

Evaluation of gama-aminobutyric acid (GABA) biosynthetic pathway in chickpea under cold stress

Saeed Amini

PhD Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Tel: 09384528570, E-mail: saeed.amini@alumni.ut.ac.ir

Reza Maali-Amiri 

*Faculty member of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Tel: 09124190124, E-mail: rmamiri@ut.ac.ir

Abstract

Objective

Metabolic adaptation to cold stress plays an important role in the growth, survival and yield of crops. Gamma aminobutyric acid (GABA) as an osmolyte may take part in counteracting the oxidative stress induced by cold stress in chickpea.

Material and methods

In this experiment, content of Putrescine (Put), GABA, Hydrogen Peroxide (H₂O₂), activity of Diamine Oxidase (DAO) and relative expression of Glutamate Gecarboxylase1 (GAD1) gene in cold-tolerant (Sel96th11439) and cold-sensitive (ILC533) chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under cold stress (4°C) as a factorial experiment in a Completely Randomized Design were studied.

Results

In tolerant genotype H₂O₂ content after a significant increase on the first day of cold stress decreased significantly on the sixth day of cold stress compared to control conditions (up to 4.7%) while its accumulation was observed in sensitive genotype (up to 50%). These results indicated a relative acclimation to cold stress in tolerant genotype. Under cold stress, GABA and Put contents in tolerant genotype was higher compared to sensitive genotype (up to 14% and 35%, respectively). Under cold stress,

in tolerant genotype increasing GABA content was accompanied with an increase in DAO activity and relative expression of GAD1 gene as biosynthetic pathways of this metabolite (up to 3- and 17-fold, respectively). The maximum activity of these two pathways was observed in tolerant genotype on the sixth day of cold stress.

Conclusions

Under cold stress, the accumulation of GABA in tolerant genotype led to reduced cell damage (H_2O_2 results) and improved cold tolerance. These indices were useful in assessment of chickpea genotypes under cold stress and breeding programs.

Key words: Diamine Oxidase (DAO), Gene expression, Hydrogen peroxide, Cold tolerance, Glutamate Decarboxylase1.

Citation: Saeed Amini, Reza Maali-Amiri (2020) Evaluation of gama-aminobutyric acid (GABA) biosynthetic pathway in chickpea under cold stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (3), 1-24.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 1-24.

DOI: 10.22103/jab.2020.15694.1221

Received: June 7, 2020; Accepted: August 9, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارزیابی مسیرهای بیوسنتز گاما آمینو بوتریک اسید (GABA) در نخود زراعی (*Cicer*)*arietinum* L. تحت تنش سرما

سعید امینی

دانش آموخته دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران، تلفن: ۰۹۳۸۴۵۲۸۵۷۰، ایمیل:

saeed.amini@alumni.ut.ac.ir

رضا معالی امیری

* نویسنده مسئول، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۹۰۱۲۴، ایمیل:

ORCID id: 0000-0003-2496-4800 rmamiri@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۹

چکیده

هدف: سازگاری متابولیکی گیاهان به تنش سرما نقش مهمی در رشد، بقا و عملکرد گیاهان زراعی دارد. گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) به عنوان اسمولیت احتمالا در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط سرما مشارکت دارد.

روش: در این پژوهش میزان GABA، پوتریسین (Put)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، فعالیت آنزیم دی آمین اکسیداز (DAO) و بیان نسبی ژن گلو تامات دکربوکسیلاز (*GAD1*) (موثر در بیوسنتز GABA) در دو ژنوتیپ متحمل (*Sel96th11439*) و حساس (*ILC533*) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرما چهار درجه سلسیوس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مطالعه شد.

نتایج: در ژنوتیپ متحمل میزان H_2O_2 پس از افزایش معنی دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد نشان داد (بیش از ۴/۷ درصد در حالی که 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 متابولیت های GABA و Put در ژنوتیپ متحمل به ترتیب تا ۱۴ و ۳۵ درصد بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. به موازات افزایش میزان GABA تحت تنش سرما، در ژنوتیپ متحمل فعالیت آنزیم DAO و بیان نسبی ژن *GAD1* به عنوان مسیرهای بیوسنتز این متابولیت افزایش معنی داری یافت (به ترتیب تا ۳ و ۱۷ برابر). حداکثر فعالیت این دو مسیر در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد.

نتیجه گیری: تحت تنش سرما تجمع GABA در ژنوتیپ متحمل منجر به کاهش آسیب سلولی (نتایج H₂O₂) و بهبود درجه تحمل نخود به سرما شد. چنین شاخص‌هایی در ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما موثر بوده و بکارگیری آنها در برنامه‌های به‌نژادی مفید است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO)، بیان ژن، پراکسید هیدروژن، تحمل سرما، گلوتامات دکربوکسیلاز

مقدمه

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 ۳۰۰-۴۰۰ 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 (et 2014 al. Kazemi Shahandashti). 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 انواع اکسیژن فعال (ROS^۱) سبب آسیب‌های شدید به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و 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 متابولیت‌ها از طریق تنظیم تظاهر ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌ها ایجاد می‌شود (Heidarvand et al. 2013). بنابراین تحت تنش‌های محیطی برنامه‌ریزی مجدد ژنوم با تغییر الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند سبب تغییر متابولیسم سلولی و هموستازی جدید شود. پوترسین (Put^۲)، سبک‌ترین عضو خانواده پلی‌آمین‌ها (PAs^۳) در واقع اسمولیتی پلی‌کاتیونی است که در پویایی فرایندهای سلولی و پاسخ به تنش‌های محیطی مشارکت دارد (Handa and Mattoo, 2010). این متابولیت از پیش‌ماده ارنیتین^۴ یا سیترولین^۵ در یک مسیر بیوسنتزی تولید و در ادامه توسط اسپرمیدین‌سینتاز (SPDS^۶) به اسپرمیدین (Spd^۷) تبدیل شده یا توسط دی‌آمین‌اکسیداز (DAO^۸) به گاما آمینوبوتریک اسید (GABA^۹) تجزیه می‌شوند (Madhulata et al. 2014). مطالعات انجام شده به نقش حفاظتی Put در پاسخ به تنش‌های محیطی اشاره دارد (Knight and Knight, 2012; Barrero-Gil and Salinas, 2013) به طوری که در برخی گیاهان از جمله گندم، برنج، لوبیا و یونجه تجمع PAs به خصوص Put در بهبود تحمل به سرما نقش ایفا می‌کند (Guye et al. 1987; Nadeau et al. 1987; Lee

1- Reactive oxygen species; ROS

2- Putrescine; Put

3- Polyamines; PAs

4- Ornithine

5- Citrulline

6- Spermidine synthase

7- Spermidine

8- Diamine oxidase

9- Gama-aminobutyric acid

1997). et al. Put با حذف مستقیم ROSها و یا با اتصال و تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در جهت حذف ROSها و همچنین افزایش بیوسنتز GABA با بهبود تحمل به سرما در گیاهان در ارتباط است (Duan et al. 2008). در ارقام برنج متحمل به سرما محتوی Put طی تنش سرما در ساقه و ریشه افزایش یافته در حالی که در رقم حساس محتوی Put افزایش جزئی در ساقه و کاهش در بافت ریشه داشته است (Lee et al. 1997). به نظر می‌رسد افزایش محتوی Put در گیاهان می‌تواند به عنوان نشانگر متابولیکی در ارزیابی تحمل به دمای پایین استفاده شود (Alcázar and Tiburcio 2018).

