دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی عوامل رونویسی در یک مطالعه ترانسکریپتوم در نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط تنش خشکی

کیوان مهدوی ماشکی[۱و۶]، علی اصغر نصراله‌نژاد قمی[۲]، خلیل زینلی‌نژاد[۳]، احد یامچی[۳]، حسن سلطانلو[۴]، ماهاندر تودی[۵] و راجیو کومار وارشنی[۵]

۱، ۳ و ۴- دانش‌آموخته دکتری، استادیار و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: ali1346nn@yahoo.com)
۵- اساتید مرکز بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه خشک، حیدرآباد، هندوستان
۶- استادیار پژوهش موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۱
صفحه: ۱۳۳ تا ۱۴۱

چکیده

تنش خشکی اثرات زیانباری بر رشد و تولید بسیاری از گیاهان از جمله گیاهان زراعی دارد. نخود (*Cicer arietinum* L.) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حبوبات، در معرض تنش خشکی انتهایی در مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار می‌گیرد. عوامل رونویسی نقش‌های کلیدی مهمی در انتقال پیام و واکنش سازگاری به تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، عوامل رونویسی در یک مطالعه ترانسکریپتوم در بافت‌های ریشه و اندام هوایی در دو رقم نخود کابلی با سطوح متفاوت تحمل به خشکی، شامل بیونیج (متحمل) و هاشم (حساس) ارزیابی گردید. از ٤٥٧٢ ژن افتراقی، ۱۸۰٦ ژن به‌عنوان عوامل رونویسی با استفاده از جستجو در پایگاه عوامل رونویسی گیاهی (PTFD) شناسایی شدند. بیشترین اعضا (۱۰۱) به خانواده bHLH تعلق داشت و خانواده‌های ERF (۸۷)، kinase superfamily (٧٦)، NAC (٧٤)، MYB (۷۲)، WRKY (۷۲) و غیره در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. مقایسه ارقام متحمل (بیونیج) و حساس (هاشم) در شرایط خشکی نشان داد که توزیع عوامل رونویسی به نوع رقم و بافت نمونه‌برداری شده بستگی دارد. خانواده‌های عوامل رونویسی شامل B3، NAC، MYB، WRKY و bHLH و غیره در پاسخ به تنش خشکی بیشترین اعضاء را داشتند. همچنین، نتایج نشان داد که چندین عامل رونویسی که در واکنش‌های مربوط به تنش‌های غیرزیستی و مسیرهای بیوسنتزی مهم نظیر بیوسنتز اسید آبسزیک و پرولین درگیر بودند، در بافت هوایی رقم بیونیج بیان بالاتری نسبت به رقم هاشم داشتند که نشان‌دهنده نقش بیشتر بافت هوایی در القای تحمل به خشکی در رقم متحمل بود. به‌طور کلی، یافته‌های این تحقیق محققان را در درک بهتر انتقال پیام و شبکه‌های تنظیمی درگیر در تنش‌ها در گیاه نخود یاری می‌کند و زمینه برای استفاده از عوامل رونویسی کلیدی و بهبود تحمل به تنش خشکی از طریق مهندسی ژنتیک را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نخود، تنش خشکی، ترانسکریپتوم، انتقال پیام، عوامل رونویسی

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) به‌عنوان یکی از لگوم‌های مهم در بسیاری از کشورهای آسیایی و آفریقایی کشت‌وکار می‌شود و به‌دلیل دارا بودن منبع غنی از پروتیئن، ویتامین‌ها و مواد معدنی، برای مصرف انسان و دام از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، به‌دلیل قابلیت تثبیت نیتروژن در حاصل‌خیزی خاک نقش به‌سزایی دارد (۳۶،۲۲،۳۴). تولید و کیفیت محصولات کشاورزی به شدت تحت تاثیر دامنه وسیعی از تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، شوری، گرما و سرما قرار می‌گیرند، به‌ویژه وقتی این تنش‌ها در ترکیب با یکدیگر روی می‌دهند، می‌توانند اثرات مخربی روی رشد و حاصل‌خیزی گیاه داشته باشند. برآورد شده است که بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد برای گیاهان زراعی مهم در سرتاسر دنیا به واسطه تنش‌های غیرزیستی روی می‌دهد (۳۹،۳،۲۸). بر اساس مدل‌های کنونی پیش‌بینی، آب و هوا به سمت افزایش خشکی، گرما و شوری پیش می‌رود (۵). این بدان معنی است که تولید کشاورزی با چالش‌های بزرگتری در مبارزه با تنش‌های محیطی در آینده روبه‌رو است. به‌علاوه، جمعیت در حال رشد جهان به ده میلیارد نفر تا سال ۲۰۵۰ خواهد رسید که به دو برابر تولید بیشتر برای تغذیه این جمعیت بزرگ نیاز است (۶،۴۹). بیش از ۹۰ درصد کشت وکار گیاه نخود در مناطق خشک و نیمه‌خشک و به‌صورت دیم انجام می‌شود که در معرض خشکی انتهایی هستند و به‌طور متوسط کاهش عملکرد ۵۰-۴۰ درصد را موجب می‌شوند (۲،۲۴). این امر اصلاح و معرفی ارقام متحمل به خشکی را بیش از پیش ضروری می‌کند. مقایسه ارقام مختلف از نظر تحمل به خشکی به درک سازوکارهای مولکولی تحمل کمک می‌کند. در چندین تحقیق از ارقام کابلی بیونیج و هاشم به‌ترتیب به‌عنوان ارقام متحمل و حساس به تنش خشکی یاد شده است (۲۹،۱۱،۳۰). به‌عنوان راهکاری برای بقا در شرایط تنش آبی، گیاهان از طریق بیان ژن‌های مختلف و تنظیم شبکه‌های رونوشتی پیچیده واکنش نشان می‌دهند (۴۰). بنابراین ضروری است که مکانیسم‌های تنظیمی تنش و به‌خصوص تنظیم‌کننده‌های کلیدی که برای اصلاح یا تولید گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک بکار می‌روند، شناسایی شوند. از طریق تحلیل ژنوم‌های گیاهی و بکارگیری ابزارهای مدرن اُمیکس[1] نظیر ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس، پیشرفت‌های مهمی در زمینه درک مکانیسم‌های پیام‌رسانی که در واکنش تنش خشکی درگیر هستند انجام شده است (۲۵). مسیر پیام‌رسانی در تنش‌های غیرزیستی، گام‌هایی کلیدی شامل درک پیام، انتقال و پاسخ‌دهی به همراه فعالسازی واکنش‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌باشد (۳۵،۲۵). در این مراحل، سلول‌های گیاهی ابتدا محرک‌های تنش را از طریق حسگرها[2] یا دریافت‌کننده‌های موجود در غشای سلول درک می‌کنند. سپس، پیام‌های خارج سلولی از طریق پیام‌رسان‌های ثانویه نظیر یون‌های کلسیم، فسفات اینوسیتول ROSها[3]، نوکلئوتیدهای حلقوی (cAMP و cGMP)، قندها و غیره به

