



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

کیوان مهدوی ماشکی^۱، علی اصغر نصراله نژاد قمی^۲، خلیل زینلی نژاد^۳، احد یامچی^۳،
حسن سلطانلو^۴، ماهاندر تودی^۵ و راجیو کومار وارثنی^۶

۱- ۳ و ۴- دانش آموخته دکتری، استادیار و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: alii1346nn@yahoo.com)
۳- اساتید مرکز بین المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه خشک، حیدرآباد، هندوستان
۴- 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.) به عنوان یکی از مهم ترین حبوبات، در معرض تنش خشکی انتهایی در مناطق خشک و نیمه خشک قرار می گیرد. عوامل رونویسی نقش های کلیدی مهمی در انتقال پیام و واکنش سازگاری به تنش های غیرزیستی نظیر خشکی ایفا می کنند. در مطالعه حاضر، عوامل رونویسی در یک مطالعه ترانسکرپتوم در بافت های ریشه و اندام هوایی در دو رقم نخود کابلی با سطوح متفاوت تحمل به خشکی، شامل بیونینج (متحمل) و هاشم (حساس) ارزیابی گردید. از ۴۵۷۲ ژن افتراقی، ۱۸۰۶ ژن به عنوان عوامل رونویسی با استفاده از جستجو در پایگاه عوامل رونویسی گیاهی (PTFD) شناسایی شدند. بیشترین اعضا (۱۰۱) به خانواده bHLH تعلق داشت و خانواده های ERF (۸۷)، kinase superfamily (۷۶)، NAC (۷۴)، MYB (۷۲)، WRKY (۷۲) و غیره در رتبه های بعدی قرار گرفتند. مقایسه ارقام متحمل (بیونینج) و حساس (هاشم) در شرایط خشکی نشان داد که توزیع عوامل رونویسی به نوع رقم و بافت نمونه برداری شده بستگی دارد. خانواده های عوامل رونویسی شامل MYB، NAC، WRKY و bHLH و غیره در پاسخ به تنش خشکی بیشترین اعضا را داشتند. همچنین، نتایج نشان داد که چندین عامل رونویسی که در واکنش های مربوط به تنش های غیرزیستی و مسیرهای بیوستیزی مهم نظیر بیوستیز اسید آسبزیک و پرولین درگیر بودند، در بافت هوایی رقم بیونینج بیان بالاتری نسبت به رقم هاشم داشتند که نشان دهنده نقش بیشتر بافت هوایی در القای تحمل به خشکی در رقم متحمل بود. به طور کلی، یافته های این تحقیق محققان را در درک بهتر انتقال پیام و شبکه های تنظیمی درگیر در تنش ها در گیاه نخود باری می کند و زمینه برای استفاده از عوامل رونویسی کلیدی و بهبود تحمل به تنش خشکی از طریق مهندسی ژنتیک را فراهم می کند.

واژه های کلیدی: نخود، تنش خشکی، ترانسکرپتوم، انتقال پیام، عوامل رونویسی

مقدمه

(۲،۲۴). این امر اصلاح و معرفی ارقام متحمل به خشکی را بیش از پیش ضروری می کند. مقایسه ارقام مختلف از نظر تحمل به خشکی به درک سازوکارهای مولکولی تحمل کمک می کند. در چندین تحقیق از ارقام کابلی بیونینج و هاشم به ترتیب به عنوان ارقام متحمل و حساس به تنش خشکی یاد شده است (۲۹،۱۱،۳۰). به عنوان راهکاری برای بقا در شرایط تنش آبی، گیاهان از طریق بیان ژن های مختلف و تنظیم شبکه های رونوشتی پیچیده واکنش نشان می دهند (۴۰). بنابراین ضروری است که مکانیسم های تنظیمی تنش و به خصوص تنظیم کننده های کلیدی که برای اصلاح یا تولید گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک بکار می روند، شناسایی شوند. از طریق تحلیل ژنوم های گیاهی و بکارگیری ابزارهای مدرن آمیکس^۱ نظیر ژنومیکس، ترانسکرپتومیکس و پروتئومیکس، پیشرفت های مهمی در زمینه درک مکانیسم های پیام رسانی که در واکنش تنش خشکی درگیر هستند انجام شده است (۲۵). مسیر پیام رسانی در تنش های غیرزیستی، گام هایی کلیدی شامل درک پیام، انتقال و پاسخ دهی به همراه فعال سازی واکنش های فیزیولوژیکی و متابولیکی می باشد (۳۵،۲۵). در این مراحل، سلول های گیاهی ابتدا محرک های تنش را از طریق حسگرها^۲ یا دریافت کننده های موجود در غشای سلول درک می کنند. سپس، پیام های خارج سلولی از طریق پیام رسانی های ثانویه نظیر یون های کلسیم، فسفات اینوسیتول ROS ها^۳، نوکلئوتیدهای حلقوی (cAMP و cGMP)، قندها و غیره به