گاما آمینو بوتیریک اسید یک آمینواسید آزاد^۱ چهار کربنه نیتروژن دار، مولکولی با تعداد گروه‌های بار مثبت و بار منفی برابر و دارای خاصیت اتصال به ROS و حذف آنها است که به‌عنوان اسموپروتکتنت غیرآنزیمی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و در شارکربن^۲، تنظیم اسمزی و سیتوپلاسمی، چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA^۳)، پیام‌رسانی سلولی و محافظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو ایفای نقش می‌کند (Yang et al. 2011; Li et al. 2017). در برخی گیاهان از جمله فلفل، باقلا، چای و ریشه سویا تحت تنش کمبود نور، کمبود و بیش‌بود اکسیژن و شوری، افزایش محتوای GABA با کاهش آسیب‌های سلولی همراه بود (Xiang et al. 2007; Yang et al. 2011; Li et al. 2017). گزارش شده که در آرایدوپسیس تحت تنش‌های غیرزیستی تجزیه PAS باعث تجمع GABA شده است (Planas-Portell et al. 2013). استعمال GABA بر روی بوته‌های خربزه و گوجه‌فرنگی کارایی بالایی در کاهش خسارت اکسیداتیو به غشای سلولی به ترتیب تحت شرایط کمبود اکسیژن (Wang et al. 2014) و تنش‌های محیطی از جمله سرما داشته است (Malekzadeh et al. 2014). بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین استعمال GABA باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در میوه هلو تحت تنش سرما و افزایش تحمل سرما در طی دوره انبارداری شده است (Yang et al. 2011). بر اساس مطالعات انجام شده در سلول‌های گیاهی، میزان GABA توسط دو مسیر مختلف آنزیمی سنتز می‌شود: الف) مسیر GABA-Shunt (مسیر اصلی تولید GABA در بسیاری از گیاهان) با وساطت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD^۴) که در pH اسیدی فعالیت کرده و با تجمع یون‌های هیدروژن و کلسیم سیتوسولی تحت تنش‌های غیرزیستی فعال می‌شود (Hyun et al. 2013) و ب) تجزیه Put توسط فعالیت آنزیم DAO و تجزیه Spd توسط فعالیت آنزیم پلی‌آمین‌اکسیداز (PAO^۵) (Wang et al. 2016). مسیر تخریب GABA نیز می‌تواند در تنظیم میزان GABA در سلول ایفای نقش کند. تخریب GABA توسط آنزیم GABA ترانس‌آمیناز (GABA-T^۶) به صورت واکنش برگشت‌پذیر منجر به سنتز سوکسینیک سمی‌آلدئید (SSA^۷) شده که توسط سوکسینیک سمی‌آلدئید دهیدروژناز

-
- 1- Free amino acid
 - 2- C flux
 - 3- Tricarboxylic acid
 - 4- Glutamate decarboxylase
 - 5- Polyamine oxidase
 - 6- GABA transaminase
 - 7- Succinic semialdehyde

(SSADH^۱) سوکسینیک اسید را سنتز می‌کند (Shelp et al. 2012). سوکسینیک اسید نیز برای حفظ چرخه کربن-نیتروژن وارد چرخه TCA می‌شود. متابولیسم PAS کاملاً با ترکیبات دیگر مانند GABA برای ایجاد تحمل به سرما مرتبط است (Gill and Tuteja, 2010) به طوری که با فعال‌سازی مسیر تجزیه Put، GABA سنتز می‌شود (Yang et al. 2011). آنزیم DAO (EC 1.4.3.6) گروهی از آمین‌اکسیدازهای (AOs) گیاهی حاوی مس (CuAO_s) است (Cona et al. 2006) که با تنظیم میزان PAS و GABA سلولی از طریق اکسیداسیون Put و متابولیت‌های دیگر از جمله کاداوآرین (Cad^۲) نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک از جمله رشد، نمو، گلدهی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Angelini et al. 2011a, b; Wimalasekera et al. 2010; et al. 2010); فرایندی که مولکول پیام‌رسان H₂O₂ را نیز از طریق کاتابولیسم انتهایی^۳ PAS تولید می‌کند (Tiburcio et al. 2014; Minocha et al. 2014). مطالعات انجام شده ارتباط میزان فعالیت این آنزیم با تنظیم محتوی GABA و Put به منظور سازگاری به تنش‌های محیطی را نشان داده است به طوری که در گیاهچه سازگار شده به سرما گوجه‌فرنگی فعالیت DAO در رقم متحمل به طور چشمگیری در مقایسه با رقم حساس افزایش یافت (Song et al. 2015). در میوه zucchini انبار شده تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد، فعالیت DAO در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش یافت (Palma et al. 2014). با توجه به ارتباط محتوی پلی‌آمین با فعالیت این آنزیم در گیاهچه خیار تحت تنش شوری، همزمان با افزایش محتوی Put فعالیت آنزیم DAO نیز افزایش یافت (Duan et al. 2008). افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم از طریق کارآتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می‌تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما نقش داشته و به عنوان یکی از شاخص‌های متابولیکی تحمل در شناسایی ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما بکار رود (Shelp et al. 2012).

پلی‌آمین‌ها و GABA دارای سوبستراهای مشخصی هستند، به طوری که یک پیام‌رسان مشخص به شیوه‌ای هماهنگ، این مسیرهای بیوستتزی را برای حذف ROSها در پاسخ به تنش‌های محیطی القا کرده (Yamamoto et al. 2012) و در تجمع میزان این متابولیت‌ها در پاسخ سازگاری به تنش موثر است (Zarei et al. 2016). کاهش میزان GABA و پاسخ‌های دفاعی سلول در گیاهچه جهش‌یافته آرابیدوپسیس که ژن‌های بیوستتزکننده GAD در آن از دست رفته‌اند تایید کننده فرضیه مشارکت آنها در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله خشکی و شوری است (Mekonnen et al. 2016; Zarei et al. 2017). با این وجود میزان تجمع اسمولیت‌ها بر اساس نوع، شدت و مدت زمان تنش در ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های گیاهی متفاوت بوده به طوری که بیانگر درجه تحمل گیاه به تنش است (Hussain et al. 2011). هدف این پژوهش بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی و مولکولی سازگاری به تنش سرما در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود (*C. arietinum L.*) کابلی است. بررسی ارتباط احتمالی بین منابع ایجاد آسیب تنش و عوامل دفاعی سلول به درک

1- SSA dehydrogenase
2- Cadavarine
3- Terminal catabolism

سازوکارهای تحمل به تنش سرما در نخود به منظور افزایش بقا و یا بهبود تحمل این گیاه تحت تنش سرما در جهت بکارگیری آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی منجر خواهد شد.

