

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی

مطالعه اثر تنش سرما بر الگوی بیان ژن های درگیر در مسیر

سیگنالینگ اتیلن در گیاه گوجه فرنگی

نگارنده: سوسن حسن زاده

اساتید راهنما

دکتر زیبا قسیم حق دکتر پرویز حیدری

استاد مشاور

دکتر حجت اله بداقی

بهمن ۹۷

تقدیم بہ

مشوقم، مادرم

حامی ام در این راہ، پدرم...

تقدیر و تشکر

پاس خدایی را که اول و آخر وجود است، بی آنکه اولی بر او پیشی بگیرد و یا آخری پس از او باشد؛ خدایی که دست هر چندی از دامن دیدارش کوتاه

است و اندیشه و فم و صف کنندگان از وصفش عاجز است. (صحیفه سجادیه)

بر رسم ادب و بر رسم شاکردی از محضر اساتید راهنمای گرامی سرکار خانم دکتر زیبا قیمی حق و جناب آقای دکتر پرویز حیدری کمال سپاس را دارم

که باز حجت بی دینشان یاری رسان من در طول پایان نامه بودند. و نیز از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر حجت اله بداتی کمال سپاس را دارم

که بی دریغ دانش گران قدر خویش را در اختیار این جانب قرار دادند. و از اساتید محترم، جناب آقای دکتر امین ابراهیمی و جناب آقای دکتر مهدی

رضایی که زحمت داورسی این پایان نامه را بر عهده داشته اند و با لطف و بزرگواری فراوان، آن را مطالعه و مورد عنایت قرار داده اند کمال تشکر و قدردانی

را دارم.

پنجین از دوستان عزیزم فاطمه ایزانلو، عطیه حامی، مسا آذینا، شقایق فرضی، مهدیه مهربانی، فاطمه دهنقانی و نجمه طالبی و بهکلاسی های محترم آقایان سعید

خانی، امیر صفاری، علی اکبر زمندی و محمد نجاری که در تمام مراحل پایان نامه یاری ام نمودند، سپاسگذارم.

سوسن حسن زاده، بهمن ۱۳۹۷

تعمدنامه

اینجانب سوسن حسن‌زاده دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه مطالعه اثر تنش سرما بر الگوی بیان ژن‌های درگیر در مسیر سیگنالینگ اتیلن در گیاه گوجه‌فرنگی تحت راهنمایی دکتر زیبا قسیم‌حق و دکتر پرویز حیدری متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است . تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

گیاه گوجه‌فرنگی با سطح زیر کشت وسیع جهانی به سرما حساس است. هورمون اتیلن در پاسخ به تنش‌های غیر زنده مختلف از جمله تنش سرما دخالت دارد. بنابراین برای درک بهتر مکانیسم‌های پاسخ به سرما در گوجه‌فرنگی، بیان برخی از ژن‌های درگیر در بیوسنتز اتیلن و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در دو گونه گوجه‌فرنگی *S.habrochaites* (مقاوم به سرما) و *S.lycopersicum* (حساس به سرما) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تحت تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیان ژن‌های SAM1، SAM2، SAM3، SAM4، SAM5، ACS1 و ACO1 در گونه حساس افزایش یافت در حالی که تحت تنش سرما در گونه مقاوم بیان ژن‌های SAM1، SAM3، SAM4 و ACS1 افزایش و بیان ژن‌های SAM2 و ACO1 کاهش داشتند و در بیان ژن SAM5 تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. تفاوت بیان ژن ACO1 تحت تنش سرما در دو گونه مقاوم و حساس نشان‌دهنده این بود که اتیلن تحمل به سرما را در گوجه‌فرنگی به صورت منفی تنظیم می‌کند. همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون کاتالاز و گایاکول پراکسیداز تحت شرایط تنش در هر دو گونه کاهش یافت. میزان افزایش نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدهید نیز تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در گونه حساس بیش از گونه مقاوم بود. نتایج تحقیق حاضر اولین گزارش از نقش ژن‌های SAM در تنش سرما است که می‌تواند در شناخت مسیرهای پیام‌رسانی سلولی و ایجاد لاین‌های مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گوجه‌فرنگی، تنش سرما، اتیلن، بیان ژن، SAM، ACS، ACO

فهرست مطالب

Contents

۱	فصل اول: مقدمه و کلیات.....
۲	۱-۱ مقدمه.....
۴	۲-۱ هدف.....
۵	۳-۱ کلیات.....
۵	۱-۳-۱ خاستگاه.....
۵	۲-۳-۱ ارزش غذایی.....
۶	۳-۳-۱ آمار تولید گوجه‌فرنگی در جهان و ایران.....
۷	۴-۳-۱ گیاهشناسی.....
۸	۵-۳-۱ تنش سرما.....
۸	۶-۳-۱ گونه‌های سازگار به سرما.....
۹	۷-۳-۱ اثر سرما بر مورفولوژی گیاه.....
۱۰	۸-۳-۱ اثرات کلی سرما بر فیزیولوژی گیاه.....
۱۱	۹-۳-۱ سنجش و هدایت سیگنال تنش سرما.....
۱۲	۱۰-۳-۱ پاسخ‌های گیاه به تنش سرما.....
۱۷	۱۱-۳-۱ کنترل پاسخ به سرما توسط هورمون‌های گیاهی.....
۱۷	۱۲-۳-۱ بیولوژی اتیلن.....
۱۸	۱۳-۳-۱ مسیر بیوسنتز اتیلن.....
۲۲	۱۴-۳-۱ مسیر انتقال سیگنال اتیلن.....
۲۳	۱۵-۳-۱ نقش اتیلن در تحمل سرما.....
۲۵	فصل دوم: مرور منابع.....
۲۶	۱-۲ پیشینه پژوهش.....

۲۶	۱-۱-۲ پژوهش‌های انجام شده در زمینه تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها تحت تنش‌های غیر زنده
۳۳	۲-۱-۲ تحقیقات انجام شده در زمینه نقش اتیلن در تحمل به تنش‌های غیر زنده
۳۸	۳-۱-۲ بررسی‌های انجام شده در زمینه بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن تحت تنش‌های غیر زنده
۴۳	فصل سوم: مواد و روش‌ها
۴۴	۳-۱ زمان و محل آزمایش
۴۴	۳-۲ نحوه اجرای آزمایش
۴۴	۳-۳ کاشت مواد گیاهی
۴۵	۳-۵ انتخاب ژن‌ها
۴۶	۳-۶ استخراج RNA کل
۴۷	۳-۷ حذف نمک‌ها
۴۸	۳-۸ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده
۴۹	۳-۹ حذف DNA ژنومی از RNA
۴۹	۳-۱۰ سنتز cDNA
۵۱	۳-۱۱ طراحی پرایمر جهت مطالعه بیان ژن
۵۲	۳-۱۲ بررسی cDNA و پرایمرهای مورد مطالعه
۵۳	۳-۱۳ واکنش qRT-PCR
۵۵	۳-۱۴ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم کاتالاز
۵۷	۳-۱۵ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم گایاکول پراکسیداز
۵۸	۳-۱۶ اندازه‌گیری پرولین
۶۰	۳-۱۷ اندازه‌گیری شاخص مالون دی‌آلدهید
۶۱	۳-۱۸ اندازه‌گیری نشت الکتروولیت
۶۲	۳-۱۹ آنالیز داده‌ها:
۶۳	فصل چهارم: نتایج و بحث
۶۴	۴-۱ آنالیز داده‌های بیوانفورماتیک
۶۷	۴-۲ درخت فیلوژنتیکی
۶۸	۴-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۶۹	۴-۴ بررسی بیان ژن های مسیر بیوستنز اتیلن
۷۹	۴-۵ بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی
۸۲	۴-۶ پرولین
۸۳	۴-۷ اندازه گیری شاخص مالون دی آلدئید (MDA)
۸۴	۴-۸ شاخص نشت الکترولیت
۸۶	۴-۹ ضریب همبستگی بین صفات بررسی شده
۸۹	فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات
۹۰	۵-۱ نتیجه گیری کلی
۹۱	۵-۲ پیشنهادات
۹۲	پیوست ها
۹۶	مراجع

فهرست جداول

- جدول ۳-۱ لیست ترکیبات جهت حذف DNA ژنومی ۴۹
- جدول ۳-۲ لیست ترکیبات مورد استفاده برای ساخت رشته اول cDNA ۵۰
- جدول ۳-۳ برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای ساخت رشته اول cDNA ۵۰
- جدول ۳-۴ لیست ژن‌ها و پرایمرهای بررسی شده در این تحقیق ۵۱
- جدول ۳-۵ ترکیبات واکنش PCR ۵۲
- جدول ۳-۶ چرخه دمایی واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) ۵۳
- جدول ۳-۷ لیست ترکیبات مواد برای واکنش qRT-PCR ۵۴
- جدول ۳-۸ سیکل دمایی برای واکنش qRT-PCR ۵۴
- جدول ۴-۱ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن ۶۶
- جدول ۴-۲ ضریب همبستگی بین صفات بررسی شده ۸۶

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ مناطق زیر کشت و میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران..... ۶
- شکل ۲-۱ ده کشور اول تولیدکننده گوجه‌فرنگی در جهان..... ۶
- شکل ۳-۱ مسیر بیوسنتز اتیلن در گیاه گوجه‌فرنگی..... ۱۹
- شکل ۱-۳ منحنی استاندارد پرولین..... ۶۰
- شکل ۱-۴ درخت فیلوژنتیکی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن در گیاه گوجه‌فرنگی..... ۶۸
- شکل ۲-۴ تعیین کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و عکسبرداری با دستگاه ژل-
داک..... ۶۹
- شکل ۳-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۴، ۲۵ و ۱۰ درجه سانتی-
گراد..... ۷۰
- شکل ۴-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM2 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۴، ۲۵ و ۱۰ درجه
سانتی‌گراد..... ۷۱
- شکل ۵-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM3 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۴، ۲۵ و ۱۰ درجه سانتی-
گراد..... ۷۲
- شکل ۶-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM4 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۴، ۲۵ و ۱۰ درجه
سانتی‌گراد..... ۷۳
- شکل ۷-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM5 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-
گراد..... ۷۴
- شکل ۸-۴ نمودار بیان نسبی ژن ACS1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-
گراد..... ۷۶
- شکل ۹-۴ نمودار بیان نسبی ژن ACO1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه
سانتی‌گراد..... ۷۷
- شکل ۱۰-۴ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-
گراد..... ۷۹

شکل ۴-۱۱ میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد..... ۸۱

شکل ۴-۱۲ میزان پرولین در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-گراد..... ۸۲

شکل ۴-۱۳ میزان MDA در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-گراد..... ۸۳

شکل ۴-۱۴ درصد نشت الکترولیت در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی-گراد..... ۸۵

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicom*) متعلق به خانواده *Solanaceae* و یکی از پر مصرف‌ترین سبزیجات در جهان بعد از سیب‌زمینی است (Bergougnoux, 2014). گوجه‌فرنگی بومی نواحی آند آمریکای جنوبی شامل قسمت‌هایی از شیلی، اکوادور و پرو است (Bai and Lindhout, 2007).

گوجه‌فرنگی با تولید جهانی ۱۷۰/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۴، هفتمین محصول زراعی بسیار مهم است. همچنین ایران با حدود شش میلیون تن تولید گوجه‌فرنگی بعد از ترکیه و مصر در رتبه ششم جهان قرار دارد^۱. متوسط عملکرد گوجه‌فرنگی در ایران حدود ۳۷ تن در هکتار است، که با اصلاح و به کارگیری روش‌های جدید می‌توان به عملکرد جهانی نزدیک شد.

واضح است که عملکرد گوجه‌فرنگی یک صفت منفرد و جدا نیست و با عواملی که بر رشد کلی گیاه تاثیر گذار هستند، همبستگی دارد (Bergougnoux, 2014). دما یکی از آن عواملی است که عمیقاً بر متابولیسم گیاهان تاثیر می‌گذارد و بنابراین یک عامل کلیدی برای تعیین فصل رشد و توزیع جغرافیایی گیاهان است (Chinnusamy et al, 2010). از آنجایی که گوجه‌فرنگی بومی مناطق گرمسیری بوده، به شدت به دمای پایین حساس است و بنابراین در دماهای بین ۰ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد به علت بروز تنش سرمایی آسیب می‌بیند (Ding et al, 2017; Liu et al, 2012). آسیب‌های سرمایی متناسب با مدت زمان و دمای تنش سرمایی و مرحله رشدی گیاه، به صورت عدم جوانه‌زنی بذر، کاهش رشد رویشی، کاهش میوه‌بندی و ... بروز می‌کند (Elizondo and Oyanedel, 2010; Weiss and Egea- Cortines, 2009).

^۱<http://faostat3.fao.org/download>

گیاهان برای مقابله با شرایط نامساعد محیطی از جمله دمای پایین، چندین راهکار را توسعه داده‌اند (Ding et al, 2017). یک پاسخ عمده به تنش سرما تغییر بیان ژن است (Ma et al, 2018). ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش سرما (COR^1) به دو گروه مجزا تقسیم می‌شوند: گروه اول ژن‌هایی که در مسیرهای سیگنالینگ و تنظیمی دخالت دارند و گروه دوم ژن‌هایی هستند که آنزیم‌های مسئول کاهش آسیب‌های ناشی از تنش را رمزگذاری می‌کنند (Chen et al, 2015; Gerszberg et al, 2015).

همچنین شبکه نظارتی پیچیده‌ی گیاهان برای سازگاری با تنش‌های غیر زنده، سیگنال‌هایی را دریافت و منتقل می‌کند، که بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به تنش را تنظیم می‌کند؛ اتیلن در تنظیم سیگنالینگ و تحمل به تنش نقش دارد (Yu et al, 2018). اتیلن، یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی است، که مسیرهای فیزیولوژیکی متعددی را کنترل می‌کند (Abiri et al, 2017). همچنین تولید اتیلن به وسیله سیگنال‌های داخلی در پاسخ به محرک‌های محیطی مثل تنش‌های زنده و غیر زنده از جمله تنش دمای پایین و سرمازدگی، افزایش می‌یابد (Depaepe and Van Der Straeten, 2014).

S. habrochaites و *S. lycopersicum* دو گونه گوجه‌فرنگی هستند که دارای ارتباط نزدیکی با یکدیگر هستند، اما ظرفیت تحمل به سرمای متفاوتی دارند (Chen et al, 2015). رشد و نمو گوجه‌فرنگی‌های زراعی (*S. lycopersicum*) شدیداً تحت اثر مخرب تنش سرما قرار می‌گیرد (Ma et al, 2018)؛ در حالی که صفت مقاومت به سرما در گونه‌ی وحشی *S. habrochaites* LA1777 شناسایی شده است (Elizondo and Oyanedel, 2010).

اصلاح‌گران علاقه‌مندند تا درک خویش از مکانیسم‌های پیام‌رسانی که سیگنال‌های تنش را انتقال می‌دهند تا واکنش‌های سازگاری را آغاز کنند، افزایش دهند و از این رو با استفاده از این اطلاعات جدید، گیاهان مقاوم به تنش‌های غیر زنده را مهندسی کنند (Yu et al, 2018). به‌علاوه، گوجه‌فرنگی متعلق

¹ Cold Regulated Genes

به خانواده بسیار بزرگ *Solanaceae* است و ارتباط نزدیکی با بسیاری از گیاهان مهم اقتصادی از جمله سیب‌زمینی، بادمجان، فلفل، تنباکو و اطلسی دارد. دانش حاصل از مطالعات انجام شده روی گوجه‌فرنگی به راحتی می‌تواند در این گیاهان نیز به کار گرفته شود (Kimura and Sinha, 2008).

۲-۱ هدف

دمای پایین یک عامل محیطی بسیار مهم است که تولید محصولات کشاورزی، توزیع جغرافیایی و رشد و نمو بسیاری از گیاهان را محدود می‌کند. طی جوانه‌زنی بذر و مراحل اولیه رشد گیاه، سرما می‌تواند به صورت قابل توجهی تولید محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار دهد و از طریق آسیب به پایداری غشا، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تخریب پروتئین‌ها و تجمع ترکیبات سمی، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در گیاه ایجاد کند. گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین محصولات اقتصادی است که در سراسر جهان کشت و مصرف می‌شود. مانند سایر گیاهان گرمسیری، گوجه‌فرنگی نیز به تنش سرما حساس است و به راحتی در دماهای زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد آسیب می‌بیند (Chen et al, 2015). تنظیم بیان ژن یکی از مکانیسم‌های به کار گرفته شده توسط گیاهان برای پاسخ به تنش سرما است. همچنین اتیلن یک هورمون گیاهی است که در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهان از جمله پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده تاثیرگذار است. اگرچه شرایط محیطی در ایران برای کشت گوجه‌فرنگی مناسب به نظر می‌رسد، تنش سرما معمولاً در مراحل اولیه فصل رشد رخ می‌دهد و سبب به تاخیر افتادن فرآیند برداشت و در صورت تشدید شرایط تنش حتی باعث از بین رفتن این گیاه نیز می‌شود (Ghanbari and Sayyari, 2018). از این رو درک پاسخ‌های این گیاه به تنش برای توسعه محصولات مقاوم به شرایط نامساعد امری ضروری است. رویکرد معمول برای مطالعه تنش‌های غیر زنده در محصولات، مقایسه گیاهان تحت تنش‌های مختلف با شرایط بهینه و راهکار دیگر مقایسه ژنوتیپ‌های متفاوت (مقاوم در برابر حساس) است (Sant'Ana and Lefsurd, 2018). بر این اساس در این پژوهش تغییرات ناشی از اثر تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز و سیگنالینگ

اتیلن، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی و پایداری غشا در دو ژنوتیپ مقاوم (LA1777) *S. habrochaites* و حساس (*S. lycopersicum* cv. MoneyMaker) گوجه‌فرنگی بررسی شد.

۱-۳-۳ کلیات

۱-۳-۱-۱ خاستگاه

گونه‌های وحشی گوجه‌فرنگی بومی جنوب غربی آمریکا، در امتداد ارتفاعات آند و سواحل اکوادور مرکزی تا پرو، شمال شیلی و جزیره گالاپاگوس است (Bergougnoux, 2013). اگرچه گوجه‌فرنگی منشأ آندی دارد، اما در مکزیک اهلی شده است و در قرن ۱۶ میلادی به اروپا وارد شد (Medina et al, 2017). به نظر می‌رسد که در نظر گرفتن *S. Lycopersicum cerasiforme* به عنوان جد گوجه-فرنگی‌های زراعی به علت وفور آن در آمریکای مرکزی امری توجیه‌پذیر باشد؛ با این حال، مطالعات ژنتیکی گسترده اخیر نشان دادند که نزدیکترین خویشاوند گوجه‌فرنگی *Solanum pimpinellifolium* است (Bai and Lindhout, 2007).

۱-۳-۲ ارزش غذایی

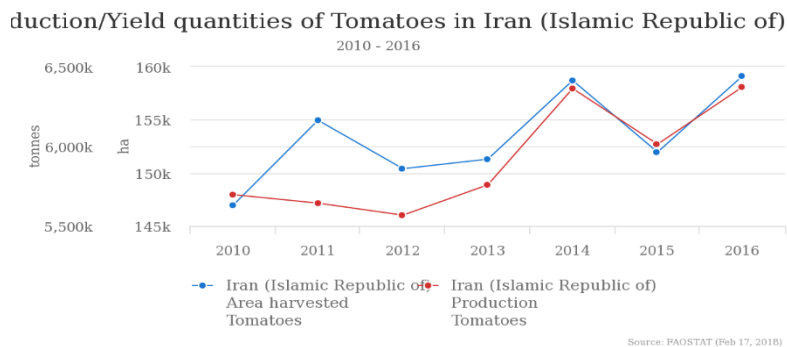
گوجه‌فرنگی یکی از محصولات غذایی عمده در سراسر جهان است که یکی از منابع اصلی مواد مغذی چون کارتنوئیدها، اسید آسکوربیک^۱ (ویتامین C)، ویتامین A، ویتامین E، فلاونوئیدها، آلفاتوکوفرول، پتاسیم و آهن محسوب می‌گردد (Erba et al, 2013). گوجه‌فرنگی حاوی چهار کارتنوئید اصلی از جمله آلفا و بتا کاروتن، لوتئین و به ویژه لیکوپن است. تصور بر این است که لیکوپن بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در بین سایر کارتنوئیدها دارد و می‌تواند رادیکال‌های آزادی را که به سلول‌های بدن آسیب می‌رسانند، خنثی کند. گوجه‌فرنگی یک منبع غنی لیکوپن است که استفاده از آن می‌تواند

¹ Ascorbic acid

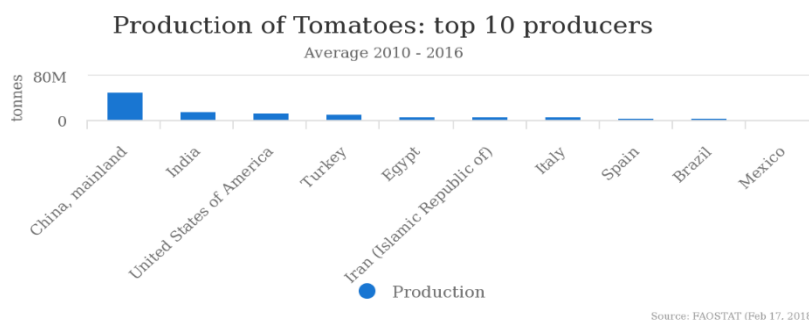
خطر بروز امراضی مثل سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و... را کاهش دهد (Bhowmik et al, 2012).

۳-۳-۱ آمار تولید گوجه‌فرنگی در جهان و ایران

در سال ۲۰۱۶ تولید جهانی گوجه‌فرنگی، ۱۷۶ میلیون تن بود که از این میزان ۵۷/۳ درصد آن در آسیا تولید شده است. در همین سال، سهم ایران از تولید جهانی با حدود ۱۸۰ هزار هکتار سطح زیر کشت، ۶/۵ میلیون تن بوده است (شکل ۱-۱). همچنین ایران، در بین ۱۰ کشور اول تولیدکننده گوجه‌فرنگی، رتبه ششم را بعد از ترکیه و مصر، به خود اختصاص داده است (شکل ۲-۱) (FAOSTAT, Feb 17, 2018).



شکل ۱-۱ مناطق زیر کشت و میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران



شکل ۲-۱ ده کشور اول تولیدکننده گوجه‌فرنگی در جهان

۱-۳-۴ گیاه‌شناسی

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicom* متعلق به خانواده *Solanaceae* است. گوجه-فرنگی یک گیاه دولپه‌ای دیپلوئید ($2n=24$)، چندساله و با عمر کوتاه است که برای برداشت میوه به صورت یک‌ساله کشت می‌شود. گیاهی علفی، معمولاً با رشد پراکنده و غیرمنظم، دارای ساقه‌های خشبی به طول ۱ تا ۳ متر و برگ‌های متناوب و مرکب به طول ۱۰ تا ۲۵ سانتی‌متر که شامل ۵ تا ۹ برگچه دنداندار است؛ هم ساقه و هم برگ‌ها دارای کرک‌های متراکم هستند. گل‌آذین گرزب با ۲ تا ۱۲ گل زرد رنگ به عرض ۱ تا ۲ سانتی‌متر و دارای ۵ لبه بر روی جام گل است (Gonzalez et al, 2011). در بین گونه‌های وحشی خودناسازگاری نیز مشاهده می‌شود (Bai and Lindhout, 2007). گوجه‌فرنگی یک گیاه روز خنثی و با عادت رشد سیمپودیال^۱ است (Quinet et al, 2006). همچنین گوجه‌فرنگی دارای ویژگی‌هایی از قبیل توانایی رشد در شرایط مختلف کشت، چرخه عمر نسبتاً کوتاه، ژنوم نسبتاً کوچک (950 Mb)، خودباروری بالا و هموزیگوتی (خودسازگاری)، کنترل آسان گرده‌افشانی و هیبریداسیون و توانایی ازدیاد غیرجنسی از طریق پیوند زدن است (Gerszberg et al, 2015). به علاوه گوجه‌فرنگی دارای صفاتی همچون میوه گوشتی، شاخه سیمپودیال و برگ‌های مرکب است که سایر گیاهان مدل مثل آرابیدوپسیس و برنج فاقد آن هستند. بیشتر این صفات به لحاظ زراعی مهم هستند و نمی‌توانند با استفاده از سایر گیاهان مدل مطالعه شوند. بنابراین با توجه به ویژگی‌های ذکر شده، گیاه گوجه‌فرنگی به صورت گسترده نه تنها به عنوان غذا، بلکه به عنوان یک گیاه مدل تحقیقاتی نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Kimura and Sinha, 2008).

