ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحه ۲۶۴ - ۲۵۱

ارزیابی مسیر بیوسنتزی پرولین نخود زراعی از طریق تخریب پوتریسین تحت تنش سرما

Evaluation of proline biosynthetic pathway of chickpea through putrescine degradation under cold stress

سعید امینی[۱]، رضا معالی‌امیری*[۲]، هلن پورمظاهری[۳]

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳- پژوهشگر پسادکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

Amini S[1], Maali-Amiri R*[2], Poormazaheri H[3]

1- Faculty member of Seed and Plant Certification and Registration Research Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- Faculty member of Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Postdoctoral Researcher of Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹)

چکیده

سازگاری متابولیکی گیاهان به تنش سرما نقش مهمی در بقا، رشد و عملکرد گیاهان زراعی دارد. پرولین به‌عنوان اسمولیت احتمالاً در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط سرما مشارکت دارد. در این پژوهش میزان پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، پرولین، پوتریسین (Put)، فعالیت آنزیم دی‌آمین اکسیداز (DAO) و بیان نسبی ژن دی‌آمین اکسیداز (DAO) در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96th11439) و حساس (ILC533) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در روز اول و ششم تنش سرما به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مطالعه شد. در ژنوتیپ متحمل میزان H_2O_2 پس از افزایش معنی‌دار در روز اول تنش، کاهش معنی‌داری در روز ششم در مقایسه با شاهد نشان داد (بیش از ۴/۷ درصد) درحالی‌که تجمع آن در ژنوتیپ حساس مشاهده شد (تا۵۰ درصد)، نتایجی که بیانگر سازگاری نسبی به سرما در ژنوتیپ متحمل بود. تحت تنش سرما میزان متابولیت‌های پرولین و Put در ژنوتیپ متحمل به‌ترتیب ۱/۴۷ و ۳/۲ برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. به‌موازات افزایش میزان پرولین تحت تنش سرما، در ژنوتیپ متحمل فعالیت آنزیم DAO و بیان نسبی ژن *DAO* به‌عنوان مسیرهای بیوسنتز این متابولیت افزایش معنی‌داری یافت (به‌ترتیب تا ۱/۸۷ و ۱/۷۲ برابر). حداکثر فعالیت این مسیر در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد. تحت تنش سرما تجمع پرولین در ژنوتیپ متحمل منجر به کاهش آسیب سلولی (نتایج H_2O_2) و بهبود درجه تحمل نخود به سرما شد. چنین شاخص‌هایی در ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما مؤثر بوده و به‌کارگیری آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی

آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO)
بیان ژن *DAO*
پراکسیدهیدروژن
پرولین
پوتریسین
تحمل سرما

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

کشت بهاره نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) با مخاطراتی مانند خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل همراه است که منجر به کاهش بهره‌وری و تولید تا میزان ۴۰۰-۳۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌شود. کشت‌های پاییزه یا زمستانه این گیاه با توجه به بارندگی و وجود رطوبت امکان پذیر بوده، لیکن سرما عامل محدود کننده در توسعه کشت پاییزه نخود محسوب می‌شود (Kazemi et al. 2013 Shahandashti). بنابراین بهبود تحمل به تنش سرما یکی از برنامه‌های اساسی به‌نژادی در سازگاری، بهبود تولید و عملکرد نخود زراعی است (Heidarvand et al. 2011). در طی تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما تجمع بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS[1]) سبب آسیب‌های شدید به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله تخریب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، و شکستن مولکول‌های اسید نوکلئیک در سلول‌های گیاهی می‌شود (Amini et al. 2017). در جهت مقابله با ROSها و تنش اکسیداتیو القا شده توسط آن‌ها، فرایند سازگاری به تنش با تغییر میزان متابولیت‌های سلولی از طریق تنظیم تظاهر ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌ها تغییر می‌کند (Heidarvand et al. 2013). بنابراین تحت تنش‌های محیطی برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها با تغییر الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند سبب تغییر متابولیسم سلولی و هموستازی جدید شود.

H_2O_2 مولکول پیام‌رسان حیاتی با قابلیت مشارکت در فرایندهای فیزیولوژیک گیاهی مانند پاسخ سازگاری به تنش‌هاست (Dickinson and Forman 2002). پوتریسین (Put[2])، سبک‌ترین عضو خانواده پلی‌آمین‌ها (PAs[3]) در واقع اسمولیتی پلی‌کاتیونی است که در پویایی فرایندهای سلولی و پاسخ به تنش‌های محیطی مشارکت دارد (Handa et al. 2010). این متابولیت از پیش‌ماده ارنیتین[4] یا سیترولین[5] در یک مسیر بیوسنتزی تولید و در ادامه توسط اسپرمیدین‌سینتاز (SPDS[6]) به اسپرمیدین (Spd[7]) تبدیل شده یا توسط دی‌آمین‌اکسیداز (DAO[8]) (EC 1.4.3.6) به گاما آمینوبوتریک اسید (GABA[9]) و نهایتاً پرولین تجزیه می‌شود (Madhulata et al. 2014). آنزیم DAO گروهی از آمین‌اکسیدازهای (AOs) گیاهی حاوی مس (CuAOs) است (Cona et al. 2006) که با تنظیم میزان PAs، GABA و پرولین سلولی از طریق اکسیداسیون Put و متابولیت‌های دیگر از جمله کاداوارین (Cad[10]) نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک از جمله رشد، نمو، گلدهی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Angelini et al. 2010; Wimalasekera et al. 2011a,b)؛ فرایندی که مولکول پیام‌رسان H_2O_2 را نیز از طریق کاتابولیسم انتهایی[11] PAs تولید می‌کند (Minocha et al. 2014; Tiburcio et al. 2014).

