

## Determination of genetic and metabolic markers related to GABA shunt pathway in chickpea under cold stress

Saeed Amini<sup>1</sup>, Reza Maali Amiri<sup>2\*</sup>, Hasan Zeinali Khangah<sup>2</sup>

1, 2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.  
(Received: May 23, 2022- Accepted: July 21, 2022)

### ABSTRACT

The Gamma aminobutyric acid (GABA) content as a free amino acid which is involved in reduction of oxidative stress damage and stress adaptation in the cell is adjusted by various routes, including the GABA shunt pathway. In this experiment, Gama aminobutyric acid (GABA), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), activity of GABA transaminase (GABA-T) and relative expression of Glutamate Gecarboxylase 1 (*GADI*) gene in cold-tolerant (Sel96th11439) and cold-sensitive (ILC533) chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under cold stress ( $4^\circ C$ ) as a factorial experiment in a completely randomized design were studied. In tolerant genotype,  $H_2O_2$  content after a significant increase on the first day of cold stress decreased significantly on the sixth day of cold stress compared to control conditions (up to 4.7%), while its accumulation was observed in sensitive genotype (up to 50%). Based on  $H_2O_2$  adjustment as a damage index, these results indicated a relative acclimation to cold stress in tolerant genotype. Under cold stress, GABA content in tolerant genotype was higher compared to sensitive genotype (up to 14%). In this experiment, under cold stress, in tolerant genotype increasing GABA content was accompanied with an increase in GABA-T activity and relative expression of *GADI* gene as regulatory routes of this metabolite (up to 3- and 17-fold, respectively). The maximum and minimum activities of catabolic and anabolic pathways were observed in tolerant genotype on the sixth day of cold stress, respectively. Therefore, under cold stress, the accumulation of GABA in tolerant genotype led to reduced cell damage ( $H_2O_2$  results) and improved cold tolerance. These indices were useful in assessment of chickpea genotypes under cold stress and breeding programs.

**Keywords:** Cold stress, GABA transaminase (GABA-T) enzyme, Glutamate Gecarboxylase1 (*GADI*) gene relative expression, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), tolerant and sensitive genotypes.

### تعیین نشانگر متابولیکی و ژنتیکی مرتبط با مسیر GABA در نخود زراعی تحت تنش سرما

سعید امینی<sup>۱</sup>، رضا معالی امیری<sup>۲\*</sup>، حسن زینالی خانقاه<sup>۲</sup>

او ۲- دانش آموخته دکتری و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.  
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰)

### چکیده

محتوی گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) به عنوان آمینواسیدی که در کاهش خسارت های تنش اکسیداتیو و سازگاری به تنش در سلول نقش ایفا می کند توسط مسیرهای مختلفی از جمله مسیر GABA shunt تنظیم می شود. در این پژوهش میزان پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، GABA، بیان نسبی ژن گلو تامات دکربوکسیلاز (*GADI*) و فعالیت آنزیم GABA ترانس آمیناز (GABA-T) در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96th11439) و حساس (ILC533) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرما چهار درجه سانتی گراد به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مطالعه شد. در ژنوتیپ متحمل، میزان  $H_2O_2$  پس از افزایش معنی دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد نشان داد (بیش از ۴/۷ درصد)؛ در حالی که تجمع آن (تا ۵۰ درصد) در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش سرما مشاهده شد. با توجه به تنظیم پراکسید هیدروژن به عنوان شاخص خسارت، این نتایج بیانگر سازگاری نسبی به تنش سرما در ژنوتیپ متحمل بود. تحت تنش سرما میزان متابولیت GABA در ژنوتیپ متحمل تا ۱۴ درصد بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. در این آزمایش به موازات افزایش میزان GABA تحت تنش سرما، بیان نسبی ژن *GADI* و فعالیت آنزیم GABA-T به ترتیب تا ۱۷ برابر افزایش و ۲/۸ برابر کاهش یافت. به ترتیب حداکثر و حداقل فعالیت دو مسیر بیوسنتز و تخریب GABA در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد. بنابراین تحت تنش سرما تجمع GABA به ترتیب با افزایش و کاهش فعالیت مسیر بیوسنتز و تخریب آن در ژنوتیپ متحمل تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد منجر به کاهش آسیب سلولی (نتایج  $H_2O_2$ ) و بهبود درجه تحمل نخود به سرما شد. چنین شاخص هایی در ارزیابی ژنوتیپ های نخود تحت تنش سرما موثر بوده و بکارگیری آنها در برنامه های به نژادی مفید است.

**واژه های کلیدی:** آنزیم GABA ترانس آمیناز (GABA-T)، بیان نسبی ژن گلو تامات دکربوکسیلاز (*GADI*)، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، سرما، نخود زراعی.

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

## مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگشن و دیپلوئید ( $2n=2x=16$ )، محتوی ژنتیکی نسبتاً کوچکی (740 Mbp) دارد (Varshney *et al.*, 2013). به طور کلی بذر این گیاه دارای  $31/2-16/4$  درصد پروتئین،  $9/0-1/6$  درصد فیبر،  $38/1-73/3$  درصد کربوهیدرات و  $6/8-1/5$  درصد چربی است (Mantri *et al.*, 2007). پتانسیل تولید نخود در دنیا (۵ تن در هکتار) بوده؛ در حالی که تولید واقعی آن ( $0/8$  تن در هکتار) می‌باشد (FAO, 2012). میزان سطح زیر کشت این گیاه در ایران  $50189$  هکتار و عملکرد در واحد سطح آن  $542$  کیلوگرم در هکتار است (آمارنامه کشاورزی ۹۵-۱۳۹۴). پایین بودن عملکرد نخود در ایران، غالباً به دلیل کشت ارقام کم‌محصول و حساسیت آن به تنش‌های محیطی است.

اساسی‌ترین مشکل کشت بهاره نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) کمبود رطوبت آخر فصل و تنش خشکی است که به کاهش بهره‌وری و تولید تا میزان  $350$  کیلوگرم در هکتار منجر می‌شود. با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در فصل‌های پاییز و زمستان، امکان کشت نخود در این فصل‌ها نیز وجود دارد؛ در حالی که تنش سرما یکی از عوامل محدودکننده توسعه کشت پاییزه می‌باشد (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2013)؛ بنابراین بهبود تحمل به تنش سرما یکی از مهمترین برنامه‌های به‌نژادی در سازگاری، بهبود تولید و عملکرد نخود زراعی است (Heidarvand *et al.*, 2011). تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما منجر به تجمع بیش از حد گونه‌های

اکسیژن فعال ( $ROS^1$ ) شده که نهایتاً منجر به آسیب‌های شدید به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های اسیدنوکلیک در سلول‌های گیاهی می‌شود (Amini *et al.*, 2017). در طی فرایند سازگاری به تنش در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو القاشده توسط ROS، میزان متابولیت‌ها در اثر تنظیم تظاهر ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌ها تغییر می‌کند (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). بنابراین تحت تنش‌های غیر زیستی برنامه‌ریزی مجدد ژنوم با تغییر الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند سبب تغییر هموستازی و متابولیسم سلولی شود.