¹ Simpodial

۱-۳-۵ تنش سرما

تنش سرما یکی از تنش‌های غیر زنده نامطلوب است که کشت، رشد، بهره‌وری محصول، بقا و همچنین توزیع جغرافیایی گیاهان را محدود می‌کند و شامل تنش دمای پایین (صفر تا ۱۵ درجه سانتی-گراد) و تنش انجماد (دمای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد) می‌شود (Kazemi-shahandashti and Maali-amiri, 2018). تنش سرما به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم سبب بروز سایر تنش‌های غیر زنده از جمله تنش‌های اکسیداتیو، اسموتیک و کمبود آب (از دست دادن آب سلولی و جلوگیری از جذب آب ناشی از سرما) نیز می‌شود (Chinnusamy et al, 2007). تنش سرما بیشتر گیاهان، به ویژه گیاهان بومی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ذرت، برنج و گوجه‌فرنگی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Janska et al, 2009)؛ به طوری که وقتی دما به زیر ۱۵ درجه سانتی‌گراد برسد، این گیاهان نسبت به سرما آسیب‌پذیر می‌شوند؛ ضمن اینکه با کاهش دما به پایین‌تر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد این گونه‌ها می‌توانند از آسیب‌های غیرقابل برگشتی رنج ببرند (Ruelland et al, 2009). این موضوع یک چالش مهم مدیریتی برای کشاورزی و باغبانی است، چراکه این محصولات معمولاً در مناطقی کشت می‌شوند که نیازهای دمایی گیاه در طول فصل رشد به صورت کامل برآورده نمی‌شود (Eremina et al, 2015).

۱-۳-۶ گونه‌های سازگار به سرما

گونه‌هایی که به وسیله انتخاب طبیعی به محیط‌های سرد سازگار شده‌اند، به منظور بهبود بقای خود در مواجهه با دوره‌های طولانی سرما، دارای یک سری ابزارهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی هستند. معمولاً این گونه‌ها (گیاهان علفی، چمن‌ها، بوته‌ها و درختچه‌های زمینی) کوتاه‌قد هستند، سطح برگ کمی دارند، نسبت ریشه به شاخه بالایی دارند، عادت رشدی آن‌ها از هر گرمایی که در طول روز و شب‌های با سرمای کمتر از زمین ساطع شود، نهایت استفاده را می‌کند. گیاهان سازگار به سرما به رشد

آهسته، فتوسنتز C3 و ذخیره قندها در اندام‌ها و بافت‌های زیرزمینی تمایل دارند. گیاهان سازگار به محیط‌های سرد دارای یک سیستم تنفسی کارآمد هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد، در طول فصل رشد کوتاه ذخایر غذایی‌شان را به سرعت به حرکت درآورند. زمان‌بندی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و نمودی به تنش‌های محیطی تحت کنترل شدید عوامل ژنتیکی می‌باشد.

میزان مقاومت به سرما معمولاً به ترکیبی از حداقل دمایی که گیاه تجربه کرده و مدت زمانی که در معرض تنش سرما بوده است، بستگی دارد. تنوع در این میزان مقاومت می‌تواند به صورت ژنتیکی تعیین شود؛ همچنین می‌تواند توسط مرحله نمودی گیاه و وضعیت فیزیولوژیکی آن در زمان وقوع تنش سرما تحت تاثیر قرار بگیرد (Janska et al, 2009). به هر حال بسیاری از محصولات مهم مثل برنج، ذرت، سویا و گوجه‌فرنگی حساس به سرما هستند و قادر به سازگاری به سرما نیستند (Chinnusamy et al, 2007).

۱-۳-۷ اثر سرما بر مورفولوژی گیاه

هر گیاه، دارای یک مجموعه دمای بهینه، برای رشد و نمو خود است. یک مجموعه خاص از شرایط دمایی بهینه برای یک گیاه ممکن است برای گیاه دیگر تنش‌زا باشد. به هر حال، ظهور علائم آسیب، به حساسیت گیاه نسبت به تنش سرما بستگی دارد و از گیاهی به گیاه دیگر متفاوت است. در حال حاضر دمای بهینه اقتصادی برای کشت و میوه‌دهی گوجه‌فرنگی در گلخانه ۱۹ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد است. کاهش دما به ۱۰ درجه سانتی‌گراد و کمتر از آن، بدین ترتیب رشد و نمو گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد که با کوتاه کردن میانگره‌ها، طول گیاه کاهش می‌یابد، گسترش برگ را به تاخیر می‌اندازد و تعداد و وزن تازه برگ را کاهش می‌دهد؛ این در حالی است که محتوی مواد خشک افزایش می‌یابد و افزایش نشاسته‌ی ذخیره‌ای موجب ضخامت برگ‌ها می‌شود.

آسیب‌های ناشی از سرما ممکن است بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار گرفتن در معرض تنش ظاهر شود. گیاهانی که در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند علائم فنوتیپی مختلفی از خود نشان می‌دهند که شامل پژمردگی و کلروز (زرد شدن برگ‌ها) است که امکان دارد منجر به نکروز (مرگ بافت) نیز بشود. آسیب‌پذیرترین مرحله در چرخه رشد، فاز زایشی است که شامل تشکیل اندام‌های تولیدمثلی، گلدهی، میوه‌دهی و نمو بذر است؛ کاهش عملکرد ناشی از سرما به این دلیل ممکن است اتفاق بیافتد که در اثر تقلیل کمیت و کیفیت دانه‌گرده و کاهش سرعت ظهور خوشه، میوه‌بندی کاهش یافته و تعداد میوه در هر بوته محدود می‌گردد (Ntatsi et al, 2014).

۱-۳-۸ اثرات کلی سرما بر فیزیولوژی گیاه

قرار گرفتن در معرض دمای پایین منجر به از دست دادن آب سلول‌ها و بافت‌ها، اختلال در پایداری پروتئین‌ها یا کمپلکس‌های پروتئینی و همچنین اختلال در تنظیمات متابولیک نیز می‌شود. دماهای پایین‌تر باعث تغییر در فاز لیپیدهای غشای سلولی و سخت شدن آن می‌شود که منجر به اختلال در همه فرآیندهای غشایی (باز شدن کانال‌های یونی، واکنش‌های انتقال الکترون مرتبط با غشا) می‌شود. دماهای پایین همچنین با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^1) همراه است. به طور کلی فعالیت آنزیم‌های هضم‌کننده تحت دماهای پایین کاهش خواهد یافت و سیستم هضم‌کنندگی قادر نخواهد بود تا تشکیل ROSها را به تعادل برساند. علاوه بر این زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست طی سرما بیش از حد کاهش خواهد یافت که منجر به افزایش تشکیل ROSها خواهد شد. تجمع ROSها اثرات زیان-آوری خصوصا بر روی غشاها خواهد داشت و منجر به نشت یونی^۲ خواهد شد؛ به علاوه دماهای پایین

¹ Reactive Oxygen Species

² Ion Leakage

باعث ساخت ساختارهای ثانویه در RNA خواهد شد و بدین ترتیب بر روی بیان ژن اثر می‌گذارد (Ruelland et al, 2009).

۱-۳-۹ هدایت سیگنال تنش سرما

سلول‌های گیاهی می‌توانند تنش سرما را از طریق تغییرات ایجاد شده ناشی از سرما در سیالیت غشا، ترکیب پروتئین و اسیدهای نوکلئیک، غلظت متابولیت‌ها و حالت ردوکس^۱ سلولی احساس کنند. به علت نقش اساسی آن در جدا کردن محیط داخلی از محیط خارجی، غشای پلاسمایی به عنوان محلی برای درک تغییرات دمایی در نظر گرفته شده است (Janska et al, 2009). قرار گرفتن در معرض تنش سرما، طبیعت سیال غشاهای سلولی را کاهش و سخت شدن آن را افزایش می‌دهد. همچنین قرار گرفتن در معرض تنش سرما در گیاهان سبب افزایش سطوح کلسیم سیتوزولی می‌شود. این افزایش در کلسیم از طریق کانال‌های مکانیسم حساس فعال شده به وسیله سخت شدن غشا یا کانال‌های کلسیم فعال شده از طریق لیگاند، میانجگری می‌شود. تغییر در سطوح کلسیم سیتوزولی از طریق پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم درک می‌شود. این پروتئین‌ها فعالیت آنزیمی ندارند اما تغییرات را به شیوه‌ای وابسته به کلسیم انجام می‌دهند. تغییر در پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم سبب می‌شود که آن‌ها با سایر پروتئین‌ها ارتباط پیدا کنند و اغلب وقایع پشت سر هم^۲ فسفریلاسیون را آغاز کنند. از طریق این وقایع، سلول‌های گیاهی می‌توانند ژن‌های اصلی پاسخگو به تنش یا عوامل رونویسی^۳ را هدف قرار دهند؛ عوامل رونویسی نیز بیان و عملکرد ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. سطوح بالاتر کلسیم در سیتوزول منجر به تقویت سیگنال از طریق فسفولیپیدها می‌شود. مولکول‌های لیپید نیز در هدایت سیگنال طی تنش سرما بسیار مهم هستند؛ اگرچه سیگنالینگ لیپید نسبتاً کمتر مطالعه شده است. سیگنال‌های

¹ Redox State

² Cascade

³ Transcription Factors

ثانویه مثل ABA¹ و ROS همچنین می‌تواند اثر کلسیم را ایجاد کنند که بر سیگنالینگ سرما تاثیرگذار است. ROSها در سلول‌های درگیر با تنش‌های غیر زنده مختلف، تجمع می‌یابند و به نظر می‌رسد که به شدت بر تنظیم بیان ژن تحت اثر سرما تاثیر گذارند. در کنار تاثیرشان بر روی اثرات کلسیم، سیگنال-های ROS همچنین می‌توانند تاثیر خود را به صورت مستقیم از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های پاسخگو به ردوکس مثل عوامل رونویسی و پروتئین کینازها اعمال کنند. تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما در ابتدا به وسیله گیرنده‌های حاضر در غشای سلولی گیاهی دریافت می‌شوند. سپس سیگنال به پایین دست هدایت می‌شود و مسیرهای سیگنالینگ بسیاری را فعال می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که چنین مسیرهایی غالباً به صورت هماهنگ فعال می‌شوند. در نهایت سیگنال تنش سرما منجر به تغییر در بیان ژن‌های تنظیم شده به وسیله سرما می‌شود و سطوح بیان این ژن‌ها، سرنوشت گیاه تحت تنش را مشخص می‌کند. تغییر بیان ژن که به وسیله مکانیسم وقایع پشت سر هم سیگنال اداره می‌شود، در ژن‌هایی که در تشکیل هورمون‌های گیاهی مثل ABA، سالیسیلیک اسید و اتیلن مشارکت دارند نیز، تغییراتی را ایجاد می‌کند. این هورمون‌ها ممکن است همان Cascadeها را تقویت کنند یا ممکن است یک مسیر سیگنالینگ جدید را آغاز کنند (Sudesh kumar Yadav, 2010; Chinnusamy et al, 2007).

۱-۳-۱۰ پاسخ‌های گیاه به تنش سرما

وقتی گیاهان در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند، در سطوح سلولی اختلالاتی از قبیل تخریب غشا، تولید بیش از حد ROSها، تغییر ماهیت پروتئین، تجمع محصولات سمی و ... رخ می‌دهد. گیاهان سعی می‌کنند تا به وسیله تغییر بیان ژن، اصلاح ترکیب غشا، تولید املاح سازگار و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

¹ Abscisic acid

که در محافظت از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از سرما نقش دارند، به این تنش واکنش نشان دهند (Maleki and Ghorbanpour, 2018).

۱-۳-۱۰-۱ عوامل رونویسی دخیل در تنش سرما

وقتی گیاهان در معرض دماهای پایین قرار می‌گیرند با تغییر بیان ژن به تنش سرما واکنش نشان می‌دهند. این ژن‌ها پروتئین‌هایی را رمزگذاری می‌کنند که در تحمل به سرما دخیل هستند. مسیرهای تنظیمی مختلفی برای ایجاد تحمل به سرما در گیاهان وجود دارد که مسیر پاسخ به سرمای عوامل متصل‌شونده به تکرار C (CBFs^۱) که به عنوان پروتئین متصل‌شونده به عنصر پاسخگو به از دست رفتن آب (DREB1^۲) نیز شناخته می‌شوند، در حال حاضر بهترین سیستم ژنتیکی ثبت شده است. CBF/DREB1 گروهی از عوامل رونویسی مختص گیاهان و متعلق به خانواده عوامل رونویسی^۳ AP2 هستند (Ebrahimi et al, 2016). ICE1^۴ از جمله عوامل رونویسی است که از طریق تنظیم مسیر CBFs، سیگنالینگ سرما را کنترل می‌کنند (Miura and Furumoto, 2013). CBFs از طریق اتصال به سیس-المنت CRT/DRE^۵ در پروموتور ژن‌های COR بیان این ژن‌ها را فعال می‌کند. بیان ژن‌های COR هم برای تحمل سرما و هم برای سازگاری به سرما در گیاهان حیاتی است (Yamaguchi-shinozaki and Shinozaki, 2006). CBFs بیان ژن‌های دخیل در رونویسی، سمیت‌زدایی ROS، انتقال غشایی، متابولیسم و سیگنالینگ هورمون‌ها و بسیاری از موارد شناخته شده یا مواردی که فرض می‌شود دارای عملکردهای محافظت از سلول هستند، را تنظیم می‌کند. تقریباً ۱۲٪ ژن‌های COR در

¹ C-repeat Binding Factors

² Dehydration-Responsive Element-Binding protein 1

³ APETALA2

⁴ Inducer of CBF Expression 1

⁵ C-Repeat/Dehydration Responsive Element

آرابیدوپسیس به وسیله CBFs کنترل می‌شود. گوجه‌فرنگی نیز یک مسیر پاسخ به سرمای CBFs دارد اما رگولون‌های^۱ CBFs آن با آرابیدوپسیس متفاوت است و به نظر می‌رسد به صورت قابل توجهی کوچکتر و تنوع عملکرد آن کمتر باشد. در گوجه‌فرنگی مسیر پاسخ به سرمای CBFs به اندازه گیاهان سازگار به سرما اهمیت ندارد (Liu et al, 2012).

۱-۳-۱۰-۲ تغییرات ترکیب غشا

وقتی گیاهان در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند سعی می‌کنند ترکیب لیپیدهای غشای پلاسمایی را تغییر دهند. این تغییرات ممکن است از آسیب‌های سرمایی وارده به غشای پلاسمایی جلوگیری کنند (Maleki and Ghorbanpour, 2018). در آرابیدوپسیس نسبت فسفولیپیدهای مختلف طی سازگاری به سرما کمی متفاوت است. یک اثر کلی سرما بر غشا، افزایش فسفولیپیدهای غیر اشباع است که در غشای پلاسمایی توت، تونوپلاست گیاه CAM کالانکوته و غشای میتوکندریایی آرابیدوپسیس و سویا نیز مشاهده شده است. یکی از اهداف افزایش فسفولیپیدهای غیر اشباع ممکن است مقابله با سخت شدن غشا ناشی از سرما باشد زیرا لیپیدهای غیر اشباع سبب سیال‌تر شدن غشا می‌شوند (Ruelland et al, 2009). همچنین تجمع ROSها موجب آسیب به غشا از طریق پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در مورد اسیدهای چرب غیر اشباع پراکسیداسیون باعث تولید مالون‌دی‌آلدهید (MDA^۲) می‌شود که می‌تواند به پروتئین‌ها آسیب برساند و شاخصی برای تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد (Distelbarth et al, 2012).

¹ Regulons

² Malondialdehyde

۱-۳-۱۰-۳-۱ املاح سازگار^۱

املاح سازگار مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم هستند که در پاسخ به بسیاری از تنش‌ها از قبیل اسمزی، خشکی و دمای پایین تولید می‌شوند. به لحاظ فیزیولوژیکی، املاح سازگار حتی در غلظت‌های بسیار زیاد نیز اثرات متابولیکی نامطلوب ندارند.

۱-۳-۱۰-۳-۱ پرولین^۲

پرولین یکی از املاح سازگار است که تحت تنش سرما به شدت تجمع می‌یابد. برای مثال در آرابیدوپسیس پس از ۴ ساعت قرار گرفتن در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مقدار پرولین بیش از دو برابر افزایش پیدا کرد و پس از ۹۶ ساعت این مقدار به طور چشمگیری تا ۱۳۰ برابر افزایش یافت. تجمع پرولین در گونه‌های مقاوم به سرما بیشتر است و یک رابطه مثبت بین تجمع پرولین و مقاومت به سرما در گیاهان وجود دارد. پرولین در محافظت از آنزیم‌ها در برابر تغییر ماهیت^۳ و تثبیت دستگاه‌های سنتز پروتئین، تنظیم اسیدپتید سیترولوی، افزایش ظرفیت اتصال به آب و فعالیت به عنوان منبع ذخیره کردن کربن و نیتروژن نقش دارد (khan et al, 2015).

۱-۳-۱۰-۳-۱ پلی آمین^۴

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که پلی آمین‌ها در تنظیم تحمل گیاه به تنش‌های زنده و غیر زنده دخالت دارند. پلی آمین‌ها با حفاظت از فعالیت‌های فتوسنتزی در تحمل سرما و کاهش اثرات تنش‌های اکسیداتیو نقش دارند. در مطالعه انجام شده روی گوجه‌فرنگی، در گیاهان تیمار شده با سرما، جلوگیری

¹ Compatible Solutes

² Proline

³ Denaturation

⁴ Polyamine

از سنتز پلی آمین منجر به افزایش آسیب‌های اکسیداتیو مثل نشت الکترولیت^۱ شد. یکی از پیش‌ماده‌های اصلی در مسیر بیوسنتز پلی آمین، s-آدنوزیل متیونین (S-AdoMet) است که طی یک سری واکنش‌های بیوشیمیایی به پوترسین^۲، اسپرمیدین^۳ و اسپرمین^۴ تبدیل می‌شود (Alcazar et al, 2010).

۱-۳-۱۰-۴ سیستم‌های آنزیمی هضم‌کننده ROS

در دمای پایین سیستم‌های آنزیمی که به صورت عادی ROSها را از بین می‌برند، عملکردشان کاهش خواهد یافت (به لحاظ ترمودینامیکی دمای پایین فعالیت آنزیم‌ها را کاهش می‌دهد) و ROSها در سرما انباشته می‌شوند. برای متعادل کردن تولید ROSها گیاهانی که در دمای پایین قرار گرفته‌اند، سیستم‌های هضم‌کننده را تحریک و فعال می‌کنند. کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به وسیله سرما تحریک می‌شوند. بین مقاومت به سرما و فعالیت سیستم‌های هضم‌کننده ROS یک همبستگی می‌تواند وجود داشته باشد. برای مثال در تحقیقی که روی دو رقم حساس و مقاوم برنج تحت تنش سرما ۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد، نتایج نشان داد که در گونه مقاوم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) و همچنین مقدار آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (اسید آسکوربیک) افزایش پیدا کردند؛ اما در گونه حساس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقدار آنتی-اکسیدان‌های غیرآنزیمی، بعد از تیمار سرمایی کاهش یافت. به طور کلی فعالیت کاتالاز بعد از تیمار سرمایی افزایش یافت این در حالی است که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بین گونه‌ها به شدت متفاوت است (Maleki and Ghorbanpour, 2018; Ruelland et al, 2009).

¹ Electrolyte Leakage

² Putrescine

³ Spermidine

⁴ Spermine

۱-۳-۱۱ کنترل پاسخ به سرما توسط هورمون‌های گیاهی

سیگنال‌های داخلی و مولکول‌های تنظیمی بسیار وجود دارد که می‌تواند بر رشد و نمو و فیزیولوژی گیاهان تاثیرگذار باشند؛ هورمون‌ها ترکیبات با وزن مولکولی کم هستند که به صورت ویژه برای سیگنالینگ تولید می‌شوند. آن‌ها اغلب از محل سنتز به محل‌های فعالیت خود منتقل می‌شوند و در غلظت‌های بسیار پایین عمل می‌کنند (Ciura and Kruk, 2018). راهکارهایی که توسط گیاهان برای مقابله با اثرات مضر تنش‌های غیر زنده از جمله تنش سرما به کار گرفته می‌شود به تنظیم مسیرهای پیچیده سیگنال‌های مولکولی نیاز دارد (Klay et al, 2018). در این وقایع پشت سر هم هدایت سیگنال، هورمون‌های گیاهی به عنوان بخشی از شبکه سیگنال به صورت ادغام‌کننده مرکزی عمل کرده تا تغییراتی را در بیان ژن‌های پاسخگو به سرما ایجاد کنند (Peleg and Blumwald, 2011; Muller and Munne-Bosch, 2018) و در نتیجه مسیرهای پاسخ به تنش منجر به مقاومت را فعال و فرآیندهای سلولی را اصلاح کنند (Eremina et al, 2015). اتیلن، یک هورمون گیاهی شناخته شده است که نقش‌های تنظیمی مهمی را در رشد و نمو و همچنین در پاسخ به تنش‌های زنده (پاتوژن‌ها) و غیر زنده (خشکی، شوری، سرما و ...) بازی می‌کند (Muller and Munne-Bosch, 2018) و تولید آن نیز به شدت توسط سیگنال‌های داخلی تنظیم می‌شود (Wang et al, 2002).

۱-۳-۱۲ بیولوژی اتیلن

اتیلن یک هورمون گیاهی با ساختار بسیار ساده دو کربنی (C_2H_4) است که بسیاری از جنبه‌های رشدی و نموی گیاه مثل جوانه‌زنی بذر، رشد رویشی، تمایز گل، تعیین جنسیت، رسیدن میوه، پیر شدن اندام‌ها، ریزش اندام‌ها و ... را تنظیم می‌کند. همچنین در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده مختلف از جمله تنش سرما نیز نقش دارد (Yin-hua et al, 2006; G.Eric Schaller, 2012). اتیلن یک هورمون گیاهی گازی شکل است که می‌تواند آزادانه بین غشاها نفوذ کند. تصور بر این است که بر خلاف سایر

هورمون‌های گیاهی، در نزدیکی و یا در همان محل فعالیت خود، سنتز می‌شود. تقریباً همه بافت‌های گیاهی قادر به سنتز اتیلن هستند اما سطح اتیلن عموماً پایین نگه داشته می‌شود و به مرحله نمو، نوع بافت، شرایط رشد و گونه گیاهی بستگی دارد (Wang et al, 2017).

۱-۳-۱ مسیر بیوسنتز اتیلن

بیوسنتز اتیلن از یک مسیر متابولیکی نسبتاً ساده تشکیل شده است (شکل ۱-۳). پیش‌ماده بیولوژیکی سنتز اتیلن، اسید آمینه متیونین (Met^1) است. در ابتدا، Met^1 از طریق آنزیم s-آدنوزیل متیونین سنتتاز (SAM^2) به s-آدنوزیل متیونین (S-AdoMet^3) تبدیل می‌شود. سپس ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC^4) و ۵-متیل تیو آدنوزین (MTA^5) به وسیله آنزیم ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید سنتتاز (ACS^6) از SAM^3 ساخته شود. در انتها و در حضور اکسیژن، ACC^4 از طریق آنزیم ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید اکسیداز (ACO^7) به اتیلن، دی‌اکسید کربن و سیانید^۸ تبدیل می‌شود (Yang and Hoffman, 1984).

