دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تجزیه ترانسکریپتوم نخود بومی ایرانی در واکنش به‌تنش خشکی

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

۱، ۴ و ۵- دانش آموخته مقطع دکتری، استادیاران و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (نویسنده مسوول: ali1346nn@yahoo.com)
۳- پژوهشگران مرکز بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه خشک (ICRISAT)، حیدرآباد، هندوستان
تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۴

چکیده

نخود (*Cicer arietinum* L.) علاوه بر اینکه یکی از مهم‌ترین حبوبات از نظر تامین پروتئین برای تغذیه انسان می‌باشد، نقش مهمی در حاصلخیزی خاک دارد. این گیاه در نواحی خشک و نیمه خشک همچون ایران، در معرض تنش خشکی انتهای فصل قرار دارد. شناسایی ژن‌های القا شده در شرایط تنش خشکی نه تنها برای درک مکانیسم‌های مولکولی تحمل به‌خشکی ضروری است، بلکه در توسعه گیاهان متحمل اهمیت دارد. در تحقیق حاضر، الگوی ترانسکریپتوم نخود کابلی بومی ایرانی (رقم بیونیج) تحت شرایط خشکی در مرحله اوایل گلدهی در مرکز بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه‌خشک (ICRISAT) بررسی شد. به‌منظور توالی‌یابی ترانسکریپتوم نمونه‌های ریشه و اندام هوایی در شرایط شاهد و تنش از Illumina HiSeq2500 استفاده شد. در مجموع تعداد ۸۹۱ و ۵۰۷ ژن با بیان افتراقی در پاسخ به‌تنش خشکی به‌ترتیب در ریشه و اندام هوایی شناسایی شدند. همچنین تعداد ۷۶۰، ۳۷۶ و ۱۳۱ ژن به‌ترتیب به‌صورت اختصاصی در ریشه، اندام هوایی و مشترک در هر دو اندام بیان شدند. تجزیه ژن آنتولوژی (GO)، چندین گروه GO مربوط به‌تنش، شامل واکنش به‌محرک‌ها و پیام‌رسانی را در ژن‌های بیان شده افتراقی در پاسخ به‌تنش خشکی شناسایی کرد. علاوه بر این، مسیرهای متابولیکی مهم، نظیر بیوسنتز اسید آبسزیک و پرولین، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مثل فلاوونوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها و متابولیسم‌های انرژی و کربوهیدارت‌ها از طریق تجزیه مسیر KEGG شناسایی شدند. یافته‌های این تحقیق نشان داد که ژن‌ها و مسیرهای بیشتری در ریشه نسبت به اندام هوایی درگیر بودند. چندین ژن بیان شده افتراقی بویژه آن‌هایی که به‌عنوان عوامل رونویسی در ارتباط با ژن‌های واکنش‌دهنده به‌خشکی عمل کردند را می‌توان در تحقیقات آتی و برای بهبود ارقام متحمل به خشکی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نخود، خشکی، RNA-Seq، مسیرهای متابولیکی، عوامل رونویسی

مقدمه

یکی از مهم‌ترین حبوبات نخود (*Cicer arietinum* L.) است که دارای سطح زیر کشت ۱۴/۸ میلیون هکتار و تولید ۱۴/۲ میلیون تن در سرتاسر دنیا می‌باشد. کشورهای هند، استرالیا، پاکستان، میانمار، اتیوپی، ترکیه و ایران بزرگترین تولیدکنندگان نخود در دنیا بشمار می‌روند (۹). این گیاه منبع غنی از پروتئین (۲۰-۲۵ درصد) است و بدلیل داشتن اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌های مهم، نقش پررنگی در تغذیه انسان دارد. توانایی تثبیت نیتروژن توسط ریشه نخود باعث باروری و حاصلخیزی خاک می‌گردد. تعداد کم کروموزوم (۲n=2x=۱۶)، اندازه ژنوم نسبتاً کوچک (۷۴۰ Mb)، خودگشن بودن و چرخه تکثیر نسبتاً کوتاه، نخود را به گیاهی مناسب برای مطالعات ژنتیکی تبدیل کرده است (۳۳،۱۹). دو نوع مهم از نخود بر اساس اندازه، شکل و رنگ دانه شناسایی شده است. نوع دسی دارای اندازه دانه نسبتاً کوچکتر، شکل زاویه‌دار و پوشش تیره می‌باشد و نوع کابلی دارای اندازه دانه بزرگتر، شکل منظم‌تر و رنگ روشن است و بدلیل ارزش غذایی و اقتصادی بالاتر در مقایسه با نوع دسی، بیشتر مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (۳۷).

تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، شوری و گرما و تنش‌های زیستی همچون پوسیدگی فوزاریومی و برق‌زدگی نخود سفید از عوامل محدودکننده رشد و نمو نخود هستند. بیش از ۹۰ درصد کشت و کار این گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک و بصورت دیم انجام می‌شود که در معرض خشکی انتهایی هستند و بطور متوسط کاهش عملکرد ۵۰-۴۰ درصد را بدنبال دارد (۲۱،۲).

طی تنش خشکی، ابتدا تنش توسط گیرنده‌های سطح غشا درک شده و پس از انتقال پیام به‌درون سلول، پیام تنش از طریق یون کلسیم، فسفاتاز اینوسیتول، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[۱]، نوکلئوتیدهای حلقوی (cAMP) و اسید آبسزیک (ABA) به‌درون هسته انتقال می‌یابد. آخرین بخش انتقال پیام توسط القا شدن یا غیرفعال شدن عوامل رونویسی (TF)[۲] صورت می‌گیرد و بدنبال آن چندین ژن درگیر در تنش از طریق اتصال اختصاصی نواحی cis-element در پروموتور با عوامل رونویسی، تنظیم می‌شوند (۱،۴،۳۸). همانند بسیاری از گیاهان، مرحله گلدهی در نخود بیشترین حساسیت را به تنش خشکی نشان می‌دهد (۳۹) و در نتیجه مطالعه ژن‌ها و شبکه‌های درگیر در این مرحله از اهمیت بالایی برای شناسایی و درک مکانیسم تحمل به خشکی ایفا می‌کند.