1- OMICS 2- Sensors 3- Reactive oxygen species

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]
[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

موارد درون سلولی تبدیل می‌شوند. متعاقباً، این پیام‌رسان‌های ثانویه، مسیرهای پیام‌رسانی مربوطه را برای انتقال آغاز می‌کنند (۹،۷). در بسیاری از مسیرهای انتقال پیام، فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون پروتئین‌ها که بترتیب توسط کینازها و فسفاتازها انجام می‌شوند، نقش مهم و موثری دارند (۴۲). برای مثال، مسیر MAPKs و CDPKs در واکنش تنش‌های غیرزیستی درگیر هستند (۳۸،۱۹). عوامل رونویسی به‌عنوان آخرین حلقه در انتهای آبشار فسفوریلاسیون توسط کینازها و فسفاتازهای پروتئینی القا می‌شوند و آن‌ها نیز به‌طور اختصاصی به عناصر همسو[1] در ناحیه راه‌انداز[2] ژن‌های هدف یا عوامل رونویسی دیگر متصل می‌شوند و رونویسی آن‌ها را تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌های تنظیمی از دو دُمین اصلی شامل فعال‌کننده[3] و متصل‌شونده به DNA[4] تشکیل شده‌اند (۱۰). در سال‌های اخیر یک دامنه وسیعی از خانواده‌های عوامل رونویسی در ارتباط با تنش خشکی شناسایی شده‌اند (۴). در گیاهان، یک بخش بزرگی از ژن‌ها در ژنوم به‌طور بالقوه کدکننده عوامل رونویسی هستند که در خانواده‌های ژنی مختلف نظیر AREB، DREB، MYB، WRKY، NAC و bZIP بر اساس ساختار دمین متصل شونده به DNA دسته‌بندی می‌شوند (۱۵،۲۱). در گذشته، در گیاه نخود چندین دیدگاه برای تشریح تحمل به خشکی نظیر نقشه‌یابی ژنتیکی (۴۶،۴۴) بکار برده شده است و در نهایت منجر به شناسایی نواحی ژنومی فعال[5] مربوط به خشکی شده است (۲۰،۲۳). با ظهور فناوری‌های نسل جدید[6] توالی‌یابی، امکان توالی‌یابی ترانسکریپتوم در تکنیک RNA-Seq فراهم شده است که خروجی آن شناسایی و ارزیابی همه ژن‌های بیان‌شده در مرحله نموی معین و شرایط محیطی خاص می‌باشد. استفاده از این تکنیک در چند سال اخیر در گیاه نخود کمک شایانی به درک ژن‌ها و مسیرهای درگیر در تنش‌های غیرزیستی کرده است (۱۸،۱۳،۱۴). هدف از مطالعه حاضر، شناسایی و ارزیابی عوامل رونویسی در یک مطالعه ترانسکریپتوم در دو رقم متحمل و حساس به تنش خشکی در گیاه نخود می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار خشکی

در این تحقیق از دو رقم نخود کابلی شامل رقم بومی بیونیج به‌عنوان رقم متحمل به خشکی و رقم هاشم به‌عنوان رقم حساس که از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم سرارود کرمانشاه تهیه شده بودند، استفاده شد. تمامی مراحل آزمایش در مرکز بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه‌خشک (ICRISAT)[7]، حیدرآباد، هندوستان در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ انجام شد. تعداد دو بذر در گلدان‌هایی به عمق ۲۱ و قطر ۲۵ سانتی‌متر کشت شدند. تعداد پنج تکرار از هر یک از تیمارهای شاهد و خشکی در گلخانه شیشه‌ای با دمای حداقل ۲۲–۱۲ و حداکثر ۲۸–۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰–۳۰ درصد قرار داده شدند. بعد از هشت روز از جوانه‌زنی تنها یک گیاه سالم در هر گلدان حفظ شد. آبیاری گلدان‌ها با آب مقطر انجام شد و اعمال تنش خشکی یک ماه پس از کشت که همزمان با شروع مرحله زایشی بود آغاز گردید. در این زمان کلیه گلدان‌های شاهد و تیمار به صورت کامل غرقاب و ۲۴ ساعت پس از آن در حالت ظرفیت زراعی توزین و یادداشت‌برداری شدند. سپس آبیاری گیاهان تحت تیمار خشکی قطع شد، در حالی‌که گیاهان شاهد بصورت نرمال آبیاری شدند تا ظرفیت زراعی حفظ شود. پس از دو هفته از آغاز خشکی، زمانی که مقدار رطوبت خاک برای گیاهان تحت تیمار خشکی به ۲۰ درصد ظرفیت زراعی رسید، نمونه‌گیری از بافت‌های هوایی و ریشه بصورت جداگانه انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع منجمد و در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA، ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی

تعداد سه تکرار بیولوژیک از هر یک از نمونه‌های ریشه و بافت هوایی در شرایط شاهد و خشکی برای استخراج RNA استفاده شدند. استخراج RNA کل توسط NucleoSpin® RNA Plant kit (MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG, Germany, 2013) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با نانودراپ ۸۰۰۰ و بیوآنالایزور ۲۱۰۰ Agilent سنجیده شد و بهترین کیفیت (RIN≥8)[8] از میان سه تکرار بیولوژیک (در مجموع هشت نمونه) برای ساخت کتابخانه cDNA و توالی‌یابی استفاده گردید. ساخت کتابخانه cDNA با استفاده از Illumina TrueSeq RNA Sample Prep kit در آزمایشگاه گروه CEG[9] در مجموعه ICRISAT، خوشه‌بندی[10] توسط cBot و توالی‌یابی دوطرفه[11] از قطعات ۱۲۵ جفت بازی با دستگاه Illumina HiSeq2500 انجام شد.

نقشه‌یابی با استفاده از ژنوم مرجع، آنالیز بیان ژن و شناسایی ژن‌های بیان‌شده افتراقی[12]

کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای FastQC و Raspberry (v0.3) انجام شد و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت حذف شدند. برای تمامی نمونه‌ها، خوانش‌های[13] دارای کیفیت بالا روی ژنوم ژنوتیپ CDC Frontier به‌عنوان ژنوم مرجع نخود کابلی (۴۵) توسط نرم‌افزار TopHat (v2.0.0) نقشه‌یابی[14] شدند و سپس ترانسکریپتوم توسط نرم‌افزارهای Cufflinks (v2.0.2) و Cuffmerge سرهم‌بندی[15] شدند. نقش ژن‌های جدید توسط پایگاه داده NCBI non-redundant (NR) و به کمک جستجوی BLASTX پیش‌بینی شدند. شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی بین نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Cuffdiff انجام شد. بدین منظور پس از محاسبه شاخص FPKM[16]، مقدار $\log_2$ از نسبت این شاخص برای تک تک ژن‌ها در نمونه‌های مورد مقایسه بدست آمد و مواردی که بزرگتر یا مساوی دو و دارای P value≤0.05 بودند به‌عنوان معیار معنی‌داری ژن‌های افتراقی لحاظ شدند.

1- *Cis*-elements 2- Promoter 3- Activator 4- DNA binding 5-Hotspot 6- Next generation sequencing (NGS) 7- International crops research institute for the semi-arid tropics 8- RNA integrity number 9- Center of excellence in genomics 10- Clustering 11- Paired-end 12- Differentially expressed genes (DEG) 13- Reads 14- Mapping 15- Assembly 16- Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

شناسایی عوامل رونویسی از میان ژن‌های بیانی افتراقی

جهت شناسایی عوامل رونویسی، ژن‌های دارای بیان افتراقی از طریق پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی (PTFD v4.0)[1] به کمک جستجوی BLASTX مورد کاوش قرار گرفتند و بر اساس دو دمین فعال‌کننده و متصل شونده، عوامل رونویسی استخراج و در خانواده‌های مربوطه دسته‌بندی شدند. همچنین، جهت بررسی الگوی بیان عوامل رونویسی، از نقشه دمایی[2] به کمک نرم‌افزار MeV v4.8.1 استفاده شد.