¹ Methionine

² S-Adenosyl Methionine synthetase

³ S-Adenosyl Methionine

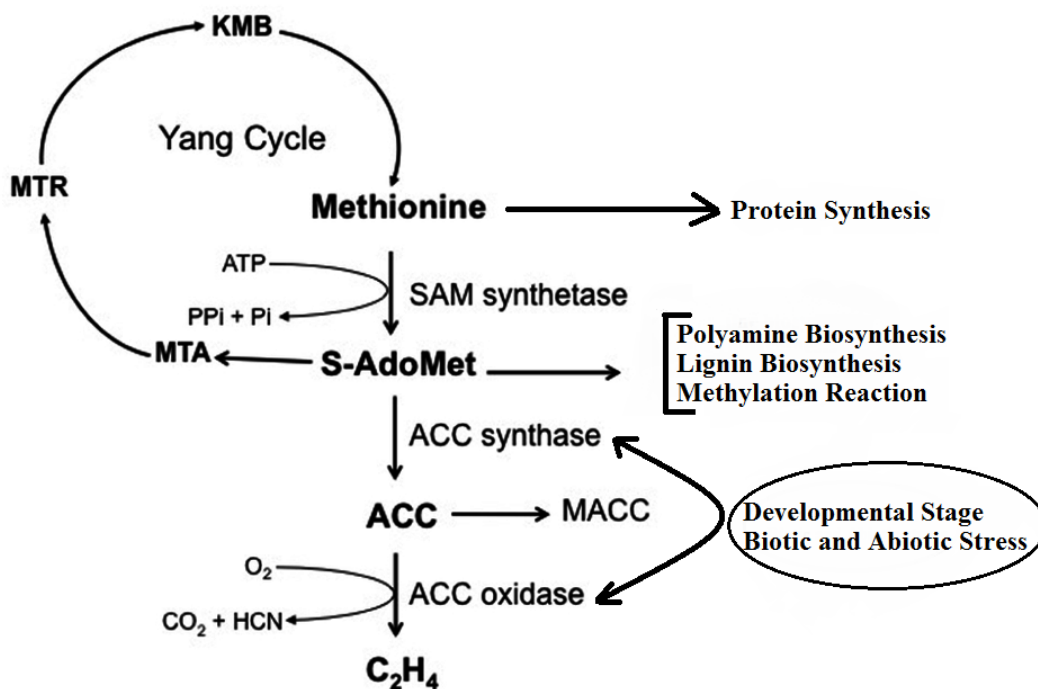
⁴ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid

⁵ 5'-Methylthioadenosine

⁶ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid synthase

⁷ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid oxidase

⁸ Cyanide



شکل ۱-۳ مسیر بیوسنتز اتیلن در گیاه گوجه‌فرنگی

یکی از محصولات جانبی چرخه بیوسنتز اتیلن، MTA، به وسیله یک سری واکنش‌های آنزیمی - که چرخه یانگ نامیده می‌شود- بازیافت می‌شود و یک مخزن ثابت Met را ایجاد می‌کند. به این ترتیب بدون تخلیه منبع ذخیره Met، نرخ بالای سنتز اتیلن می‌تواند اتفاق بیوفتد. همچنین سیانید نیز به صورت بتا-سیانوآلانین^۱ و بتا-سیانوآلانین سنتاز^۲ سمیت‌زدایی می‌شود تا از سمیت سیانید انباشته شده طی سنتز اتیلن با نرخ بالا، جلوگیری شود. مرحله Rate-limiting در سنتز اتیلن تبدیل S-AdoMet به ACC به وسیله ACS است (Booker and Delong, 2015).

^۱ β - cyanoalanine

^۲ β - cyanoalanine synthase

۱-۳-۳-۱ آنزیم SAM

متیونین یک اسیدآمینو ضروری برای سنتز پروتئین است. نزدیک به ۸۰٪ Met سلولی به وسیله آنزیم SAM و با صرف ATP به S-AdoMet تبدیل می‌شود. S-AdoMet یک دهنده عمده گروه متیل در گیاهان است و به عنوان پیش‌ماده بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی شامل بیوسنتز پلی‌آمین و اتیلن استفاده می‌شود. به علاوه S-AdoMet در واکنش‌های متیلاسیون^۱ نیز دخیل است که لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را اصلاح می‌کند. بنابراین سطوح آن باید به وسیله فعالیت کافی آنزیم SAM نگه‌داری شود. بدین ترتیب S-AdoMet نقش مهمی در تنظیم نمو گیاه، تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده و تجمع متابولیت‌ها بازی می‌کند. براساس وظایف مهم S-AdoMet می‌توان انتظار داشت که آنزیم SAM نقشی حیاتی در تحمل گیاهان به تنش بازی کند (Sanja Roje, 2006).

۱-۳-۳-۲ آنزیم ACS

ACS متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌ها است که به عنوان آنزیم‌های وابسته به (PLP) شناخته می‌شود. پیرودوکسال^۲ یا ۵-فسفات^۲ PLP یک کوفاکتور ضروری برای فعالیت ACS است که در سایت فعال آنزیم‌های غیرلیگاندی از قبل متصل شده است. این آنزیم‌ها در ترنس‌آمینوسیون^۳ (انتقال گروه آمین از یک مولکول به مولکول دیگر به ویژه از یک آمینواسید به یک کتواسید)، دی‌آمینوسیون^۴ (حذف گروه آمین از یک اسیدآمینو)، کربوکسیلاسیون و حذف و جابه‌جایی کربن β و γ در اسیدآمینوهای مختلف دخیل هستند. ACS، AdoMet را از طریق واکنش حذف کربن β و γ به ACC تبدیل می‌کند

¹ Methylation

² Pyridoxal-5'-Phosphate

³ Transamination

⁴ Deamination

(Argueso et al, 2007). ACS به وسیله یک خانواده چند ژنی (۱۰ ژن در آرآبیدوپسیس و ۹ ژن در گوجه‌فرنگی) رمزگذاری می‌شود، که بیان ژن‌های ACS به شدت از طریق سیگنال‌های مختلف در سطح رونویسی^۱ و بعد از رونویسی^۲ کنترل تنظیم می‌شود (Depaepe and Van Der Straeten, 2014). بیان ژن ACS1 چندین سیگنال را تحریک و سایر ژن‌های ACS را فعال می‌کند؛ احتمال دارد که ACS1 به عنوان تنظیم‌کننده فعالیت ACS عمل کند (Wang et al, 2002).

۱-۳-۱۳-۲-۱ تنظیم رونویسی ACS

ژن‌های ACS در سطح رونویسی و بعد از رونویسی در پاسخ به محرک‌های نموی و محیطی تنظیم می‌شود. مطالعه در مورد بیان ژن‌های ACS نشان داد که تمام ژن‌های ACS الگوی بیان مخصوص بافت و یا مرحله رشدی دارند. تنظیم رونویسی ژن‌های ACS یک مکانیسم کلیدی است که بیوسنتز اتیلن را در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده تنظیم می‌کند (Tsuchisaka et al, 2009).

۱-۳-۱۳-۳-۱ آنزیم ACO

آنزیم‌هایی از گروه ACO قادر هستند تا واکنش‌های متنوعی مثل هیدروکسیلاسیون^۳، بستن حلقه اکسیداتیو^۴ و غیر اشباع‌سازی^۵ را کاتالیز کنند. ACO، از طریق تغییر کربن C-2 و C-3، ACC را به اتیلن، کربن C-1 را به سیانید و گروه کربوکسیل را به CO₂ تبدیل می‌کند (Argueso et al, 2007). مشابه آنزیم ACS، آنزیم ACO نیز به وسیله یک خانواده چند ژنی (۵ ژن در آرآبیدوپسیس و گوجه‌فرنگی) رمزگذاری می‌شود، که در پاسخ به علائم محیطی و نموی مختلف به صورت متفاوت تنظیم

¹ Transcriptional

² Post transcriptional

³ Hydroxylation

⁴ Oxidative ring closure

⁵ Desaturation

می‌شود. ACO به عنوان یک نقطه کنترل در بیوسنتز اتیلن تحت شرایط خاص نمو و تنش در گیاهان عمل می‌کند (Wang et al, 2017). در گوجه‌فرنگی ۵ عضو^۱ LeACO1، LeACO2، LeACO3، LeACO4 و LeACO5 شناسایی شده‌اند (Yin-hua et al, 2006).

۱-۳-۱۴ مسیر انتقال سیگنال اتیلن

اتیلن یک هورمون گازی شکل با توانایی انتشار در محیط‌های آبی و لیپیدی است، بنابراین بر خلاف سایر هورمون‌های گیاهی لزومی ندارد تا گیرنده‌های آن در غشای پلاسمایی مستقر باشند؛ در حقیقت اتیلن از طریق یک خانواده از گیرنده‌ها که در غشای شبکه آندوپلاسمی قرار دارند، شامل ETR1^۲، ESR1^۳، ETR2، ERS2 و EIN4^۴ دریافت می‌شود و به وسیله یک کوفاکتور مس به گیرنده‌های خود متصل می‌شود (Iqbal et al, 2013). اعتقاد بر این است که زمانی که اتیلن به گیرنده‌های خود متصل می‌شود، کمپلکس گیرنده‌ها دچار تغییرات ساختاری می‌شوند؛ بدین صورت که در حضور اتیلن گیرنده‌ها و CTR1^۵ که از اجزای پایین‌دستی مسیر سیگنالینگ و پاسخ اتیلن است، غیرفعال می‌شوند. CTR1 یک تنظیم‌کننده منفی سیگنالینگ است، در مقابل EIN2، EIN3، EIN5 و EIN6 که در غشای شبکه آندوپلاسمی و در کنار گیرنده‌های اتیلن و CTR1 قرار دارد سیگنالینگ اتیلن را به صورت مثبت تنظیم می‌کنند (Guo and Ecker, 2004; Muller and Munne-Bosch, 2018). آخرین اجزای پایین دست مسیر انتقال سیگنال اتیلن عوامل پاسخ به اتیلن (ERF^۶) هستند این عوامل رونویسی مختص گیاهان و متعلق به خانواده بزرگ عوامل رونویسی AP2/ERF یا APETALA2 هستند که به ناحیه پرموتور

^۱ *Lycopersicon esculentum* ACO1

^۲ Ethylene Response 1

^۳ Ethylene Response Sensor 1

^۴ Ethylene Insensitive 4

^۵ Constitutive Triple Response 1

^۶ Ethylene Response Factors

ژن‌های دفاعی پاسخگو به اتیلن متصل می‌شوند. بنابراین وقایع پشت سر هم رونویسی میانجگری شده به وسیله پروتئین‌های ERF منجر به تنظیم بیان ژن شده که به وسیله اتیلن کنترل می‌شود. ERFها تنظیم‌کننده‌های کلیدی در پاسخ به تنش‌های غیر زنده از جمله تنش سرما هستند (Klay et al, 2018; Guo and Ecker, 2004).

۱-۳-۱۵ نقش اتیلن در تحمل سرما

تنش سرما سطوح اتیلن داخلی را در بسیاری از گونه‌های گیاهی تغییر می‌دهد، بر این اساس بین افزایش سطوح اتیلن و تحمل سرما همبستگی وجود دارد. زمانی که دانه‌های آرابیدوپسیس که در محیط درون شیشه‌ای رشد کرده بودند با ACC تیمار شدند این گیاهان کاهش تحمل به سرما از خود نشان دادند. در حالی که کاربرد آمینواتوکسی وینیل گلایسین (AVG^1) که بازدارنده بیوسنتز ACC است تحمل سرما را افزایش داد. که این نشان‌دهنده اثر منفی اتیلن در تحمل به سرما است. در مقابل مطالعه دیگری اخیراً نشان داده است که کاربرد ACC تحمل سرما را در دانه‌های خاک‌کشت آرابیدوپسیس افزایش می‌دهد (Kemal Kazan, 2015).

۱-متیل سیکلو پروپان ($1-MCP^2$) که بازدارنده بیوسنتز اتیلن است تحمل سرما را در گوجه‌فرنگی کاهش می‌دهد که یک اثر مثبت برای اتیلن در تحمل سرما پیشنهاد می‌کند (Zhao et al, 2009). در مقابل تیمار با AVG تحمل سرما در تنباکو را بالا می‌برد که یک اثر منفی برای اتیلن در تحمل سرما پیشنهاد می‌کند، بنابراین به نظر می‌رسد که نقش اتیلن در تحمل سرما می‌تواند وابسته به گونه باشد (Zhang and Huang, 2010).

¹ Aminoethoxyvinylglycine

² 1-Methycyclopropane

برخی مطالعات نشان داده‌اند که غلظت اتیلن در پاسخ به سرما در گونه‌های گیاهی مختلف از جمله گوجه‌فرنگی افزایش می‌یابد. در آرابیدوپسیس این افزایش میزان اتیلن با افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتزی مرتبط بود. محققان نشان دادند که سطوح اتیلن بعد از تیمار سرمایی در گیاهان آرابیدوپسیس خاک‌کشت به صورت گذرا افزایش یافت که با افزایش گذرا در رونوشت‌های ژن‌های مختلف بیوسنتز اتیلن همراه بود (Catala et al, 2014). نقش مثبت اتیلن در تحمل سرما و تنظیم ژن‌های COR برای گونه‌های گیاهی حساس به سرما نیز پیشنهاد شد. بیان بیش از حد عامل پاسخ به اتیلن گوجه‌فرنگی TERF2/LeERF2 که بیان آن هم ناشی از سرما و هم اتیلن است، بیوسنتز اتیلن را تحریک کرد و تحمل سرما را در گیاهان تراریخته تنباکو، گوجه‌فرنگی و برنج افزایش داد؛ که با القای ژن‌های COR و کاهش مقدار ROSها در این گیاهان همراه بود (Zhang et al, 2009). علاوه بر این کاربرد ACC تحمل سرما را در گوجه‌فرنگی و تنباکو افزایش داد. همچنین یک موتانت غیرحساس به اتیلن گوجه‌فرنگی به سرما بسیار حساس شد. بنابراین از نقش تنظیم‌کننده مثبت اتیلن در پاسخ‌های تنش سرما در این گونه گیاهی حمایت کرد. اگرچه مطالعات دیگری مدارکی را دال بر کاهش میزان اتیلن در پاسخ سرما ارائه کرده‌اند (Eremina et al, 2015). به هر حال بسته به شدت شرایط تنش، اتیلن می‌تواند به عنوان یک تعدیل‌کننده مثبت یا منفی فعالیت کند (Abiri et al, 2017).

فصل دوم: مرور منابع

۱-۲ پیشینه پژوهش

۱-۱-۲ پژوهش‌های انجام شده در زمینه تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها تحت تنش‌های

غیرزنده

Chen و همکاران (2015) در پژوهشی اثر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های ۱ و ۱۲ ساعت در ژنوتیپ‌های مقاوم (*S. habrochaites* LA1777) و حساس (*S. lycopersicum* glamor) گوجه‌فرنگی ۸ هفته‌ای را با استفاده از آنالیز کامل رونوشت‌ها و بررسی تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد تحت تنش سرما نسبت به شرایط نرمال حدود ۲۱٪ و ۲۳٪ از ژن‌ها به ترتیب در گوجه‌فرنگی‌های حساس و گوجه‌فرنگی‌های مقاوم به صورت متفاوت بیان شدند. در این مطالعه، مسیرهای پاسخ به اتیلن و بیوسنتز لیگنین را به عنوان مسیرهای درگیر در مقاومت به سرما معرفی کردند. *S. habrochaites* بعد از ۱۰ روز تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد کمتر از *S. lycopersicum* دچار پژمردگی شدید شد. تنش سرما موجب افزایش معنی‌دار مقادیر MDA، پرولین و فعالیت^۱ POD و^۲ CAT در این گیاهان شد.

Liu و همکاران (2012) به مطالعه اثر دمای پایین در گوجه‌فرنگی پرداختند. آن‌ها گیاهچه‌های ۶ هفته‌ای *S. lycopersicum* LA4024 و *S. habrochaites* LA1777 را به همراه اینبرد لاین حاصل از تلاقی آن‌ها، LA3969، به مدت ۷ روز جهت اعمال تنش سرما در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. LA3969 و والد LA1777 نسبت به والد LA4024 به سرما مقاوم‌تر بودند. تفاوت‌های فیزیولوژیک و بیان ژن سراسری^۳ بین ژنوتیپ‌های مقاوم LA1777 و LA3969 و ژنوتیپ حساس LA4024 تحت

^۱ Peroxidase

^۲ Catalase

^۳ Global Gene Expression

تنش سرما بررسی شد. نتایج آنالیزهای GO¹ نشان داد در حالی که در ژنوتیپ حساس بیشتر فرآیندهای بیولوژیکی به صورت معنی داری به وسیله سرما متوقف می‌شوند، در ژنوتیپ مقاوم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از طریق افزایش بیان ژن‌ها تحت تنش سرما تقویت شدند. گیاهانی که در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند غالباً از آسیب‌های غشایی رنج می‌برند که می‌تواند از طریق نشت الکترولیت و تولید MDA ارزیابی شود. در طول تنش سرما، در همه ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی میزان نشت الکترولیت و مقدار MDA افزایش یافت. اما سطوح نشت الکترولیت و مقدار MDA پس از ۳ روز تنش سرما در دو ژنوتیپ مقاوم به طور قابل توجهی پایین‌تر از ژنوتیپ حساس بود. نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما نسبت به ژنوتیپ حساس به سرما، تحت تنش سرمایی کمتر از آسیب‌های غشایی شدید رنج می‌برد. املاح سازگار مثل پرولین نیز نقش مهمی در تنظیم شرایط اسمزی سلول و حفظ پایداری غشا بازی می‌کنند. بنابراین تفاوت در تجمع پرولین نیز بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس تحت تنش سرما آنالیز شد. در طول تنش سرما مقدار پرولین به صورت پیوسته در LA1777 افزایش یافت. بعد از ۵ روز تیمار سرمایی LA1777 به طور قابل توجهی دارای سطوح پرولین بالاتری نسبت به LA4024 بود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل CAT، POD و SOD² نیز تحت تنش سرما آنالیز شد. بعد از روز سوم تیمار سرمایی، فعالیت POD به میزان قابل توجهی در دو ژنوتیپ مقاوم بالاتر از ژنوتیپ حساس بود. فعالیت CAT بعد از ۵ روز تیمار سرمایی به صورت معنی‌داری در LA1777 نسبت به LA4024 کاهش یافت. اما هیچ تفاوت معنی‌داری بین LA3969 و LA4024 در طول تنش سرما مشاهده نشد. همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری نیز در فعالیت SOD بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم در طول تنش سرما مشاهده نشد.

¹ Gene Ontology

² Superoxide dismutase

Zhang و همکاران (2004) طی تحقیقی مسیر عوامل رونویسی پاسخ‌دهنده به سرمای CBF را در گوجه‌فرنگی بررسی کردند. نتایج نشان داد که مسیر تنظیم CBFs در گوجه‌فرنگی متفاوت از آرابیدوپسیس است. این عوامل در آرابیدوپسیس، بیان ژن‌های هدف که باعث افزایش مقاومت به سرما می‌شوند را افزایش می‌دهند اما برخلاف آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی نمی‌تواند سازش سرمایی را افزایش دهد. البته گوجه‌فرنگی مشابه آرابیدوپسیس سه CBF هومولوگ شامل LeCBF1-3 را در ژنوم خود کد می‌کند که در بین آن‌ها تنها ژن ¹LeCBF1 در مقاومت سرمایی نقش دارد.

Duan و همکاران (2012) دو ژنوتیپ وحشی (L.e cv. Zhongshu6) و تراریخته (T₁) دارای بیان بیش از حد ²LetAPX (گوجه‌فرنگی را در گلخانه پرورش دادند. پس از رشد کامل برگ ششم، گیاهچه‌ها را به مدت ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. در شرایط نرمال رشدی گیاهان T₁ و WT³ نشت یونی مشابهی داشتند اما پس از ۱۲ ساعت تنش سرما نشت یونی در گونه WT، ۷۵٪ و در T₁، ۶۲٪ افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده این بود که آسیب غشا تحت تنش سرما در گیاهان WT جدی‌تر از گیاهان T₁ بود. تولید MDA نیز به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید غشا در نظر گرفته شد که سطوح MDA تا ۱۰۱٪ در WT و ۶۳٪ در T₁ افزایش یافت.

به منظور درک بهتر پاسخ‌های تنش سرما در تنباکو (*Nicotiana tabacum*)، نرخ رشد و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های ۴ برگی دو رقم تنباکو MSK326 (واريته حساس به سرما) و HHDJY (واريته مقاوم به سرما) در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ و ۴ روز توسط Xu و همکاران (2010) مطالعه شد. در این مطالعه مشخص شد که رشد شاخه‌ها راحت‌تر از رشد ریشه‌ها تحت تاثیر تنش سرما قرار می‌گیرد. غلظت MDA در هر دو واريته تحت تنش سرما افزایش یافت. در فعاليت پراکسیداز

¹ *Lycopersicon esculentum* CBF

² *Lycopersicon esculentum* tomato Ascorbate Peroxidase

³ Wild Type

(POD) بین شاخه‌های MSK326 کنترل و تیمار شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ در حالی که فعالیت این آنزیم به صورت معنی‌داری در شاخه‌های HHDJY تحت تنش سرمای ۴ روزه افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری در فعالیت CAT بین شاخه‌های HHDJY کنترل و تیمار شده مشاهده نشد. برای MSK326 تیمار تنش سرما منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت CAT در شاخه‌ها گردید.

برای روشن شدن مکانیسم‌های ژنتیک مولکولی تحمل به سرما در برنج (*Oryza sativa*)، Zhang و همکاران (2012) از دو ژنوتیپ، Japonica LTH (مقاوم به سرما) و Indica IR29 (حساس به سرما) استفاده کردند. جهت اعمال تیمار سرمایی گیاهچه‌های مرحله S3 به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همانطور که از طریق مقایسه بصری جمع شدن و تا خوردن برگ‌ها و علائم پژمردگی مشاهده شد، LTH نسبت به IR29 به سرما مقاوم‌تر بود. در مقایسه با LTH، گیاهچه‌های IR29 تیمار شده با سرما، آسیب‌های غشایی (نشت الکترولیت) بیشتری را از خود نشان دادند و غلظت MDA بالاتری داشتند. هیچ مدرکی مبنی بر تغییر غلظت پرولین در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما در مقایسه با گیاهان کنترل وجود نداشت. اما در هر دو رقم به طور قابل توجهی سطوح بالاتری از پرولین بعد از بازیابی مشاهده شد که نشان می‌دهد پرولین ممکن است نقش مهمی در فرآیند بازیابی گیاه برنج بعد از تنش سرما داشته باشد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های تحت تنش سرما آنالیز شد تا تفاوت بیوشیمیایی بین دو ژنوتیپ ارزیابی شود. تغییرات جزئی در فعالیت CAT و POD بعد از ۸ ساعت تیمار سرمایی در LTH در مقایسه با تیمار کنترل مشاهده شد. هر دو ژنوتیپ افزایش قابل توجهی در فعالیت SOD بعد از ۸ ساعت تیمار سرمایی در مقایسه با گیاهان کنترل از خود نشان دادند که فعالیت SOD در IR29 نسبت به LTH بالاتر بود. تحت تنش سرما تاثیر اصلی بر بیان ژن به صورت، افزایش بیان در ژنوتیپ مقاوم به سرما و سرکوب قوی بیان در ژنوتیپ حساس به سرما بود. در انتهای تیمارهای سرمایی یک تغییر بیان ژن سریع و کارآمد در ژنوتیپ LTH مقاوم به سرما

مشاهده شد؛ در حالیکه ژنوتیپ IR29 حساس به سرما، ظرفیت بهبود کندتری در سطح رونویسی از خود نشان داد.

Jan و همکاران (2018) در مطالعه‌ای پاسخ‌های گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) به تنش سرما را مورد بررسی قرار دادند. بدین صورت که گیاهچه‌های ۱۴ روزه به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پاسخ گیاهچه‌های همیشه‌بهار به تنش سرما از طریق اندازه‌گیری نشت الکترولیت و مقدار MDA، پرولین و فعالیت آنزیمی آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل CAT تحت دمای پایین ۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ درجه سانتی‌گراد کنترل، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که قرار دادن *C.o* در معرض تنش سرما موجب افزایش تجمع پرولین می‌شود. میزان MDA و نشت الکترولیت طی ۷۲ ساعت تنش سرما افزایش داشت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به جز CAT افزایش، اما فعالیت کاتالاز به تدریج با افزایش دوره تنش کاهش یافت.

در پژوهشی گیاهچه‌های ۴ برگی جو دوسر (*Avena nuda L.*) در معرض تیمار سرمایی ۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز قرار داده شدند. نشت الکترولیت نسبی برگ‌های گیاهچه در تیمار سرمایی به صورت قابل توجهی افزایش یافت. میزان پرولین در برگ‌های گیاهچه تحت دمای پایین در مقایسه با دمای اتاق بیشتر بود. در این آزمایش تحت دمای پایین میزان MDA در مقایسه با تیمار کنترل بالاتر بود. فعالیت پراکسیداز در روزهای پایانی تیمار سرمایی به شدت کاهش یافت که نشان می‌دهد دمای پایین آنزیم پراکسیداز را تحت تاثیر قرار داده است که ممکن است به علت قرار گرفتن رونویسی و ترجمه RNA تحت تاثیر سرما، سنتز پراکسیداز کاهش یافته باشد. از طرفی به صورت همزمان میزان پرولین در دمای پایین افزایش یافت که می‌تواند پراکسیداز و فعالیت آن را کاهش دهد. فعالیت کاتالاز در تیمار سرمایی در مقایسه با تیمار کنترل بیشتر بود (Liu et al, 2013).

Yahia و همکاران (2016) اثر سرما بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های هوایی (شاخه و برگ) دو رقم مخالف شبدر *Medicago ciliaris* (cil 126 مقاوم و cil 123 حساس) را بررسی کردند. گیاهچه‌های ۱۰ روزه به مدت ۲، ۴ و ۶ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فعالیت پراکسیداز و ایزوآنزیم‌های آن (گایاکول پراکسیداز^۱) تحت تنش دمای پایین در رقم مقاوم بیش از رقم حساس بود. تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید ناشی از سرما روی دو رقم کلزا (*Brassica napus L.*) توسط Fahimirad و همکاران (2013) بررسی شد. گیاهچه‌های ۴ برگی دو رقم کلزای زمستانه (Okapi مقاوم به سرما) و کلزای بهاره (Rgs003 حساس به سرما) جهت قرار گرفتن در معرض تنش سرما به مدت ۷ روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد روز و ۳ درجه سانتی‌گراد شب قرار داده شدند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD در کلزای زمستانه در مقایسه با رقم بهاره بیشتر بود. از طرفی میزان MDA و POD در رقم زمستانه کمتر از کلزای بهاره بود. این مطالعه نشان می‌دهد که مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی، در مقایسه با رقم بهاره، سبب تحمل به سرمای بیشتر در رقم زمستانه می‌شود.