از دیدگاه فیزیولوژیک در گیاهان، مسیر آنزیمی GABA shunt در تنظیم مولکولی بسیاری از فرایندهای رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های مختلف غیر زیستی موثر است (Tavladoraki *et al.*, 2012). این مسیر متابولیسمی از یک سو با فعالیت آنزیم گلو تامات دکربوکسیلاز ( $GAD^2$ ) در سنتز گاما آمینوبوتریک اسید ( $GABA^3$ ) نقش داشته و از سوی دیگر با فعالیت آنزیم GABA ترانس آمیناز ( $GABA-T^4$ ) این متابولیت را تجزیه می‌کند (Liao *et al.*, 2017). مولکول GABA یک آمینواسید آزاد<sup>۵</sup> چهارکربنه نیتروژن دار با تعداد گروه‌های بار مثبت و بار منفی برابر و دارای خاصیت اتصال به ROS و حذف آنها است که به‌عنوان اسموپروتکتنت (زیست‌سازگار ساز) غیر آنزیمی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی سریعاً سنتز و در شارکربن<sup>۶</sup>، تنظیم اسمزی و سیتوپلاسمی، چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید ( $TCA^7$ )، پیام‌رسانی سلولی و محافظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو موثر است (Yang *et al.*, 2011). بر اساس مطالعات انجام شده

5- Free amino acid  
6- Carbon flux  
7- Tricarboxylic acid

1- Reactive oxygen species  
2- Glutamate decarboxylase  
3- Gama-Aminobutyric acid  
4- GABA transaminase

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد (Yang *et al.*, 2011). بنابراین GABA می‌تواند به‌عنوان نشانگر متابولیکی در ارزیابی تحمل به دمای پایین استفاده شود.

هر یک از عوامل محیطی، برنامه‌ریزی تظاهر ژن‌ها را به شکل متفاوتی تغییر می‌دهد. امروزه با استفاده از فناوری‌های نوین می‌توان با بررسی بیان ژن‌ها بخشی از پاسخ‌های یاخته در سطح رونوشت (ترانسکریپتوم) را شناسایی کرد. تغییر فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله GAD که در مسیر متابولیک GABA shunt از طریق تجمع یون‌های هیدروژن و کلسیم سیتوسولی تحت تنش فعال شده و متابولیت GABA را به‌منظور ارائه پاسخ به شرایط تنش سنتز می‌کند (Shelp *et al.*, 2012a)، یکی از ویژگی‌های یاخته گیاهی است که توسط تغییر بیان ژن رمزکننده آن یعنی *GAD1* تنظیم می‌شود. بنابراین با بررسی الگوی بیان نسبی این ژن اطلاعات سودمندی درباره چگونگی تغییر فعالیت این آنزیم تحت تنش حاصل می‌شود. کاهش میزان GABA و پاسخ‌های دفاعی سلول در گیاهچه جهش‌یافته آرابیدوپسیس که ژن‌های *GAD* سنتزکننده در آن دست‌رفته‌اند تاییدکننده فرضیه مشارکت آن‌ها در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری است (Mekonnen *et al.*, 2016; Zarei *et al.*, 2017).

آنزیم GABA-T (EC 2.6.1.19) از طریق کاتالیز واکنش برگشت‌پذیر تجزیه GABA به سوکسینیک سمی‌آلدئید (SSA<sup>۱۲</sup>) میزان این متابولیت را در سلول تحت تنش‌های غیر زیستی تنظیم می‌کند، فرایندی که توسط

در سلول‌های گیاهی، میزان GABA توسط دو مسیر مختلف آنزیمی GABA-Shunt و تجزیه پلی‌آمین‌ها<sup>۸</sup> سنتز می‌شود (Shelp *et al.*, 2012a). مسیر آنزیمی GABA-Shunt به‌عنوان مسیر اصلی تنظیم میزان این متابولیت با فعالیت GAD و GABA-T تنظیم می‌شود (Hyun *et al.*, 2013) و مسیر تخریب PAs توسط فعالیت آنزیم‌های آمین‌کسیداز (AOs<sup>۹</sup>) کاتالیز می‌شود (Wang *et al.*, 2016).

مطالعات انجام‌شده ارتباط بین میزان GABA و آشفتگی‌های فیزیولوژیک و همچنین آثار حفاظتی این اسموپروتکتنت در پاسخ به تنش‌های محیطی را نشان داده است (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Mekonnen *et al.*, 2016). به‌طوری‌که محتوی GABA در گیاهان تحت تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما، گرما، کمبود اکسیژن<sup>۱۰</sup>، مکانیکی، گیاه‌خواری، زخم و آلودگی با پاتوژن‌ها تجمع یافت (Kinnersley & Turano, 2000; Shelp *et al.*, 2012a). تجمع GABA نقش مهمی در بسته‌شدن روزه‌های آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی داشت (Mekonnen *et al.*, 2016). در فلفل، باقلا، چای و ریشه سویا به‌ترتیب تحت تنش کمبود نور، کمبود و بیشبود اکسیژن<sup>۱۱</sup> و شوری با افزایش محتوی GABA آسیب‌های سلولی کاهش یافت (Xing *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2011). اسپری‌پاشی GABA خسارت اکسیداتیو تنش سرما و کمبود اکسیژن در گوجه‌فرنگی و خربزه را کاهش داد (Malekzadeh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014) و باعث افزایش تحمل سرما در طی دوره انبارداری میوه هلو از طریق افزایش فعالیت

11- Anoxia

12- Succinic semi aldehyde

8- Polyamines

9- Amine oxidases

10- Hypoxia

سرما همراه با  $H_2O_2$  به عنوان شاخص آسیب سلولی مطالعه خواهد شد. شناسایی نحوه تنظیم مسیره‌های متابولسمی بیوسنتز و تجزیه GABA که بیانگر نتایج احتمالی این پژوهش هستند امکان دارد تغییرات محتوی GABA و مسیره‌های بیوسنتز و تجزیه آن را به عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش متابولیکی به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای نخود پیشنهاد و همچنین منجر به استفاده احتمالی آن به صورت اسپری‌پاشی GABA در راستای بهبود تحمل و یا افزایش بقا این گیاه تحت تنش سرما در جهت برنامه‌های کشاورزی پایدار شود. 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

