

Improvement of cold tolerance of chickpea through heavy polyamines catabolism and ethylene phytohormone

Saeed Amini 

Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, P. O. Box: 31535-1516, Karaj, Iran, Tel: 09384528570, E-mail address: s.amini@areeo.ac.ir

Reza Maali-Amiri 

*Corresponding author. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, Tel: 09124190124, E-mail address: rmamiri@ut.ac.ir

Hasan Zeinali

Professor, Faculty member of Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Tel: 09123623109, E-mail address: hzeinali1336@yahoo.com

Abstract

Objective

The current study was undertaken to investigate if there is a relationship between metabolism of ethylene and heavy polyamines (PAs) under cold stress in cold-tolerant and cold-sensitive chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes.

Materials and methods

In this research, content of ethylene, heavy polyamines (spermidine (Spd) and spermine (Spm)), activities of PAs degradation pathway enzymes (polyamine oxidase (PAO) and diamine oxidase (DAO)), hydrogen peroxide (H₂O₂) and relative expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) and 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase (ACO) genes in cold-tolerant (Sel 96th11439) and cold-sensitive (ILC 533) chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes during the first and sixth days of cold stress at 4 °C compared to control condition as a factorial experiment in a Completely Randomized Design were investigated.

Results

During cold stress, both genotypes showed a significant increase in Spd and Spm content (66.66 and 96.23%). Ethylene production was declined in cold-sensitive genotype under cold stress compared to control conditions (up to 26.08%) while in the cold-tolerant genotype, the unique ethylene peak in early response (on the first day of stress) compared to control conditions (15.62%) was closely related to increased heavy polyamine accumulation. In the tolerant genotype, the increase in polyamine oxidase (PAO) and diamine oxidase (DAO) activity in early responses, (By 2.6- and 3.01-fold, respectively) was related to the increase in ethylene biosynthesis, as well as a concomitant increase in heavy polyamine (Spd & Spm) content by cold stress. In the tolerant genotype, the relative expression of *ACS* and *ACO* genes, after a significant increase on the first day of cold stress (5.2- and 4.03-fold, respectively), showed a significant decrease on the sixth day of the stress compared to the control plants, while a continuous decreasing trend (35- and 21.7-fold, respectively) was observed in the sensitive genotype compared to the control condition.

Conclusions

Findings of this research suggest that ethylene is intimately involved in improvement of cold stress tolerance through activation of a complex pathway of signalling by H₂O₂ that is polyamine catabolism-dependent.

Keywords: Ethylene metabolism, Hydrogen peroxide, Heavy Polyamines, Cold stress, Chickpea.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Amini S, Maali-Amiri R, Zeinali H (2023) Improvement of cold tolerance of chickpea through heavy polyamines catabolism and ethylene phytohormone. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 1-26.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 1-26.

DOI: 10.22103/jab.2022.19539.1403

Received: November 6, 2022.

Received in revised form: December 10, 2022.

Accepted: December 10, 2022.

Published online: February 18, 2023

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بهبود تحمل سرمای نخود زراعی از طریق تجزیه پلی آمین های با وزن مولکولی بالا و هورمون اتیلن

سعید امینی 

استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، تلفن: ۰۹۳۸۴۵۲۸۵۷۰، رایانامه: s.amini@areeo.ac.ir

رضا معالی امیری 

*نویسنده مسئول، استاد گروه زرع و اصلاح نباتات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۹۰۱۲۴، رایانامه: rmamiri@ut.ac.ir

حسن زینالی

استاد گروه زرع و اصلاح نباتات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران، تلفن: ۰۹۱۲۳۶۲۳۱۰۹، ایمیل: hzeinali1336@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰

چکیده

هدف: این تحقیق به منظور بررسی نقش ارتباط بین سوخت و ساز پلی آمین ها (PAS) و اتیلن در پاسخ به تنش سرما در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96th11439) و حساس (ILC 533) به سرمای نخود انجام شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق میزان اتیلن، PAS با وزن مولکولی بالا (اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm))، فعالیت آنزیم های پلی آمین اکسیداز (PAO) و دی آمین اکسیداز (DAO)، بیان نسبی ژن های ۱-آمینو سیکلوپروپان ۱-کربوکسیلیک اسید سنتاز (ACS) و ۱-آمینو سیکلوپروپان ۱-کربوکسیلیک اسید اکسیداز (ACO) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طی روزهای اول و ششم پس از آغاز تنش سرما $4^{\circ}C$ در مقایسه با شرایط کنترل به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد.

نتایج: تحت تنش سرما هر دو ژنوتیپ افزایش معنی داری در محتوی Spd و Spm (به ترتیب حداکثر تا ۶۶/۶۶ درصد و ۹۶/۲۳ درصد) نشان دادند. تحت تنش سرما بیوسنتز اتیلن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط کنترل کاهش یافت (۲۶/۰۸ درصد) در حالی که در ژنوتیپ متحمل به سرما، حداکثر تجمع اتیلن در روز اول تنش در مقایسه با شرایط کنترل (۱۵/۶۴ درصد) ارتباط نزدیکی

با افزایش تجمع PAS با وزن مولکولی بالا داشت. در ژنوتیپ متحمل افزایش فعالیت پلی‌آمین‌اکسیداز (PAO) و دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) (به ترتیب ۲/۶ و ۳/۰۱ برابر) در پاسخ‌های زود هنگام با افزایش بیوسنتز اتیلن و همچنین افزایش همزمان محتوی PAS تحت تنش سرما در ارتباط بود. در ژنوتیپ متحمل بیان نسبی ژن‌های ACS و ACO پس از یک افزایش معنی‌دار در روز اول تنش سرما (به ترتیب ۵/۲ و ۴/۰۳ برابر) کاهش معنی‌داری در روز ششم تنش در مقایسه با گیاهان کنترل نشان داد در حالیکه روند کاهشی مداوم (به ترتیب ۳۵ و ۷/۲۱ برابر) در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق بیانگر آن است که اتیلن از طریق فعال‌سازی مسیر پیچیده پیام‌رسانی H_2O_2 که وابسته به تجزیه زیستی PAS است، مستقیماً در بهبود تحمل به تنش سرما موثر بود. این نتایج پیشنهاد می‌کند که مسیر بیوسنتزی اتیلن و تجزیه زیستی PAS با وزن مولکولی بالا می‌توانند در سازوکار تحمل سرما موثر باشند.

کلیدواژه‌ها: سوخت و ساز اتیلن، پراکسید هیدروژن، پلی‌آمین‌های دارای وزن مولکولی بالا، تنش سرما، نخود.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: امینی سعید، معالی‌امیری رضا، زینالی حسن (۱۴۰۲) بهبود تحمل سرمای نخود زراعی از طریق تجزیه پلی‌آمین‌های با وزن مولکولی بالا و هورمون اتیلن. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱-۲۶.