طی سال‌های گذشته، مطالعه ترانسکریپتوم نخود با روش‌هایی نظیر توالی‌یابی سنگر و ریزآرایه[۳] آغاز شده است (۳۵،۸،۱۸،۲۶،۲۳) و با ظهور روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS)[۴] و در دسترس بودن ژنوم مرجع، امکان ارزیابی بهتر و دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تحمل به تنش‌های غیرزیستی فراهم شده است. اخیراً در چندین گزارش از تکنولوژی RNA-Seq به‌منظور ارزیابی پاسخ به تنش‌های

1- Reactive oxygen species 2- Transcription factors 3- Microarray 4- Next generation sequencing

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

غیرزیستی روی نخود دسی استفاده شده است و شبکه‌ها و مسیرهای درگیر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نخستین گزارش RNA-Seq روی نخود بدون استفاده از ژنوم مرجع انجام شد (۱۷). در تحقیقی دیگر، آنالیز ترانسکریپتوم منجر به شناسایی ۱۱۶۴۰ ژن در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و سرما در نخود متحمل ICC4958 شد (۱۴). در مقایسه ژنوتیپ‌های متحمل و حساس نیز در پاسخ به تنش خشکی ۴۹۵۴ ژن افتراقی شناسایی شد (۱۵). تجزیه ترانسکریپتوم در ژنوتیپ‌های متحمل که کمتر مورد مطالعه قرار گرفتند در شناسایی ژن‌های جدید و درک مکانیسم‌های پیچیده تحمل به خشکی کمک شایانی خواهد کرد. از این‌رو در تحقیق حاضر از رقم متحمل نخود به‌منظور مطالعه ترانسکریپتوم ریشه و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی در مرحله آغاز گلدهی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار خشکی

در این تحقیق از نخود کابلی رقم بیونیج که در بیشتر مناطق غرب ایران بخصوص کرمانشاه به‌عنوان رقم بومی کشت‌وکار می‌شود، استفاده شد. در مطالعات قبلی از بیونیج به‌عنوان رقم متحمل به خشکی یاد شده است (۱۲،۲۲،۲۷). تمامی مراحل آزمایش در مرکز بین‌المللی تحقیقات گیاهان زراعی برای نواحی گرمسیری نیمه خشک (ICRISAT)[1]، حیدرآباد، هندوستان، در سال۱۳۹۴انجام شد. تعداد دو بذر در گلدان‌هایی به‌عمق ۲۱ سانتی‌متر 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 یک‌ماه پس از کشت که همزمان با شروع مرحله زایشی بود آغاز گردید. در این زمان کلیه گلدان‌های شاهد و تیمار به‌صورت 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 به ۲۰ درصد ظرفیت زراعی رسید، نمونه‌گیری از اندام‌های هوایی و ریشه بصورت جداگانه انجام شد. نمونه‌گیری از ریشه در گیاهان شاهد با شستشوی خاک و خارج کردن ریشه‌ها انجام شد، در حالی‌که برای گیاهان در تیمار خشکی، خاک اطراف ریشه با احتیاط خرد و ریشه‌ها پس از خارج شدن توسط الکل شستشو داده شدند. 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 اندام هوایی در شرایط شاهد و خشکی برای استخراج RNA استفاده شد. استخراج RNA کل توسط NucleoSpin® RNA Plant kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & 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)[2] از میان سه تکرار بیولوژیک (در مجموع چهار 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[3] در مجموعه ICRISAT، خوشه‌بندی[4] توسط cBot و توالی‌یابی دوطرفه از قطعات ۱۲۵ جفت بازی با دستگاه Illumina HiSeq2500 انجام شد.

نقشه‌یابی با استفاده از ژنوم مرجع، تجزیه بیان ژن و شناسایی ژن‌های افتراقی

کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای FastQC (v0.3) و Raspberry انجام شد و طی آن آداپتورها، آغازگرها و توالی‌های بی‌کیفیت حذف شدند. برای تمامی نمونه‌ها، خوانش‌های[5] دارای کیفیت بالا روی ژنوم ژنوتیپ CDC Frontier به‌عنوان ژنوم مرجع نخود کابلی (۳۴) توسط نرم‌افزار TopHat (v2.0.0) نقشه‌یابی[6] شدند و سپس ترانسکریپتوم توسط نرم‌افزارهای Cufflinks (v2.0.2) و Cuffmerge سرهم‌بندی[7] شدند. نقش ژن‌های جدید توسط پایگاه داده NCBI non-redundant (NR) و به‌کمک نرم‌افزار BLASTp پیش‌بینی شدند. شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی بین نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Cuffdiff انجام شد. بدین منظور پس از محاسبه شاخص FPKM[8]، 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.

تجزیه غنی‌سازی ژن آنتولوژی و مسیر KEGG[9] (Gene ontology and KEGG pathway enrichment analysis)

به‌منظور گروه‌بندی ژن‌ها بر اساس نقش مولکولی[10]، جزء سلولی[11] و فرایند بیولوژیکی[12]، لیست GO های ژن‌های افتراقی توسط AgriGO تجزیه شدند. بدلیل شباهت ژنوم نخود با گیاه مدل *Medicago truncatula* (v4.0) از این گیاه به‌عنوان گونه و ژنوم مرجع استفاده شد. جهت آزمون معنی‌داری از روش آماری hypergeometric و روش تعدیل چند آزمونه Yekutieli در سطح معنی‌دار پنج استفاده شد. تجزیه غنی‌سازی مسیر KEGG با استفاده از آزمون hypergeometric در نرم‌افزار R انجام شد. مسیرهای معنی‌دار از طریق حد آستانه FDR≤۰/۰۵ انتخاب شدند.

تایید نتایج RNA-Seq به کمک qRT-PCR

جهت تایید داده‌های RNA-Seq، چهار ژن (جدول ۱) از میان ژن‌های افتراقی انتخاب و آغازگرها توسط نرم‌افزار Primer Express (v3.0) طراحی شدند. ساخت cDNA توسط SuperScript® III First-Strand synthesis kit انجام شد و کمیت و کیفیت cDNA توسط نانودراپ ارزیابی شدند. cDNA های ساخته شده توسط ژن خانه‌دار *GAPDH* نرمال و تجزیه qRT-PCR توسط دستگاه Applied

1- International crops research institute for the semi-arid tropics 2- RNA integrity number 3- Center of excellence in genomics
4- Clustering 5- Reads 6- Mapping 7- Assembly 8- Fragments per kilobase of ranscript per
9- Kyoto encyclopedia of genes and genomes 10- Molecular function 11- Cellular component 12- Biological process

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

Biosystems 7500 و رنگ سایبرگرین در دو تکرار تکنیکی انجام شد. تجزیه داده‌ها باروش $2^{-\Delta\Delta ct}$ و همبستگی نتایج qRT-PCR و RNA-Seq توسط نرم‌افزار R محاسبه شد.