مواد گیاهی و شرایط رشد: در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود زراعی (C.arietinum L.) Sel96th11439

(متحمل به سرما با منشا ایکاردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های ILC 482×ILWC 182 و ILC533 (حساس به سرما منشا گرفته از مصر که اجداد آن هنوز ردیابی نشده‌اند) فراهم شده از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) استفاده شد (Heidarvand et al. 2011; Saeed et al. 2011). بذور با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی 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 ۲۳ درجه سلسیوس به مدت سه شبانه‌روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های با قطر دهانه دوازده سانتی‌متر و ارتفاع ده سانتی‌متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به ۰/۲۵ (حجمی) انتقال یافت. گلدان‌ها در اتاقک رشد 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 ۲۳ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها (با ارتفاع حدود ۲۰ سانتی‌متر و دارای حداقل پنج شاخه) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) با دمای چهار درجه سلسیوس (به عنوان دمای LT₅₀ نخود) منتقل شدند (Nayyar et al. 2005; Kazemi-Shahandashti et al. 2014). نمونه‌گیری از برگ‌های میانی هر گیاهچه به عنوان برگ‌های فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام گیاه) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) انجام شد (Amini et al. 2017; Karami-moalem et al. 2018). نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سلسیوس نیز به عنوان گیاهان شاهد انجام گرفت (سن فیزیولوژیک تمام گیاهان یکسان در نظر گرفته شد (Hurry and Huner, 1991; Kazemi-Shahandashti et al. 2014). بنابراین در این پژوهش پاسخ‌های سلولی در گیاهچه‌ها تحت شرایط دمایی ۲۳ درجه سلسیوس، یک روز و شش روز پس از شروع تنش سرمای چهار درجه سلسیوس در دو ژنوتیپ متحمل و حساس بررسی شد.

سنجش میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂): مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم نمونه تازه برگ با نیتروژن مایع در هاون چینی

به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس ۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک 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 نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت $12000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار دیدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چند بار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول

موج ۳۹۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova 2001). نتایج بصورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش میزان Put: سنجش کمی Put به روش (Walter and Geun 1987) انجام شد. ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت برگ‌گی در دو میلی‌لیتر محلول پرکلریک اسید (PCA^۱) چهار درصد حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوپنتان^۲ (۵ میلی‌گرم در لیتر از اسیدکلریدریک ۲ نرمال) هموژنیزه شد. پس از یک ساعت قرارگیری در چهار درجه سلسیوس، از فیلتر (پالایشگر) ۴۵ درصد میکرونی عبور داده شد. بر روی دو دهم میلی‌لیتر از این محلول، یک میلی‌لیتر بافر کربنات با pH ۹ و یک میلی‌لیتر محلول دانسیل کلراید^۳ (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 $500 \times g$ 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 از نوع فاز معکوس به طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی سه میلی‌متر متصل به دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 (Cambridgeshire, UK) تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل با خلوص بسیار بالا و آب دیونیزه به ترتیب به نسبت ۷۲ به ۲۸ حجمی/حجمی و با سرعت دو میلی‌متر بر دقیقه حرکت آن در سامانه ایزوکراتیک انجام شد. دکتور این دستگاه از نوع UV است که در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از روش کالیبراسیون نسبی با استفاده از ۷،۱ دی‌آمینوپنتان (HTD) به عنوان استاندارد داخلی و مقادیر استاندارد Put از ۰/۳ تا ۱/۵ نانومول خریداری شده از شرکت سیگما برای تعیین وجود Put و غلظت سنجی آن در نمونه‌های مورد آزمایش استفاده شد (López-Gómez et al. 2016). نتایج به صورت نانومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش میزان GABA: مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم بافت برگ‌گی در ۸۰۰ میکرولیتر محلول ECA (حاوی اتانول ۷۰ درصد حجمی/حجمی، کلروفرم و هیدروکلریک اسید (HCl) یک دهم مولار) به نسبت ۱:۵:۱۲ (حجمی/حجمی/حجمی) هموژنیزه و در هاون پودر شد. سپس به مدت یک دقیقه ورتکس شده و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت $\times g$ ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. روشناور به تیوب جدید انتقال یافت. فرایند استخراج مجدداً دو مرتبه تکرار و روشناورها باهم مخلوط شدند. روشناور به مدت یک شبانه‌روز در دمای چهار درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس فاز مایع در مدت یک ساعت در دستگاه خشک‌کن Speed Back خشک شد. به پلیت باقی‌مانده در هر تیوب ۳۰۰ میکرولیتر متانول و ۱/۲ میلی‌لیتر استونیتریل افزوده شد و پیش از تزریق از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد (Palma et al. 2015). به منظور ارزیابی کمی GABA، ۱۵ میکرولیتر از این محلول به سیستم Hewlett-Packard به طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر متصل به دستگاه HPLC تزریق شد. فاز متحرک (شستشو) با سرعت ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه شامل محلول آب مقطر حاوی ۰/۰۱ درصد فرمیک

- 1- Perchloric acid (ClO₄H)
- 2- 1,7-diaminoheptane
- 3- Dansyl chloride

اسید بود (Oh and Choi, 2001). دتکتور این دستگاه از نوع فلورومتريک و در طول موج ۳۳۰ نانومتر تنظیم شد. از نمونه استاندارد (محلول GABA خالص شرکت سیگما، Cat#A2129) برای تعیین وجود GABA و تعیین غلظت آن استفاده شد. نتایج به صورت میکرومول بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم DAO (EC 1.4.3.6): پس از پودر کردن ۴۰۰ میلی گرم بافت برگ در ۱/۲ میلی لیتر بافر

استخراج (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۵) نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت $10000 \times g$ سانتریفیوژ شده و مایع رویی برداشته شد (López-Gómez et al. 2014). واکنش سنجش فعالیت آنزیم DAO حاوی ۶۳۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۵، ۷۰ میکرولیتر محلول واکنش (۶/۲۵ میکرولیتر آن-دی متیل آنیلین^۱، ۲/۵ میلی گرم ۴-آمینوآنتی پیرین^۲، ۲۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیداز (۱/۴۲ میلی گرم در میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برگ و ۱۰۰ میکرولیتر Put (۳/۲ میلی گرم هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH = ۶/۵) بود. میزان فعالیت این آنزیم در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1603 cell positioner CPS 240A, Kyoto, Japan) اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میکرومول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

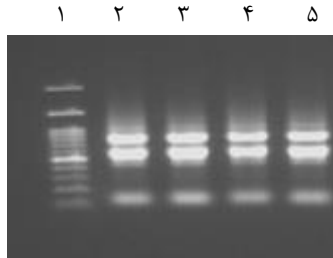
استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش Quantitative real-time PCR: استخراج RNA کل سلول به

روش تریزول با ۸۰ میلی گرم نمونه‌های بافت برگ خرد شده 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 18S و 25S 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 ۲۶۰nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمتناز 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 درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. تیوب‌ها در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) (۲۰-۱۸ 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 درجه سلسیوس 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

1- NN-dimethylaniline

2- 4-aminoantiprine

میکرولیتزر رسانده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد 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 درجه سلسیوس قرار داده شد.



