



Evaluating the Regulation of Diamine Cadaverine Content as a Cold Stress Tolerance Index in Chickpea

Saeed Amini¹ | Reza Maali-Amiri² | Hasan Zeinali Khanghah³

1. Identification and Registration of Plant Variety Department, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: s.amini@areeo.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: rmamiri@ut.ac.ir
3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hzeinali@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: March 05, 2023

Received in revised form:

April 17, 2023

Accepted: May 08, 2023

Published online:

September 23, 2023

Keywords:

Cadaverine,
cold tolerance,
diamine oxidase (DAO),
hydrogen peroxide,
relative expression of diamine
oxidase (*CaDAO*) gene.

ABSTRACT

Metabolic adaptation to cold stress plays an important role in the growth, survival, and yield of crops. Diamine cadaverine (Cad) as an osmolyte may take part in counteracting the oxidative stress induced by cold stress in chickpea. In this experiment, content of hydrogen peroxide (H₂O₂), Cad, activity of diamine oxidase (DAO), and its relative gene expression (*DAO*) in cold-tolerant (Sel96th11439) and cold-sensitive (ILC533) chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under cold stress (4°C) as a factorial experiment in a completely randomized design (CRD) were studied. In tolerant genotype H₂O₂ content after a significant increase on the first day of cold stress decreased significantly on the sixth day of cold stress compared to control condition (up to 4.7%), while, its accumulation was observed in sensitive genotype (up to 50%). These results indicated a relative acclimation to cold stress in tolerant genotype. The Cad metabolite content (18 nmol/g FW) was observed under cold stress in tolerant genotype on the sixth day of stress. Under cold stress, in tolerant genotype increasing Cad content was accompanied with an increase in DAO activity and relative expression of *DAO* gene as biosynthetic pathways of this metabolite (up to 3.5- and 3-fold, respectively). The maximum activity of this route was observed in tolerant genotype on the sixth day of cold stress. In the late responses under cold stress, the accumulation of Cad in tolerant genotype led to reduced cell damage (H₂O₂ results) and improved cold tolerance. These indices were useful in assessment of chickpea genotypes under cold stress and breeding programs.

Cite this article: Amini, S., Maali-Amiri, R., & Zeinali Khanghah, H. (2023). Evaluating the regulation of diamine cadaverine content as a cold stress tolerance index in chickpea. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 54(3), 149-161. DOI: 10.22059/ijfcs.2023.356157.654986.



© The Authors.

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijfcs.2023.356157.654986>



انتشارات دانشگاه تهران

علوم گیاهان زراعی ایران

Homepage: <https://ijfcs.ut.ac.ir/>

شاپا الکترونیکی: ۸۰۸۲-۲۴۲۳

ارزیابی تنظیم محتوی دی آمین کاداوارین به عنوان شاخص تحمل تنش سرما در نخود زراعی

سعید امینی^۱ | رضا معالی امیری^۲ | حسن زینالی خانقاه^۳

۱. بخش شناسایی و ثبت ارقام گیاهی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، رایانامه: s.amini@areeo.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، رایانامه: rmamiri@ut.ac.ir

۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، رایانامه: hzeinali@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	سازگاری متابولیکی گیاهان به تنش سرما نقش مهمی در رشد، بقا و عملکرد گیاهان زراعی دارد. دی آمین کاداوارین به عنوان یک اسمولیت احتمالا در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو القاشده توسط سرما مشارکت دارد. در این پژوهش، میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، کاداوارین (Cad)، فعالیت آنزیم دی آمین اکسیداز (DAO) و بیان نسبی ژن دی آمین اکسیداز (DAO) در دو ژنوتیپ متحمل (Sel96th11439) و حساس (ILC533) نخود زراعی (<i>Cicer arietinum</i> L.) تحت تنش سرما (چهار درجه سلسیوس) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا 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 در ژنوتیپ حساس مشاهده شد (تا ۵۰ درصد). این نتایج بیانگر سازگاری نسبی به تنش سرما در ژنوتیپ متحمل بود. تحت تنش سرما متابولیت Cad در ژنوتیپ متحمل در روز ششم تنش مشاهده شد (میزان ۱۸ نانومول بر گرم در وزن تر). به موازات افزایش میزان Cad تحت تنش سرما، در ژنوتیپ متحمل فعالیت آنزیم DAO و بیان نسبی ژن DAO به عنوان مسیرهای بیو سنتز این متابولیت در روز ششم تنش افزایش معنی داری یافت (به ترتیب تا ۳/۵ و سه برابر). حداکثر فعالیت این مسیر در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد. در پاسخهای دیر هنگام تحت تنش سرما، تجمع Cad در ژنوتیپ متحمل منجر به کاهش آسیب سلولی (نتایج H_2O_2) و بهبود درجه تحمل نخود به سرما شد. این شاخصها در ارزیابی ژنوتیپهای نخود تحت تنش سرما موثر بوده و به کارگیری آن در برنامه های به نژادی مفید است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱	
کلیدواژه ها: پراکسید هیدروژن، کاداوارین، آنزیم دی آمین اکسیداز (DAO)، بیان نسبی ژن DAO، تحمل سرما.	

استناد: امینی، س.، معالی امیری، ر.، و زینالی خانقاه، ح. (۱۴۰۲). ارزیابی تنظیم محتوی دی آمین کاداوارین به عنوان شاخص تحمل تنش

سرما در نخود زراعی. *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۴(۳)، ۱۴۹-۱۶۱. DOI: 10.22059/ijfcs.2023.356157.654986



© نویسندگان

ناشر: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

۱. مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی خودگ‌شن و دیپلوئید ($2n=2x=16$) محسوب شده و محتوی ژنتیکی نسبتاً کوچکی (740 Mbp) دارد (Varshney *et al.*, 2013). به‌طور کلی بذر این گیاه دارای $۳۱/۲-۱۶/۴$ درصد پروتئین، $۹/۰-۱/۶$ درصد فیبر، $۷۳/۳-۳۸/۱$ درصد کربوهیدرات و $۶/۸-۱/۵$ درصد چربی است (Mantri *et al.*, 2007). پتانسیل تولید نخود در دنیا ۵ تن در هکتار بوده؛ درحالی‌که تولید واقعی آن $۰/۸$ تن در هکتار است (FAO, 2012). میزان سطح زیر کشت این گیاه در ایران ۵۰۰۱۸۹ هکتار و عملکرد در واحد سطح آن ۵۴۲ کیلوگرم در هکتار است (آمارنامه کشاورزی ۹۵-۱۳۹۴). پایین‌بودن عملکرد نخود در ایران، غالباً به‌دلیل کشت ارقام کم‌محصول و حساسیت آن به تنش‌های محیطی است.