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



© the authors

مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگشن و دیپلوئید ($2n=2x=16$) بوده که محتوی ژنتیکی نسبتاً کوچک (۷۴۰Mbp) دارد (Varshney et al. 2013). دانه‌ها در این گیاه دارای $31/2-16/4$ درصد پروتئین، $9/0-1/6$ درصد فیبر، $3/3-73/3$ درصد کربوهیدرات و $8/8-1/5$ درصد چربی می‌باشد (Arriagada et al. 2022). این گیاه پس از لوبیا و نخودفرنگی، سومین لگوم فصل سرد است که با سطحی بیش از $14/56$ میلیون هکتار و تولید سالانه بیش از $11/5$ میلیون تن کشت می‌شود (Merga and Haji, 2019). میزان تولید نخود در ایران که در مقام هفتم دنیا قرار دارد در سال سه دهم میلیون تن بوده و سهم آن در بین کشورهای تولید کننده $3/3$ 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 به نظر می‌رسد. در کشت زود هنگام پاییزه و زمستانه گیاه به خوبی 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 تنش های انتهای فصل مفید بوده بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی تر بازده تولید افزایش می یابد (Habibpour et al. 2012). اما مشکل عمده، حساسیت بسیاری از ارقام نخود زراعی به تنش سرما است، به طوری که تنش سرما رشد، نمو و در نهایت عملکرد نخود را در بسیاری از نواحی ایران کاهش می دهد (Heidarvand and Maali-Amiri 2013; Kazemi-Shahandashti et al. 2014). فرایند تحمل به تنش وابسته به تغییر متابولیت ها به دنبال فعالسازی مسیر پیامرسانی سرما و سپس تنظیم تظاهر گروه های متعدد ژنی می باشد (Heidarvand & Maali-Amiri 2013). هورمون های مختلف در سلول های گیاهی در مسیرهای متعدد پیامرسانی ایفای نقش می کنند (Kazemi-Shahandashti & Maali-Amiri 2018). هر یک از ماکرومولکول های اتیلن (C_2H_4) و پلی آمین ها (PAs) می توانند بطور مستقل به عنوان تنظیم کننده طول دوره رشد و نمو گیاه و همچنین القا کننده تحمل در برابر تنش های محیطی موثر باشند (Gupta et al. 2013; Lasanajak et al. 2014; Müller & Munné-Bosch 2015). بیوسنتز اتیلن و تجزیه PAs از نظر بیوشیمیایی به یکدیگر مرتبط بوده زیرا آنها یک پیش ساز مشترک در مسیرهای بیوسنتزی دارند، بطوری که تغییر در بیوسنتز اتیلن احتمالاً بر هموستازی PAs موثر است (Grzesiak et al. 2013). اتیلن یک هورمون گازی گیاهی است که عمدتاً به عنوان هورمون پیری شناخته شده (Van Der Straeten 2014; Van de Poel et al. 2015) و جنبه های مختلف رشد گیاه از جمله جوانه زنی، بذر، پیری برگ، رسیدن میوه، ریزش و پاسخ به تنش های زیستی و غیر زیستی را تنظیم می کند (Van de Poel et al. 2015; Vilchez et al. 2018). غلظت این فیتوهورمون گازی در گیاهان تحت تنش های غیرزیستی از جمله خشکی، سرما، ازن و اکسیداتیو افزایش می یابد (Wi et al. 2010; Habben et al. 2014). این هورمون احتمالاً القا کننده بیان ژن های موثر در رسیدگی میوه، مهار جوانه زنی بذر، پیری و ریزش برگ ها است (Moeder et al. 2002; Wi et al. 2010; Habben et al. 2014). مسیر بیوسنتزی اتیلن در گیاهان تحت تنش های غیرزیستی از طریق چرخه یانگ طی سه مرحله آنزیمی تنظیم می شود. در مرحله اول متیونین (Met) به S -آدنوزیل- L -متیونین (SAM) تبدیل می شود، سپس SAM به ACC^2 و سپس ACO^3 تبدیل و سرانجام به اتیلن تبدیل می شود. در شرایط طبیعی Met با بیوسنتز 5-Methylthioadenosine (MTA) از SAM بازیابی می شود و سپس MTA به 5'-Methylthioribose تبدیل شده و سپس به 5'-Methylthioribose-1-phosphate فسفریله و سپس 2-keto-4-methylthiobutyrate ($KMTB$) را بیوسنتز می کند و سپس $KMTB$ به متیونین تبدیل می شود (Sauter et al. 2013). مشارکت اتیلن در فرآیندهای بهبود تحمل به تنش می تواند با توجه به نوع پاسخ، از جمله افزایش بیوسنتز اتیلن و یا بیان بهبود یافته گیرنده های اتیلن، متفاوت باشد (Wu et al. 2008; Jiang et al. 2013; Zhai et al. 2013; Shi et al. 2015). با این حال، نحوه ایفای نقش پیامرسانی و بیوسنتز اتیلن در واکنش گیاه به تنش، دقیقاً شناسایی نشده است. در

¹- Polyamines

²- 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

³- 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase

آرابیدوپسیس تالیانا حذف آلل *sst1*^۶ سبب کاهش تولید اتیلن شده که این فرایند از طریق القا بیان ژن *ETOI*^۵ در بهبود تحمل شوری نقش دارد (Jiang et al. 2013). از سوی دیگر، تشدید بیان ژن *ERF*^۶ در توتون و سویا، سبب القا ژن‌های کارکردی در مقابله با تنش اسمزی و اکسیداتیو شده و بدین ترتیب با کاهش آثار نامطلوب تنش بر جذب کربن فتوسنتزی و سوخت و ساز، محتوی کلروفیل و قندهای محلول افزایش می‌یابد (Wu et al. 2008; Zhai et al. 2013). اگرچه افزایش موقت بیوسنتز اتیلن به‌عنوان عاملی تعیین‌کننده در بهبود تحمل تنش بکار می‌رود، برخی یافته‌ها نیز نشان می‌دهد که کاهش نسبی بیوسنتز اتیلن نیز تحمل به تنش در گیاهان را بهبود می‌دهد. گیاهان تراریخت توتون با کاهش بیوسنتز اتیلن، تحمل شوری بالاتری داشتند که بنظر می‌رسد از طریق کاهش تجمع ROS و افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای ROS ایجاد می‌شود (Wi et al. 2010). به‌همین ترتیب، در آرابیدوپسیس تالیانا جهش ناک‌داون ژن *ACS7* با کاهش بیوسنتز اتیلن، تحمل به تنش‌های غیرزیستی را بهبود داده است (Dong et al. 2011). بر اساس برخی گزارش‌ها، اتیلن و H_2O_2 ممکن است به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان هم‌افزا^۷ و خودتقویت‌کننده^۸ در تنظیم حلقه پیش‌خور^۹ فعالیت کنند. در آرابیدوپسیس تالیانا متحمل به شوری القا همزمان فعالیت مسیرهای متابولیک اکسیداز جایگزین^{۱۰} اتیلن و پراکسید هیدروژن بیانگر ارتباط نزدیک بین اتیلن و H_2O_2 است (Wang et al. 2010). در موتانت‌های آرابیدوپسیس تالیانا، اتیلن با تنظیم غلظت H_2O_2 در بذور در حال جوانه‌زنی، آثار نامطلوب تنش شوری بر جوانه‌زنی بذور را کاهش داد (Lin et al. 2012). همچنین پیشنهاد شده که H_2O_2 تولید شده توسط تجزیه زیستی PAS نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کند و به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در تنظیم مسیرهای تداخلی فعالیت می‌کند (Campestre et al. 2011; Guo et al. 2014). در سوخت و ساز PAS، H_2O_2 از واکنش کاتالیز شده توسط دی‌آمین اکسیداز (DAO) و پلی‌آمین اکسیدازی (PAO) که عمدتاً در آپوپلاست قرار دارند، منشاء می‌گیرد (Groppa & Benavides 2008; Alcázar et al. 2010; Tavladoraki et al. 2012). همچنین، PAO را می‌توان در سایر بخش‌های سلول از جمله در واکوئل، سیتوپلاسم و پراکسی‌زوم نیز یافت (Cervelli et al. 2004; Tavladoraki et al. 2006; Moschou et al. 2008c). تشدید بیان ژن *pao* در توتون منجر به کاهش محتوی PAS و H_2O_2 شد و بدین ترتیب ژن‌های آنتی‌اکسیدانی مورد نیاز برای بهبود تحمل و بقا سلول تنظیم شد (Moschou et al. 2008a). تحت تنش‌های غیرزیستی در گیاهان تراریخت با ژن *pao*، با افزایش ترشح PAS از سلول به فضای بین سلولی تجمع ROS، افزایش آسیب اکسیداتیو و نهایتاً مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ایجاد می‌شود. در توتون تراریخت (ژن *pao* سی‌پلاستی) تحت تنش شوری، تغییر بیان ایزوفرم‌های PAO سی‌پلاستی و