در مطالعه‌ی دیگری در دو رقم کلزای بهاره (رقم Zarfam مقاوم به سرما و رقم Option 500 حساس به سرما) تغییرات کمی مقادیر پرولین و MDA تحت تنش سرما ارزیابی شد. گیاهچه‌ها در مرحله ۴ برگی به مدت ۷ روز در محیط سرد با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد روز و ۳ درجه سانتی‌گراد شب قرار داده شدند. میزان MDA به سرعت متناسب با مدت زمانی که گیاهان در معرض سرما بودند افزایش یافت به صورتی که در روز هفتم به بالاترین میزان خود رسید که البته نرخ افزایش MDA در رقم حساس به سرما سریع‌تر بود. هر دو رقم روند افزایشی مشابهی برای مقدار پرولین از خود نشان

¹ Guaiacol Peroxidase

دادند که در روز هفتم بالاترین میزان پرولین در برگ‌های هر دو رقم تحت تنش سرما مشاهده شد (Moeini-korbekandi et al, 2014).

Azzeme و همکاران (2016) برای شناسایی تغییرات پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی به خشکی دانه‌های نخل روغنی (*tenera oil palm*) را در معرض شدت‌های مختلف تنش خشکی قرار دادند. بدین ترتیب که دانه‌های سه ماهه *tenera* (*Dura* × *pisifera*) به مدت ۲ ماه هر روز آبیاری شدند. سپس تنش خشکی در سه گروه و به صورت خفیف (۷ روز بدون آبیاری)، متوسط (۱۴ روز بدون آبیاری) و شدید (۲۱، ۲۸ و ۳۵ روز بدون آبیاری) بر آن‌ها اعمال شد. تجمع پرولین به تدریج هم در برگ و هم در ریشه در شدت‌های مختلف تنش خشکی افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان پرولین در تنش خشکی شدید بود. فعالیت کاتالاز در برگ‌ها تحت تنش خشکی خفیف نسبت به گیاهان کنترل افزایش داشت اما فعالیت آن تحت تنش متوسط و شدید شناسایی نشد. فعالیت گایاکول پراکسیداز در برگ‌ها تحت تنش خفیف به شدت افزایش یافت اما تحت تنش متوسط افت کرد و تحت تنش خشکی شدید نیز کاهش پیدا کرد.

۲-۱-۲ تحقیقات انجام شده در زمینه نقش اتیلن در تحمل به تنش‌های غیر زنده

Zhang و همکاران (2009) ابتدا در مطالعه‌ای نشان دادند که پروتئین ERF گوجه‌فرنگی^۱ TERF2/LeERF2 با اتیلن تحریک می‌شود و تولید اتیلن در گوجه‌فرنگی‌های غیر حساس^۲ TERF2/LeERF2 سرکوب شده است؛ که عملکرد TERF2/LeERF2 را به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت در بیوسنتز اتیلن پیشنهاد می‌کند. Zhang و Huang (2010) در ادامه گزارش کردند که تنظیم TERF2/LeERF2 در بیوسنتز اتیلن با افزایش تحمل به انجماد در تنباکو و گوجه‌فرنگی مرتبط است. آنالیز بیان ژن مشخص کرد که سرما به آرامی باعث بیان TERF2/LeERF2 در گوجه‌فرنگی می‌شود. بدین معنی که TERF2/LeERF2 ممکن است در پاسخ‌های سرمایی از طریق تعدیل اتیلن دخیل باشد. برای آزمایش این فرضیه، ابتدا مشاهده کردند که بیان بیش از حد TERF2/LeERF2 در تنباکو، نه تنها از طریق فعال‌سازی ژن‌های مرتبط به سرما تحمل به انجماد را افزایش می‌دهد، بلکه به طرز قابل توجهی نشت الکترولیت را نیز کاهش می‌دهد. به علاوه تیمار با بازدارنده بیوسنتز اتیلن (AVG) یا آنتاگونیست گیرنده اتیلن (AgNO₃) نشان داد که انسداد بیوسنتز اتیلن یا مسیر سیگنالینگ آن، در تنباکوهای با بیان بیش از حد TERF2/LeERF2 تحمل به انجماد را کاهش می‌دهد. علاوه بر این تحمل به انجماد در گوجه‌فرنگی‌های با بیان بیش از حد TERF2/LeERF2 افزایش و در لاین‌های تراریخته غیر حساس TERF2/LeERF2 کاهش یافت. همچنین کاربرد پیش ماده اتیلن ACC، تحمل به انجماد در لاین‌های غیر حساس TERF2/LeERF2 را باز می‌گرداند. بر اساس این نتایج، TERF2/LeERF2 تحمل به انجماد گیاهان را از طریق بیوسنتز اتیلن و مسیر سیگنالینگ آن افزایش می‌دهد.

¹ Tomato ERF2/Lycopersicon esculentum ERF2

² Antisense

ژن¹ SI-ERF.B.3 خانواده عوامل رونویسی ERF در گوجه‌فرنگی را رمزگذاری می‌کند. نتایج Real time RT-PCR در پژوهش Klay و همکاران (2014) نشان داد که SI-ERF.B.3 یک ژن پاسخگو به تنش‌های غیر زنده است که به وسیله سرما، گرما و غرقاب تحریک می‌شود ولی بیان آن به وسیله خشکی و شوری کاهش می‌یابد. در مقایسه با گونه وحشی، رشد گیاهان تراریخته غیر حساس SI-ERF.B.3 در پاسخ به تنش شوری متوقف شد. علاوه بر این، آزمایش تنش سرما به وضوح نشان داد که معرفی لاین‌های غیر حساس SI-ERF.B.3 در گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته، آسیب‌های سلولی را کاهش و تحمل آن‌ها را در برابر ۱۴ روز تنش سرما افزایش می‌دهد. همچنین نشت یونی جهت تعیین میزان آسیب سلولی بعد از ۱۴ روز تیمار سرمایی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار سرمایی منجر به افزایش شدید نشت یونی در بافت برگ‌های WT در مقایسه با لاین‌های غیر حساس SI-ERF.B.3 می‌شود. بنابراین معرفی لاین‌های غیر حساس SI-ERF.B.3 در گیاهان گوجه‌فرنگی ممکن است سبب کاهش آسیب‌های غشای پلاسمایی شود و تحمل در برابر تنش دمای پایین را افزایش دهد. بنابراین SI-ERF.B.3 یک ژن مرتبط با تنش سرما است که ممکن است به عنوان جزئی از مسیر پاسخ به تنش سرما در گوجه‌فرنگی عمل کند.

شناسایی نحوه پاسخ به خشکی گونه وحشی گوجه‌فرنگی *Solanum pennellii* (Sp) در مقایسه با گوجه‌فرنگی زراعی *Solanum lycopersicom* (Sl) هدف پژوهش Egea و همکاران (2018) بود. در این مقاله پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی در برگ‌های Sp و Sl در شرایط نرمال و تنش خشکی متوسط بررسی شد. تفاوت فیزیولوژیکی معنی‌داری بین گونه‌ها مشاهده شد؛ بدین صورت که برگ‌های Sp توانایی بیشتری برای ممانعت از اتلاف آب و آسیب‌های اکسیداتیو از خود نشان داد. اندازه‌گیری میزان MDA مشخص کرد که تحت تنش خشکی میزان MDA در برگ‌های Sp در مقایسه با Sl، پایین‌تر

¹ *Solanum lycopersicom* ERF.B.3

بود. ژن‌های دخیل در بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن به ویژه در مراحل کاتالیز شده با ACO و تنظیم شده با ERF در برگ‌های Sp، به وسیله تنش خشکی تحریک می‌شود. در این تحقیق بیان ERF1B و ERF095 در Sp افزایش یافت؛ که پیشنهاد می‌کند بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن مسئله مهمی در پاسخ به خشکی در گونه‌های وحشی گوجه‌فرنگی است. در مجموع به نظر می‌رسد که بیان تحریک شده ژن‌های بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن، در Sp با تحمل به خشکی آن در ارتباط است.

Siddique و همکاران (2011) در تحقیقی افزایش رشد و تحمل به شوری گیاهچه‌های فلفل قرمز (*Capsicum annuum L.*) از طریق تنظیم سنتز اتیلن ناشی از تنش با استفاده از باکتری‌های شورپسند دارای فعالیت ACC deaminase را بررسی کردند. دو ساعت قرار گرفتن گیاهچه‌های ۸ روزه فلفل قرمز در معرض شدت‌های مختلف تنش شوری (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl) سبب افزایش تولید اتیلن به ترتیب (۴۴٪، ۶۴٪ و ۷۴٪) شد. افزایش سطوح اتیلن می‌تواند مانع از طویل شدن ریشه و شاخه و در کل رشد گیاه شود. در تنش ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، تلقیح با سه باکتری شورپسند تولیدکننده ACC deaminase (*B.licheniformis* RS656، *Z.alba* RS111 و *Br.iodinum* RS16) تولید اتیلن را به ترتیب (۴۴٪، ۵۳٪ و ۵۷٪) کاهش داد. به صورت خلاصه این مطالعه نشان داد که استفاده از باکتری‌های شورپسند تولیدکننده ACC deaminase، اثرات نامطلوب تنش شوری بر رشد گیاهان فلفل قرمز را از طریق کاهش تولید اتیلن ناشی از تنش^۱، برطرف می‌کند.

مطالعه Shi و همکاران (2012) نشان داد اتیلن به صورت منفی پاسخ‌های گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) را به تنش انجماد تنظیم می‌کند. اولاً، تولید اتیلن در گیاهان گونه وحشی و موتانت *eto1*^۲، بعد از ۱ تا ۳ ساعت تیمار سرمایی به صورت قابل توجهی کاهش یافت و وقتی تنش سرما به مدت ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرد در سطح پایین باقی ماند. ثانیاً، افزایش بیوسنتز اتیلن که یا به

¹ stress-induced ethylene production

² Ethylene overproducer1

وسیله تیمار گونه وحشی با ACC یا با استفاده از موتانت *eto1* انجام شد، منجر به کاهش تحمل به انجماد شد. در مقابل تیمار گونه وحشی یا *eto1* با AVG یا یون نقره (Ag^+) تحمل به انجماد را افزایش داد. ثالثاً، در موتانت‌های غیر حساس^۱ به اتیلن شامل *etr1-1*^۲، *ein4-1*، *ein2-5*، *ein3-1* و *ein3 eil1*^۳ یک افزایش در مقاومت نسبت به انجماد مشاهده شد. در مقابل تحمل به انجماد موتانت *ctr1-1*^۴ کاهش داشت.

نقش اتیلن در پاسخ گیاه آرابیدوپسیس به تنش شوری توسط Yang و همکاران (2013) بررسی شد. آن‌ها از گونه وحشی آرابیدوپسیس (*Col-0*)، موتانت‌های غیر حساس اتیلن (*ein2-5* و *ein3-1*) و موتانت پاسخ سازنده سه‌گانه (*ctr1-1*) استفاده کردند تا پاسخ‌های فنوتیپی و فیزیولوژیکی آن‌ها به تنش شوری را مقایسه کنند. موتاسیون در مسیر سیگنالینگ اتیلن منجر به تغییرات فنوتیپی آشکار شد به صورتی که موتانت‌های حساس به اتیلن کوچکتر و موتانت‌های غیر حساس به اتیلن بزرگتر از *Col-0* بودند. اتفن^۵ به صورت خارجی بر گیاهچه‌های *Col-0* اعمال شد تا نقش اتیلن در پاسخ به شوری را تایید کند. در این تحقیق مشخص شد که عدم حساسیت به اتیلن در گیاهان *ein2-5* و *ein3-1* نسبت به *Col-0* حساسیت آرابیدوپسیس به شوری را افزایش می‌دهد. به هر حال اثرات نامطلوب ناشی از تنش شوری در *ctr1-1* نسبت به *Col-0* تا حد زیادی بهبود یافت. اتفن به طور قابل توجهی محدودیت طول ریشه ناشی از شوری را کاهش داد. آنالیز هموستازی Na^+ و K^+ نشان داد که اتیلن می‌تواند به گیاه کمک کند تا تغذیه بالای شاخه و ریشه با K^+ را در گیاهان تحت تنش شوری کوتاه یا بلند مدت حفظ کند. به هر حال اتیلن در افزایش سدیم و نسبت‌های آب در گیاهان تحت تنش شوری تغییر قابل توجهی

¹ethylene- insensitive mutant

² ethylene receptor1-1

³ ein3-like1

⁴ constitutive triple response1-1

⁵ Ethephon

ایجاد نکرد. همچنین کاربرد خارجی اتفن به صورت معنی داری از کاهش سطح K^+ در شاخه که ناشی از تیمار شوری بود، جلوگیری کرد. بر این اساس، مشاهدات تایید کرد که نقش کلیدی اتیلن در بهبود تحمل به شوری گیاهان و توانایی برجسته آن، در حفظ K^+ و نه کاهش Na^+ ، در شاخه‌ها و ریشه‌ها برای بهبود تحمل به شوری در آرابیدوپسیس است. همچنین بررسی SOD، CAT و POD نشان داد که سیگنالینگ اتیلن تا حد زیادی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. به ویژه فعالیت POD در موتانت *ctr1-1* در مقایسه با گیاهان *Col-0* به شدت افزایش داشت. موتانت‌های *ein2-5* و *ein3-1* نسبت به *Col-0* فعالیت SOD، CAT و POD پایین‌تری داشتند.

بر اساس مطالعات Yu و همکاران (2017) پروتئین ERF نقش مهمی در تولید اتیلن دارد. از این رو آن‌ها عملکرد تنظیمی یک ERF جدید،^۱ OsERF109، را در گیاهچه‌های برنج تحت تنش خشکی بررسی کردند. بیان OsERF109 به سرعت توسط تنش تحریک شد. آزمایشات نشان داد که OsERF109 در هسته حضور دارد و دارای عملکرد تغییردهندگی فعالیت^۲ است. گیاهان تراریخته با بیان بیش از حد OsERF109 (OE^3) به صورت قابل توجهی کاهش تحمل به خشکی از خود نشان دادند؛ در حالی که گیاهان تراریخته که در آن‌ها OsERF109 با دخالت RNA از بین رفته بود (RI^4)، به صورت معنی‌داری افزایش تحمل به خشکی از خود به نمایش گذاشتند. این نتایج نشان می‌دهد که OsERF109 تحمل به خشکی در برنج را به صورت منفی تنظیم می‌کند. علاوه بر این نتایج گاز کروماتوگرافی نشان داد که میزان اتیلن، در گیاهان OE نسبت به گونه‌های وحشی کمتر اما در لاین‌های RI بیشتر بود. همچنین آنالیز Real-Time PCR ثابت کرد که OsERF109 بیان ژن‌های OsACS6، OsERF3 و OsACO2 که در بیوسنتز اتیلن نقش مهمی ایفا می‌کنند، را تنظیم می‌کند. بر اساس

¹ *Oryza sativa* ERF109

² Transactivation

³ OverExpressing

⁴ Knockdown with RNA Interfering

داده‌های بدست آمده از این پژوهش OsERF109 تحمل به خشکی در برنج را از طریق تاثیر بر بیوسنتز اتیلن تنظیم می‌کند. در مجموع این تحقیق نقش منفی OsERF109 در بیوسنتز اتیلن و تحمل به تنش خشکی در برنج را مشخص کرد.

Sun و همکاران (2016) در تحقیقی نشان دادند که دمای پایین، آزاد شدن اتیلن در انگور را تحریک می‌کند. در این مطالعه گیاهچه‌های ۶ هفته‌ای در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت تیمار با تنظیم‌کننده‌های رشد برگ گیاهچه‌ها با ACC (۱۰۰ میکرومولار) یا AVG (۱۰۰ میکرومولار) اسپری شدند. تولید اتیلن به سرعت بعد از شروع تنش سرما افزایش یافت و در ساعت هشتم به حداکثر خود رسید و سپس بعد از ۴۸ ساعت تا سطح اصلی خود کاهش یافت. تیمار با ACC خارجی تحمل سرمای انگور را افزایش داد؛ در مقابل کاربرد بازدارنده بیوسنتز اتیلن، AVG، سبب کاهش تحمل سرمایی در این گیاه شد. این یافته‌ها پیشنهاد کردند که اتیلن پاسخ‌های سرمایی در انگور را به صورت مثبتی تحت تاثیر قرار می‌دهد. بیان VaERF057 یک ژن پایین دست سیگنالینگ اتیلن به شدت به وسیله سرما القا شد. همچنین بیان بیش از حد VaERF057 تحمل سرما آرابیدوپسیس را نیز افزایش داد. تحت تیمار سرمایی در لاین‌های تراریخته، مقدار MDA پایین‌تر و فعالیت SOD، POD و CAT بالاتر از گونه‌های وحشی بود. این مطالعه تایید کرد که اتیلن به طور مثبت تحمل به سرما در انگور را از طریق تعدیل بیان VaERF057 تنظیم می‌کند.

۳-۱-۲ بررسی‌های انجام شده در زمینه بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز

اتیلن تحت تنش‌های غیر زنده

Espartero و همکاران (1994) نشان دادند که گیاه گوجه‌فرنگی دارای حداقل ۴ ایزوژن SAM است. آنالیز RNA، پاسخ‌های مختلف ژن‌های SAM به شوری و سایر تنش‌ها را نشان داد. در پاسخ به تیمار با NaCl، مانیتول و ABA، SAM1 mRNA و SAM3 در ریشه تجمع یافت. SAM1 mRNA

در بافت برگگی نیز انباشته شد. در حالی که تحت تنش شوری سطوح SAM3 mRNA در مقایسه با برگ‌های کنترل کاهش یافت، و SAM2 پاسخ آشکاری به تنش شوری از خود نشان نداد. افزایش سطوح mRNA بلافاصله ۸ ساعت بعد از شروع تیمار شوری ظاهر شد و حداقل تا ۳ روز باقی ماند. در پاسخ به تنش بیشترین فراوانی رونوشت در بین سه mRNA مربوط به SAM1 و SAM2 کمترین فراوانی را دارا بود. در گیاهان کنترل سطوح حالت پایدار^۱ SAM1 mRNA در ساقه بیشتر بود، در حالی که SAM3 ترجیحا در اندام‌های هوایی بیان شد و SAM2 mRNA در ریشه‌ها وفور بیشتری داشت. القای ژن‌ها به وسیله تنش شوری ممکن است یک پاسخ اولیه با هدف غلبه بر شوک‌های اولیه شوری و اسمزی یا به عنوان نتیجه سازگاری در طولانی مدت به شرایط رشدی جدید باشد.

جهت روشن ساختن نقش SAM در سازگاری گیاه به یک محیط شور، الگوی بیان SAM در گیاهان گوجه‌فرنگی تحت شرایط کنترل و تنش شوری توسط Sanchez-Aguayo و همکاران (2004) بررسی شد. برای ارزیابی تاثیر تیمار NaCl بر بیان ژن SAM، RNA از برگ و ریشه گیاهان کنترل و تیمار شده با NaCl به مدت ۶ روز در کشت هیدروپونیک، استخراج شد. نتایج آزمایشات نشان داد که در گیاهان کنترل سطح حالت پایدار SAM1 mRNA در ریشه بیشتر از برگ بود. رونوشت ژن SAM1 در هردو اندام ریشه و برگ در پاسخ به تنش شوری افزایش یافت. رونوشت ژن‌های SAM2 و SAM3 در پاسخ به تیمار NaCl افزایش قابل توجهی نداشتند.

در یک پژوهش با انتقال SAM synthetase1 cDNA (SISAMS1^۲) به ژنوم گوجه‌فرنگی نشان داده شد که گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته با بیان بیش از حد SISAMS1 به صورت قابل توجهی نسبت به تنش قلیایی مقاوم بوده، حفظ تعادل مواد مغذی، ظرفیت فتوسنتز در آن‌ها افزایش یافته و آسیب‌های اکسیداتیو پایین‌تری نسبت به گیاهان WT در آن‌ها مشاهده شد. بیان بیش از حد SISAMS1 به شدت

¹ Steady-state

² *Solanum lycopersicum* S-Adenosyl Methionine synthetase1

سنتز اتیلن در برگ‌های گوجه‌فرنگی را تحت تاثیر قرار داد. تحت شرایط کنترل شده، در گیاهان تراریخته غلظت بالاتری از ACC و اتیلن نسبت به گیاهان WT مشاهده شد. در حالی که فعالیت ACO کاهش یافته و فعالیت ACS تحت تاثیر بیان بیش از حد SISAMS1 قرار نگرفت. فعالیت ACO و ACS و همچنین غلظت ACC و اتیلن در گیاهان تراریخته‌ای که به مدت ۶ روز تحت تنش بودند، بسیار پایین‌تر بود. اگرچه بیان بیش از حد SISAMS1 در گیاهانی که ۱۲ روز تحت تنش بودند، منجر به افزایش جزئی فعالیت ACO و غلظت اتیلن شد و همچنین کاهش جزئی در فعالیت ACS و غلظت ACC مشاهده شد. بیان بیش از حد SISAMS1 منجر به افزایش جزئی تجمع سوپراکسید و هیدروژن پراکسید تحت شرایط نرمال شد، در حالی که منجر به پراکسیداسیون لیپید و نشت الکترولیت نشد. بعد از ۶ و ۱۲ روز تنش قلیایی تجمع سوپراکسید و هیدروژن پراکسید به صورت معنی‌داری به ویژه در تیمار ۱۲ روزه افزایش یافت. در مقایسه با گیاهان WT، گیاهان تراریخته تجمع سوپراکسید و هیدروژن پراکسید بسیار کمتری داشتند. بر اساس نتایج آزمایشات، بیان بیش از حد SISAMS1 پراکسیداسیون لیپید و نشت الکترولیت در برگ‌های گوجه‌فرنگی را کاهش داد. بیان بیش از حد SISAMS1 منجر به کارایی بیشتر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. تحت تنش قلیایی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل SOD و CAT در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان WT بالاتر بود. به هر حال بیان بیش از حد SISAMS1 تحمل به تنش قلیایی گوجه‌فرنگی را از طریق پلی‌آمین‌ها و نه اتیلن، افزایش داد. بدین صورت که استفاده از بازدارنده سنتز اسپرمین و اسپرمیدین اثر بیان بیش از حد SISAMS1 را متوقف کرد و کاربرد بازدارنده سنتز اتیلن تاثیری بر این امر نداشت (Gong et al, 2014).

Ma و همکاران (2017) در پژوهشی افزایش تحمل به تنش‌های شوری و اکسیداتیو از طریق بیان بیش از حد¹ BvM14-SAMS2 در آرابیدوپسیس را بررسی کردند. برای تعیین نقش بالقوه SAMS در

¹ *Beta vulgaris* M14- S-Adenosyl Methionine synthetase2

تنش شوری، ژن SAMS2 از یک چغندر قند مقاوم به شوری (*Beta vulgaris* M14) را جداسازی شد. بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 در آرابیدوپسیس منجر به افزایش مقاومت به شوری و هیدروژن پراکسید شد. علاوه بر این با وارد کردن T-DNA به ¹AtSAMS3، یک موتانت آرابیدوپسیس فاقد SAMS3 (*atsams3*) بدست آمد که حساسیت بالایی به شوری و هیدروژن پراکسید از خود نشان داد. آن‌ها همچنین دریافتند که در گیاهان با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 سیستم آنتی‌اکسیدانی و متابولیسم پلی‌آمین نقش مهمی در مقاومت به شوری و هیدروژن پراکسید دارد. بدین ترتیب که ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری سطوح بالای رونوشت BvM14-SAMS2 در ریشه و برگ‌ها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که بیان BvM14-SAMS2 به صورت قابل توجهی توسط تنش شوری افزایش یافت. تحت شرایط تنش گیاهچه همه ژنوتیپ‌ها تمایل به افزایش مقادیر H₂O₂ و MDA داشتند. به هر حال در لاین موتانت *atsams3* نسبت به WT و لاین با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2، مقادیر بالاتری H₂O₂ و MDA انباشته شد. علاوه بر این گیاهان با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 تحت شرایط تنش نسبت به گیاهان WT مقادیر پایین‌تری H₂O₂ و MDA از خود نشان دادند. این نتایج تعیین کرد آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 کاهش یافت. همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل SOD، CAT و POD تحت تنش شوری و هیدروژن پراکسید در لاین‌های با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 نسبت به لاین‌های WT فعالیت بالاتری داشتند. تحت شرایط تنش در لاین موتانت *atsams3* محدوده افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به لاین WT کمتر بود. علاوه بر این تحت شرایط کنترل بین همه گیاهچه‌ها تفاوتی در فعالیت آنزیم SOD مشاهده نشد. البته تحت شرایط کنترل فعالیت CAT و POD در گیاهان با بیان بیش از حد BvM14-SAMS2 بیش از گیاهان WT و *atsams3* بود.

