ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحه ۱۹۲ - ۱۸۳

ارزیابی بیان نسبی برخی از ژن‌های دخیل در تحمل سرما نخود زراعی (*Cicer arietimun* L.)

Assessment of relative expression of some genes involved in cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

هلن پورمظاهری[۱]، رضا معالی امیری*[۱]، فرید اسحقی گرجی[۱]

۱- به‌ترتیب پژوهشگر پسادکتری، استاد، دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Pourmazaheri H[1], Maali-Amiri R[*1], Eshaghi Gorji F[1]

1- Postdoctoral Researcher, Professor, MSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

چکیده

در این پژوهش، اثر تنش سرما بر میزان شاخص خسارت سلولی (H_2O_2) و فعالیت آنزیم فتوسنتزی فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) و بیان نسبی ژن‌های زیرواحد کوچک و بزرگ روبیسکو و پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* در دو ژنوتیپ متحمل Sel96th439 و حساس ILC533 به سرما نخود زراعی (*Cicer arietimun* L.) تحت تنش سرما (٤ ˚C) بررسی شد. تحت تنش سرما میزان H_2O_2 در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس به‌طور معنی‌داری کمتر بود (تا ٪٤٠/٨). نتایج نشان داد که فعالیت فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) در هر دو ژنوتیپ و به‌خصوص در ژنوتیپ متحمل (تا ٪٦٩) افزایش یافت با این وجود در روز ششم پس از تنش سرما فعالیت PEPC ١٦/٩ درصد در ژنوتیپ متحمل بیشتر از حساس بود. در ژنوتیپ متحمل میزان بیان ژن‌های زیرواحد کوچک و بزرگ روبیسکو در روز اول تنش سرما نسبت به شرایط کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش (به‌ترتیب ٪٨٠/٣ و ٪٧٠/٦) یافت در حالی‌که در روز ششم تنش میزان بیان این ژن‌ها (به‌ترتیب ٪٩٣/٥ و ٪٣٨/٢) کاهش یافت. در ژنوتیپ حساس، میزان بیان ژن‌ها در مقایسه با شرایط کنترل کاهش مداوم و معنی‌داری داشت. میزان بیان نسبی ژن پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* روند تغییرات تقریبا مشابهی در مقایسه با ژن زیرواحد کوچک و بزرگ روبیسکو نشان داد، با این تفاوت که در روز ششم تنش سرما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل هم سطح کنترل شد. این نتایج احتمالاً به استقرار مجدد هموستازی سلولی از طریق فعالیت‌های متابولیکی و فتوسنتزی در جهت سازگاری گیاه به تنش سرما اشاره دارد. کاهش شاخص خسارت سلولی (H_2O_2) در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش سرما در مقایسه با ژنوتیپ حساس تایید کننده این موضوع می‌باشد. بنابراین تغییر متابولیسم مشارکت کننده در فتوسنتز می‌تواند شاخصی در ارزیابی درجه تحمل نخود زراعی به سرما باشد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)
تنش سرما
فتوسنتز
متابولیسم

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

مقدمه

رشد و پراکنش گیاهان در طبیعت به‌طور دائم تحت اثر عوامل تنش‌زای محیطی است. به‌منظور سازگاری[1] و پاسخ‌های سریع، گیاهان (به‌عنوان موجودات غیر متحرک) نمی‌توانند موقعیت مکانی خود را مانند دیگر موجودات زنده تغییر دهند اما فرآیند تکامل در آن‌ها مکانیسم‌هایی تعبیه کرده که به آن‌ها در حفظ، بقاء و پایداری عملکرد کمک می‌کند (Heidarvand and Maali Amiri 2010). یعنی محیط به‌طور دائم در حال تغییر بوده و گیاهان نیز خود را با این تغییرات تنظیم می‌کنند. امروزه سازگاری گیاهان به‌عوامل محیطی تمرکز مهم تحقیقات بیولوژیکی بوده زیرا تحت شرایط حاد، مکانیسم‌های دخیل در سازگاری و ادامه حیات گیاه اطلاعات مهمی در جهت بهبود برنامه‌های اصلاحی در مقابله با تنش عرضه می‌کند. سازگاری به سرما فرآیند بسیار پیچیده‌ای بوده و شامل تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعدد می‌باشد و گمان می‌رود که انواع ژن‌ها در این فرآیند مشارکت دارند (Kazemi-Shahandashti and Maali-Amiri 2018).

