

## پاسخ‌های زودهنگام ترانسکریپتوم نخود زراعی به تنش سرما

یاسین خالدیان<sup>۱</sup>، رضا معالی امیری<sup>۲\*</sup>، رحمت محمدی<sup>۳</sup>، نیتین مانتری<sup>۴</sup>

۱ - به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳- استادیار موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ۴- دانشیار، دانشگاه RMIT، ملبورن.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۸)

## چکیده

در این مطالعه، پاسخ‌های ترانسکریپتوم دو ژنوتیپ نخود متحمل (Sel96th11439) و حساس (ILC533) به تنش سرمای کوتاه مدت (چهار درجه سانتی‌گراد پس از ۲۴ ساعت)، به کمک روش RNA-seq بررسی شد. تحت تنش سرما، محتوی پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون چربی‌های غشا و نشأت الکترولیتی غشا در گیاهان حساس در مقایسه با گیاهان متحمل، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با گیاهان شاهد (بدون تنش سرما)، ۵۲۶ ژن، تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند، به‌طوری که ۲۶۱ و ۲۶۵ ژن، به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار داشتند. در ژنوتیپ حساس در مقایسه با گیاهان شاهد (بدون تنش سرما)، ۹۰۱ ژن تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند که ۲۹۵ و ۶۰۶ ژن، به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار داشتند. نتایج نشان داد که ژن‌های دارای بیان کاهشی، فراوانی بیشتری در مقایسه با ژن‌های دارای بیان افزایشی در هر دو ژنوتیپ داشتند. همچنین تعداد ژن‌های دارای بیان کاهشی ژنوتیپ حساس، ۲/۳ برابر در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود. بیان ۲۱۶ ژن در ژنوتیپ متحمل افزایش یافت در حالی که این ژن‌ها در ژنوتیپ حساس کاهش بیان داشتند که تقریباً ۱۵ درصد آن‌ها، ژن‌های فاکتور رونویسی بودند. بر اساس الگوهای رونوشت شناسایی شده، بیان ژن‌های مسیر سنتز برخی متابولیت‌ها در ژنوتیپ متحمل، افزایش و در ژنوتیپ حساس، کاهش یافت. تحت تنش سرما، ۳۱ ژن در ژنوتیپ حساس افزایش و در ژنوتیپ متحمل کاهش بیان نشان دادند که ژن‌های مولد هیستون‌ها، تقریباً ۱۰ درصد این ژن‌ها بودند. نتایج این مطالعه بیانگر نقش تعیین‌کننده پاسخ‌های زودهنگام، به‌خصوص فاکتورهای رونویسی و تغییرات اپی ژنتیکی در تحمل به تنش سرما در نخود بود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، توالی‌یابی، پاسخ سرما، نخود زراعی، RNAseq.

## Transcriptome profiling of the early-response in chickpea to cold stress

Yasin Khaledian<sup>1</sup>, Reza Maali-Amiri<sup>2\*</sup>, Rahmat Mohammadi<sup>2</sup>, Nitin Mantri<sup>3</sup>

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, 2. Dryland Agricultural Research Institute, Ministry of Jihad-e-Agriculture Research and Education Organization, Maraghe, 3. School of Science, RMIT University, Melburn, Australia.

(Received: May 20, 2019 - Accepted: July 9, 2019)

## ABSTRACT

In this study, transcriptome responses of cold-tolerant (Sel96Th11439) and cold-sensitive (ILC533) chickpea genotypes were evaluated under short-term cold stress (4°C). The hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lipid peroxidation (MDA) and electrolyte leakage content increased significantly under cold stress in sensitive more than tolerant plants. In tolerant genotype, 526 genes showed significant expressions; 261 and 265 genes were up-and down-regulated, respectively, while in sensitive genotype, 901 genes showed significant patterns of expression; 295 and 606 genes showed increases and decreases in their expressions, respectively. In both genotypes and under cold conditions, the down-regulated genes had more frequencies than up-regulated genes. Also, the down-regulated genes in sensitive plants were 2.3-fold compared to tolerant ones. 216 genes, which were up-regulated in tolerant plants, showed decreased expression in sensitive plants under cold stress, among which 15% were transcription factors. Based on identified transcript patterns, those genes involved in biosynthetic pathway of some metabolites were significantly increased in tolerant genotype whereas they were decreased in sensitive genotype. The level of transcript in 31 genes showed significant increase and decrease in sensitive and tolerant genotypes, respectively and 10% of these genes were histone producer. Findings indicate the crucial role of early responses, particularly transcription factors and epigenetic changes in cold tolerance in chickpea seedlings.

**Keywords:** Chickpea, cold responses, gene expression, RNAseq, sequencing.

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

## مقدمه

در تحمل به سرما و انتقال این صفات، منجر به افزایش تحمل به سرما و در نتیجه افزایش سطح زیر کشت نخود در مناطق با آب و هوای سرد می‌شود. بر این اساس، ارقام نخود سارال، آتا، آتا، نصرت و سعید، به‌عنوان ارقام متحمل به سرما در مناطق سردسیر و ارقام منصور، عادل، آزاد، هاشم، ثمین و آرمان، در مناطق معتدل و گرم کشت می‌شوند. با این وجود، برخی از این ارقام معرفی شده، با چالش‌هایی روبه‌رو بوده‌اند که لزوم پژوهش‌های بیشتر در جهت معرفی ارقام جدید را ضروری می‌سازد. به‌طور مثال، اگرچه رقم سارال از تحمل مطلوبی به سرما برخوردار است اما دانه ریز است که موجب کاهش تقاضا برای کشت و بازاریابی آن شده است.

پاسخ گیاهان به تنش سرما به دو گروه زود هنگام و دیر هنگام دسته‌بندی می‌شود (Schade *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2010). پژوهش‌های پیشین نشان داده است که روش‌های اندازه‌گیری سریع و کوتاه مدت می‌تواند نتایج قابل اعتماد و موثری تولید نماید و در غربال‌گری سریع مواد گیاهی تحت تنش سرما مفید باشد. این پاسخ‌ها، بیانگر سرعت پاسخ‌دهی و آمادگی گیاه است و عامل تعیین کننده در چگونگی ارائه پاسخ‌های دیر هنگام می‌باشد (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013)، بنابراین به زنده‌مانی گیاه در تنش‌های طولانی مدت کمک خواهد کرد (Hannah *et al.*, 2005). تنش سرما سبب افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> (ROS) مانند پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در گیاهان می‌شود و بدین ترتیب، بروز تنش اکسیداتیو<sup>۲</sup> را به‌عنوان یک تنش ثانویه در پی دارد که سبب القا پراکسیداسیون چربی‌های غشایی (MDA<sup>۳</sup>) و نشت الکترولیتی غشا (ELI<sup>۴</sup>) می‌شود. با وجود اثرات مخرب، ROSها به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان ثانویه<sup>۵</sup>، در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله پاسخ به تنش‌های سلولی شناخته شده‌اند. این‌که ROSهای سلولی به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان عمل کنند و یا این‌که موجب