#### مواد گیاهی و شرایط رشد

در این پژوهش از دو ژنوتیپ نخود (*C. arietinum* L.) کابلی (Sel96th11439) (متحمل به سرما با منشا ایکاردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های (ILC482×ILWC182) و ILC533 حساس به سرما منشا گرفته از مصر که اجداد آن هنوز ردیابی نشده‌اند (Heidarvand *et al.*, 2011; Saeed *et al.*, 2011) استفاده شد. دو ژنوتیپ مذکور از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم ایران (مراغه، آذربایجان شرقی) تهیه شدند. بذور با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای  $23^{\circ}C$  به مدت سه شبانه‌روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی،

آلفاکتوگلوتمارات ( $GABA-TK^{13}$ ) یا پیرووات/گلی-اکسیلات ( $GABA-TP^{14}/GABA-TG^{15}$ ) به عنوان گیرنده‌های آمینو به ترتیب آمینواسیدهای گلوتمات یا آلانین/گلیسین را نیز سنتز می‌کند (Vijayakumari & Puthur, 2016). SSA سپس با سنتز سوکسینیک اسید توسط سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز ( $SSADH^{16}$ )، سوبسترای لازم برای ادامه زنجیره انتقال الکترون و چرخه TCA را فراهم می‌کند (Shelp *et al.*, 2012a). این فرایند می‌تواند به عنوان سوبسترای متابولیک موثر در حفظ اسکلت کربنی و انتقال انرژی تحت تنش‌های غیر زیستی نیز به کار رود (Jacoby *et al.*, 2011). با این وجود میزان تجمع اسمولیت‌ها بر اساس نوع، شدت و مدت زمان تنش در ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های گیاهی متفاوت بوده به طوری که بیانگر درجه تحمل گیاه به تنش است (Hussain *et al.*, 2011).  $H_2O_2$  مولکول پیام‌رسان حیاتی با قابلیت مشارکت در فرایندهای فیزیولوژیک گیاهی مانند پاسخ سازگاری به تنش هاست (Dickinson & Forman, 2002).

هدف این پژوهش بررسی پاسخ‌های متابولیکی و مولکولی سازگاری به تنش سرما در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel96th11439) نخود زراعی است. در این راستا تغییرات بیوسنتز GABA توسط فعالیت عوامل موثر در مسیر GABA Shunt یعنی بیان ژن *GADI* و فعالیت آنزیم GABA-T به عنوان فعالیت دفاعی چندگانه سلول در برابر تنش سرما به منظور افزایش محتوی این متابولیت سلولی در جهت بهبود پاسخ‌های متمایز زود هنگام و دیر هنگام ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود به تنش

15- Pyruvate-dependent GABA-T  
16- SSA dehydrogenase

13- Alpha-ketoglutarate-dependent GABA-T  
14- Glyoxalase-dependent GABA-T

تیوب اضافه شد و تیوبها تا یکنواخت شدن نمونهها در حمام یخ قرار داده شدند. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  با سرعت  $12000 \times g$  سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید حاوی یک میلی لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و  $0.5$  میلی لیتر بافر فسفات  $10$  میلی مولار افزوده شد و پس از چندبار وارونه کردن تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج  $390\text{nm}$  توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) اندازه گیری شد (Loreto & Velikova., 2001). نتایج به صورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

#### سنجش میزان GABA

مقدار  $250$  میلی گرم بافت برگگی در  $800$  میکرولیتر محلول ECA (حاوی اتانول  $70$  درصد حجمی/حجمی، کلروفرم و هیدروکلریک اسید (HCl) یک دهم مولار (به نسبت  $1:5:12$  حجمی) هموژنیزه و در هاون پودر شد. سپس به مدت یک دقیقه ورتکس شد و پس از آن سانتریفیوژ ( $10$  دقیقه،  $4^{\circ}\text{C}$ ،  $12000 \times g$ ) انجام شد. روشناور به تیوب جدید انتقال یافت. فرایند استخراج مجدداً دو مرتبه تکرار و روشناورها باهم مخلوط شدند. روشناور به مدت یک شبانه روز در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. سپس فاز مایع در مدت یک ساعت در دستگاه خشک کن Speed Back خشک شد. به پلیت باقی مانده در هر تیوب  $300$  میکرولیتر متانول و  $1/2$  میلی لیتر استونیتریل افزوده شد و پیش از تزریق از فیلتر  $0.22$  میکرومتری عبور داده شد (Palma *et al.*, 2015). به منظور ارزیابی کمی GABA،  $15$  میکرولیتر از این محلول به سیستم Hewlett-Packard به طول  $250$  میلی متر و قطر داخلی  $4/6$  میلی متر متصل به دستگاه HPLC تزریق شد. فاز

گیاهچهها به گلدانهای سایز  $12$  (با قطر دهانه  $12$  سانتی متر و ارتفاع ده سانتی متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به  $0.25$  حجمی) انتقال یافت. گلدانها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با نور دویست میکرومول بر متر مربع بر ثانیه و شرایط نوری  $16$  ساعت روز و هشت ساعت شب و دمای  $23^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی  $75$  درصد قرار داده شد. جهت بررسی پاسخهای گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچهها (با ارتفاع حدود  $20$  سانتی متر و دارای حداقل پنج شاخه به طول پنج تا هشت سانتی متر) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اصفهان، ایران) با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به عنوان دمای  $LT_{50}$  (Lethal Temperature 50) (Nayyar *et al.*, 2005; Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2013) منتقل شدند و نمونه گیری از برگهای میانی هر گیاهچه به عنوان برگهای فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخهای زود هنگام) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخهای دیر هنگام گیاه) انجام شد (Rakei *et al.*, 2016). نمونه گیری از گیاهچهها در اتاقک رشد با دمای  $23^{\circ}\text{C}$  نیز به عنوان گیاهان شاهد (زمان صفر) 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  $23^{\circ}\text{C}$ ، گیاهچهها یک روز و شش روز پس از تنش سرما) در دو ژنوتیپ متحمل و حساس بررسی شد.

#### سنجش میزان پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

مقدار  $350$  میلی گرم نمونه تازه برگگی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون  $15$  میلی لیتری انتقال یافت و سپس  $5$  میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید یک درصد (محلول در حمام یخ) به

حاوی عصاره آنزیمی و یک میلی‌لیتر HCl ۰/۵ مولار و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم در آغاز واکنش بود. یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی نمونه‌هایی که واکنش آنها پایان یافته،  $\text{NAD}^+$  ۱/۵ میلی‌مولار و ADH ۰/۰۲ باکتری باسیلیوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، (ساخت شرکت سیگما) بود. محلول واکنش ۱۰ دقیقه در دمای  $25^\circ\text{C}$  قرار گرفت. میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu UV-1603 cell positioner CPS 240A, ) (Deewatthanawong *et al.*, ) (Kyoto, Japan) قرائت شد (2010b). فعالیت آنزیم GABA-T برحسب نانومول آلانین بر میلی‌گرم وزن تر گیاهچه در دقیقه بیان شد.

#### استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش Quantitative Reverse-Transcriptase PCR (QRT-PCR)

استخراج RNA کل سلول به روش ترايزول با ۸۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافت برگی خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد (شکل ۱). تشکیل دو باند RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۵S 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* براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم *DNaseI* و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و

متحرک (شسته شو) با سرعت ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه از محلول آب مقطر حاوی ۰/۰۱ درصد فرمیک‌اسید بود (Oh & Choi, 2001). دکتور این دستگاه از نوع فلورومتریک و در طول موج ۳۳۰ نانومتر تنظیم شد. از نمونه استاندارد (محلول GABA خالص) برای تعیین وجود GABA و تعیین غلظت آن استفاده شد. نتایج به صورت میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

#### استخراج و سنجش فعالیت آنزیم GABA-T

دو گرم بافت برگی در شش میلی‌لیتر بافر استخراج (حاوی Tris-HCl ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=9/1$ ، گلیسرول ۱۰٪) (حجمی/حجمی)، دی تیوتریتول ( $\text{DTT}^{17}$ ) یک میلی‌مولار، EDTA پنج میلی‌مولار،  $\text{PLP}^{18}$  ۰/۵ میلی‌مولار و  $\text{PMSF}^{19}$  یک میلی‌مولار) پودر و سپس سانتریفوژ  $15000 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  انجام شد. از سوپرناتانت برای سنجش GABA-T استفاده شد. فعالیت آنزیمی با ترکیب کردن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول واکنش حاوی Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با  $\text{pH}=8$ ، دی تیوتریتول ۱/۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۷۵ میلی‌مولار، PLP ۰/۱ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰٪ (حجمی/حجمی)، پیروات چهار میلی‌مولار و GABA ۱۶ میلی‌مولار سنجش شد. پس از ورتکس، محلول به مدت یک ساعت در دمای  $30^\circ\text{C}$  قرار داده شد. برای توقف واکنش ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک‌اسید (HCl) ۰/۵ مولار و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول افزوده شد. به منظور سنجش فعالیت GABA-T، میزان آلانین سنتز شده هر نمونه در طی این یک ساعت براساس سنجش فعالیت آنزیمی آلانین دهیدروژناز (ADH) اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد

19- Phenylmethylsulfonyl fluoride

17- Dithiothreitol (DTT)

18- Pyridoxal phosphate

آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومول و پنج 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 مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای 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°C با سرعت ۲۰°C در ثانیه ثبت شد، سپس در دمای ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه ثابت ماند و سپس با گرمایش آهسته با سرعت ۰/۵°C در ثانیه تا دمای ۹۵°C افزایش یافت. فلورسانس به طور مداوم در طول دوره افزایش آهسته دما برای نظارت بر تفکیک رنگ Evagreen اندازه‌گیری شد. ترسیم سیگنال‌های فلورسانس به طور 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 ۳/۲۳- و ۳/۴۲- بود (Pfaffl, 2001). نسبت بیان نسبی هر توالی باتوجه به شاخص Cq محاسبه شده که میانگین کارایی PCR ژن‌های خانه‌دار مورد نظر در Plate را در برمی‌گیرد. باتوجه 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  $2^{-\Delta\Delta CT}$  به عنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد

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) (۱۸-۲۰ نوکلئوتید) مخلوط 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 دی‌اکسی‌نوکلئوتری فسفات (dNTPs) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه شد. حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به این محلول افزوده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C قرار داده شد. سپس برای غیر فعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. به منظور تایید سنتز cDNA از روش تکثیر ژن خانه‌دار اکتین ۱ (*Actin1*) (Peng et al., 2010) از ژنوم نخود روی cDNA ساخت شده (پس از رقیق سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) توسط PCR و الکتروفورز آن روی ژل آگارز یک در صد استفاده شد. نتایج حاکی از مطابقت اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار (۱۸۹ bp) بود. ۱۱۴۵ نانوگرم در میکرولیتر 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

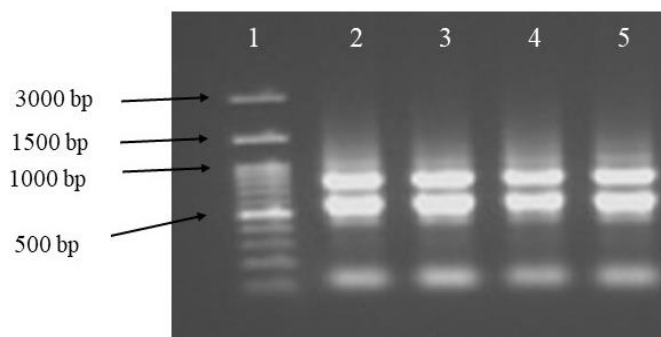
این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار زیستی برای آزمایش‌های بخش فیزیولوژی و دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای آزمایش‌های بخش بیان نسبی ژن *GAD1* انجام شد و آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن ( $P < 0.01$ ) و با نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

### نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان  $H_2O_2$ ، GABA، بیان ژن *GAD1* و فعالیت آنزیم GABA-T ( $P < 0.01$ ) وجود داشت (جدول ۲).

(Livak & Schmittgen, 2001). در این روش بیان ژن مورد نظر با بیان *Actin1* که یک ژن خانه‌دار تنظیم شده است نرمال شده و سپس از مقادیر نرمال شده برای مقایسه بیان متفاوت ژن‌ها در نمونه‌های مختلف استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن اختصاصی *GAD1* 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.

### تجزیه و تحلیل آماری



شکل ۱- نگاره نوارهای RNA استخراج شده. از چپ به راست به ترتیب: (۱) نشانگر اندازه با نوارهای مشخص شده، ۲ و ۳) ژنوتیپ متحمل و حساس شاهد، ۴ و ۵) ژنوتیپ متحمل و حساس روز اول تنش سرما

Figure 1. Extracted RNA. From left to right: 1) 100 bp DNA size marker, Fermentas; 2,3) tolerant and sensitive genotypes under control conditions and 4,5) tolerant and sensitive genotypes on the first day of cold stress.

جدول ۱- توالی‌های آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی.

Table 1. Primer sequences used in qRT-PCR amplification.