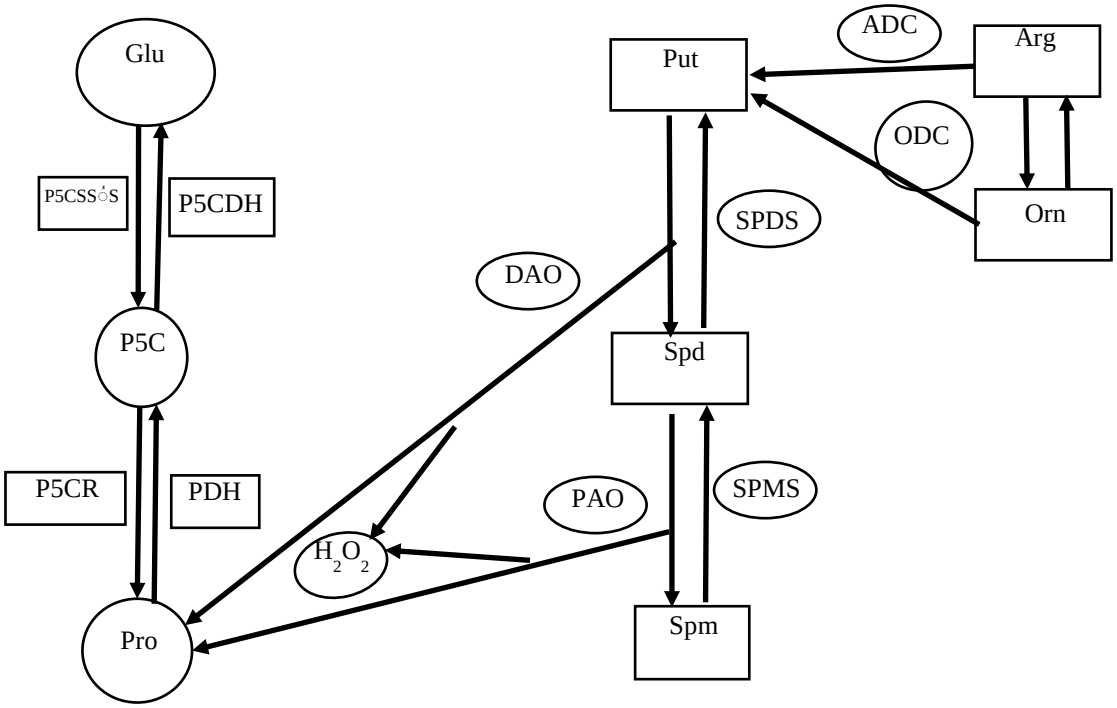
پرولین به‌عنوان سبک‌ترین آمینو اسید آزاد سلولی، علاوه بر ایفای نقش اسموپروتکتنت در تنظیم هموستازی از جمله تعادل وضعیت انرژی و اکسایش/ احیا سلول نیز موثر است. همچنین پرولین می‌تواند به‌عنوان مولکول سیگنال در تنظیم عملکرد میتوکندری، تنظیم تکثیر سلولی یا مرگ سلول و تحریک بیان ژن‌هایی که در بازیابی تنش مؤثرند نیز نقش ایفا کند (Turchetto-Zolet et al. 2009). محتوی پرولین از طریق القای فعالیت آنزیم‌های دلتا- ۱- پرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) در مسیر سنتز و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز (Pro DH) و پرولین ۵ کربوکسیلات دهیدروژناز (P5CDH) (Tavakoli et al. 2016) در مسیر تجزیه و همچنین از طریق مسیر تجزیه PAs توسط القای فعالیت آنزیم DAO در مسیر سنتز GABA نیز در سلول تجمع می‌یابد (Su and Bai 2008 Santa-Cruz et al. 1999;) گلوتامیک اسید پیش‌ساز رایج پرولین و PAs است (Tonon et al. 2004). الکترون مورد نیاز برای سنتز پرولین از NADPH و NADH تأمین شده، تا گلوتامیک اسید به شکل دی‌پرولین اسید ۵ کربوکسیلاز درآید و سپس این ماده به پرولین تبدیل شود. در واقع سنتز پرولین از دو مسیر گلوتامات و

[1] Reactive oxygen species
[2] Putrescine
[3] Polyamines
[4] Ornithine
[5] Citroline
[6] Spermidine Synthase
[7] Spermidine
[8] Diamine oxidase
[9] γ-Aminobutyric acid
[10] Cadavarine
[11] Terminal catabolism

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

یا ارنیتین انجام می‌شود. همچنین گلوتامیک اسید می‌تواند مستقیماً توسط مسیر Glutamate-Δ1-pyrroline-5-carboxylate یا غیرمستقیم از طریق استیلاسیون ارنیتین و آرژنین به Put تبدیل شود (Alcazar et al. 2010b). در شکل ۱ مسیر بیوسنتز پرولین به‌طورشماتیک نمایش داده شده است. تجمع پرولین و تغییر محتوی PAs نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند (Su and Bai 2008). تجمع پرولین در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت بوده (Alcazar et al. 2010a) و به‌طور معمول محتوی آن تحت تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Verbruggen and Hermans 2008). برخی مطالعات به وجود همبستگی بین محتوی پرولین و PAs بدلیل وجود رابطه بین متابولیسم PAs و پرولین تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما و شوری اشاره کرده‌اند (Cao et al. 2012; Song et al. 2015).

Santa-Cruz et al. (1999) گزارش کردند که در گوجه‌فرنگی متحمل به شوری با افزایش غلظت نمک تا بیش از ۲۰۰ میلی‌مولار، محتوی Put به موازات تجمع پرولین کاهش می‌یابد. Tanon et al. (2004) گزارش کردند که تحت تنش شوری با غلظت کم نمک، محتوی پرولین به موازات محتوی Put تغییر کرده در حالی‌که در غلظت بالای نمک، تغییرات متفاوتی در غلظت پرولین و Put تحت تنش شوری ایجاد می‌شود. Sanchez et al. (2005) گزارش کردند که در *Lotus glaber* L. تحت تنش شوری بلند مدت، محتوی PAs دائما به موازات تجمع پرولین تغییر نمی‌کند. در برخی گونه‌ها مانند سویا و گوجه‌فرنگی تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری با افزایش تجزیه PAs، محتوی پرولین افزایش می‌یابد (Sotiropoulos 2007). نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی در ذرت، یونجه و آرابیدوپسیس گزارش شده است (Rayapati and Stewart 1991; Kiyosue et al. 1996; Ginzberg et al. 1998). افزایش محتوی پرولین به‌عنوان اسموپروتکتنت در پاسخ به بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله خشکی (Alexieva et al. 2001)، شوری (Sairam et al. 2002) و سرما (Javadian et al. 2010) باعث محافظت از ساختار پروتئین‌ها و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود.



شکل ۱- نمایش شماتیک مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

این متابولیت به‌عنوان تعدیل‌کننده اسمزی با محافظت از ساختارهای درون سلولی در طی تنش‌های محیطی نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش در گیاهان دارد (Janmohammadi et al. 2012). از پرولین به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای تحمل به دمای پایین و سازگاری به سرما استفاده شده (Janmohammadi et al. 2012) و ارتباط مثبت و معنی‌دار آن با تحمل سرما گزارش شده است (Javadian et al. 2010). گزارش‌ها نشان داده که ژنوتیپ‌های گندمی که با تأخیر وارد مرحله زایشی شدند، محتوی پرولین بالاتری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند و با عبور ژنوتیپ‌های گندم از مرحله رویشی به زایشی و مشاهده حلقه‌های مضاعف کاهش معنی‌داری در محتوی پرولین مشاهده شد (Janmohammadi et al. 2012).