نخود با نام علمی *Cicer arietinum* L. گیاهی زراعی از خانواده لگومینوز (Leguminosae) و یکی از منابع تامین پروتئین و کربوهیدرات برای تغذیه انسان و دام به شمار می‌رود. نخود زراعی پس از لوبیا و نخودفرنگی، سومین لگوم فصل سرد است که با سطحی بیش از ۱۴/۵۶ میلیون هکتار و تولید سالانه بیش از ۱۱/۵ میلیون تن کشت می‌شود (Merga and Haji 2019). میزان تولید نخود در ایران که در مقام هفتم دنیا قرار دارد در سال ۰/۳ میلیون تن بوده و سهم آن در بین کشورهای تولید کننده ۲/۳ درصد می‌باشد (FAO 2019). در حال حاضر با توجه به مشکلات کشت بهاره نخود از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل، کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به‌نظر می‌رسد. در کشت زود هنگام پاییزه و زمستانه گیاه به‌خوبی می‌تواند با دسترسی به رطوبت کافی، دوره رویشی و زایشی طولانی‌تر و انتقال بهتر آسیمیلات‌ها از بخش‌های رویشی و بهبود میزان نیتروژن مغذی، بازده محصول را تا بیش از دو برابر افزایش دهد. در نتیجه استراتژی تغییر تاریخ کشت نه تنها در مواجهه با تنش‌های انتهای فصل مفید بوده بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی‌تر بازده تولید افزایش می‌یابد (Habibpour et al. 2012). اما مشکل عمده، حساسیت بسیاری از ارقام نخود زراعی به تنش سرما است، به‌طوری‌که تنش سرما رشد، نمو و در نهایت عملکرد نخود را در بسیاری از نواحی ایران کاهش می‌دهد (Heidarvand and Maali-Amiri 2013; Kazemi-Shahandashti et al. 2014).

یکی از مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش سرما ایجاد می‌شود تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[2] و القاء تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌باشد. ROS شکل‌های فعال اکسیژن بوده که در مراحل حیاتی مانند تنفس و فتوسنتز تولید می‌شوند. ROSها به‌طور غیراختصاصی با اجزای سلولی ازجمله غشاءها، برهمکنش داشته و واکنش‌های پراکسیداسیون غشایی را راه‌اندازی می‌کنند. تجمع ROSها آسیب‌های معنی‌داری به ماکرومولکول‌های ضروری مانند رنگیزه‌ها و آنزیم‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها وارد می‌کنند (Mitler et al. 2004).

تحت تنش سرما، مالات به‌عنوان یک اسمولیت عمل کرده و در سلول‌های نگهبان روزنه از طریق آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)[3] تولید می‌شود. تحت تنش سرما، مالات به‌عنوان یک مخزن اضافی برای تثبیت کربن محسوب می‌شود (Kramer et al. 2011). PEPC نقش کلیدی در اتصال CO_2 (به فرم بی‌کربنات) به PEP برای تشکیل اگزالواستات در بافت مزوفیل ایفا می‌کند. این اگزالواستات سپس برای انتشار CO_2 در لایه‌های عمیق‌تر غلاف آوندی به‌منظور تثبیت کربن توسط روبیسکو و در چرخه کالوین به پیروات (از طریق مالات) تبدیل می‌شود. پیروات در سلول مزوفیل به PEP تبدیل و چرخه مجدد آغاز می‌شود. در نتیجه CO_2 به‌طور فعال پمپاژ شده و منجر به افزایش تولید انرژی (ATP) جهت بیوسنتز ترکیبات حافظتی در برابر تنش سرما می‌شود (Xuming et al. 2008; Hasanpour et al. 2015).

[1] Acclimation

[2] Reactive oxygen species

[3] Phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

اهداف بنیادین ترنسکریپتومیکس[1] تولید و مقایسه تصاویر لحظه‌ای از جمعیت‌های mRNA است. تجزیه رونویسی روشی معمول در کشف تفاوت بیان ژن‌ها است زیرا تنظیم فعالیت ژن در ابتدا در سطح رونویسی رخ داده و پاسخ‌های بیولوژیک و برنامه‌ریزی نموی موجود به‌وسیله تنظیم دقیق بیان ژن‌ها کنترل می‌شود. در نتیجه مقایسه میزان رونویسی در مراحل فیزیولوژیک خاص، الگوهای اختصاصی بیان ژن در آن مرحله را مشخص می‌کند و تعیین اعمال فیزیولوژیک ژن‌ها تسهیل می‌شود. ترنسکریپتومیکس یا تجزیه هم‌زمان بیان ژن در سطح RNA در یک بافت خاص، عنصری کلیدی در ژنومیکس عملکردی[2] است و درک ما را از کارکرد ژن افزایش می‌دهد (Weiberg and Karlovsky 2009). سنجش میزان اثر عوامل مختلف در تحمل به تنش‌های غیر زنده از روش‌های متعددی ازجمله اندازه‌گیری سطوح رونویسی ژن‌ها انجام می‌شود (Kazemi-Shahandashti et al. 2013). مطالعات نشان داده که تفاوت در میزان بیان ژن‌های دخیل در تحمل، احتمالاً در اثر زمان و شدت فعالیت رونویسی این ژن‌ها بوده، به‌طوری‌که آنالیز عملکرد ژن‌های با بیان متمایز جهت درک مکانیسم مولکولی تحمل و پاسخ به تنش اهمیت دارد (Kiedrowski et al. 1992). ژن‌های دخیل در تنش‌های غیرزیستی را می‌توان به سه گروه طبقه‌بندی کرد: ژن‌های کد کننده اجزای مسیر انتقال پیام، ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کارکردی. در این بین پروتئین‌های کارکردی بر اساس تغییر میزان رونوشت و ترجمه، سلول‌ها را در برابر تنش حفاظت می‌کنند. از جمله ژن‌های دخیل در تحمل به سرما در گیاهان می‌توان به ژن‌های فتوسنتزی مانند ژن‌های زیرواحد کوچک (*RSS*)[3] و بزرگ روبیسکو (*RLS*)[4] و پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* اشاره کرد.

