ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۳۳ - ۲۲۵

ارزیابی مسیر بیوسنتزی پلی‌آمین‌ها در نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرما

Evaluation of polyamine biosynthetic pathway in chickpea plants under cold stress

سعید امینی[۱]، رضا معالی امیری*[۱]، حسن زینالی خانقاه[۱]

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

Saeed Amini[1], Reza Maali-Amiri*[1], Zeinali H[1]

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

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

(تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

در بررسی نقش پلی‌آمین‌ها (PAs) در پاسخ به تنش سرما (٤ °C) در ژنوتیپ متحمل (Sel96th 11439) و حساس (ILC533) نخود (*Cicer arietinum* L.)، محتوی پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd)، اسپرمین (Spm)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوسنتز Put، آرژنین دکربوکسیلاز (*ADC*) و ارنیتین دکربوکسیلاز (*ODC*) مطالعه شد. در ژنوتیپ متحمل محتوی H_2O_2 پس از افزایش معنی‌دار در روز اول، در روز ششم تنش کاهش یافته (بیش از ٤/٧ درصد)، به‌طوری‌که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد کمتر شد، در حالی‌که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت (تا٥٠ درصد). تحت تنش سرما به موازات کاهش خسارت سلولی (H_2O_2) محتوی هر سه نوع PAs به‌ویژه Put تحت تنش سرما در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت (حداکثر تا ١١٦ درصد)، در حالی‌که در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش افزایش محتوی Put در مقایسه با ژنوتیپ متحمل کم‌تر بود (تا ١٤ درصد). بنابراین، به‌نظر می‌رسد که Put به‌عنوان محافظت کننده در پاسخ به تنش سرما در اثر خسارت القایی تنش تجمع می‌یابد. تحت تنش سرما به موازات افزایش میزان Put، محتوی Spd و Spm نیز در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت (به ترتیب حداکثر تا ٦٦ و ٦٩ درصد) به‌طوری‌که افزایش آن‌ها در ژنوتیپ متحمل بیش‌تر از ژنوتیپ حساس بود. تحت تنش سرما میزان بیان ژن *ADC* در مقایسه با شاهد در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت (حداکثر تا بیش از ٢٦ برابر) در حالی‌که میزان بیان ژن *ODC* در هر دو ژنوتیپ در مقایسه با شاهد کاهش یافت (تا بیش از ٢ برابر). نتایج نشان داد که تحت تیمارهای آزمایش افزایش بیوسنتز Put وابسته به بیان ژن *ADC* مسیری غالب در مقایسه با مسیر *ODC* در نخود است. احتمالا افزایش بیان نسبی ژن *ADC* با تولید Put باعث افزایش تحمل به تنش سرما می‌شود. بنابراین افزایش میزان پلی‌آمین‌ها (PAs) به‌ویژه Put، که احتمالا با افزایش بیان ژن *ADC* سنتز می‌شود، در بهبود تحمل به تنش سرما نخود زراعی نقش مهمی ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی

نخود
تنش سرما
پراکسید هیدروژن
پلی‌آمین‌ها

مقدمه

دمای پایین یکی از تنش‌های محیطی است که در تحقیقات به‌نژادی گیاهان زراعی در حوزه رشد، نمو و کیفیت محصولات از جمله در نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) مطالعه می‌شود (Heidarvand et al. 2011; Amini et al. 2017). کشت بهاره گیاه نخود با مخاطراتی از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل همراه است که منجر به کاهش تولید تا میزان ۴۰۰-۳۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌شود در حالی‌که کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به‌نظر می‌رسد. لیکن سرما عامل محدود کننده در توسعه کشت پاییزه نخود محسوب می‌شود (Kazemi Shahandashti et al. 2013). فرایند سازگاری به تنش وابسته به تغییر متابولیت‌ها در اثر فعال‌سازی انتقال سیگنال سرما و به دنبال تنظیم تظاهر گروه‌های متعدد ژنی توسعه می‌یابد (Heidarvand et al. 2013). پلی‌آمین‌ها (PAs[1]) اسمولیت‌هایی پلی‌کاتیونیک با وزن مولکولی کم هستند که در تقسیم، تکثیر سلول و هم‌چنین ایجاد تنوع در فرایندهای رشد و نمو مانند عملکرد کروماتین، سنتز پروتئین، استحکام ساختاری اسیدهای نوکلئیک و پویایی غشا سلولی موثرند (Handa and Mattoo 2010; Handa et al. 2018). در گیاهان PAs شامل پوتریسین (Put[2])، اسپرمیدین (Spd[3]) و اسپرمین (Spm[4]) از پیش‌ماده ارنیتین[5] یا سیترولین[6] در یک مسیر آنزیمی بیوسنتزی پشت سر هم تولید و یا تخریب می‌شوند (Madhulata et al. 2014).