Accession number	Gene name	Protein name	Sequence (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon length (bp)
XM_004503044.3	<i>GAD1</i>	Glutamate Decarboxylase1	F:GTGTTGTCATAAGGGAGGACTT R:CTAGTGCTGCTGCTCTATT	57.71 57.81	124
EU529707.1	<i>Act1</i>	Actin1	F: CTACGAATTGCCTGATGGAC R: CCTCCTGAAAGGACGATGTT	56.31 57.23	189



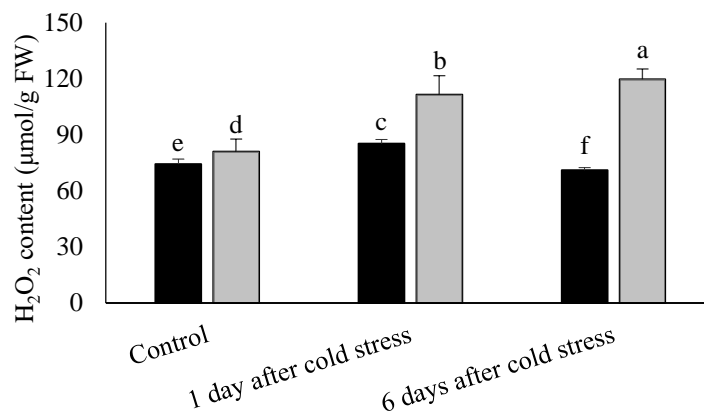
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در دو ژنوتیپ حساس و متحمل نخود زراعی در سطوح مختلف تنش سرما.

Table 2. Variance analysis of studied traits of tolerant (Sel96th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes under cold stress.

SOV	DF	MS			
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	GABA-T	GABA	GADI
Genotype	1	3327.64**	0.8**	2.52**	218.3**
Temprature	2	748.98**	1.64**	0.98**	109.1**
Genotype× Temprature	2	664.88**	0.86**	0.21**	85.8**
Error	12	1	0.018	0.007	0.056
CV (%)		1.1	10.03	5.72	4.77

متحمل هم در شرایط شاهد (۳۳ درصد) و هم تحت تنش (۸۰-۷۴ درصد) به طور معنی داری در مقایسه با ژنوتیپ حساس بیشتر بود (شکل ۳-الف). این نتایج با یافته‌های (Shelp *et al.*, 2012a) در خصوص افزایش میزان GABA تحت تنش‌های غیر زیستی مطابقت داشت. افزایش میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در پاسخ‌های زود هنگام و کاهش معنی دار آن در روز ششم تنش سرما در ژنوتیپ متحمل (شکل ۲) بیانگر نقش پیام‌رسانی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی می‌باشد که با افزایش میزان GABA مطابقت دارد. همانطور می‌دانید ROSها به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان ثانویه در سلول‌های یوکاریوتی ایفای نقش می‌کنند (Kazemi-Shahandashti & Maali-Amiri, 2018). لذا افزایش اولیه آنها در پاسخ‌های زود هنگام می‌تواند در القای پاسخ‌های دفاعی سلول تحت تنش ضروری باشد. بنابراین ژنوتیپ‌های متحمل هم پاسخ‌های اولیه و هم پاسخ‌های دیر هنگام مطلوبی به شرایط تنش‌زای محیطی نشان می‌دهند (Hannah *et al.*, 2005; Heidarvand & Maali-Amiri, 2013).

میزان تجمع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> که یکی از مهمترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (Kazemi Shahandashti & Maali Amiri, 2018)، تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (حداکثر بیش از ۶۹٪ در روز ششم تنش). در ژنوتیپ متحمل میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> پس از افزایش معنی دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش یافته، بطوری که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد به طور معنی داری کمتر شد (بیش از ۴۷٪)، در حالی که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد به طور پیوسته افزایش یافت (تا ۵۰٪) (شکل ۲). بنابراین درجه تحمل به تنش سرما در دو ژنوتیپ نخود با یکدیگر متفاوت بوده به طوری که این نتایج بیانگر ارتباط احتمالی تاثیر پاسخ‌های دفاعی ژنوتیپ‌های نخود می‌باشد. میزان GABA تحت تنش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری یافت به طوری که بیشترین میزان آن در روز ششم تنش مشاهده شد (تا ۸۹٪) (شکل ۳-الف). در ژنوتیپ حساس نیز میزان GABA در روز ششم تنش در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری یافت (۴۴/۴۴ درصد) اگر چه تجمع آن در ژنوتیپ



شکل ۲- تغییر میزان  $H_2O_2$  در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی ( $23^\circ C$ )، روزهای اول و ششم تنش سرما ( $4^\circ C$ ). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

Figure 2. Change in hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content in the leaves of tolerant (Sel96th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control ( $23^\circ C$ ), day 1 and 6 of cold stress ( $4^\circ C$ ) (DPT). Different letters indicate a significant difference among the means based on the comparison of the average Duncan.

آنزیم GABA-T در ژنوتیپ حساس به طور پیوسته کاهش و در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش در مقایسه با شاهد به طور پیوسته کاهش یافت (حداکثر تا ۲/۸ برابر در ژنوتیپ حساس)، (شکل ۳-ج) چنین نتایجی توجیه‌کننده محتوی کمتر GABA در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل در شرایط شاهد و تحت تنش سرما و همچنین بیانگر ظرفیت ژنتیکی فعال‌تر ژنوتیپ متحمل در جهت تولید یا حفظ محتوی GABA برای مقابله با آثار مخرب ROS سلولی است. گزارش شده که میزان GABA در گیاهان تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی (از جمله کمبود اکسیژن، سرما، گرما و آسیب‌های مکانیکی و گیاه‌خواری، زخم و آلودگی با پاتوژن‌ها) تجمع می‌یابد (Shelp *et al.*, 2012a). بنابراین به نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی‌داری بین میزان آسیب سرما (از جمله نتایج  $H_2O_2$ ) و افزایش میزان GABA وجود دارد و این متابولیت به عنوان

در گیاهان بخشی از سازگاری به تنش در نتیجه کاهش میزان ROS سلولی در اثر تنظیم میزان GABA، از طریق مسیرهای تخریب PAS توسط فعالیت آنزیم‌های پلی‌آمین‌اکسیداز (PAO) و دی‌آمین‌اکسیداز (DAO) همراه با تولید  $H_2O_2$  (Alcazar *et al.*, 2010; Amini *et al.*, 2021) و همچنین تنظیم سنتز آن (فعالیت آنزیمی GAD) و یا تغییر در فعالیت مسیر تجزیه آن (فعالیت آنزیمی GABA-T) ایجاد می‌شود (Xing *et al.*, 2007). نتایج نشان داد که در شرایط شاهد محتوی GABA برخلاف فعالیت آنزیم GABA-T در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۳-الف و ج). تحت تنش سرما محتوی GABA و بیان ژن *GADI* (حداکثر تا ۱۷ برابر در ژنوتیپ متحمل) در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت (شکل ۳-الف و ب) به طوری که این افزایش در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس معنی‌دار بود، در حالی که تحت تنش سرما فعالیت

به‌طور پیوسته افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش سرما ۱۷ برابر در مقایسه با شاهد بود (شکل ۳-ب). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱/۵ و دو برابر افزایش یافت (شکل ۳-ب).