در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) و بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به تنش سرما در نخود زراعی در دو ژنوتیپ Sel96th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) بررسی شد که می‌تواند به شناسایی برخی ساز و کارهای مؤثر در تحمل سرما در این گیاه کمک کند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود زراعی (کابلی)، Sel96th11439 (متحمل به سرما) و ILC533 (حساس به سرما) استفاده شد. بذور با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب‌مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳°C قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان انتقال یافت. انتقال غیرمستقیم گیاهان به خاک به‌دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن‌ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور ۲۲۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای ۲۳°C و رطوبت نسبی ۷۵ ٪ قرار داده شد (Heidarvand et al. 2011). جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، گیاهچه‌های بیست و یک روزه به اتاقک رشد با دمای ٤°C منتقل شدند و نمونه‌گیری در روز اول (۲٤ 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. تعدادی از گیاهچه‌ها به‌عنوان کنترل (شاهد) در اتاقک رشد با دمای ۲۳°C نگهداری شدند و نمونه‌گیری برگی از این گیاهان نیز انجام گرفت. نمونه‌های برگی پس از فریز شدن در ازت مایع، در فریزر ۸۰°C- تا زمان آزمایش نگهداری شد (Rakei et al. 2016).

جهت اندازه‌گیری محتوی H_2O_2، ۰/۵ گرم از نمونه در ازت مایع به کمک هاون چینی کوبیده و سپس درون ۵ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (TCA) مخلوط شدند. پس از آن مخلوط هموژن شده با سرعت g × ۱۲۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و ۰/۷۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۰/۷۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر از یدید پتاسیم یک مولار، به کووت اضافه و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر

[1] Transcriptomics
[2] Functional genomics
[3] Rubisco small subunit
[4] Rubisco large subunit

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

قرائت و محتوی H_2O_2 با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده اندازه‌گیری شد. به‌منظور یافتن فرمول رگرسیونی رابطه میزان غلظت H_2O_2 و طول موج جذبی، غلظت‌های متفاوت از H_2O_2 در فالکون‌های متعدد آماده و جذب نوری آن‌ها قرائت شد. سپس فرمول رگرسیون محاسبه و به کمک آن غلظت H_2O_2 استخراج شده از نمونه محاسبه شد (Loreto and Velikova 2001).

سنجش فعالیت آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) بر اساس Sayer et al. (1979) بدین صورت انجام شد که ۰/۵ گرم برگ فریز شده در هاون سرد به‌وسیله بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Bicine-NaOH با pH= ۷/۸، ۱۰ میلی‌مول کلرور منیزیم، ۱۰ میلی‌مولار بتا- مرکاپتواتانول و پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدین دو درصد وزنی حجمی ساییده شد. سپس عصاره با سرعت g × ۲۶۸۰ و در دمای ۴°C به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به یک میلی‌لیتر محلول واکنش شامل ۵۰ میلی‌مول در لیتر Tris-HCL با pH= ۷/۸ ، ۱۰ میلی‌مول در لیتر کلرور منیزیم، ۰/۲۵ میلی‌مول در لیتر EDTA و ۵ میلی‌مول در لیتر $NAHCO_3$، ۴ واحد مالات دهیدروژناز، ۰/۱ میلی‌مول در لیتر NADH و ۲ میلی‌مول فسفواینول پیروات اضافه شد. سپس فعالیت آنزیم با دنسیتومتر مدل CD60 در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA کل سلولی توسط روش بایازول[1] (فرژن پویش، تهران، ایران) از ۸۰ میلی‌گرم نمونه خرده شده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام و کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل 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 ۲۶۰ nm استفاده می‌شود. RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. ۲ میکروگرم RNA، ۱ میکرولیتر بافر، ۱ واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۳۰ دقیقه دردمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرارداده و تیوب‌ها در دمای ۸۰°C- نگه‌داری شدند. ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگودی‌تی[2] (۱ پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفته و پس از آن بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات[3] با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به این محلول افزوده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C قرار داده شد. جهت 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 برروی ژل یک درصد آگارز استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن‌های موردنظر (*Chl a/b- binding Protein*، *SRubisco*، *LRubisco*) و همچنین ژن خانه‌دار *Actin-1* با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، ۳ میکرولیتر آب‌مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول و۵ میکرولیتر نمونه cDNA ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت. برای هر واکنش دو تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت ۲ دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ۶۰°C (دمای Tm آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. کلیه تیمارها با گیاهان کنترل زمان خودش مقایسه شدند. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST[4] استفاده شد (Pfaffl et al. 2001).