جدول ۱- لیست و توالی آغازگرهای استفاده شده برای qRT-PCR

Table 1. List and sequence of primers used for qRT-PCR

شناسه ژن		توالی آغازگر
Ca_04355	مستقیم	5'- TCAGGTGCACATCTCAATCC -3'
	معکوس	5'- TTGCAAAAGCTTGACCAATG -3'
Ca_04358	مستقیم	5'- GAATCACAAATGGGAGCAGCA -3'
	معکوس	5'- CTTCACAAGGCTTTGCAACAA -3'
Ca_04370	مستقیم	5'- CACCGACTCATGATGGAT -3'
	معکوس	5'- TCATCTTCACGCCCTCTT -3'
Ca_04561	مستقیم	5'- AATGCTTTCAAGGCCAAA -3'
	معکوس	5'- CAACCTGTTTCCACGCAA -3'

نتایج و بحث

توالی‌یابی ترانسکریپتوم و نقشه‌یابی

در تحقیق حاضر، پاسخ به خشکی در نخود متحمل بیونیج با تکنیک RNA-Seq مطالعه شد. نتایج توالی‌یابی Illumina، کنترل کیفیت و نقشه‌یابی در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع بیش از ۳۴۲ میلیون خوانش از چهار نمونه با متوسط ۸۵ میلیون بدست آمد. بیشترین و کمترین خوانش‌ها به ترتیب مربوط به نمونه‌های اندام هوایی و ریشه در شرایط خشکی با ۹۴ میلیون و ۷۱ میلیون خوانش بود. پس از فیلتر کردن و حذف خوانش‌های بی‌کیفیت در مجموع بیش از ۳۱۶ میلیون خوانش تولید شد که از این مقدار ۳۰۲ میلیون روی ژنوم مرجع نقشه‌یابی شدند. بیشترین نرخ نقشه‌یابی مربوط به نمونه اندام هوایی در شرایط شاهد (۹۶ درصد) و نرخ متوسط آن ۹۵/۴۵ درصد بدست آمد.

جدول ۲- نتایج حاصل از توالی‌یابی، کنترل کیفیت و نقشه‌یابی

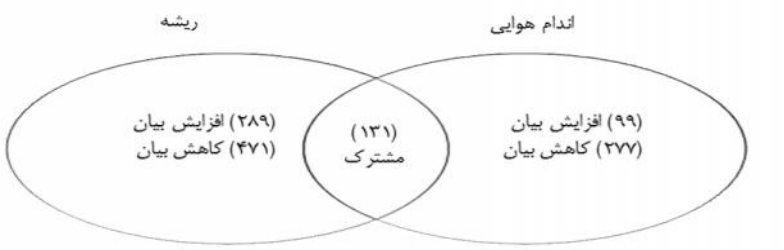
Table 2. Results of sequencing, quality control and mapping

نمونه	تعداد خوانش‌ها (میلیون)	خوانش‌های فیلتر شده (میلیون)	خوانش‌های نقشه‌یابی شده (میلیون)	نرخ نقشه‌یابی (درصد)
ریشه-شاهد	۹۱/۲۹۳۷۴۲	۸۴/۱۳۹۲۰۸	۸۰/۲۶۳۷۹۰	۹۵/۴
ریشه-خشکی	۷۱/۸۹۷۳۹۲	۶۶/۴۲۷۶۶۰	۶۳/۳۳۰۷۹۵	۹۵/۳
اندام هوایی-شاهد	۸۴/۴۷۳۷۰۸	۷۸/۹۱۸۹۳۶	۷۵/۷۲۴۴۲۳	۹۶/۰
اندام هوایی-خشکی	۹۴/۸۹۸۰۷۴	۸۷/۳۰۴۵۶۲	۸۳/۰۵۱۰۳۲	۹۵/۱
کل	۳۴۲/۲۵۶۲۹۱۶	۳۱۶/۷۹۰۳۶۶	۳۰۲/۳۷۰۰۴۰	
متوسط	۸۵/۶۴۰۷۲۹	۷۹/۱۹۷۵۹۲	۷۵/۵۹۲۵۱۰	۹۵/۴۵