سرما یکی از عوامل اصلی محدود کننده تولید در گیاهان زراعی محسوب می‌شود. با توجه به این‌که گیاهان، قابلیت جابه‌جا شدن ندارند و نمی‌توانند محل زندگی خود را تغییر دهند، از طریق تغییر در الگوی بیان ژن‌ها که منجر به فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود، به تنش سرما پاسخ می‌دهند. گیاهان حساس، تحت تنش سرما خسارت می‌بینند، در حالی‌که گیاهان متحمل، قابلیت سرما سازگاری نشان می‌دهند (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). نخود زراعی با نام علمی *Cicer arietinum* L. سومین گیاه لگوم با اهمیت در دنیا می‌باشد. تعداد کم کروموزوم ( $2n=2x=16$ )، اندازه ژنوم نسبتاً کوچک (۷۴۰ Mb)، خودگشن بودن و چرخه تکثیر نسبتاً کوتاه، نخود را به گیاهی مناسب برای مطالعات ژنتیکی تبدیل کرده است. با توجه به مزایای تغذیه‌ای و غنی سازی خاک، امروزه نخود در ۵۲ کشور جهان، به‌ویژه در نواحی خشک و نیمه خشک کشت می‌شود (Varshney *et al.*, 2009). کشت بهاره این گیاه در نواحی خشک و نیمه خشک سبب شده است تا محصول، در معرض تنش خشکی و گرمای انتهای فصل قرار گیرد و با کاهش عملکرد همراه باشد. از طرفی در کشت زود هنگام پاییزه و زمستانه، با دسترسی مطلوب‌تر به آب، میزان محصول تا بیش از دو برابر افزایش می‌یابد. در نتیجه، راهکار تغییر فصل کاشت از بهار به پاییز، نه تنها راهکاری در مقابله با تنش‌های خشکی انتهای فصل محسوب می‌شود، بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی، عملکرد محصول به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد (Yadav *et al.*, 2006; Habibpour *et al.*, 2012). با این وجود، حساسیت گیاه نخود به تنش سرما، به‌عنوان مهم‌ترین چالش در کشت‌های پاییزه و زمستانه مطرح شده است. بنابراین، اجرای برنامه‌های به‌نژادی تحمل به تنش سرما در جهت درک سازوکارهای دخیل در تحمل، راهبردی مهم در افزایش عملکرد این گیاه می‌باشد (Heidarvand *et al.*, 2011). شناسایی فرایندهای موثر

<sup>۴</sup> Electrolyte leakage index

<sup>۵</sup> Secondary messengers

<sup>۱</sup> Reactive oxygen species

<sup>۲</sup> Oxidative stress

<sup>۳</sup> Malondialdehyde

معنی دار داشتند. به علاوه، این ژن‌ها متعلق به گروه فاکتورهای رونویسی، ژن‌های مرتبط با فسفریلاسیون، متابولیت‌های ثانویه، هورمون‌ها، کیتین‌ها و پروتئین کینازها بودند. با این وجود، تاکنون در خصوص بررسی ترانسکریپتوم تحت تنش سرما در نخود زراعی که سطح کشت زیادی در کشور دارد، پژوهشی انجام نشده است. در تحقیق حاضر و در راستای شاخص‌های فیزیولوژیکی بیوشیمیایی، پاسخ کل ترانسکریپتوم گیاه نخود زراعی متحمل و حساس به تنش سرما، با استفاده از تکنولوژی RNAseq بررسی شد. این مطالعه، چشم‌انداز جدیدی را برای پاسخ مولکولی به تنش سرما در نخود مشخص خواهد کرد. در خصوص ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌های نخود تحت شرایط مزرعه و گلخانه تحقیقات گسترده ای توسط مولفین این مقاله انجام شده است (Heidarvand *et al.*, 2011; Heidarvand and Maali-*Amiri*, 2013; Rakei *et al.*, 2016). نتیجه این تحقیقات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، شناسایی یک ژنوتیپ کاندید برای تحمل به سرما بوده است. کشت پاییزه این ژنوتیپ در چند ناحیه، بیانگر تحمل مطلوب این ژنوتیپ به سرما و بهبود عملکرد در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر نخود بوده است. بنابراین، پژوهش حاضر که برنامه‌ریزی ژنومی این ژنوتیپ را تحت تنش سرما نشان می‌دهد، شروع تحقیقات در زمینه تحمل به سرمای نخود نیست، بلکه تایید کننده نتایج گذشته نیز خواهد بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و شرایط آزمایش

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل دو ژنوتیپ نخود کابلی Sel96th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) که از موسسه تحقیقات دیم مراغه تهیه شدند و فاکتور دوم شامل تیمارهای دمایی در دو سطح شامل تنش سرما و شاهد بود. بذرها با هیپوکلیت سدیم ۲/۵ درصد و به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر، بر روی

خسارت اکسیداتیو به سلول‌ها شوند، بستگی به تعادل در تولید ROS و سیستم‌های حفاظتی و حذف کننده آن دارد که در اثر فعالیت ژن‌ها ایجاد می‌شوند (Wu *et al.*, 2014).

درک سازوکارهای مولکولی فعال و شناسایی ژن‌های کاندید تحمل به سرما، پیش‌نیاز روش‌های اصلاح مولکولی و مهندسی ژنتیک تحت تنش سرما تلقی می‌شود (Heidarvand & Maali-*Amiri*, 2010; Heidarvand & Maali-*Amiri*, 2013). تاکنون ژن‌های متعددی به کمک روش‌های مولکولی، در پاسخ به تنش‌های محیطی در گیاه نخود شناسایی شده‌اند اما هنوز پژوهش‌های انجام شده برای درک سازوکارهای مولکولی تحت تنش سرما قابل توجه نیستند. با استفاده از روش دورگ‌گیری افتراقی<sup>۱</sup>، تعداد ۱۰۱ رونوشت پاسخ‌دهنده به تنش دهیدراسیون در گیاه نخود شناسایی شدند (Boominathan *et al.*, 2004). همچنین ۲۱۰ ژن در پاسخ به تنش سرما در گیاه نخود، با استفاده از تکنیک ریزآرایه<sup>۲</sup> شناسایی شدند (Mantri *et al.*, 2007). اگرچه این مطالعات تا حدودی به درک ما از پاسخ به تنش سرما در گیاه نخود کمک می‌کند، اما به دلیل عدم دسترسی به ژنوم/ترانسکریپتوم رفرنس در نخود، اطلاعات ارائه شده محدود است و در بررسی پاسخ کل ژنوم از طریق تغییر بیان ژن، محدودیت داشته‌اند. دسترسی به اطلاعات ذکر شده در نخود و روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS)<sup>۳</sup>، امکان مطالعه کل ترانسکریپتوم را در بافت و زمان خاص فراهم کرده است (Garg *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2013). توانایی روش توالی‌یابی RNA (RNA-seq)<sup>۴</sup> برای تعیین تعداد رونوشت‌های کل ژنوم، در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است (Pertea *et al.*, 2016)؛ بنابراین استفاده از روش RNA-seq می‌تواند به درک بیشتر ما از پاسخ گیاه نخود به تنش سرما کمک کند. Garg *et al.* (2015) پاسخ نخود دسی را در پنج ساعت اول تنش سرما، با استفاده از تکنیک RNAseq و پلت فرم Illumina بررسی کردند. نتایج نشان داد که ۴۱۴۵ ژن در پاسخ به تنش سرما بیان

<sup>3</sup> Next generation sequencing

<sup>4</sup> RNA sequencing

<sup>1</sup> Subtractive hybridization

<sup>2</sup> Microarray

### اساس مالون دی آلدئید

میزان پراکسیداسیون ژنوتیپ‌های نخود، بر اساس تجمع مالون دی آلدئید برگ و با استفاده از تیوباربتوریک اسید تعیین شد (Heath & Packer, 1968). میزان ۳۰۰ میلی گرم نمونه برگی در پنج میلی لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار Tris-Hcl، pH=۷/۶ حاوی NaCl) کوبیده شد تا یک محلول یکنواخت به دست آید. سپس سه میلی لیتر از این محلول با دو میلی لیتر محلول تیوباربتوریک اسید، حاوی اسید تری کلرواستیک در لوله آزمایش مخلوط شد و در حمام آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفوژ با  $g \times 12000$  و به مدت ۱۰ دقیقه، چگالی نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160, Japan) تعیین شد. غلظت مالون دی آلدئید، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد که در آن، D: چگالی و E: ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر  $10^5 \times 1/56$ ) است.

$$C = D/E$$

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

میزان ۸۰ میلی گرم برگ نخود، به لوله آزمایش حاوی ده میلی لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب، هوای درون محیط با استفاده از پمپ خلا خارج شد و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab، آلمان) خوانده شد و میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC2) پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) و ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر تعیین شد و در نهایت، میزان شاخص خسارت، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Popov *et al.*, 2005)

$$I = EC1/EC2 * 100$$

آزمایش توالی‌یابی RNA-Seq

استخراج RNA به کمک روش با یوزول<sup>۱</sup>

بررسی کمی و کیفیت RNA توسط نانودراپ، ژل

کاغذ صافی، در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها منتقل شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، با نور ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و هشت ساعت شب و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم، گیاهچه‌ها به اتاقک رشد با دمای چهار درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در بررسی پاسخ‌های زودهنگام گیاه نخود، چهار نمونه جهت توالی‌یابی ارسال شد که از هر نمونه، سه تکرار (شامل سه تکرار بیولوژیک) در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری در روز اول تنش سرما (۲۴ ساعت پس از شروع تنش) انجام گرفت و نمونه‌گیری برای آزمایش‌های فیزیولوژیکی و اندازه‌گیری های RNasec، به صورت جداگانه ولی همزمان صورت گرفت.