[1] Biozol

[2] Oligo dt

[3] Deoxynucleothriphosphate

[4] Relative expression software tool

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

جدول ۱- ویژگی آغازگر ژن‌های مطالعه شده نخود در این تحقیق

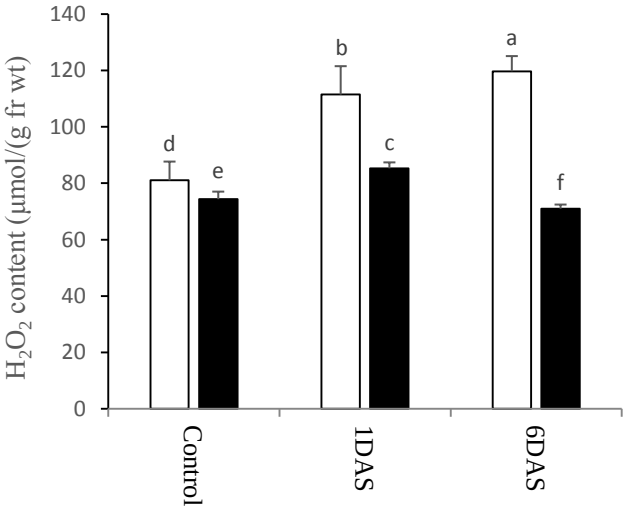
Accession N.	Gene	Sequence (5´-3´)
AJ131044.1	*Chl a/b- binding Protein*	F: AGTCCACCCTCACTAAAGATTTG R: TGGGAGCATTGGGATGTG
AJ131050.1	*RSS*	F: CAACACTTGAACAGCCTCAG R: GGGATGGGTTCCTTGCT
AF308707.1	*RLS*	F: TAGGACACCCTTGGGGAAAT R: ATCCATTGCTGGGAATTCAA
EU529707.1	*Actin1*	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT

توالی و شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و طول محصول آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار در جدول ۱ ارائه شده است. این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

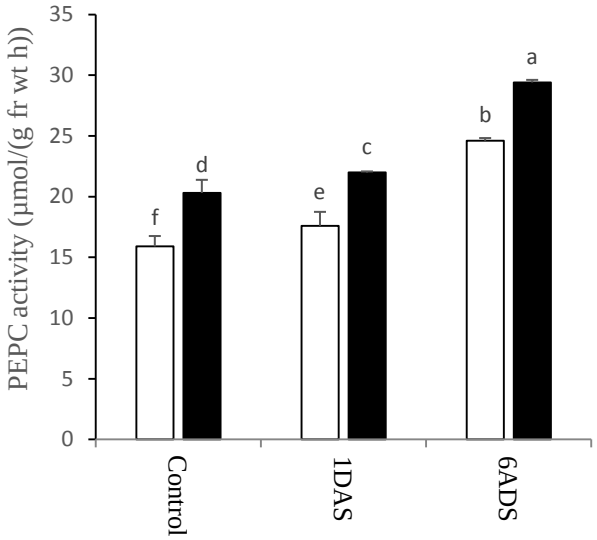
نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H_2O_2 وجود داشت که بیانگر تمایز در تجمع ROS تحت تنش سرما در نخود می‌باشد. در ژنوتیپ متحمل محتوی H_2O_2 در روز اول افزایش معنی‌داری داشته در حالی‌که کاهش معنی‌دار در روز ششم تنش نشان داد و حداقل میزان آن در روز ششم تنش مشاهده شد. تحت تنش سرما، میزان H_2O_2 در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا ٪۳۲/۳) (شکل ۱). نتایج مقایسه میانگین H_2O_2 نشان داد که تحت تنش سرما میزان H_2O_2 در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل تا ٪۵۹/۲ افزایش یافت. بنابراین در این مطالعه الگوی متمایزی در تجمع ROS در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش سرما مشاهده شد، به‌طوری‌که مقایسه شاخص خسارت تاییدکننده درجه متفاوت تحمل سرما در این ژنوتیپ‌ها بود (Hasanpour et al. 2015).

نقش PEPC حفظ pH و تولید اگزالواستات به‌عنوان منبعی برای باز تولید واسطه‌های چرخه کربس است که اسکلت کربنی مورد نیاز برای بیوسنتز و تثبیت نیتروژن را فراهم می‌کند به‌طوری‌که میزان PEPC طی تنش‌های مختلف محیطی افزایش می‌یابد (Doubnerova and Ryslava 2011). نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس تحت تیمارهای تنش سرما (روز اول و ششم تنش سرما) روند افزایشی داشت به‌طوری‌که فعالیت این آنزیم در روز ششم به حداکثر مقدار خود رسید. فعالیت این آنزیم در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل ۱/۲ برابر ژنوتیپ حساس بود (شکل ۲). دلیل افزایش فعالیت این آنزیم تحت تیمارهای آزمایشی، نقش این آنزیم در افزایش مالات در گیاهان سه کربنه (C_3) است زیرا این ماده سبب تسریع تحمل به سرما می‌شود.