شکل ۱. نگاره باندهای RNA استخراج شده. از چپ به راست به ترتیب: (۱) نشانگر DNA ۱۰۰ bp فرمنتاز، (۲) ژنوتیپ متحمل شاهد، (۳) ژنوتیپ حساس شاهد، (۴) ژنوتیپ متحمل روز اول تنش سرما و (۵) ژنوتیپ حساس روز تنش اول سرما

Figure 1. Extracted RNA. From left to right: 1) 100 bp DNA marker, Fermentas; 2,3) tolerant and sensitive genotypes under control conditions and 4,5) tolerant and sensitive genotypes on the first day of cold stress

سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. به منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار^۱ اکتین ۱ (ACTIN1) (Peng et al. 2010) بر روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. نتایج حاکی از مطابقت اندازه قطعه تکثیر شده با ژن خانه‌دار (۱۸۹ bp) بود. ۱۱۴۵ نانوگرم در میکرو لیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، ۳ 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 میکرو لیتر (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 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس (T_m آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. تایید اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده^۲ با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب^۳ انجام شد. منحنی ذوب با خنک

۱- House-keeping gene

۲- Amplicon

۳- Melting curve

شدن تا دمای ۵۵ درجه سلسیوس با سرعت ۲۰ درجه سلسیوس در ثانیه ثبت شد، سپس در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند و سپس با گرمایش آهسته با سرعت ۰/۵ درجه سلسیوس در ثانیه تا دمای ۹۵ درجه سلسیوس افزایش یافت. فلورسانس به طور مداوم در طول دوره افزایش آهسته دما، برای نظارت بر تفکیک رنگ Evagreen اندازه‌گیری شد. بر اساس منحنی‌های استاندارد رسم شده حاصل از پنج 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 $-۳/۲۳$ و $-۳/۴۲$ بود (Pfaffl et al. 2002). با توجه به نتایج منحنی‌های استاندارد، از نرم‌افزار REST^۱ می‌توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه‌دار (ACTIN1) در هر نمونه مشخص با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ به عنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (Livak and Schmittgen 2001). طراحی آغازگر برای ژن اختصاصی GAD1 (XM_004503044.3) با استفاده از تارنمای Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) به آدرس <https://www.idtdna.com> و همچنین ژن خانه‌دار ACTIN1 با استفاده از تارنمای 3 Primer به آدرس www.embnet.sk/cgi-bin/primer3www.cgi برای دستیابی به آغازگرهای دارای خصوصیات مناسب انجام گرفت (جدول ۱).

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

Table 1. Primer sequences used in qPCR amplification

Accession No	Gene name	Protein name	Sequence (5'-3')	T _a (°C)	Length (bp)
XM_004503044.3	GAD1	Glutamate decarboxylase1	F:GTGTTGTCATAAGGGAGGACTT R:CTAGTGCTGCTGCTCCTATTT	58	124
EU529707.1	Act1	Actin1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT	57	189

بررسی های آماری: این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا 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 GAD1 انجام شد و آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن ($P < 0/01$) و با نرم افزار SAS 9.4 انجام شد.

۱- Relative expression software tool

نتایج و بحث

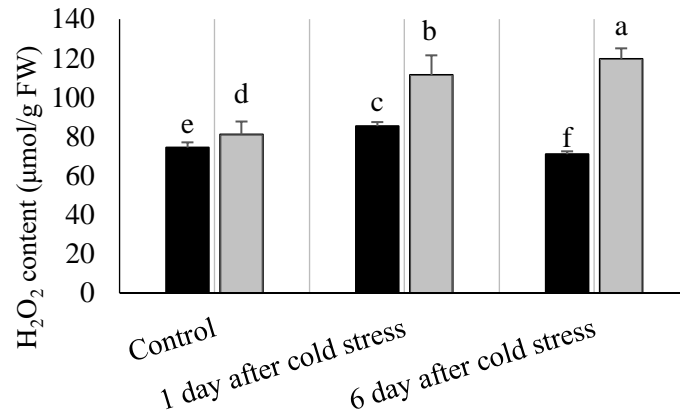
تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H_2O_2 ، Put، GABA، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن GAD1 ($P < 0.01$) وجود داشت (جدول ۲). تفاوت معنی‌دار میزان H_2O_2 تحت شرایط شاهد نشان دهنده اختلاف در تنظیم متابولیسم سلولی در اثر ظرفیت ژنتیکی متمایز دو ژنوتیپ متحمل و حساس بود (شکل ۲)، نتایجی که به وسیله دیگر محققین نیز گزارش شده است (Razmi et al. 2017; Ansari et al. 2018). میزان تجمع H_2O_2 که از مهمترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (Kazemi Shahandashti & Maali Amiri 2018)، تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (حداکثر بیش از ۶۹ درصد در روز ششم تنش). در ژنوتیپ متحمل پس از افزایش معنی‌دار در روز اول تنش، میزان H_2O_2 در روز ششم کاهش یافته، به طوری که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد به طور معنی‌داری کمتر شد (بیش از ۴۷٪)، در حالی که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد به طور پیوسته افزایش یافت (تا ۵۰٪) (شکل ۲). بنابراین درجه خسارت ناشی از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه آن درجه تحمل به تنش سرما در دو ژنوتیپ نخود با یکدیگر متفاوت می‌باشد. این نتایج بیانگر ارتباط احتمالی تاثیر پاسخ‌های دفاعی ژنوتیپ‌های نخود می‌باشد (Kazemi Shahandashti and Maali-Amiri 2018). در گیاهان بخشی از سازگاری به تنش در نتیجه کاهش میزان ROS سلولی اتفاق می‌افتد که بدنال تنظیم میزان GABA از طریق تنظیم سنتز آن (مسیر GAD) و یا تغییر در فعالیت مسیر تجزیه Put ایجاد می‌شود (Palma et al. 2014). نتایج نشان داد که در شرایط شاهد میزان متابولیت‌ها و آنزیم اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. تحت تنش سرما میزان Put، GABA و فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن GAD1 در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت به طوری که این افزایش در ژنوتیپ متحمل اغلب در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی‌دار بود، چنین نتایجی بیانگر ظرفیت ژنتیکی فعال‌تر ژنوتیپ متحمل در جهت حفظ محتوی GABA برای مقابله با آثار مخرب ROS سلولی است. در ژنوتیپ متحمل میزان Put در مقایسه با شاهد در روز اول افزایش نسبی اما غیر معنی‌دار و در روز ششم تنش افزایش ۱۱۶٪ داشت در حالیکه در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش افزایش میزان این متابولیت در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بسیار کمتر بود (تا ۳۵٪) (شکل ۳-الف). این نتایج با یافته‌های آزمایش در گیاهان زراعی که در آنها تحت تنش سرما میزان Put آزاد افزایش یافته، هماهنگ بود (Zhang et al. 2013). بنابراین به نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی‌داری بین میزان آسیب سرما (از جمله نتایج H_2O_2) و افزایش میزان Put وجود داشت، که با نتایج Kim et al. (2002) در مورد اثر محلول‌پاشی Put بر تسریع افزایش پایداری غشای گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما همخوانی داشت. آمین‌آکسیدازها (AOs) در مسیر تجزیه پلی‌آمین‌ها، با اتصال به رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آنها، H_2O_2 نیز تولید می‌کنند (Groppa and Benavides, 2008). این فرایند در هموستازی سلول و بهبود تحمل به 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 ۲) بیانگر نقش پیام‌رسانی H_2O_2 در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی می‌باشد که با افزایش میزان Put مطابقت داشت.