4- *Soil salinity tolerant 1*

5- *Ethylene overproducer 1*

6- *Ethylene response factor*

7- Synergistically

8- Self-amplifying

9- Feed forward loop

10- Alternative oxidase

آپوپلاستی و افزایش رونوشت ژن‌های مسیر بیوستنز PAS مشاهده شد (Moschou et al. 2008b). بنابراین بنظر می‌رسد تولید حد معینی از ROS آپوپلاستی، بیان ژن‌های پاسخ به تنش و یا فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی را القا می‌کند (Soares Freitas et al. 2018). سوخت و ساز PAS با وزن مولکولی بالا، که در اثر اتصال یک یا دو گروه آمینوپروپیل به پوتریسین (Put)، به ترتیب اسپرمیدین (Spd^{11}) و اسپرمین (Spm^{12}) را سنتز می‌کنند (Amini et al., 2021)، نه تنها تولید H_2O_2 را تا سطوح پیام‌رسانی افزایش می‌دهد، بلکه ذخیره‌ای از PAS را برای اهداف دفاعی فراهم می‌کند. تشدید بیان ژن $SISAMS1^{13}$ در گوجه‌فرنگی از طریق تجمع Spd و Spm و مهار ROS، عملکرد فتوسنتزی و تحمل به تنش قلیایی ایجاد کرد. بنابراین بنظر می‌رسد H_2O_2 تولید شده توسط مسیر فعالیت PAO^{14} پیام‌رسان پایین‌دستی بهبود تحمل به تنش قلیایی توسط $SISAMS1$ است (Gong et al. 2016). بیوستنز اتیلن عمدتاً توسط ژن‌های ACS و ACO در سطوح رونویسی و پس از ترجمه تنظیم می‌شود (Lyzenga et al. 2012). اگرچه اتیلن آثار مثبتی بر تحمل سرما در گوجه‌فرنگی داشته (Ciardi et al. 1997)، لیکن محتوی اتیلن همبستگی منفی با تحمل سرما در یونجه یکساله و توتون داشت (Zhang and Huang. 2010; Zhao et al. 2014). بنابراین احتمالاً نقش اتیلن در تحمل سرما وابسته به محتوی آن و نوع گونه است. فرضیه برهمکنش بین هورمون‌های گیاهی از جمله اتیلن و PAS از نتایج تحقیقاتی که در آن بسیاری از فرایندهای نموی و فیزیولوژیک بطور هم‌افزا و یا متعارض توسط PAS همراه با هورمون‌های گیاهی تنظیم شده‌اند، منشا می‌گیرد (Bitrián et al. 2012; Milhinhos & Miguel 2013). با وجود مطالعه نقش حیاتی PAS، اتیلن و H_2O_2 در رشد، نمو و پاسخ‌های گیاه به تنش، به دلیل پیچیدگی و تنوع پاسخ‌های سلولی در گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های مختلف، شبکه تنظیمی این اجزا تحت تنش سرما به خوبی درک نشده‌اند. با توجه به آنکه افزایش فعالیت مسیر تجزیه PAS توسط آنزیم‌های آمین‌اکسیداز، با افزایش نسبی تولید H_2O_2 موثر در فرایند پیام‌رسانی سلولی می‌شود (Alcázar et al., 2010; Heidarvand et al., 2013) بنابراین به نظر می‌رسد، مطالعه همزمان تغییرات متمایز محتوی H_2O_2 و عوامل موثر در تغییر محتوی بخشی از این شاخص سیگنالینگ (از جمله مسیر تجزیه PAS) می‌تواند بیانگر اثبات نقش فرایند پیام‌رسانی H_2O_2 وابسته به بیوستنز از طریق تجزیه PAS باشد. یافته‌های این آزمایش بیانگر آن است که اتیلن با تنظیم تجزیه PAS با وزن مولکولی بالا مرتبط با تولید H_2O_2 به‌عنوان پیام‌رسان تنش در بهبود تحمل سرما در نخود زراعی ایفای نقش می‌کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود (*C. arietinum* L.) کابلی متحمل به سرما

(Sel96th11439) () با منشا ایکاردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های (ILC482×ILWC182) و حساس به سرما (ILC 533)

11- Spermidine

12- Spermine

13- *S-adenosyl-L-methionine synthetase*

14- PAO-originated H_2O_2

(منشا گرفته از مصر که اجداد آن هنوز ردیابی نشده‌اند) استفاده شد (Heidarvand et al. 2011; Saeed et al. 2011). بذور با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای 23°C به مدت ۳ شبانه‌روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های اندازه ۱۲ (با قطر دهانه ۱۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به ۰/۲۵ حجمی) انتقال یافت. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای 23°C و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شد. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز ۲۱ پس از کشت گیاهچه‌ها (با ارتفاع حدود ۲۰ سانتی‌متر و دارای حداقل پنج شاخه به طول پنج تا هشت سانتی‌متر) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اسپادانا، ایران) با دمای 4°C به‌عنوان دمایی که بر اساس تعریف شاخص‌های خسارت بعنوان LT_{50}^{15} (میانگین زمان کمی‌سازی شده مرگ موجودات تحت تنش) این دو ژنوتیپ تحت تنش سرما انتخاب شده‌اند، (Nayyar et al. 2005; Kazemi-Shahandashti et al. 2013; Jha et al., 2020; Arriagada et al., 2022) منتقل شدند و نمونه‌گیری از برگ‌های میانی هر گیاهچه بعنوان برگ‌های فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) براساس پژوهش گذشته انجام شد (Rakei et al. 2016). نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای 23°C نیز بعنوان گیاهان شرایط کنترل انجام گرفت. سن فیزیولوژیک تمام گیاهان یکسان در نظر گرفته شد (Hurry & Huner 1991; Kazemi-Shahandashti et al. 2014). بنابراین در این پژوهش اثر سه نوع تیمار دمایی (شامل گیاهچه‌ها در دمای 23°C ، گیاهچه‌ها یک روز و سه روز پس از شروع تنش سرما) در دو ژنوتیپ متحمل و حساس بررسی شد.

سنجش میزان اتیلن: بر اساس روش Yang & Hoffman (1984) برای اندازه‌گیری محتوی اتیلن بیوسنتز شده،

گیاهچه نخود به صورت تک‌گیاه در ظروف یک لیتری قرار گرفت. در کف ظرف محلول نگهدارنده حاوی آب مقطر، ۱۰ ppm کلرین و ۲۵ میلی‌لیتر پتاسیم‌هیدروکسید (KOH) یک مولار برای جذب گاز کربن‌دی‌اکسید ریخته شد تا میزان گاز کربن‌دی‌اکسید را در حد کمتر از ۰/۱ درصد (حجمی/حجمی) نگه‌دارد. سپس جهت جلوگیری از نشت گاز تولید شده درب ظرف‌ها محکم بسته شد. پس از ۲۴ ساعت قرار دادن گیاهچه‌ها در داخل ظرف، یک میکرولیتر از هوای داخل ظرف از طریق درب کوچک لاستیکی که بر روی درب بزرگ تعبیه شده بود، نمونه‌گیری شد. اندازه‌گیری محتوی اتیلن بیوسنتز شده توسط دستگاه GC-8 AIT انجام شد. دمای بخش تزریق، ستون و آشکارساز^{۱۶} به ترتیب 120°C ، 90°C و 120°C بود. غلظت گاز اتیلن استاندارد 0.09 ± 0.02 میلی‌لیتر (BOC Gases B-grade) بود. از نیتروژن به‌عنوان گاز متعادل کننده استفاده شد. گاز حامل نیتروژن (فشار یک کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع)

¹⁵- Lethal temprature 50

¹⁶- Detector

دارای خلوص بسیار بالا بود. همچنین از اکسیژن (۰/۳ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) و هیدروژن (۰/۴۵ کیلوگرم بر سانتی متر مربع) با خلوص بالا برای اندازه گیری استفاده شد. محتوی اتیلن بیوسنتز شده بر حسب واحد میکرولیتر بر وزن تر گیاهچه بر حسب گرم بر ساعت بیان شد. برای اندازه گیری محتوی اتیلن بیوسنتز شده از فرمول $Ep=(E \times V \times 60)/(T \times W)$ استفاده شد، که در آن Ep: محتوی اتیلن بیوسنتز شده (میکرولیتر بر وزن تر گیاهچه بر حسب گرم بر ساعت)، E: غلظت اتیلن در فضای بالای ظرف (میکرولیتر بر لیتر)، V: حجم ظرف پس از کم کردن وزن گیاهچه و پتاسیم هیدروکسید (KOH) (لیتر)، T: مدت زمان قرار دادن نمونه در ظرف (ساعت)، W: وزن تر گیاهچه (گرم) است.

سنجش محتوی PAs با وزن مولکولی بالا (Spd و Spm): سنجش کمی Spd و Spm به روش (1987)

Hugo & Jan انجام شد. ۲۵۰ میلی گرم از بافت گیاهی در دو میلی لیتر محلول پرکلریک اسید (PCA^{17}) چهار درصد حاوی یک و هفت دی آمینوهپتان¹⁸ (پنج میلی گرم در لیتر از اسیدکلریدریک دو نرمال) هموزنیزه شد. پس از یک ساعت قرارگیری در $4^{\circ}C$ ، از فیلتر (۴۵ درصد میکرونی) عبور داده شد. بر روی دو دهم میلی لیتر از این محلول، یک میلی لیتر بافر کربنات با pH ۹ و یک میلی لیتر محلول دانسیل کلراید¹⁹ (۱۰ میلی گرم در یک میلی لیتر استون) اضافه و مخلوط شد. پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول پرولین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) دانسیل کلراید اضافی حذف شد و سپس ۴۰۰ میکرولیتر تولوئن به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و پس از سانتریفوژ $500 \times g$ به مدت دو دقیقه فاز آلی برداشته و این محلول برای ارزیابی Spd و Spm توسط HPLC استفاده شد. به منظور ارزیابی کمی Spd و Spm، ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی به ستون Chrompack-Nederland در دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 تزریق شد. آشکارساز این دستگاه از نوع UV است که در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از نمونه های استاندارد برای تعیین وجود Spd و Spm و غلظت سنجی آنها استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم های DAO و PAO: بر اساس روش (López-Gómez et al. 2014)، پس از پودر کردن