پژوهش‌های متعددی به مطالعه پاسخ گونه‌های گیاهی به تنش‌های محیطی از طریق تنظیم میزان PAs و نقش آنها در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[7]) و سیگنالینگ اکسایش-احیا پرداخته‌اند (Kusano et al. 2008; Chen et al. 2018) به‌طوری‌که ارتقا میزان PAs در سازگاری به تنش در گیاهان تراریخت که در آن ژن‌های بیوسنتزکننده PAs افزایش بیان یافته، تایید کننده فرضیه مشارکت آن‌ها در پاسخ به تنش است (Gupta et al. 2013; Knight andKnight 2012). با این وجود بر اساس نوع، شدت و مدت زمان تنش در گونه‌ها و ژنوتیپ‌های گیاهی میزان تجمع PAs متفاوت بوده به‌طوری‌که میزان PAs می‌تواند در بهبود درجه تحمل تنش ایفای نقش کند (Hussain et al. 2011). پراکسید هیدروژن (H_2O_2) سیگنال مولکولی حیاتی با قابلیت مشارکت در فرایندهای فیزیولوژیک گیاهی مانند پاسخ سازگاری به تنش‌هاست (Dickinson and Chang 2011). PAs وابسته به غلظت درون سلولی و بر اساس ظرفیت ژنتیکی سلول و نوع پاسخ به تنش ممکن است تحریک کننده تولید ROS یا حذف کننده آن باشند (Saha et al. 2015). در بسیاری از موارد تولید H_2O_2 از طریق تجزیه PAs به‌عنوان یک مسیر حفاظتی در نظر گرفته شده‌است (Cona et al. 2006). از آنجا که سازوکارهای موثر در تحمل به تنش سرما در نخود زراعی به‌خوبی شناخته نشده بنابراین به‌منظور یافتن شیوه‌هایی برای ایجاد تحمل به تنش سرما در نخود، مسیرهای القایی این تنش بایستی مورد مطالعه قرار گیرد. در این رابطه مطالعه مسیر متابولیسمی PAs به‌عنوان ترکیبات ضروری موثر در بقا و حفاظت از گیاه در برابر تنش می‌تواند بسیار مهم باشد.

امروزه با استفاده از فناوری‌های نوین، با مطالعه بیان ژن‌ها می‌توان بخشی از پاسخ‌های سلول به عوامل محیطی را در سطح ترانسکریپتوم شناسایی کرد. گیاهان برای سازگاری و دستیابی به پاسخ مناسب در برابر تغییرات محیطی با برنامه‌ریزی مجدد ژنوم بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های مسیر بیوسنتز Put یعنی آرژنین دکربوکسیلاز (*ADC*) و ارنیتین دکربوکسیلاز (*ODC*) را تغییر داده (Palma et al. 2015) که نهایتا منجر به تغییرات متابولیسم مسیر بیوسنتز Put و میزان پلی‌آمین‌ها تحت تنش سرما می‌شوند. بنابراین هدف این پژوهش مطالعه تاثیر تنش سرما بر ژنوتیپ‌های حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th 11439) نخود کابلی بر اساس شاخص خسارت اکسیداتیو مانند H_2O_2، محتوی PAs (Put، Spd و Spm) و بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوسنتز Put یعنی *ADC* و *ODC* است. بررسی ارتباط احتمالی بین منابع ایجاد خسارت تنش و عوامل مختلف دفاعی سلول به

[1] Polyamines (PAs)
[2] Putrescine
[3] Spermidine
[4] Spermine
[5] Ornithine
[6] Citroline
[7] Reactive oxygen species

شناخت بیش‌تر نحوه ایجاد تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود کابلی Sel96th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) که از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شده بودند، استفاده شد. بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵ درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب‌مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳°C به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها 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°C و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها به اتاقک رشد با دمای ٤°C (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) منتقل شدند و نمونه‌گیری در روز اول (٢٤ ساعت) پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام گیاه) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) انجام شد. نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۳°C نیز انجام گرفت. بنابراین در این پژوهش اثر سه نوع تیمار دمایی و در دو ژنوتیپ متحمل و حساس و در مجموع ٦ نمونه با سه تکرار بررسی شد.