استخراج و سنجش فعالیت پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

میزان ۰/۳۵ گرم نمونه برگ، با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس پنج 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 شدند. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده، به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، با سرعت  $g \times 12000$  سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰ nm اندازه‌گیری شد (Loreto & Velikova 2001).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون سلولی بر

<sup>1</sup> Biozol

درجه پاسخ ژنوتیپ‌ها به تنش سرما بود که این مساله، بیانگر ظرفیت ژنتیکی ژرم‌پلاسم نخود تحت شرایط محیطی می‌باشد (شکل ۱A).

غلظت مالون‌دی‌آلدهید، به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو وارد شده به چربی‌های غشای تنش سرما اندازه‌گیری شد. اختلاف معنی‌داری بین غلظت مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در دو ژنوتیپ تحت تنش سرما مشاهده شد. نتایج نشان داد که پراکسیداسیون غشا در هر دو ژنوتیپ با کاهش دما افزایش یافت و در ژنوتیپ حساس در تیمار تنش سرما، بعد از یک روز، به حداکثر مقدار (با میانگین ۴/۲۳ میکرومول در گرم وزن تر) رسید (شکل ۱B). کمترین میزان غلظت مالون‌دی‌آلدهید نیز در ژنوتیپ متحمل در تیمار شاهد مشاهده شد. تولید مالون‌دی‌آلدهید، حاصل تجزیه زنجیره چربی‌های غیر اشباع در اثر فعالیت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی تحت تنش سرما رخ می‌دهد (Nejadsadeghi *et al.*, 2014). توانایی یک ژنوتیپ برای ایجاد تعادل بین آنزیم‌های تبدیل‌کننده اسید چرب اشباع به غیر اشباع، عامل مهمی در کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و در نتیجه افزایش تحمل به سرما است که با توجه به نتایج، ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس، درجه تحمل بالاتری نشان داد.

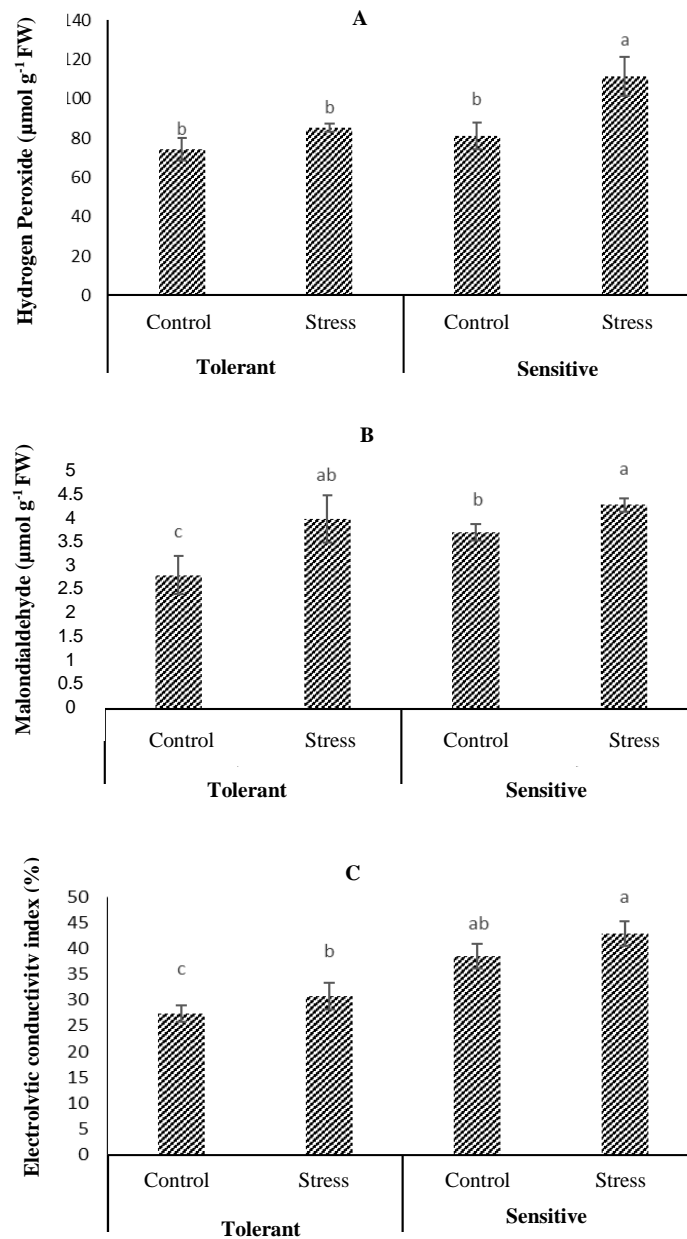
ژنوتیپ‌های نخود از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، به‌طوری‌که بیشترین درصد نشت الکترولیتی را ژنوتیپ حساس (۴۲/۹ درصد) در تنش سرما به خود اختصاص داد و ژنوتیپ متحمل نیز در تیمار شاهد کمترین میزان (۲۷/۴ درصد) نشت را نشان داد (شکل ۱C). با کاهش دما، میزان نشت الکترولیت در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت اما شیب افزایش نشت در دو ژنوتیپ متفاوت بود که احتمالاً ناشی از تفاوت آن‌ها در میزان تحمل به دماهای پایین است. این امر نشان می‌دهد که در شرایط تنش، سرعت نشت الکترولیت در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس، کمتر بود. افزایش در نشت الکترولیت‌ها تحت تنش سرما، در اثر اختلال در ساختار غشای سلولی می‌باشد که حاصل این تغییرات، کاهش سیالیت و انسجام غشاها و غیر فعال شدن آن می‌باشد (Heidarvand & Maali-Amiri, 2010).

آگارز و Bioanalyser انجام شد. برای توالی‌یابی از Ion Proton استفاده شد و توالی‌هایی با طول ۶۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز، تولید شدند. کیفیت خوانش‌ها (reads) توسط QC-Ion-torrent suite & quadtrium مورد بررسی قرار گرفت و Mapping توالی‌ها به‌وسیله TopHat (v 2.1.1) (Trapnell *et al.*, 2009) و Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) و با استفاده از ژنوم مرجع نخود (Varshney *et al.*, 2013) انجام شد. توالی پروتئوم نخود موجود در پایگاه داده NCBI به‌عنوان مرجع برای ارزیابی سرهم‌بندی استفاده شد.

شناسایی ژن‌های با تغییر بیان (DEGs) از طریق محاسبه تعداد قطعات نقشه‌یابی شده یک رونوشت خاص در بین کتابخانه‌های مختلف صورت گرفت و برای نرمال‌سازی از تکنیک Trimmed mean TMM (Robinson and McCarthy, 2010) استفاده شد. شمارش خوانش‌ها به‌وسیله HTSEQ (Anders *et al.*, 2014) و مقایسه بیان ژن توسط برنامه برخط EdgeR و با استفاده از نرم‌افزار R 3.5 (Robinson *et al.*, 2010) انجام شد. همچنین برای شناسایی ایزوفرم‌ها با بیان مختلف، از Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010) استفاده شد.