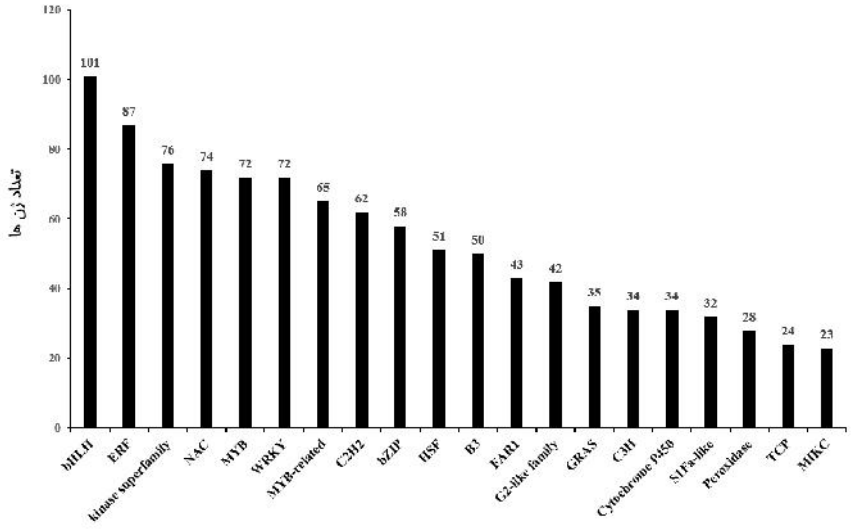
نتایج و بحث

ارزیابی عوامل رونویسی در کل ژن‌های بیانی افتراقی

پس از تحلیل بیان ژن، تعداد ۴۵۷۲ ژن با بیان افتراقی در مقایسه بین نمونه‌ها بدست آمد. از طریق جستجو در پایگاه داده PTFD، تعداد ۱۸۰۶ ژن مربوط به خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی بودند که بیش از ۳۹ درصد از کل ژن‌های افتراقی را شامل شدند. تعداد ۲۰ خانواده با بیشترین تعداد اعضا در شکل ۱ آمده است. بیشترین اعضا به خانواده bHLH با ۱۰۱ ژن تعلق داشت و در ادامه خانواده‌های ERF (۸۷ ژن)، Kinase superfamily (۷۶ ژن)، NAC (۷۴ ژن)، MYB (۷۲ ژن) و WRKY (۷۲ ژن) و غیره قرار گرفتند. در یک مطالعه ترانسکریپتوم روی ریشه نخود نوع دسی تحت تنش‌های خشکی و شوری، خانواده bHLH بیشترین اعضا را به خود اختصاص داد و به دنبال آن خانواده‌های AP2-EREBP، MYB، HB، WRKY و NAC قرار داشتند (۱۴).

ارزیابی عوامل رونویسی در ریشه و بافت هوایی در مقایسه بین دو رقم در شرایط خشکی

به‌منظور درک بهتر توزیع خانواده‌های عوامل رونویسی در شرایط خشکی، تنها ژن‌هایی که بین دو رقم متحمل و حساس در پاسخ به خشکی افتراقی بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. از مجموع ۶۵ ژن کدکننده عوامل رونویسی در ریشه، ۴۲ ژن (از ۱۷ خانواده) در رقم هاشم و ۲۳ ژن (از ۱۶ خانواده) در رقم بیونیج افزایش بیان نشان دادند. در بافت هوایی نیز، از مجموع ۹۳ ژن کدکننده عوامل رونویسی، ۴۸ ژن (از ۲۴ خانواده) در رقم هاشم و ۴۵ ژن (از ۲۱ خانواده) در رقم بیونیج افزایش بیان نشان دادند. شش ژن کدکننده عوامل رونویسی در ریشه و بافت هوایی مشترک بودند که از بین آن‌ها، دو ژن با شناسه Ca_09798 (از خانواده bHLH) و Ca_19895 (از خانواده MYB-related) در ریشه رقم هاشم بیان بیشتری از رقم متحمل داشتند، درحالیکه در بافت هوایی در رقم بیونیج بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشتند.



شکل ۱- توزیع ۲۰ خانواده عوامل رونویسی با بیشترین تعداد عضو از میان ۴۵۷۲ ژن بیانی افتراقی.

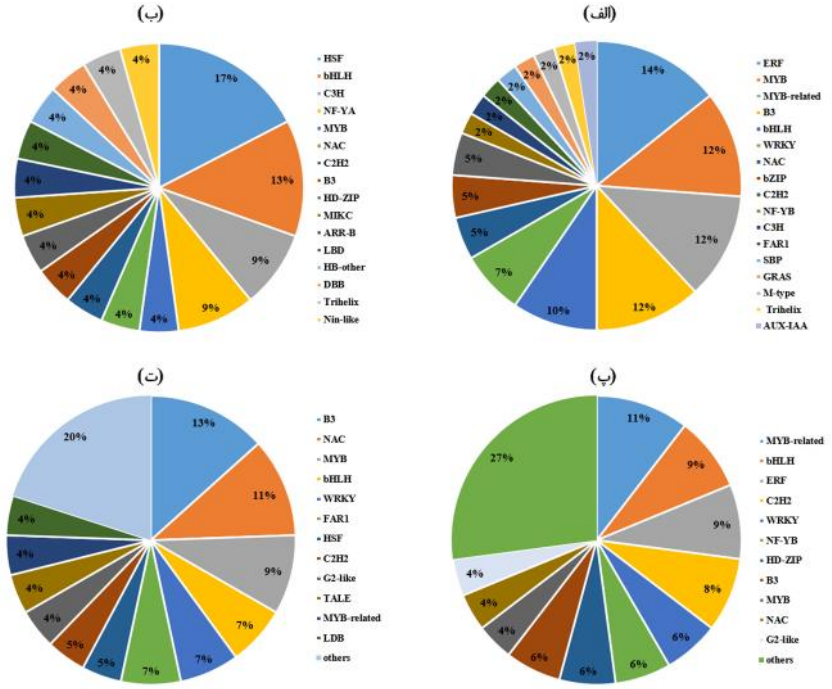
Figure 1. Distribution of top 20 transcription factor families among the 4572 differentially expressed genes

1- Plant Transcription Factor Database

2- Heatmap

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]



شکل ۲- توزیع خانواده‌های عوامل رونویسی در مقایسه بین ارقام متحمل و حساس در شرایط تنش خشکی. الف و ب- به ترتیب افزایش بیان یافته در بافت ریشه ارقام هاشم و بیونیج، پ و ت- به ترتیب افزایش بیان یافته در بافت هوایی ارقام هاشم و بیونیج.

Figure 2. Distribution of TF families in comparison between the tolerant and the sensitive cultivars under drought stress. A and B- Up-regulated in the roots of Hashem and Bivanij, respectively. C and D- Up-regulated in the shoots of Hashem and Bivanij, respectively.