شناسایی ژن‌های بیانی افتراقی

به‌منظور شناسایی ژن‌های بیانی افتراقی، نمونه‌های ریشه و اندام هوایی بصورت جداگانه در شرایط شاهد و تنش خشکی توسط نرم‌افزار Cuffdiff مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در پاسخ به خشکی تعداد ژن‌های بیشتری به صورت افتراقی در ریشه نسبت به اندام هوایی بیان شدند. از ۸۹۱ ژن افتراقی که در ریشه بیان شدند ۳۵۱ ژن افزایش بیان و ۵۴۰ ژن در پاسخ به خشکی کاهش بیان نشان دادند. در اندام هوایی، تعداد ۵۰۷ ژن افتراقی در پاسخ به خشکی شناسایی شدند که بیان ۳۵۰ ژن کاهش و بیان ۱۵۷ ژن افزایش یافت. از میان ژن‌های افتراقی در ریشه، ۸۵۱ ژن بصورت اختصاصی و ۴۰ ژن به بیش از یک جایگاه در ژنوم مرجع نقشه‌یابی شدند. در اندام هوایی نیز ۲۴ ژن افتراقی دارای بیش از یک شناسه ژن (با پیشوند Ca) در ژنوم مرجع بودند. با استفاده از نرم‌افزارهای Cufflinks و Cuffmerge ژن‌های جدید شناسایی شدند، بطوریکه از ۸۹۱ ژن افتراقی در ریشه ۸۰ ژن و از ۵۰۷ ژن افتراقی در اندام هوایی ۴۶ ژن (با پیشوند XLOC) جدید بودند. کارکردهای این ژن‌های جدید توسط پایگاه داده NCBI non-redundant (NR) جستجو شد، اگر چه بخشی از آن‌ها ناشناخته باقی ماند. از نمودار Venn برای شناسایی تعداد ژن‌های افتراقی مشترک بین ریشه و اندام هوایی استفاده شد (شکل ۱). از کل ژن‌های افتراقی، تعداد ۷۶۰ ژن (۲۸۹ ژن دارای افزایش بیان و ۴۷۱ ژن دارای کاهش بیان) بصورت اختصاصی در ریشه، ۳۷۶ ژن (۹۹ ژن دارای افزایش بیان و ۲۷۷ ژن دارای کاهش بیان) بصورت اختصاصی در اندام هوایی و ۱۳۱ ژن بصورت مشترک بین هر دو اندام بیان شدند. از بین ۱۳۱ ژن مشترک، تعداد ۵۴ ژن در ریشه و اندام هوایی افزایش بیان، ۶۶ ژن در ریشه و اندام هوایی کاهش بیان نشان دادند. جالب آنکه بیان هفت ژن در ریشه افزایش و در اندام هوایی کاهش و متقابلاً بیان چهار ژن در ریشه کاهش و در اندام هوایی افزایش یافت. ریشه به‌عنوان نخستین اندامی که خشکی و کم‌آبی را در خاک درک می‌کند از اهمیت بالایی در تحمل به خشکی برخوردار است. در مطالعات گذشته روی ارقام دسی نخود نیز، تعداد ژن‌های افتراقی بیشتری در ریشه نسبت به برگ و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی گزارش شد (۱۴،۳۵).

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]



شکل ۱- تعداد ژن‌های افتراقی اختصاصی و مشترک در ریشه و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی
Figure 1. Number of specific and common differentially genes in root and shoot in response to drought stress

تجزیه ژن آنتولوژی ژن‌های بیانی افتراقی

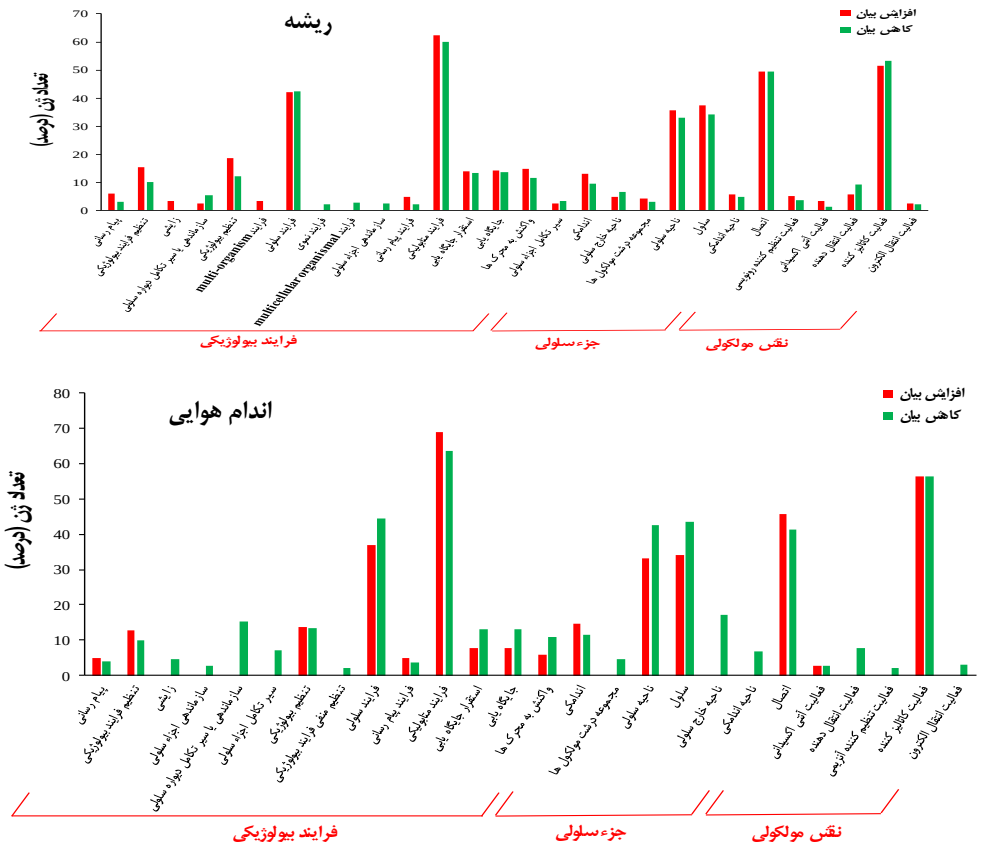
ژن آنتولوژی (GO) به‌منظور درک گروه‌بندی کارکردی ژن‌های بیان شده به شکل افتراقی بکار می‌رود. ۸۹۱ و ۵۰۷ ژن با بیان افتراقی به ترتیب در ریشه و اندام هوایی برای تجزیه غنی‌سازی ژن آنتولوژی بکار رفتند (شکل ۲). گروه‌بندی ژن‌های افتراقی بر اساس جزء سلولی نشان داد که در هر دو اندام گروه‌های سلول[۱] و ناحیه سلولی[۲] و با بیشترین تعداد از ژن‌ها غنی شده‌اند. هر چند در اندام هوایی بر خلاف ریشه درصد ژن‌های کاهش بیان یافته در پاسخ به خشکی بیشتر از ژن‌های افزایش بیان یافته بود. در سطح نقش مولکولی، گروه‌های فعالیت کاتالیزکننده[۳] و اتصال[۴] بیشترین تعداد ژن را در هر دو اندام به خود اختصاص دادند. گروه‌های فعالیت تنظیم‌کننده رونویسی[۵]، فعالیت انتقال‌دهنده[۶] و فعالیت انتقال الکترون[۷] در ریشه، دارای درصد نسبتاً برابری از ژن‌های افزایش و کاهش بیانی بودند، در حالی‌که در اندام هوایی، گروه‌های فعالیت تنظیم‌کننده آنزیمی[۸]، فعالیت انتقال‌دهنده و فعالیت انتقال الکترون تنها با ژن‌های کاهش بیان‌یافته غنی شدند. در ریشه و اندام هوایی، گروه فعالیت آنتی‌اکسیدانی[۹] درگیر بود، اما در ریشه نسبت به اندام هوایی تعداد ژن‌های افزایش بیان‌یافته بیشتر بود. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) طی شرایط تنش در سلول‌ها تولید می‌شوند و دارای اثرات زیانباری روی ماکرومولکول‌ها هستند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز نقش مهمی در سم‌زدایی این ترکیبات دارا هستند (۳۲).