چهاردهم گرم بافت برگگی در ۱/۲ میلی لیتر بافر استخراج (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵، نمونه ها سانتریفوژ $(4^{\circ}C, 20 \text{ min}, 10000 \times g)$ و مایع رویی برداشته شد. واکنش سنجش فعالیت آنزیم DAO حاوی ۶۳۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵، ۷۰ میکرولیتر محلول واکنش (۶/۲۵ میکرولیتر از آن دی متیل آنیلین²⁰، ۲/۵ میلی گرم -۴ آمینوآنتی پرن²¹، ۲۵ میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیداز (۱/۴۲ میلی گرم در هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برگگی و ۱۰۰ میکرولیتر Put (۳/۲ میلی گرم در هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵) بود. برای سنجش فعالیت آنزیم PAO نیز از همین واکنش استفاده شد،

17- Perchloric acid (CLO₄H)

18- 1,7-diaminoheptane

19- Dansyl chloride

20- NN-dimethylaniline

21- 4-aminoantiprine

فقط بجای Put، از Spd+Spm (Spd): پنج میلی گرم در هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH، ۶/۵ و Spm: ۶/۶ میلی گرم در هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH، ۶/۵ استفاده شد. میزان فعالیت این آنزیمها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^{۲۲} اندازه گیری شد.

سنجش میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂): مقدار ۳۵۰ میلی گرم نمونه تازه برگی پس از اضافه کردن نیتروژن مایع

در هاون چینی به خوبی سائیده شد و به فالکون ۱۵ میلی لیتری انتقال یافت. پنج میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید^{۲۳} یک درصد (محلول در حمام یخ) به فالکون اضافه شد و تا یکنواخت سازی نمونهها در حمام یخ قرار داده شد. فالکون حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ °C با سرعت $12000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک فالکون جدید حاوی یک میلی لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن فالکون در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160, (Kyoto, Japan) اندازه گیری شد (Loreto and Velikova. 2001). نتایج بصورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA^{۲۴} و واکنش QPCR^{۲۵}: استخراج RNA کل به روش ترایزول با ۸۰ میلی گرم

نمونه های بافت برگ خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی ۱۸S و ۱۸S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific model, 1000)^{۲۶} در طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC^{۲۷} 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. به منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ °C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی اکسی نوکلئوتری فسفات (dNTPs^{۲۸}) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد

22- Spectrophotometer

23- Trichloroacetic acid

24- Complementary DNA

25- Quantitative PCR

26- Nanodrop spectrophotometer

27- Diethyl pyrocarbonate

28- Deoxynucleotide triphosphates

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 37°C قرار داده شد. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای 42°C قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70°C قرار گرفتند. به منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه دار اکتین ۱ (*Actin1*)، (Peng et al. 2010) از ژنوم نخود بر روی cDNA ساخت شده، پس از رقیق سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر توسط PCR و الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. نتایج حاکی از مطابقت اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه دار (bp) (۱۸۹) بود. ۱۱۴۵ نانوگرم در میکرو لیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت Evagreen، سه میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرو لیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۲۰) بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای 94°C و ۳۵ تکرار با چرخه های ۱۰ ثانیه در دمای 95°C ، ۱۰ ثانیه در دمای T_A^{29} ، 57°C آغازگر و ۱۰ ثانیه در دمای 72°C . تایید اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده با استفاده از تجزیه و تحلیل منحنی ذوب انجام شد. منحنی ذوب با خنک شدن تا دمای 55°C با سرعت 20°C در ثانیه ثبت شد، سپس در دمای 55°C به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند و سپس با گرمایش آهسته با سرعت 0.5°C در ثانیه تا دمای 95°C افزایش یافت. فلورسانس به طور مداوم در طول دوره افزایش آهسته دما برای نظارت بر تفکیک رنگ Evagreen اندازه گیری شد. ترسیم سیگنال های فلورسانس به طور خودکار در زمان واقعی و در مقابل دما برای ایجاد منحنی های ذوب انجام گرفت. بر اساس منحنی های 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 $-3/23$ و $-3/42$ بود (Pfaffl 2001). نسبت بیان نسبی هر توالی با توجه به شاخص Cq محاسبه شده که میانگین کارایی PCR ژن های خانه دار مورد نظر در Plate را در بر می گیرد. با توجه به نتایج منحنی های استاندارد، از نرم افزار REST³⁰ می توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه دار (*Actin1*) در هر نمونه مشخص با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ بعنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (Livak & Schmittgen 2001). در این روش بیان ژن مورد نظر با بیان ژن *Actin1* که یک ژن خانه دار تنظیم شده است نرمال شده و سپس از مقادیر نرمال شده برای مقایسه بیان متفاوت ژن ها در نمونه های مختلف استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن اختصاصی *GADI* و ژن خانه دار *Actin1* با استفاده از تارنمای (IDT) Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) به آدرس (<https://www.idtdna.com>) برای

²⁹- Annealing temperature

³⁰- Representational state transfer software

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.

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

Table 1. Primer sequences used in qPCR amplification

Accession number	Gene name	Protein name	Sequence (5'-3')	T _a (°C)	Amplicon length (bp)
شماره دسترسی	نام ژن	نام پروتئین	توالی (۵'-۳')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز)
EU529707.1	<i>Act1</i>	Actin1	F: CTACGAATTGCCTGATGGA C R: CCTCCTGAAAGGACGATGT T	57	189
DQ372685	<i>ACS</i>	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase	F: GGTCTACCCGAGTTCAGAAATG R: CAGTTGCTCCACCACTCATTA	58	106
AJ549384	<i>ACO</i>	1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase	F: TGACCAATGGCAGATACAAGAG R: GCCTTGAGTGGTGGGTTATAG	58	100

بررسی‌های آماری: 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 ژن‌های *ACS* و *ACO* انجام شد و آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن ($P < 0.01$) و با نرم افزار SAS 9.4 انجام شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان اتیلن، پلی‌آمین‌های با وزن مولکولی بالا (Spd)

و (Spm)، فعالیت آنزیم‌های PAO و DAO، بیان نسبی ژن‌های *ACS* و *ACO* و محتوی اتیلن نشان داد (جدول ۲).

بیوسنتز اتیلن تحت تنش سرما: به منظور بررسی قابلیت تاثیر اتیلن در پاسخ نخود زراعی به تنش سرما، الگوهای بیوسنتز

اتیلن تحت تنش سرما در برگ‌های ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به سرما ارزیابی شد. تحت تنش سرما میزان اتیلن در ژنوتیپ

متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۱-الف). گاز اتیلن در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش در مقایسه با شرایط کنترل به

طور معنی داری افزایش یافت (۱۵/۶۲ درصد) و به حداکثر میزان آن در این تحقیق رسید و سپس در روز ششم تنش سرما مجدداً در مقایسه با شرایط کنترل نیز کاهش یافت، بطوری که حتی میزان آن به کمتر از شرایط کنترل رسید (۱۲/۵ درصد). همچنین محتوی اتیلن در ژنوتیپ متحمل در روز اول در مقایسه با روز ششم تنش سرما به طور معنی داری بیشتر بود (۱/۳۲ برابر)، (شکل ۱-الف).