میزان GABA تحت تنش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت به طوری که بیشترین میزان آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا ۸۹ درصد) (شکل ۳-ب). در ژنوتیپ حساس نیز میزان GABA در روز ششم تنش در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت اگر چه تجمع آن در ژنوتیپ متحمل هم در شرایط شاهد (۳۳ درصد) و هم تحت تنش (۷۴-۸۰ درصد) به طور معنی‌داری در مقایسه با ژنوتیپ حساس بیشتر بود (شکل ۳-ب). این نتایج با یافته‌های Shelp et al. (2012) که تحت تنش‌های غیرزیستی میزان GABA در گیاهان افزایش یافته، مطابقت داشت. گزارش شده که میزان GABA در گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله کمبود اکسیژن، سرما، گرما و آسیب‌های مکانیکی و زیستی از جمله گیاه‌خواری، زخم و آلودگی با پاتوژن‌ها تجمع می‌یابد (Shelp et al. 2012).

جدول ۲. تجزیه واریانس میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، پوتریسین (Put) و گاما‌آمینوبوتریک اسید (GABA)، فعالیت آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) و بیان نسبی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (*GADI*) در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود زراعی تحت تنش سرما

Table 2. Variance analysis of hydrogen peroxide (H_2O_2), putrescine (Put) and gama-amino butyric acid (GABA) content, diamine oxidase (DAO) activity and relative expression glutamate decarboxylase1 (*GADI*) gene in tolerant (Sel96th11439) and sensitive (ILC533) chickpea genotypes under cold stress

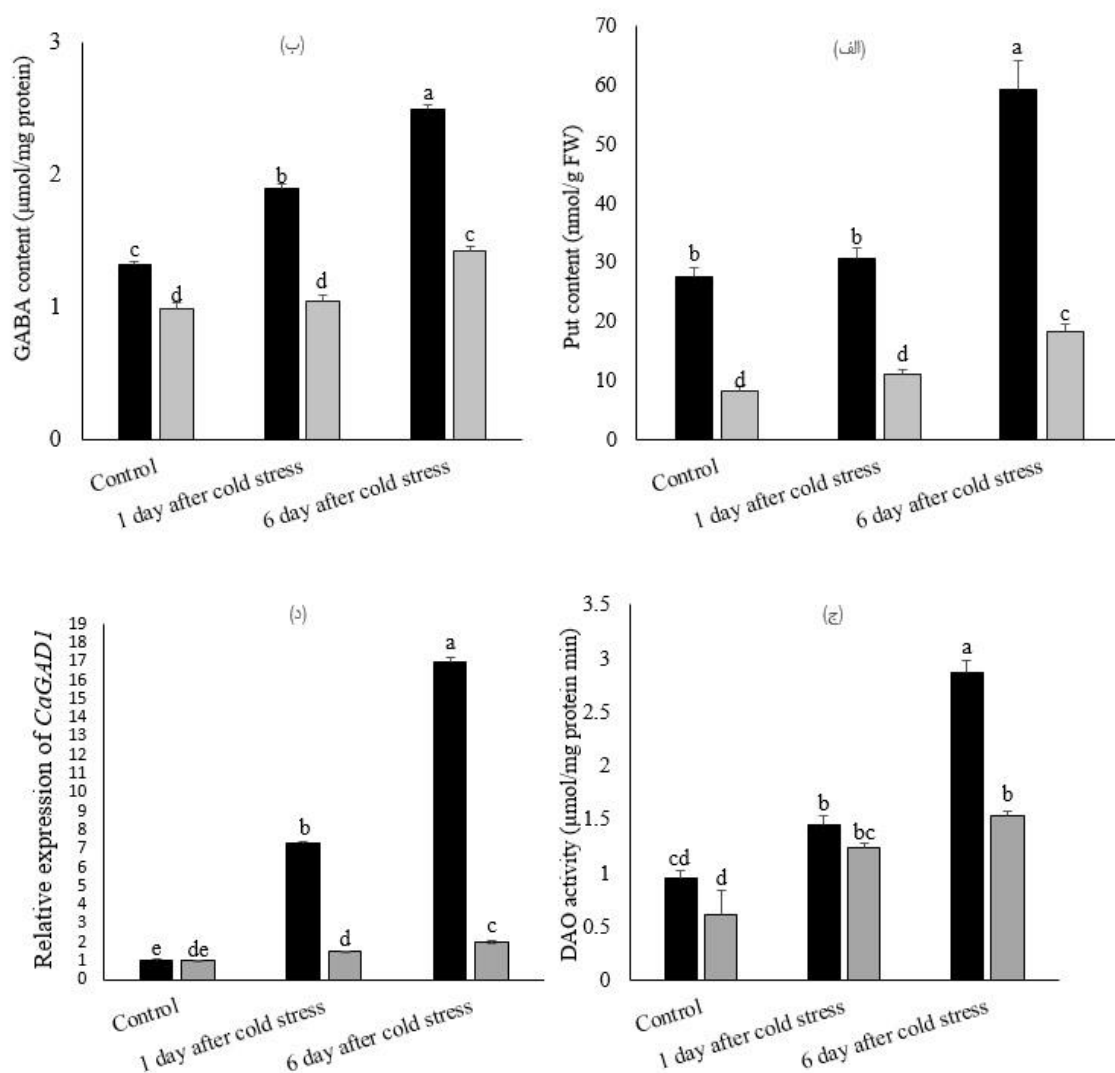
MS					df	S .O. V
<i>GADI</i>	GABA	DAO	Put	H_2O_2		
218.3**	2.52**	1.8**	3166.22**	3327.64**	1	ژنوتیپ
Genotype						
109.1**	0.98**	3.05**	768.51**	747.98**	2	دوره زمانی تنش
Stress period						
85.8**	0.21**	0.56**	230.54**	664.88**	2	ژنوتیپ × دوره زمانی تنش
Stress period × Genotype						
0.056	0.007	0.06	5.53	1	12	خطا
Error						
4.77	5.72	17.7	9.1	1.1		ضریب تغییرات (%)
CV						