میزان ۰/۳۵ گرم نمونه تازه گیاهی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس پنج میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید یک درصد (محلول در حمام یخ) به تیوب اضافه شد و تیوب‌ها تا یکنواخت‌شدن نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤°C با سرعت ۱۲۰۰۰ ×g سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار پدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰ nm اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova. 2001). سنجش کمی پلی‌آمین‌ها به روش Hugo and Jan (1987) انجام شد. ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در ۲ میلی‌لیتر محلول پرکلریک اسید (PCA[1]) چهار درصد حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوهپتان[2] (پنج میلی‌گرم در لیتر از اسیدکلریدریک ۲ نرمال) هموژنیزه شد. پس از یک ساعت قرارگیری در ٤°C، از فیلتر (پالایشگر) ٤٥ درصد میکرونی عبور داده شد. بر روی دو دهم میلی لیتر از این محلول، یک میلی‌لیتر بافر کربنات با pH= ۹ و یک میلی‌لیتر محلول دانسیل‌کلراید[3] (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 ٤۰۰ میکرولیتر تولوئن به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و پس از سانتریفوژ g × ۵۰۰ به مدت ۲ دقیقه فاز آلی برداشته و این محلول برای ارزیابی PAs توسط HPLC استفاده شد.

به‌منظور ارزیابی کمی پلی‌آمین‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی به ستون Chrompack-Nederland از نوع فاز معکوس .CC.P microsphere به طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۳ میلی‌متر متصل به دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 ساخت انگلستان تزریق شد. فاز شستشو (متحرک) شامل مخلوط استونیتریل با خلوص بسیار بالا و آب دیونیزه به‌ترتیب به نسبت ۷۲ به ۲۸ حجم به حجم بود که با سرعت ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه حرکت آن با سامانه ایزوکراتیک انجام شد. دتکتور این دستگاه از نوع UV و در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از نمونه‌های استاندارد برای تعیین وجود هر یک از PAs و تعیین غلظت آن‌ها استفاده می‌شود.

استخراج RNA کل سلول توسط روش ترایزول از ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگی خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط

[1] Perchloric acid (CLO_4H)
[2] 1,7-diaminoheptane
[3] Dansyl chloride

الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 18S و 28S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰nm استفاده شد.

سپس RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شدند. تیوب‌ها در ۸۰°C- نگه‌داری شدند. پنج میکرو لیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگودی‌تی (یک 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 ٤ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C 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 ٤۲°C قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند.

به‌منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار *Actin1* بر روی cDNA ساخته شده (پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل یک درصد آگارز استفاده شد، که اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار مطابقت داشت (bp ۱۸۹). میزان ۱۱٤۵ نانوگرم بر میکرولیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن‌های *ADC* و *ODC* و همچنین ژن خانه‌دار *Actin1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. در جدول ۱ توالی آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار ارائه شده‌است. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، ۳ میکرولیتر آب‌مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز 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، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای ۹٤°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ٦۰°C (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST[1] استفاده شد (Pfaffl et al. 2001).

این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS9.2، آزمون مقایسهٔ میانگین به روش دانکن انجام شد.

[1] Relative expression software tool

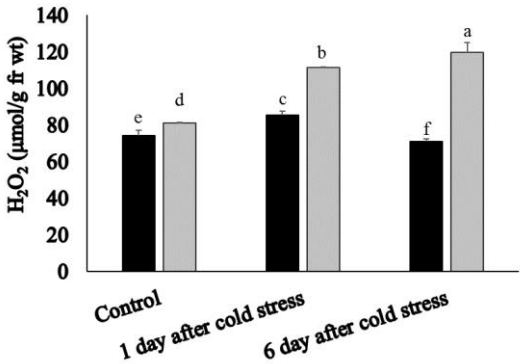
جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (qPCR) تحت تنش سرما.