در طبقه‌بندی ژن‌های پاسخ دهنده به خشکی بر اساس فرایند بیولوژیکی ۱۶ گروه از ژن ها در ریشه و ۱۴ گروه در اندام هوایی به شکل معنی‌داری درگیر بودند. دو گروه فرایند متابولیکی[۱۰] و فرایند سلولی[۱۱] در ریشه و اندام هوایی بالاترین درصد ژن‌های افتراقی را به‌خود اختصاص دادند. سه گروه مهم در فرایندهای بیولوژیکی، شامل پیام‌رسانی[۱۲]، فرایند پیام‌رسانی و واکنش به محرک‌ها[۱۳] به‌عنوان گروه‌های درگیر در تنش‌های غیر زیستی در هر دو اندام بصورت معنی‌داری غنی شدند، اما در ریشه نسبت به اندام هوایی درصد بالاتری از ژن‌های افزایش بیان یافته درگیر بودند. در ریشه بیان ۵/۹۹ درصد از ژن‌های افتراقی در گروه پیام‌رسانی در پاسخ به خشکی افزایش یافتند، در حالی‌که در اندام هوایی بیان ۴/۸۵ درصد از ژن‌های افتراقی افزایش یافت. در گروه فرآیند پیام‌رسانی در ریشه تعداد ژن‌هایی که دارای افزایش بیان بودند نسبت به تعداد ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند، بیشتر درگیر بودند. بخش عمده‌ای از ژن‌های مربوط به تنش‌های غیرزیستی در گروه ژن آنتولوژی واکنش به محرک‌ها قرار می‌گیرند و نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن‌های افتراقی پاسخ‌دهنده به خشکی در ریشه و اندام هوایی رقم متحمل بیونیج به خوبی این گروه را غنی کرده‌اند، اما درصد ژن‌های افزایش و کاهش بیان‌یافته در دو اندام عکس یکدیگر بود که دلالت بر نقش بیشتر اندام ریشه در القای تحمل به خشکی دارد. در ریشه و در گروه واکنش به محرک‌ها ۱۴/۷۵ درصد و ۱۱/۴ درصد از ژن‌های افتراقی به ترتیب افزایش و کاهش بیان نشان دادند، در حالی‌که در اندام هوایی بیان ۵/۸۳ درصد از ژن‌ها افزایش و ۱۰/۷۶ درصد کاهش یافت. یکی از مکانیسم‌های کاهش آسیب در برابر خشکی تکمیل سریع‌تر مرحله زایشی می‌باشد. به‌عنوان مثال گروه زایشی[۱۴] مربوط به ژن‌های نمو گل و تسریع روند زایشی می‌باشد (۱۰)، که نتایج این مطالعه نشان داد که این گروه در ریشه با ژن‌های افزایش بیان یافته و در اندام هوایی با ژن‌های کاهش بیان یافته غنی شده‌اند. در نتیجه، می‌توان عنوان کرد موفقیت‌های زایشی رقم بیونیج بدلیل ژن‌های درگیر در ریشه است. بطورکلی، تجزیه ژن آنتولوژی در این تحقیق تا حدود زیادی در توافق با نتایج مطالعات ترانسکریپتوم نخود دسی در شرایط خشکی می‌باشد (۱۵،۱۷).

عوامل رونویسی، پروتئین‌های تنظیم‌کننده کلیدی هستند که می‌توانند بیان چندین ژن پائین‌دست را کنترل کنند. این ژن‌ها نقش مرکزی مهمی به‌عنوان حدواسط در واکنش‌های مربوط به تنش در گیاهان ایفا می‌کنند (۲۰،۱۶). بدلیل اهمیت عوامل رونویسی در فرایندهای حیاتی گیاه، از میان ژن‌های گروه واکنش به محرک‌ها، عوامل رونویسی استخراج شدند. اسامی این عوامل رونویسی در جدول ۳ ارائه شده است. کنترل و تنظیم بیان چندین ژن مربوط به تنش موجب شده است تا عوامل رونویسی کاندیدهای مناسبی برای مهندسی ژنتیک و اصلاح گیاهان متحمل به تنش باشند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه استفاده از این ژن‌ها به‌منظور بهبود گیاهان مختلف در برابر تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (۳۶). جداسازی عوامل رونویسی CIPK25 و CarNAC4 از نخود و انتقال آن‌ها به ترتیب به گیاهان توتون و آرابیدوپسیس موجب افزایش تحمل به تنش‌های کم‌آبی و شوری شده است (۴۰،۲۵).

1- Cell 2- Cell part 3- Catalytic activity 4- Binding 5- Transcription regulator activity 6- Transporter activity 7- Electron carrier activity 8- Enzyme regulator activity 9- Antioxidant activity 10- Metabolic process 11- Cellular process 12- Signaling 13- Response to stimulus 14- Reproduction

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]



شکل ۲- مقایسه ژن آنتولوژی برای ژن‌های افزایش و کاهش بیان یافته در شرایط خشکی در ریشه و اندام هوایی
Figure 2. Comparison the gene ontology of up and down-regulated genes in root and shoot in response to drought stress

جدول ۳- ژن‌های مربوط به زیرگروه واکنش به محرک‌ها که به عنوان عوامل رونویسی در پاسخ به تنش خشکی افزایش بیان یافته‌اند (پیشوند XLOC بیانگر ژن‌های جدید است)
Table 3. List of genes associated with the sub-category of "response to stimulus" which were up-regulated as transcription factors under drought stress (XLOC prefix refers to the novel genes)