نخود (*Cicer arietinum* L.) به عنوان یکی از لگوم های مهم در بسیاری از کشورهای آسیایی و آفریقایی کشت و کار می شود و به دلیل دارا بودن منبع غنی از پروتئین، ویتامین ها و مواد معدنی، برای مصرف انسان و دام از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، به دلیل قابلیت تثبیت نیتروژن در حاصل خیزی خاک نقش به سزایی دارد (۳۶،۲۲،۳۴). تولید و کیفیت محصولات کشاورزی به شدت تحت تاثیر دامنه وسیعی از تنش های غیرزیستی نظیر خشکی، شوری، گرما و سرما قرار می گیرند، به ویژه وقتی این تنش ها در ترکیب با یکدیگر روی می دهند، می توانند اثرات مخربی روی رشد و حاصل خیزی گیاه داشته باشند. برآورد شده است که بیش از ۵۰ درصد کاهش عملکرد برای گیاهان زراعی مهم در سرتاسر دنیا به واسطه تنش های غیرزیستی روی می دهد (۳۹،۳،۲۸). بر اساس مدل های کنونی پیش بینی، آب و هوا به سمت افزایش خشکی، گرما و شوری پیش می رود (۵). این بدان معنی است که تولید کشاورزی با چالش های بزرگتری در مبارزه با تنش های محیطی در آینده روبه رو است. به علاوه، 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 و کار گیاه نخود در مناطق خشک و نیمه خشک و به صورت دیم انجام می شود که در معرض خشکی انتهایی هستند و به طور متوسط کاهش عملکرد ۵۰-۴۰ درصد را موجب می شوند

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 یادداشت برداری شدند. سپس آبیاری گیاهان تحت تیمار خشکی قطع شد، در حالی که 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 ازلت 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 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 بیوآنالایزر ۲۱۰۰ Agilent سنجیده شد و بهترین کیفیت (RIN 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^۱ در مجموعه ICRISAT، خوشه‌بندی^{۱۱} توسط cBot و توالی‌یابی دوطرفه^{۱۱} 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^{۱۲}

کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای FastQC و (v0.3) Raspberry انجام شد و طی آن آدپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت حذف شدند. برای تمامی نمونه‌ها، خوانش‌های^{۱۳} دارای کیفیت بالا روی ژنوم ژنوتیپ CDC Frontier به‌عنوان ژنوم مرجع نخود کابلی (۴۵) توسط نرم‌افزار TopHat (v2.0.0) نقشه‌یابی^{۱۴} شدند و سپس ترانسکرپتوم توسط نرم‌افزارهای Cufflinks (v2.0.2) و Cuffmerge سرهم‌بندی^{۱۵} 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^{۱۶}، مقدار log₂ 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.

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^۱ در ناحیه راه‌انداز ژن‌های هدف یا عوامل رونویسی دیگر متصل می‌شوند و رونویسی آن‌ها را تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌های تنظیمی از دو دُمین اصلی شامل فعال‌کننده و متصل‌شونده به DNA^۲ 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 DREB، AREB، MYB، WRKY، NAC و bZIP بر اساس ساختار دُمین 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^۵ مربوط به خشکی شده است (۲۰،۲۳). با ظهور فناوری‌های نسل جدید^۶ توالی‌یابی، امکان توالی‌یابی ترانسکرپتوم 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 ترانسکرپتوم 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 بیونج 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)^۷، 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

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

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 بیونج 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 بیونج 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 بیونج بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشتند.