Accession number	Gene	Protein	Sequence (5´-3´)
XM_004507452.2	*ADC*	Arginine decarboxylase	F: GTAGGGCCATTGTGTCTCAT R: GAGAGCCCTTCTCCCAAATAC
XM_004500845.2	*ODC*	Ornithine decarboxylase	F: CACTCATTGGTACACTAGCTTCA R: GACTCGGATTTACACGGGTTAG
EU529707.1	*Actin 1*	Actin 1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT

نتایج و بحث

تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر محتوی PAs (Put، Spd و Spm)، H_2O_2 و بیان ژن‌های آرژنین دکربوکسیلاز (*ADC*) و ارنیتین دکربوکسیلاز (*ODC*) (p <۰/۰۱) وجود داشت (جدول ۲) که بیانگر تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها در القا پاسخ‌های فیزیولوژیکی بیوشیمیایی و مولکولی بود.

یکی از شاخص‌های مهم در تعیین خسارت سلولی، میزان تجمع H_2O_2 است (Sun et al. 2018)، به طوری‌که تحت تنش سرما در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس کمتر بود (بیش از ۵۹ درصد). در ژنوتیپ متحمل محتوی H_2O_2 پس از افزایش معنی‌دار در روز اول، در روز ششم تنش کاهش یافته (بیش از ٤/۷ درصد)، به طوری‌که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد کمتر شد، در حالی‌که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت (تا ۵۰ درصد) (شکل ۱).



شکل۱- تغییر میزان H_2O_2 در ژنوتیپ‌های حساس ILC533 (ستون روشن) و متحمل Sel96th11439 (ستون تیره) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل شرایط شاهد (23°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (٤°C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

این نتایج از یک سو آثار مثبت پاسخ‌های دفاعی را نشان داده و از سوی دیگر مشخص نمود که در نخود درجه تحمل به تنش سرما احتمالا یک صفت مبتنی بر ژنوتیپ است. بخشی از سازگاری به تنش به دنبال کاهش میزان ROS سلولی در اثر افزایش میزان PAs ایجاد می‌شود (Li et al. 2017). به‌منظور بررسی چنین فرضیه‌ای میزان PAs تحت تیمارهای دمایی در ژنوتیپ‌های انتخابی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در شرایط شاهد و تحت تنش، محتوی PAs در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. میزان Put تحت تنش در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت اما این افزایش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی‌دار بود. در ژنوتیپ متحمل محتوی Put در مقایسه با شاهد با یک افزایش نسبی در روز اول و افزایش ۱۱٦ درصد در روز ششم تنش مواجه شد در حالی‌که در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش افزایش محتوی Put در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بسیار کمتر بود (تا ١٤ درصد) (شکل ۲- الف). این یافته‌ها با نتایج آزمایش، در گیاهان زراعی که در آن‌ها تحت تنش سرما محتوی Put آزاد افزایش یافته، هماهنگ بود (Zhang et al. 2013). بنابراین به نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی‌داری بین میزان خسارت سرما (نتایج H_2O_2) و افزایش میزان Put وجود داشته، که با نتایج Kim et al. (2002) در مورد اسپری‌پاشی Put بر برگ‌های گوجه‌فرنگی که سبب افزایش پایداری غشا تحت تنش سرما شده، همخوانی دارد. PAs با اتصال به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را خنثی کرده و یا طی تجزیه توسط آمین‌اکسیدازها، H_2O_2 را از طریق حذف سوپراکسیدها در مسیر تخریب PAs تولید می‌کند (Groppa and Benavides 2008) به طوری‌که در ایجاد تحمل سرما و حفظ هوموستازی سلول نقش حیاتی ایفا می‌کند.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بررسی شده در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود زراعی در سطوح مختلف تنش سرما