در مقایسه دو رقم متحمل و حساس در شرایط خشکی در بافت ریشه، خانواده‌های ERF (۱۴ درصد)، MYB (۱۲ درصد)، MYB-related (۱۲ درصد) و B3 (۱۲ درصد) برای ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم هاشم بیشترین تعداد عضو را داشتند (شکل ۲-الف)، درحالیکه در رقم بیونیج، خانواده‌های HSF (۱۷ درصد)، bHLH (۱۳ درصد)، C3H (نه درصد) و NF-YA (۹ درصد)، بیشترین تعداد ژن با افزایش بیان نسبت به رقم هاشم را به خود اختصاص دادند (شکل ۲-ب). در بافت هوایی نیز، خانواده‌های MYB-related (۱۱ درصد)، bHLH (نه درصد)، ERF (نه درصد) و C2H2 (نه درصد)، بیشترین تعداد عوامل رونویسی را برای ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم هاشم داشتند (شکل ۲-پ)، در حالی‌که خانواده‌های B3 (۱۳ درصد)، NAC (۱۱ درصد) و MYB (نه درصد)، به‌ترتیب بیشترین اعضا را برای ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم بیونیج نسبت به رقم هاشم در شرایط خشکی داشتند (شکل ۲-ت). به‌طور کلی، نتایج حاضر نشان داد که توزیع نوع و فراوانی خانواده‌های عوامل رونویسی در شرایط خشکی به نوع رقم (حساس و متحمل) و به نوع بافت (ریشه و هوایی) مورد مطالعه بستگی دارد. از طریق نمودار نقشه دمایی، الگوی بیان اعضای خانواده‌های عوامل رونویسی در مقایسه دو رقم متحمل و حساس در شرایط خشکی در دو بافت ریشه و هوایی مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳). نتایج نشان داد که به‌طور قابل توجه، بعضی از خانواده‌ها به یک رقم یا شرایط محیطی خاص اختصاص دارند. برای مثال، اعضای خانواده ERF، به صورت اختصاصی در هر دو بافت رقم هاشم افزایش بیان داشتند، درحالی‌که تنها یک ژن در رقم بیونیج بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشت. همچنین، همه اعضای خانواده HSF در هر دو بافت ریشه و هوایی در رقم متحمل بیونیج، بیان بیشتری نسبت به رقم حساس هاشم داشتند. همچنین، کارکردهای عوامل رونویسی که به صورت افتراقی در دو رقم متحمل و حساس در پاسخ به تنش خشکی بیان شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند و لیستی از عوامل رونویسی با نقش‌های مهم در تنش‌های غیرزیستی تهیه شد (جدول ۱). از میان ۱۱ عامل رونویسی، سه ژن در بافت ریشه و هشت ژن در اندام هوایی به شکل افتراقی بیان شدند. از این تعداد، دو ژن در ریشه و پنج ژن در اندام هوایی در رقم متحمل بیونیج بیان بالاتری نسبت به رقم حساس هاشم داشتند که نشان‌دهنده نقش مهم‌تر رقم بیونیج در تحمل به تنش خشکی است. خانواده‌های C3H، NAC و MYB-related هر کدام با دو ژن بیشترین اعضا را داشتند.

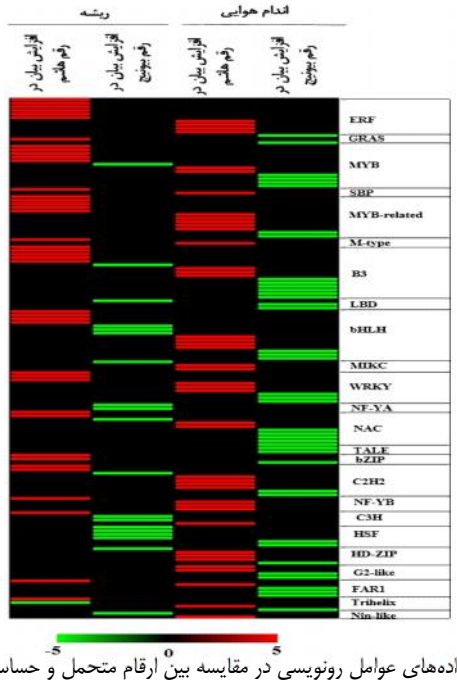
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

هورمون‌های گیاهی رشد و نمو را تنظیم می‌کنند و در تنش‌های محیطی مختلف از طریق انتقال پیام درگیر هستند. اسید آبسزیک از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی است که موجب بسته شدن روزنه‌ها در شرایط کمبود آب شده و با کاهش هدر رفت آب و ممانعت از فتوسنتز و رشد، گیاه را قادر می‌سازد با تنظیم اسمزی به شرایط تنش سازگاری نشان دهد (۴۷،۳۷). در این تحقیق، ژن Ca_00449 از خانواده FAR1 به‌طور محسوس بیان بیشتری در اندام هوایی رقم بیونیج نسبت به هاشم داشت. این عامل رونویسی در القای بیان ژن کدکننده آنزیم zeta-carotene desaturase (ZDS) در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید که منجر به سنتز هورمون اسید آبسزیک (ABA) می‌شود، نقش داشت. پرولین به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند و با حفاظت از ماکرومولکول ها و آنزیم‌ها، نقش مهمی در تنش‌های غیرزیستی در گیاهان ایفا می‌کند (۱۶). در تحقیق حاضر، دو ژن Ca_24241 و Ca_15236 که به‌ترتیب از خانواده‌های عوامل رونویسی B3 و NAC بودند در مراحل بیوسنتز پرولین نقش داشتند و بیان هر دو ژن در اندام هوایی رقم بیونیج بیشتر از رقم هاشم بود.

جدول ۱- لیستی از عوامل رونویسی افتراقی بین دو رقم مورد مطالعه در شرایط خشکی که دارای نقش‌های کارکردی کلیدی در ارتباط با تنش هستند
Table 1. List of differentially TFs between the cultivars in drought stress response which have key functional roles related to stress.