## نتایج و بحث

بررسی الگوی تغییر ROS (در این مطالعه محتوی  $H_2O_2$ )، احتمالاً برخی از سازوکارهای تحمل به تنش سرما را در گیاه نخود مشخص کرده است. همچنین میزان  $H_2O_2$  می‌تواند نشان‌دهنده درجه آسیب ایجاد شده توسط تنش سرما نیز باشد (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). تنش سرما بر الگوی تغییر  $H_2O_2$  تاثیر داشت، به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل آن‌ها مشاهده شد. بیشترین میزان  $H_2O_2$  (۱۱۱/۴ میلی‌گرم بر وزن تر) در شرایط تنش، در ژنوتیپ حساس و کمترین مقدار آن، در ژنوتیپ متحمل در تیمار شاهد (۷۴/۳۴ میلی‌گرم بر وزن تر) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین  $H_2O_2$  تجمع یافته در ژنوتیپ حساس، بین دو تیمار شاهد و تنش مشاهده شد، درحالی‌که در ژنوتیپ متحمل، این اختلاف معنی‌دار نبود. این نتایج نشان‌دهنده تفاوت در



شکل ۱- تغییر میزان پراکسید هیدروژن (A)، مالون‌دی‌آلدهید (B) و نشت الکترولیتی غشا (C) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 و حساس ILC533 نخود در تیمارهای دمایی آزمایش شامل شرایط شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و روز اول تنش سرما (چهار درجه سانتی‌گراد). حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها، بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 1. Hydrogen peroxide (A), malondialdehyde (B) and electrolyte leakage index (ELI) (C) changes in cold-tolerant (Sel96th11439) and cold-sensitive (ILC533) chickpea genotypes grown under normal conditions (23°C and 1 day after cold stress at 4°C). Different letters on bars represent statistically significant differences based on Duncan's multiple range tests.

تنش سرما در ژنوتیپ‌های نخود مفید باشند و از طرف دیگر، بررسی این شاخص‌ها در بسیاری موارد ممکن است به‌طور غیرمستقیم، میزان فعالیت سیستم‌های

نتایج مطالعات فیزیولوژیکی بیوشیمیایی نشان داد که شاخص‌های خسارت سلولی، از یک طرف ممکن است به‌عنوان نشانگری آگاهی‌بخش در ارزیابی تحمل به

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بیان ژن، به کمک RNAseq نشان داد که تحت تنش سرما، در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با گیاهان شاهد (بدون تنش سرما)، ۵۲۶ ژن تغییر بیان معنی‌دار داشتند، به طوری که ۲۶۱ و ۲۶۵ ژن، به ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار داشتند (جدول ۱).

دفاعی گیاه را نیز نشان دهند. بنابراین و بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد که سیستم‌های دفاعی گیاهان متحمل در مقایسه با گیاهان حساس، پاسخ‌های مطلوب‌تری به تنش سرما نشان دادند. به منظور بررسی چنین فرضیه‌ای، الگوی ترانسکریپتوم این دو ژنوتیپ تحت تنش سرما، به کمک تکنولوژی RNA-seq بررسی شد.

جدول ۱- پاسخ ژن‌های بررسی شده تحت تنش سرما در ژنوتیپ متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC 533) نخود زراعی.  
Table 1. Response of genes expression in tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC 533) genotypes under cold stress.

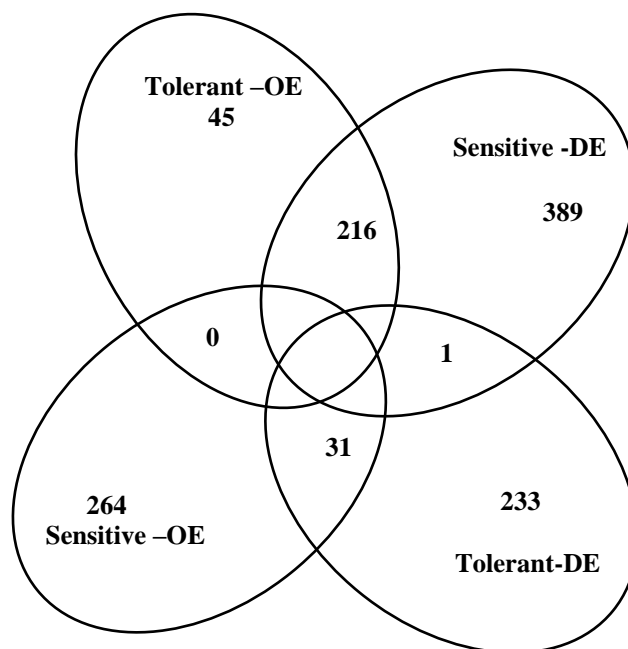
Genotypes	Gene numbers	Modified genes number	Up-regulated genes	Down-regulated genes
Sel96Th11439	15924	526	261	265
ILC 533	15595	901	295	606

ژنوتیپ ILC533 متمایز بوده است که گویای نوعی پاسخ اولیه تحمل به تنش سرما می‌باشد. چنین نتایجی، به وجود تنوع و ظرفیت ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی نخود تحت تنش سرما اشاره کرده است؛ تفاوت‌هایی که احتمالاً به تمایز پاسخ‌ها در میزان خسارت‌های سلولی منجر شده است (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). بنابراین در بسیاری از موارد، کاهش بیان ژن در ژنوم، دلیل بر خسارت و اختلال در فرآیند نیست. از آن‌جا که تحت تنش سرما، میزان انرژی سلول در اثر کاهش سوخت و ساز و فتوسنتز کاهش می‌یابد، سلول در جهت صرفه‌جویی در مصرف انرژی، تنها به تولید پروتئین‌هایی اقدام می‌کند که در جهت افزایش توان دفاعی و کاهش خسارت فعالیت می‌کنند. بنابراین کاهش بیان اغلب ژن‌های غیر ضروری تحت تنش، پاسخی هوشمندانه سلول در نظر گرفته می‌شود (Kundu et al., 2018).

در مقایسه ژن‌های تغییر بیان یافته در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل، تنها یک ژن با بیان کاهش‌یافته مشترک وجود داشت. از تفاوت‌های بارز ژنوتیپ متحمل و حساس، الگوی بیان متمایز آن‌ها در پاسخ‌های زودهنگام می‌باشد، به طوری که ژنوتیپ متحمل، پاسخ‌های زودهنگام مطلوبی به تنش سرما نشان داد.

تحت چنین شرایطی در ژنوتیپ حساس، ۹۰۱ ژن تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند که ۲۹۵ و ۶۰۶ ژن، به ترتیب افزایش و کاهش بیان معنی‌دار داشتند. بنابراین ژن‌های با بیان کاهش‌یافته، فراوانی بیشتری در مقایسه با ژن‌های با بیان افزایش‌یافته در هر دو ژنوتیپ نخود داشتند (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد که تنش سرما احتمالاً سبب کاهش سوخت و ساز و فعالیت سلول‌ها در گیاهچه نخود شده است؛ پاسخ‌های مولکولی که منجر به اختلال در فتوسنتز و کاهش تنفس می‌شود. چنین پاسخ‌هایی می‌توانند به عنوان ویژگی گیاهان حساس به تنش سرما از جمله نخود معرفی شوند (Longo et al., 2017).

در مطالعات اخیر، بالاتر بودن فراوانی ژن‌های با بیان کاهش‌یافته تحت تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش سرما در بادام (Mousavi et al., 2014)، تنش دهیدراسیون در سویا (Belamkar et al., 2014) و تنش خشکی در *Haloxylon ammodendron* (Long et al., 2014) گزارش شده است. نتایج مطالعه Wu et al. (2014) بر روی *Ammopiptanthus mongolicus* تحت تنش سرما و خشکی نشان داد که با طولانی شدن زمان تنش، فراوانی ژن‌های با بیان کاهش‌یافته افزایش می‌یابد. با این وجود، نتایج پژوهش در نخود نشان داد که پاسخ‌های تحمل در ژنوتیپ Sel96Th11439 در مقایسه با



شکل ۲- ژن‌های تغییر بیان یافته در ژنوتیپ‌های حساس (ILC533) و متحمل (Sel96Th11439) نخود زراعی تحت تنش سرما. ژن‌های با بیان افزایشی در ژنوتیپ متحمل (Tolerant-OE)، ژن‌های با بیان افزایشی در ژنوتیپ حساس (Sensitive-OE)، ژن‌های با بیان کاهش‌ی در ژنوتیپ متحمل (Tolerant-DE) و ژن‌های با بیان کاهش‌ی در ژنوتیپ حساس (Sensitive-DE) نمایش داده شده است.