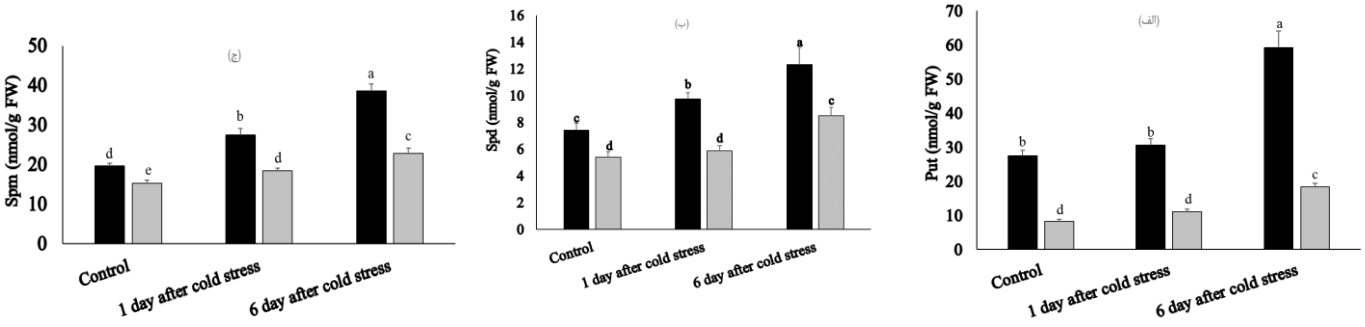
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		Put	Spd	Spm	H_2O_2	*ADC gene*	*ODC gene*
ژنوتیپ	۱	۳۱٦٦/۲۲**	٤۷/۱٤**	٤۲۷/۳۹**	۳۳۲۷/٦٤**	۳۱۸/۷۸**	۰/۲۱
دما	۲	۷٦۸/۵۱**	۲٤/۸۷**	۲٦٤/۷۲**	۷٤۸/۹۸**	۳۹۵/۰٦**	۱۳/۲۳**
ژنوتیپ × دما	۲	۲۳۰/۵٤**	۱۱/٦۹**	٤۸/۷۸**	٦٦٤/۸۸**	۱۲۲/٤۹**	۰/۱٤
خطا	۱۲	۵/۵۳	۰/٤۸	۱/٦۳	۱	۲/۷۳	۰/۰٦۲
ضریب تغییرات (٪)		۹/۱	۸/٤۵	۵/٤۱	۱/۱	۱۹/۰۹	۱٦/۳۵

بنابراین با توجه به هم‌زمانی افزایش Put و کاهش معنی‌دار خسارت H_2O_2 در روز ششم تنش مخصوصا در ژنوتیپ متحمل این فرضیه که PAs می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، ROSها را حذف‌کنند، تایید می‌شود (Gupta et al. 2013). افزایش نسبی میزان H_2O_2 در پاسخ‌های زودهنگام و کاهش معنی‌دار آن در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل (شکل ۱) بیانگر نقش پیام‌رسانی H_2O_2 در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی می‌باشد که با افزایش میزان Put و سایر اجزا سیستم دفاعی در این پژوهش مطابقت دارد.

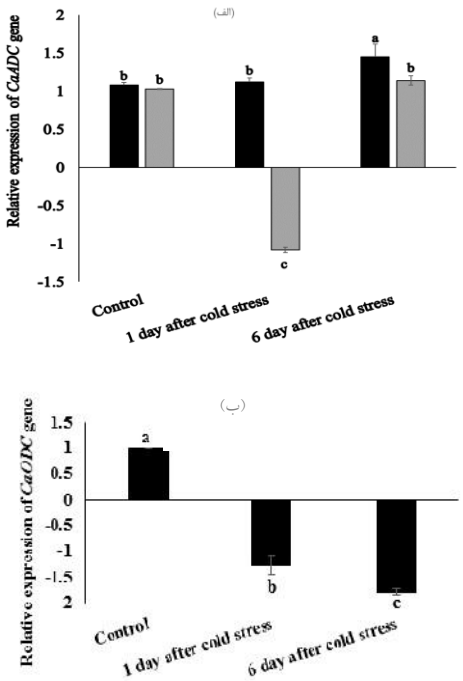
در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل محتوی Spd تحت تنش در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری (به‌ترتیب تا ۵۷ و ٦٦ درصد) داشت. محتوی Spd طی تنش در ژنوتیپ متحمل تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ حساس داشته و در روز اول تنش ٦٦ درصد و در روز ششم تنش ٤٥ درصد در مقایسه با ژنوتیپ حساس بیش‌تر بود (شکل ۲–ب). مطالعه اثر Spd در گیاهان زراعی تحت تنش نقش آن را در القا بیان چندین گروه ژن مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، احیا اکسیداسیونی[1]، انتقال سیگنال و بیوسنتز هورمون‌ها نشان می‌دهد (Cheng et al. 2012). گزارش‌ها نشان داده که آسیب ناشی از تنش شوری در گیاهان زراعی با اسپری‌پاشی Spd به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (Yin et al. 2015). به‌نظر می‌رسد که Spd در همکاری با سایر متابولیت‌ها و اجزا سیستم دفاعی می‌تواند در القا درجه تحمل به تنش سرما در نخود فعالیت داشته باشد، نتایجی که از هماهنگی تغییر الگوی Spd با Put پیش بینی می‌شود.