عامل رونویسی	شناسه ژن	جایگاه	بافت	رقم	نقش ژن
C3H	Ca_06635	کروموزوم ۷	ریشه	بیونیج	واکنش به تنش کمبود آب و شوری، تنظیم بسته شدن روزنه
C3H	Ca_10437	کروموزوم ۶	ریشه	بیونیج	واکنش به تنش
M-type	Ca_03175	کروموزوم ۷	ریشه	هاشم	واکنش به تنش، مراحل تجزیه پراکسید هیدروژن
B3	Ca_24241	کروموزوم ۶	اندام هوایی	بیونیج	مراحل بیوسنتز پرولین
NAC	Ca_09533	کروموزوم ۳	اندام هوایی	بیونیج	واکنش دفاعی، مراحل بیوسنتز فلاوونوئید
NAC	Ca_15236	کروموزوم ۲	اندام هوایی	بیونیج	واکنش به تنش‌های اسمزی، مقاومت اکتسابی سیستمیک، مراحل بیوسنتز پرولین و تری‌هالوز، نقش در پیری برگ
FAR1	Ca_00449	کروموزوم ۱	اندام هوایی	بیونیج	مراحل بیوسنتز اسید آبسزیک
MYB-related	Ca_04125	کروموزوم ۵	اندام هوایی	بیونیج	واکنش به تنش اکسیداتیو، مراحل تجزیه پراکسید هیدروژن
MYB-related	Ca_07985	کروموزوم ۱	اندام هوایی	هاشم	واکنش به تنش اکسیداتیو، مراحل تجزیه پراکسید هیدروژن
M-type	Ca_01935	کروموزوم ۸	اندام هوایی	هاشم	واکنش به تنش اکسیداتیو، مراحل تجزیه پراکسید هیدروژن
G2-like	Ca_25602	اسکافولد۳۴۲۲	اندام هوایی	هاشم	واکنش به تنش



شکل ۳- الگوی بیان اعضای خانواده‌های عوامل رونویسی در مقایسه بین ارقام متحمل و حساس در بافت‌های ریشه و هوایی در پاسخ به تنش خشکی، مقیاس رنگی بر اساس log2 fold change

Figure 3. Expression patterns of TF family members in comparison of the tolerant and the sensitive genotypes in drought stress response, Color scale are based on log2 fold change

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

مطالعات گذشته انواع متنوعی از عوامل رونویسی را که به صورت مشترک یا اختصاصی در شرایط تنش‌های مختلف در گیاه نخود بیان شده‌اند را شناسایی کرده است و اعضای خانواده‌های MYB، NAC، WRKY، bHLH، HSF، Zinc-finger، AP2/EREBP و غیره به‌عنوان عوامل رونویسی مهم درگیر در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی معرفی شده‌اند (۴۱،۱۲،۱۳،۱۴). همچنین در گونه‌های مختلف نیز چندین عضو از عوامل رونویسی NAC، MYB و bZIP در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی درگیر بوده‌اند (۳۱،۸،۱۷). آگاروال و همکاران (۱) چند خانواده از عوامل رونویسی را در نخود تحت شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد بررسی قرار دادند و به‌طور قابل توجه، از میان عوامل رونویسی مهم درگیر در تنش‌های غیرزیستی، چهار ژن از خانواده ERF (Ca_15031، Ca_23799، Ca_09578 و Ca_08430) و دو ژن از خانواده G2-like (Ca_25811 و Ca_25602) با عوامل رونویسی افتراقی که در آزمایش ما شناسایی شده بودند، مطابقت نشان داد. به دلیل اهمیت عوامل رونویسی در القای تحمل به تنش، چندین عامل رونویسی کلیدی درگیر در تنش‌های غیرزیستی از طریق مهندسی ژنتیک منتقل و موجب افزایش تحمل در گیاهان مختلف شده است (۳۲،۴۳،۲۶). اخیراً در گیاه نخود نیز چندین عامل رونویسی مهم از خانواده NAC شناسایی شده‌اند که با انتقال آن‌ها به آرابیدوپسیس، بیان بسیاری از ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش خشکی نظیر RD، ERD، COR و غیره افزایش نشان داد و به‌طور محسوسی تحمل به تنش‌های خشکی و شوری افزایش یافت (۴۸،۲۷). در مطالعه‌ای دیگر در گیاه نخود که با استفاده از رقم حساس به خشکی هاشم و رقم متحمل ILC482 انجام شد، عامل رونویسی CaNAC16 از خانواده NAC به‌عنوان مهم‌ترین ژن در پاسخ به تنش شناسایی شد (۳۳) که در تحقیق حاضر نیز این ژن (Ca_18090) در گیاه متحمل بیونیج بیان بالاتری از رقم هاشم داشت که بیانگر نقش کلیدی این عامل رونویسی در القای تحمل به خشکی است.

در تحقیق حاضر، عوامل رونویسی در یک مطالعه ترانسکریپتوم در گیاه نخود تحت شرایط تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج نشان داد که توزیع و بیان خانواده‌های عوامل رونویسی با توجه به نوع رقم و بافت مورد مطالعه متفاوت است. همچنین چندین عامل رونویسی از خانواده‌های مختلف به‌عنوان ژن‌های مهم درگیر در واکنش تنش‌های غیرزیستی و مسیرهای مهم نظیر بیوسنتز اسید آبسزیک و پرولین معرفی شدند. تحقیقات آینده در جهت استفاده از این عوامل رونویسی کاندید به منظور شناسایی شبکه‌های تنظیمی و انتقال پیام، به درک بهتر مکانیسم مولکولی تنش خشکی و اصلاح و بهبود آن کمک شایانی خواهد کرد.

