‌های آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qPCR) تحت تیمارهای دمایی آزمایش.

Table 1- Primer sequences used in qPCR amplification of known chickpea genes undergoing thermal treatments.

Accession number	Gene	Protein	Sequence (5'-3')
AB095985	<i>AOS</i>	Allen oxide synthase	F: TCAGTACGCGAAAGCCAAAC R: GTTTCAGGACCATTTCGACCA
AJ276265.1	<i>LOX</i>	Lipoxygenase	F: GGCAGTACAAGCCTTCCAAA R: GGCAGTACAAGCCTTCCAAA
EU529707.1	<i>Actin 1</i>	Actin 1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT
AB095986	<i>AOC</i>	Allen oxide cyclase	F: GGCTGTAACAGGAGGATCTGG R: TAGCAGCAGGAGAAGGCTCA

(2013). با این وجود افزایش میزان ROS به نسبت‌های کم طی مراحل اولیه تنش می‌تواند نقش‌های دیگری علاوه بر القا خسارت سلولی از جمله نقش سیگنال‌رسانی سلولی داشته باشد (Nazari et al., 2012). در مراحل اولیه تنش میزان ROS سبب القا پاسخ‌های دفاعی در گیاه شده به این ترتیب می‌تواند در افزایش سازگاری و درجه تحمل نقش داشته باشد. بنابراین افزایش اولیه میزان ROS در ژنوتیپ متحمل می‌تواند سبب القا مسیر دفاعی در گیاه نخود شود (Habibpour et al., 2012)، در حالیکه عدم القا مسیرهای دفاعی در ژنوتیپ حساس سبب افزایش پی‌درپی میزان ROS شده‌است. تحقیقات گذشته نشان داده که کاهش در میزان مالون دی‌آلدهید موجب پایداری بیشتر اسیدهای چرب غیر اشباع و تحمل بیشتر به تنش سرما می‌شود. چنین وضعیتی در تنش‌های محیطی دیگر از

آزمون مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ‌های دفاعی گیاه تحت این شرایط بود به طوری‌که تحت تنش سرما میزان MDA در ژنوتیپ متحمل پس از یک افزایش معنی‌دار در روز اول (تا ۳۹ درصد)، تغییر معنی‌داری در روز سوم و ششم نشان‌نداد در حالیکه در ژنوتیپ حساس روند تغییر الگوی میزان ترکیب با طولانی‌تر شدن دوره تنش افزایش پیدا کرده به طوری‌که در روز ششم تنش این میزان به بالاترین سطح خود (تا ۵۷ درصد) رسید. تغییر میزان MDA در ژنوتیپ‌های نخود نشان می‌دهد که گیاه نخود تنش سرما را احساس کرده (Kazemi Shahandashti et al., 2014) و افزایش میزان MDA در این گیاه به معنی افزایش میزان خسارت سلولی در اثر افزایش میزان ROS می‌باشد (Heidarvand and Maali-Amiri



شکل ۱- میزان مالون دی آلدئید (MDA) تحت تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط کنترل (۲۳ درجه سانتی گراد)، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرما (۴ درجه سانتی گراد) در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC533 (ستون خاکستری) گیاه نخود.

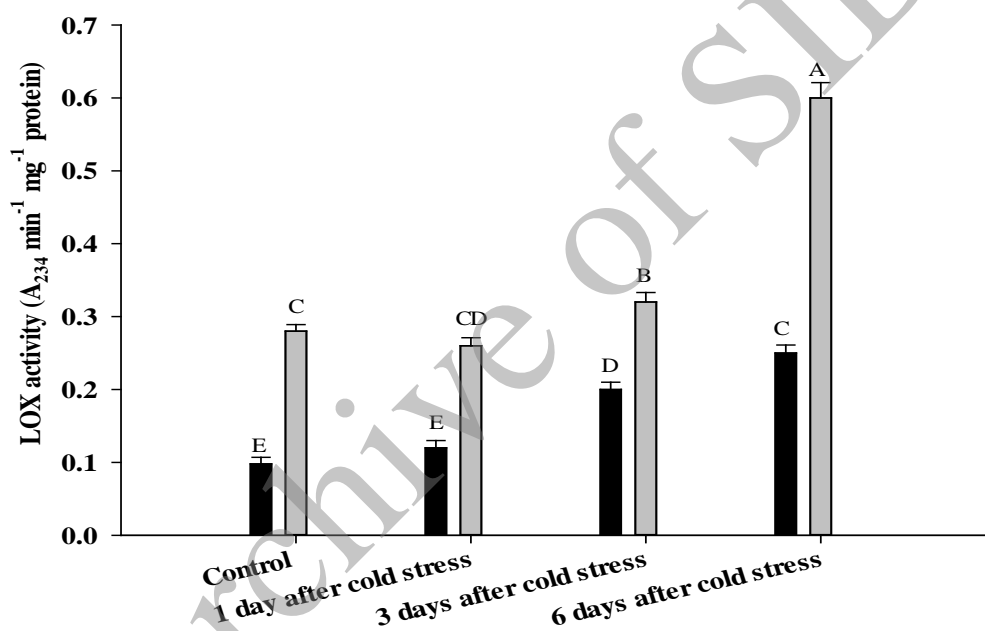
Figure 1- The malondialdehyde (MDA) content of the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).