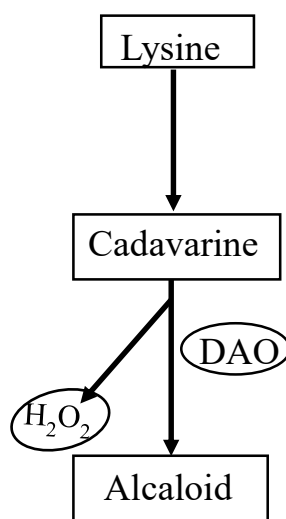
کشت بهاره نخود زراعی با مشکلاتی از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل همراه است که منجر به کاهش یافتن بهره‌وری و تولید تا میزان $۳۰۰-۴۰۰$ کیلوگرم در هکتار می‌شود. کشت‌های پاییزه یا زمستانه این گیاه با توجه به وجود رطوبت امکان‌پذیر بوده، ولی سرما عامل محدودکننده در توسعه کشت پاییزه نخود محسوب می‌شود (Kazemi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

H_2O_2 مولکول پیام‌رسان حیاتی با قابلیت مشارکت در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهی مانند پاسخ سازگاری به تنش‌ها است (Dickinson & Forman, 2002). کاداورین (Cad^1)، سبک‌ترین عضو خانواده پلی‌آمین‌ها (PAs^2) در واقع اسمولیتی پلی‌کاتیونی است که در پویایی فرآیندهای سلولی، رشد، نمو، تمایز و پاسخ به تنش‌های محیطی مشارکت دارد (Handa *et al.*, 2010). این متابولیت از پیش‌ماده لیزین^۳ در یک مسیر بیوسنتزی تولید و در ادامه توسط دی‌آمین‌اکسیداز (DAO^4) به آلکالوئیدها تبدیل می‌شود (Rajpal & Tomar, 2020). آنزیم DAO (EC 1.4.3.6) گروهی از آمین‌اکسیدازهای (AOs) گیاهی حاوی مس ($CuAOs$) است (Cona *et al.*, 2006) که با تنظیم میزان PAs، از جمله کاداورین (Cad) و تجزیه آن به آلکالوئیدها نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله رشد، نمو، گلدهی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کنند (Angelini *et al.*, 2010; Wimalasekera *et al.*, 2011a,b). فرآیند تولید PAs می‌کند (Minocha *et al.*, 2014; Tiburcio *et al.*, 2014).

کاداورین به‌عنوان پلی‌آمین سبک، علاوه بر ایفای نقش اسموپروتکتنت با حذف رادیکال‌های آزاد در تنظیم هموستازی سلول نیز موثر است. همچنین کاداورین می‌تواند به‌عنوان مولکول سیگنال در تنظیم فعالیت‌های سلولی و تحریک بیان ژن‌هایی که در بازیابی تنش موثرند نیز نقش ایفا کند (Simon-Sarkadi *et al.*, 2014). محتوی کاداورین از طریق القای فعالیت آنزیم لیزین‌دکربوکسیلاز در مسیر بیوسنتز و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم دی‌آمین‌اکسیداز (Cassan *et al.*, 2009) در مسیر تجزیه تجمع می‌یابد. آمینوا سید لیزین پیش‌ساز رایج کاداورین است (Simon-Sarkadi *et al.*, 2014). در شکل ۱ مسیر متابولیک کاداورین به‌طور شماتیک نمایش داده شده است. تغییر محتوی کاداورین نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی ایفا می‌کند (Rajpal & Tomar, 2020). تجمع کاداورین در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت بوده (Alcazar *et al.*, 2010a) و به‌طور معمول محتوی آن تحت تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Rajpal & Tomar, 2020).

1. Cadaverine
2. Polyamines
3. Lysine
4. Diamine oxidase

تحت تنش‌های محیطی شوری و خشکی افزایش محتوی کاداوآرین گیاهی به‌عنوان یک حفاظت‌کننده اسمزی گزارش شده است (Shen & Galston, 1985; Garcia-Garcia *et al.*, 2000; Shalaby, 2000; Carrizo *et al.*, 2001; Kuznetsov *et al.*, 2009; López-Gómez *et al.*, 2017; Köhler & Szepesi, 2023; Napieraj *et al.*, 2023; Kapoor, 2023; Samanta *et al.*, 2023); به‌طوری که به‌موازات جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها سبب بهبود تحمل به تنش‌ها شده است (Kuznetsov *et al.*, 2007; Sziderics *et al.*, 2010; Simon-Sarkadi, 2014). در پاسخ به تنش گرما، برنج محتوی کاداوآرین خود را افزایش داده که بیانگر نقش این پلی‌آمین در تحمل به تنش گرما است (Kapoor, 2023). این متابولیت به‌عنوان تعدیل‌کننده اسمزی نیز با محافظت از ساختارهای درون‌سلولی در طی تنش‌های محیطی نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش‌های محیطی در گیاهان دارد (Simon-Sarkadi *et al.*, 2014). از کاداوآرین به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای تحمل به تنش‌های محیطی استفاده شده (Janmohammadi *et al.*, 2012) و ارتباط مثبت و معنی‌دار آن با تحمل تنش گزارش شده است (Rajpal & Tomar, 2002). Kuznetsov *et al.* (2007) گزارش کردند که اسپری پاشی Cad روی بذور گیاهان زراعی با کاهش آثار تنش، جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه را تحت تنش شوری تسهیل می‌کند (Avusoglu *et al.*, 2007; Tomar *et al.*, 2013b).



شکل ۱. نمایش شماتیک مسیر متابولیک کاداوآرین در گیاهان (Moschou *et al.*, 2012).