¹ *Arabidopsis thaliana* S-Adenosyl Methionine synthetase3

به منظور درک بهتر نقش SAMS تحت تنش غرقاب و خشکی در سویا (*Glycine max*)، Wang و همکاران (2016) آزمایشاتی در سطح mRNA و فعالیتهای آنزیمی آن انجام دادند. فعالیت SAMS در پاسخ به تنش غرقابی کاهش یافت و در پاسخ به تنشهای NaCl، سرما، جیبرلیک اسید و کلسیم در ریشههای سویا به صورت معنی‌داری تغییر نکرد. فعالیت SAMS در ریشه و هیپوکوتیل سویا تحت تنش خشکی تحریک شد. بیان mRNA خانواده SAMS در نوک ریشه و ریشه‌ها تحت تنش غرقابی و خشکی کاهش یافت. SAMS1 و SAMS2 در ریشه‌ها و در هر دو شرایط تنش کاهش بیان داشتند. ژن ACS در نوک ریشه، ریشه‌ها و هیپوکوتیل تحت تنش خشکی افزایش یافت، اگرچه تحت تنش غرقابی تغییری نکرد. به علاوه بیان ژن ACO در نوک ریشه‌ها تحت تنش خشکی و غرقاب تحریک شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که SAMS در پاسخ تنش‌های غرقابی و خشکی دخالت دارد.

Chen و همکاران (2014) در پژوهشی یک ژن ACO¹، TaACO1، که مرحله آخر بیوسنتز اتیلن را تحت تاثیر قرار می‌دهد، از یک لاین گندم (*Triticum aestivum*) مقاوم به شوری (SR3) را جدا کردند و تاثیر آن بر پاسخ به تنش شوری را مورد آزمایش قرار دادند. بیان رونوشت TaACO1 در ریشه گندم تحت تاثیر تنش شوری، خشکی، تنش اکسیداتیو و ABA کاهش یافت. همچنین با مشاهده کاهش جوانه‌زنی بذور و محدود شدن رشد ریشه تحت تنش شوری دریافتند که بیان بیش از حد TaACO1 در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس موجب حساسیت به شوری می‌شود. بیان پیوسته TaACO1 در آرابیدوپسیس، بیان ژن‌های پاسخگو به تنش مثل AtCBF1 و AtCBF3 را متوقف کرد. به طور کلی گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس ممکن است به علت فعالیت بیشتر ACO اتیلن بیشتری تولید کنند و اتیلن نیز مدت‌ها به عنوان تنظیم‌کننده منفی رشد در نظر گرفته شده است.

¹ *Triticum aestivum* ACO1

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ زمان و محل آزمایش

کشت گیاه و اعمال تیمارهای آزمایش تحت شرایط کنترل شده در سال ۱۳۹۶ و در آزمایشگاه علوم باغبانی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود واقع در بسطام اجرا شد.

۳-۲ نحوه اجرای آزمایش

آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور شامل گونه (مقاوم به سرما و حساس به سرما) و دما (۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد) بر پایه طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد.

۳-۳ کاشت مواد گیاهی

بذرهای هر دو گونه‌ی *S. habrochaites* LA1777 (مقاوم به سرما) و *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (حساس به سرما) از شرکت ENZA Zaden هلند تهیه شد. بذرها به صورت سطحی در گلدان‌های حاوی پیت ماس و پرلیت استریل شده با نسبت ۱:۲ (۳ عدد بذر در هر گلدان) کشت شده و سپس گلدان‌ها به اتاقک کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد.

پس از ۶ هفته، ۵۰٪ از دانهال‌های هر گونه، به منظور اعمال تنش سرما به مدت سه روز، در اتاقک کشت با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛ سپس برای مطالعه پروفایل بیان ژن‌ها و تغییرات آنزیمی، نمونه‌برداری از اندام هوایی (ساقه و برگ) دانهال‌های شاهد و تحت تیمار هر دو گونه گوجه‌فرنگی (حساس و مقاوم به سرما) انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد برای استخراج mRNA و بررسی محتوی آنزیمی نگهداری گردیدند.

۳-۴ بررسی‌های بیوانفورماتیک

۳-۴-۱ شناسایی ژن‌ها

ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی با استفاده از سایت ^۱ Plantcyc شناسایی شدند. توالی رونوشت و پلی‌پپتید ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی از سایت The Sol Genomics Network (SGN)^۲ به‌دست آمد.

۳-۴-۲ خصوصیات فیزیوشیمیایی

پیش‌بینی صفات فیزیوشیمیایی مثل طول، وزن مولکولی (^۳MW)، (^۴pI)، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری و (GRAVY) توالی پلی‌پپتید ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه داده‌های Expasy^۵ انجام شد. محل استقرار پروتئین‌ها در سلول با استفاده از سایت plant-mPLOC^۶ مشخص گردید. درخت فیلوژنتیکی نیز با نرم‌افزار MEGA-6 طبق الگوریتم Neighbor Joining رسم شد و تست آن با روش Bootstrap و با تکرار ۱۰۰۰ انجام گرفت.

۳-۵ انتخاب ژن‌ها

پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده، ۷ ژن از ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن در

^۱ <https://www.plantcyc.org/>

^۲ <https://solgenomics.net/>

^۳ Molecular Weight

^۴ Isoelectric point

^۵ <https://web.expasy.org/protparam/>

^۶ <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>

گوجه‌فرنگی و همچنین درگیر در تنش سرما جهت بررسی تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش سرما و در برگ‌های گیاهان توسعه یافته انتخاب شدند.

۳-۶ استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از گیاه گوجه‌فرنگی از معرف RNX-Plus شرکت SinaClon استفاده گردید. استخراج به شرح زیر صورت گرفت:

- ابتدا ۰/۵ گرم بافت برگ‌گی با استفاده از نیتروژن مایع در هاون پودر گردید.
- ۱ میلی‌لیتر محلول RNX-Plus سرد به تیوب ۲ میلی‌لیتری محتوی نمونه هموزن شده اضافه شد و به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.
- سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه با تکان دادن تیوب به خوبی مخلوط شد و ۵ دقیقه روی یخ انکوبه گردید.
- بعد از آن، به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد.
- فاز آبی (فاز بالایی) به یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید عاری از RNase (RNase-free) انتقال داده شد و به حجم برابر آن، ایزوپروپانول اضافه گردید؛ پس از اختلاط آرام به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد.
- مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید.

- سوپرناتانت دور ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ اضافه گردید و خیلی کوتاه ورتکس شد تا رسوب سفید رنگ از جای خود خارج و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه و در ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. این مرحله دوبار انجام شد.
- سوپرناتانت مجددا حذف و برای چند دقیقه اجازه داده شد تا رسوب سفیدرنگ در دمای اتاق خشک شود.
- رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب^۱ DEPC حل شد.

۷-۳ حذف نمک‌ها

به منظور حذف نمک‌های باقی مانده در RNA استخراج شده، از پروتوکل زیر استفاده شد:

- ۱۰ میلی لیتر آمونیوم استات ۲/۵ مولار به محلول RNA استخراج شده اضافه گردید.
- ۱۵۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰٪ سرد به آن اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در فریزر ۸۰- انکوبه گردید.
- بعد از آن، به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.
- سوپرناتانت دور ریخته شد و ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ سرد اضافه گردید و ورتکس شد.
- پس از آن، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.

^۱ DiEthyl PyroCarbonate water

- سوپرناتانت مجددا حذف و برای چند دقیقه اجازه داده شد تا رسوب سفید رنگ در دمای اتاق خشک شود.

- رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد.

۸-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۱-۸-۳ الکتروفورز

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری شد. پس از آن با استفاده از دستگاه عکس‌برداری ژل، باندهای مورد نظر بررسی شد.

۲-۸-۳ نانو دراپ

برای تعیین غلظت RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ Implen NanoPhotometer استفاده شد. حداکثر جذب RNA در ۲۶۰ نانومتر است. در این طول موج یک واحد جذب (OD^1) معادل ۴۰ میکروگرم RNA در هر میکرولیتر است. نسبت OD_{260} به OD_{280} درجه خلوص RNA را مشخص می‌کند که این نسبت ($A_{260/280}$) تقریباً بایستی در محدوده ۲-۱/۸ باشد؛ که در صورت وجود آلودگی‌های پروتئینی این نسبت کاهش می‌یابد. نسبت OD_{260} به OD_{230} میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی-ساکارید را نشان می‌دهد.

¹ Optical Density

۹-۳ حذف DNA ژنومی از RNA

جهت حذف الودگی DNA ژنومی از RNA از RNase-free DNase I شرکت Thermo Scientific

استفاده شد و مراحل زیر انجام گردید:

- مواد جدول ۱-۳ به تیوب RNase free اضافه گردید.
- تیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.
- یک میکرولیتر از EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار به واکنش اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مرحله نمونه ها جهت ساخت cDNA آماده شدند.

جدول ۱-۳ ترکیبات و نسبت های مورد استفاده جهت حذف DNA ژنومی

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
RNA	۱ (بر حسب میزان غلظت RNA)
بافر واکنش 10X با $MgCl_2$	۱
DNase 1, RNase free	۱
آب تیمار شده با DEPC	به حجم ۱۰ برسد

۱۰-۳ سنتز cDNA

ساخت اولین رشته cDNA از نمونه های RNA طبق دستورالعمل شرکت wizbio solutions و

بصورت زیر انجام شد:

- مواد جدول ۲-۳ به تیوب واکنش اضافه گردید (تمام این مراحل بر روی یخ انجام شد).

- تیوب‌ها به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند و سپس در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی جدول ۳-۳ قرار گرفتند.
- cDNA ساخته شده بلافاصله به ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲-۳ ترکیبات و نسبت‌های مورد استفاده برای ساخت رشته اول cDNA

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
RT Master mix	۱۰
Oligo dT	۱
نمونه RNA	۲-۳
آب RNase free	۶-۷
حجم نهایی	۲۰

جدول ۳-۳ برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای ساخت رشته اول cDNA

زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱۰	۲۵
۳۰	۴۲
۵	۸۵
Hold	۴

۳-۱۱ طراحی پرایمر جهت مطالعه بیان ژن

پرایمرها با نرم افزار آنلاین ^۱Primer3 طراحی و با نرم افزار Clone Manager Suit ارزیابی شدند.

از دستگاه Applied Biosystems 7300 جهت مطالعه بیان ژن‌ها استفاده شد. از ژن Elongation

Factor به عنوان ژن کنترل استفاده گردید (جدول ۳-۴).

جدول ۳-۴ لیست ژن‌ها و پرایمرهای بررسی شده در این تحقیق

Gene ID	Name	Primer (5'-3')	Temperature	Length
Solyc06g005060	EF	F:CGTGGTTATGTTGCCTCAAA R:ACAGCAATGTGGGAAGTGTG	57	20
Solyc01g094190	SAM1	F:TGATCGAGTTTCCAGGGTTC R:CGCGGTTAACAGTTGATGAG	57	20
Solyc01g101060	SAM2	F:TGACAACGGTGCTATGGTTC R:CTTGATGACACGCTCTTTGTG	57	20
Solyc04g049200	SAM3	F:TGCAGCTTACGGTCACTTTG R:CAAGCTTTTGGCTTGAGGAC	57	20
Solyc09g008280	SAM4	F:AGATCACAACCAAGGCCAAG R:AGGTGAAGTGAAGCCAATGC	57	20
Solyc10g083970	SAM5	F:CATGTTTGGCTATGCCACTG R:GCCAAGAGCAAGTTCCATTC	57	20
Solyc08g081540	ACS1	F:CATTGTTGTGAGCCTGGTTG R:GATTCGCCGATTCTTCTTC	57	20
Solyc07g049530	ACO1	F:CTTGGCTTAAAACCCCATGC R:TCACCCATGAGAACAAGCAG	57	20

^۱ frodo.wi.mit.edu

۳-۱۲ بررسی cDNA و پرایمرهای مورد مطالعه

به منظور به دست آوردن دمای بهینه پرایمرها برای واکنش qRT-PCR و بررسی cDNA، از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad استفاده شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR^۱)، محلول واکنش طبق جدول ۳-۵ آماده شد و همه پرایمرها در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. چرخه دمایی واکنش PCR طبق جدول ۳-۶ انجام گرفت. محصول واکنش به وسیله ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۳-۵ ترکیبات مورد نیاز در واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرو لیتر)
RT Master mix	۱۰
پرایمر (پرایمرهای رفت و برگشتی)	۲
cDNA	۱
آب	۷
حجم نهایی	۲۰

^۱ Polymerase Chain Reaction

جدول ۳ - ۶ چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان
Initial denaturation	۹۵	۴ دقیقه
Denaturation	۹۵	۳۰ ثانیه
Annealing	۶۲	۳۰ ثانیه ۴۰ بار تکرار
Extention	۷۲	۴۰ ثانیه
Final extention	۷۲	۶ دقیقه
	۴	Hold

۳-۱۳ واکنش qRT-PCR

واکنش qRT-PCR با استفاده از SYBR Green master mix شرکت Thermo Scientific و طبق

دستورالعمل آن در سه تکرار مستقل انجام گردید (جدول ۳-۷ و ۳-۸). جهت محاسبه بیان نسبی ژن‌ها

از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد (Rao et al, 2014).

جدول ۳- ۷ ترکیبات و نسبت‌های مورد نیاز برای واکنش qRT- PCR

حجم (میکرولیتتر)	ترکیبات
۵	Maxima SYBR Green/ROX- Master Mix (2X)
۰/۳۵	Forward Primer
۰/۳۵	Reverse Primer
۲	Template cDNA
۲/۳	Water, nuclease-free
۱۰	حجم نهایی

جدول ۳- ۸ سیکل دمایی برای واکنش qRT- PCR

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	Initial denaturation
	۱۵ ثانیه	۹۵	Denaturation
۳۵	۱ دقیقه	۶۱	Annealing
		۶۱-۹۵	Melting Curve

۳-۱۴ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم کاتالاز

۳-۱۴-۱ تهیه بافر استخراج

برای تهیه بافر استخراج ۰/۲۴ گرم Tris HCl در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با استفاده از محلول هیدرو کلریدریک اسید (HCl) ۱ نرمال، pH محلول بر روی ۷/۸ تنظیم شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری محلول در یخچال pH آن مجدداً بررسی و تنظیم شد و سپس ۲ میلی‌لیتر گلیسرول به آن اضافه شده و حجم نهایی به ۲۰ میلی‌لیتر رسید.

۳-۱۴-۲ استخراج محلول آنزیمی

- ۰/۲۵ گرم از نمونه برگ در هاون چینی، با استفاده از مقداری ازت مایع و هاون بخوبی سائیده شد و به حالت پودر درآمد.
- پودر حاصل به فالكون‌های پانزده میلی‌لیتری منتقل و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج افزوده شد.
- پس از ورتکس پودر نمونه و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

مایع رویی داخل فالكون‌های پانزده میلی‌لیتری به تیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده

و فعالیت آنزیم با فاز تاخیری صفر ثانیه‌ای، به مدت ۳ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز گردید (Aebi, 1984). فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (ΔOD) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم بافت برگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

U : واحد آنزیمی

ΔA_{240} : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

1: با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن در معادله تعیین می گردد که معادل دو می باشد.

V_t : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی لیتر بود).

d_f : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۱۸۰ ثانیه)

V_s : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود)

ϵ : ضریب خاموشی برابر $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

۳-۱۵ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم گایاکول پراکسیداز

- ۰/۲۵ گرم از هر نمونه برگی در هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد.
- سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (Ph=۷) و ۰/۰۲۵ گرم PVP^۱ به آن اضافه گردید.
- تیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.
- ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به تیوب جدید منتقل شد تا جهت قرائت در دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۷۰ نانومتر مورد استفاده قرار گیرد.
- کمپلکس واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۷۵۰ میکرولیتر گایاکول (۲۲ میکرولیتر گایاکول در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۱۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۷۰ میلی‌مولار (۳۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید در ۴/۹۶ میلی‌لیتر بافر فسفات)، ۱۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است.
- با اضافه کردن عصاره آنزیمی واکنش آغاز می‌گردد و فعالیت گایاکول پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم گایاکول بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه بر گرم وزن تازه بیان شد (Chance and Maehly, 1995).

۳-۱۵-۱ محاسبه فعالیت آنزیم گایاکول:

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{470} \times 1 \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

^۱ polyvinylpyrrolidone

U : واحد آنزیمی

A470Δ : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

1: با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن در معادله تعیین می گردد که معادل ۴ می باشد.

Vt : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی لیتر بود).

df : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۶۰ ثانیه)

Vs : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۲۰ میکرولیتر بود)

ε : ضریب خاموشی برابر $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

۱۶-۳ اندازه گیری پرولین

۱-۱۶-۳ آماده سازی محلول ها

- سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ : ۳ گرم پودر سولفوسالیسیلیک اسید را در آب مقطر حل شد و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.
- فسفریک اسید ۶ مولار: ۴۱/۲۱ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ به آب مقطر افزوده و سپس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد.
- تهیه معرف نین هیدرین: مقدار ۱/۲۵ گرم نین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال حل نموده و سپس ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار به آن اضافه گردید. جهت استفاده های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شود.

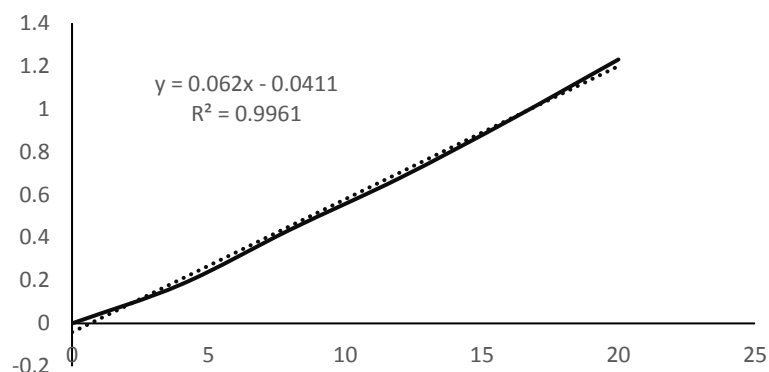
- تهیه محلول‌های استاندارد پرولین: ابتدا ۰/۰۱ گرم پرولین در آب مقطر حل شد و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید؛ سپس برای ساخت استانداردهای ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین به ترتیب ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین برداشته و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد.

۳-۱۶-۲ روش کار

- ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ‌گی در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ هموزن شد.
- سپس از قیف شیشه‌ای و کاغذ صافی واتمن ۲ برای صاف کردن نمونه‌ها استفاده گردید.
- مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده به تیوب جدید منتقل شده و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال به آن افزوده و سپس به خوبی مخلوط شد.
- همزمان مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین به همراه ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال به تیوب‌های جدید منتقل و خوب مخلوط شد.
- تیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و پس از آن سریعاً خنک گردید.
- سپس مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه و مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس هم‌زده شد.

استانداردهای پرولین محلول در فاز تولوئن به اندازه لازم در کووت ریخته و مقدار پرولین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد و منحنی استاندارد پرولین رسم گردید (شکل ۳-۱). سپس میزان جذب در نمونه‌های گیاهی قرائت شد و با قرار دادن آن در معادله خط مقدار پرولین در بافت برگ به دست آمد (Bates et al, 1973).

منحنی استاندارد پرولین



شکل ۳-۱ منحنی استاندارد پرولین

۳-۱۷ اندازه‌گیری شاخص مالون دی‌آلدئید

- ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ در ۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵٪ تری کلرو استیک اسید هموزن و به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.
- ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۶۷٪ تیو باربیتوریک اسید مخلوط شد.
- کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و سپس بلافاصله خنک گردید.

- نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند.

جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها

از فرمول زیر محاسبه شد. (Meng et al, 2012)

$$[6.45(a_{532}-a_{600})-(0.56 \times a_{450})] \frac{v_t \times v_r}{m \times v_s}$$

۳-۱۸ اندازه‌گیری نشت الکترولیت

- ۰/۱ گرم نمونه برگ‌ها از هر تیمار آزمایشی درون فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰

میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر غوطه‌ور گردید.

- سپس در دستگاه حمام آب گرم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار

داده شد.

- پس از طی این زمان هدایت الکتریکی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری

شد.

- مجدداً نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه قرار

گرفتند.

- پس از این مدت زمان و رسیدن دمای محلول به دمای اتاق مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها

اندازه‌گیری گردید.

سپس اعداد حاصله در فرمول زیر جای‌گذاری شده و درصد نشت الکترولیت از غشا سلول محاسبه

گردید. که در فرمول این EC_1 هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایشی در زمان ۱۰ دقیقه و EC_2 هدایت

الکتریکی در زمان ۳۰ دقیقه است.

$$EL=1-EC_1/EC_2*100$$

۳-۱۹ آنالیز داده‌ها:

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از میانگین داده‌ها و انحراف معیار و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار

Excel انجام گرفت.

فصل چہارم: نتائج و بحث

۴-۱ آنالیز داده‌های بیوانفورماتیک

با استفاده از سایت Plantcyc، ۲۷ ژن درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن گوجه‌فرنگی شناسایی شدند که از این تعداد ۶ ژن مربوط به آنزیم SAM، ۱۱ ژن مربوط به آنزیم ACS و ۱۰ ژن مربوط به آنزیم ACO هستند. خصوصیات فیزیوشیمیایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن که با استفاده از ابزار ProtParam سایت EXPASY به دست آمده بود، در جدول (۴-۱) شرح داده شده است.

در جدول (۴-۱) شاخص Length یا طول به تعداد اسیدآمینه‌های موجود در پروتئین اشاره دارد. با توجه به داده‌ها در گروه SAM طول‌ترین پروتئین مربوط به ژن‌های Solyc01g101060 و Solyc12g099000 و کوتاه‌ترین پروتئین مربوط به ژن Solyc04g049200 است. ژن Solyc08g079750 با ۵۴۸ اسیدآمینه بلندترین پروتئین در گروه ACS و ژن Solyc02g063540 با ۲۴۸ اسیدآمینه کوتاه‌ترین پروتئین را در این گروه دارند. بیشترین و کمترین تعداد اسیدآمینه در گروه ACO به ترتیب متعلق به ژن‌های Solyc02g093080 و Solyc02g068330 است.

شاخص MW نشانگر وزن مولکولی تمامی اسیدهای آمینه در یک توالی بر حسب کیلو دالتون است. در اینجا بیشترین وزن مولکولی با ۶۰/۲۱ کیلو دالتون در Solyc08g079750 مربوط به گروه ACS و کمترین وزن مولکولی با ۱۰/۸۳ کیلو دالتون در Solyc04g049200 مربوط به گروه SAM شناسایی شد.

pI یا نقطه ایزوالکتریک pH است که در آن یک مولکول خاص هیچ بار الکتریکی خالصی ندارد و به عبارتی به لحاظ الکتریکی خنثی است. که ACS5 با pH ۹/۱۰ بالاترین pI را در بین ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن دارد.

Instability index یا شاخص ناپایداری در حقیقت تخمینی کلی در مورد پایداری پروتئین مورد نظر در لوله آزمایش است. که با توجه اطلاعات به دست آمده تمامی پروتئین‌های SAM حالت پایدار

دارند. همه پروتئین‌های ACS به جز Solyc02g063540 (ACS7) و Solyc03g043890 (ACS) ناپایدارند. همچنین تمام پروتئین‌های ACO به جز Solyc06g060800 و Solyc07g026650 (ACO5) پایدارند.

Aliphatic index یا شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به صورت حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلفا (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) تعریف می‌شود. این ممکن است به عنوان یک عامل مثبت برای افزایش قابلیت استحکام در مقابل حرارت در پروتئین‌های کروی مورد توجه قرار گیرد. این شاخص برای SAM1 بیشترین و برای ACS3 کمترین مقدار را دارا بود.

Subcellular localization بیانگر موقعیت قرار گرفتن پروتئین‌ها در سلول است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود این پروتئین‌ها در نقاط مختلفی از سلول از جمله سیتوپلاسم، کلروپلاست، دستگاه گلژی و هسته پراکنده شده‌اند. تمامی پروتئین‌های گروه ACS در سیتوپلاسم و کلروپلاست و تمامی پروتئین‌های مربوط به ACO نیز در سیتوپلاسم جای گرفته‌اند. درحالی‌که پروتئین‌های گروه SAM در قسمت‌های مختلف سلول از قبیل کلروپلاست، دستگاه گلژی و هسته شناسایی شدند.