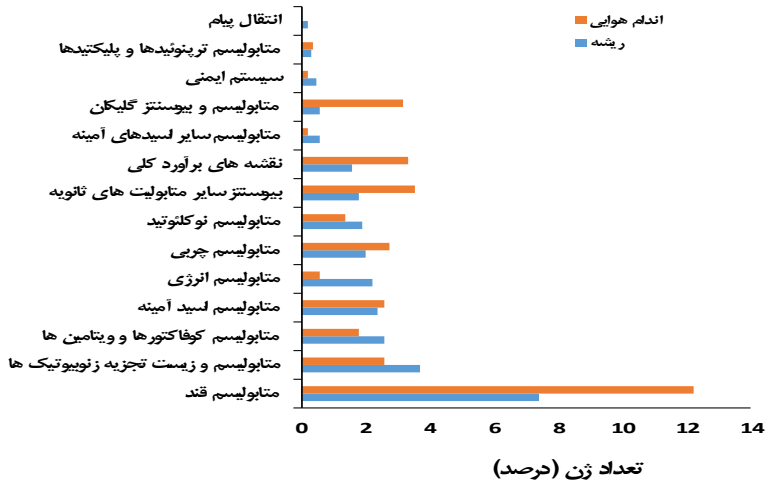
شناسه ژن	جایگاه	بافت	عامل رونویسی
Ca_13942	کروموزوم ۱	ریشه	ARF
XLOC_001833	کروموزوم ۱	ریشه	MIKC
Ca_15641	کروموزوم ۲	ریشه	M-type
Ca_15674	کروموزوم ۲	ریشه	MYB_related
Ca_17121	کروموزوم ۴	ریشه	Dof
XLOC_012982	کروموزوم ۴	ریشه	bZIP
Ca_04125	کروموزوم ۵	ریشه	MYB_related
Ca_18183	کروموزوم ۵	ریشه	ARF
Ca_07983	کروموزوم ۱	اندام هوایی	M-type
XLOC_016065	کروموزوم ۵	اندام هوایی	NAC
Ca_10410	کروموزوم ۵	اندام هوایی	NF-YA
Ca_11027	کروموزوم ۵	اندام هوایی	MYB

تجزیه غنی‌سازی مسیر KEGG

به‌منظور مقایسه مسیرهای متابولیکی درگیر در ریشه و اندام هوایی در شرایط خشکی، تجزیه مسیر KEGG با استفاده از ژن‌های بیانی افتراقی انجام شد (شکل ۳). ژن‌های مربوط به متابولیسم و بیوسنتز کربوهیدارت‌ها، انرژی، لیپیدها، کوفاکتور و ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و متابولیت‌های ثانویه بطور معنی‌داری در ریشه و اندام هوایی درگیر بودند که نشان دهنده اهمیت این مسیرها در شرایط خشکی است. همچنین تعداد ژن‌های متفاوت درگیر در این مسیرها برای ریشه و اندام هوایی، بیانگر تاثیر نوع اندام گیاهی در پاسخ به تنش خشکی است. به‌منظور کسب اطلاعات بیشتر، چندین مسیر متابولیکی مهم درگیر در خشکی را با تاکید بر نتایج حاصل از این تحقیق بررسی می‌کنیم.

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

مسیر بیوسنتز اسید آبسزیک: این مسیر متعلق به متابولیسم ترپنوئیدها و پلیکتیدها می‌باشد و منجر به سنتز هورمون اسید آبسزیک می‌شود. هورمون‌های گیاهی شامل اسید آبسزیک،



شکل ۳- مقایسه تجزیه غنی‌سازی مسیرهای متابولیکی KEGG در ریشه و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی
Figure 3. Comparison of KEGG metabolic pathway enrichment analysis in root and shoot in response to drought stress

اکسین، سیتوکینین، جیبرلین، اتیلن، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک نقش‌های حیاتی در رشد و نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. اسید آبسزیک (ABA) یکی از مهمترین هورمون‌های گیاهی است و در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهی نظیر بلوغ جنین، جلوگیری از جوانه‌زنی زودهنگام، خواب بذر، تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها و فعال‌سازی ژن‌های مربوط به تنش و تنظیم اسمزی نقش دارد (۳۱،۳۰). در تحقیق حاضر، بیان ژن با مسیر بیوسنتز پرولین: یکی از مهم‌ترین مسیرهای متابولیسمی اسیدهای آمینه، متابولیسم آرژنین و پرولین است که در نهایت منجر به سنتز پرولین می‌شود. پرولین به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند، در تثبیت و محافظت ماکرومولکول‌ها و آنزیم‌ها نقش دارد و همچنین به‌عنوان یک ذخیره کربن و نیتروژن در طی دوره‌های کم‌آبی استفاده می‌شود (۷،۳). در مسیر بیوسنتز پرولین، بیان دو ژن با شناسه Ca_23716 و Ca_24241 که القاکننده آنزیم‌های ۵-کیناز و دهیدروژناز هستند در اندام ریشه و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت. در ضمن بیان ژن با شناسه Ca_17738 در اندام هوایی کاهش یافت.

بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه: فلاوونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها از جمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه هستند که اکثراً به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از گیاهان در برابر تنش‌های متنوع زیستی و غیرزیستی محافظت می‌کنند (۲۸). در این مطالعه چندین ژن افتراقی مربوط به مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در ریشه و اندام هوایی درگیر بودند، در حالی‌که در مسیر فلاوونوئیدها، تنها ژن‌های افتراقی مربوط به اندام هوایی نقش داشتند. بیان ژن با شناسه Ca_05702 (به‌عنوان عامل رونویسی از خانواده ARF) در مسیر بیوسنتز فلاوونوئیدها در اندام هوایی در پاسخ به تنش شناسه Ca_08641) (به‌عنوان عامل رونویسی از خانواده FAR1) که در القای ژن سنتزکننده آنزیم zeta-carotene desaturase (ZDS) نقش دارد، در پاسخ به خشکی در اندام هوایی افزایش یافت. آنزیم ZDS در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید منجر به تبدیل کاروتن به لیکوپن می‌شود. چندین گزارش نشان دادند که موتانت‌های دارای نقص در ژن‌های مسیر بیوسنتز هورمون ABA، حساس به تنش‌های محیطی هستند (۲۴،۱۳).