بیان ژن فرآیند مولکولی حائز اهمیتی است که بین تنوع ژنتیکی و فنوتیپی ارتباط برقرار می‌کند و تنظیم آن نقش مهمی در تنوع صفات و تکامل گونه‌ها ایفا می‌کند (Wang *et al.*, 2018). همچنین تغییرات بیان ژن‌ها در پایه‌ریزی تنوع فنوتیپ بسیاری از موجودات ایفای نقش می‌کند (Konishi *et al.*, 2006, Hung *et al.*, 2012). بنابراین مقایسه محتوی رونوشت در شرایط، بافت و یا زمان خاص، الگوهای اختصاصی بیان ژن در هر مرحله را تعیین می‌کند و تعیین وظایف ژن‌ها را تسهیل می‌کند (Weiberg & Karlovsky, 2009). ترنسکریپتومیکس در یک بافت، زمان و یا شرایط خاص، عنصری کلیدی در ژنومیکس کارکردی است که درک ما را از نحوه کارکرد ژن‌ها افزایش می‌دهد (Weiberg & Karlovsky, 2009). بنابراین مطالعه تنظیم بیان ژن‌ها، شناخت کارکرد آنها و مکانیسم‌های مولکولی تنظیمی سامانه‌های زیستی را بهبود می‌دهد.

QPCR برای مطالعه خصوصیت‌های متنوع ژنتیکی اختصاصی موثر در تنظیم بیان ژن در اکثر جانداران استفاده شده است (Amini *et al.*, 2017). این مطالعات دیدگاه عمیق و منطقی در زمینه اساس ژنتیکی تنوع طبیعی در سطح mRNA ایجاد کرده و نقش بیان ژن‌ها در ایجاد تنوع فنوتیپی را بررسی کرده است. همچون متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های حد واسط نیز در سازگاری در پاسخ به تغییرات محیطی موثرند (Kliebenstein & Osbourn, 2012, Moore *et al.*, 2014). به‌نظر می‌رسد کاداوآرین، متابولیتی است که در پاسخ به تنش محتوی آن افزایش می‌یابد (Alcazar & Tiburcio, 2018). تنظیم بیان ژن‌ها نقش کلیدی

در سنتز متابولیت‌ها دارد و در ادامه حیات موجودات تحت تنش‌های محیطی نقش موثری ایفا می‌کند. این ارتباط بدون ایجاد ناهماهنگی در تنظیم بیان ژن‌هایی که در سنتز متابولیت‌های اختصاصی نقش دارند، انعطاف مناسبی در گیاهان برای سازش به تغییرات محیطی فراهم می‌کند. پژوهش‌ها در زمینه بیان ژن‌ها نقش تنظیم بیان ژن‌ها را در ایجاد تنوع بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل و بهبود تحمل سرما از طریق ایجاد تنوع در متابولیت‌های اختصاصی را نشان داده‌اند (Karami Moalem *et al.*, 2018). هدف این پژوهش بررسی پاسخ‌های متابولیکی و مولکولی سازگاری به تنش سرما در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (SeI96th11439) نخود کابلی (*C. arietinum* L.) است. در این راستا تغییرات محتوی کاداورین توسط فعالیت عوامل موثر در این مسیر متابولیک یعنی بیان ژن DAO و فعالیت آنزیم DAO به‌عنوان بخشی از فعالیت دفاعی چندگانه سلول در برابر تنش سرما به‌منظور بهبود محتوی این متابولیت سلولی در جهت بهبود پاسخ‌های متمایز زودهنگام و دیرهنگام ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود به تنش سرما همراه با H_2O_2 به‌عنوان شاخص آسیب سلولی بررسی خواهد شد. شناسایی نحوه تنظیم القایی برخی مسیره‌های متابولیسمی پاسخ به تنش از جمله کاداورین که بیانگر نتایج احتمالی این پژوهش است، امکان دارد تغییرات محتوی این مولکول و مسیره‌های تنظیمی آن را به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش متابولیکی به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای نخود پیه‌شهاد و همچنین منجر به بکارگیری آنها در راستای هدف به‌نژادی صفت تحمل تنش سرما از طریق بهبود تحمل و یا افزایش بقا گیاه در راستای اهداف 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.

۲. روش‌شناسی پژوهش

در این پژوهش از بذر دو ژنوتیپ نخود کابلی (*C. arietinum* L.) متحمل به سرما (SeI96th11439) (با منشا ایکاردا و حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های (ILC482×ILWC182) و حساس به سرما (ILC533) منشا گرفته از ارقام بومی مصر استفاده شد. بذر از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) تهیه شدند (Heidarvand *et al.*, 2011; Saeed *et al.*, 2011). بذر 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 گرفتند. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد به مدت سه شبانه‌روز قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های سایز ۱۲ (با قطر دهانه دوازده سانتی‌متر و ارتفاع ده سانتی‌متر حاوی رس، ماسه و کود دامی به نسبت سه به یک به ۲۵٪ حجمی) انتقال یافتند. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۶ با نور دوپست میکرومول بر متر مربع بر ثانیه (حدود ۱۰۰۰۰ لوکس) و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و هشت ساعت شب و دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی هفتاد و پنج درصد قرار داده شدند. جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها (با ارتفاع حدود بیست سانتی‌متر و دارای حداقل پنج شاخه به طول پنج تا هشت سانتی‌متر) به اتاقک رشد (آروین تجهیز، اسپادانا، ایران) با دمای $4^{\circ}C$ به‌عنوان LT_{50} نخود (Nayyar *et al.*, 2005; Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2013) منتقل شدند و نمونه‌گیری از برگ‌های میانی هر گیاهچه به‌عنوان برگ‌های فعال از دیدگاه فیزیولوژیکی در روز اول پس از شروع تنش سرما (جهت بررسی پاسخ‌های زودهنگام) و روز ششم پس از شروع تنش (جهت بررسی پاسخ‌های دیرهنگام گیاه) انجام شد (Rakei *et al.*, 2016). نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با دمای بیست و سه درجه سانتی‌گراد نیز به‌عنوان گیاهان شاهد انجام گرفت (سن فیزیولوژیکی 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 ۲۳ درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌ها یک روز و شش روز پس از شروع تنش سرما) در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار بررسی شد.