بیان ژن فرایند مولکولی مهمی است که بین تنوع ژنتیکی و رخ نمود[1] جانداران ارتباط برقرار می‌کند و تنظیم آن نقش مهمی در تنوع صفات و تکامل گونه‌ها ایفا می‌کند (Wang et al. 2018). همچنین تغییرات بیان ژن‌ها در پایه‌ریزی تنوع رخ نمود بسیاری از موجودات ایفای نقش می‌کند (Konishi et al. 2006, Hung et al. 2012). بنابراین مقایسه محتوی رونوشت در بافت، زمان و یا شرایط خاص، الگوهای اختصاصی بیان ژن در آن مرحله را مشخص می‌کند و تعیین وظایف فیزیولوژیک ژن‌ها را تسهیل می‌کند (Weiberg and Karlovsky 2009). ترنسکریپتومیکس یا تجزیه مقایسه‌ای بیان ژن در سطح RNA در یک بافت، زمان و یا شرایط خاص، عنصری کلیدی در ژنومیکس کارکردی (Functional genomics) است که درک ما را از نحوه عمل ژن‌ها افزایش می‌دهد (Weiberg and Karlovsky 2009). بنابراین مطالعه تنظیم بیان ژن‌ها، شناخت کارکرد آن‌ها و سازوکارهای مولکولی تنظیمی سامانه‌های زیستی را تسهیل می‌کند.

QPCR[2] برای بررسی خصوصیات متنوع اختصاصی ژنتیکی مؤثر در تنظیم بیان ژن‌ها در اکثر جانداران مورد استفاده قرار گرفته است (Amini et al. 2017). این مطالعات دیدگاه منطقی و عمیقی در زمینه اساس ژنتیکی تنوع طبیعی در سطح mRNA ایجاد کرده و نقش بیان ژن‌ها در ایجاد تنوع رخ نمود را مورد بررسی قرار داده‌اند. برخلاف متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های حد واسط در سازگاری کارکردی (عملکردی) در پاسخ به تغییرات محیطی مؤثرند (Kliebenstein and Osbourn 2012, Moore et al. 2014). به‌نظر می‌رسد پرولین و پوتریسین، متابولیت‌هایی هستند که در پاسخ به تنش محتوی آن‌ها افزایش می‌یابد (Alcazar and Tiburcio 2018). تنظیم بیان ژن‌ها نقش کلیدی در سنتز متابولیت‌ها داشته و در بقای موجودات در شرایط نامساعد محیطی نقش مؤثری ایفا می‌کند. این ارتباط بدون ایجاد ناهماهنگی در تنظیم بیان ژن‌هایی که در سنتز متابولیت‌های اختصاصی نقش دارند، انعطاف مناسبی در گیاهان برای سازگاری به تغییرات محیطی ایجاد می‌کند. مطالعات اخیر در خصوص بیان ژن‌ها نقش تنظیم بیان ژن‌ها را در بهبود تحمل سرما و ایجاد تنوع بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل از طریق ایجاد تنوع در متابولیت‌های اختصاصی را نمایان ساخته‌اند (Karami moalem et al. 2018).

هدف این پژوهش بررسی پاسخ‌های متابولیکی و مولکولی سازگاری به تنش سرما در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود (*C.arietinum* L.) کابلی است. شناسایی نحوه تنظیم القایی برخی مسیرهای متابولیسمی پاسخ به تنش از جمله پرولین و Put ممکن است ارزیابی آن‌ها را به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش متابولیکی در برنامه‌های اصلاحی نخود معرفی نماید. همچنین بررسی ارتباط احتمالی بین منابع ایجاد آسیب تنش و عوامل دفاعی سلول به درک بهتر نحوه بهبود تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود (*C. arietinum* L.) کابلی (Sel96th11439) (Saeed et al. 2011) متحمل به سرما با منشاء ایکاردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های (ILC482×ILWC182) و ILC533 حساس به سرما منشاء گرفته از مصر که اجداد آن هنوز ردیابی نشده‌اند (Heidarvand et al. 2011; Saeed et al. 2011) که از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شدند، استفاده شد. بذور با هیپوکلریت سدیم ۱۰

[1] Phenotype
[2] Quantitative PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

درصد به مدت ۱۰ 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 بیست و سه درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ شبانه روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های سایز ۱۲ (با قطر دهانه دوازده سانتی‌متر و ارتفاع ده سانتی‌متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به ۰/۲۵ حجمی) انتقال یافت. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور دویست میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ قرار داده شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها (با ارتفاع حدود بیست سانتی‌متر و دارای حداقل پنج شاخه به طول پنج تا هشت سانتی‌متر) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اسپادانا، ایران) با دمای ٤˚C به‌عنوان دمای LT_{50}[1] نخود (Nayyar et al. 2005; Kazemi-Shahandashti et al. 2013) منتقل شدند و نمونه‌گیری از برگ‌های میانی هر گیاهچه به‌عنوان برگ‌های فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (٢٤ ساعت پس از آغاز تنش سرما، جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) انجام شد (Rakei et al. 2016). نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد نیز به‌عنوان گیاهان شاهد انجام گرفت (سن فیزیولوژیک تمام گیاهان یگسان درنظر گرفته شد (Hurry and Huner 1991; Kazemi-Shahandashti et al. 2014)). بنابراین در این پژوهش اثر سه نوع تیمار دمایی (شامل گیاهچه‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌ها یک روز و شش روز پس از شروع تنش سرما) در دو ژنوتیپ متحمل و حساس بررسی شد.

مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم نمونه تازه برگی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس ۵ 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 ۱۵دقیقه و در دمای ٤˚C با سرعت g ×۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر 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 ۳۹۰nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) اندازه‌گیری شد (Loreto and Velikova. 2001). نتایج به‌صورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش کمی Put به روش Walter and Geun (1987) انجام شد. ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در دو میلی‌لیتر محلول پرکلریک اسید (PCA[2]) چهار درصد حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوهپتان[3] (۵ 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[4] (۱۰میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر استون) اضافه و مخلوط شد. پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول پرولین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دانسیل‌کلراید 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 دو دقیقه فاز آلی برداشته و این محلول برای ارزیابی Put توسط HPLC استفاده شد. به منظور ارزیابی کمی Put ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی به ستون Chrompack-Nederland در دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 تزریق شد. دتکتور این دستگاه از نوع UV است که در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از نمونه‌های استاندارد برای تعیین وجود Put و غلظت‌سنجی آن استفاده شد.