شکل ۲. میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (۲۳ درجه سلسیوس)، روز اول و روز ششم تنش سرما (چهار درجه سلسیوس). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن در سطح یک درصد

Figure 2. Change in Hydrogen Peroxide (H_2O_2) content in the leaves of tolerant (Sel96th11439) and sensitive (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C), day 1 and day 6 of cold stress (4°C). Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test ($P < 0.01$)

بنابراین به نظر می‌رسد GABA به‌عنوان اسموپروتکتنت سلولی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفای نقش می‌کند (Bouchereau et al. 1999). تجمع GABA تحت تنش‌های محیطی از طریق سه سازوکار افزایش می‌یابد (Kinnersley & Turano, 2000): در سازوکار نخست، اسیدی شدن فضای سیتوسول در اثر اختلالات مکانیکی یا متابولیکی ناشی از تنش، منجر به فعال‌سازی وابسته به pH آنزیم GAD و القا سنتز GABA می‌شود؛ در سازوکار دوم، تنش با آغاز مسیر پیام‌رسانی و تحریک فعالیت GAD وابسته به یون کلسیم/کالمودولین در شرایطی که یون کلسیم سیتوسولی افزایش یافته، GABA را سنتز می‌کند. سازوکار دیگر تنظیم‌کننده میزان GABA در سلول، فرایند تجزیه PAS توسط آنزیم‌های آمین‌اکسیداز است، فرایندی که با آزاد شدن H_2O_2 همراه است. افزایش میزان GABA تحت تاثیر تنش سرما در مقایسه با شاهد و نیز در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس و در روز ششم در مقایسه با روز اول تنش (شکل ۳-ب) حاکی از همکاری مسیر متابولیک سنتز GABA و مسیر تجزیه Put برای سنتز GABA و همچنین فعال بودن مسیر متابولیسمی PAS (خصوصاً Put) بدلیل افزایش محتوی Put (شکل ۳-الف) در روز ششم تنش هماهنگ با افزایش GABA (شکل ۳-ب) در نخود تحت تنش سرما است.



شکل ۳- تغییر میزان پوتریسین (Put) (الف) و گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) (ب)، فعالیت آنزیم دی آمین اکسیداز (DAO) (ج) و بیان نسبی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (GADI) (د) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (۲۳ درجه سلسیوس)، روز اول و روز ششم تنش سرما (چهار درجه سلسیوس). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن در سطح یک درصد

Figure 3- Change in putrescine (Put) and gama-aminobutyric acid (GABA) content, diamine oxidase (DAO) activity and relative expression of *glutamate decarboxylase1* (GADI) gene in the leaves of tolerant (Sel96th11439) and sensitive (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C), day 1 and day 6 of cold stress (4°C). Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test ($P < 0.01$)

نکته جالب در این پژوهش افزایش غیرمعنی‌دار Put در روز اول تنش سرما در ژنوتیپ متحمل و حساس نخود بوده که بیانگر دو موضوع می‌باشد: الف- عدم توانایی پاسخگویی دو ژنوتیپ به تنش سرما و ب- تجزیه و تبدیل Put به متابولیت‌های دیگر از جمله GABA. با توجه به کاهش میزان خسارت‌های سلولی در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش به نظر فرضیه اول رد شده و فرضیه دوم به دلیل افزایش معنی‌دار GABA در روز اول تنش در هر دو ژنوتیپ تایید می‌شود. احتمالاً تغییر شرایط محیطی و تعادل اکسیداسیون/ احیا سلول تحت تنش‌های محیطی مستقیماً بر فعالیت مسیرهای متابولیک تنظیم میزان GABA موثر است. تحت تنش کمبود^۱ و بیش‌بود^۲ اکسیژن و شوری به‌ترتیب در گیاهان باقلا، چای و ریشه سویا بخش کوچکی از GABA از طریق مسیر تخریب PAs و بخش اعظمی از آن توسط فعالیت آنزیم GAD تجمع می‌یابد (Xiang et al. 2007; Yang et al. 2011). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در نخود میزان GABA تحت تنش سرما از یک سو وابسته به مسیر بیوسنتز GABA و از سوی دیگر به میزان تخریب PAs (با توجه به تغییر میزان Put، GABA و فعالیت آنزیم DAO، شکل ۳- الف، ب، ج) وابسته است، به‌طوری‌که احتمالاً با فعال‌سازی مسیر تخریب Put به کمک DAO، GABA سنتز می‌شود (Yang et al. 2011). سنتز GABA توسط کاتابولیسم PAs، باعث تجمع مولکول پیام‌رسان H₂O₂ به‌عنوان محصول جانبی اکسیداسیون PAs نیز می‌شود که اغلب توان دفاعی در برابر تنش‌های غیر زیستی را با فعالیت در مسیرهای انتقال پیام تسریع می‌کند (Wimalasekera et al. 2011a; Shelp et al. 2012). این مولکول پیام‌رسان همچنین در اولین مرحله پاسخ‌های دفاعی در اثر فعالیت آنزیم SOD از رادیکال سمی اکسیژن نیز سنتز می‌شود. مطابق با الگوی تغییر Put و GABA تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ متحمل و حساس در مقایسه با شاهد حداکثر سه برابر شد بطوری‌که بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل مشاهده شد (شکل ۳- ج). فعالیت آنزیم DAO در بذر برنج تحت تنش سرما مانند نتایج این آزمایش روند افزایشی داشت (Sheteiwy et al. 2017). اگرچه تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد فعالیت DAO در ژنوتیپ حساس نیز روند افزایشی داشت، 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 بدلیل ضعف سامانه‌های دفاعی ژنوتیپ حساس در بهبود تحمل به سرما در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود، نتایجی که با روند تغییر Put تحت تنش سرما نیز مطابقت داشت. آنزیم DAO به‌عنوان عامل تجزیه Put، همراه با تولید H₂O₂، بخشی از آمینواسید آزاد GABA را سنتز می‌کند (Duan et al. 2008; Shelp et al. 2012). با این وجود به دلیل سنتز Put همزمان با تخریب آن توسط آنزیم DAO میزان Put در روز اول تنش در ژنوتیپ‌ها کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشت و تنها عدم تغییر معنی‌دار مشاهده شد. الگوی تغییر H₂O₂ در ژنوتیپ متحمل در شرایط شاهد و تحت تنش سرما برخلاف فعالیت DAO بود که احتمالاً به دلیل کارایی بالاتر ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در حذف H₂O₂ توسط فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی است