جدول ۴-۱ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن

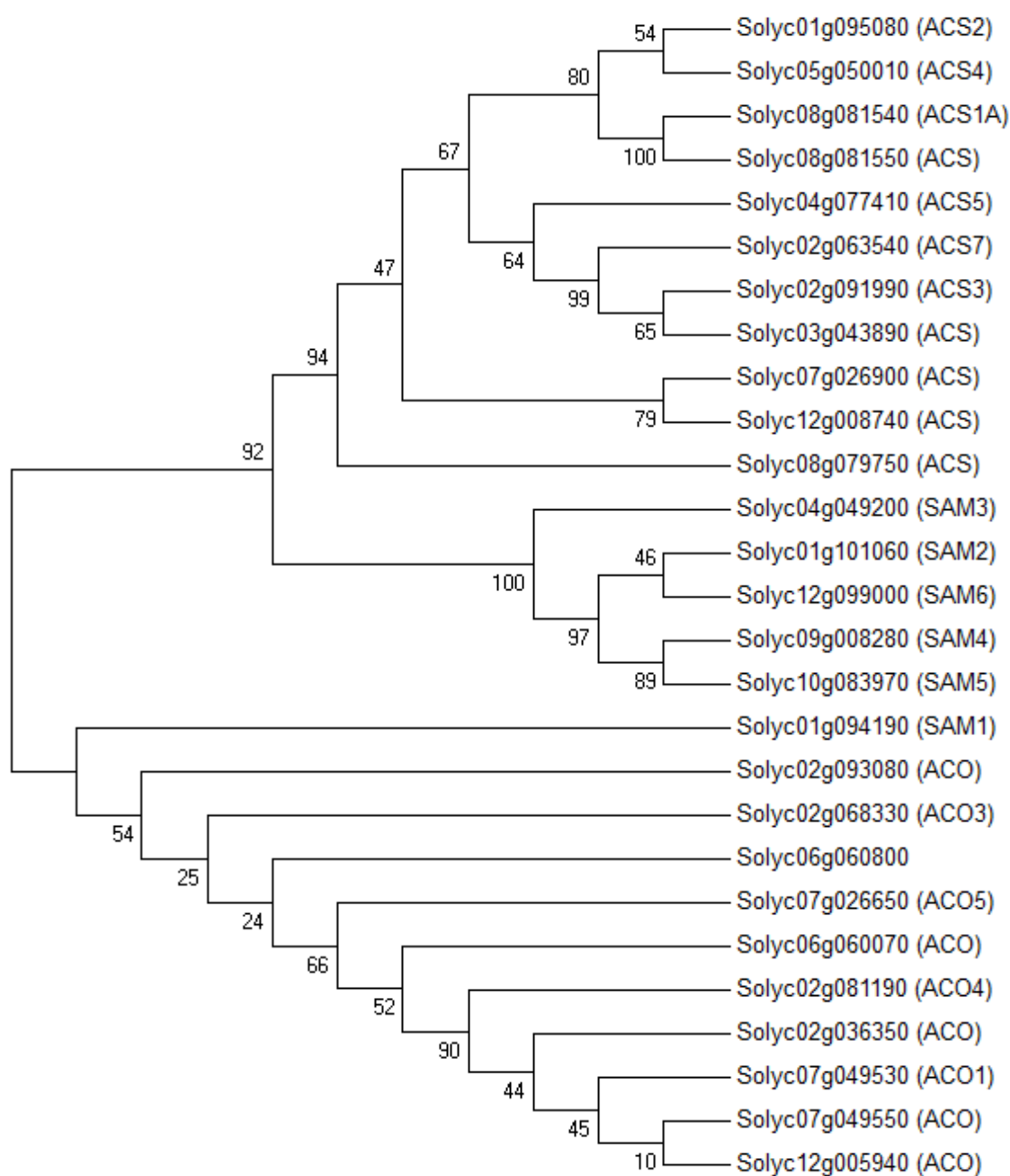
Locus ID	Gene name	Length (aa)	MW (KDa)	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
Solyc01g094190	SAM	324	35.56	5.98	Stable	91.76	-0.034	Golgi apparatus
Solyc01g101060	SAM	393	43.30	5.51	Stable	82.8	-0.335	Chloroplast
Solyc04g049200	SAM	96	10.83	5.62	Stable	90.21	-0.408	Chloroplast, Nucleus
Solyc09g008280	SAM	390	42.65	5.76	Stable	82.95	-0.283	Chloroplast
Solyc10g083970	SAM	390	42.66	6.12	Stable	80.97	-0.313	Chloroplast
Solyc12g099000	SAM	393	43.08	5.41	Stable	84.05	-0.313	Chloroplast
Solyc08g079750	ACS	548	60.21	8.83	Unstable	87.88	-0.193	Chloroplast
Solyc01g095080	ACS2	485	54.66	7.92	Unstable	80.8	-0.29	Chloroplast
Solyc02g063540	ACS7	284	32.05	5.90	Stable	86.51	-0.221	Cytoplasm
Solyc02g091990	ACS3	469	53.09	8.23	Unstable	78.61	-0.366	Cytoplasm
Solyc03g043890	ACS	471	53.10	7.55	Stable	84.48	-0.256	Cytoplasm
Solyc04g077410	ACS5	471	53.48	9.10	Unstable	84.48	-0.279	Cytoplasm
Solyc05g050010	ACS4	476	53.51	5.56	Unstable	86.66	-0.214	Chloroplast
Solyc07g026900	ACS	441	49.96	5.72	Unstable	84.01	-0.272	Chloroplast
Solyc08g081540	ACS1	483	54.56	6.18	Unstable	85.18	-0.179	Chloroplast
Solyc08g081550	ACS	472	53.48	7.15	Unstable	87.16	-0.183	Chloroplast
Solyc12g008740	ACS	434	49.17	7.93	Unstable	82.9	-0.326	Chloroplast
Solyc02g093080	ACO	330	36.68	5.70	Stable	83	-0.266	Cytoplasm
Solyc02g068330	ACO3	257	29.03	5.48	Stable	87.94	-0.278	Cytoplasm
Solyc02g036350	ACO	319	36.34	5.15	Stable	86.18	-0.367	Cytoplasm
Solyc02g081190	ACO4	320	36.36	5.19	Stable	86.5	-0.387	Cytoplasm
Solyc06g060070	ACO	314	35.82	5.71	Stable	84.04	-0.457	Cytoplasm
Solyc06g060800	-	310	35.08	5.52	Unstable	84.58	-0.258	Cytoplasm
Solyc07g026650	ACO5	301	34.38	6.16	Unstable	81.03	-0.412	Cytoplasm
Solyc07g049530	ACO1	315	35.81	5.13	Stable	82.03	-0.412	Cytoplasm
Solyc07g049550	ACO	316	35.97	5.11	Stable	84.84	-0.385	Cytoplasm
Solyc12g005940	ACO	316	36.08	5.60	Stable	83.92	-0.416	Cytoplasm

۴-۲ درخت فیلوژنتیکی

با ترسیم درخت فیلوژنتیکی می‌توان سیر تکاملی ژن‌هایی با توالی مشابه بدین صورت که کدام ژن قدیمی‌تر و به نوعی منشا سایر ژن‌ها می‌باشد؟ کدام ژن از کدام ژن مشتق شده است؟ کدام ژن جدیدتر است؟ را بررسی کرد.

بنابراین ژن‌های دارای خصوصیات فیزیوشیمیایی مشابه، جد فیلوژنتیکی همسانی در درخت فیلوژنتیک دارند؛ برای مثال ژن‌های Solyc09g008280(SAM4) و Solyc10g083970 (SAM5) که خصوصیات فیزیوشیمیایی نزدیکی دارند در درخت فیلوژنتیک بسیار نزدیک‌تر به هم قرار دارند. همچنین ژن‌های ACS1 و ACO1 که روی درخت فیلوژنتیکی در فاصله دوری از هم قرار گرفته‌اند، دارای خصوصیات فیزیوشیمیایی متفاوتی نیز هستند (شکل ۴-۱). با توجه به درخت فیلوژنتیکی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن به سه دسته کلی شامل ژن‌های گروه SAM، ژن‌های گروه ACS و ژن‌های گروه ACO، تقسیم می‌شوند؛ که مطابق با مسیر بیوسنتز اتیلن ژن‌های گروه SAM آنزیم SAM، ژن‌های گروه ACS آنزیم ACS و ژن‌های گروه ACO آنزیم ACO را کدگذاری می‌کنند. ژن SAM1 روی درخت فیلوژنتیکی به دلیل شباهت بیشتر توالی پروتئینی در دسته ژن‌های ACO قرار گرفته است اما در همین دسته نیز تفاوت‌هایی بین ژن SAM1 با ژن‌های ACO مشاهده می‌شود که آن را در دسته مذکور از سایر ژن‌ها جدا کرده است. همچنین ژن Solyc06g060800 با توجه موقعیت آن روی درخت فیلوژنتیکی و شباهت با ژن‌های ACO احتمالاً جز این دسته از ژن‌ها است.

بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک انجام شده و مرور منابع، تعداد ۷ ژن درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن گیاه گوجه‌فرنگی شامل ۵ ژن (SAM1، SAM2، SAM3، SAM4 و SAM5) از گروه ژن‌های SAM، ۱ ژن (ACS1) از گروه ژن‌های ACS و ۱ ژن (ACO1) نیز از گروه ژن‌های ACO، جهت بررسی در دو گونه گوجه‌فرنگی تحت تنش دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد گزینش نهایی شدند.

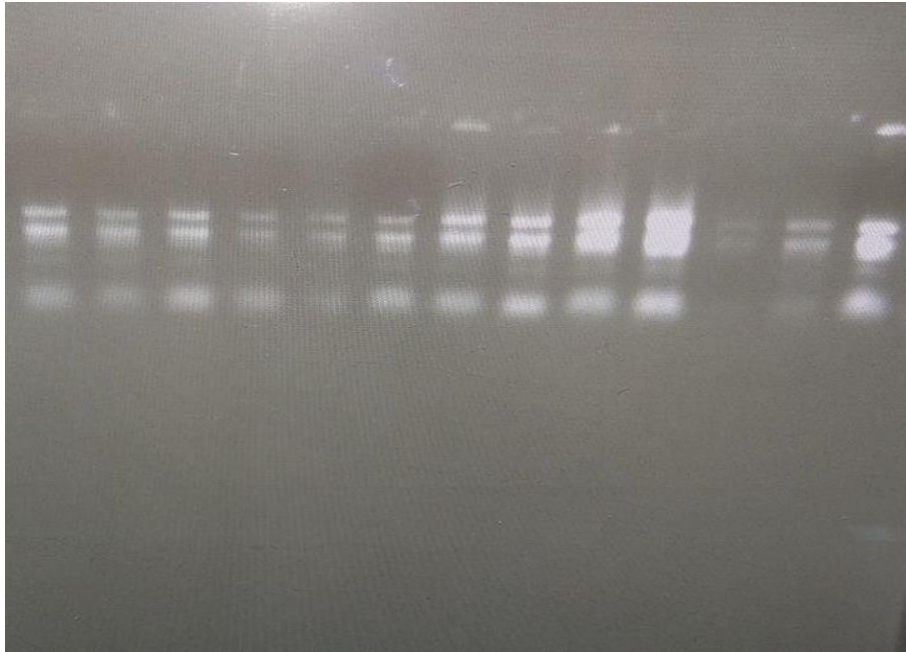


شکل ۴-۱ درخت فیلوژنتیکی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن در گیاه گوجه‌فرنگی

۳-۴ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

نتایج استخراج RNA از گونه‌های Sh LA1777 و SI Moneymaker تحت دو تیمار کنترل و تنش سرما نشان داد که RNA استخراج شده فاقد آلودگی DNA و پروتئین است. مشاهده سه باند ایجاد شده بر روی ژل آگارز ۱٪ و عدم وجود اسمیر بین باندها، حاکی از کیفیت مناسب RNA استخراج شده،

است (شکل ۴-۲). از سه باند مشاهده شده هر RNA یکی مربوط به ۲۸s rRNA است که به دلیل اینکه طول بیشتری دارد در بالا قرار می‌گیرد، دیگری مربوط به ۱۸s rRNA و آخری مربوط به ۵s است که چون طول کمتری دارد پایین تر از بقیه قرار می‌گیرد. که چون هر سه این باندها خوب و به اصطلاح sharp هستند، نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده است.



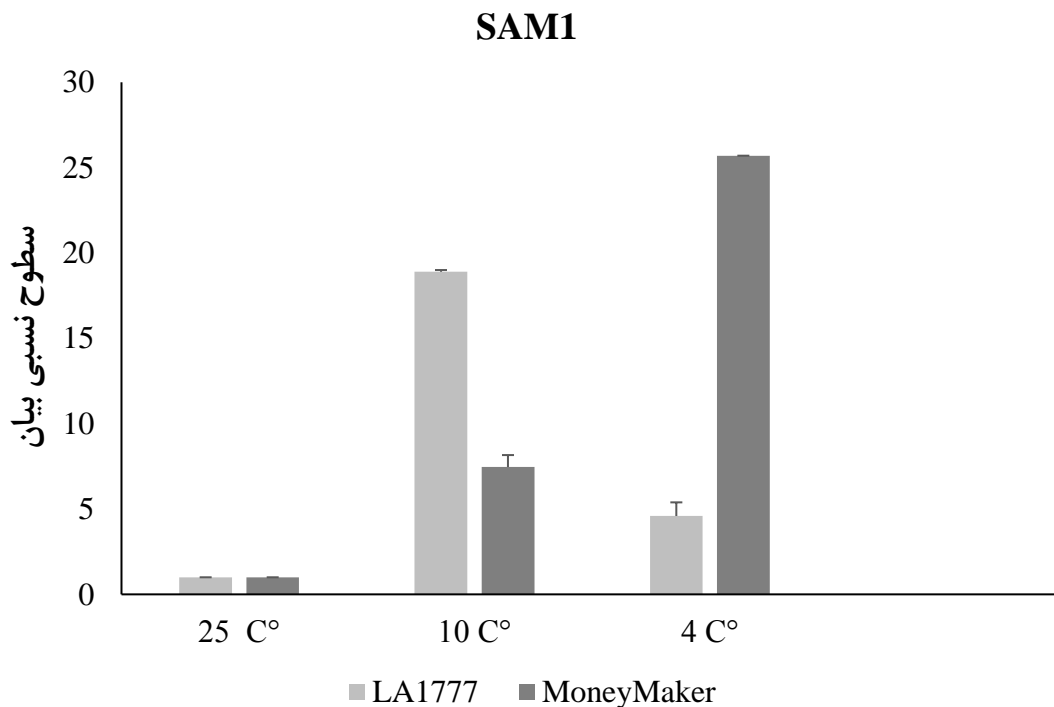
شکل ۴-۲ تعیین کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و عکس‌برداری با دستگاه ژل‌داک

۴-۴ بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن

۴-۴-۱ سطوح بیان ژن SAM1

با توجه به شکل (۴-۳)، بیان ژن SAM1 تحت تنش دمای پایین نسبت به شرایط کنترل در هر دو گونه مقاوم و حساس افزایش داشت. علی‌رغم افزایش بیان ژن SAM1 در هر دو گونه مقاوم و حساس تحت تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نرخ افزایش بیان ژن SAM1 در گونه SI Moneymaker بسیار بالاتر از گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) بود؛ در حالی که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان

ژن SAM1 در گونه مقاوم بیش از افزایش بیان این ژن در گونه حساس به سرما بود. همچنین در گونه مقاوم به سرما سطوح بیان ژن SAM1 تحت تنش ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیش از سطوح بیان آن تحت تنش ۴ درجه سانتی‌گراد بود. به صورت کلی بیان ژن SAM1 تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در گونه حساس در مقایسه با شرایط کنترل تا ۲۵ برابر افزایش یافت که بیشترین میزان بیان این ژن تحت تنش‌های سرمایی و گونه‌های مورد بررسی در این پژوهش بود. بنابراین ژن SAM1 از جمله ژن‌هایی است که تحت تاثیر تنش سرما تحریک می‌شود.



شکل ۳-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۲۵،

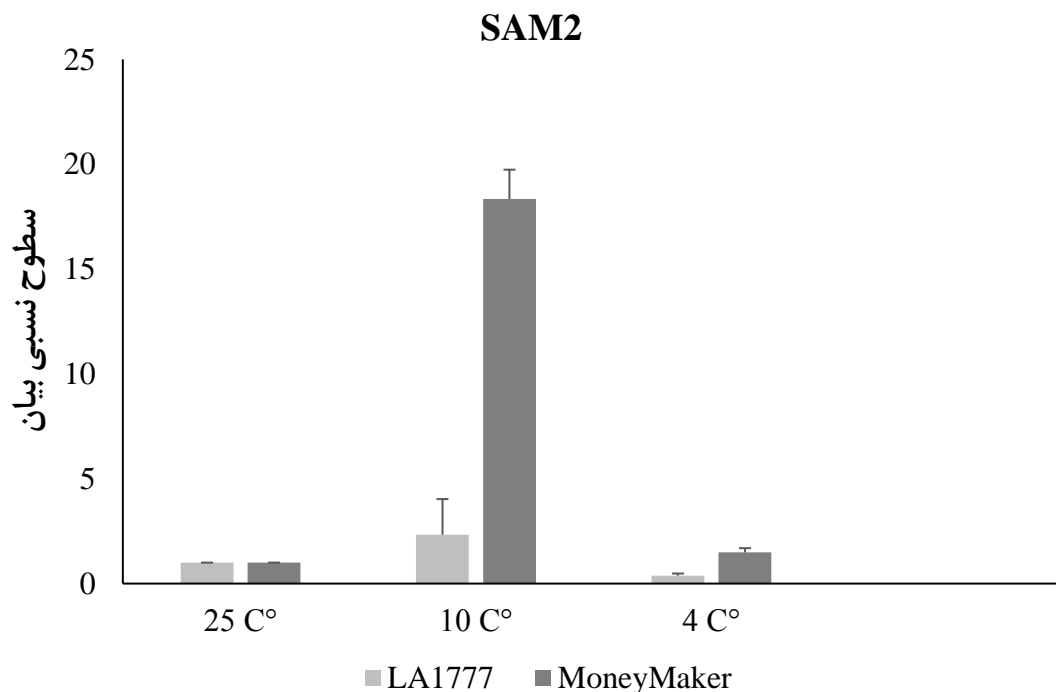
۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد

در پژوهش Espartero و همکاران (1994) نیز تجمع SAM1 mRNA در پاسخ به تنش شوری، مانیتول و ABA در برگ‌های گوجه‌فرنگی افزایش یافت. همچنین در آزمایش Sanchez-Aguayo و همکاران (2004) رونویس ژن SAM1 در هردو اندام ریشه و برگ گیاه گوجه‌فرنگی در پاسخ به تنش

شوری افزایش یافت نشان داد که مطابق با نتایج این پژوهش در تنش سرما است. طبق گزارش Gong و همکاران (2014) بیان بیش از حد ژن SISAMS1 به شدت سنتز اتیلن در برگ‌های گوجه‌فرنگی را تحت تاثیر قرار داد، پراکسیداسیون لیپید و نشت الکترولیت را کاهش داد و منجر به کارایی بیشتر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شد.

۴-۴-۲ سطوح بیان ژن SAM2

بیان ژن SAM2 تحت تنش ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شرایط کنترل، در گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) کاهش و در گونه SI MoneyMaker (حساس به سرما) اندکی افزایش یافت؛ در حالی که بیان این ژن تحت تنش ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دو گونه مقاوم و حساس افزایش یافت. سطوح بیان ژن SAM2 تحت دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در گونه حساس به سرما بسیار چشم‌گیرتر از گونه مقاوم بود و تا ۱۸ برابر نسبت به شرایط کنترل افزایش داشت (شکل ۴-۴).



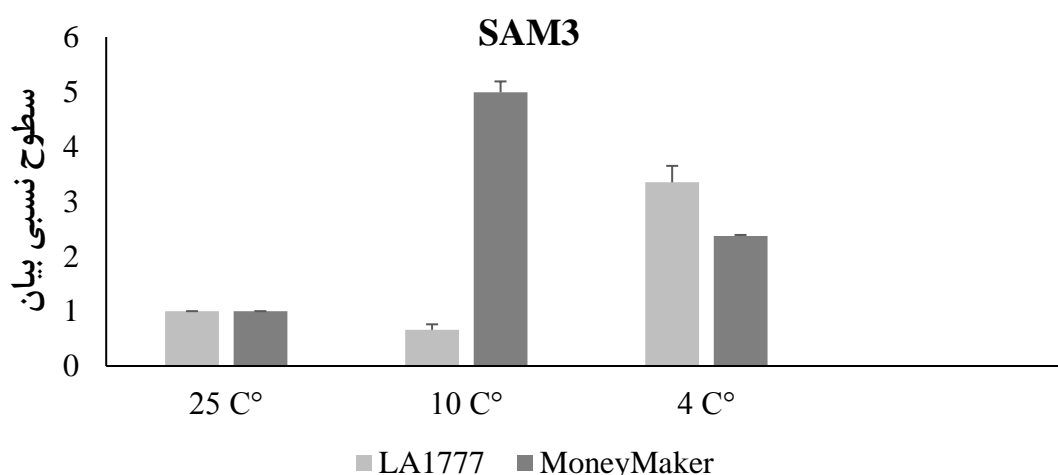
شکل ۴-۴ نمودار بیان نسبی ژن SAM2 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۲۵،

۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد

مطابق با نتایج پژوهش حاضر در گونه حساس به سرما، در تحقیق Ma و همکاران (2017) در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش شوری نیز بیان ژن SAM2 افزایش یافت. همچنین در این تحقیق دریافتند بیان بیش از حد SAMS2 در آرابیدوپسیس منجر به افزایش مقاومت به شوری و هیدروژن پراکسید شد؛ و در این گیاهان سیستم آنتی‌اکسیدانی و متابولیسم پلی‌آمین نقش مهمی در مقاومت به شوری و هیدروژن پراکسید دارد. در حالی که در گیاه سویا تحت تنش‌های غرقابی و خشکی بیان این ژن در ریشه‌ها کاهش یافت (Wang et al, 2016). بیان ژن SAM2 در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری پاسخ آشکاری از خود نشان نداد (Espartero et al, 1994; Sanchez-Aguayo et al, 2004). با توجه به مطالعات انجام شده، سطوح بیان ژن SAM2 در پاسخ به تنش‌های متفاوت و در گونه‌های گیاهی مختلف، بسیار متغیر است.

۳-۴-۴ سطوح بیان ژن SAM3

در هر دو گونه مقاوم و حساس به سرما تحت تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد بیان ژن SAM3 نسبت به تیمار کنترل افزایش داشت. همچنین تحت تیمار سرمایی بیان ژن SAM3 در Sh LA1777 بیش از SI MoneyMaker بود؛ اما تحت تیمار ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیان ژن SAM3 در گونه مقاوم کاهش و در



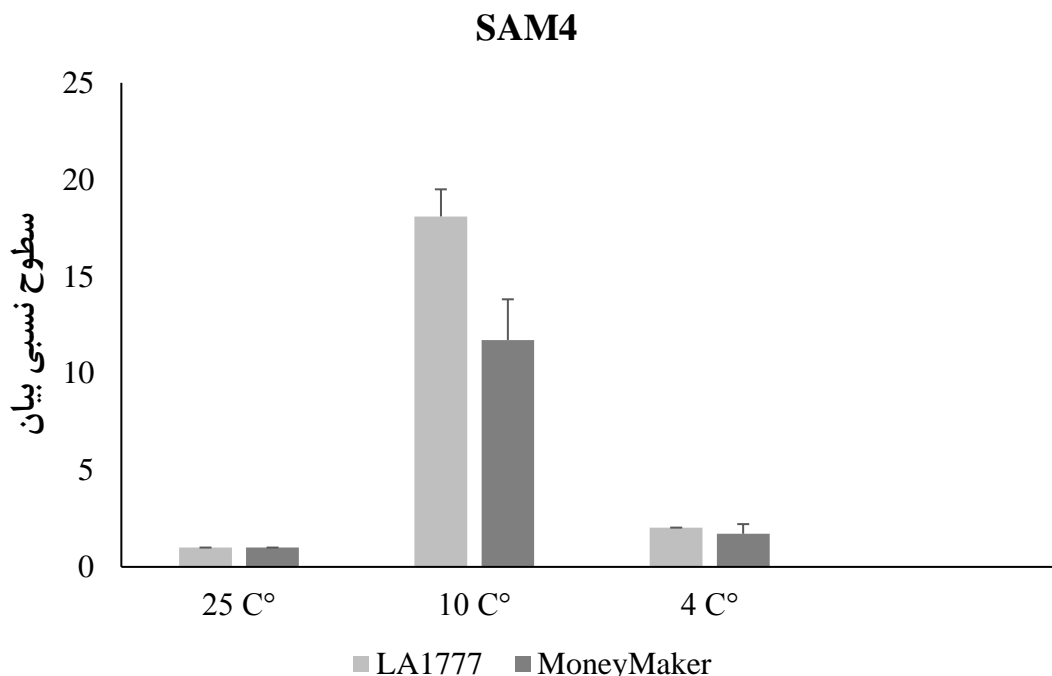
شکل ۴-۵ نمودار بیان نسبی ژن SAM3 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۲۵،

۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد

گونه حساس به سرما، افزایش یافت. در گونه حساس به سرما، افزایش سطوح بیان این ژن تحت تنش ۱۰ در سانتی‌گراد بیش از تنش ۴ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۴-۵). تحت تنش شوری در مقایسه با تیمار کنترل سطوح SAM3 mRNA در برگ‌های گوجه‌فرنگی کاهش یافت اما در ریشه‌های آن تجمع پیدا کرد (Espartero et al, 1994). بر اساس نتایج Sanchez-Aguayo و همکاران (2004) بیان ژن SAM3 در گیاه گوجه‌فرنگی در پاسخ به تنش شوری افزایش معنی‌داری نداشت.