محتوی Spm طی تنش در ژنوتیپ متحمل به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود، به طوری‌که بیش‌ترین افزایش میزان آن در روز ششم و به میزان ٦٩ درصد بود (شکل ۲–ج). بنابراین در امتداد با افزایش میزان Put و Spd، تغییر میزان Spm نیز احتمالا در القا پاسخ‌های دفاعی گیاه نخود فعالیت کرده که نتیجه آن کاهش شاخص‌های خسارت سلولی بود. در آرابیدوپسیس تراریخت شده با ژن اسپرمین سینتاز بدون تغییر محتوی Put و Spd، میزان Spm تا سه برابر افزایش یافت که متعاقب آن رونویسی از فاکتورهای رونویسی، کینازها، پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتید (DNA و RNA) و ژن‌های موثر در پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش زیستی افزایش یافت (Gonzalez et al. 2011). بنابراین افزایش معنی‌دار میزان Spm در همکاری با سایر متابولیت‌ها احتمالا می‌تواند در بهبود درجه تحمل گیاه به تنش سرما نقش داشته باشد. نکته جالب آن است که تحت تنش سرما میزان هر سه نوع PAs در ژنوتیپ حساس نیز همانند ژنوتیپ متحمل افزایش نشان داد. به‌نظر می‌رسد افزایش محتوی PAs در ژنوتیپ حساس بیانگر تلاش سلول حتی در این ژنوتیپ برای نجات و حفاظت از ساختارهای خود و بازگشت به شرایط معمول فیزیولوژیکی است.

[1] Oxidation reduction



شکل۲– تغییر محتوی پلی‌آمین‌های پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd)، اسپرمین (Spm) در ژنوتیپ‌های حساس ILC533 (ستون روشن) و متحمل Sel96th11439 (ستون تیره) و نخود تحت تیمارهای دمایی شامل شرایط شاهد (23°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (٤°C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.



شکل۳- الگوی بیان ژن آرژنین دکربوکسیلاز (*ADC*) (الف) و ارنیتین دکربوکسیلاز (*ODC*) (ب) در ژنوتیپ‌های حساس ILC533 (ستون روشن) و متحمل Sel96th11439 (ستون تیره) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل شرایط شاهد (23°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (٤°C).

افزایش میزان خسارت‌ها و عدم توانایی سلول در حذف آن‌ها تاییدکننده ناکافی بودن مسیر متابولیسم PAs به موازات ضعف دیگر سامانه‌های دفاعی موثر در تحمل به تنش سرما در ژنوتیپ حساس است. گیاهان متحمل در روز اول تنش محتوی PAs غنی‌تری در مقایسه با ژنوتیپ حساس داشتند به طوری‌که حتی این میزان در مقایسه با میزان PAs در پاسخ دیرهنگام ژنوتیپ حساس بیش‌تر بود که نشان دهنده نقش زمان و شدت پاسخ‌های سلولی و تعیین کننده درجه تحمل بالاتر گیاه متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس بود. با توجه به اینکه Put در مقایسه با سایر PAs نقش مهم‌تری در ایجاد تحمل به سرما در گیاهان مختلف دارد (Song et al. 2015)، بنابراین به‌منظور دستیابی به اساس مولکولی چگونگی تغییرات PAs در پاسخ به تنش سرما، میزان بیان نسبی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های موثر در بیوسنتز Put بررسی شد. بیان ژن *ADC* تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ حساس و متحمل به‌طور پیوسته افزایش یافت، به طوری‌که میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش سرما بیش از ۲٦ برابر در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۳- الف). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به‌ترتیب بیش از چهار و هشت برابر افزایش یافت. هم‌چنین میزان بیان نسبی این ژن در روز ششم تنش در ژنوتیپ متحمل سه برابر بیش‌تر از ژنوتیپ حساس بود که حاکی از ظرفیت ژنتیکی ناکارامد ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل در جهت القا تحمل به سرما بود. همچنین بیان این ژن با نتایج محتوی Put تحت تنش مطابقت داشت، که نشان می‌دهد این ژن احتمالا بیوسنتز Put را تنظیم کرده و مسئول پاسخ به سرما در سطح رونویسی است.