بر اساس روش López-Gómez et al. (2014)، پس از پودر کردن ۰/٤ گرم بافت برگی در ۱/۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=٦/۵) نمونه‌ها سانتریفوژ (٤˚C، min ۲۰، g × ۱۰۰۰۰) و مایع رویی برداشته شد. واکنش سنجش

[1] Lethal temprature 50

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

فعالیت آنزیم DAO حاوی ۶۳۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵، ۷۰ میکرولیتر محلول واکنش (۶/۲۵ میکرولیتر انان- دی‌متیل‌آنیلین[1]، ۲/۵ میلی‌گرم ۴-آمینوآنتی‌پرین[2]، ۲۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیداز (۱/۴۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برگی و ۱۰۰ میکرولیتر Put (۳/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۶/۵) بود. میزان فعالیت این آنزیم در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

پس از پودر کردن ۰/۲ گرم بافت برگی در چهار میلی‌لیتر محلول ECA (حاوی اتانول، کلروفرم و هیدروکلریک اسید (HCl ۰/۱ مولار) به نسبت ۱۲:۵:۱ (حجمی/ حجمی/ حجمی) از فیلتر پارچه‌ای عبور داده شد و به داخل فالکون منتقل شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها (۴ °C، ۱۰ min، g × ۱۰۰۰۰)، مایع رویی به فالکون‌های جدید منتقل و با ۱/۵ میلی‌لیتر آب و ۲/۳ میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط شد. نمونه‌ها مجددا سانتریفوژ (۴ °C، ۱۰ min، × g ۱۲۰۰) شدند و دو میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به داخل تیوپ منتقل شد و به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شد (Palma et al. 2015). به هر تیوپ ۲۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات (Na_2CO_3) و سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول دنسیل‌کلراید (۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر استون) افزوده شد. سپس برای انجام کامل واکنش، نمونه‌ها به مدت ۲۰ ساعت در اتاق تاریک قرار گرفتند. ۱۰۰ میکرولیتر Spd (۱۰۰ میلی‌گرم Spd در یک میلی‌لیتر آب) برای انجام واکنش دانسیلاسیون به هر نمونه افزوده شد و برای انجام کامل واکنش نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار گرفتند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر تولوئن به منظور استخراج مشتقات دانسیل افزوده شد. سپس سانتریفوژ (۴ °C، ۵ min، g × ۵۵۰۰) انجام و فاز بالایی برداشته و به تیوپ جدید انتقال یافت. محتوی تیوپ در دستگاه Speed back خشک شد. ۵۰ میکرولیتر استونیتریل به هر تیوپ اضافه و سانتریفوژ (۴ °C، ۱۰ min، g × ۱۰۰۰۰) شد. ۳۰ میکرولیتر از این محلول در شیشه مخصوص HPLC ریخته شد و سپس محتوی پرولین به مدت شش دقیقه برای هر نمونه در دستگاه HPLC قرائت شد (Palma et al. 2015).

استخراج RNA کل سلول به روش ترایزول با ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگی خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد (شکل ۱). تشکیل دو باند RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۵S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific model 1000) در طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (Ambion, Texas, USA) 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. به‌منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات (dNTPs) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv (Bio-RAD California, USA) به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°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* (Peng et al. 2010)، (*Actin1*) ژنوم نخود بر روی cDNA سنتز شده، پس از رقیق‌سازی و

[1] NN-dimethylaniline
[2] 4-aminoantiprine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

رساندن غلظت cDNA به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر (توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز یک درصد) استفاده شد. نتایج حاکی از مطابقت اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار (۱۸۹جفت‌باز) بود. ۱۱٤۵ نانوگرم در میکرولیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen (Invitrogen)، سه میکرولیتر آب‌مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۲۰) بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 (Bio-RAD) 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 Tm ۵۷°C آغازگر و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C. تایید اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب انجام شد. منحنی ذوب با خنک شدن تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در ثانیه ثبت شد، سپس در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند و سپس با گرمایش آهسته با سرعت ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در ثانیه تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. فلورسانس به‌طور مداوم در طول دوره افزایش آهسته دما برای نظارت بر تفکیک رنگ Evagreen اندازه‌گیری شد. ترسیم سیگنال‌های فلورسانس به‌طور خودکار در زمان واقعی و در مقابل دما برای ایجاد منحنی‌های ذوب انجام گرفت. بر اساس منحنی‌های استاندارد رسم شده حاصل از پنج سریال رقت (۱، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰) کارایی PCR در تمام آغازگرها در حدود ۱/۹ تا ۲ بود و شیب خط رگرسیون بین و ۳/۲۳- و ۳/٤۲- بود (*Actin1*) (Pfaffl 2001). نسبت بیان نسبی هر توالی با توجه به شاخص Cq محاسبه شده که میانگین کارآیی PCR ژن‌های خانه‌دار مورد نظر در Plate را در بر می‌گیرد. با توجه به نتایج منحنی‌های استاندارد، از نرم‌افزار REST می‌توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه‌دار (*Actin1*) در هر نمونه مشخص با روش $^{-\Delta\Delta CT}$۲به‌عنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (Livak and Schmittgen 2001). در این روش بیان ژن مورد نظر با بیان *Actin1* که یک ژن خانه‌دار تنظیم شده است نرمال شده و بیان دائم آن توسط نرم‌افزار geNorm v3.4 تأیید شد. سپس از مقادیر نرمال شده برای مقایسه بیان متفاوت ژن‌ها در نمونه‌های مختلف استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن اختصاصی *DAO* و ژن خانه‌دار*Actin1* با استفاده از تارنمای Integrated DNA Technologies, Inc.(IDT) به آدرس (https://www.idtdna.com) برای دستیابی به آغازگرهای دارای خصوصیات مناسب انجام گرفت. در جدول ۱ نام آغازگرهای ژن‌های اختصاصی و خانه‌دار، توالی و شماره دسترسی آن‌ها ارائه شده است.

این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با نمونه‌گیری تصادفی و سه تکرار زیستی برای آزمایش‌های بخش فیزیولوژی و دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای آزمایش‌های بخش بیان نسبی ژن *DAO* انجام شد و آزمون مقایسهٔ میانگین به روش دانکن (p<۰/۰۱) و با نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

جدول۱- توالی‌های آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (QPCR)

Accession number	Gene name	Protein name	Sequence (5′-3′)	T_m (°C)	Amplicon length (bp)
AJ009825	*DAO*	Diamine oxidase	F: CTGTGCCTACTGCTGAGAAA R:TGAACCTTGTGGTTGATGACTA	57	101
EU529707.1	*Act1*	Actin1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT	57	189

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

نتایج و بحث

تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H_2O_2، پرولین، Put، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن *DAO* ($p<۰/۰۱$) وجود داشت (جدول ۲).