جدول ۲. تجزیه واریانس اتیلن و بیان ژن های مسیر بیوسنتز آن در دو ژنوتیپ حساس و متحمل نخود تحت

تنش سرما

Table 2. Variance analysis of studied traits of tolerant (Sel 96th11439) and susceptible (ILC 533) chickpea genotypes under cold stress

(Mean Square) میانگین مربعات								منابع تغییر	درجه
H ₂ O ₂	DAO	PAO	Spm	Spd	ACO	ACS	Ethylene	S.O.V.	آزادی
								df	
3327.64**	1/80**	0.39**	427.39**	47.14**	61.3**	474.32**	0.02**	ژنوتیپ	1
								Genotype	
748.98**	3.05**	0.65**	264.72**	24.87**	71.59**	1106.88**	0.0055**	دوره زمانی	2
								Stress	
								period	
								ژنوتیپ ×	
								دوره زمانی	
664.88**	0.56**	0.015 ^{ns}	48.78**	11.69**	18.96**	356.72**	0.003**	تنش	2
								Stress	
								period ×	
								Genotype	
1	0.06	0.012	1.63	0.48	0.46	8.84	0.00046	خطا	12
								Error	
1.1	17.70	14.92	5.41	8.45	18.64	15.06	7.45	ضریب	
								تغییرات (%)	
								CV	

** بیانگر معنی داری در سطح یک درصد است.

سوخت و ساز اتیلن: بر اساس نتایج جستجو در پایگاه اطلاعاتی NCBI³¹ و پایگاه اختصاصی ژنوم³² و ترانسکریپتوم³³

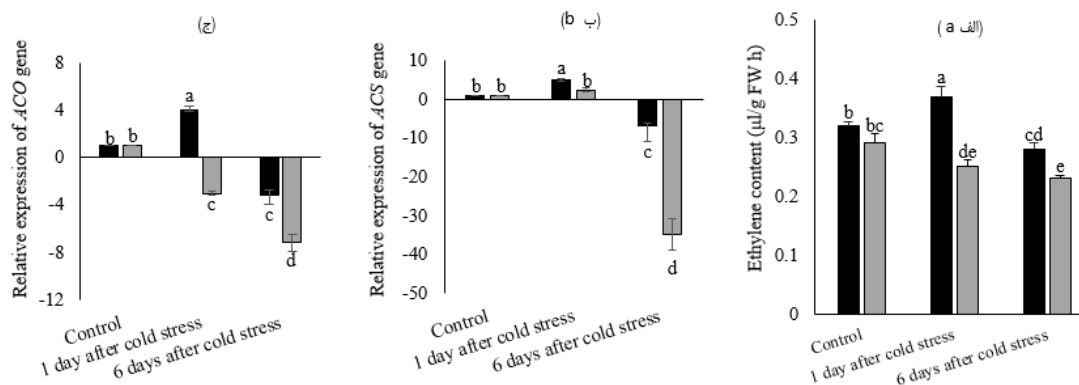
نخود، ژنوم نخود زراعی تنها حاوی یک ایزوفرم ژنی رمزکننده هر یک از ژن های مسیر تنظیم سوخت و ساز اتیلن بوده که شماره دسترسی آنها در جدول ۱ آمده است. به منظور ارزیابی الگوی بیوسنتز متفاوت اتیلن و همچنین نقش تنظیم در سطح رونویسی در ژنوتیپ های متحمل و حساس به سرما نخود، میزان بیان نسبی ژن های ACS و ACO در دو ژنوتیپ حساس و متحمل در شرایط

³¹- National center for biotechnology information

³²- The chickpea genomic web resources

³³- Chickpea transcriptome database

کنترل، روز اول و ششم تنش، توسط QRT-PCR^{۳۴} اندازه‌گیری شد. افزایش بیان نسبی هر دو ژن در روز اول تنش در مقایسه با شرایط کنترل و همچنین در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۱-ب و ج).



شکل ۱. تغییرات میزان اتیلن (میکرولیتر/گرم وزن تر ساعت) (الف) و میزان بیان نسبی ژن‌های ACS (ب) و ACO (ج) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel 96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (۲۳ °C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (۴ °C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن

Figure 1. Changes in ethylene content (µl/g FW), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) and 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase (ACO) relative genes (Sel 96th11439) and susceptible (ILC 533) chickpea expression in the leaves of tolerant respectively) grown under control (23 °C), day 1 and genotypes (black and light gray bars, day 6 of cold stress (4 °C). Different letters indicate a significant difference among the means based on the comparison of the average Duncan

بیان نسبی ژن ACS تحت تنش سرما در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش سرما در مقایسه با شرایط کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت^{۳۵} (۵/۲ برابر) و مجدداً در روز ششم تنش سرما کاهش یافت^{۳۶} (۷ برابر)، در حالیکه بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ حساس پس از ۲/۴ برابر افزایش در روز اول تنش، در روز ششم تنش تا ۳۵ برابر کاهش یافت (شکل ۱-ب). بیان نسبی ژن ACO به‌عنوان یکی از تنظیم‌کنندگان مسیر بیوسنتز اتیلن، تحت تنش سرما در ژنوتیپ متحمل در روز اول تنش سرما ۴/۰۳ برابر افزایش یافته و مجدداً در روز ششم تنش سرما ۳/۲۳ برابر در مقایسه با شرایط کنترل کاهش یافت، به طوری که میزان بیان نسبی این ژن

^{۳۴}- Quantitative reverse transcriptase-PCR

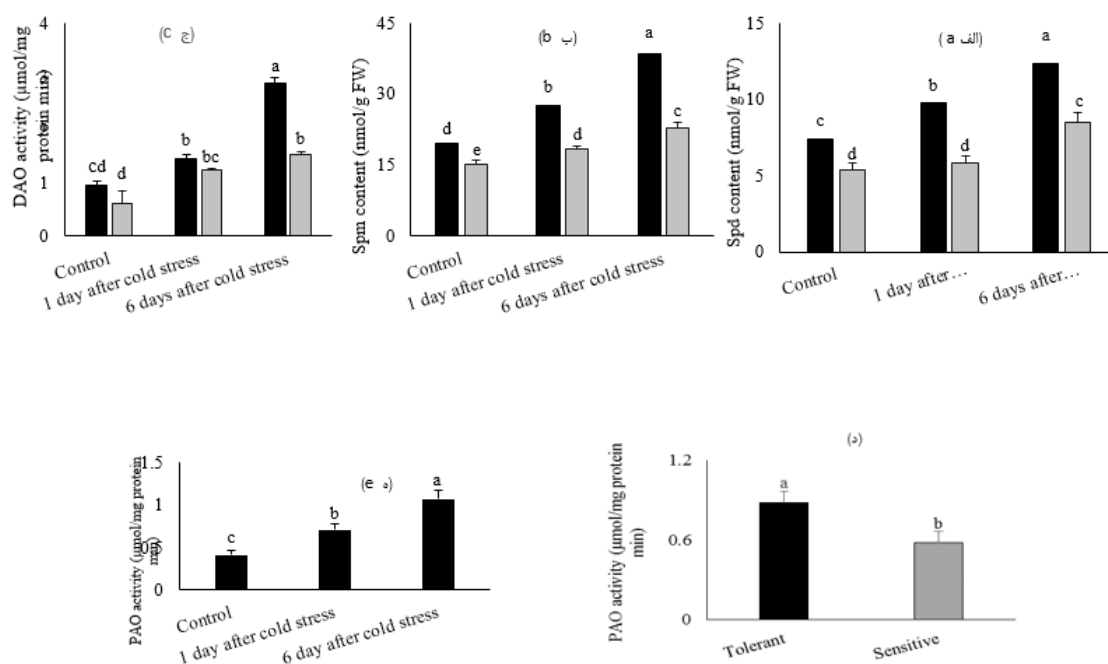
^{۳۵}- Up-regulate

^{۳۶}- Down-regulate

در مقایسه با شرایط کنترل نیز کمتر شد (شکل ۱-ج). بیان نسبی ژن *ACO* در ژنوتیپ حساس تحت تنش سرما در مقایسه با شرایط کنترل به طور پیوسته کاهش یافت (۷/۲۱ برابر)، (شکل ۱-ب و ج).

سوخت و ساز PAS با وزن مولکولی بالا و فرایند تولید H_2O_2 وابسته به Pas: به منظور بررسی ارتباط احتمالی

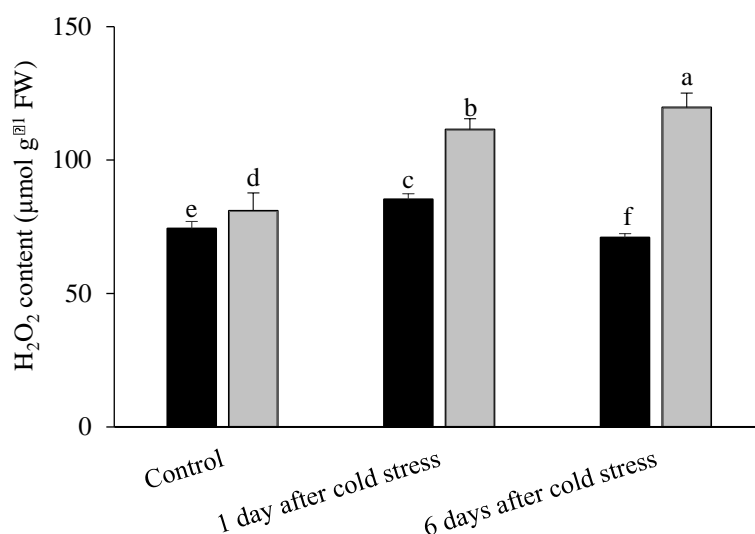
بین سوخت و ساز PAS و بیوستز اتیلن محتوی Spd و Spm، فعالیت آنزیم‌های DAO و PAO در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به سرما نخود اندازه‌گیری شد. محتوی Spd و Spm در شرایط کنترل در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (به ترتیب ۱/۳۷ و ۱/۲۹ برابر) (شکل ۲-الف و ب).