مقدار ۳۵۰ میلی گرم نمونه تازه برگگی با نیتروژن مایع در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر تهیه شده به فالكون ۱۵ میلی لیتری انتقال یافت و سپس ۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید یک در صد (محلول در حمام یخ) به تیوب اضافه شد و تیوب ها تا یکنواخت شدن نمونه ها در حمام یخ قرار داده شد. تیوب حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴°C با سرعت $g \times 12000$ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک تیوب 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 تیوب در محیط تاریک برای یکنواخت کردن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) اندازه گیری شد (Loreto & Velikova, 2001). نتایج به صورت میکرومول در هر گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش کمی Cad به روش Walter & Geun (1987) انجام شد. ۲۵۰ میلی گرم از بافت گیاهی در دو میلی لیتر محلول پرکلریک-اسید (PCA^۱) چهار درصد حاوی ۱ و ۷ دی آمینوهپتان^۲ (پنج میلی گرم در لیتر از اسید کلریدریک دو نرمال) هموژنیزه شد. پس از یک ساعت قرارگیری در ۴°C، از فیلتر (پالایشگر) ۴۵ درصد میکرونی عبور داده شد. روی ۰/۲ میلی لیتر از این محلول، یک میلی لیتر بافر کربنات با pH ۹ و یک میلی لیتر محلول دانسیل کلراید^۳ (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 سانتریفیوژ $g \times 500$ به مدت دو دقیقه فاز آلی (رویی) برداشته و این محلول برای ارزیابی Cad توسط HPLC استفاده شد. به منظور ارزیابی کمی Cad ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی به ستون Chrompack-Nederland در دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 تزریق شد. دتکتور این دستگاه از نوع UV است که در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. از نمونه های استاندارد برای تعیین وجود Cad و غلظت سنجی آن استفاده شد.

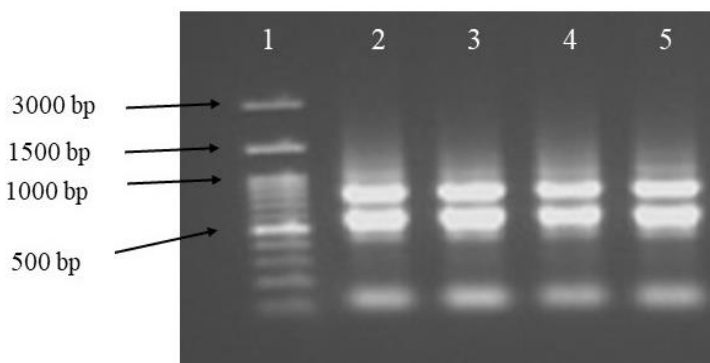
بر اساس روش López-Gómez *et al.* (2014)، پس از پودر کردن ۰/۴ گرم بافت برگگی در ۱/۲ میلی لیتر بافر استخراج (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵) نمونه ها سانتریفیوژ (۴°C، ۲۰ min، $g \times 10000$) و مایع رویی برداشته شد. واکنش سنجش فعالیت آنزیم DAO حاوی ۶۳۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵، ۷۰ میکرولیتر محلول واکنش (۶/۲۵) میکرولیتر آن دی متیل آنیلین^۴، ۲/۵ میلی گرم ۴-آمینوآنتی پیرین^۵، 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 cad (۳/۲) میلی گرم در هر میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۶/۵ بود. میزان فعالیت این آنزیم در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد.

۱-۳. استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش QRT-PCR (QRT-PCR)

استخراج RNA کل سلول به روش ترایزول با ۸۰ میلی گرم نمونه های بافت برگگی خردشده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز یک در صد تعیین شد (شکل ۲). 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 بر اساس 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 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شدند. تیوب ها در ۸۰°C- نگهداری شدند. به منظور ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNaseI با کمک آغازگر الیگودی تی (یک پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر

1. Perchloric acid (CLO4H)
2. 1,7-diaminoheptane
3. Dansyl chloride
4. NN-dimethylaniline
5. 4-aminoantiprine

رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای 70°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 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 $^{\circ}\text{C}$ ۴۲ قرار داده شد. سپس برای غیر فعال کردن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 70°C قرار گرفتند. به منظور تایید سنتز cDNA روش تکثیر ژن خانه‌دار اکتین ۱ (*Actin1*) استفاده شد، به طوری که پس از رقیق‌سازی و رساندن غلظت cDNA سنتز شده به ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر واکنش PCR و الکتروفورز قطعه تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد انجام شد (Peng et al., 2010). نتایج حاکی از مطابقت اندازه باند مشاهده شده با اندازه ژن خانه‌دار (۱۸۹ bp) بود. 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 پنج میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۲۰) برر سی شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت مورد نظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: دو دقیقه در دمای 94°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای 95°C ، ۱۰ ثانیه در دمای 57°C Tm 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 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، 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 ژن‌های خانه‌دار مورد نظر در Plate را در بر می‌گیرد. با توجه به نتایج منحنی‌های استاندارد، از نرم‌افزار REST می‌توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه‌دار (*Actin1*) در هر نمونه مشخص با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ به‌عنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (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 DAO و ژن خانه‌دار *Actin1* با استفاده از تارنمای Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) به آدرس (<https://www.idtdna.com>) برای دست‌یابی به آغازگرهای دارای خصوصیات مناسب انجام گرفت. در جدول ۱ نام آغازگرهای ژن‌های اختصاصی و خانه‌دار، توالی و شماره دسترسی آنها ارائه شده است.



شکل ۲. 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.