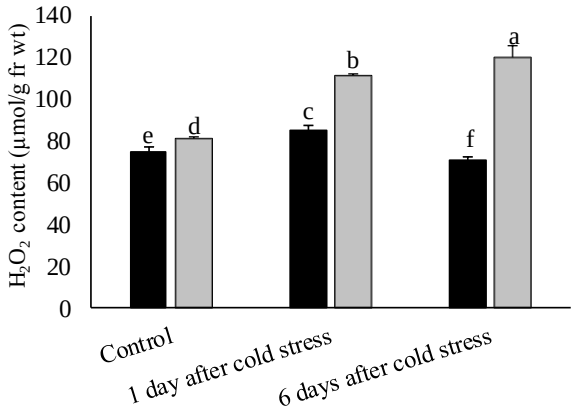
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده در دو ژنوتیپ حساس و متحمل نخود زراعی در سطوح مختلف تنش سرما

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		H_2O_2	Put	Proline	DAO	*DAO*
ژنوتیپ	۱	۳۳۲۷/٦٤**	۳۱٦٦/۲۲**	۱۳/۷۸**	۱/۸۰**	۱/٦٥**
دما	۲	۷٤۸/۹۸**	۷٦۸/٥۱**	۳۱/۸۲**	۳/۰٥**	٤/٥٤**
ژنوتیپ × دما	۲	٦٦٤/۸۸**	۲۳۰/٥٤**	۱/۲۹**	۰/٥٦**	۰/۸٦**
خطا	۱۲	۱	٥/٥۳	۰/۰۱٦	۰/۰٦	۰/۰۱۲
ضریب تغییرات (٪)		۱/۱	۹/۱۰	۲/٦٦	۱۷/۷۰	٥/۹۱

** بیانگر معنی‌داری در سطح یک درصد است.

میزان تجمع H_2O_2 که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (Kazemi Shahandashti and Maali Amiri 2018)، تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (حداکثر بیش از ٦۹ ٪ در روز ششم تنش). در ژنوتیپ متحمل میزان H_2O_2 پس از افزایش معنی‌دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش یافته، به‌طوری‌که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر شد (بیش از ٤/۷٪)، در حالی‌که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد به‌طور پیوسته افزایش یافت (تا ۵۰٪) (شکل ۲). بنابراین درجه تحمل به تنش سرما در دو ژنوتیپ نخود با یکدیگر متفاوت بوده به‌طوری‌که این نتایج بیانگر ارتباط احتمالی تأثیر پاسخ‌های دفاعی ژنوتیپ‌های نخود می‌باشد.

در گیاهان بخشی از سازگاری به تنش در اثر تنظیم میزان پرولین از طریق مسیرهای بیوسنتزی آن و یا فعالیت مسیر تخریب پلی‌آمین‌ها مانند Put ایجاد می‌شود (Su and Bai 2008). نتایج نشان داد که در شرایط شاهد میزان متابولیت‌ها و فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۳ الف، ب، ج). تحت تنش سرما میزان پرولین، Put، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن *DAO* در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت به‌طوری‌که این افزایش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی‌دار بود، چنین نتایجی بیانگر پاسخ‌های ژنتیکی مطلوب ژنوتیپ متحمل در جهت حفظ محتوی GABA برای مقابله با آثار مخرب ROS سلولی است (شکل ۳).



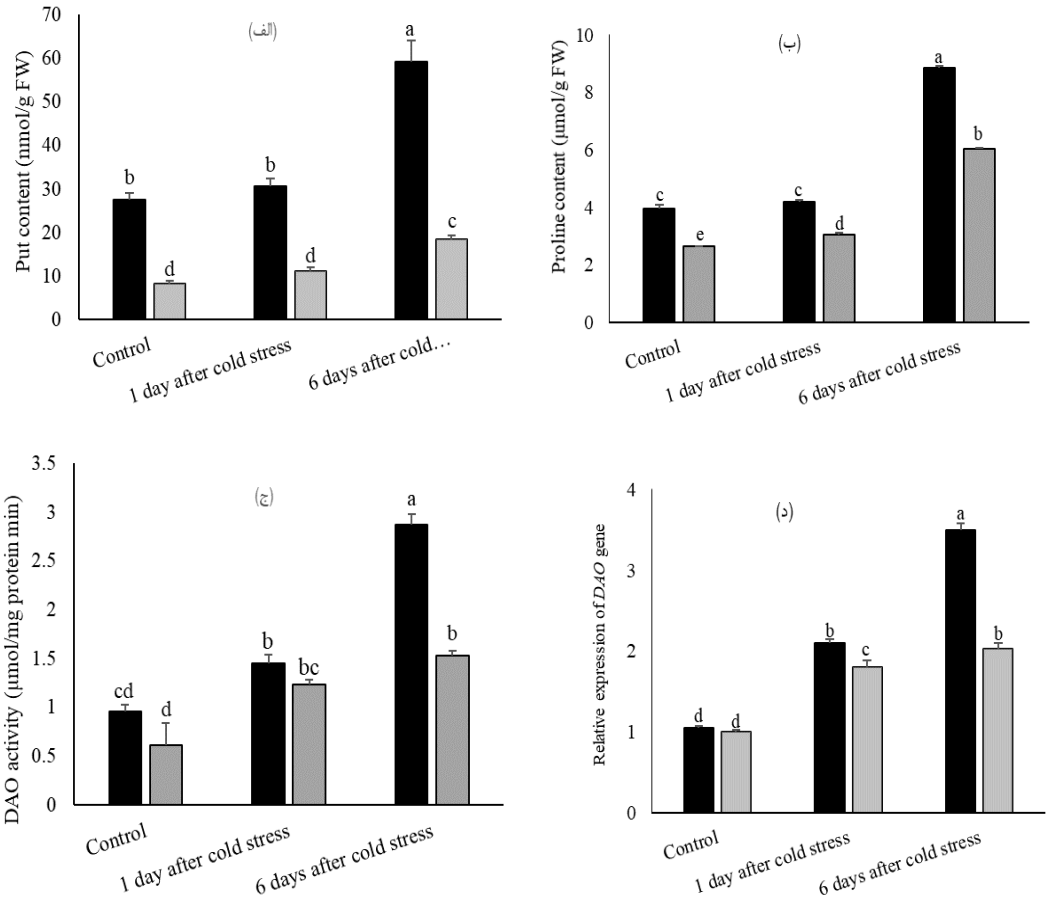
شکل ۲- تغییر میزان H2O2 در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (23 °C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (٤ °C). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