شکل ۲. تغییرات میزان PAS با وزن مولکولی بالا (اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm) (نانومول/گرم وزن تر) (الف و ب)، فعالیت آنزیم‌های دی‌آمین اکسیداز و پلی‌آمین اکسیداز (DAO و PAO) (میکرومول/ میلی‌گرم پروتئین دقیقه) (ج و د) در ژنوتیپ‌ها (د) و تیمارهای مختلف دمایی (ه) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel 96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (۲۳°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (۴°C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگینها براساس مقایسه میانگین دانکن

Figure 2. Changes in heavy polyamines (Spermidine (Spd) and Spermine (Spm)) content (nmol/g wt), Diamine oxidase (DAO) and Polyamine oxidase (PAO) activity ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein min) in different genotypes and under thermal treatment in the leaves of tolerant (Sel 96th11439) and sensitive (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23 °C), day 1 and day 6 of cold stress (4 °C). Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test

تنش سرما محتوی PAS با وزن مولکولی بالا Spd و Spm را در هر دو ژنوتیپ (بجز محتوی Spd در ژنوتیپ حساس در روز اول تنش سرما که افزایش آن نسبی و غیرمعنی دار بود) بطور معنی داری افزایش داد (به ترتیب حداکثر ۶۶/۳۹ درصد و ۹۶/۳۳ درصد)، (شکل ۲-الف و ب). همچنین فعالیت آنزیم‌های DAO و PAO به منظور بررسی نقش تجزیه زیستی PAS در فرایند پیام‌رسانی سلولی از طریق تولید ROS و همچنین نقش این سازوکار در تحریک پاسخ‌های زودهنگام به تنش سرما (روز اول تنش) در ژنوتیپ متحمل اندازه‌گیری شد. فعالیت DAO در ژنوتیپ متحمل به سرما بطور معنی داری تحت شرایط تنش سرما در مقایسه با شرایط کنترل بیشتر بود (۳/۰۱ برابر)، (شکل ۲-ج). نکته جالب آنکه در پاسخ‌های زودهنگام (روز اول تنش)، افزایش فعالیت این آنزیم ارتباط نزدیکی با افزایش تولید H_2O_2 داشت (شکل ۳).



شکل ۳. تغییر میزان H_2O_2 (میکرومول/گرم وزن تر) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel 96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی ($23^{\circ}C$)، روز اول و روز ششم تنش سرما ($4^{\circ}C$). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن

Figure 3. Change in hydrogen peroxide (H_2O_2) content ($\mu\text{mol/g fr wt}$) in the leaves of tolerant (Sel 96th11439) and susceptible (ILC 533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control ($23^{\circ}C$), day 1 and day 6 of cold stress ($4^{\circ}C$). Different letters indicate a significant difference among the means based on the comparison of the average Duncan

از سوی دیگر، در ژنوتیپ حساس به سرما نیز افزایش قابل توجه و معنی دار در فعالیت آنزیم DAO در مقایسه با شرایط کنترل مشاهده شد (۲/۴۹۳ برابر)، (شکل ۲-ج)، یافته‌ای که با افزایش شدید و معنی دار تولید H_2O_2 در این ژنوتیپ مرتبط بود. این نتایج بیانگر آن است که تجزیه زیستی PAS بطور مستقیم، همراه با سایر فرآیندها، در تولید H_2O_2 موثر است. فعالیت آنزیم PAO در ژنوتیپ متحمل بطور قابل توجهی بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (۱/۵۱ برابر)، (شکل ۲-د) و در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما در مقایسه با شرایط کنترل به طور معنی داری افزایش یافت (۲/۶ برابر) (شکل ۲-ه)؛ پاسخی که با نتایج Spd و Spm در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس مطابقت داشت (شکل ۲-الف و ب). بنابراین به نظر می‌رسد با افزایش محتوی Spm و Spd، افزایش فعالیت مسیر تجزیه زیستی این دو متابولیت نیز اتفاق می‌افتد.

بحث

افزایش بیوستنز اتیلن در پاسخ زود هنگام ژنوتیپ متحمل بیانگر کارایی مسیر پیام‌رسانی در پاسخ به

تنش سرماست: اتیلن آثار متناقضی بر سوخت و ساز گیاه دارد (Stearns & Glick 2003). اگرچه اتیلن به‌عنوان یک واسطه مهم در تنظیم هموستازی اکسیداتیو و تحمل به تنش‌های غیر زیستی معرفی شده است (Yang et al. 2013; Jiang et al. 2011; Wang et al. 2011; Zapata et al. 2007)، اما مرحله رویشی اولیه در برخی گونه‌ها را با اختلال مواجه می‌کند (Zapata et al. 2007). بلافاصله پس از آغاز تنش بیوستنز اتیلن به‌عنوان پاسخ اولیه، افزایش نسبی یافته و با ادامه تنش محتوی اتیلن شدیداً افزایش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که در پاسخ‌های زود هنگام، بیوستنز اتیلن قابلیت ایفای نقش پیام‌رسانی حفاظتی در پاسخ به تنش داشته در حالی که احتمالاً در پاسخ‌های دیر هنگام در القای فرآیندهای کلروز، پیری و ریزش برگ موثر باشد (Stearns & Glick 2003). بر اساس نتایج این آزمایش، بیوستنز اتیلن در گیاهچه نخود متحمل به سرما فقط در پاسخ‌های زود هنگام اولیه افزایش یافت در حالی که، در ژنوتیپ حساس افزایش بیوستنز اتیلن مشاهده نشد. بنابراین، عدم بیوستنز دو مرحله‌ای اتیلن در ژنوتیپ متحمل به سرما (شکل ۱-الف) تا حدودی پاسخ مناسب‌تر ژنوتیپ Sel 96th 11439 به تنش سرما را توجیه می‌کند (Azevedo Neto et al. 2004). گیاه تراریخت *N. tabacum* با ژن آنتی‌سنس ACS مرحله دوم افزایش بیوستنز اتیلن به‌عنوان پاسخ دیر هنگام به تنش را نداشت و تحمل بیشتری به تنش H_2O_2 داشت (Wi et al. 2010). تحمل بیشتر به تجمع کمتر ROS در اثر افزایش فعالیت و بیان ژن‌های آنزیم‌های سم‌زدای ROS (از جمله $MnSOD^{37}$ ، $Cu/ZnSOD^{38}$ و کاتالاز) در ارتباط است (Wi et al. 2010). همچنین کاهش بیان ژن‌های ACS و ACO در توتون با روش آنتی‌سنس از طریق کاهش بیوستنز اتیلن، تحمل به تنش‌های شوری، اسیدی، پیری و ABA را بهبود داد (Tavladoraki et al. 2012). بیان ژن‌های مسیر بیوستنز اتیلن و محتوی ACC عمدتاً به‌عنوان عوامل محدود کننده برای بیوستنز اتیلن در نظر گرفته می‌شوند (Abts et al. 2014; Bulens et al. 2014).

³⁷- Manganese Super Oxide Dismutase

³⁸- Copper/Zinc SOD

به منظور بررسی اینکه آیا بیوسنتز اتیلن مستلزم تنظیم در سطح رونویسی است، در این پژوهش، بیان نسبی ژن‌های *ACO* و *ACS* توسط QRT-PCR بررسی شد.