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

Accession number	Gene name	Protein name	Sequence (5'-3')	T _m (°C)	Amplicon length (bp)
AJ009825	DAO	Diamine oxidase	F: CTGTGCTACTGCTGAGAAA R: TGAACCTTGTGGTTGATGACTA	57	101
EU529707.1	Act1	Actin1	F: CTACGAATTGCTGATGGAC R: CCTCTGAAAGGACGATGTT	57	189

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

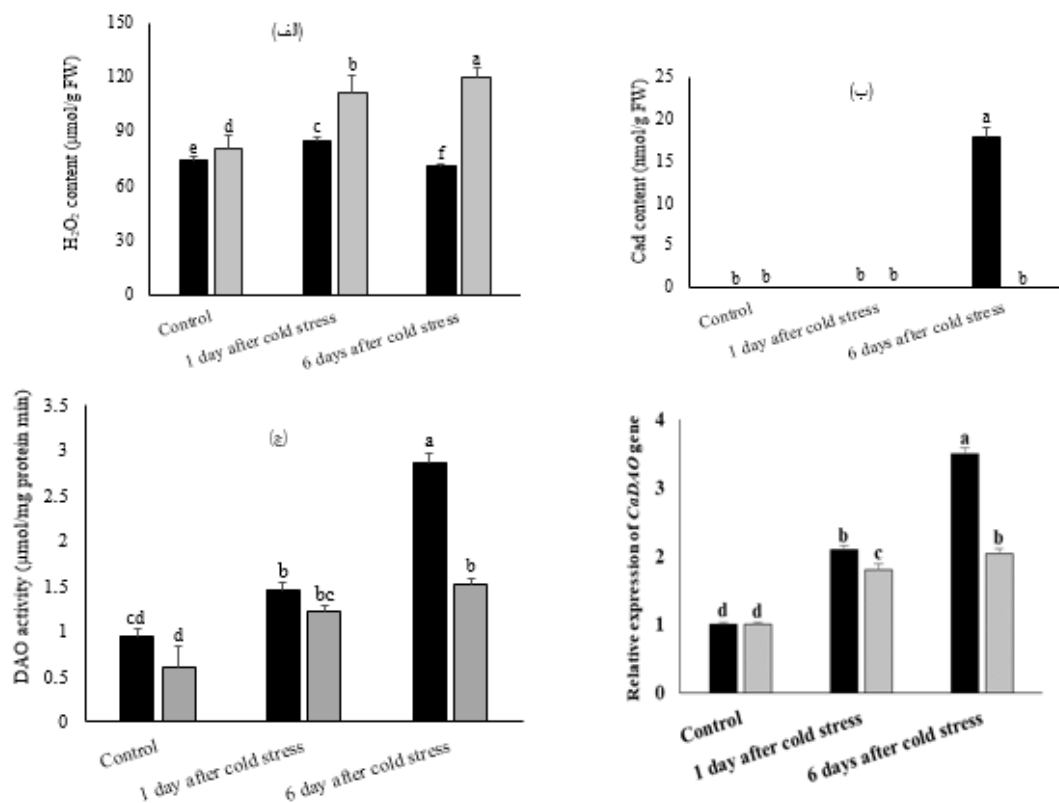
تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر میزان H₂O₂، کاداوآرین، فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن DAO ($P < 0.01$) وجود داشت (جدول ۲). میزان تجمع H₂O₂ که از مهمترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (Kazemi Shahandashti & Maali Amiri, 2018)، تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بیشتر بود (حداکثر بیش از ۶۹٪ در روز ششم تنش). در ژنوتیپ متحمل میزان H₂O₂ پس از افزایش معنی‌دار در روز اول تنش، در روز ششم کاهش یافته، به طوری که تجمع آن در مقایسه با شرایط شاهد به طور معنی‌داری کمتر شد (بیش از ۴۷٪)، در حالی که تجمع آن در ژنوتیپ حساس در مقایسه با شرایط شاهد به طور پیاپی افزایش یافت (تا ۵۰٪) (شکل ۳-الف). 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. همچنین حداقل میزان H₂O₂ در روز ششم تنش سرما در گیاهان متحمل مشاهده شده (شکل ۳-الف) که بیانگر فرآیند سرما سازگاری نسبی است. چنین فرآیندهایی احتمالاً از برنامه‌ریزی مجدد ژنوم و هموستازی متابولیکی منشا می‌گیرد (Heidarvand & Maali Amiri, 2010). بنابراین سنجش شاخص H₂O₂ می‌تواند به عنوان یک نشانگر تحمل سرما در نخود به کار رود.

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

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

	M.S.			df	S.O.V.
	DAO	DAO	Cad		
	۱/۶۵**	۱/۸۰**	۱۶۲**	۳۳۲۷/۶۴**	1 Genotype
	۴/۵۴**	۳/۰۵**	۱۶۲**	۷۴۸/۹۸**	2 Temperature
	۰/۱۸۶**	۰/۵۶**	۱۶۲**	۶۶۴/۸۸**	2 Genotype× Temperature
	۰/۰۱۲	۰/۰۶	۰/۶۶	۱	12 Error
	۵/۹۱	۱۷/۷۰	۲۷/۲	۱/۱	C.V. (%)

نتایج نشان داد که محتوی Cad تنها در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما به میزان ۱۸ نانومول بر گرم در وزن تر بود و این متابولیت در بقیه تیمارهای سرمایی و همچنین شرایط شاهد در هر دو ژنوتیپ وجود نداشت (شکل ۳-ب). در امتداد با داده‌های پیشین در گیاهان زراعی، این نتایج به نقش القایی این متابولیت تحت تنش اشاره دارد (Kuznetsov *et al.*, 2007; (Sziderics *et al.*, 2010; Simon-Sarkadi, 2014).



شکل ۳. تغییر میزان H₂O₂ (الف)، کاداوآرین (ب)، فعالیت آنزیم دی‌آمین اکسیداز (DAO) (ج) و بیان ژن دی‌آمین اکسیداز (DAO) (د) در ژنوتیپ‌های متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و حساس ILC533 (ستون خاکستری) به سرمای نخود تحت تیمارهای دمایی شامل دمای طبیعی (23°C)، روز اول و روز ششم تنش سرما (4°C). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس مقایسه میانگین دانکن.