۱- Hypoxia

۲- Anoxia

(Heidarvand and Maali-Amiri, 2013). این نتایج با یافته‌های (Duan et al. 2008) که گزارش کردند، تحت تنش شوری همزمان با افزایش میزان Put فعالیت آنزیم DAO افزایش یافته و میزان این پلی‌آمین با فعالیت آنزیم DAO در ارتباط است، همخوانی داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که فعالیت DAO تحت تنش سرما وابسته به غلظت Put در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما به منظور پاسخ به آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) بوده، اگرچه در ژنوتیپ متحمل با فعالیت شدیدتر این آنزیم بدلیل تجمع بیشتر Put با کاهش شدیدتر H_2O_2 همراه بود. پژوهش‌ها نشان داده که در گوجه‌فرنگی سازگار شده به سرما فعالیت DAO در رقم متحمل به طور چشمگیری در مقایسه با حساس افزایش یافت (Song et al. 2015). بنابراین افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده Put از طریق کاراتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می‌تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما نقش داشته باشد (Shelp et al. 2012). تحت تنش‌های محیطی کاتابولیسیم Put علاوه بر ایفای نقش در سازوکارهای دفاعی در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو (از جمله جوانه‌زنی، استحکام دیواره سلولی، نمو ریشه، رسیدن میوه و پیری)، شار کربن، چرخه TCA و پیام‌رسانی سلولی مشارکت دارد (Tavladoraki et al. 2012). همچنین اگرچه مسیر بیوستتر PAS نقش مهمی در تنظیم میزان این متابولیت‌ها دارد، مسیر تجزیه آنها نیز از یک سو به دلیل ارتباط با مسیرهای متابولیسمی متعدد آمینواسیدها و از سوی دیگر تولید مولکول‌های پیام‌رسان H_2O_2 و GABA در هموستازی آنها موثر است (Moschou et al. 2012). بنابراین نتایج این پژوهش، الگوی متمایز فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل و همچنین پاسخ‌های زود هنگام و دیر هنگام به سرما در نخود زراعی را نشان داده، به طوری که مطالعه فعالیت این آنزیم به‌عنوان عامل موثر در یکی از دو مسیر تولید Put و GABA در شرایط آزمایش تاییدکننده اختلافات در تجمع این متابولیت‌ها به‌عنوان شاخص‌های تحمل در برابر عوامل آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) در ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما است. قابل ذکر است که در ژنوتیپ حساس نیز تحت تنش سرما اغلب افزایش معنی‌دار میزان متابولیت‌های سلولی اندازه‌گیری شده در این پژوهش به موازات ژنوتیپ متحمل مشاهده شد. به نظر می‌رسد ژنوتیپ حساس نیز در جهت پاسخ به تنش سرما و القا مکانیسم‌های دفاعی تلاش کرده اما به دلیل نقص ظرفیت ژنتیکی و پاسخ‌گویی ناکارآمد قادر به مهار ROS نبوده لذا این چنین سلولی قادر به ادامه حیات و بقا نخواهد بود.

ژن GAD1 رمز کننده آنزیم GAD یکی از اجزای این مسیر بیوستتری در شبکه متابولیک پاسخ به تنش‌های محیطی است (Mekonnen et al. 2016). به‌منظور دستیابی به اساس مولکولی چگونگی تغییر متابولیت GABA در پاسخ به تنش سرما، بیان نسبی ژن GAD1 بررسی شد. بیان ژن GAD1 تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ حساس و متحمل به طور پیوسته افزایش یافت، به طوری که میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش سرما ۱۷ برابر در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۳-د). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱/۵ و دو برابر افزایش یافت (شکل ۳-د). این نتایج بیانگر القا موثر فعالیت ژنوم در سطح رونویسی به‌منظور آماده سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر به موازات بروز کمترین خسارت می‌باشد. همچنین میزان بیان نسبی این ژن در روز ششم تنش در

ژنوتیپ متحمل ۸/۵ برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس بود که حاکی از موثرتر بودن این مسیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در جهت القا تحمل به سرما بود. همچنین بیان این ژن با نتایج میزان GABA تحت تنش مطابقت داشت که نشان می‌دهد تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی در امتداد با تنظیم میزان متابولیت مسئول پاسخ به سرما در نخود بوده، مشاهداتی که توسط نتایج شاخص آسیب سلولی نیز تایید شد. از دست رفتن پروتئین‌های AtGAD¹ در آرآبیدوپسیس جهش‌یافته، سبب کاهش میزان GABA و پاسخ‌های دفاعی سلول در مقایسه با گیاهان معمولی (تیپ وحشی) تحت تنش‌های خشکی و شوری شد (Mekonnen et al. 2016; Zarei et al. 2017) که بیانگر نقش کلیدی مسیر تبدیل گلوتامات به GABA در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، القای این ژن در گیاهان متحمل در اثر برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها و هوموستازی سلولی نقش موثری در ایجاد الگوی پاسخ‌های سازگاری به تنش سرما ایفا می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی: ارتباط شاخص آسیب سلولی (H_2O_2) و میزان متابولیت‌های اندازه‌گیری شده (Put و GABA) در این آزمایش غیرهمسو بود، به طوری که تجمع این متابولیت‌ها در ژنوتیپ متحمل به موازات فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن GAD1 با کاهش آسیب سلولی در ارتباط بود (شکل‌های ۲ و ۳). به منظور بهبود تحمل به تنش سرما در نخود، بیوسنتز GABA توسط فعالیت مسیر بیوسنتز این متابولیت (بیان ژن GAD1) و همچنین مسیر تجزیه Put فعال‌تر می‌شوند. پاسخ‌های متمایز زود هنگام و دیر هنگام ژنوتیپ‌ها به تنش سرما بیانگر راهبرد چندگانه دفاعی سلولی نخود به تنش سرما بود. این یافته که گیاه نخود دارای تجمع بیشتر GABA به عنوان اسموپروتکتنت سلولی با کاهش میزان آسیب‌های سلولی تحمل بیشتری به تنش سرما دارد، ممکن است تغییر محتوی GABA و مسیرهای مختلف بیوسنتزی آن را به عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش متابولیکی در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای نخود پیشنهاد کند. مطالعه این فرایندها که غالباً همراه با القای سامانه‌های دفاعی خواهد بود، به درک بهتر نحوه بهبود تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد. با انجام مطالعات تکمیلی در ژنوتیپ‌های نخود به نظر می‌رسد کاربرد GABA در جهت بهبود تحمل به تنش سرما در در برنامه‌های کشاورزی پایدار نخود استفاده شود. با توجه به چالش‌های زیست‌محیطی، آثار استعمال GABA، بر عملکرد و کیفیت نخود باید به طور جامع مطالعه شود.