نتایج نشان داد که افزایش رونوشت ژن‌های *ACS* و *ACO* در پاسخ اولیه ژنوتیپ متحمل به سرما (شکل ۱-ب و ج) به عنوان سازوکاری فعال در سطح رونویسی سبب افزایش محتوی اتیلن در این ژنوتیپ شده است. به نظر می‌رسد تحت تنش سرما فرایند تنظیم محتوی اتیلن نخود ممکن است هم در سطح رونویسی^{۳۹} و هم در سطح ترجمه^{۴۰} تنظیم شود. همچنین کاهش بیان این دو ژن تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس و همچنین در پاسخ‌های دیر هنگام ژنوتیپ متحمل به سرما نیز تاییدکننده اهمیت نقش تنظیم در سطح رونویسی در هر دو مرحله مسیر متابولیک بیوسنتز اتیلن به منظور تنظیم محتوی این فیتوهورمون است (Stepanova & Alonso 2009; Chen et al. 2014). بنابراین با توجه به نتایج بیوشیمیایی و بیان نسبی ژن‌ها، می‌توان چنین پیش‌بینی کرد که بیوسنتز اتیلن تحت تنش سرما، تحت تنظیم پیچیده فرایندهای رونویسی و کارکردی ژن‌های موثر در این مسیر است. به نظر می‌رسد بیان نسبی ژن‌های *ACO* و *ACS* (شکل ۱-ب و ج)، با افزایش بیوسنتز اتیلن در طی مرحله اول پاسخ به تنش (پاسخ‌های زود هنگام) در ژنوتیپ متحمل همراه باشد. در ژنوتیپ نخود متحمل به سرما، افزایش بیان این دو ژن و نهایتاً افزایش محتوی اتیلن تحت تنش سرما احتمالاً در اثر واکنش کاتالیز شده توسط فعالیت آنزیم *ACS* و سنتز *ACC* و نهایتاً اتیلن ناشی می‌شود. تجمع اولیه اتیلن در ژنوتیپ متحمل به سرما کاملاً با افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن‌های *ACS* و *ACO* همراستایی داشت (شکل ۱-ب و ج). در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس به سرما، کاهش بیان نسبی این دو ژن با کاهش محتوی اتیلن در پاسخ‌های زود و دیر هنگام ژنوتیپ حساس (عدم افزایش اولیه و دیر هنگام اتیلن) و پاسخ‌های دیر هنگام ژنوتیپ متحمل (عدم افزایش دیر هنگام اتیلن) همراه بود (شکل ۱-الف، ب، ج). چنین فرضیه‌ای توسط پژوهش (Chen et al. 2014) نیز تایید شده است. بیان دائمی ژن *ACO1* منجر به افزایش حساسیت آرابیدوپسیس تالیانا به تنش شوری شد. همچنین بنظر می‌رسد که حساسیت گیاهان تراریخت به تنش اسمزی در اثر کاهش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش (از جمله عوامل اتصال تکرار-^{۴۱}C: *cbf1* و *cbf6*) موثر در انتقال پیام است.

اتیلن نقش کلیدی در تنظیم تولید H_2O_2 کاتالیز شده توسط آنزیم‌های مسیر تجزیه زیستی PAs با وزن

مولکولی بالا برای پیام‌رسانی تنش دارد: تجزیه زیستی PAs با وزن مولکولی بالا نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کند (Amini et al. 2021)، اما کراس‌تاک اختصاصی میان تجزیه زیستی PAs با وزن مولکولی بالا نخود همراه با نقش پیام‌رسانی هورمون اتیلن، خصوصاً تحت تنش سرما، بطور کامل مشخص نشده است. یافته‌های این تحقیق نشان داد که هورمون اتیلن در تنظیم دقیق^{۴۲} تولید H_2O_2 به منظور بهبود رویدادهای پیام‌رسانی مرتبط با تنظیم آنزیم‌های تجزیه

³⁹- Transcriptional regulation

⁴⁰- Translational regulation

⁴¹- C-repeat binding factors

⁴²- Fine-tuning

زیستی PAS با وزن مولکولی بالا تحت تنش سرما خصوصا در پاسخ اولیه ژنوتیپ متحمل نخود موثر است. این فرضیه توسط سنجش محتوی H_2O_2 همزمان با فعالیت آنزیم‌های مسیر تجزیه زیستی PAS با وزن مولکولی بالا پشتیبانی شد (شکل‌های ۱-الف، ۲-ج، ه و ۳). تحت تنش سرما، مرحله اول بیوسنتز اتیلن (در روز اول تنش سرما) در ژنوتیپ متحمل با افزایش معنی‌دار محتوی H_2O_2 همزمان با افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم DAO همراه بود. با این وجود، در ژنوتیپ حساس بدون افزایش بیوسنتز اتیلن، افزایش تولید H_2O_2 و همچنین افزایش فعالیت آنزیم DAO (۱/۵ برابر) مشاهده شد، در حالی که تغییرات فعالیت PAO تحت تنش در این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی‌دار نبود. به همین ترتیب، Zarza et al. (2017) بیان کردند که سهم H_2O_2 در اثر فعالیت PAO در آرابیدوپسیس در مراحل اولیه تنش‌های غیر زیستی به نسبت محدود است. نتایج نشان داد که در گیاهان نخود حساس به سرما، تولید H_2O_2 وابسته به تجزیه زیستی PAS با وزن مولکولی بالا در طی مرحله نخست بیوسنتز اتیلن فعال شد، اما تولید بیش از حد H_2O_2 همراه با افزایش شدید آنزیم‌های مسیر تجزیه زیستی PAS با وزن مولکولی بالا، بدون پیام‌رسانی اتیلن رخ داد. این نتایج بیانگر آن است که اتیلن، تنظیم‌کننده تعادل تولید H_2O_2 کاتالیز شده با آنزیم‌های تجزیه کننده PAS است که به نوبه خود به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه فعالیت کرده و با فعال کردن اهداف پایین‌دستی، تحمل سرما را در گیاهچه نخود بهبود می‌بخشد، پاسخی که حداقل تحت تنش سرما کوتاه‌مدت وابسته به ژنوتیپ است.

تعامل میان سوخت و ساز PAS با وزن مولکولی بالا در برابر تحمل تنش سرما در ژنوتیپ‌های متحمل و

حساس به سرما نخود: ژنوتیپ متحمل به سرما نخود، تحت تنش سرما در پاسخ‌های اولیه و دیر هنگام، افزایش قابل توجهی در Spm و Spd آزاد سلول نشان داد اما در پاسخ‌های اولیه ژنوتیپ حساس افزایش محتوی Spd نسبی و غیر معنی‌دار بود، در حالی که افزایش Spd در پاسخ‌های دیر هنگام و Spm در پاسخ‌های اولیه و دیر هنگام در این ژنوتیپ در مقایسه با شرایط کنترل معنی‌دار بود (شکل ۲-الف و ب). به همین ترتیب، در سایر پژوهش‌ها نیز به افزایش محتوی Spd و Spm تحت تنش‌های غیر زیستی اشاره شده است (Rodríguez-Kessler et al. 2006; Jiménez- Bremont et al. 2007; Sudhakar et al. 2014). نتایج این آزمایش بیانگر آن است که تحت تنش سرما، افزایش Spd و Spm آزاد در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با حساس برجسته‌تر بود که نقش احتمالی این دو متابولیت را در فرآیندهای بهبود تحمل سرما مشخص می‌کند. از همین رو، افزایش محتوی Spd و Spm برای تحمل گیاهان به تنش اسمزی، شوری و خشکی نیز مورد نیاز است (Jiménez-Bremont et al. 2007; Wang et al. 2007; Wi et al. 2014; Yin et al. 2014). افزایش محتوی PAS با وزن مولکولی بالا ارتباط نزدیکی با تحمل سرما داشته است (Amini et al. 2021) اما ممکن است تحت سایر تنش‌های غیر زیستی پاسخ‌های متفاوتی ایجاد کند (Sudhakar et al. 2014).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق دیدگاه جدیدی در مورد چگونگی ارتباط سوخت و ساز اتیلن و PAS با وزن مولکولی بالا با

تحمل تنش سرما ارائه می‌کند، که حداقل شامل سه سازوکار است: (۱) افزایش بیوسنتز اتیلن در پاسخ‌های زود هنگام ژنوتیپ متحمل

به سرما احتمالاً سیگنال فعال‌سازی سازوکارهای پاسخ به سرما است. ۲) پروتئین‌های PAO و DAO تولید H_2O_2 را به‌منظور پیام‌رسانی پاسخ‌های قدرتمند دفاعی گیاه افزایش می‌دهند و ۳) منابع PAS احتمالاً نقش مهمی در برابر آثار نامطلوب تنش سرما ایفا می‌کنند. در مجموع نتایج این تحقیق، تنظیم روابط تداخلی مابین اتیلن، PAS و H_2O_2 (به‌عنوان محصول جانبی تجزیه زیستی PAS) را به‌عنوان مدلی برای نمایش بخشی از پاسخ‌های تحمل سرما در نخود زراعی پیشنهاد می‌کند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به خاطر حمایت معنوی در

اجرای پژوهش حاضر و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

References

- Abts W, Van de Poel, B, Vandenbussche B, De Proft MP (2014) Ethylene is differentially regulated during sugar beet germination and affects early root growth in a dose-dependent manner. *Planta* 240, 679–686.
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, et al. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237–1249.
- Amini S, Maali-Amiri R, Kazemi-Shahandashti SS, et al. (2021) Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *J Plant Physiol* 258, 153387.
- 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 Physiol Biochem* 111, 39-49.
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, et al. (2004) Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz J Plant Physiol* 16, 31–38.
- Bitrián M, Zarza X, Altabella T, Tiburcio AF, Alcázar R (2012) Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal cross talks in plants. *Metabolites* 2(3), 516-528.
- Bulens I, Van de Poel B, Hertog MLATM, et al. (2014) Dynamic changes of the ethylene biosynthesis in ‘Jonagold’ apple. *Physiol Plant* 150, 161–173.
- Campestre MP, Bordenave CD, Origone AC, et al. (2011) Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *J Plant Physiol* 168, 1234–1240.
- Cervelli M, Di Caro O, Di Penta A, et al. (2004) A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J* 40, 410–418.
- Chen D, Ma X, Li C, et al. (2014) A wheat *aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* gene, *TaACO1*, negatively regulates salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 33, 1815–1827.