خشکی افزایش یافت. این ژن بیان ژن کدکننده آنزیم shikimate O-hydroxycinnamoyl transferase را القا می‌کند.

متابولیسم نشاسته و ساکارز: طی شرایط خشکی، طیفی از مولکول‌های آلی کوچک، نظیر قندها، اسیدهای آمینه و ترکیبات مربوطه توسط سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند (۵). قندهای محلول مانند نشاسته و ساکارز، نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی دارند (۲۹). از ۱۸ ژن افتراقی مربوط به متابولیسم نشاسته و ساکارز در ریشه، بیان هشت ژن افزایش و ۱۰ ژن در شرایط خشکی کاهش بیان داشتند، در حالی‌که از ۱۹ ژن افتراقی در اندام هوایی، بیان پنج ژن افزایش و بیان بقیه ژن‌ها کاهش یافت. افزایش قندهای محلول و به دنبال آن افزایش پتانسیل اسمزی می‌تواند به‌علت بالاتر بودن تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته در ریشه نسبت به اندام هوایی باشد.

متابولیسم انرژی: فتوسنتز و فسفورولاسیون اکسیداتیو به عنوان مهم‌ترین مسیرهای مربوط به متابولیسم انرژی، تنها در ریشه درگیر بودند، و چندین ژن مربوط به این مسیرها به شکل افتراقی بیان شدند. در حالی‌که در اندام هوایی تنها یک ژن در مسیر فتوسنتز در پاسخ به خشکی کاهش بیان نشان داد. ادامه فتوسنتز در شرایط خشکی از پارامترهای تحمل به

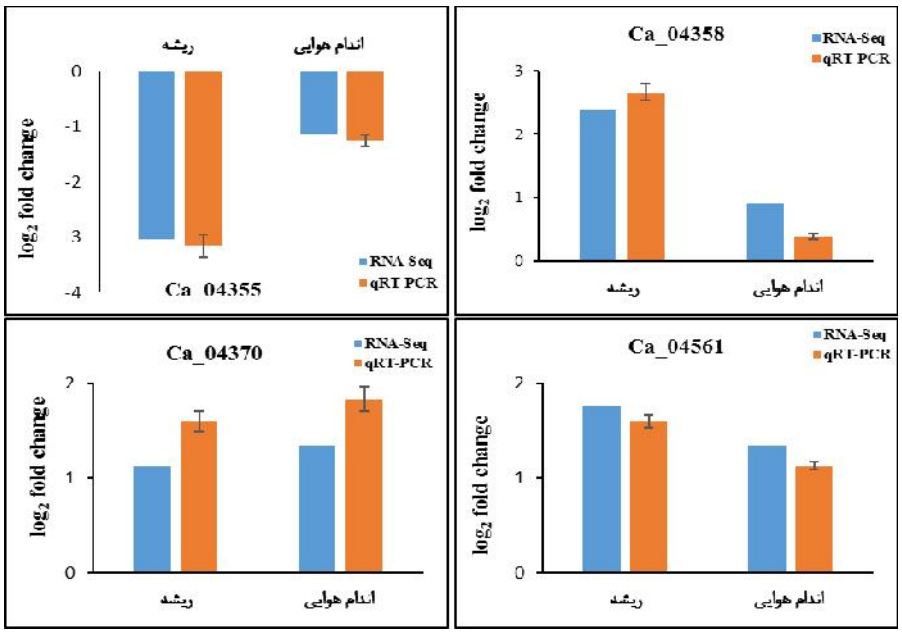
[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

خشکی می‌باشد، اما از طرف دیگر مسیرهای فتوسنتز و فسفورولاسیون اکسیداتیو مستلزم صرف انرژی نیز هستند و به‌نظر می‌رسد افزایش سطح هورمون اسید آبسزیک، بسته شدن روزنه‌ها و همچنین افزایش سطح پرولین، نوعی حالت موقت برای گیاه به‌منظور کاهش تعرق و کاهش مصرف انرژی باشد (۱۱،۶).

تایید داده‌های RNA-Seq به کمک qRT_PCR

به‌منظور تایید نتایج توالی‌یابی ترانسکریپتوم از qRT_PCR استفاده شد. مقایسه دو تکنیک از نظر بیان چهار ژن در ریشه و اندام هوایی در پاسخ به تنش خشکی، نشان‌دهنده همبستگی بالا (r=۰/۹۷) بین نتایج دو روش بود، و بدین ترتیب qRT-PCR به خوبی توانست نتایج RNA-Seq را تایید کند (شکل ۳).

تحقیق حاضر در بردارنده اطلاعات ارزشمندی در مورد الگوی ترانسکریپتوم نخود بومی ایرانی در واکنش به تنش خشکی در مرحله گلدهی می‌باشد. نتایج ژن آنتولوژی و تجزیه مسیر به خوبی توانست ژن‌ها و مسیرهای درگیر در تحمل به خشکی را تشریح نماید. همچنین نتایج نشان داد که ریشه نقش بیشتری در تحمل به خشکی در رقم بیونیج ایفا می‌کند. چندین ژن کاندید کلیدی که به‌عنوان عوامل رونویسی عمل می‌کنند در این تحقیق گزارش شد که با تحقیقات بیشتر، امکان اصلاح و بهبود ارقام برتر نخود با تحمل بالا در برابر خشکی انتهای فصل را فراهم می‌آورد.



شکل ۴- تایید نتایج RNA-Seq توسط qRT-PCR. چهار ژن در ریشه و اندام هوایی در پاسخ به خشکی ارزیابی شدند

Figure 4. Verification of RNA-Seq results by qRT-PCR. Four gene were evaluated in root and shoot in response to drought

منابع

1. Agarwal, P. and B. Jha. 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. Biologia Plantarum, 54: 201-212.
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. Ashraf, M. and M. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
4. Bhargava, S. and K. Sawant, 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. Plant Breeding, 132: 21-32.
5. Bohnert, H.J., D.E. Nelson and R.G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell, 7: 1099.
6. 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.
7. Delauney, A.J. and D.P.S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal, 4: 215-223.
8. Deokar, A.A., V. Kondawar, P.K. Jain, S.M. Karuppayil and N.L. Raju. 2011. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) between drought-tolerant and -susceptible genotypes of chickpea under terminal drought stress. BMC Plant Biology, 11: 70.
9. FAOSTAT 2013. FAOSTAT database. http://faostat3.fao.org/faostat- gateway/go/to/download/Q/QC/E.
10. Farooq, M., N. Gogoi, S. Barthakur, B. Baroowa and N. Bharadwaj. 2016. Drought Stress in Grain Legumes during Reproduction and Grain Filling. Journal of Agronomy and Crop Science, 203(2): 81-102.