یافته‌ها نشان داده که اسپری پاشی کاداوآرین (یک میلی‌مولار) روی برگ و بذور گیاهان آثار نامطلوب تنش شوری و فلزات سنگین را از طریق افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت نیترات‌ردوکتاز، نیتروژن آلی، پروتئین محلول، رشد گیاهچه و حذف آثار نامطلوب رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش داده است (Aziz *et al.*, 1997; 1999; Cavusoglu *et al.*, 2007; Sziderics *et al.*, 2010; Tomar *et al.*, 2013a; Tomar *et al.*, 2013b). براساس همخوانی نتایج این پژوهش با داده‌های گذشته به‌نظر می‌رسد در نخود زراعی ارتباط معنی‌داری بین ظهور کاداوآرین و محتوی کاهش‌یافته شاخص‌های خسارت سرما (از جمله نتایج H₂O₂) وجود داشته که بیانگر تاثیر آن در بهبود پایداری غشای سلولی تحت تنش سرما می‌باشد نتایجی که نیاز به پژوهش‌های عمیق‌تری در این زمینه دارد (Kim *et al.*, 2002). افزایش نسبی میزان H₂O₂ در پاسخ‌های زود هنگام در ژنوتیپ متحمل و کاهش معنی‌دار آن در روز ششم تنش سرما (شکل ۳-الف) از یک طرف بیانگر نقش پیام‌رسانی H₂O₂ در القا پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی و از طرف دیگر در امتداد با افزایش میزان کاداوآرین، ارتباط معنی‌دار آنها را نشان می‌دهد.

عدم وجود Cad در پاسخ‌های زود هنگام و دیر هنگام ژنوتیپ حساس و پاسخ‌های زود هنگام ژنوتیپ متحمل احتمالاً می‌تواند به دلیل ضعف سامانه‌های دفاعی در ژنوتیپ حساس و یا افزایش محتوی سایر متابولیت‌های سازگار ساز موثر در بهبود تحمل سرما در ژنوتیپ متحمل باشد (Rakei *et al.*, 2016). اگرچه نتایج هیچ همبستگی معنی‌دار مستقیمی بین محتوی Cad با شاخص‌های خسارت سلولی نشان نداد، اما وجود رابطه منفی بین آنها بیانگر نقش حفاظتی این پلی‌آمین در بهبود تحمل به تنش سرما در گیاه نخود بوده که با نتایج تحقیقات پیشین در خصوص اتصال کاداوآرین به رادیکال‌های آزاد اکسیژن و خنثی سازی آثار مضر آنها بر اجزای مختلف سلول و تعدیل آثار تنش مطابقت دارد (Cavusoglu *et al.*, 2007; Tomar *et al.*, 2013b).

بر خلاف الگوی تغییر Cad تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم DAO که آنزیمی است که در تجزیه کاداوآرین موثر است، در ژنوتیپ متحمل و حساس در مقایسه با شاهد به‌طور تدریجی افزایش یافت (حداکثر تا بیش از سه برابر) و در روز ششم تنش سرما

در ژنوتیپ متحمل به بالاترین میزان رسید (شکل ۳-ج). این نتایج بیانگر نقش این آنزیم در تجزیه سایر پلی آمین ها از جمله پوترید سین است (Amini et al., 2021). مشابه با نتایج این آزمایش، در بذر برنج نیز تحت تنش سرما فعالیت آنزیم DAO روند افزایشی نشان داد (Sheteiwy et al., 2017). اگرچه در ژنوتیپ حساس نیز فعالیت DAO تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد روند افزایشی داشت (حداکثر تا ۲/۵ برابر)، اما این روند صعودی در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل نرخ کندتری داشت (شکل ۳-ج) که بیانگر فعالیت کمتر این آنزیم در ژنوتیپ حساس به دلیل عدم بیوسنتز دی آمین کاداوآرین (شکل ۳-ب) و همچنین بیوسنتز کمتر سایر دی آمین ها از جمله پوترید سین (Amini et al., 2021) و در نتیجه نیاز کمتر به فعالیت این آنزیم است. بر اساس نتایج، الگوی تغییر میزان H_2O_2 (شاخص خسارت) به عنوان محصول جانبی فعالیت آنزیم DAO (شاخص دفاع) در شرایط شاهد و تحت تنش سرما متفاوت با الگوی فعالیت DAO بوده که احتمالاً به دلیل کارایی مطلوب فعالیت سامانه آنتی اکسیدانی ژنوتیپ متحمل در جهت حذف ROS می باشد (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). پژوهش (Duan et al., 2008) نشان داد که تحت تنش شوری همزمان با افزایش میزان پلی آمین ها، فعالیت آنزیم DAO نیز افزایش یافته و میزان تجمع پلی آمین ها با فعالیت آنزیم DAO در ارتباط است. بنابراین به نظر می رسد که فعالیت DAO تحت تنش سرما وابسته به غلظت کاداوآرین و پوترید سین بوده که در هر دو ژنوتیپ، به منظور پاسخ آسیب های سلولی (نتایج H_2O_2) می شود، اگرچه در ژنوتیپ متحمل به دلیل تجمع بیشتر کاداوآرین با فعالیت شدیدتر آنزیم DAO کاهش H_2O_2 شدیدتر خواهد بود. پژوهش ها نشان داده که در گوجه فرنگی سازگار شده به سرما فعالیت DAO در رقم متحمل بطور چشمگیری در مقایسه با حساس افزایش یافت (Song et al., 2015). بنابراین افزایش معنی دار فعالیت آنزیم تجزیه کننده دی آمین های کاداوآرین و پوترید سین از طریق کارآتر کردن مسیرهای متابولیکی پاسخ به سرما می تواند در بهبود تحمل گیاه به تنش های غیر زیستی از جمله سرما ایفای نقش کند (Shelp et al., 2012a). تحت تنش های محیطی کاتابولیسیم دی آمین ها علاوه بر ایفای نقش در سازوکارهای دفاعی، در بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو و پیام رسانی سلولی نیز مشارکت دارد (Tavladoraki et al., 2012). همچنین اگرچه مسیر بیوسنتز PAS نقش مهمی در تنظیم میزان این متابولیت ها دارد، مسیر تجزیه آنها نیز از یک سو به دلیل ارتباط با مسیرهای متابولسمی مختلف از جمله برخی آلکالوئیدها و از سوی دیگر تولید مولکول های پیام رسان از جمله H_2O_2 در هموستازی آنها موثر خواهد بود (Moschou et al., 2012). بنابراین نتایج این پژوهش، الگوی متمایز فعالیت آنزیم DAO در پاسخ های زود هنگام و دیر هنگام به سرما و همچنین ژنوتیپ های حساس و متحمل نخود زراعی را نشان داده، به طوری که مطالعه فعالیت این آنزیم به عنوان عامل موثر در مسیر تجزیه دی آمین کاداوآرین در شرایط آزمایش تایید کننده تمایز آشکاری در تجمع این متابولیت به عنوان یکی از شاخص های تحمل به سرما در برابر عوامل آسیب های سلولی (نتایج H_2O_2) در نخود در نظر گرفته می شود.