- Ciardi JA, Deikman J, Orzolek MD (1997) Increased ethylene synthesis enhances chilling tolerance in tomato. *Physiol Plant* 101, 333–340.
- Dong H, Zhen Z, Peng J, et al. (2011) Loss of *ACS7* confers abiotic stress tolerance by modulating ABA sensitivity and accumulation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 62, 4875–4887.
- Freitas VS, Souza Miranda R, Costa JH, et al. (2018) Ethylene triggers salt tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H₂O₂ production. *Environ Exp Bot* 145, 75-86.
- Gong B, Li X, VandenLangenberg KM, et al. (2014) Overexpression of *S-adenosyl-L methionine synthetase* increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnol J* 12, 694–708.
- Gong B, Wang X, Wei M, et al. (2016) Overexpression of *S-adenosylmethionine synthetase1* enhances tomato callus tolerance to alkali stress through polyamine and hydrogen peroxide cross-linked networks. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 124, 377–439.
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45.
- Grzesiak M, Filek M, Barbasz A, et al. (2013) Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG-and NaCl-induced stresses. *Plant Growth Regul* 69(2), 177-189.
- Guo Z, Tan J, Zhuo C, et al. (2014) Abscisic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotech J* 12, 601–612.
- Gupta K, Dey A, Gupta B (2013) Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol Plant* 35(7), 2015-2036.
- Habben JE, Bao X, Bate NJ, et al. (2014) transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant Biotech J* 12(6), 685-693.
- Heidarvand L, Amiri RM, Naghavi MR et al. (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russ J Plant Physiol* 58, 157-163.
- Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *J Plant Physiol* 170, 459-469.
- Hugo JP, Jan MC (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiol* 83:232-234.

- Hurry VM, Huner NPA (1991) Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol* 96,491–497.
- Jha UC, Nayyar H, Jha R, et al. (2020) Chickpea Breeding for Abiotic Stress: Breeding Tools and ‘Omics’ Approaches for Enhancing Genetic Gain. In *Accelerated Plant Breeding, Volume 3* (pp. 211-234). Springer, Cham.
- Jiang C, Belfield EJ, Cao Y, et al. (2013) An Arabidopsis soil salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. *Plant Cell* 25, 3535–3552.
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodríguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol Bioch* 45, 812–821.
- Kazemi Shahandashti SS, Maali Amiri R, Zeinali H, Ramezanpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Mol Biol Rep* 40(2), 893-903.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R (2018) Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J Plant Physiol* 226, 123-135.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H et al. (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *J Plant Physiol* 171, 1106-1116.
- Lasanajak Y, Minocha R, Minocha SC, et al. (2014) Enhanced flux of substrates into polyamine biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast *S-adenosylmethionine decarboxylase* gene. *Amino Acids* 46(3), 729-742.
- Lin Y, Wang J, Zu Y, Tang Z (2012) Ethylene antagonizes the inhibition of germination in Arabidopsis induced by salinity by modulating the concentration of hydroge peroxide. *Acta Physiol Plant* 34, 1895–1904.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- López-Gómez M, Hidalgo-Castellanos J, Iribarne C, Luch C (2014) Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant Soil* 374, 149-159.
- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol* 127, 1781-1787.

- Lyzenga WJ, Booth JK, Stone SL (2012) The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. *Plant J* 71(1), 23-34.
- Merga B, Haji J (2019) Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agricul* 5:1615718.
- Milhinhos A, Miguel CM (2013) Hormone interactions in xylem development: a matter of signals. *Plant Cell Rep* 32(6), 867-883.
- Moeder W, Barry CS, Tauriainen AA, et al. (2002) Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase* and *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130(4), 1918-1926.
- Moschou, PN, Delis ID, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008a) transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiol Plant* 133, 140–156.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, et al. (2008b) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708–1724.
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, et al. (2008c) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidas responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* 147, 1845–1857. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.123802>.
- Müller M, Munné-Bosch S (2015) Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant physiol* 169(1), 32-41.
- Nayyar H, Bains TS, Sanjeev K (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environ Exp Bot* 54, 275–285.
- Peng H, Cheng H, Yu X et al. (2010) Molecular analysis of an *actin* gene, *CarACT1*, from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Biol Rep* 37, 1081.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- 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.

- Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solís AG, Ruiz OA, Jimenez-Bremont JF (2006). Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regul* 48(2), 175-185.
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R et al. (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Mol Biol Rep* 29, 848-858.
- Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, et al. (2013) Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem J* 451, 145–154.
- Shi J, Habben JE, Archibald RL, et al. (2015) Overexpression of *ARGOS* genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize. *Plant Physiol* 169, 266–282.
- Stearns JC, Glick BR (2003) Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnol Adv* 21, 193–210.
- Stepanova AN, Alonso JM (2009) Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol* 12, 548-555.
- Sudhakar C, Veeranagamallaiah G, Nareshkumar A, et al. (2014) Polyamine metabolism influences antioxidant defense mechanism in foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salinity tolerance. *Plant Cell Rep* 34, 141–156.
- Tavladoraki P, Cona A, Federico R, et al. (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* 42, 411–426.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, et al. (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol* 141, 1519–1532.
- Thudi M, Chitikineni A, Liu X, et al. (2016) Recent breeding programs enhanced genetic diversity in both desi and kabuli varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Sci Rep* 6(1), 1-10.
- Van de Poel B, Smet D, Van Der Straeten D (2015) Ethylene and hormonal cross talk in vegetative growth and development. *Plant Physiol* 169(1), 61-72.
- Van de Poel B, Van Der Straeten D (2014) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front Plant Sci* 5, 640.
- Wang B, Zhang J, Xia X, Zhang WH (2011) Ameliorative effect of brassinosteroid and ethylene on germination of cucumber seeds in the presence of sodium chloride. *Plant Growth Regul* 65, 407–413. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-011-9595-9>.

- Wang H, Liang X, Huang J, et al. (2010) Involvement of ethylene and hydrogen peroxide in induction of alternative respiratory pathway in salt-treated *Arabidopsis* calluses. *Plant Cell Physiol* 51, 1754–1765.
- Wang X, Shi G, Xu Q, Hu J (2007) exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *J Plant Physiol* 164, 1062–1070.
- Wi SJ, Jang SJ, Park KY (2010) Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Mol Cell* 30, 37–49.
- Wi SJ, Kim SJ, Kim WT, Park KY (2014) Constitutive *S-adenosylmethionine decarboxylase* gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Planta* 239, 979–988.
- Wu L, Zhang Z, Zhang H, et al (2008) Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol* 148, 1953–1963.
- Yang L, Zu YG, Tang ZH (2013) Ethylene improves *Arabidopsis* salt tolerance mainly via retaining K^+ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na^+ content. *Environ Exp Bot* 86, 60–69.
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 35(1), 155-189.
- Yin ZP, Li S, Ren J, Song XS (2014) Role of spermidine and spermine in alleviation of drought-induced oxidative stress and photosynthetic inhibition in Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis*) seedlings. *Plant Growth Regul* 74, 209–218.
- Zarza X, Atanasov KE, Marco F, et al. (2017) *Polyamine oxidase 5* loss-of-function mutations in *Arabidopsis thaliana* trigger metabolic and transcriptional reprogramming and promote salt stress tolerance. *Plant Cell Environ* 40, 527–542.
- Zhai, Y., Wang, Y., Li, Y., et al. (2013) Isolation and molecular characterization of *GmERF7*, a soybean ethylene-response factor that increases salt stress tolerance in tobacco. *Gene* 513, 174–183.
- Zhang Z, Huang R (2010) Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis. *Plant Mol Biol* 73, 241–249.
- Zhao M, Liu W, Xia X, et al. (2014) Cold acclimation-induced freezing tolerance of *Medicago truncatula* seedlings is negatively regulated by ethylene. *Physiol Plant* 152, 115–129.