منابع

1. Agarwal, G., V. Garg, H. Kudapa, D. Doddamani, L.T. Pazhamala and A.W. Khan. 2016. Genome-wide dissection of AP2/ERF and HSP90 gene families in five legumes and expression profiles in chickpea and pigeonpea. Plant Biotechnology Journal, 14: 1563-1577.
2. Ahmad, F., P. Gaur and J. Croser. 2005. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement-Grain Legumes, 1: 185-214.
3. Ahuja, I., R.C. de Vos, A.M. Bones and R.D. Hall. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. Trends in Plant Science, 15: 664-674.
4. Anbazhagan, K., P. Bhatnagar-Mathur, V. Vadez, S.R. Dumbala, P.K. Kishor and K.K. Sharma. 2015. DREB1A overexpression in transgenic chickpea alters key traits influencing plant water budget across water regimes. Plant Cell Reports, 34: 199-210.
5. Bates, B. 2009. Climate Change and Water: IPCC technical paper VIWorld Health Organization, 101 p.
6. Bengtsson, M., Y. Shen and T. Oki. 2006. A SRES-based gridded global population dataset for 1990–2100. Population and Environment, 28: 113-131.
7. Bhargava, S. and K. Sawant. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. Plant Breeding, 132: 21-32.
8. Bhattacharjee, A. and M. Jain. 2013. Transcription factor mediated abiotic stress signaling in rice. Plant Stress, 7: 16-25.
9. Chaves, M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany, 103: 551-560.
10. Danquah, A., A. de Zelicourt, J. Colcombet and H. Hirt. 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. Biotechnology Advances, 32: 40-52.
11. Farshadfar, E. and J. Javadinia. 2011. Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for drought tolerance**.** Seed and Plant Improvement Journal, 27(1): 517-537 (In Persian).
12. Gao, W.R., X.S. Wang, Q.Y. Liu, H. Peng, C. Chen, J.G. Li, J.S. Zhang, S.N. Hu and H. Ma. 2008. Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications, 376: 578-583.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

13. Garg, R., A. Bhattacharjee and M. Jain. 2015. Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. Plant Molecular Biology Reporter, 33: 388-400.
14. Garg, R., R. Shankar, B. Thakkar, H. Kudapa, L. Krishnamurthy and N. Mantri. 2016. Transcriptome analyses reveal genotype-and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. Scientific Reports, 6: 19228.
15. Golldack, D., I. Lüking and O. Yang. 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. Plant Cell Reports, 30: 1383-1391.
16. Hayat, S., Q. Hayat, M.N. Alyemeni, A.S. Wani, J. Pichtel and A. Ahmad. 2012. Role of proline under changing environments: a review. Plant Signaling & Behavior, 7: 1456-1466.
17. Heidari, P. and H. Najafi Zarrini. 2016. Classification and gene expression analysis of bzip family in tomato root under sub-optimal temperature. Journal of Crop Breeding, 8(17): 17-23 (In Persian).
18. Hiremath, P.J., A. Farmer, S.B. Cannon, J. Woodward, H. Kudapa and R. Tuteja. 2011. Large-scale transcriptome analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.), an orphan legume crop of the semi-arid tropics of Asia and Africa. Plant Biotechnology Journal, 9: 922-931.
19. Huang, G.T., S.L. Ma, L.P. Bai, L. Zhang, H. Ma and P. Jia. 2012. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports, 39: 969-987.
20. Jaganathan, D., M. Thudi, S. Kale, S. Azam, M. Roorkiwal and P.M. Gaur. 2015. Genotyping-by-sequencing based intra-specific genetic map refines a "QTL-hotspot" region for drought tolerance in chickpea. Molecular Genetics and Genomics, 290: 559-571.
21. Jin, J., H. Zhang, L. Kong, G. GAO and J. Luo. 2013. Plant TFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. Nucleic Acids Research, 42: 1182-D1187.
22. Jukanti, A.K., P.M. Gaur, C. Gowda and R.N. Chibbar. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition, 108: S11-S26.
23. Kale, S.M., D. Jaganathan, P. Ruperao, C. Chen, R. Punna and H. Kudapa. 2015. Prioritization of candidate genes in "QTL-hotspot" region for drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Scientific Reports, 5: 15296.
24. Kashiwagi, J., L. Krishnamurthy, J.H. Crouch and R. Serraj. 2006. Variability of root length density and its contributions to seed yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. Field Crops Research, 95: 171-181.
25. Liu, J.H., T. Peng and W. Dai. 2014. Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 32: 303-317.
26. Liu, L., Z. Zhang, J. Dong and T. Wang. 2016. Overexpression of MtWRKY76 increases both salt and drought tolerance in *Medicago truncatula*. Environmental and Experimental Botany, 123: 50-58.
27. Liu, Y., X. Yu, S. Liu, H. Peng, A. Mijiti and Z. Wang. 2017. A chickpea NAC-type transcription factor, CarNAC6, confers enhanced dehydration tolerance in Arabidopsis. Plant Molecular Biology Reporter, 35: 83-96.
28. Lobell, D.B., W. Schlenker and J. Costa-Roberts. 2011. Climate trends and global crop production since 1980. Science, 333: 616-620.
29. Mansourifar, C., M. Shaban, M. Ghobadi and A.R. Ajirlu. 2011. Effect of drought stress and N fertilizer on yield, yield components and grain storage proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. African Journal of Plant Science, 5: 634-642.
30. Moucheshi, S., B. Heidari and E. Farshadfar. 2009. Evaluation of stress indices for drought tolerance screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Crop Breeding, 1 (4)**:** 49-64 (In Persian).
31. Nakashima, K., H. Takasaki, J. Mizoi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica ET Biophysica Acta, 1819: 97-103.
32. Nakashima, K., L.S.P. Tran, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama and D. Todaka. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. The Plant Journal, 51: 617-630.
33. Nguyen, K.H., C.V. Ha, Y. Watanabe, U.T. Tran, M. Nasr Esfahani and D.V. Nguyen. 2015. Correlation between differential drought tolerability of two contrasting drought-responsive chickpea cultivars and differential expression of a subset of CaNAC genes under normal and dehydration conditions. Frontiers in Plant Science, 6: 449.
34. Ngwe, T., Y. Nukui, S. Oyaizu, G. Takamoto, S. Koike, K. Ueda. 2012. Bean husks as a supplemental fiber for ruminants: potential use for activation of fibrolytic rumen bacteria to improve main forage digestion. Animal Science Journal, 83: 43-49.
35. Pérez-Clemente, R.M., V. Vives, S.I. Zandalinas, M.F. López-Climent, V. Muñoz and A. Gómez-Cadenas. 2012. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. BioMed Research International, 13-20.
36. Rubio, L.A. 2005. Ileal digestibility of defatted soybean, lupin and chickpea seed meals in cannulated Iberian pigs: I. Proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 1313-1321.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