در ژنوتیپ متحمل میزان Put در مقایسه با شاهد در روز اول افزایش نسبی غیر معنی‌دار و در روز ششم تنش افزایش ۱۱٦٪ داشت در حالی‌که در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش افزایش میزان این متابولیت در مقایسه با ژنوتیپ متحمل کمتر بود (تا ۱٤٪) (شکل ۳- الف). این نتایج با یافته‌های آزمایش در گیاهان زراعی که در آن‌ها تحت تنش سرما میزان Put آزاد افزایش یافته، هماهنگ است (Zhang et al. 2013). بنابراین به‌نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی‌داری بین میزان آسیب سرما (از جمله نتایج H_2O_2) و افزایش میزان Put وجود داشته، به‌طوری‌که این نتایج با گزارش Kim et al. (2002) در مورد اثر اسپری‌پاشی Put بر تسریع افزایش پایداری غشای گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما هم‌خوانی داشت. آمین‌آکسیدازها (AOs) در مسیر تجزیه پلی‌آمین‌ها، با اتصال به رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و خنثی‌سازی آن‌ها، H_2O_2 نیز تولید می‌کنند (Groppa and Benavides 2008). این فرایند در هموستازی سلول و بهبود

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

تحمل سرما نقش حیاتی دارد. 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 مطابقت داشت.

پرولین یکی از ترکیبات سازگارساز سلولی است که در حفاظت از اجزای سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش ایفای نقش می‌کند (Kamiab et al. 2014). اگرچه مسیر بیوسنتز پرولین از پیش‌ماده گلوتامیک اسید نقش مهمی در تنظیم محتوی این متابولیت دارد، با این وجود مسیر تجزیه PAs نیز بخشی از مسیر تنظیم محتوی پرولین در سلول است (Su and Bai 2008). نتایج نشان داد تحت تنش محتوی پرولین در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت به طوری‌که بیشترین محتوی آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا بیش از ۲ برابر) (شکل ۳ ب).



شکل ۳- تغییر میزان پوتریسین (Put) (الف) و پرولین (ب)، فعالیت آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) (ج) و بیان ژن دی‌آمین‌اکسیداز (*DAO*) (د) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (23 °C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (٤ °C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

در ژنوتیپ حساس هم محتوی پرولین در روز ششم تنش در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافت (تا بیش‌از ۱/۳ برابر)، اگرچه تجمع آن در ژنوتیپ متحمل هم در شرایط شاهد و هم تحت تنش به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳ ب). افزایش محتوی پرولین در ژنوتیپ حساس بیانگر تلاش سلول به‌منظور حذف آثار نامطلوب خسارت اکسیداتیو و بازگشت به حالت طبیعی است. نتایج این پژوهش با یافته‌های پیشین در گیاهان زراعی و درختان میوه که در آن‌ها تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما و شوری محتوی پرولین افزایش یافته، مطابقت دارد (Aziz et al. 1998; Su and Bai. 2008; Shang et al. 2011;

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

(Cao et al. 2012; Palma et al. 2016; Song et al. 2015). همخوانی بین الگوی تجمع پرولین و کاهش معنی‌دار خسارت سلولی در روز ششم تنش به‌خصوص در ژنوتیپ متحمل بیانگر نقش پرولین در حذف ROSها است (شکل‌های ۲ و ۳ ب). بنابراین پرولین به‌عنوان اسموپروتکتنت غیرآنزیمی با حذف ROSها در پاسخ به تنش ایفای نقش می‌کند (Kamiab et al. 2014). به‌نظر می‌رسد عدم افزایش معنی‌دار پرولین در پاسخ زودهنگام ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد، به‌دلیل فعالیت بیشتر سایر سامانه‌های دفاعی برای بهبود تحمل به سرما باشد (شکل ۲). این یافته‌ها با گزارشات پیشین در خصوص اینکه پرولین در پاسخ‌های دیرهنگام گیاه به تنش‌های محیطی تجمع یافته و در شرایط بازیابی پس از تنش، محتوی افزایش یافته آن به‌عنوان منبع نیتروژن و بهبود دهنده علایم تنش مؤثر است، همخوانی دارد (Aziz et al. 1998). با توجه به هماهنگی تغییر الگوی پرولین با سایر متابولیت‌ها و اجزا دفاعی سلول همزمان با کاهش خسارت‌های سلولی در این آزمایش، به‌نظر می‌رسد که تحت تنش سرما شبکه‌ای از پاسخ‌های دفاعی به‌منظور بهبود تحمل به تنش سرما در نخود فعال شده است. در ژنوتیپ متحمل نخود با توجه به کاهش معنی‌دار میزان H_2O_2 تحت تنش سرما، احتمالا همکاری پرولین با سایر متابولیت‌ها در کاهش خسارت اکسیداتیو موثر بوده است. از دیدگاه فیزیولوژیک، مسیر کاتابولیسم PAs در گیاهان به‌دلیل ایفای نقش Put به‌عنوان پیش‌ساز بخشی از پرولین تجمع‌یافته تحت تنش، در همکاری با مسیر عمده بیوسنتز پرولین با پیش‌ساز گلوتامیک اسید در بهبود پاسخ نخود به تنش سرما نقش دارد. بنابراین افزایش محتوی پرولین تحت تنش و همچنین در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با حساس (شکل۳ ب) بیانگر وجود ارتباط مسیر متابولیسمی PAs و پرولین از طریق سنتز ATP و NADH می‌باشد (Su and Bai. 2008). گزارش شده که در سویا تحت تنش شوری، بخشی از پرولین تجمع یافته از طریق مسیر تجزیه PAs سنتز شده است (Su and Bai 2008). وجود همبستگی بین پرولین و PAs در گونه‌های دیگر از جمله گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما (Song et al. 2015)، سویا (Su and Bai, 2008)، کلزا (Aziz and Larher, 1995)، گوجه‌فرنگی (Aziz et al. 1998; Santa-Cruz et al. 1999)، کالوس *Fraxinus angustifolia* (Tonon et al. 2004) و *Loutus glaber* (Sanchez et al. 2005) تحت تنش شوری نیز مؤید نتایج این آزمایش است. اثر مثبت اسپری‌پاشی Put و اثر منفی تیمار آمینوگوانیدین (مهارکننده DAO) بر تجمع پرولین در گیاهان زراعی تحت تنش‌های محیطی (Aziz et al. 1998; Su and Bai 2008; Li et al. 2014) که بر فرایندهای سلولی از جمله تنظیم اسمزی و فشار تورگر، تعویق پیری، پایداری غشاء سلولی تاثیر می‌گذارد بیانگر نقش مسیر تجزیه Put در سنتز این اسموپروتکتنت (پرولین) است.