ژن DAO ($CuAO$) رمز کننده آنزیم DAO بوده و نقش مهمی در تنظیم شبکه متابولیک پاسخ به تنش های محیطی دارد (Wimalasekera et al., 2011b). به منظور دستیابی به فرایند مولکولی چگونگی تغییر فعالیت این آنزیم در پاسخ به تنش سرما، بیان نسبی ژن DAO بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی توالی رمز کننده آنزیم DAO در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش سرما در مقایسه با شاهد به طور پیوسته افزایش یافت (تقریباً حداکثر تا بیش از ۳/۳ برابر) (شکل ۳-د) که حاکی از موثرتر بودن این مسیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس در جهت القا تحمل به سرما بود. در روز اول و همچنین روز ششم تنش سرما میزان بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل به طور معنی داری بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (حداکثر تا بیش از ۱/۷ برابر در روز ششم پس از تنش سرما) (شکل ۳-د). بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل در روز اول و ششم تنش سرما در مقایسه با شاهد به ترتیب بیش از ۲/۲ و ۳/۵ برابر افزایش یافت (شکل ۳-د). این نتایج بیانگر القا موثرتر فعالیت ژنوم در سطح رونویسی به منظور آماده سازی گیاه برای رویارویی با دماهای پایین تر به موازات بروز کمترین خسارت می باشد، مشاهداتی که توسط نتایج شاخص آسیب سلولی نیز تایید شد. افزایش میزان رونوشت ها به موازات افزایش فعالیت آنزیم DAO اشاره به تنظیم این مسیر بیوشیمیایی هم در سطح رونویسی و هم ترجمه دارد که بایستی با جزئیات بیشتر بررسی شود. این یافته ها با نتایج Tanou et al. (2014) که گزارش کردند که تحت تنش شوری بیان نسبی ژن های مسیر تجزیه PAS در نارنج (*Citrus aurantium* L.) افزایش یافته، هماهنگ بود. همچنین موتاسیون در ژن $CuAO$ سبب حساسیت آرابیدوپسیس به تنش

اسمزی شد (Wimalasekera *et al.*, 2011b). بنابراین باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده، القای بیان این ژن در گیاهان متحمل در اثر برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌ها و هوموستازی سلولی نقش موثری در ایجاد الگوی پاسخ‌های سازگاری به تنش سرما ایفا می‌کند.

۴. نتیجه‌گیری

ارتباط شاخص آسیب سلولی (H_2O_2) و میزان متابولیت دی‌آمین کاداوارین در این آزمایش ناهمسو بود، به‌طوری‌که تجمع این متابولیت در ژنوتیپ متحمل به موازات فعالیت آنزیم DAO و بیان ژن DAO با کاهش آسیب سلولی در ارتباط بود. به‌منظور بهبود تحمل تنش سرما در نخود، محتوای کاداوارین توسط تنظیم دقیق فعالیت عوامل مختلف موثر در تنظیم این متابولیت، افزایش می‌یابد. پاسخ‌های متمایز زوددهنگام و دیرهنگام ژنوتیپ‌ها به تنش سرما بیانگر راهبرد چندگانه دفاعی سلولی نخود به تنش سرما است. این یافته که گیاه نخود دارای تجمع بیشتر کاداوارین به‌عنوان اسموپروتکتنت سلولی با کاهش میزان آسیب‌های سلولی تحمل بیشتری به تنش سرما دارد، ممکن است به قابلیت این گیاه برای بقا و یا بهبود آن طی تنش سرما بیانجامد و کاربرد جدیدی برای اسپری‌پاشی کاداوارین در برنامه‌های کشاورزی پایدار پیشنهاد کند. با انجام مطالعات تکمیلی در ژنوتیپ‌های نخود به‌نظر می‌رسد کاربرد کاداوارین در جهت بهبود تحمل به تنش سرما در برنامه‌های کشاورزی پایدار نخود استفاده شود. به‌نظر می‌رسد این فرایندها غالباً همراه با القای سامانه‌های دفاعی خواهد بود. باتوجه‌به چالش‌های زیست‌محیطی، ضروری است آثار کاربرد اسپری‌پاشی کاداوارین، بر عملکرد و کیفیت نخود به‌طور جامع مطالعه شود.

۵. منابع

- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., & Tiburcio, A.F. (2010a). Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249.
- Alcázar, R., & Tiburcio, A.F. (Eds.). (2018). *Polyamines: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Amini, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S.S., Lopez-Gomez, 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.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., & Tisi, A. (2010). Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 560-564.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J., & Larher, F. (1997). Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regulation*, 21, 153-163.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J., & Larher, F. (1999). Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science*, 145(2), 83-91.
- Carrizo, C.N., Pitta-Alvarez, S.I., Kogan, M.J., Giulietti, A.M., & Tomaro, M.L. (2001). Occurrence of cadaverine in hairy roots of *Brugmansia candida*. *Phytochemistry*, 57(5), 759-763.
- Cassan, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., & Ruiz, O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 12-19.
- Çavuşoğlu, K., Kılıç, S., & Kabar, K. (2007). Some morphological and anatomical observations during alleviation of salinity (NaCl) stress on seed germination and seedling growth of barley by polyamines. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 551-557.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11, 80-88.
- Dickinson, D.A., & Forman, H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 1019-1026.
- Duan, J., Li, J., Guo, S., & Kang, Y. (2008). Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1620-1635.
- Garcia-Garcia, P., Brenes-Balbuena, M., Hornero-Méndez, D., Garcia-Borrego, A., & Garrido-Fernández, A. (2000). Content of biogenic amines in table olives. *Journal of Food Protection*, 63(1), 111-116.
- Groppa, M.D., & Benavides, M.P. (2008). Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids*, 34, 35-45.
- Heidarvand, L., & Amiri, R.M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologia Plantarum*, 32(3), 419-431.