Figure 2. Differential gene expression in chickpea tolerant and sensitive genotypes under cold stress. Up-regulated genes in tolerant and sensitive genotypes (Tolerant-OE and Sensitive-OE, respectively) and Down-regulated genes in tolerant and sensitive genotypes (Tolerant-DE and sensitive-DE, respectively) have been shown.

در پاسخ به تنش سرما، قبلاً گزارش شده است (Ray و CBF2, CBF1, *et al.*, 2011; Priya & Jain, 2013) CBF3 متعلق به دمن‌های<sup>۲</sup> خانواده AP2/ERF متصل به DNA هستند و خانواده‌های AP2، در پاسخ به تنش-های غیر زیستی نقش دارند (Liu *et al.*, 1998; Mizoi *et al.*, 2012). پروتئین‌های Zinc-finger باعث تحمل به تنش‌های غیر زیستی می‌شوند (Davletova *et al.*, 2005). به‌علاوه چندین TF از خانواده‌های NAC و MYB در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در گیاهان شناسایی شده‌اند (Nakashima *et al.*, 2012; Bhattacherjee & Jain, 2013). تغییر بیان TFs برنامه‌ریزی دوباره ترانسکریپتوم در ژنوتیپ متحمل ممکن است در درک و انتقال پیام تنش سرما و فعال-سازی مسیرهای دفاعی دخالت داشته باشد و منجر به سازگاری گیاه و حفاظت در برابر تنش سرما شود. چنین

برای مشخص شدن نحوه پاسخ مطلوب ترانسکریپتوم نخود، ژن‌هایی که در یک ژنوتیپ، افزایش و در ژنوتیپ دیگر، کاهش بیان داشتند بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تحت تنش، ۲۱۶ ژن در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان یافتند، درحالی‌که در ژنوتیپ حساس، بیان این ژن‌ها کاهش یافت (شکل ۲). از جمله ژن‌هایی که در پاسخ‌های اولیه گیاه، تغییر بیان داشتند، گروه ژن‌های فاکتورهای رونویسی (TF<sup>۱</sup>) و ژن‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی هستند (Usadel *et al.*, 2008; Garg *et al.*, 2015). میزان ۱۳/۷ درصد ژن‌هایی که در ژنوتیپ متحمل و حساس، به‌ترتیب افزایش و کاهش بیان نشان داشتند، از گروه TFs، شامل فاکتورهای رونویسی NAC، Zinc finger، WRY، APR، bHLH130 و MYB بودند. نقش مهم TFs در پاسخ به تنش‌های غیر زنده و همچنین تغییر بیان آن‌ها

<sup>2</sup> Domains

<sup>1</sup> Transcription factor



رشد همچنان می‌تواند ادامه یابد. با این وجود، در این تحقیق، طول دوره سرمادهی کوتاه بود؛ بنابراین اگر دوره تنش طولانی و شدت آن کاهش یابد، احتمالاً طول ساقه ژنوتیپ متحمل، تغییراتی نشان خواهد داد، به طوری که طول ساقه در ژنوتیپ متحمل بیشتر خواهد شد.

آنزیم‌های مسیر لیگنین و تولید متابولیت‌های ثانویه نیز در ژنوتیپ متحمل و حساس، به ترتیب افزایش و کاهش بیان داشتند. آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوید که منجر به تولید ترکیبات فنلی می‌شود، از جمله نخستین پاسخ‌های گیاهان به شرایط تنش می‌باشند (Wen *et al.*, Khaledian & Maali-Amiri, 2015). متابولیت‌های ثانویه و از جمله این ترکیبات گفته شده، در تحمل و سازگاری به تنش‌های غیر زیستی نقش دارند (Jain 2013; Davies *et al.*, 2018). از میان ژن‌های دفاعی، ژن *Cinnamoyl-CoA reductase* از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز لیگنین است. سنتز لیگنین در دیواره سلولی می‌تواند باعث تقویت دیواره سلولی در مقابله با تنش‌های زیستی و غیر زیستی شود (Khaledian & Maali-Amiri, 2015; Wen *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2017). ژن *Glycine-rich cell wall protein* نشان داد که با افزایش سنتز لیگنین در ژنوتیپ متحمل و کاهش آن در ژنوتیپ حساس، احتمالاً مسیر متابولیتی گیاه به سمت تقویت دیواره سلولی سوق می‌یابد.

ژن *putative 12-oxophytodienoate reductase* که در سنتز متابولیت‌های مسیر اکسی‌لیپین نقش دارد (Schaller *et al.*, 2000) نیز در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. تجزیه و تحلیل موتاسیون‌ها در آرابیدوپسیس نشان داد که اکسی‌لیپین به عنوان مولکول پیام‌رسان در گیاه فعالیت می‌کند و در تحمل به تنش نقش دارد (Böttcher & Pollmann, 2009; Grebner *et al.*, 2013).

افزایش بیان ژن‌های *Pathogenesis-related protein Dehydrin DHN3-like* شامل *Cationic peroxidase 2-related protein PR-4-like Peroxidase P7-like*، *Cationic peroxidase 2-like* و *Polygalacturonase* و *Polyphenol oxidase like*

پاسخ‌های زود هنگام گیاهان متحمل تحت تنش سرما، اغلب از گیاهان حساس متمایز است و مرتبط با درک و پیام‌رسانی جهت القای بیان ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسمی، دفاعی و فتوسنتز می‌باشد (Garg *et al.*, 2015). افزایش بیان غیر معنی‌دار  $H_2O_2$  در ژنوتیپ متحمل، احتمالاً می‌تواند عاملی در فعالیت مسیر سیگنالینگ تنش سرما و القای ژن‌های پاسخ به تنش باشد. افزایش بیان ژن‌های فاکتور رونویسی، تایید کننده این نتایج می‌باشد. با این وجود، به علت توان ژنتیکی محدود در ژنوتیپ حساس، افزایش معنی‌دار  $H_2O_2$  نتوانست سبب القا فعالیت این مسیرها و پاسخ‌های تنش شود، به طوری که چنین سلولی، قادر به مهار ROS نیست و بقا آن تضمین نمی‌شود.

نتایج نشان داد که ژن‌های دخیل در مسیر سنتز هورمون‌ها، در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس، کاهش بیان داشتند. ژن‌های *Ethylene-responsive transcription factor* (در مسیر سنتز اتیلن) (Stockinger *et al.*, 1997) و *indole-3-acetic acid* (Caarls *et al.*, 2017) و *Auxin-induced protein* و *induced protein ARG2* (در مسیر سنتز اکسین) از آن جمله هستند (Jain & Khurana, 2009; Shi *et al.*, 2017). هورمون‌های اتیلن، سالیسیلیک اسید (SA) و آبسیزیک اسید (ABA) در درک و تنظیم پاسخ به تنش سرما نقش دارند (Atici & Nalbantoglu, 2003). همچنین، پیشنهاد شده است که برهم‌کنش بین ABA، اکسین و اتیلن برای سازگاری یک بافت خاص یا کل گیاه به تنش‌های محیطی، بسیار مهم است. اکسین در افزایش طول ساقه نقش دارد؛ به طوری که کاهش بیان ژن‌های مسیر متابولسیم اکسین ممکن است با کاهش طول ساقه در ژنوتیپ حساس تحت تنش سرما در ارتباط باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که طی تنش سرما، رشد و نمو ژنوتیپ حساس احتمالاً محدود شود (Park & Han, 2003). افزایش بیان ژن‌های مسیر هورمون‌های ذکر شده، بیانگر نوعی سازگاری نسبی در ژنوتیپ متحمل می‌باشد. بر این اساس و تحت چنین شرایطی، به دلیل فعالیت بیشتر سازوکارهای دفاعی، گیاه دچار خسارت اکسیداتیو نمی‌شود؛ بنابراین شرایط