مطابق با الگوی تغییر Put و پرولین تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ متحمل و حساس در مقایسه با شاهد به‌طور تدریجی افزایش یافت (حداکثر تا بیش از سه برابر) و در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل به بالاترین میزان رسید (شکل ۳–ج). فعالیت آنزیم DAO در بذر برنج تحت تنش سرما مانند نتایج این آزمایش روند افزایشی بود Sheteiwy et al. (2017). اگرچه تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد فعالیت DAO در ژنوتیپ حساس نیز روند افزایشی داشت (حداکثر تا ۲/۵ برابر)، اما این روند صعودی در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل کندتر بود (شکل ۳–ج). نرخ کند افزایش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل احتمالا به‌دلیل ضعف سامانه‌های دفاعی ژنوتیپ حساس در بهبود تحمل سرما در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود، نتایجی که با روند تغییر Put تحت تنش سرما مطابقت داشت.

الگوی تغییر H_2O_2 در ژنوتیپ متحمل در شرایط شاهد و تحت تنش سرما برخلاف فعالیت DAO بود که احتمالاً به‌دلیل کارایی مطلوب ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در حذف H_2O_2 توسط فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی است (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). این نتایج با یافته‌های Duan et al. (2008) که گزارش کردند، تحت تنش شوری همزمان با افزایش میزان Put فعالیت آنزیم DAO افزایش یافته و میزان این پلی‌آمین با فعالیت آنزیم DAO در ارتباط است، همخوانی داشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد که فعالیت DAO تحت تنش سرما وابسته به غلظت Put در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما به‌منظور پاسخ به آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) بوده، اگرچه در ژنوتیپ متحمل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

با فعالیت شدیدتر این آنزیم به‌دلیل تجمع بیشتر Put با کاهش شدیدتر H_2O_2 همراه بود. پژوهش‌ها نشان داده که در گوجه‌فرنگی سازگار شده به سرما فعالیت DAO در رقم متحمل به‌طور چشمگیری در مقایسه با حساس افزایش یافت (Song et al. 2015). بنابراین افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده Put از طریق کاراتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می‌تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما نقش داشته باشد (Shelp et al. 2012a). تحت تنش‌های محیطی کاتابولیسم Put علاوه بر ایفای نقش در سازوکارهای دفاعی در بسیاری از فرایندهای رشد و نموی (از جمله جوانه‌زنی، استحکام دیواره سلولی، نمو ریشه، رسیدن میوه و پیری)، شار کربن، چرخه TCA و پیام‌رسانی سلولی مشارکت دارد (Tavladoraki et al. 2012). همچنین اگرچه مسیر بیوسنتز PAs نقش مهمی در تنظیم میزان این متابولیت‌ها دارد، مسیر تجزیه آن‌ها نیز از یک سو به‌دلیل ارتباط با مسیرهای متابولیسمی متعدد آمینواسیدها و از سوی دیگر تولید مولکول‌های پیام‌رسان پرولین و H_2O_2 در هموستازی آن‌ها مؤثر است (Moschou et al. 2012). بنابراین نتایج این پژوهش، الگوی متمایز فعالیت آنزیم DAO در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل و همچنین پاسخ‌های زودهنگام و دیرهنگام به سرما در نخود زراعی را نشان داده، به‌طوری‌که مطالعه فعالیت این آنزیم به‌عنوان عامل مؤثر در یکی از دو مسیر تولید Put و پرولین در شرایط آزمایش تاییدکننده اختلافات در تجمع این متابولیت‌ها به‌عنوان شاخص‌های تحمل در برابر عوامل آسیب‌های سلولی (نتایج H_2O_2) در ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما است.

ژن *DAO* (*CuAO*) رمز کننده آنزیم DAO یکی از اجزای این مسیر بیوسنتزی در شبکه متابولیک پاسخ به تنش‌های محیطی است (Wimalasekera et al. 2011b). به‌منظور دستیابی به اساس مولکولی چگونگی تغییر متابولیت پرولین در پاسخ به تنش سرما، بیان نسبی ژن *DAO* بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی توالی رمزکننده آنزیم DAO در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد به‌طور پیوسته افزایش یافت (تقریبا حداکثر تا بیش از ۳/۳ برابر) (شکل ۳ د) که حاکی از مؤثرتر بودن این مسیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در جهت القا تحمل به سرما بود. در روز اول و همچنین روز ششم تنش سرما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (حداکثر تا بیش از ۱/۷ برابر در روز ششم پس از تنش سرما) (شکل ۳ د). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به‌ترتیب بیش از ۲/۲ و ۳/۵ برابر افزایش یافت (شکل ۳ د). این نتایج بیانگر القاء مؤثرتر فعالیت ژنوم در سطح رونویسی به‌منظور آماده سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر به موازات بروز کمترین خسارت می‌باشد. همچنین بیان این ژن با نتایج میزان پرولین تحت تنش مطابقت داشت، که نشان می‌دهد بیان این ژن با تنظیم میزان این متابولیت در سطح رونویسی مسئول پاسخ به سرما در نخود بوده، مشاهداتی که توسط نتایج شاخص آسیب سلولی نیز تایید شد. این یافته‌ها با نتایج Tanou et al. (2014) که گزارش کردند که تحت تنش شوری بیان نسبی ژن‌های مسیر تجزیه PAs (*DAO* و*PAO*) در نارنج (*Citrus aurantium* L.) افزایش یافته، هماهنگ است. همچنین موتاسیون در ژن *CuAo* سبب حساسیت آرابیدوپسیس به تنش اسمزی شد (Wimalasekera et al. 2011b). بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده، القای بیان این ژن در گیاهان متحمل در اثر برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها و هوموستازی سلولی نقش مؤثری در ایجاد الگوی پاسخ‌های سازگاری به تنش سرما ایفاء می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

ارتباط شاخص آسیب سلولی (H_2O_2) و میزان متابولیت‌های اندازه‌گیری شده (Put و پرولین) در این آزمایش ناهمسو بود، به‌طوری که تجمع این متابولیت‌ها در ژنوتیپ متحمل به موازات فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن *CaDAO*، با کاهش آسیب سلولی در ارتباط بود. به‌نظر می‌رسد این فرایندها غالباً همراه با القای سامانه‌های دفاعی خواهد بود. پاسخ‌های متمایز زودهنگام و دیرهنگام ژنوتیپ‌ها به تنش سرما بیانگر راهبرد چندگانه دفاعی سلول نخود به تنش سرما است. نتایج نشان داد که در نخود تجمع بیشتر پرولین به‌عنوان اسموپروتکتنت سلولی با کاهش میزان آسیب‌های سلولی و تحمل بیشتری به تنش سرما همراه بود و این موضوع احتمالاً می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مد نظر قرار گیرد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

منابع

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

Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Altabella T (2010b). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. Plant Physiology Biochemistry 48:547-552.