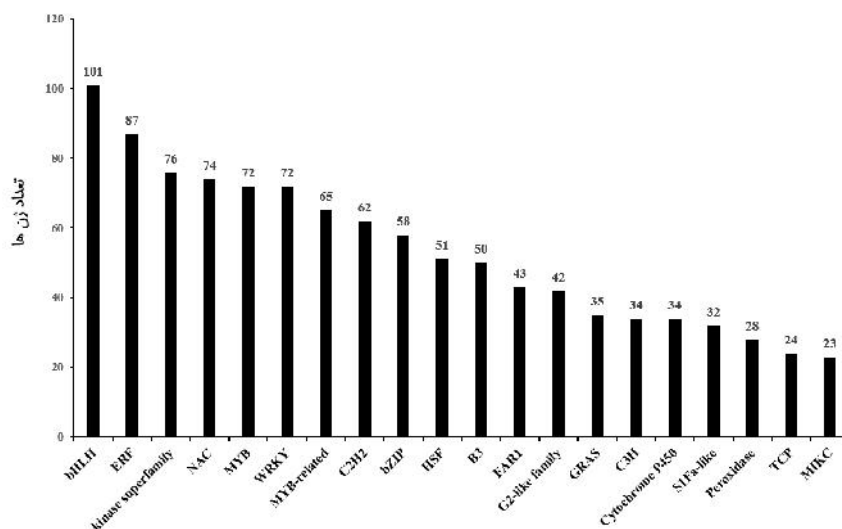
شناسایی عوامل رونویسی از میان ژن‌های بیانی افتراقی

جهت شناسایی عوامل رونویسی، ژن‌های دارای بیان افتراقی از طریق پایگاه داده عوامل رونویسی گیاهی (PTFD v4.0) 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^۲ به کمک نرم‌افزار v4.8.1 MeV استفاده شد.

نتایج و بحث

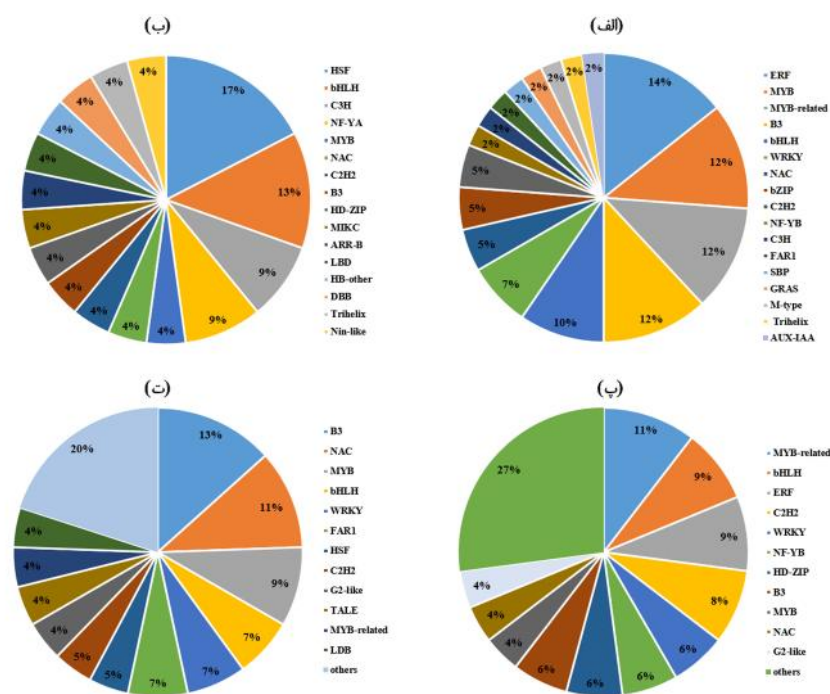
ارزیابی عوامل رونویسی در کل ژن‌های بیانی افتراقی

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



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



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 بیونج، پ و ت- به ترتیب افزایش بیان یافته در بافت هوایی ارقام هاشم و بیونج.
 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.

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 بیونج بیان بیشتری نسبت به رقم حساس داشت. همچنین، همه اعضای خانواده HSF در هر دو بافت ریشه و هوایی در رقم متحمل بیونج، 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 بیونج بیان بالاتری نسبت به رقم حساس هاشم داشتند که نشان‌دهنده نقش مهم‌تر رقم بیونج در تحمل به تنش خشکی است. خانواده‌های C3H، NAC و MYB-related هر کدام با دو ژن بیشترین اعضا را داشتند.