متابولیت‌ها در مسیر لیگنین نیز این نتایج را تایید می‌کند. احتمالاً افزایش استحکام دیواره سلولی، بخشی از سازوکار نخود برای افزایش تحمل به سرما است. ژن‌های *Galactinol-sucrose galactosyltransferase*، *Sugar transport protein* و *Sugar transporter* که در مسیر کربوهیدرات‌ها نقش دارند، در ژنوتیپ متحمل و حساس، به ترتیب افزایش و کاهش بیان نشان دادند. کربوهیدرات‌های محلول، علاوه بر نقش اسمولیت‌های سازگار برای گیاه، می‌توانند انرژی مورد نظر گیاه را طی دوره تنش سرما تامین کنند. مسیرهای سیگنالینگ قند نیز فرآیندهای سازگاری گیاه به سرما را تنظیم می‌کنند. قندها غلظت اسمولیت‌های درون سلولی را افزایش و در نتیجه نقطه انجماد سیتوپلاسم را کاهش می‌دهند. در کلروپلاست نیز نشاسته به وسیله بتا آمیلاز در تولید مالتوز، هیدرولیز می‌شود (Kaplan et al., 2004). سازگاری به تنش، فرایند پیچیده‌ای است و سیگنال‌دهی کربوهیدرات‌ها در این مسیر، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند (Rekarte-Cowie et al., 2008). با تغییر میزان قندها در شرایط تنش، گیاهان می‌توانند از آن‌ها در سیگنال‌دهی مربوط به تنظیم رشد و نمو استفاده کنند. به‌طور مثال، ساکارز باعث القای پروموتور *COR78*<sup>1</sup> شده است (Rekarte-Cowie et al., 2008). موتانت *gin6* گلوکز در آرابیدوپسیس، از بیان فاکتور رونویسی *ABI4* که در مسیر پاسخ به ABA نقش دارد جلوگیری می‌کند (Arenas-Huertero et al., 2000). در فرآیند سرما سازگاری، کربوهیدرات‌ها از جمله ساکارز و رافینوز در گیاهان تجمع می‌یابند؛ بنابراین ژن‌های متابولیسم کربوهیدرات‌ها با توجه به نقشی که در ساخت، متابولیسم و انتقال کربوهیدرات‌ها دارند، به دمای پایین پاسخ می‌دهند (Kaplan & Guy, 2004; Rekarte-Cowie et al., 2008; Shahryar & Maali-Amiri, 2016) و به عنوان سیگنال مولکولی می‌توانند بیان برخی ژن‌های *COR* مانند *Beta-amylase* را تنظیم کنند (Kaplan & Guy, 2004). از ژن‌های مهم دیگر در مسیر کربوهیدرات‌ها، ژن *Beta-glucosidase 24-like* است که در ژنوتیپ

*inhibitor* که جزء سیستم دفاعی محسوب می‌شوند نیز در ژنوتیپ متحمل مشاهده شد. پژوهش‌ها نشان داده که دهیدرین‌ها (DHNs) به عنوان تنظیم کننده‌های اسمزی و همچنین به‌عنوان حذف کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعالیت دارند (Hara et al., 2003). همچنین DHNs، احتمالاً به عنوان ناقلان یونی فعالیت می‌کنند و آسیب‌های غشایی جدی ناشی از افزایش غلظت یون‌ها در طول تنش دهیدراسیون در سیتوپلاسم را کاهش می‌دهند (Hara et al., 2005). القای ژن‌های *Pathogenesis-related protein* نیز در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی گزارش شده است (Seki et al., 2002) اما به دلیل پیچیدگی پاسخ‌های گیاهی تحت تنش سرما، نقش آن‌ها کاملاً مشخص نیست. *Cationic peroxidases* که به عنوان ژن‌های *Pathogenesis-related protein* شناسایی شده‌اند، طی تنش سرما در ژنوتیپ متحمل القا می‌شوند و در تحمل به تنش سرما نقش دارند (Llorente et al., 2002).

دو ایزوform ژن *Gluthatione S-transferase (GST)* در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان داشتند. اعتقاد بر این است که این ژن، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش دارد. در آرابیدوپسیس در پاسخ به تنش سرما و شوری، دو رونوشت *GST* افزایش بیان داشتند و در همان حال، سه رونوشت *GST* کاهش بیان نشان دادند. به‌نظر می‌رسد که تغییرات متفاوت ایزوform‌های این ژن، امکان بروز طیفی از پاسخ‌ها را در برابر تنش فراهم می‌سازد (Seki et al., 2002).

ژن‌های دخیل در سنتز و افزایش استحکام دیواره سلولی مانند *Expansin-like A2* و *Cellulose synthase-like protein E1* در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داشتند. نقش فیزیکی و ضخامت دیواره سلولی گیاهان در تحمل به تنش سرما به اثبات رسیده است (Abuqamar et al., 2009; 2014; Yin et al., 2009).

<sup>1</sup> Cold-responsive

سرما کمک می‌کند (Gigon et al., 2004; Upchurch, 2008). انتقال گیاهان به دمای صفر تا چهار درجه سانتی‌گراد، باعث تغییر در ترکیبات لیپیدی و سیالیت غشا می‌شود (Somerville & Browse, 1996) و منجر به تغییر در بیان ژن‌هایی می‌شود که خصوصیات فیزیکی غشایی پلاسمایی را تغییر می‌دهند. تولید سیب‌زمینی و *E. coli* تراریخته با ژن *delta-12 acyl lipid desaturase* باعث افزایش اسیدهای چرب غیراشباع بیشتر و بهبود تحمل به تنش سرما شده است (Maali et al., 2007; Maali et al., 2010).

تغییرات پس از ترجمه<sup>۱</sup> نقش اساسی در تعیین عملکرد و پایداری پروتئین‌ها دارند. فسفریلاسیون، یکی از مهم‌ترین تغییرات پس از ترجمه است که موجب انتقال پیام در تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Tanaka et al., 2012; Liu et al., 2013; Osakabe et al., 2013). افزایش ژن‌های مرتبط با فسفریلاسیون در ژنوتیپ متحمل و کاهش آن‌ها در ژنوتیپ حساس در روز اول تنش سرما، احتمالاً با توانایی بیشتر ژنوتیپ متحمل در درک تنش‌های محیطی در ارتباط است.

در این آزمایش و تحت تنش سرما، ۳۱ ژن به‌طور معنی‌داری در ژنوتیپ حساس، افزایش بیان و در ژنوتیپ متحمل، کاهش بیان داشتند؛ هیستون‌ها تقریباً ۱۰ درصد از این ژن‌ها بودند. همچنین ژن *SNF2 domain-containing protein* بدون تغییر معنی‌دار در ژنوتیپ متحمل، در ژنوتیپ حساس افزایش بیان یافت. تغییر معنی‌دار در بیان هیستون‌ها و ژن‌های دخیل در فرآیندهای اپی‌ژنتیکی و فراساختار کروموزومی، احتمالاً تا اندازه‌ای بیانگر پاسخ زود هنگام ژنوتیپ حساس به تنش سرما می‌باشد.

تعداد ژن‌هایی که در روز اول تنش سرما در ژنوتیپ متحمل و حساس کاهش بیان نشان دادند، به ترتیب ۲۶۵ و ۶۰۶ ژن بودند که نشان می‌دهد فعالیت ژن‌های ژنوتیپ حساس را در مقایسه با ژنوتیپ متحمل، ۲/۳ برابر کاهش یافته است. این تفاوت در بیان، احتمالاً تا اندازه‌ای به تغییر ساختار کروماتین، در نتیجه بیان ژن‌های هیستون و ژن‌های *SNF2 domain-*

متحمل و حساس، به ترتیب افزایش و کاهش یافت. با این وجود، ژن *Beta-glucosidase 12-like* با افزایش در ژنوتیپ متحمل و عدم تغییر معنی‌دار در ژنوتیپ حساس همراه بود؛ این دو ژن، دی‌ساکاریدها را به مونوساکارید تبدیل می‌کنند. احتمالاً ژنوتیپ متحمل ترجیح می‌دهد که از مونوساکاریدها به عنوان اسمولیت برای تحمل به سرما استفاده کند. در تحقیقات مختلف، القای ژن‌های *Beta-glucosidase* تحت تنش غیرزنده گزارش شده است (Seki et al., 2002; Khazaei et al., 2015). این پروتئین باعث آزادسازی گلوکز از ABA-*glucose* می‌شود، به طوری که ABA از حالت غیر فعال، به فعال تبدیل می‌شود و بنابراین می‌تواند بیان ژن‌های دفاعی را فعال کند (Sun et al., 2015).