این نتایج بیانگر القا موثرتر فعالیت ژنوم در سطح رونویسی به‌منظور آماده‌سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین‌تر به موازات بروز کمترین خسارت می‌باشد. همچنین میزان بیان نسبی این ژن در روز اول تنش در ژنوتیپ متحمل ۸/۵ برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس بود که حاکی از موثرتر بودن این مسیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در جهت القا تحمل به سرما بود. همچنین بیان نسبی این ژن با نتایج میزان GABA تحت تنش مطابقت داشت که نشان می‌دهد تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی در امتداد با تنظیم میزان متابولیت مسئول پاسخ به سرما در نخود بوده، مشاهداتی که توسط نتایج شاخص آسیب سلولی نیز تایید شد. از دست رفتن پروتئین‌های AtGAD در آرآبیدوپسیس جهش یافته سبب کاهش میزان GABA و پاسخ‌های دفاعی سلول در مقایسه با گیاهان شاهد (تیپ وحشی) تحت تنش‌های خشکی و شوری شد (Mekonnen *et al.*, 2016; Zarei *et al.*, 2017) که بیانگر نقش کلیدی مسیر تبدیل گلوتامات به GABA در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی است. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، القای این ژن در گیاهان متحمل در اثر برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها و هومو ستازی سلولی نقش موثری در ایجاد الگوی پاسخ‌های سازگاری به تنش سرما ایفا می‌کند.

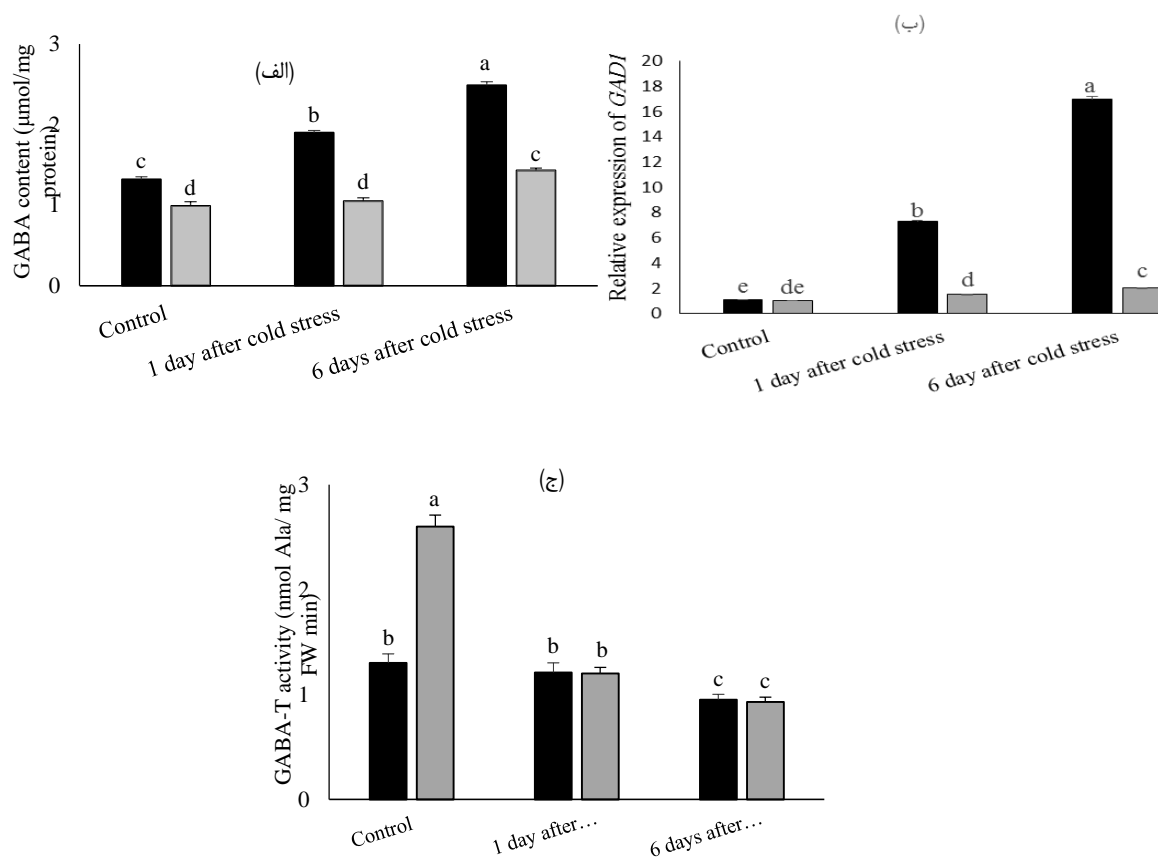
کاهش فعالیت GABA-T تحت تنش، باعث ایجاد تغییر معنی‌دار در شاخص خسارت سلولی و محتوی GABA به‌منظور سازگاری به سرما بخصوص در گیاهان متحمل شد (شکل ۳-ج). میزان فعالیت این آنزیم در شرایط شاهد در ژنوتیپ حساس به‌طور معنی‌داری بیشتر از

اسموپروتکتنت سلولی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفای نقش می‌کند (Bouchereau *et al.*, 1999) همچنین این یافته‌ها با نتایج (Malekzadeh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014;) (Yang *et al.*, 2011) در مورد اثر محلول‌پاشی GABA بر کاهش خسارت اکسیداتیو، تسریع افزایش پایداری غشا و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گوجه‌فرنگی، خربزه و میوه هلو تحت تنش سرما و کمبود اکسیژن همخوانی داشت. تحت تنش‌های محیطی القا سنتز GABA از طریق سازوکارهای مختلفی از جمله فعال‌سازی GAD وابسته به تغییر غلظت یون کلسیم/کالمودولین و یا اسیدی شدن pH فضای سیتوسول به دنبال اختلالات مکانیکی یا متابولیکی ناشی از تنش افزایش می‌یابد (Kinnersley & Turano, 2000). بنابراین محتمل است که تغییر شرایط محیطی و تعادل اکسیداسیون/احیا سلول تحت تنش مستقیماً بر فعالیت مسیرهای متابولیک تنظیم میزان GABA موثر باشد. تحت تنش کمبود و بی‌شبود اکسیژن و شوری به‌ترتیب در گیاهان باقلا، چای و ریشه سویا بخش اعظمی از GABA توسط فعالیت آنزیم GAD سنتز می‌شود (Xiang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011).