را نشان داد (شکل ۲). باین وجود میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای زمانی تنش در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس در سطح کمتری (تا ۲/۵ برابر) تولید شد. به نظر می‌رسد اگرچه ژنوتیپ متحمل در روزهای سوم و ششم تنش فعالیت آنزیم بیشتری نسبت به روز اول تنش داشته اما این مسیر با اکسید کردن اسیدهای چرب غشا می‌تواند با خسارت به غشا سبب اختلال در فعالیت‌های سلولی و مرگ سلول شود. بنابراین در ژنوتیپ متحمل برخلاف ژنوتیپ حساس، فعالیت آنزیم LOX و بهره‌گیری از این مسیر جهت پاسخ به اثرات تنش ایجاد شده

در گیاهان آنزیم LOX عمدتاً مسیر آنزیمی پراکسیداسیون لیپیدی را کاتالیز می‌کند (Berger et al., 2001). لینولئیک اسید پیش‌ساز بیوستنز جاسمونیک اسید است که به عنوان مولکولی نشان‌دار، مکانیسم‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کند. تجزیه نتایج اندازه‌گیری این آنزیم نشان داد که افزایش میزان این آنزیم در روز اول تنش سرما در دو ژنوتیپ متحمل و حساس در مقایسه با شاهد غیر معنی‌دار بود که نشان دهنده عدم تغییر الگوی فعالیت این آنزیم در تنش‌های زمانی کوتاه مدت می‌باشد اما در روزهای سوم و ششم تنش، الگوی فعالیت آنزیم سطح بالاتری

نتایج تجزیه وتحلیل فعالیت آنزیم AOS در هر دو ژنوتیپ نشان داد که همانند فعالیت آنزیم LOX میزان تولید این آنزیم در روز اول در مقایسه با تیمار شاهد از تفاوت معنی‌داری برخوردار نبود اما در هر دو ژنوتیپ در روز سوم در مقایسه با روز اول افزایش معنی‌داری (۷۷-۷۰ درصد) در میزان فعالیت این آنزیم مشاهده شد و در روز ششم تنش، میزان فعالیت آنزیم AOS به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۳).

محدود بود (Porta and Rocha-Sosa, 2002; Cho et al., 2011). نتایج نشان داد که در گیاه نخود فعالیت آنزیم LOX به طور مستقیم مرتبط با خسارت سلولی القا شده توسط تنش سرما نبوده و بسته به ظرفیت ژنتیکی ژنوتیپ نخود با پاسخ‌های دفاعی نیز در ارتباط است. تحقیقات گذشته نشان داده که فعالیت آنزیم LOX سبب القا پاسخ‌های دفاعی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شده است (Lim et al., 2015).