Alcázar R, Tiburcio AF (Eds.). (2018) Polyamines: Methods and Protocols. Humana Press.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell & Environment 24:1337-1344.

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

Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P, Tisi A (2010) Plant amine oxidases "on the move": an update. Plant Physiology Biochemistry 48:560-564.

Aziz A, Larher F (1995) Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. Plant Science 112:175-186.

Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F (1998) Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. Physiologia Plantarum 104:195-202.

Cao S, Cai Y, Yang Z, Zheng Y (2012) MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and gamma-aminobutyric acid contents. Food Chemistry 133:1466-1470.

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.

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

Duan J, Li J, Guo S, Kang Y (2008) Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. Journal of Plant Physiology 165:1620-1635.

Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Zilberstein A (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Molcular Biology 38:755-764.

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

Handa AK, Nambeesan S, Mengiste T, Laluk K, AbuQamar S, Mattoo AK (2010, July). Polyamine spermidine is an upstream negator of ethylene-regulated pathogenesis of Botrytis cinerea in tomato leaf. In *III International Symposium on Tomato Diseases* 914:109-112.

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 (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology 170:459-469.

Hung HY, Shannon LM, Tian F, Bradbury PJ, Chen C, Flint-Garcia SA, Holland JB (2012) ZmCCT and the genetic basis of day-length adaptation underlying the post domestication spread of maize. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:E1913-E1921.

Hurry VM, Huner NPA (1991) Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. Plant Physiolgy 96:491–497.

Janmohammadi M, Abbasi A, Sabaghnia N (2012) Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). Acta Agriculture Slovenica 99:31.

Javadian N, Karimzadeh G, Mahfoozi S, Ghanati F (2010) Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. Russ. Journal of Plant Physiology 57:540-547.

Kamiab F, Talaie A, Khezri M, Javanshah A (2014) Exogenous applications of free polyamines enhance salt tolerance of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. Plant Growth Regul 72:257-268.

Karami-Moalem S, Maali-Amiri R, Kazemi-Shahandashti SS (2018) Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. Plant Physiology and Biochemistry 122:31-39.

Kazemi Shahandashti SS, Maali Amiri R, Zeinali H, Ramezanpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Molecular Biology Reporter 40:893-903.

Kazemi-Shahandashti 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.

Kazemi-Shahandashti 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. Journal Plant of Physiology 171:1106-1116.

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* L.). Physiologia Plantarum 115:370-376.

Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. Plant Cell 8:1323-1335.

Kliebenstein DJ, and Osbourn A (2012) Making new molecules evolution of pathways for novel metabolites in plants. Current opinion in plant biology 15:415-423.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Konishi S, Izawa T, Lin SY, Ebana K, Fukuta Y, Sasaki T, and Yano M (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science 312:1392–1396.

Li Z, Peng Y, Zhang XQ, Ma X, Huang LK, Yan YH (2014) Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. Molecules 19:18003-18024.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. Methods 25:402-408.

López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Iribarne C, Lluch C (2014) Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of Medicago sativa in symbiosis with Sinorhizobium meliloti during the initial response to salinity. Plant Soil 374:149-159.

Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant 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.

Minocha R, Majumdar R, Minocha SC (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. Frontiers in plant science 5:175.

Moore BD, Andrew RL, K€ulheim C, and Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytologist 201:733–750.

Moschou PN, Wu J, Cona A, Tavladoraki P, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA (2012) The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. Journal of experimental botany 63:5003–5015.

Nayyar H, Satwinder K, Kumar S, Singh KJ, Dhir KK (2005) Involvement of polyamines in the contrasting sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) to water deficit stress. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46.

Palma F, Carvajal F, Ramos JM (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.

Palma F, Carvajal F, Jamilena M, Garrido D (2016) Putrescine treatment increases the antioxidant response and carbohydrate content in zucchini fruit stored at low temperature. Postharvest Biology and Technology 118:68-70.

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.

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.

Rayapati PJ, Stewart CR (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. Plant Physiology 95:787-791.

Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri SK, Nazaryan R (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. Plant Molecular Biology Reporter 29:848-858.

Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163:1037-1046.

Sanchez DH, Cuevas JC Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. Plant Science 168:541-546.

Sanchez DH, Cuevas JC, Chiesa MA, Ruiz OA (2005) Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. Plant Science 168:541-546.

Santa-Cruz A, Acosta M, Rus A, Bolarin MC (1999) Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. Plant Physiology and Biochemistry 37:65-71.

Shang H, Cao S, Yang Z, Cai Y, Zheng Y (2011) Effect of exogenous γ-aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. Journal of Agricultural Food Chemistry 59:1264-1268.

Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ (2012a) Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. Plant Science 193:130-135.

Sheteiwy M, Shen H, Xu J, Guan Y, Song W, Hu J (2017)Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5-aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Environmental and Experimental Botany 137:58-72.

Song Y, Diao Q, Qi H (2015) Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. Plant Growth Regulation 75:21-32.

Sotiropoulos TE (2007) Effect of NaCl and CaCl2 on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biologia plantarum 51:177-180.

Su GX, Bai X (2008) Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. Plant Cell Environment 52:796.

Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Molassiotis A (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. Plant Cell Environ 37:864-885.

Tavakoli M, Poustini K, Alizadeh H (2016) Proline accumulation and related genes in wheat leaves under salinity stress. Journal of Agricultural Science 18:707-716.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Tavladoraki P. Cona A, Federico R, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Agostinelli E (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. Amino acids 42:411-426.

Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M, Alcázar R (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. Planta 240:1-18.

Tonon G, Kevers C, Faivre-Rampant O, Graziani M, Gaspar T (2004) Effect of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on proline and free polyamine levels in embryogenic Fraxinus angustifolia callus. Journal of Plant Physiology 161:701-708.

Turchetto-Zolet AC, Margis-Pinheiro M, Margis R (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. Molecular Genetics and Genomics 281:87-97.

Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. Amino acids 35:753-759.

Walter HJP, Geuns JM (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. Plant Physiology 83:232-234.

Wang X, Chen Q, Wu Y, Lemmon ZH, Xu G, Huang C, Tian F (2018) Genome-wide analysis of transcriptional variability in a large maize-teosinte population. Molecular plant 11:443-459.

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

Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GFE (2011b) *COPPER AMINE OXIDASE1* (*CuAO1*) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. Molecular Plant 4:663–678.

Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011a) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. Plant Science 181:593–603.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]