۴-۴-۴ سطوح بیان ژن SAM4

بیان ژن SAM4 تحت تنش ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شرایط کنترل در هر دو گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) و SI Moneymaker (حساس به سرما) افزایش کمی داشت. با این وجود تحت شرایط تنش در گونه مقاوم به سرما بیان SAM4 با اندک اختلاف بالاتر از گونه حساس به سرما بود. همچنین تحت تنش ۱۰ درجه سانتی‌گراد نیز بیان ژن SAM4 در هر دو گونه حساس و مقاوم به



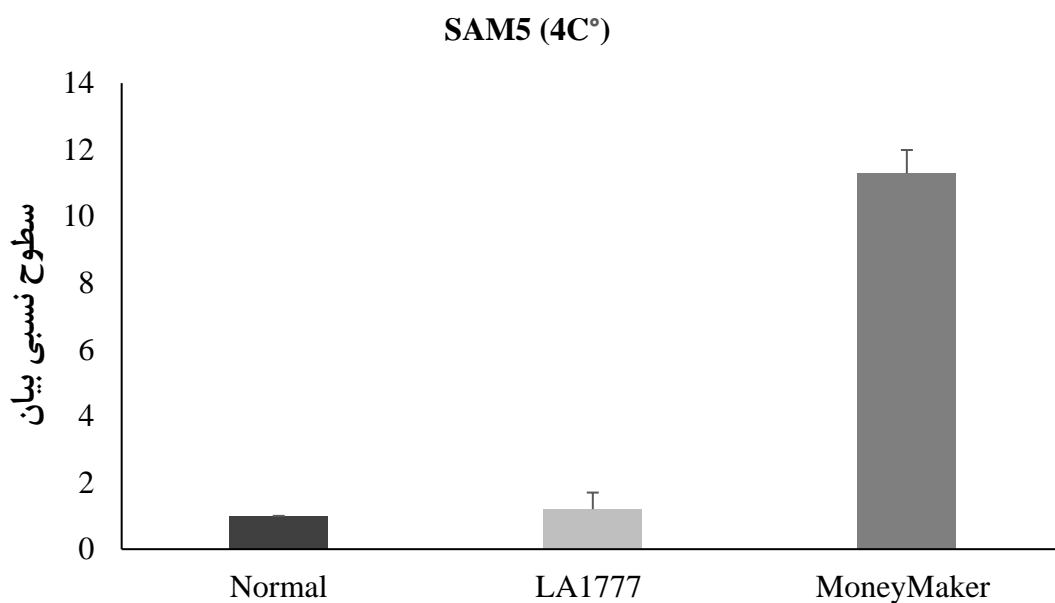
شکل ۴-۶ نمودار بیان نسبی ژن SAM4 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در سه دمای ۲۵،

۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد

سرما افزایش یافت که افزایش سطوح بیان این ژن در گونه مقاوم بیش از گونه حساس به سرما بود. به صورت کلی، سطوح بیان ژن SAM4 تحت دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و در گونه مقاوم به سرما در مقایسه با شرایط کنترل تا ۱۸ برابر افزایش یافت (شکل ۴-۶).

۵-۴-۴ سطوح بیان ژن SAM5

در حالی که در گونه SI MoneyMaker سطوح بیان ژن SAM5 تحت تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار کنترل افزایش قابل توجهی داشت؛ در گونه Sh LA1777 تحت شرایط مشابه، تغییر معنی‌داری در بیان این ژن مشاهده نشد (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷ نمودار بیان نسبی ژن SAM5 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

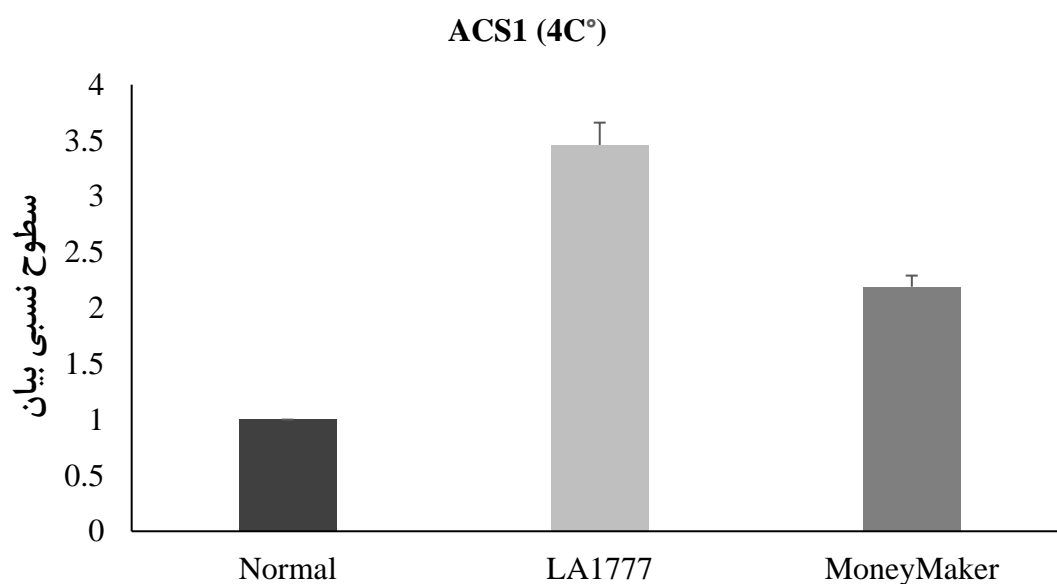
آنزیم SAM بیوسنتز S-AdoMet از Met و ATP را کاتالیز می‌کند. S-AdoMet به عنوان یک گروه دهنده متیل عمده برای پکتین متیل استراز و O-متیل ترنسفراز عمل می‌کند که در متابولیسم پکتین و لیگنین دخالت دارند. S-AdoMet در واکنش‌های ترنس متیلاسیون^۱ DNA، RNA، پروتئین، لیپید نقش دارد و به وسیله آنزیم S-AdoMet دکرکسیلاز^۲، دکرکسیله می‌شود تا به عنوان پیش ماده بیوسنتز پلی‌آمین عمل کند. همچنین در گیاهان S-AdoMet پیش ماده بیوسنتز اتیلن نیز هست. در اصل، افزایش بیان آنزیم SAM می‌تواند فرآیندهای متفاوتی همچون بیوسنتز آمینواسید، ترکیبات فنیل پروپانوئید، پلی‌آمین و اتیلن را تحت تاثیر قرار دهد. این اطلاعات نشان می‌دهد که آنزیم SAM نقشی حیاتی در تنظیم متابولیسم، رشد و نمو گیاهان و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده دارد. همچنین مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که بیان این آنزیم به وسیله تنش‌های غیر زنده متعددی از جمله شوری، خشکی، غرقاب، سرما و ... تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Roeder et al, 2009).

^۱ Transmethylation

^۲ S-Adenosyl methionine Decarboxylase

۴-۴-۶ سطوح بیان ژن ACS1

در هر دو گونه مقاوم و حساس به سرما در شرایط تنش سرمایی در مقایسه با شرایط کنترل بیان ژن ACS1 یافت. که میزان افزایش بیان این ژن در گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) بیش از گونه SI MoneyMaker (حساس به سرما) بود (شکل ۴-۸).

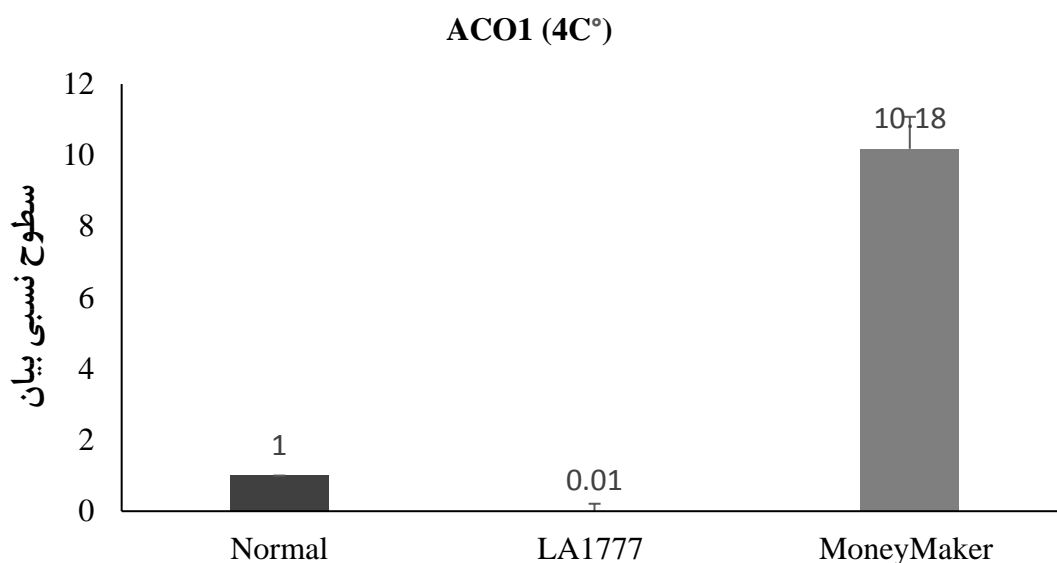


شکل ۴-۸ نمودار بیان نسبی ژن ACS1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

در سویا نیز خانواده ژن‌های ACS تحت شرایط تنش خشکی افزایش بیان داشتند (Barbosa et al, 2015). تبدیل S-AdoMet به ACC به وسیله آنزیم ACS مرحله اصلی در تنظیم بیوسنتز اتیلین است. ژن‌های ACS در گوجه‌فرنگی بخشی از یک خانواده چند ژنی با الگوی بیان متفاوت است که از طریق سیگنال‌های نموی و محیطی زنده و غیر زنده تنظیم می‌شوند (Van Der Straeten and Van Der Straeten, 2017).

۷-۴-۴ سطوح بیان ژن ACO1

بیان ژن ACO1 در گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش چشمگیری داشت. از سوی دیگر بیان این ژن در گونه SI MoneyMaker (حساس به سرما) در شرایط یکسان و در مقایسه با تیمار کنترل افزایش قابل توجهی داشت (شکل ۹-۴).



شکل ۹-۴ نمودار بیان نسبی ژن ACO1 در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵

و ۴ درجه سانتی‌گراد

بیان رونوشت ژن TaACO1 در گندم رقم SR3 مقاوم به شوری، علاوه بر تنش شوری تحت تاثیر تنش‌های اکسیداتیو و خشکی نیز کاهش پیدا کرد. همچنین بیان بیش از حد TaACO1 در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس موجب حساسیت به شوری شد (Chen et al, 2014).

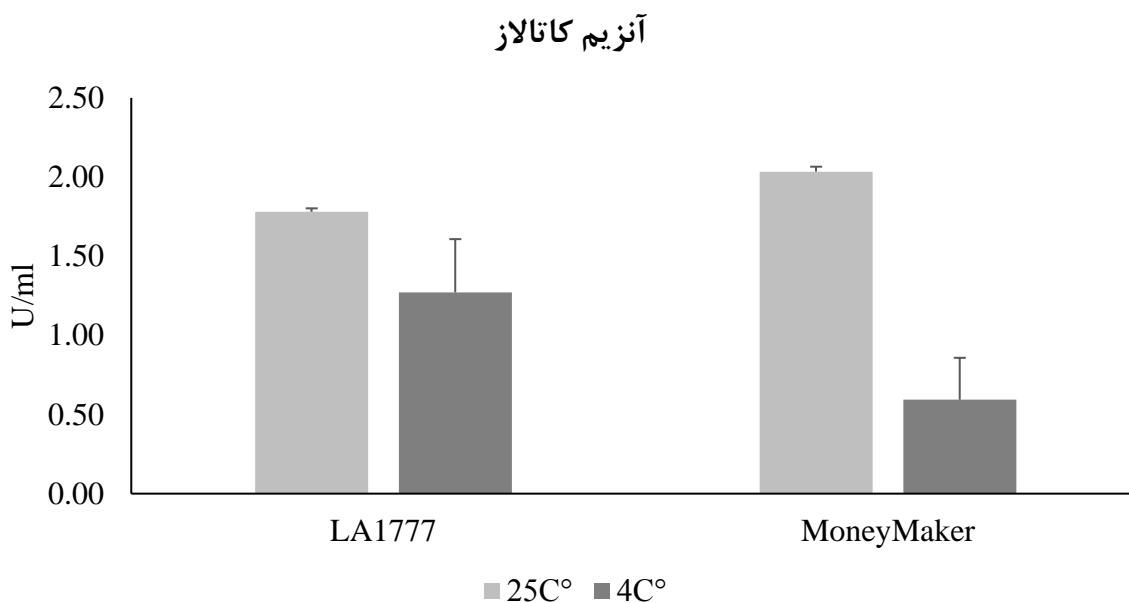
ACO آنزیمی است که مستقیماً مسئول بیوسنتز اتیلن است. در گیاهان مختلف چندین ایزوفرم ACO وجود دارد که به وسیله یک خانواده چند ژنی رمزگذاری می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که یک رابطه‌ی مثبت بین بیان ژن ACO و میزان تولید اتیلن برقرار است؛ و عامل محدودکننده بیوسنتز اتیلن فعالیت آنزیم ACO است. ایزوفرم‌های چندگانه ACO تحت کنترل عوامل نموی و محیطی هستند. از این رو تنظیم فعالیت ژن ACO ممکن است به عنوان کنترل‌کننده جانبی یا در موارد متعددی کنترل‌کننده اصلی سطوح بیوسنتز اتیلن در گیاهان عالی عمل کند. افزایش تولید اتیلن نه تنها طی مراحل رشدی از جمله جوانه‌زنی بذر، رسیدن میوه، پیری و ریزش اندام‌ها، بلکه از طریق قرار گرفتن گیاه در معرض انواع تنش‌های غیر زنده مختلف از قبیل سرما، گرما، کمبود عناصر غذایی، جراحت، غرقاب نیز اتفاق می‌افتد. شواهد حاکی از آن است که این افزایش تولید اتیلن می‌تواند از طریق افزایش سطوح رونوشت‌های آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز آن ایجاد شود (Rudus et al, 2012; Wang et al, 2016).

اگرچه بی‌شک وجود اتیلن برای رشد و نمو مناسب و بقای گیاه ضروری است، در برخی موارد ممکن است برای گیاهان زیان‌آور نیز باشد. افزایش تولید اتیلن در گونه‌های گیاهی حساس به سرما تنها یک نشانه از آسیب است که سبب صدمه زدن به رشد و سلامت گیاه می‌شود (Shi et al, 2012).

۴-۵ بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

۴-۵-۱ فعالیت آنزیم کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو گونه مقاوم و حساس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد میزان فعالیت کاتالاز در گونه SI Moneymaker (حساس به سرما) بیشتر از گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) بود. پس از اعمال تنش سرما ۴ درجه سانتی‌گراد، میزان فعالیت کاتالاز در هر دو گونه مقاوم و حساس کاهش یافت اما فعالیت آن در گونه مقاوم بیش از گونه حساس بود (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

فعالیت CAT بعد از ۵ روز تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به صورت قابل توجهی در LA1777 کاهش یافت (Liu et al, 2012). از بین چند آنزیم تجزیه‌کننده پراکسید هیدروژن، کاتالاز تنها آنزیمی است که برای تخلیه H₂O₂ نیازی به عامل احیاکننده ندارد. کاتالاز می‌تواند به طور مستقیم H₂O₂

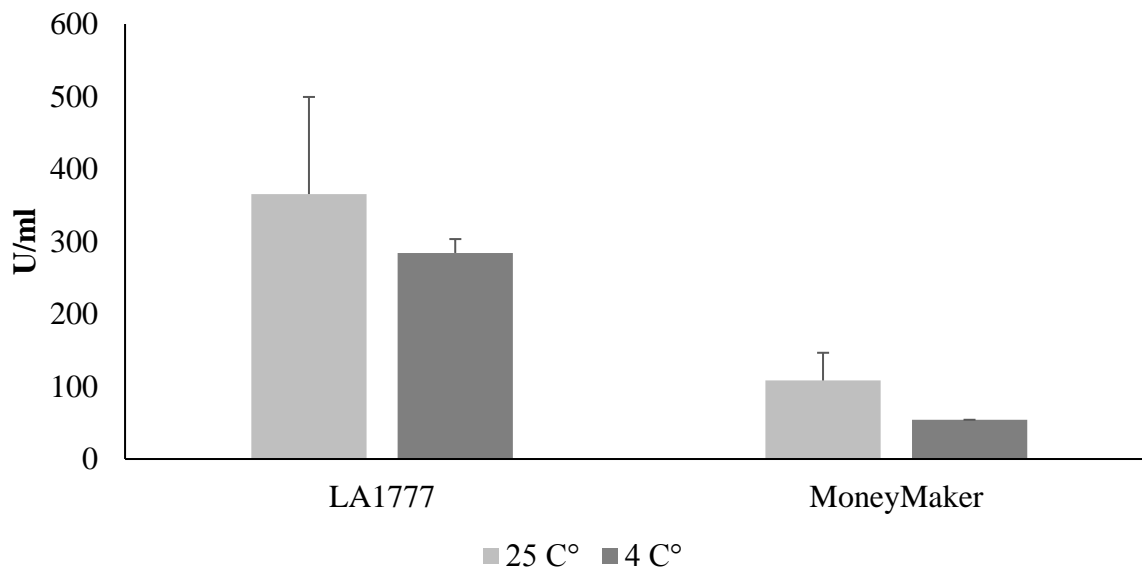
را به O₂ و H₂O تبدیل کند و در طول شرایط تنش برای سمیت زدایی ROSها ضروری است. CAT در حذف H₂O₂ در پروکسی زومها اهمیت دارد؛ اما در کلروپلاست، میتوکندری و سایر قسمت‌های سلول نیز یافت می‌شود. بیان و فعالیت CAT عموماً در پاسخ به تنش‌های محیطی مثل خشکی، شوری، سرما و ... افزایش می‌یابد (Czarnocka and Karpinski, 2018). کاهش غیر قابل پیش‌بینی و فعالیت پایین CAT می‌تواند به علت مهار ترجمه و غیرفعال شدن نوری^۱ تحت تنش، همچنین تاثیر تنش سرما بر ساختار و عملکرد پروتئین CAT و در نتیجه جلوگیری از فعالیت آنزیم باشد (Jan et al, 2018).

۴-۵-۲ فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان داد اعمال تنش سرما سبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم در هر دو گونه مقاوم و حساس می‌شود اما به طور کلی میزان فعالیت این آنزیم هم در شرایط کنترل و هم در شرایط تنش، در گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) بیشتر از گونه SI MoneyMaker (حساس به سرما) بود (شکل ۴-۱۱).

^۱ Photo-inactivation

آنزیم گایاکول پراکسیداز

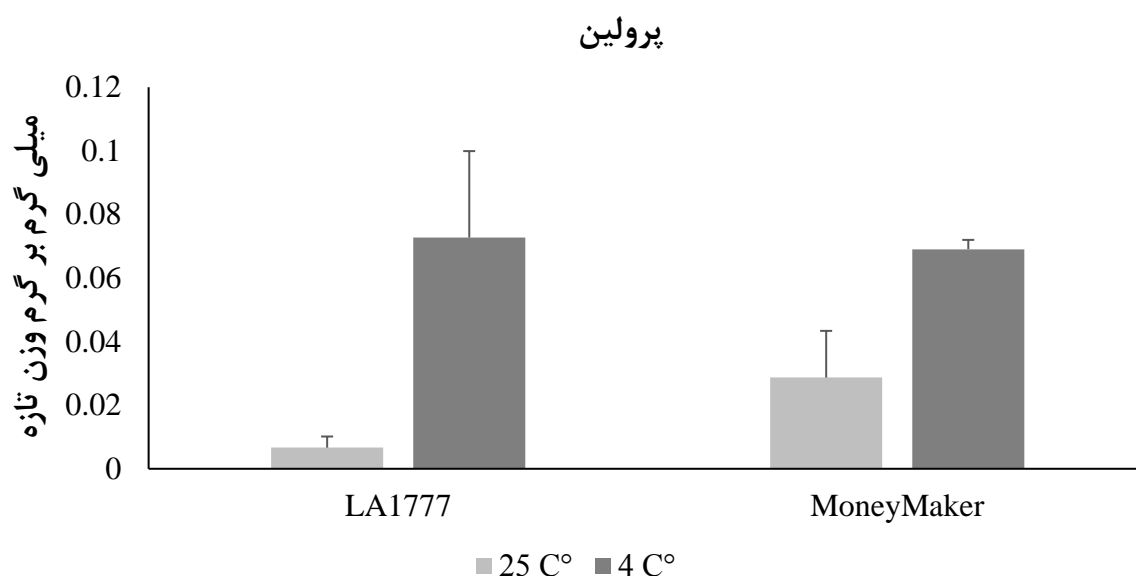


شکل ۴-۱۱ میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

Azzeme و همکاران (2016) پس از قرار دادن نخل‌های روغنی در معرض شدت‌های مختلف تنش خشکی مشاهده کردند که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌ها تحت تنش خفیف به شدت افزایش یافت اما تحت تنش متوسط افت کرد و تحت تنش خشکی شدید کاهش یافت. آنزیم گایاکول-پراکسیداز (GPOX) در دفاع در برابر تنش‌های غیر زنده از طریق مصرف H₂O₂ نقش دارد. اهداکنندگان الکترون آروماتیک مثل گایاکول را ترجیح می‌دهد. فعالیت GPOX به میزان قابل توجهی متنوع است که به گونه گیاهی و شرایط تنش بستگی دارد (Yahia et al, 2016).

۴-۶ پرولین

نتایج ارزیابی میزان پرولین حاکی از این بود که تجمع پرولین پس از اعمال شرایط تنش افزایش یافت. در تیمار کنترل و در شرایط یکسان تجمع پرولین در گونه مقاوم کمتر از گونه حساس بود اما پس اعمال تیمار سرمایی، نرخ افزایش پرولین در گونه Sh LA1777 بیش از گونه SI Moneymaker بود (شکل ۴-۱۲).



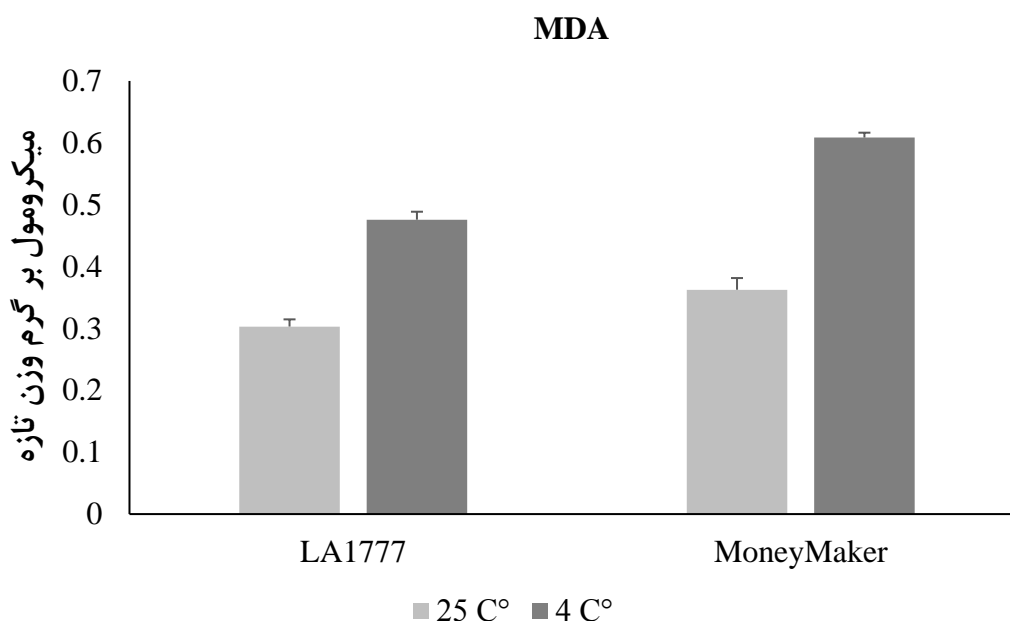
شکل ۴-۱۲ میزان پرولین در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

در مطالعه‌ای که توسط Ghanbari and Sayyari (2018) انجام شد، گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۴ برگی پس از ۶ روز قرار گرفتن در معرض دمای ۳ درجه سانتی‌گراد، نرخ پرولین در مقایسه با شرایط کنترل افزایش داشت. امروزه مشخص شده است که پرولین عملکردی چندگانه دارد. علاوه بر اسمولیت محافظتی، پرولین می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی نیز عمل کند. پرولین وقتی در بافت‌های گیاهی تجمع پیدا کند، می‌تواند در جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ROSها نقش مهمی داشته باشد، ممکن است DNA، غشا و کمپلکس‌های پروتئینی را تثبیت کند و یک منبع کربن و نیتروژن برای رشد بعد از رها شدن از شرایط تنش را فراهم کند. افزایش تجمع پرولین با تقویت تحمل

به تنش‌های غیر زنده مختلف از جمله شوری، خشکی و سرما همبستگی دارد. بدین ترتیب تجمع پرولین در گیاهان مقاوم به تنش بیشتر از گیاهان حساس به تنش است (Ben Rejeb et al, 2014; Dar et al, 2016).