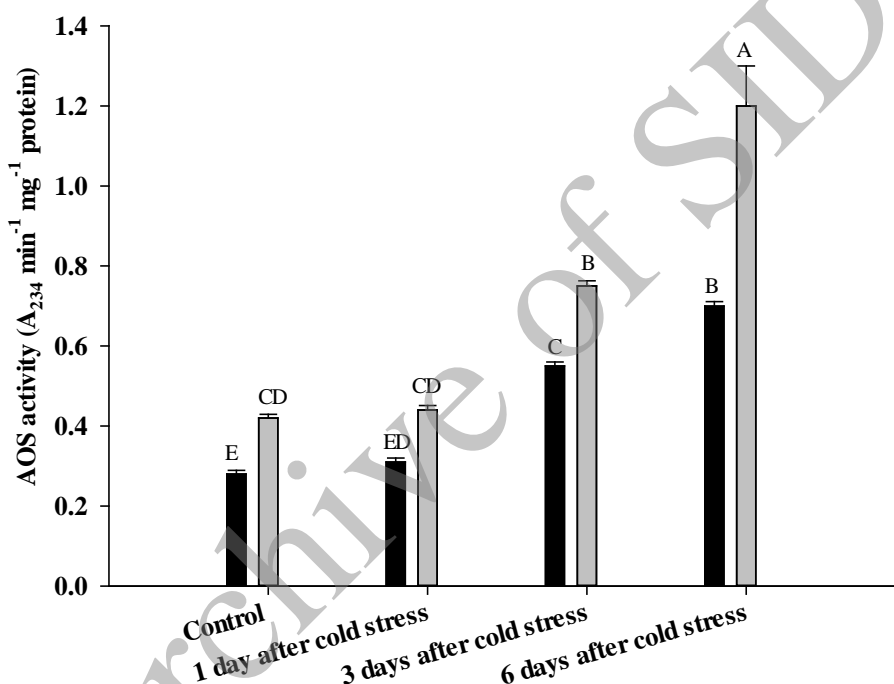


شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX) تحت تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط کنترل (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرما (چهار درجه سانتی‌گراد) در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC533 (ستون خاکستری) گیاه نخود.

Figure 2- The lipoxygenase (LOX) activity of the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).

تحت تنش سرما در نخود فعالیت کرده که می-تواند احتمالا منجر به تولید هورمون جاسمونات و در نتیجه تحریک و القا ژنهای دفاعی در گیاه شود. تحقیقات گذشته نیز بیانگر فعالیت آنزیم-های AOS، LOX و AOC در سنتز جاسمونیک اسید می باشد (Pushpalatha et al., 2011).

افزایش فعالیت این آنزیم برای ژنوتیپ حساس به طور معنی داری نسبت به ژنوتیپ متحمل در سطوح بالاتری (تا ۱۷۰ درصد) قرار گرفت. با توجه به فعالیت آنزیمهای LOX و AOS در مسیر اکسی لیپین (Wasternack 2007) نتایج این آزمایش نشان می دهد که فعالیت شاخه AOS به عنوان شاخه اصلی مسیر اکسی لیپین



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم آلن اکسید سینتاز (AOS) تحت تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط کنترل (۲۳ درجه سانتی گراد)، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرما (چهار درجه سانتی گراد) در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC533 (ستون خاکستری) گیاه نخود.

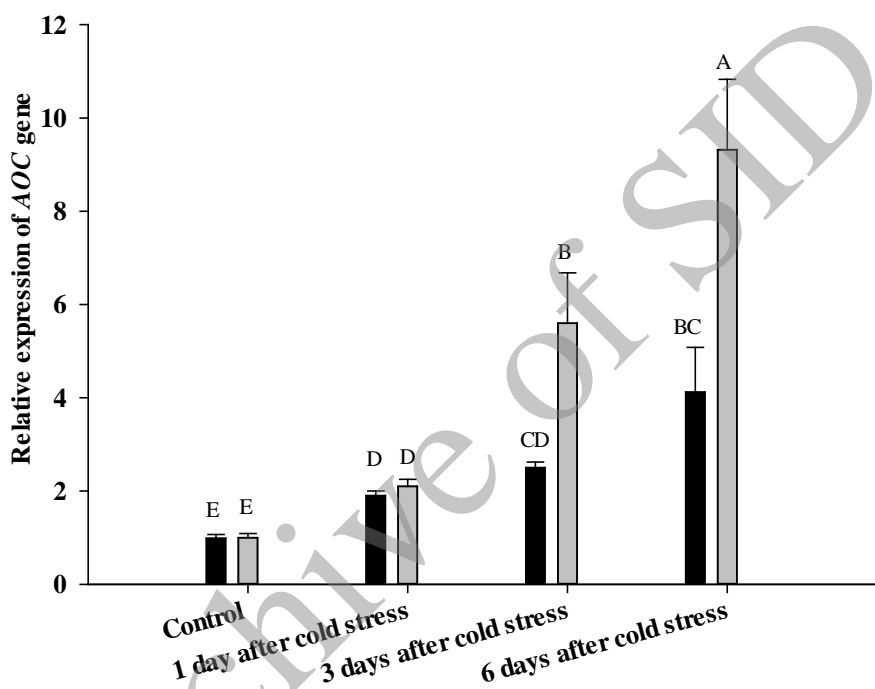
Figure 3- The allene oxide synthase (AOS) activity of the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).