از آنجا که محتوی این متابولیت در سطح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شود، لذا به‌منظور دستیابی به اساس مولکولی چگونگی تغییر متابولیت GABA در پاسخ به تنش سرما، بیان نسبی ژن *GADI* بررسی شد؛ زیرا ژن مذکور رمزکننده آنزیم GAD و یکی از اجزای شبکه متابولیک پاسخ به تنش‌های محیطی است (Mekonnen *et al.*, 2016). مطابق با الگوی تغییر GABA تحت تنش سرما، بیان ژن *GADI* تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ حساس و متحمل

(۲/۰۴ برابر) (شکل ۳-ج). نرخ سریع کاهش فعالیت این آنزیم تحت تنش در ژنوتیپ حساس در مقایسه با متحمل احتمالاً به دلیل تلاش ناکارآمد حتی در ژنوتیپ حساس برای حفظ هموستازی سلولی است، نتایجی که با روند تغییرات GABA و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تحت تنش سرما نیز مطابقت داشت (شکل ۳-الف).

ژنوتیپ متحمل بود (تا دو برابر). همچنین مطابق با تغییرات محتوی GABA تحت تنش، میزان فعالیت GABA-T در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل نخود تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد به طور پیوسته کاهش یافت (حداکثر ۲/۸ برابر در ژنوتیپ حساس در روز ششم تنش) (شکل ۳-ج). این روند نزولی در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل چشمگیرتر بود



شکل ۳- تغییر میزان گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) (الف)، بیان ژن *GADI* (ب)، فعالیت آنزیم گابا ترانس آمیناز (GABA-T) (ج) در ژنوتیپ‌های متحمل (ستون سیاه) و حساس (ستون خاکستری) ILC533 (ستون خاکستری) نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (۲۳ °C)، روزهای اول و ششم تنش سرما (۴ °C). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

Figure 3. Changes in  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) content, *Glutamate decarboxylase 1* (*GADI*) gene expression and GABA transaminase (GABA-T) enzyme activity and in the leaves of tolerant (Sel96th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23 °C), day 1 and 6 of cold stress (4 °C) (DPT). Different letters indicate a significant difference among the means based on the comparison of the average Duncan.

محصولات تجزیه GABA با ورود به چرخه TCA و زنجیره انتقال الکترون در سنتز اسکلت کربنی و انتقال انرژی برای ایجاد هموستازی جدید مشارکت می‌کنند (Jacoby *et al.*, 2011). فرایندی که در اولین مرحله آن به موازات تبدیل GABA به SSA توسط GABA-T، آلفاکتوگلوکوتارات (GABA-TK) یا پیرووات/گلی‌اکسیلات (GABA-TG /GABA-TP) به‌عنوان گیرنده‌های آمینو به‌ترتیب آمینواسیدهای گلوتامات یا آلانین/گلیاسین را نیز سنتز می‌کند (Vijayakumari & Puthur, 2016). بنابراین نتایج این پژوهش، الگوی متمایز فعالیت آنزیم GABA-T در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل و همچنین در شرایط شاهد و تحت تنش سرما در نخود زراعی را نشان داده، به‌طوری‌که مطالعه فعالیت این آنزیم به‌عنوان عامل موثر در تجزیه GABA در شرایط آزمایش تاییدکننده اختلافات در تجمع این متابولیت به‌عنوان شاخص تحمل در برابر عوامل آسیب‌های سلولی (نتایج  $H_2O_2$ ) در ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما است. قابل ذکر است که در ژنوتیپ حساس نیز تحت تنش سرما اغلب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت مسیرهای دفاعی در این پژوهش به موازات ژنوتیپ متحمل مشاهده شد. به نظر می‌رسد ژنوتیپ حساس نیز در جهت پاسخ به تنش سرما و القا سازوکارهای دفاعی تلاش کرده اما به‌دلیل پاسخ‌گویی ناکارآمد در مسیرهای دفاعی قادر به مهار ROS نبوده؛ لذا این چنین سلولی قادر به بقا نخواهد بود.

### نتیجه‌گیری کلی

ارتباط شاخص آسیب سلولی ( $H_2O_2$ ) و محتوی GABA در این آزمایش غیر همسو بود، به‌طوری‌که تجمع این متابولیت‌ها در ژنوتیپ متحمل به موازات بیان ژن *GADI* و فعالیت آنزیم GABA-T با کاهش آسیب سلولی در ارتباط بود (شکل‌های ۱ و ۲). به‌منظور بهبود تحمل تنش سرما در نخود، بیوسنتز GABA توسط تنظیم دقیق فعالیت عوامل مختلف موثر در مسیر GABA shunt که شامل مسیر بیوسنتز این متابولیت (افزایش بیان نسبی ژن

روند متضاد تغییرات فعالیت آنزیم GABA-T با الگوی محتوی GABA و تغییرات بیان نسبی ژن *GADI* موید نقش محافظت‌کننده این متابولیت به‌عنوان یکی از مسیرهای پاسخ به تنش سرماست (شکل ۳-الف، ب، ج) که بر اساس نتایج تحقیقات پیشین (Amini *et al.*, 2020) در نخود تحت تنش سرما علاوه‌بر تنظیم توسط مسیر GABA shunt توسط مسیر تخریب پلی‌آمین‌ها نیز سنتز می‌شود؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که در نخود زراعی تحت تنش سرما به‌منظور تنظیم محتوی GABA هر دو مسیر GABA shunt و تخریب پلی‌آمین‌ها فعال هستند. این نتایج با یافته‌های Palma *et al.* (2014, 2015) که گزارش کردند تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد در میوه Zucchini، با کاهش فعالیت GABA-T، محتوی GABA افزایش یافته و گزارش (Ditomasso *et al.*, 1992) که به نقش اسپری‌پاشی Gabaculine (بازدارنده آنزیم GABA-T) در تحریک تجمع GABA اشاره دارد، همخوانی داشت. بنابراین، به‌نظر می‌رسد کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده GABA با کارآتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می‌تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش‌های غیر زیستی از جمله سرما نقش داشته باشد. همچنین وجود روند متضاد بین فعالیت GABA-T و بیان نسبی *GADI* (شکل ۳-ب، ج) تاییدکننده عملکرد متضاد این دو مسیر در تنظیم محتوی GABA است. تحت تنش سرما کاهش شدیدتر فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس در مقایسه با متحمل بیانگر تلاش سلول حتی در ژنوتیپ حساس به منظور حفظ محتوی GABA و مبارزه با آثار مخرب آسیب‌های سلولی است، با این‌وجود سلول‌های این گیاه ظرفیت جبران عدم کارایی در سنتز GABA (شکل ۳-الف، ب) را نداشته‌اند. نتایج شاخص‌های خسارت سلولی نیز موید چنین فرضیه‌ای می‌باشد (شکل ۲). همچنین در امتداد با نقش حیاتی مسیر بیوسنتز GABA، مسیر تجزیه آن نیز از اهمیت زیادی در تنظیم میزان این متابولیت برخوردار است. تحت تنش‌های محیطی

بهبود تحمل تنش سرما در این گیاه تحت تنش سرما بینجامد. مطالعه این فرایندها که غالباً همراه با القای سامانه‌های دفاعی خواهد بود، به درک بهتر نحوه بهبود تحمل به تنش سرما در نخود زراعی منجر خواهد شد. با انجام مطالعات تکمیلی در ژنوتیپ‌های نخود به نظر می‌رسد کاربرد GABA در جهت بهبود تحمل به تنش سرما در برنامه‌های کشاورزی پایدار نخود استفاده شود. با توجه به چالش‌های زیست‌محیطی، آثار کاربرد اسپری‌پاشی GABA، بر عملکرد و کیفیت نخود باید به‌طور جامع مطالعه شود.