38. Schaller, G.E., J.J. Kieber and S.H. Shiu. 2008. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. The Arabidopsis Book, 112 pp.
39. Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel, P. Manivannan, R. Panneerselvam and M.A. Shao. 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants–biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe. Critical Reviews in Biotechnology, 29: 131-151.
40. Singh, D. and A. Laxmi. 2015. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. Frontiers in Plant Science, 6 pp.
41. Singh, K.B., R.C. Foley and L. Oñate-Sánchez. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. Current Opinion in Plant Biology, 5: 430-436.
42. Singh, R.P., S. Rizvi and P.K. Jaiwal. 2003. Genetic engineering for enhancing abiotic stress tolerance. Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology. Springer, 223-243.
43. Su, L.T., J.W. Li, D.Q. Liu, Y. Zhai, H.J. Zhang and X.W. Li. 2014. A novel MYB transcription factor, GmMYBJ1, from soybean confers drought and cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Gene, 538: 46-55.
44. Thudi, M., H.D. Upadhyaya, A. Rathore, P.M. Gaur, L. Krishnamurthy and M. Roorkiwal. 2014. Genetic dissection of drought and heat tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-based association mapping approaches. PLoS One, 9: 96758.
45. Varshney, R.K., C. Song, R.K. Saxena, S. Azam, S. Yu and A.G. Sharpe. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. Nature Biotechnology, 31: 240-246.
46. Varshney, R.K., M. Thudi, S.N. Nayak, P.M. Gaur, J. Kashiwagi and L. Krishnamurthy. 2014. Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). TAG. Theoretical and Applied Genetics, 127: 445-462.
47. Wilkinson, S. and W.J. Davies. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, Cell & Environment, 33: 510-525.
48. Yu, X., Y. Liu, S. Wang, Y. Tao, Z. Wang and Y. Shu. 2016. CarNAC4, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in Arabidopsis. Plant Cell Reports, 35: 613-627.
49. United Nations. 2015. The World Population Prospects. New York, NY: United Nations Department of Economic and Social Affairs.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]

Transcription Factors Evaluation in a Transcriptome Analysis on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Under Drought Stress

Keyvan Mahdavi Mashaki[1,6], Ali Asghar Nasrollahnezhad Ghomi[2], Khalil Zaynali Nezhad[3], Ahad Yamchi[3], Hasan Soltanloo[4], Mahendar Thudi[5] and Rajeev Kumar Varshney[5]

1, 3 and 4- Graduated PhD Student, Assistant Professor and Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, (Corresponding author: Ali1346nn@yahoo.com)
5- Professors, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Hyderabad, India
6- Assistant Professor of the Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran
Received: July 2, 2017 Accepted: September 12, 2017

Abstract

Drought causes detrimental effect on growth and productivity of many plants, including crops. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as one of the most important legume crops is subjected to terminal drought stress in arid and semi-arid regions. Transcription factors (TFs) play key roles during signal transduction and adaptation response to abiotic stresses such as drought. In the present study, TFs were assessed in a transcriptome analysis in the root and the shoot tissues of two contrasting drought responsive kabuli chickpea. Out of 4572 differentially expressed genes, 1806 TFs were identified using search on the plant transcription factor database (PTFD). The highest members (101) of the TFs belonged to bHLH family, followed by ERF (87), kinase superfamily (76), NAC (74), MYB (72), WRKY (72), etc. The comparison of the tolerant (Bivanij) and the sensitive (Hashem) cultivars under drought stress showed that the TFs were differently distributed based on the cultivars and the tissue types. The TF families including B3, NAC, MYB, WRKY, bHLH, etc. had most members in response to the drought stress. Furthermore, the results revealed that several TFs which were involved in abiotic stress-related responses and major biosynthetic pathways such as ABA and proline biosynthesis were up-regulated in the shoot of Bivanij as compared to Hashem indicating the vital role of the shoot for inducing drought tolerance in the tolerant cultivar. As result, these findings help the researches to better understanding of signal transduction and stress-related regulating networks in chickpea and provide the transferring of key TFs and promoting drought tolerance by genetic engineering.

Keywords: Chickpea, Drought Stress, Signal Transduction, Transcription Factors, Transcriptome

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-25]

[DOI: 10.29252/jcb.11.30.133]