بنابراین چنین متابولیت‌هایی دارای نقش تنظیمی در گیاه نخود بوده و در طول دوره نمو گیاه و سازگاری با تنش سرما به عنوان مولکول‌های سیگنال عمل می‌کنند (Wasternack 2007). تجزیه‌های انجام شده نشان داد که گیاه در روز نخست تنش توانسته که تاحدی پایداری خود را نسبت به تنش اعمال شده نشان دهد که این واکنش در ژنوتیپ متحمل به مراتب بهتر و از میزان تحمل بیشتری در برابر تنش برخوردار بود. به نظر می‌رسد در گیاهان حساس به تنش سرما مانند نخود نیز ظرفیت ژنتیکی متفاوتی وجود دارد که ارتباط مستقیم با سازگاری و مکانیسم‌های متعدد فیزیولوژیکی بیوشیمیایی دارد که بایستی در جزئیات مورد مطالعه قرار گیرد. نتایج مرتبط با میزان ROS به عنوان ترکیباتی که در خسارت سلولی به ویژه غشا فعالیت دارند نیز تاکید کننده نتایج فوق بود. تحقیقات گذشته نشان داده که القا مسیر تولید جاسمونیک اسید سبب سنتز ترکیبات سلولی متعددی مانند مهارکننده‌های پروتئینی، ترکیبات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های درگیر در تعادل ROS در سلول می‌شود (Gill et al., 2013) به طوری که افزایش میزان جاسمونیک اسید باعث کاهش میزان نشت الکترولیتی و در نتیجه افزایش پایداری غشا شده است (Paull and Rohrbach 1985). به طور کلی مسیر اکسی‌لیپینی در هنگام تنش سرما از طریق اکسیدکردن اسیدهای چرب غیراشباع غشا فعالیت می‌کند که در نهایت با تولید فیتوهورمون

تجزیه داده‌ها به کمک نرم افزار REST نشان داد که بیان ژن‌های *AOS*، *LOX* و *AOC* تحت تیمارهای زمانی اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۴). اگرچه در ژنوتیپ متحمل با افزایش دوره تنش افزایش بیان این ژن‌ها (تا حدود چهار برابر در مقایسه با کنترل) مشاهده شد ولیکن در ژنوتیپ حساس این افزایش میزان بیان در روز سوم و ششم تنش به مراتب بالاتر از ژنوتیپ متحمل بود (تا حدود نه برابر در مقایسه با کنترل). با توجه به روند الگوی بیان ژن، به نظر می‌رسد که شاخه *AOS* در گیاه نخود فعال‌تر از سایر مسیرهای اکسی‌لیپینی تلقی شده که احتمالاً تایید کننده نتایج فعالیت‌های آنزیمی *LOX* و *AOS* و تاکید بر القای برخی از پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش می‌باشد. اختلاف بیان ژن‌های *aoc*، *lox* و *aos* به موازات تغییر در فعالیت آنزیم‌های مسیر اکسی‌لیپین تحت تنش برخی از پیچیدگی‌های پاسخ‌های گیاه نخود را به تنش سرما نشان داد به طوری که تنظیم مسیر اکسی‌لیپین احتمالاً در سطح رونویسی و پس از رونویسی کنترل می‌شود (Yang et al., 2011). دو ژنوتیپ متحمل و حساس واکنش‌های متفاوتی به تنش سرما حتی در یک مسیر بیوشیمیایی نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد که تحت تنش سرما افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب آنزیم‌ها از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب القا تغییرات در فعالیت متابولیت‌های سلولی شده است.

در ژنوتیپ حساس) سبب خسارت به ساختار غشایی شد. تغییر همزمان الگوی فعالیت آنزیم-های مسیر اکسی لیپین و رونوشت این آنزیمها و مکانیسمهای دفاعی دیگر که با تغییر شاخص خسارت مرتبط است گویای آن است که بررسی این شاخصها ممکن است در ارزیابی ژنوتیپ-های مختلف به تنش سرما بکار گرفته شود.

جاسمونیک اسید به عنوان سیگنال دفاعی منجر به القای برخی از پاسخ های دفاعی از جمله افزایش میزان ترکیبات فنلی گیاه می شود (Kazemi-Shahandashti et al., 2014). از طرف دیگر به نظر می رسد که این مسیر بیوشیمیایی روشی پرهزینه برای گیاه در مقابله با تنش می باشد به طوری که فعالیت زیاد این مسیر



شکل ۴- الگوی بیان ژن آلن اکسید سیکلاز (AOC) تحت تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط کنترل (۲۳ درجه سانتی گراد)، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرما (چهار درجه سانتی گراد) در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC533 (ستون خاکستری) گیاه نخود.

Figure 4- The allene oxide cyclase (AOC) activity of the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).