References

- Alcázar R, Tiburcio AF (Eds.) (2018) Polyamines: Methods and Protocols. Humana Press.
- Amiri 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 Physiol Biochem* 111, 39-49.
- Angelini R, Cona A, Federico R et al. (2010) Plant amine oxidases “on the move”: an update. *Plant Physiol Biochem* 48, 560-564.
- Ansari WA, Atri N, Singh B, Kumar P, Pandey S (2018) Morpho-physiological and biochemical responses of muskmelon genotypes to different degree of water deficit. *Photosynthetica* 56, 1019-1030.
- Barrero-Gil J, Salinas J (2013) Post-translational regulation of cold acclimation response. *Plant Sci* 205-206, 48–54.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140, 103-125.
- Cona A, Rea G, Angelini R et al. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 11, 80-88.
- 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. *J Plant Physiol* 165, 1620–1635.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48, 909–930.
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35-45.
- Guye MG, Vigh L, Wilson JM (1987) Chilling-induced ethylene production in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* spp. *J Exp Bot* 38, 680-690.
- Handa AK, Mattoo AK (2010) Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiol Biochem* 48, 540–546.
- Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR et al. (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russ J Plant Physiol* 58, 157-163.
- Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *J Plant Physiol* 170, 459-469.
- Hurry VM, Huner NPA (1991) Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol* 96,491–497.

- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Advance* 29, 300–311.
- Hyun TK, Eom SH, Jeun YC et al. (2013) Identification of glutamate decarboxylases as a γ -aminobutyric acid (GABA) biosynthetic enzyme in soybean. *Ind Crop Prod* 49, 864–870.
- Karami-Moalem S, Maali-Amiri R, Kazemi-Shahandashti SS (2018) Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiol Biochem* 122, 31–39.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R (2018) Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J Plant Physiol* 226, 123–135.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H et al. (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *J Plant Physiol* 171, 1106–1116.
- Kim TE, Kim SK, Han TJ et al. (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol Plantarum* 115, 370–376.
- Kinnersley AM, Turano FJ (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit Rev Plant Sci* 19, 479–509.
- Knight MR, Knight H (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytol* 195, 737–751.
- Lee TM, Lur HS, Chu C (1997) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci* 126, 1–10.
- Li Y, Fan Y, Ma Y et al. (2017) Effects of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. *J Plant Growth Regul* 36, 436–449.
- 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, Cobos-Porras L, Prell J et al (2016) Homospermidine synthase contributes to salt tolerance in free-living *Rhizobium tropici* and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Plant and soil* 404, 413–425.
- 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 Physiol* 127, 1781-1787.
- Madhulatha P, Gupta A, Gupta S et al. (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. *J Plant Biochem Biotechnol* 23, 151-160.
- Malekzadeh P, Khara J, Heydari R (2014) Alleviating effects of exogenous Gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiol Mol Biol Plants* 20, 133-137.
- Mekonnen DW, Flüggé UI, Ludewig F (2016) Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *A. thaliana*. *Plant Sci* 245.
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Front Plant Sci* 5, 175.
- Moschou PN, Wu J, Cona A et al. (2012) The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J Exp Bot* 63, 5003–5015.
- Nadeau P, Delaney S, Chouinard L (1987) Effects of cold hardening on the regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 84, 73-77.
- Nayyar H, Bains TS, Sanjeev K (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environ Exp Bot* 54, 275–285.
- Oh SH, Choi WG (2001) Changes in the levels of γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings. *J Plant Res* 114, 309–313.
- Palma F, Carvajal F, Jamilena M, Garrido D (2014) Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage. *Plant Physiol Biochem* 82, 161–171.
- Palma F, Carvajal F, Ramos JM et al. (2015) Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. *Postharvest Biol Tec* 99, 131-140.
- Peng H, Cheng H, Yu X et al. (2010) Molecular analysis of an actin gene, *CarACT1*, from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Biol Rep* 37, 1081.

- 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 Res* 30, e36.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T (2013) Copper containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 13, 109.
- Razmi N, Ebadi A, Daneshian J, Jahanbakhsh S (2017) Salicylic acid induced changes on antioxidant capacity, pigments and grain yield of soybean genotypes in water deficit condition. *J Plant Interact* 12, 457-464.
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R et al. (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Mol Biol Rep* 29, 848-858.
- Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP et al. (2012) Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci* 193, 130-135.
- Sheteiwy M, Shen H, Xu J et al. (2017) Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5-aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environ Exp Bot* 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.
- Tavladoraki P, Cona A, Federico R et al. (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.
- Walter HJP, Geuns JM (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiol* 83, 232-234.
- Wang C, Fan L, Gao H, Wu X, Li J, Lv G, Gong B (2014) Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiol Biochem* 82 17-26.
- Wang Y, Luo Z, Mao L, Ying T (2016) Contribution of polyamines metabolism and GABA shunt to chilling tolerance induced by nitric oxide in cold-stored banana fruit. *Food Chem* 197, 333-339.

- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011a) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181, 593–603.
- 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. *Mol Plant* 4, 663–678.
- Xing SG, Jun YB, Hau ZW, Liang LY (2007) Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiol Biochem* 45, 560-566.
- Yamamoto A, Shim IS, Fujihara S (2012) Chilling-stress responses by rice seedlings grown with different ammonium concentrations and its relationship to leaf spermidine content. *J Plant Biol* 55, 191-197.
- Yang A, Cao S, Yang Z et al. (2011) γ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chem* 129, 1619-1622.
- Yang R, Chen H, Gu Z (2011) Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean L. during germination. *J Agric Food Chem* 59, 11616-11620.
- Zarei A, Chiu GZ, Yu GH et al. (2017) Salinity-regulated expression of genes involved in GABA metabolism and signaling. *Botany*; <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0304>.
- Zarei A, Trobacher CP, Shelp BJ (2016) *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production. *Sci Rep* 6, 35115.
- Zhang X, Shen L, Li F et al. (2013) Hot air treatment-induced arginine catabolism is associated with elevated polyamines and proline levels and alleviates chilling injury in postharvest tomato fruit. *J Sci Food Agric* 93, 3245-3251.