بررسی بیان ژن *ODC* نشان می‌دهد که بیان این ژن تحت تنش سرما در ژنوتیپ‌های نخود به‌طور پیوسته تا بیش از سه برابر کاهش یافت (شکل ۳-ب). افزایش بیان ژن *ADC* در مقایسه با کاهش بیان ژن *ODC* تحت تنش سرما تایید می‌کند که *ADC* مسئول پاسخ به تنش سرما بوده، در حالی‌که *ODC* احتمالا در پاسخ به تنش سرما تحت تیمارهای آزمایش نقشی ندارد. چنین نتایجی نشان می‌دهد که افزایش بیان *ADC* از طریق تجمع محتوی Put سبب تحمل سرما در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس شده‌است. این نتایج توسط گزارشات پیشین در آرابیدوپسیس تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی (Cuevas et al. 2008; Mitsuya et al. 2009) و در برنج تحت تنش‌های شوری و خشکی (Alcazar et al. 2010; Do et al. 2013) و هم‌چنین در تلقیح ذرت با قارچ پاتوژن بایوتروف *Ustilago maydis* (Rodríguez-Kessler et al. 2008) تایید می‌شود. در برخی پژوهش‌ها بیان هر دو ژن *ADC* و *ODC* تحت تنش افزایش نشان داده است (Zhang et al. 2011, 2013; Song et al. 2015). از طرف دیگر در ژنوتیپ حساس آرابیدوپسیس تحت تنش شوری القای کم *ADC2* توسط *ODC1* جبران شده، در حالی‌که در ژنوتیپ متحمل هر دو مسیر تحت تنش شوری فعال می‌شوند (Rodriguez-Kessler et al. 2006). بنابراین نتایج پژوهش در نخود نشان داد که تحت تنش سرما بیوسنتز Put وابسته به *ADC* پاسخ مطلوب‌تری نسبت به مسیر *ODC* دارد. بنابراین نقش غالب مسیر ADC در مقایسه با مسیر ODC در سنتز Put و دیگر PAs

مانند Spd و Spm از طریق تجمع این متابولیت‌ها باعث افزایش تحمل به تنش سرما شده‌است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور خلاصه تغییر میزان پلی‌آمین‌ها (PAs) به‌ویژه Put، که احتمالا بیش‌تر توسط افزایش بیان ژن *ADC* سنتز می‌شود، در تحمل به تنش سرما مخصوصا در ژنوتیپ متحمل نقش ایفا می‌کند. محتوی Spd در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل در روز اول و ششم به میزان کمی افزایش یافته که نشان می‌دهد Spd احتمالا متابولیتی حدواسط در مسیر بیوسنتز Put و Spm خصوصا در پاسخ دیرهنگام ژنوتیپ متحمل نخود به سرما باشد. این بدان معناست که در پاسخ دیرهنگام نخود به تنش سرما متابولیسم چرخه بیوسنتز به شدت فعالیت می‌کند تا آثار نامطلوب تنش را حذف کند. در ژنوتیپ متحمل کمترین میزان H_2O_2 همراه با بیش‌ترین محتوی PAs و بیان نسبی ژن *ADC* در روز ششم تنش سرما مشاهده شد، که بیانگر نقش احتمالی PAs در کاهش خسارت سلولی در این ژنوتیپ است. نکته جالب آن است که در ژنوتیپ متحمل محتوی PAs حتی در روز اول تنش نیز بیش‌تر از محتوی آن در ژنوتیپ حساس بود که بیانگر نقش زمان و شدت پاسخ‌های متابولیکی بود و احتمالا تعیین کننده درجه تحمل این دو ژنوتیپ به تنش سرما است. با این وجود مطالعات بیشتری برای تعیین نقش شبکه‌های متابولیکی- مولکولی در پاسخ به تنش سرما در نخود زراعی در زمینه نحوه تنظیم PAs مورد نیاز است. مسیر بیوشیمیایی PAs می‌تواند به‌عنوان هدفی ایده‌ال در به‌نژادی تحمل به تنش سرما و بهبود عملکرد محصولات زراعی استفاده شود.