شکل ۱- الگوی تغییر میزان پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) ژنوتیپ‌های متحملSel96th11439 (ستون سیاه) و حساسILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط کنترل، روز اول (1 DAS) و روز ششم (6 DAS) پس از تنش سرما ٤°C.

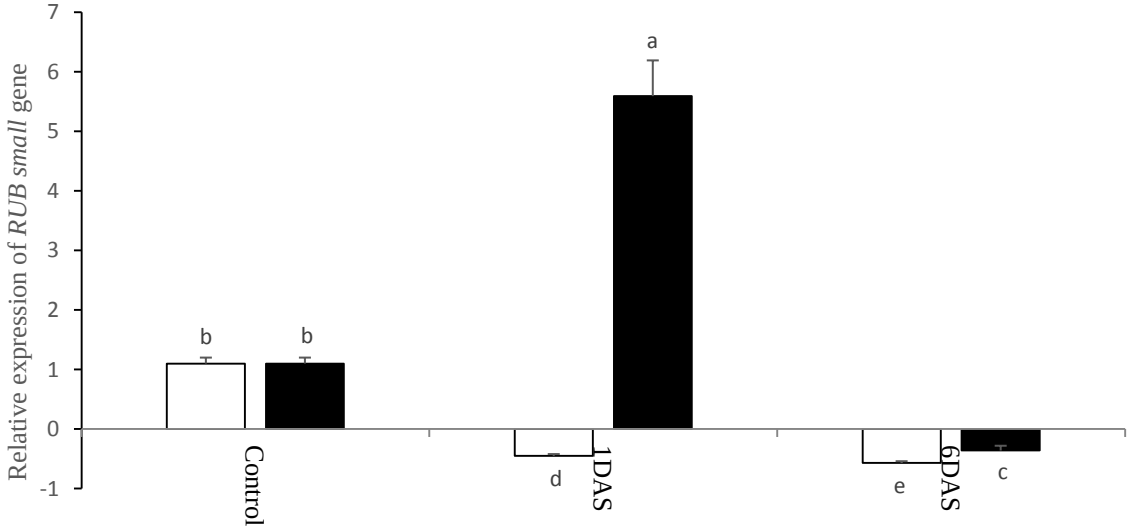
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]



شکل ۲- الگوی تغییر میزان فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط کنترل، روز اول (1 DAS) و روز ششم (6 DAS) پس از تنش سرما ٤˚C.

نتایج مشابهی در چاودار تحت تنش سرما مبنی بر افزایش دیرهنگام این آنزیم گزارش شده است (Crecelius et al. 2003). افزایش فعالیت PEPC می‌تواند در اثر بسته شدن روزنه‌ها طی تنش سرما باشد که سبب کاهش هدایت روزنه‌ای و مزوفیلی برای CO_2 می‌شود و در نتیجه غلظت CO_2 مورد نیاز برای واکنش با PEP و تشکیل مالات کاهش می‌یابد و بدین ترتیب مالات در برگ کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی فعالیت PEPC برای استفاده از حداقل CO_2 موجود و تولید مالات بیشتر افزایش می‌یابد (Savitch et al. 2000)، زیرا مالات به‌عنوان یک اسمولیت در شرایط تنش عمل کرده و به حفظ پتانسیل آب گیاه کمک می‌کند. همچنین مالات به‌عنوان یک مخزن اضافی کربن برای تثبیت CO_2 نیز محسوب می‌شود تا در شرایطی که غلظت CO_2 محیط به‌دلیل بسته شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد توسط مالیک آنزیم به CO_2 تبدیل شود (Chia et al. 2000). تحت تنش فلز آلومینیوم در سویا و تنش شوری در گره‌های ریشه نخود نیز فعالیت بیشتر PEPC در ژنوتیپ متحمل مشاهده شده که نشان دهنده غلظت بیشتر مالات در گیاه متحمل و در نتیجه تحمل بیشتر این گیاه به سرما است (Ermolayev et al. 2003; Soussi et al. 1999). بنابراین تحت تنش سرما تولید متابولیت‌های دخیل در تحمل به تنش از طریق تسریع یا توازن فتوسنتز و مسیرهای تولید ATP می‌تواند راهکاری مؤثر برای کاهش خسارت تنش سرما و بقا در گیاه نخود باشد.

با توجه به شکل ۳، در ژنوتیپ متحمل میزان بیان ژن زیرواحد کوچک روبیسکو در روز اول تنش سرما نسبت به شرایط کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی‌که در روز ششم تنش میزان بیان این ژن کاهش معنی‌داری داشت. با شروع سرما روزنه‌ها بسته شده و غلظت CO_2 درون سلولی نیز کاهش می‌یابد.