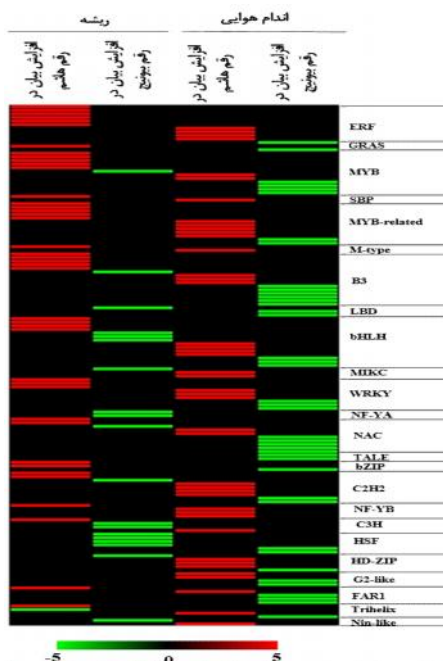
در مقایسه دو رقم متحمل و حساس در شرایط خشکی در بافت ریشه، خانواده‌های ERF (۱۴ درصد)، MYB (۱۲ درصد)، MYB-related (۱۲ درصد) و B3 (۱۲ درصد) برای ژن‌های افزایش بیان یافته در رقم هاشم بیشترین تعداد عضو را داشتند (شکل ۲-الف)، درحالی‌که در رقم بیونج، خانواده‌های HSF (۱۷ درصد)، bHLH (۱۳ درصد)، C3H (نه درصد) 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 بیونج 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

مسیر بیوستنز کاروتنوئید که منجر به سنتز هورمون اسید آبسزیک (ABA) می‌شود، نقش داشت. پرولین به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند و با حفاظت از ماکرومولکول‌ها و آنزیم‌ها، نقش مهمی در تنش‌های غیرزیستی در گیاهان ایفا می‌کند (۱۶). در تحقیق حاضر، دو ژن Ca_15236 و Ca_24241 که به ترتیب از خانواده‌های عوامل رونویسی B3 و NAC بودند در مراحل بیوستنز پرولین نقش داشتند و بیان هر دو ژن در اندام هوایی رقم بیونج بیشتر از رقم هاشم بود.

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 فتوستنز 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 بیونج نسبت به هاشم داشت. این عامل رونویسی در القای بیان ژن کدکننده آنزیم zeta-carotene desaturase (ZDS) در

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	یافت	رقم	نقش ژن
C3H	Ca_06635	کروموزوم ۷	ریشه	بیونج	واکنش به تنش کمبود آب و شوری، تنظیم بسته شدن روزنه
C3H	Ca_10437	کروموزوم ۶	ریشه	بیونج	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	بیونج	مراحل بیوستنز پرولین
NAC	Ca_09533	کروموزوم ۳	اندام هوایی	بیونج	واکنش دفاعی، مراحل بیوستنز فلاوونوئید
NAC	Ca_15236	کروموزوم ۲	اندام هوایی	بیونج	واکنش به تنش‌های اسمزی، مقاومت اکتسابی سیستمیک، مراحل بیوستنز پرولین و تری‌هالوز، نقش در پیری برگ
FAR1	Ca_00449	کروموزوم ۱	اندام هوایی	بیونج	مراحل بیوستنز اسید آبسزیک
MYB-related	Ca_04125	کروموزوم ۵	اندام هوایی	بیونج	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	اسکافولد ۳۴۲۲	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 \log_2 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 \log_2 fold change

خشکی نظیر RD، ERD، COR و غیره افزایش نشان داد و به‌طور محسوسه 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 بیونج 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 آسزیک 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.

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

منابع

- 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.
- Ahmad, F., P. Gaur and J. Croser. 2005. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement-Grain Legumes*, 1: 185-214.
- 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.
- 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.
- Bates, B. 2009. Climate Change and Water: IPCC technical paper VIWorld Health Organization, 101 p.
- Bengtsson, M., Y. Shen and T. Oki. 2006. A SRES-based gridded global population dataset for 1990–2100. *Population and Environment*, 28: 113-131.
- Bhargava, S. and K. Sawant. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132: 21-32.
- Bhattacharjee, A. and M. Jain. 2013. Transcription factor mediated abiotic stress signaling in rice. *Plant Stress*, 7: 16-25.
- 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.
- 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.
- 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).
- 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.

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. Golladack, 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.

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.

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

Keyvan Mahdavi Mashaki^{1,6}, Ali Asghar Nasrollahnezhad Ghomi², Khalil Zaynali Nezhad³, Ahad Yamchi³, Hasan Soltanloo⁴, Mahendar Thudi⁵ and Rajeiv Kumar Varshney⁵

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