منابع

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Tiburcio A F (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta 231:1237-1249.

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

Chen J, Fang J, Guo Z, Lu S (2018) Polyamines and antioxidant defense system are associated with cold tolerance in centipedegrass. Frontiers of Agricultural Science and Engineering 5:129-138.

Cheng L, Sun RR, Wang FY, Peng Z, Wu J, Kong FL, Wu J, Cao JS, Lu G (2012) Spermidine affects the transcriptome responses to high temperature stress in ripening tomato fruit. Journal of Zhejiang University Science B 13:283-297.

Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends in Plant Science 11:80-88.

Cuevas JC, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Ferrando A (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. Plant Physiology 148:1094-1105.

Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochemical Pharmacology 64:1019-1026.

Do PT, Degenkolbe T, Erban A, Heyer AG, Kopka J, Köhl KI, Zuther E (2013) Dissecting rice polyamine metabolism under controlled long-term drought stress. PLoS One 8:e60325.

Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34:35-45.

Gupta K, Dey A, Gupta B (2013) Plant polyamines in abiotic stress responses. Acta Physiologya Plantarum 35:2015-2036.

Handa AK, Fatima T, Mattoo AK (2018) Polyamines: Bio-Molecules with diverse functions in plant and human health and disease. Frontiers in Chemistry 6:10.

Handa AK, Mattoo AK (2010) Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:540-546.

Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology 58:157-163.

Heidarvand L, Maali-Amiri R (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress. Acta Physiologia Plantarum 32:419-431.

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.

Hugo JP, Jan MC (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. Plant Physiology 83:232-234.

Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. Biotechnology Advance 29:300-311.

Kim TE, Kim SK, Han TJ, Lee JS, Chang SC (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of

cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). Physiologya Plantarum 115:370-376.
Knight MR, Knight H (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. New Phytologist 195:737-751.
Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta 228:367-381.
Li Y, Fan Y, Ma Y, Zhang Z, Yue H, Wang L, Jiao Y (2017) Effects of exogenous γ- aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. Journal of Plant Growth Regulation 36:436-449.
Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology 127:1781-1787.
Madhulatha P, Gupta A, Gupta S, Kumar A, Pal RK, Rajam MV (2014) Fruit-specific over-expression of human S-adenosylmethionine decarboxylase gene results in polyamine accumulation and affects diverse aspects of tomato fruit development and quality. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 23:151-160.
Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, Takahashi H, Kusano T (2009) Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. Journal of Plant Physiology 166:626-643.
Palma F, Carvajal F, Ramos JM, Jamilena M, Garrido D (2015) Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. Postharvest Biology and Technology 99:131-140.
Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 30:e36.
Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF (2008) Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. Plant Physiology and Biochemistry 46:805-814.
Shahandashti SSK, Amiri RM, Zeinali H, Ramezanpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Molecular Biology Reports 40:893-903.
Song Y, Diao Q, Qi H (2015) Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. Plant Gowth Regulation 75:21-32.
Sun C, Liu L, Lu L, Jin C, Lin X (2018) Nitric oxide acts downstream of hydrogen peroxide in regulating aluminum-induced antioxidant defense that enhances aluminum resistance in wheat seedlings. Environmental and Experimental Botany 145:95-103.
Walters D (2003) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. New Phytologist 159:109-115.
Yin L, Wang S, Tanaka K, Fujihara S, Itai A, Den X, Zhang S (2015) Silicon-mediated changes in polyamines participate in silicon-induced salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. Plant Cell Environment 39:245-258.
Zhang X, Shen L, Li F, Meng D, Sheng J (2013) Hot air treatment-induced arginine catabolism is associated with elevated polyamines and proline levels and alleviates chilling injury in postharvest tomato fruit. Journal of Science Food Agriculture 93:3245-3251.