(GADI) و همچنین مسیر تجزیه آن (کاهش فعالیت آنزیم GABA-T) است، افزایش می‌یابد. پاسخ‌های متمایز زودهنگام و دیرهنگام ژنوتیپ‌ها به تنش سرما بیانگر راهبرد چندگانه دفاعی سلولی نخود به تنش سرما بود. این یافته که گیاهان نخود دارای تجمع بیشتر GABA (به‌عنوان اسموپروتکتنت سلولی) با کاهش میزان آسیب‌های سلولی، تحمل بیشتری به تنش سرما دارد، ممکن است تغییر محتوی GABA و مسیرهای مختلف بیوسنتز و تجزیه آن را به‌عنوان نشانگرهای آگاهی بخش متابولیکی به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای نخود پیشنهاد کرده و همچنین به توانایی بقا و یا

## REFERENCES

1. Amini, S., & Maali, R. (2020). Evaluation of gamma-aminobutyric acid (GABA) biosynthetic pathway in chickpea under cold stress. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(3), 1-24. (In Persian)
2. Amini, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S. S., López-Gómez, M., Sadeghzadeh, B., Sobhani-Najafabadi, A., & Kariman, K. (2021). Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *Journal of Plant Physiology*, 258, 153387.
3. Amini, S., Maali-Amiri, R., Mohammadi, R., & Kazemi-Shahandashti, S. S. (2017). cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO<sub>2</sub> nanoparticles during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 39-49.
4. Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
5. Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2013). Open or close the gate—stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 4, 138.
6. Deewatthanawong, R., Nock, J. F., & Watkins, C. B. (2010b).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) accumulation in four strawberry cultivars in response to elevated CO<sub>2</sub> storage. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 92-96.
7. Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 1019-1026.
8. DiTomaso, J. M., Hart, J. J., & Kochian, L. V. (1992). Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiology*, 98(2), 611-620.
9. Heidarvand, L., Amiri, R. M., Naghavi, M. R., Farayed, Y., Sadeghzadeh, B., & Alizadeh, K. H. (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russ. Journal of Plant Physiology*, 58(1), 157-163.
10. Heidarvand, L., & Maali-Amiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 170(5), 459-469.
11. Hurry, V.M., & Huner, N.P.A. (1991). Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiology*, 96, 491-497.
12. Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M., & Siddique, K.H. (2011). Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*, 29, 300-311.
13. Hyun, T. K., Eom, S. H., Jeun, Y. C., Han, S. H., & Kim, J. S. (2013). Identification of glutamate decarboxylases as a  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) biosynthetic enzyme in soybean. *Industrial Crops and Products*, 49, 864-870.
14. Jacoby, R. P., Taylor, N. L., & Millar, A. H. (2011). The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 16(11), 614-623.

15. Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., & Ramezanzpour, S.S. (2013). Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171:1106-1116.
16. Kazemi-Shahandashti, S. S., & 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.
17. Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., & Ramezanzpour, S. S. (2014). Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171(13), 1106-1116.
18. Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Review in Plant Science*, 19(6), 479-509.
19. Li, Y., Fan, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Yue, H., Wang, L., & Jiao, Y. (2017). Effects of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum L.*) seedlings under low light stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(2), 436-449.
20. Liao, J., Wu, X., Xing, Z., Li, Q., Duan, Y., Fang, W. & Zhu, X. (2017).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) accumulation in tea (*Camellia sinensis L.*) through the GABA shunt and polyamine degradation pathways under anoxia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(14), 3013-3018.
21. Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
22. 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(4), 1781-1787.
23. Malekzadeh, P., Khara, J., & Heydari, R. (2014). Alleviating effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), 133-137.
24. Mantri, N. L., Ford, R., Coram, T. E., & Pang, E. C. (2007). Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics*, 8(1), 303.
25. Mekonnen, D. W., Flüge, U. I., & Ludewig, F. (2016). Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 245.
26. Nayyar, H., Satwinder, K., Kumar, S., Singh, K.J., & Dhir, K.K. (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*, Sin 46.
27. Oh, S. H., & Choi, W. G. (2001). Changes in the levels of  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings. *Journal of Plant Resources*, 114(3), 309-313.
28. Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M., Garrido, D. (2014). Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 161-171.
29. Palma, F., Carvajal, F., Ramos, J. M., Jamilena, M., Garrido, D. (2015). Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 131-140.
30. Peng, H, Cheng, H, Yu, X. *et al.* (2010). Molecular analysis of an actin gene, *CarACT1*, from chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Molecular Biology Reports*, 37, 1081.
31. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.
32. 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.
33. Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L., & Brikis, C.J., (2012). Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193, 130-135.
34. 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(2-3), 411-426.
35. Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A. G., & Millan, T. (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum L.*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnol.*, 31(3), 240.36.

- Vijayakumari, K., & Puthur, J. T. (2016). Gama-Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. *Plant Growth Regulation*, 78(1), 57-67.
37. Wang, C., Fan, L., Gao, H., Wu, X., Li, J., Lv, G., & Gong, B. (2014). Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 17-26.
38. Wang, Y., Luo, Z., Mao, L., & Ying, T. (2016). Contribution of polyamines metabolism and GABA shunt to chilling tolerance induced by nitric oxide in cold-stored banana fruit. *Food Chemistry*, 197, 333-339.
39. Xing, S.G., Jun, Y.B., Hau Z.W., & Liang, L.Y. (2007). Higher accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 560-566.
40. Yang, A., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011).  $\gamma$ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chemistry*, 129, 1619-1622.
41. Yang, R., Chen, H., & Gu, Z. (2011). Factors influencing diamine oxidase activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11616-11620.
42. Zarei, A., Chiu, G. Z., Yu, G., Trobacher, C. P., & Shelp, B. J. (2017). Salinity-regulated expression of genes involved in GABA metabolism and signaling. *Botany*, 95(6), 621-627.