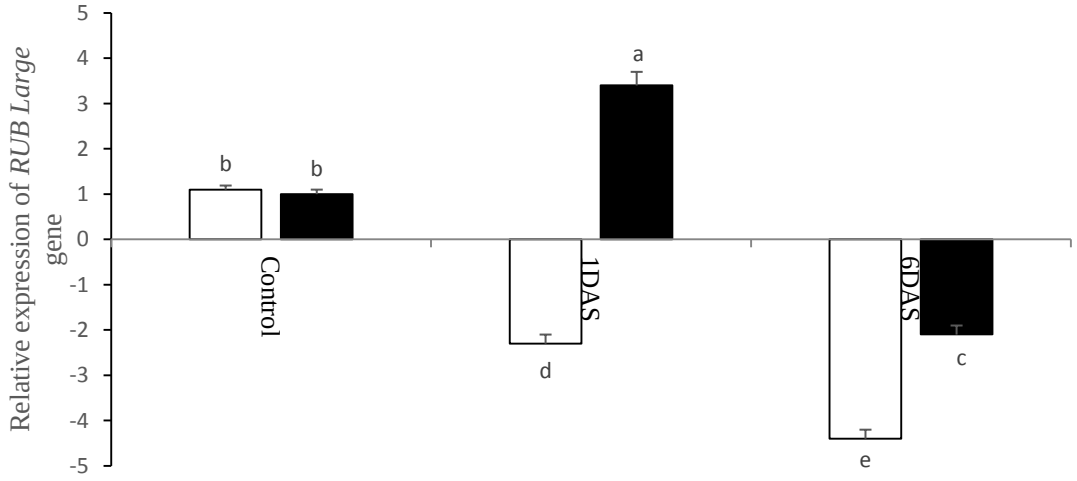
شکل ۳- الگوی تغییر بیان نسبی ژن زیرواحد کوچک روبیسکو ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط کنترل، روز اول (1DAS) و روز ششم (6DAS) پس از تنش سرما ٤˚C.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

به‌نظر می‌رسد که گیاه به‌منظور جبران اثرات منفی این عوامل، میزان بیان ژن زیرواحد کوچک را افزایش می‌دهد. پژوهش‌های گذشته بر روی نخود تحت تنش سرما نیز بیانگر افزایش بیان ژن زیرواحد کوچک روبیسکو در دوره‌های کوتاه مدت تنش سرما است (Kazemi-Shahandashti et al. 2013) اما با طولانی شدن تنش، رونویسی زیرواحد کوچک کاهش معنی‌داری یافت.

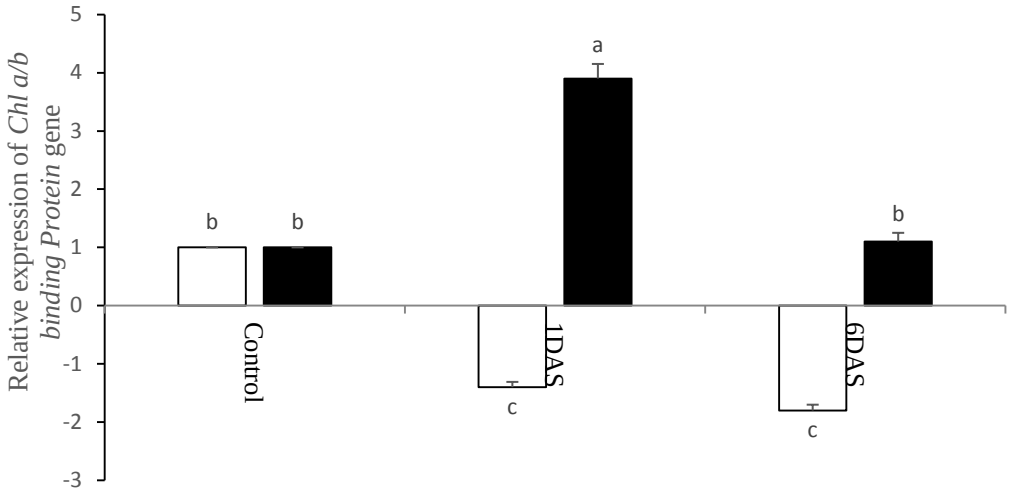
به‌نظر می‌رسد در چنین شرایطی برای اجتناب از اثرات تجمع ROS که به‌دلیل آسیب به چرخه انتقال آن انجام می‌گیرد، کاهش فتوسنتز در برگ نمایان می‌شود. باتوجه به اینکه روبیسکو بخش بزرگی از پروتئین برگ را تشکیل می‌دهد، کاهش رونوشت زیرواحد کوچک و کاهش فتوسنتز احتمالا استراتژی گیاه برای فرار از تنش و تقویت توان دفاعی گیاه باشد (Munne-Bosch et al. 2004). نتایج آنالیز بیان ژن زیرواحد کوچک روبیسکو در ژنوتیپ حساس نشان داد که تحت تنش میزان بیان ژن زیرواحد کوچک روند نزولی مداوم داشت. با ادامه تنش و افزایش خسارت تنش اکسیداتیو، کاهش بیان زیرواحد کوچک روبیسکو نیز ادامه یافت، نتایجی که توسط شاخص خسارت H_2O_2 تایید می‌شود. نتایج مشابهی در گیاه برنج تحت تنش سرما مشاهده شده است (Hahn and Walbot 1989). بنابراین براساس نتایج ارائه شده میزان بیان ژن زیرواحد کوچک روبیسکو نشان داد که در ژنوتیپ متحمل، سرما تاثیر کمتری بر بیان این ژن در مقایسه با ژنوتیپ حساس داشت.