- Berger S, Weichert H, Porzel A, Wasternack C, Kühn H, Feussner I (2001). Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochemistry Biophysics Acta* 1533:266-76.
- Bhardwaj PK, Kaur J, Sobti RC, Ahuja PS, Kumar S (2011). Lipoxygenase in *Caragana jubata* responds to low temperature, abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid. *Gene* 483:40-53.
- Blée E (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Science* 7:315-322.
- Cho K, Han Y, Woo JC, Baudisch B, Klösigen RB, Oh S (2011). Cellular localization of dual positional specific maize lipoxygenase-1 in transgenic rice and calcium mediated membrane association. *Plant Science* 181:242-248.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.
- Habibpour Mehraban F, Maali Amiri R, Nazari MR, Zeinali H (2012). Genotypic variability and physio-biochemical characteristics of Iranian black chickpea to cold stress. *Romanian Agricultural Research* 29: 121-130.
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-215.
- 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, Maali Amiri R, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh K (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58:157-163.
- Kazan K (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in plant science* 20: 219-229.
- Kazemi M, Maali-Amiri R, Sadeghzadeh B, Ramezanzpour SS (2014). Cold stress-induced physiological and biochemical changes in two chickpea genotypes. *Genetic in the 3rd Millennium* 12:3770-3777.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Taleei AR, Ramezanzpour 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.
- Kazemi Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ramezanzpour SS (2013). Change in membrane fatty acid compositions and cold induced responses in chickpea. *Molecular Biology Reports* 40:893-903.
- Khazaei M, Maali-Amiri R, Talei AR, Ramezanzpour SS (2015). Differential transcript accumulation of dhydrin and beta-glucosidase genes to cold-induced oxidative stress in chickpea. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17:725-734.
- Lim CW, Han SW, Hwang IS, Kim DS, Hwang BK, Lee SC (2015). The pepper lipoxygenase CaLOX1 plays a role in osmotic, drought, and high salinity. *Plant and Cell Physiology*
- 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* 54:600-606.
- Mantri NL, Ford R, Coram TE, Pang ECK (2007). Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics* 8:303.

- 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.
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M (2006). Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of Experimental Botany* 57: 3767-3779.
- Paull RE, Rohrbach KG (1985). Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). *Journal of American Society Horticultural Science* 110: 100-105.
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130:15-21.
- Pushpalatha HG, Sudisha J, Geetha NP, Amruthesh KN, Shekar Shetty H (2011). Thiamine seed treatment enhances LOX expression, promotes growth and induces downy mildew disease resistance in pearl millet. *Biologia Plantarum* 55:522-527.
- 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.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant cell reports* 32: 1085-1098.
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany* 100:681-697.
- Yang H, Liu H, Tang K, Huang W (2011). Role of lipoxygenase and allene oxide synthase in wound-inducible defense response of pea. *Plant Physiology* 58:238-247.

Metabolic change of oxylipin pathway in cold responses of chickpea plants

Maali-Amiri R.^{*1}, Sadeghzadeh B.², Farayedi Y.²

¹Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

²Dryland Agricultural Research Institute, Ministry of Jihad-e-Agriculture Research and Education Organization

Abstract

Oxylipins the products of fatty acid oxidation, to acclimate biotic and abiotic stresses. In this study, we evaluate the effects of cold stress by measuring malondialdehyde (as membrane damage index), the activity of lipoxygenase (LOX) and allene oxide synthase (AOS) enzymes, the levels of transcript *LOX*, *AOS* and allene oxide cyclase (*AOC*) genes using quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qPCR) under cold stress (4°C) in tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. The data analysis revealed that under cold stress, MDA content significantly increased in both genotypes so that MDA content in susceptible plants was maximum on day 6 of cold stress (by 57%) whereas in tolerant genotype, after an increase on day 1 of cold stress its content did not significantly change. Such increase in MDA content showed signaling role and induction of defense mechanisms in tolerant genotype. Under cold stress, the activity of LOX and AOS significantly increased in susceptible genotype compared to tolerant one. Therefore, the activity of AOS pathway, as main pathway of oxylipin was considered in chickpea under cold stress, indicating probably its role in creating jasmonates and induction of defense genes. The analysis of transcription level of *LOX*, *AOS* and *AOC* genes with REST software confirmed changes in oxylipin components. Thus degree of cold tolerance in tolerant plants was related with cell damages content and the activity of oxylipin pathway under cold stress.

Key words: *Gene expression, Cold stress, Oxylipin, Allene oxide synthase.*

* Corresponding Author: Maali-Amiri R. Tel: 09124190124

Email: rmamiri@ut.ac.ir