- 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.
- Hung, H.Y., Shannon, L.M., Tian, F., Bradbury, P.J., Chen, C., Flint-Garcia, S.A., & Holland, J.B. (2012). *ZmCCT* and the genetic basis of day-length adaptation underlying the post domestication spread of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), E1913-E1921.
- Hurry, V.M., & Huner, N.P. (1991). Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiology*, 96(2), 491-497.
- Janmohammadi, M., Abbasi, A., & Sabaghnia, N. (2012). Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 99(1), 31.
- Kapoor, R.T. (2023). Role of polyamines in plants under abiotic stresses: Regulation of biochemical interactions. *Plant Stress Mitigators*, 209-220.
- Karami-Moalem, S., Maali-Amiri, R., & Kazemi-Shahandashti, S.S. (2018). Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 122, 31-39.
- Kazemi Shahandashti, S.S., Maali Amiri, R., Zeinali, H., & Ramezanzpour, S.S. (2013). Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 893-903.
- 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.
- 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.
- Kim, T.E., Kim, S.K., Han, T.J., Lee, J.S., & Chang, S.C. (2002). ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Physiologia Plantarum*, 115, 370-376.
- Kliebenstein, D.J., & Osbourn, A. (2012). Making new molecules evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 415-423.
- Köhler, Z.M., & Szepesi, Á. (2023). More than a diamine oxidase inhibitor: L-aminoguanidine modulates polyamine-related abiotic stress responses of plants. *Life*, 13(3), 747.
- Konishi, S., Izawa, T., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., & Yano, M. (2006). An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science*, 312, 1392-1396.
- Kuznetsov, V., Shorina, M., Aronova, E., Stetsenko, L., Rakitin, V., & Shevyakova, N. (2007). NaCl-and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Science*, 172(2), 363-370.
- Kuznetsov, V.V., Stetsenko, L.A., & Shevyakova, N.I. (2009). Exogenous cadaverine induces oxidative burst and reduces cadaverine conjugate content in the common ice plant. *Journal of Plant Physiology*, 166(1), 40-51.
- 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.
- López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Iribarne, C., & Lluch, C. (2014) Proline accumulation has prevalence over polyamines in nodules of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* during the initial response to salinity. *Plant Soil*, 374, 149-159.
- López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Muñoz-Sánchez, J.R., Marín-Peña, A.J., Lluch, C., & Herrera-Cervera, J.A. (2017). Polyamines contribute to salinity tolerance in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* by preventing oxidative damage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 116, 9-17.
- 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.
- 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.
- Moore, B.D., Andrew, R.L., K€ulheim, C., & Foley, W.J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201, 733-750.
- Moschou, P.N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., & Roubelakis-Angelakis, K.A. (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 5003-5015.
- Napieraj, N., Janicka, M., & Reda, M. (2023). Interactions of polyamines and phytohormones in plant response to abiotic stress. *Plants*, 12(5), 1159.
- 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.
- 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.

- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.
- Rajpal, C., & Tomar, P.C. (2020). Cadaverine: A diamine presence & role in plants. *Plant Arch*, 20, 1754-1763.
- 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.
- Saeed, A., Hovsepyan, H., Darvishzadeh, R., Imtiaz, M., Panguluri, S. K., & Nazaryan, R. (2011). Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(4), 848-858.
- Samanta, I., Roy, P.C., Das, E., Mishra, S., & Chowdhary, G. (2023). Plant peroxisomal polyamine oxidase: A ubiquitous enzyme involved in abiotic stress tolerance. *Plants*, 12(3), 652.
- Shalaby, A.R. (2000). Changes in biogenic amines in mature and germinating legume seeds and their behavior during cooking. *Food/Nahrung*, 44(1), 23-27.
- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L., & Brikis, C.J. (2012a). Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193, 130-135.
- Shen, H.J., & Galston, A.W. (1985). Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedling roots. *Plant Growth Regulation*, 3(3-4), 353-363.
- Sheteiwy, M., Shen, H., Xu, J., Guan, Y., Song, W., & Hu, J. (2017). Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5-aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 58-72.
- Simon-Sarkadi, L., Ludidi, N., & Kocsy, G. (2014). Modification of cadaverine content by NO in salt-stressed maize. *Plant Signaling & Behavior*, 9, e27598.
- Song, Y., Diao, Q., & Qi, H. (2015). Polyamine metabolism and biosynthetic genes expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings during cold acclimation. *Plant Growth Regulation*, 75(1), 21-32.
- Su, G.X., & Bai, X. (2008). Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Biologia Plantarum*, 52(4), 796.
- Sziderics, A.H., Oufir, M., Trognitz, F., Kopecky, D., Matušiková, I., & Hausman, J.F. (2010). Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. *Plant Cell Report*, 29, 295-305.
- Tanou, G., Ziogas, V., Belghazi, M., Christou, A., Filippou, P., Job, D., & Molassiotis, A. (2014). Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, Cell Environment*, 37(4), 864-885.
- 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.
- Tomar, P.C., Lakra, N., & Mishra, S.N. (2013b). Effect of cadaverine on *Brassica juncea* (L.) under multiple stresses. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 758-763.
- 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 Biotechnology*, 31(3), 240.
- Walter H.J.P., & Geuns J.M. (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 83, 232-234.
- Wang, X., Chen, Q., Wu, Y., Lemmon, Z.H., Xu, G., Huang, C., & Tian, F. (2018). Genome-wide analysis of transcriptional variability in a large maize-teosinte population. *Molecular Plant*, 11(3), 443-459.
- Weiberg, A., & Karlovsky, P. (2009). Components of variance in transcriptomics based on electrophoretic separation of cDNA fragments (cDNA-AFLP). *Electrophoresis*, 30(14), 2549-2557.
- Wimalasekera, R., Villar, C., Begum, T., & Scherer, G.F.E. (2011b). Copper amine oxidase1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant*, 4, 663-678.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., & Scherer, G.F. (2011a). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science*, 181, 593-6.