نکته جالب آن است که ژن *alpha-trehalose-phosphate synthase* که در ساخته شدن ترهالوز نقش دارد، در ژنوتیپ حساس افزایش بیان و در ژنوتیپ متحمل کاهش بیان معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ حساس در تنش سرما، بیشتر از فرم قندی ترهالوز به عنوان اسمولیت استفاده می‌کند، در حالی که ژنوتیپ متحمل، تمایل کمتری به استفاده از ترهالوز به عنوان اسمولیت در شرایط تنش سرما نشان می‌دهد. قبلاً کاهش بیان ژن ترهالوز در ژنوتیپ متحمل نخود (Mantri et al., 2007) گزارش شده است. بیان این نکته ضروری است که ژن *Probable alpha-trehalose-phosphate synthase* رفتار معکوسی تحت تنش سرما در این آزمایش نشان داد که بیانگر نقش ایزوفرم‌های متفاوت ژن‌های ترهالوز در شرایط تنش سرما است.

در مسیر سنتز لیپید، بیان ژن‌های *Fatty acid desaturase 4* و *Fatty acyl-CoA reductase 3-like* افزایش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدهید و نشأت الکترولیتی غشا به موازات افزایش معنی‌دار  $H_2O_2$  در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل، تاییدکننده فعالیت محدود ژن‌های دخیل در حفظ ساختار غشا از جمله دساتورازها می‌باشد. افزایش بیان ژن‌هایی که در سنتز لیپیدها و فسفولیپیدها نقش دارند، به پایداری غشا تحت تنش

<sup>1</sup> Post-translational modifications

شده بود، تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم می‌تواند احتمالاً تایید کننده نتایج پژوهش‌های گذشته در این ژنوتیپ‌ها باشد. نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل با برنامه‌ریزی مجدد ژنومی، پاسخ‌های مطلوبتری به تنش سرما در مقایسه با ژنوتیپ حساس ارائه می‌دهد که می‌تواند منجر به بهبود درجه تحمل به سرما شود. ارزیابی شاخص‌های خسارت که نشانگر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این تحقیق معرفی می‌شوند، تایید کننده این نتایج می‌باشد. نتایج RNA-seq نشان داد که فاکتورهای رونویسی، بیشترین تاثیر را در پاسخ زود هنگام به تنش سرما در گیاه نخود دارند، به طوری که فاکتورهای رونویسی، بیشترین درصد ژن‌هایی بودند که در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان داشتند. همچنین تعداد زیادی از ژن مرتبط با سیستم‌های دفاعی، کربوهیدرات‌ها، متابولیت‌های ثانویه، دیواره سلولی، هورمون‌ها و فتوسنتز، در ژنوتیپ متحمل افزایش و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان دادند. به نظر می‌رسد که بخشی از عدم توانایی تحمل به تنش سرما در ژنوتیپ حساس، در اثر تغییرات کروماتینی و اپیژنتیکی بوده است که این نتیجه، از تعداد زیاد هیستون‌های بیان شده و ژن‌های دخیل در مسیر اپیژنتیکی قابل استنباط است. پیشنهاد می‌شود که به دلیل اهمیت فاکتورهای رونویسی در پیام رسانی و القای بیان ژن‌های دفاعی، تحقیقات آینده تحمل نخود به سرما، روی فاکتورهای رونویسی انجام شود. شناسایی فرآیندهای تحمل به سرما و انتقال ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما، منجر به افزایش تحمل به سرما و در نتیجه افزایش سطح زیر کشت این گیاه در مناطق با آب و هوای سرد می‌شود.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از زحمات مرحوم آقای دکتر رحمت محمدی، دانشجوی با اخلاق و پرتلاش اینجانب است که بدین وسیله ضمن سپاس و قدردانی و یاد آن عزیز، برای ایشان آموزش و علو درجات از خداوند بزرگ خواستارم.

*containing protein* وابسته است. *SNF2* که از خانواده *helicase-like proteins* است، در بازآرایی مجدد کروماتین نقش دارد و تنظیم ساختار کروماتین، امکان تنظیم ژن‌های موجود در DNA را فراهم می‌کند (Ryan & Owen-Hughes, 2011). گزارش شده است که تغییرات اپیژنتیک در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرما در نخود نقش دارد (Tan, 2010; Kumar et al., 2012; Mastan et al., 2012; Rakei et al., 2015). همچنین ژن‌های درگیر در سنتز دیواره سلولی مانند *Patellin-6-like*، *Proteins WALLS* و *ARE THIN Protein trichome birefringence-like* (Ranocha et al., 2010) در ژنوتیپ متحمل و حساس، به ترتیب کاهش و افزایش بیان نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که تقویت دیواره سلولی، یکی از سیستم‌های دفاعی فعال در ژنوتیپ حساس تحت تنش سرما است. همچنین ژن‌های دو فاکتور رونویسی *bHLH* در ژنوتیپ حساس افزایش بیان و در ژنوتیپ متحمل کاهش بیان نشان دادند. افزایش بیان این دو فاکتور رونویسی، تلاش ژنوتیپ حساس را در مقابله با خسارت اکسیداتیو نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که پدیده تحمل، صفتی چندژنی است و با برآیند اثر ژن‌های متعدد در ارتباط می‌باشد. بنابراین در ژنوتیپ حساس، کاهش تولید انرژی با کاهش فعالیت بیان بسیاری از ژن‌ها همراه است و اگرچه سلول، تلاش می‌کند تا زنده بماند، اما به دنبال خسارت‌های زیادی که در اثر ناکارآمدی سیستم‌های دفاعی وارد می‌شود، احتمالاً در این شرایط از بین خواهد رفت.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نشان داد که دو ژنوتیپ تحت تنش سرما، تفاوت معنی‌داری در میزان خسارت‌های سلولی و الگوی پاسخ‌های دفاعی داشتند. بررسی شاخص‌های خسارت می‌تواند به طور غیرمستقیم به پاسخ‌های دفاعی گیاه نیز اشاره کند. نظر به این که در پژوهش‌های گذشته، شاخص‌های دفاعی متعددی در این دو ژنوتیپ تحت تنش سرما بررسی

## REFERENCES

1. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. (2014). HTSeq–A python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31 (2), 166-169.
2. Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. & Leon, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*, 14(16), 2085-2096.
3. Belamkar, V., Weeks, N. T., Bharti, A. K., Farmer, A. D., Graham, M. A. & Cannon, S. B. (2014). Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress. *BMC Genomics*, 15(1), 950.
4. Bhattacharjee, A. & Jain, M. (2013). Transcription factor mediated abiotic stress signaling in rice. *Plant Stress*, 7, 16-25.
5. Boominathan, P., Shukla, R., Kumar, A., Manna, D., Negi, D., Verma, P. K. & Chattopadhyay, D. (2004). Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology*, 135(3), 1608-1620.
6. Böttcher, C. & Pollmann, S. (2009). Plant oxylipins: plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276 (17), 4693–4704.
7. Caarls, L., Van der Does, D., Hickman, R., Jansen, W., Verk, M. C. V., Proietti, S., Lorenzo, O., Solano, R., Pieterse, C. M. & Van Wees, S. (2017). Assessing the role of ethylene response factor transcriptional repressors in salicylic acid-mediated suppression of jasmonic acid-responsive genes. *Plant and Cell Physiology*, 58(2), 266-278.
8. Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. & Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(2), 847-856.
9. Garg, R., Bhattacharjee, A. & Jain, M. (2015). Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3), 388-400.
10. Garg, R., Patel, R. K., Jhanwar, S., Priya, P., Bhattacharjee, A., Yadav, G., Bhatia, S., Chattopadhyay, D., Tyagi, A. K. & Jain, M. (2011). Gene discovery and tissue-specific transcriptome analysis in chickpea with massively parallel pyrosequencing and web resource development. *Plant Physiology*, 156, 1661–1678.
11. Grebner, W., Stingl, N. E., Oenel, A., Mueller, M. J. & Berger, S. (2013). Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161, 2159-2170.
12. Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*, 94(3), 345-351.
13. Hara, M., Fujinaga, M. & Kuboi, T. (2005). Metal binding by Citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2695-2703.
14. Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T. & Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217(2), 290-298.
15. Heidarvand, L. & MaaliAmiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 170(5), 459-469.
16. Heidarvand, L. & Maali Amiri, R. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 419-431.
17. Heidarvand, L., Maali Amiri, R., Naghavi, M. R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B. & Alizadeh, K. H. (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 157-163.
18. Hannah, M. A., Heyer, A. G. & Hincha, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 1(2): p.e26.
19. Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-215.
20. Davies, K. M., Albert, N. W., Zhou, Y. & Schwinn, K. E. (2018). Functions of flavonoid and betalain pigments in abiotic stress tolerance in plants. *Annual Plant Reviews*, 15, 1-41.
21. Jain, M. (2013). Emerging role of metabolic pathways in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 1(108), 10-4172.
22. Jain, M. & Khurana, J. P. (2009). Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS Journal*, 276(11), 3148-3162.
23. Kaplan, F. & Guy, C. L. (2004). b-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, 135(3), 1674-1684.