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

11. Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable Agriculture, Springer, pp: 153-188.
12. Farshadfar, E. and J. Javadinia. 2011. Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for drought tolerance. Seed and Plant Improvment Journal, 27(1): 517-537 (In persian).
13. Finkelstein, R.R. and C.D. Rock. 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. The Arabidopsis Book: e0058.
14. 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.
15. Garg, R., R. Shankar, B. Thakkar, H. Kudapa and L. Krishnamurthy. 2016. Transcriptome analyses reveal genotype-and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. Scientific Reports, 6: 19228.
16. 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).
17. Hiremath, P.J., A. Farmer, S.B. Cannon and J. Woodward. 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.
18. Jain, D. and D. Chattopadhyay. 2010. Analysis of gene expression in response to water deficit of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties differing in drought tolerance. BMC Plant Biology, 10(1): 24.
19. Jayashree, B., H.K. Buhariwalla, S. Shinde and J.H. Crouch. 2005. A legume genomics resource: the chickpea root expressed sequence tag database. Electronic Journal of Biotechnology, 8: 8-13.
20. Joshi, R., S.H. Wani, B. Singh, A. Bohra and Z.A. Dar. 2016. Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. Frontiers in Plant Science, 7: 1029.
21. 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.
22. 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.
23. Mantri, N.L., R. Ford, T.E. Coram and E.C. Pang. 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. BMC Genomics, 8: 1.
24. McAdam, S.A. and T.J. Brodribb. 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. Plant Physiology, 167: 833-843.
25. Meena, M.K., S. Ghawana, V. Dwivedi, A. Roy and D. Chattopadhyay. 2015. Expression of chickpea CIPK25 enhances root growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco. Frontiers in Plant Science, 6(683): 1-11.
26. Molina, C., B. Rotter, R. Horres, S.M. Udupa and B. Besser. 2008. SuperSAGE: the drought stress responsive transcriptome of chickpea roots. BMC Ggenomics, 9(1): 553.
27. 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).
28. Pourcel, L., J.M. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec and I. Debeaujon. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. Trends in Plant Science, 12: 29-36.
29. Ruan, Y.L., Y. Jin, Y.J. Yang, G.J. Li and J.S. Boyer. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. Molecular Plant, 3: 942-955.
30. Ruggiero, B., H. Koiwa, Y. Manabe, T.M. Quist and G. Inan. 2004. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of sto1/nced3, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in Arabidopsis. Plant Physiology, 136: 3134-3147.
31. Sah, S.K., K.R. Reddy and J. Li. 2016. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. Frontiers in Plant Science, 7(571): 1-26.
32. Shao, H.B., L.Y. Chu, Z.H. Lu and C.M. Kang. 2008. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. International Journal of Biological Sciences, 4(1): 8.
33. Varshney, R.K., P.J. Hiremath, P. Lekha, J. Kashiwagi and J. Balaji. 2009. A comprehensive resource of drought-and salinity-responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). BMC Genomics, 10: 1.
34. Varshney, R.K., C. Song, R.K. Saxena, S. Azam and S. Yu. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides a resource for trait improvement. Nature biotechnology, 31: 240-246.
35. Wang, X., Y. Liu, Y. Jia, H. Gu and H. Ma. 2012. Transcriptional responses to drought stress in root and leaf of chickpea seedling. Molecular Biology Reports, 39: 8147-8158.
36. Wang, H., H. Wang, H. Shao and X. Tang. 2016. Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. Frontiers in Plant Science, 7(67):1-13.
37. Wood, J., E. Knights and M. Choct. 2011. Morphology of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.): comparison of desi and kabuli types. International Journal of Plant Sciences, 172: 632-643.
38. Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology, 57: 781-803.
39. Yaqoob, M., P.A. Hollington, A.B. Mahar and Z.A. Gurmani. 2013. Yield performance and responses studies of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under drought stress. Emirates Journal of Food and Agriculture, 25(2): 117.
40. Yu, X., Y. Liu, S. Wang, Y. Tao and Z. Wang. 2016. CarNAC4, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in Arabidopsis. Plant Cell Reports, 35: 613-627.

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]

Transcriptome Analysis of Iranian Local Chickpea in Response to Drought Stress

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

1, 4 and 5- Graduated Ph.D. Student, Assistant Professors 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)
3- Researchers, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Hyderabad, India
Received: 13 October 2016 Accepted: 4 December 2016

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is one of the most important legumes for human food and plays major roles in soil productivity. This crop is subjected to terminal drought in arid and semi-arid regions such as Iran. Identification of drought-induced genes is necessary not only for understanding molecular mechanisms of drought tolerance, but also is important to develop tolerant crops. In present study, transcriptome profiling of Iranian local kabuli chickpea (Bivanij cultivar) was investigated under drought stress at early flowering stage at International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). Illumina HiSeq2500 was applied for sequencing the root and the shoot samples under control and stress conditions. A total of 891 and 507 differentially expressed genes (DEGs) were identified in response to the drought stress in the root and the shoot, respectively. Likewise, 760, 376 and 131 DEGs were detected specifically in the root, the shoot and common in both organs, respectively. Gene ontology (GO) analysis revealed several GO terms associated with stress, including response to stimulus and signaling among the DEGs in response to the drought stress. Moreover, major metabolic pathways such as ABA and proline biosynthesis, biosynthesis of secondary metabolites such as flavonoids and phenylpropanoids, carbohydrates and energy metabolisms were identified by KEGG pathway analysis. These findings showed that more drought-related genes and pathways were induced in the root compared to the shoot. Several DEGs particularly those which were functioned as transcription factors (TFs) related to drought responsive genes, can be used for future researches and improving drought tolerant cultivars.

Keywords: Chickpea, Drought, Metabolic pathways, RNA-Seq, Transcription factors

[DOI: 10.29252/jcb.9.24.1]