با توجه به شکل ٤، میزان بیان ژن زیرواحد بزرگ روبیسکو در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش سرما در مقایسه با شرایط کنترل افزایش معنی‌داری داشت و در روز ششم تنش بیان این ژن کاهش معنی‌داری یافت. نتایج زیرواحد کوچک روبیسکو و مقایسه آن با نتایج بیان نسبی زیرواحد بزرگ نشان می‌دهد که در روز اول تنش سرما، ژنوتیپ متحمل به‌منظور استفاده از CO_2 موجود و تامین انرژی، فعالیت فتوسنتزی خود را جهت تولید متابولیت‌های دفاعی افزایش می‌دهد. اما به‌نظر می‌رسد که با ادامه تنش گیاه به‌منظور کاهش تولید ROS و همچنین تقویت توان دفاعی خود بیان ژن زیرواحد بزرگ روبیسکو را کاهش می‌دهد. بنابراین کاهش بیوسنتز زیرواحدهای بزرگ و کوچک روبیسکو تحت تنش شدید می‌تواند راهکاری در حفظ انرژی موجود و به‌کارگیری آن در تولید بیشتر متابولیت‌های دفاعی باشد زیرا انرژی سلولی تحت تنش محدود بوده و اولویت اصلی سلول در این مدت دفاع در جهت برقراری هموستازی می‌باشد. کاهش موقت میزان روبیسکو و افزایش توان دفاعی در ژنوتیپ متحمل تاییدکننده کاهش میزان خسارت سلولی (نتایج H_2O_2) است. چنین سلولی می‌تواند در فاز بهبودی مجدد فعالیت فتوسنتزی خود را از سر گیرد، مکانیسمی که تمایز آن در مقایسه با ژنوتیپ حساس محسوس است.



شکل ٤- الگوی تغییر بیان نسبی ژن زیرواحد بزرگ روبیسکو ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساسILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط کنترل، روز اول (1 DAS) و روز ششم (6 DAS) پس از تنش سرما ٤°C.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]



شکل ۵- الگوی تغییر بیان نسبی ژن پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون سفید) نخود تحت شرایط کنترل، روز اول (1 DAS) و روز ششم (6 DAS) پس از تنش سرما ٤˚C.

نکته جالب آن است که ژن‌های زیرواحد کوچک در ژنوم هسته و ژن‌های زیرواحد بزرگ روبیسکو در کلروپلاست بیان می‌شود (Patel and Berry 2008) و شاید شدیدتر بودن کاهش‌ها و افزایش‌ها در زیرواحد بزرگ از نظر مقیاس نسبت به زیرواحد کوچک به‌همین علت باشد ولی با وجود آن‌که در بخش‌های مختلفی بیان می‌شوند، اما می‌توان گفت که بیان آن‌ها طی تنش سرما هنوز وابسته به یکدیگر است (Hahn and Walbot 1989). خاموش کردن بیان زیرواحد کوچک روبیسکو از طریق RNA آنتی سنس سبب مهار تجمع زیرواحد بزرگ آن نیز می‌شود (Cohen et al. 2005). بنابراین بررسی بیان زیرواحدهای مختلف پروتئین روبیسکو می‌تواند در جهت درک بهتر پاسخ‌های سلولی به تنش مفید باشد.

با توجه به شکل ۵ مشاهده شد که در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش سرما میزان بیان ژن پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* به‌صورت معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش یافت و در روز ششم میزان بیان این ژن کاهش نشان داد به‌طوری‌که میزان آن به شرایط کنترل نزدیک شد. در ژنوتیپ حساس میزان بیان ژن پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* تحت تنش کاهش معنی‌دار و مداوم نشان داد. پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b* پروتئینی است که به شدت به فتوسنتز و زیرواحد کوچک و بزرگ روبیسکو وابسته است به‌طوری‌که با مهار فتوسنتز تحت تنش سرما بیان ژن این پروتئین نیز مهار می‌شود (Strand et al. 1997). بنابراین با توجه به ارتباط معنی‌دار میزان فتوسنتز و بیان ژن پروتئین اتصالی به کلروفیل *a/b*، به‌نظر می‌رسد که این مساله سبب تغییر هماهنگ میزان بیان این ژن با الگوهای تغییر زیرواحدهای روبیسکو می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش با بررسی برخی شاخص‌های تحمل به سرما در دو ژنوتیپ متحمل و حساس نشان داد که سازگاری‌های متابولیکی سلول در بخش‌های دخیل در فتوسنتز ممکن است به سازگاری به تنش سرما در نخود زراعی بیانجامد. بررسی شاخص خسارت نشان داد که دو ژنوتیپ نخود درجه تحمل به سرمای متفاوتی دارند و بخشی از این تمایز به‌دلیل پاسخ‌های متابولیکی متفاوت در سطح فتوسنتزی است که می‌تواند غیرمستقیم در تسریع تحمل به تنش سرما از طریق تولید ATP لازم جهت به‌کارگیری در بیوسنتز ترکیبات دفاعی سلول شرکت کند. بنابراین تحت تنش سرما اولویت سلولی نخود، تنظیم تولید فرآورده‌های متابولیکی در جهت تعدیل خسارت و هموستازی و پس از آن از سرگیری فعالیت‌های دیگر سلولی در فاز بهبودی است که وابسته به بقاء سلول در چنین رویارویی با تنش سرما می‌باشد. در تنش شدید به‌دلیل کارایی کم انتقال الکترون و جهت جلوگیری از تجمع ROS میزان فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد اما باتوجه به کاهش میزان H_2O_2 در روز ششم تنش به نظر گیاهان متحمل می‌توانند پس از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