24. Kumar, M., Bijo, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K. & Jha, B. (2012). Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria durabiy* regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 129-138.
25. Kundu, P., Gill, R., Ahlawat, S., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, A. A., Hasanuzzaman, M., Ramakrishna, A., Chauhan, N., Tuteja, N. & Gill, S. S. (2018). Targeting the redox regulatory mechanisms for abiotic stress tolerance in crops. In: *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants*. 151-220.
26. Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.
27. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10(8), 1391-1406.
28. Liu, Q., Zhang, X., Zhao, Y., Lin, J., Shu, C., Wang, C. & Fang, X. (2013). Fullerene-induced increase of glycosyl residue on living plant cell wall. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7490-7498.
29. Llorente, F., Lopez-Cobollo, R. M., Catala, R., Martinez-Zapater, J. M. & Salinas, J. (2002). A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI 3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant Journal*, 32(1), 13-24.
30. Long, Y., Zhang, J., Tian, X., Wu, S., Zhang, Q., Zhang, J., Dang, Z. & Pei, X.W. (2014). *De novo* assembly of the desert tree *Haloxylon ammodendron* (CA Mey.) based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics*, 15(1), 1111.
31. Longo, V., Kamran, R. V., Michaletti, A., Toorchi, M., Zolla, L. & Rinalducci, S. (2017). Proteomic and physiological response of spring barley leaves to cold stress. *Cell*, 6, 7.
32. 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.
33. Maali Amiri, R., Yur'eva, N. O., Shimshilashvili, K. R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Pchelkin, V. P., Kuznitsova, E. I., Tsydendambaev, V. D., Trunova, T. I., Los, D. A., Salehi Jouzani, G. & Nosov, A. M. (2010). Expression of acyl-lipid delta12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(3), 289-297.
34. Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I., Pchelkin, V. P., Tsydendambaev, V. D., Vereshchagin, A. G., Deryabin, A. N., Trunova, T. I., Los, D. A. & Nosov A. M. (2007). Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the  $\Delta 12$ -desaturase gene from Cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5):678-685.
35. Mantri, N. L., Ford, R., Tristan, E., Edwin, C. & Pang, C. K. (2007). Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high salinity, cold and drought. *BMC Genomics*, 8(1), 303-317.
36. Mastan, S. G., Rathore, M. S., Bhatt, V. D. & Chikara, Y. J. (2012). Assessment of changes in DNA methylation by methylation-sensitive amplified polymorphism in *Jatropha curcas* L. subjected to salinity stress. *Gene*, 508(1), 125-129.
37. Mizoi, J., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 86-96.
38. Mousavi, S., Alisoltani, A., Shiran, B., Fallahi, H., Ebrahimie, E., Imani, A. & Houshmand, S. (2014). De novotranscriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in (*Prunus dulcis* Mill.) in response to freezing stress. *PLOS One*, 9, e104541.
39. Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 97-103.
40. Nejadshadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S. S. and Sadeghzade, B. (2014). Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70, 399-408.
41. Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. & Tran, L. S. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 445-458.
42. Popov, V. N., Orlova, I. V., Kipaikina, N. V., Serebriiskaya, T. S., Merkulova, N. V., Nosov, A. M. & Los, D.A. (2005). The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl-lipid  $\delta 9$ -desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(5), 664-667.

43. Priya, P. & Jain, M. (2013). RiceSRTFDB: a database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis. *Database*, bat027.
44. 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(1), 61-76.
45. Ranocha, P., Denancé, N., Vanholme, R., Freyrier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., Köhler, L., Pouzet, C., Renou, J. P., Sundberg, B. & Boerjan, W. (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant Journal*, 63(3), 469-483.
46. Robinson, M. D. & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25.
47. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
48. Ray, S., Dansana, P. K., Giri, J., Deveshwar, P., Arora, R., Agarwal, P., Khurana, J. P., Kapoor, S. & Tyagi, A. K. (2011). Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Functional & Integrative Genomics*, 11(1), 157-178.
49. Rekart-Cowie, I., Ebshish, O. S., Mohamed, K. S. & Pearce, R. S. (2008). Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4205-4217.
50. Ryan, D. P. & Owen-Hughes, T. (2011). Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(5), 649-656.
51. Ramezani, S., Maali-Amiri, R., Khazaei, M. & Talei, A. R., (2015). Differential transcript accumulation of dhyrin and beta-glucosidase genes to cold-induced oxidative stress in chickpea. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 17, 725-734.
52. Shi, H., Liu, W., Wei, Y. & Ye, T. (2017). Integration of auxin/indole-3-acetic acid 17 and RGA-LIKE3 confers salt stress resistance through stabilization by nitric oxide in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1239-1249.
53. Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T. & Weiler, E. W. (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210(6), 979-984.
54. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T. & Satou, M. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31(3), 279-292.
55. Somerville, C. R. & Browse, J. (1996). Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends in Cell Biology*, 6(4), 148-153.
56. Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(3), 1035-1040.
57. Smith, R. A., Cass, C. L., Mazaheri, M., Sekhon, R. S., Heckwolf, M., Kaeppler, H., Leon, N., Mansfield, S. D., Kaeppler, S. M., Sedbrook, J. C. & Karlen, S.D. (2017). Suppression of CINNAMOYL-CoA REDUCTASE increases the level of monolignol ferulates incorporated into maize lignins. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 109.
58. Shahryar, N. & Maali-Amiri, R. (2016). Metabolic acclimation of tetraploid and hexaploid wheats by cold stress-induced carbohydrate accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 204, 44-53.
59. Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K. D. & Thomas, D. Y. (2004). Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5492-502.
60. Sun, J. H., Dong, Y. H., Li, C. L. & Shen, Y. Y. (2015). Transcription and enzymatic analysis of beta-glucosidase VvBG1 in grape berry ripening. *Plant Growth Regulation*, 75(1): 67-73.
61. Tan, M. P. (2010). Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(1), 21-26.
62. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105-1111.
63. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5), 511.
64. Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Journal*, 70(4), 599-613.

65. Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Letters*, 30(6), 967-977.
66. Varshney, R. K., Close, T. J., Singh, N. K., Hoisington, D. A. & Cook, D. R. (2009). Orphan legume crops enter the genomics era, *Current Opinion in Plant Biology*. 12(2), 202-210.
67. Varshney, R. K., Song, C. & Saxena, R. K. (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, 31(3), 240-246.
68. Wu, Y., Wei, W., Pang, X., Wang, X., Zhang, H., Dong, B., Xing, Y., Li, X. & Wang, M. (2014). Comparative transcriptome profiling of a desert evergreen shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, in response to drought and cold stresses. *BMC Genomics*, 15(1), 671.
69. Yadav, S. S., Kumar, J., Yadav, S. K., Singh, S., Yadav, V. S., Turner, N. C. & Redden, R. (2006). Evaluation of *Helicoverpa* and drought resistance in desi and kabuli chickpea. *Plant Genetic Resources*, 4(3), 198-203.
70. Yin, Y., Huang, J. & Xu, Y. (2009). The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae. *BMC Plant Biology*, 9(1), 99.
71. Yun, K. Y., Park, M. R., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Mauleon, R., Wijaya, E., Bajic, V. B., Bruskiewich, R. & de los Reyes, B. G. (2010). Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. *BMC Plant Biology*, 10(1), 16.