دوره تنش، وضعیت بازیابی را سریع‌تر انجام دهند در حالی‌که ژنوتیپ حساس به‌دلیل شدت خسارت‌های سلولی احتمالاً از بین خواهند رفت. تاثیر مثبت بیان ژن‌های دو زیرواحد کوچک و بزرگ روبیسکو و شاخص‌های درگیر در تحمل به سرما و فتوسنتز مانند فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) سبب افزایش تحمل به تنش در گیاه شده و به بالا بردن عملکرد و کیفیت نخود در مناطق سردسیر ایران کمک می‌کند.

منابع

Book FAO Year (2019) Food and Agriculture Organization of United Nations Rome.

Cohen I, Knopf JA, Irihimovitch V, Shapira M (2005) A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. Plant Physiology

Chia DW, Yoder TJ, Reiter WD, Gibson SI (2000) Fumaric acid: an overlooked from of fixed carbon in Arabidopsis and other plant species. Planta 211:743-751. 137:738- 746.

Crecelius F, Streb P, Feierbend J (2003) Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (Secale cereal L.) leaves. Journal of Experimental Botany 54:1075-1083.

Doubnerova V, Ryslava H (2011) What can enzymes of C_4 photosynthesis do for C_3 plants under stress? Plant Science 180:575-583.

Ermolayev V, Weschke W, Manteuffel R (2003) Comparison of Al induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. Journal of Experimental Botany 54:2745-2756.

Habibpour F, Zeinali H, Maali-Amiri R, Nazari M (2012) Genotypic variability and physio-biochemical characteristics of Iranian black chickpea to cold stress. Romanian Agricultural Research 29:121-130.

Hahn M, Walbot V (1989) Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA levels in rice leaves. Plant Phusiology 91:930-938.

Hasanpour H, Maali-Amiri R, Zeinali H (2015) Effect of TiO_2 Nanoparticles on Metabolic Limitations to Photosynthesis Under Cold in Chickpea. Russian Journal of Plant Physiology 62:779-787.

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

Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (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.

Kazemi-Shahandasht SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (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.

Kazemi-Shahandasht SS, Maali-Amiri R, Ramezanpour SS (2013) Change in memebrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Molecular Biology Reports 40:893-903.

Kazemi-Shahandasht SS, Maali-Amiri R (2018) Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. Journal of Plant Physiology 226:123-135.

Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock k, Somssich I, Dangl J (1992) Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM disease resistance locus. EMBO Journal 11:46-77.

Kramer DM, Evans JR (2011) The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. Plant Physiology. 155:70-78.

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.

Merga B, Haji J (2019) Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. Cogent Food and Agriculture 5:1615718.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Science 9:490-498.

Munne-Bosch S, Alegre L (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. Functional Plant Biology 31:203-216.

Patel M, Berry J (2008) Rubisco gene expression in C_4 plants. Journal of Experimental Botany 59:1625-1634.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR.

Rakei A, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ranjbar M (2016) DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. Protoplasma 253:61-76.

Savitch LV, Massacci A, Gray GR, Huner NP (2000) Acclimation to low temperature or high light mitigates sensitivity to photoinhibition: roles of the Calvin cycle and the Mehler reaction. Functional Plant Biology 27:253-264.

Soussi M, Lluch C, Ocana A, Norero A (1999) Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. Journal of Experimental Botany 50:1701-1708.

Strand A, Hurry V, Gustafsson P, Gardestrom P (1997) Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]

Xuming W, Fengqing G, Linglan M, Jie L, Sitao Y, Ping Y, Fashui H (2008) Effects of nano-anatase on ribulose1,5bisphosphate carboxylase/oxygenase mRNA expression in spinach. Biology Trace Elements Research 126:280-289.

temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. Plant Journal 12:605-614.

Weiberg A, Karlovsky P (2009) Components of variance in transcriptomics based on electrophoretic separation of cDNA fragments (cDNA-AFLP). Electrophoresis 30:2549-2557.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.9.1]