۴-۷ اندازه‌گیری شاخص مالون دی‌آلدهید (MDA)

نتایج نشان داد قرار گرفتن هر دو گونه Sh LA1777 (مقاوم به سرما) و SI MoneyMaker (حساس به سرما) در معرض تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش میزان مالون دی‌آلدهید می‌شود که ناشی از پراکسیداسیون لیپید غشایی حاصل از تجمع ROSها است. پس از تیمار سرمایی میزان MDA در گونه‌های حساس نسبت به گونه‌های مقاوم افزایش بیشتری داشت (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳ میزان MDA در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد

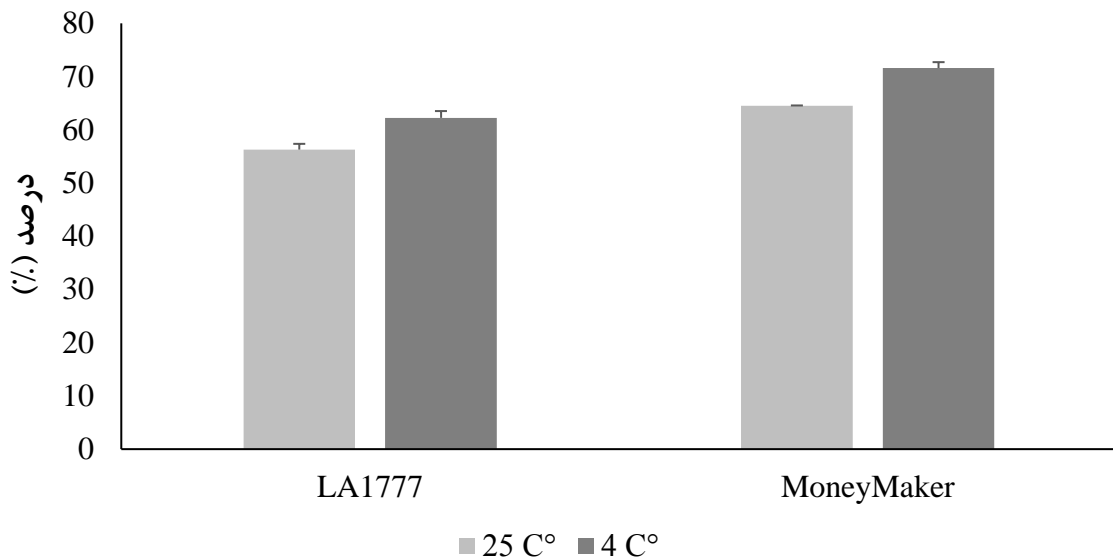
Duan و همکاران (2012) نیز پس از قرار دادن گوجه‌فرنگی‌های ۶ برگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت، افزایش تجمع MDA و نشت یونی را در گونه‌های حساس بیش

از گونه‌های مقاوم مشاهده کردند. آسیب‌های غشایی گاهی اوقات ممکن است به عنوان یک پارامتر مستقل برای تعیین سطح تجزیه لیپیدها تحت تنش‌های متفاوت در نظر گرفته شود. اثرات کلی پراکسیداسیون لیپید کاهش سیالیت غشا، افزایش نفوذ پذیری غشا نسبت به موادی که به طور معمول مگر از طریق کانال‌های خاص از آن عبور نمی‌کنند، آسیب به پروتئین‌های غشا، غیر فعال کردن گیرنده-ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی است. قرار دادن گیاهان در معرض تنش‌های غیر زنده مختلف، به علت افزایش تولید ROSها، موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید غشای سلول می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). MDA محصول پایانی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع غشا است. تشکیل و تجمع MDA یک شاخص مهم برای تفسیر آسیب‌های ناشی از تنش است (Moeini-korbekandi et al, 2014).

۸-۴ شاخص نشت الکترولیت

نتایج نشان داد قرار گرفتن در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش شاخص نشت الکترولیت در هر دو گونه SI MoneyMaker و SI LA1777 می‌شود. همان‌طور که انتظار می‌رفت نرخ افزایش نشت الکترولیت در گونه حساس به سرما بیش از گونه مقاوم به سرما بود (شکل ۴-۱۴).

نشت الکترولیت



شکل ۴-۱۴ درصد نشت الکترولیت در دو گونه حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه

سانتی‌گراد

Ding و همکاران (2017) شاهد افزایش نشت الکترولیت پس از ۲ روز قرار دادن گیاهچه‌های ۶ برگی گوجه‌فرنگی در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بودند. که این افزایش در گونه‌های حساس بیشتر از گونه‌های مقاوم بود. در گیاهان حساس به سرما، تغییر فاز ایجاد شده در غشای سلولی از حالت کریستال مایع به حالت ژل جامد و پراکسیداسیون لیپید حاصل از تجمع ROSها، منجر به افزایش نفوذ پذیری غشای سلول و در نتیجه افزایش انتشار الکترولیت‌ها می‌شود. میزان نشت الکترولیت از سلول‌های آسیب‌دیده از طریق اندازه‌گیری هدایت الکتریکی ارزیابی می‌شود. بنابراین نشت الکترولیت افزایش یافته یک شاخص معتبر برای آسیب غشا در نظر گرفته می‌شود (Kim et al, 2002).

۹-۴ ضریب همبستگی بین صفات بررسی شده

جدول ۲-۴ ضریب همبستگی بین صفات بررسی شده

	<i>SAM1</i>	<i>SAM2</i>	<i>SAM3</i>	<i>SAM4</i>	<i>CAT</i>	<i>GPX</i>	<i>MDA</i>	<i>EL</i>	<i>PRO</i>
<i>SAM1</i>									
<i>SAM2</i>	۰/۳۶								
<i>SAM3</i>	*۰/۷۷	*۰/۷۰							
<i>SAM4</i>	*۰/۷۹	*۰/۷۴	*۰/۸۷						
<i>CAT</i>	۰/۵۴	*۰/۷۱	*۰/۷۳	۰/۵۵					
<i>GPX</i>	-۰/۱۰	۰/۲۷	-۰/۱۶	-۰/۲۳	۰/۰۰				
<i>MDA</i>	۰/۴۳	۰/۵۴	۰/۴۱	*۰/۷۳	-۰/۰۶	-۰/۵۷			
<i>EL</i>	*-۰/۸۳	*-۰/۷۶	*-۰/۹۳	*-۰/۹۷	*-۰/۷۰	۰/۱۷	-۰/۵۸		
<i>PRO</i>	-۰/۴۱	-۰/۲۱	-۰/۱۶	-۰/۱۵	۰/۲۲	-۰/۱۷	-۰/۰۹	۰/۱۲	

با توجه به جدول ضریب همبستگی، بین ژن‌های *SAM1* و *SAM2* و ژن‌های *SAM3* و *SAM4* و ژن *SAM3* با ژن *SAM4* همبستگی مثبت وجود دارد. همچنین بین آنزیم کاتالاز و ژن‌های *SAM2* و *SAM3* و بین *MDA* با ژن *SAM4* نیز همبستگی مثبت مشاهده شد. بین شاخص نشت الکترولیت و ژن‌های *SAM1*، *SAM2*، *SAM3* و *SAM4* و همچنین آنزیم کاتالاز همبستگی منفی وجود داشت. وجود همبستگی منفی بین شاخص نشت الکترولیت و ژن‌های *SAM* را می‌توان به این صورت توجیه کرد، آنزیم *SAM* علاوه بر مسیر بیوسنتز اتیلن، در مسیر بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و لیگنین نیز فعالیت می‌کند که این ترکیبات در پاسخ به تنش‌های غیر زنده افزایش پیدا می‌کنند و سبب افزایش پایداری غشا و کاهش نشت الکترولیت می‌شوند. بدین ترتیب با توجه به نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر، سطوح بیان تمامی ژن‌های *SAM* مورد بررسی، در گونه حساس به سرما افزایش داشت؛ از طرفی در گونه مقاوم همزمان با افزایش سطوح بیان ژن‌های *SAM*، برخلاف گونه حساس به سرما، سطوح بیان ژن *ACO* کاهش یافت. همچنین میزان نشت الکترولیت نیز تحت شرایط تنش سرما در گونه مقاوم کمتر از گونه حساس بود. بنابراین افزایش بیان ژن‌های *SAM* منجر به افزایش تولید و فعالیت آنزیم

SAM، افزایش تولید پلی‌آمین‌ها و لیگنین، افزایش پایداری غشا و در نهایت کاهش نشت الکتروولیت می‌شود.

همبستگی منفی آنزیم کاتالاز و نشت الکتروولیت نیز می‌تواند بدین صورت تفسیر شود که به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی این آنزیم و هضم ROSها، هرچه فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتر باشد، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا کمتر شده و در نتیجه نشت الکتروولیت نیز کاهش می‌یابد.

فصل پنجم: نیچہ گیری و پیشہ نادات

۵-۱ نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر تنش سرما بر ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن در دو گونه گوجه‌فرنگی با مقاومت متفاوت به سرما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن‌های SAM که مسئول رمزگذاری S-AdoMet که یک پیش ماده در مسیر بیوسنتز اتیلن است در سیستم پاسخ به سرما درگیر هستند و در گونه‌های مختلف گوجه‌فرنگی رفتارهای متفاوتی از خود نشان دادند. تمامی ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل SAM1، SAM2، SAM3، SAM4، SAM5، ACS1 و ACO1 در گونه حساس به سرما افزایش بیان داشتند. در گونه مقاوم به سرما ژن‌های SAM1، SAM3، SAM4 و ACS1 افزایش بیان و بیان ژن‌های SAM2 و به ویژه ACO1 کاهش داشت. با توجه به اینکه S-AdoMet یک دهنده عمده گروه متیل در گیاهان است و به عنوان پیش ماده بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی شامل بیوسنتز پلی‌آمین، لیگنین و اتیلن استفاده می‌شود، صرف افزایش بیان ژن‌های SAM دلیلی برای افزایش تولید اتیلن محسوب نمی‌شود. از طرفی افزایش یا کاهش بیان ژن‌های ACS و ACO می‌تواند مبنای بهتری برای افزایش یا کاهش تولید اتیلن باشد، به ویژه آنزیم ACO که مرحله آخر بیوسنتز اتیلن را کاتالیز می‌کند. بنابراین افزایش همزمان بیان ژن‌های SAM و ACO در گونه حساس به سرما ممکن است دلیلی برای افزایش تولید اتیلن در این گونه باشد، ضمن اینکه حساسیت این گونه به سرما به صورت علائم پژمردگی و سرمازدگی قابل مشاهده بود. علاوه بر این در بسیاری از منابع به نقش منفی اتیلن در تنظیم پاسخ به سرما اشاره شده است. افزون بر این در گونه مقاوم به سرما علی‌رغم افزایش بیان ژن‌های SAM، بیان ژن ACO به شدت کاهش یافت. این مسئله می‌تواند نشانگر این باشد که در گونه‌های مقاوم S-AdoMet تولید شده در اثر افزایش بیان ژن‌های SAM از راه‌های دیگری به غیر از افزایش تولید اتیلن، سبب ایجاد مقاومت در این گونه شده باشند. همچنین پلی‌آمین و لیگنین از منابع بزرگ مصرف S-AdoMet هستند که با توجه به مطالعات پیشین در پاسخ به تنش‌های غیر زنده افزایش پیدا می‌کنند و سبب افزایش پایداری غشا می‌شوند امکان

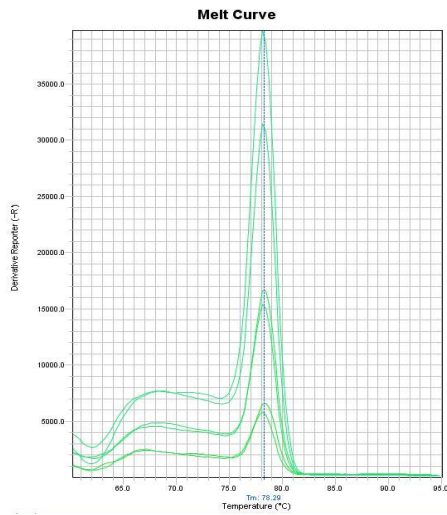
دارد بتوان درصد نشت الکتروولت پایین گونه مقاوم نسبت به گونه حساس تحت تنش سرما را با توجه به این مضمون توجیه کرد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در هر دو گونه مقاوم و حساس به سرما بعد از ۳ روز قرار گرفتن در معرض دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. در بسیاری از منابع گزارش شده است که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون کاتالاز در ۸ ساعت اول پس از قرار گرفتن در معرض تنش سرما رخ داده است و همزمان با افزایش طول دوره تنش سرمای می میزان فعالیت این آنزیم‌ها در ابتدا به سطوح اولیه خود بازگشته و سپس روند کاهشی در پیش گرفتند. در دمای پایین عملکرد سیستم‌های آنزیمی کاهش خواهد یافت زیرا به لحاظ ترمودینامیکی دمای پایین فعالیت آنزیم‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین میزان مالون‌دی‌آلدهید که شاخص پراکسیداسیون لیپید غشا است نیز تحت تنش سرما در هر دو گونه گوجه‌فرنگی افزایش داشت که با توجه به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تجمع ROSها تحت تنش امری طبیعی تلقی می‌شود. همچنین نرخ افزایش پرولین در گونه مقاوم به سرما بیش از گونه حساس تحت تنش سرمای بود. نقش مثبت پرولین در پاسخ به تنش‌های غیر زنده همچون سرما از طریق محافظت از آنزیم‌ها در برابر تغییر ماهیت در بسیاری از پژوهش‌های پیشین نشان داده شده است.

تحقیق فوق اولین گزارش علمی در زمینه بررسی بیان ژن‌های SAM تحت تنش سرما است که می‌تواند در درک بهتر نقش این ژن‌ها در پاسخ به سرما مورد استفاده قرار بگیرد.

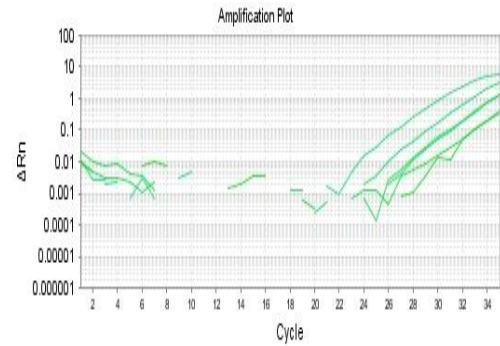
۵-۲ پیشنهادات

۱. بررسی میزان اتیلن تولید شده درون بافتی تحت تنش سرما
۲. بررسی همبستگی ژن‌های SAM و بیوسنتز لیگنین تحت تنش سرما
۳. بررسی همبستگی ژن‌های SAM و بیوسنتز پلی‌آمین‌ها تحت تنش سرما
۴. ایجاد لاین‌های موتانت برای هر یک از ژن‌های SAM و بررسی اثر تنش سرما بر آن‌ها

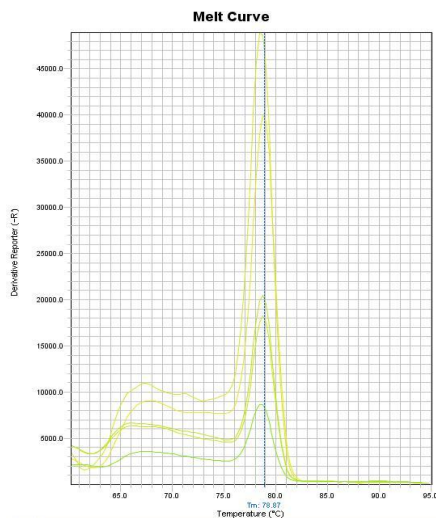
پوستها



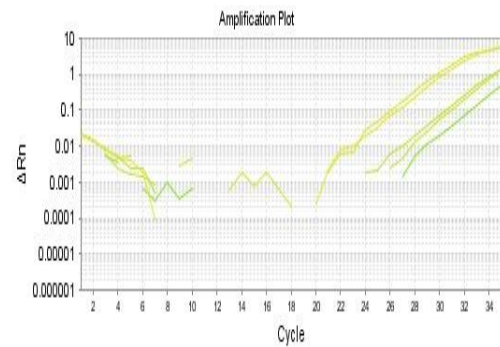
شکل ۲- منحنی ذوب ژن SAM1



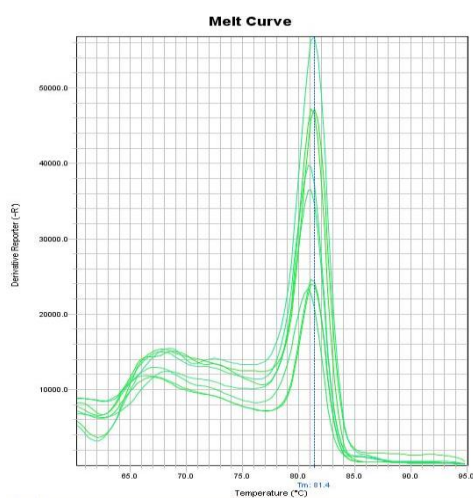
شکل ۱- منحنی تکثیر ژن SAM1



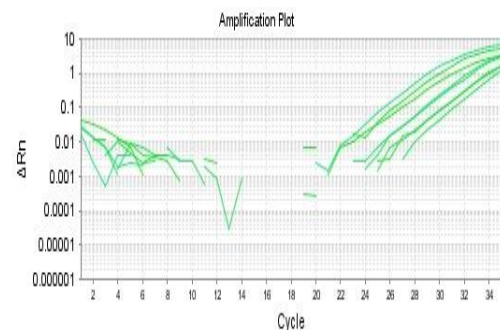
شکل ۴- منحنی ذوب ژن SAM2



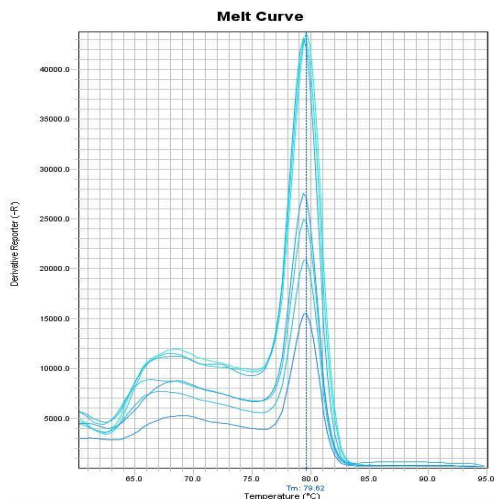
شکل ۳- منحنی تکثیر ژن SAM2



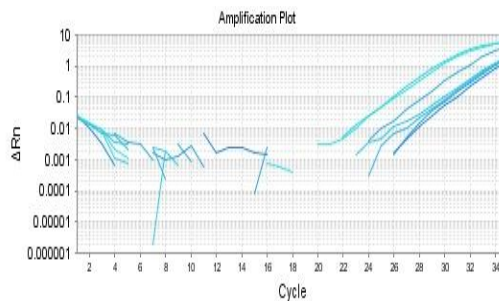
شکل ۶- منحنی ذوب ژن SAM3



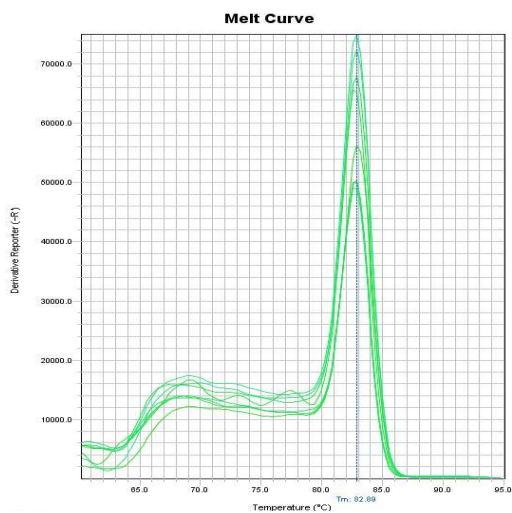
شکل ۵- منحنی تکثیر ژن SAM3



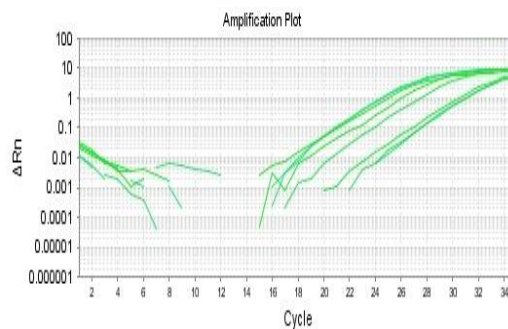
شکل ۸- منحنی ذوب ژن SAM4



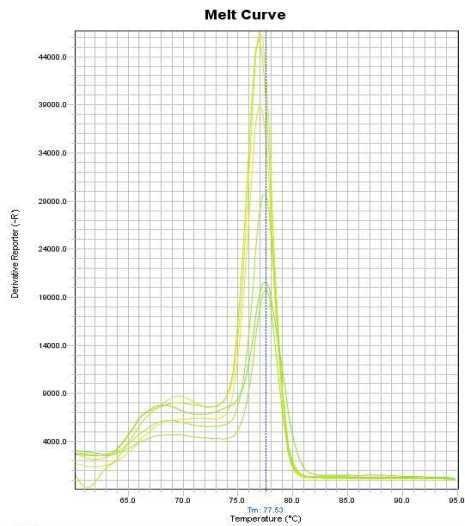
شکل ۷- منحنی تکثیر ژن SAM4



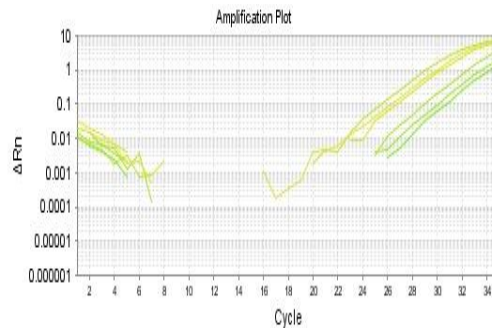
شکل ۱۰- منحنی ذوب ژن SAM5



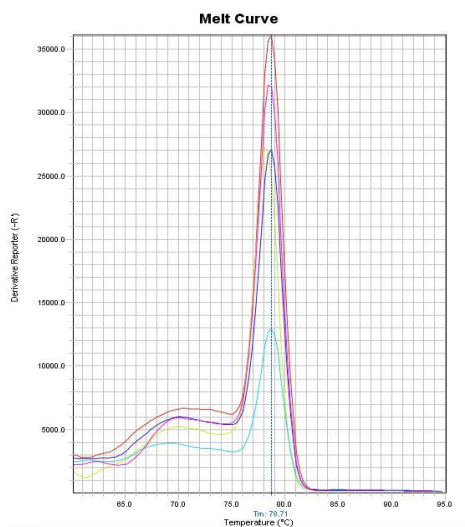
شکل ۹- منحنی تکثیر ژن SAM5



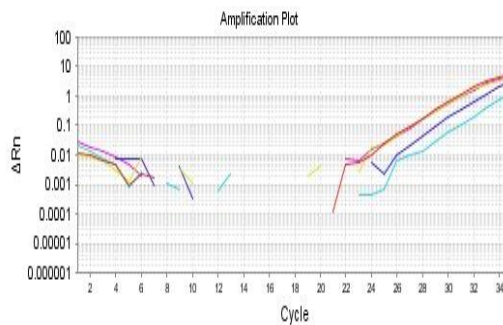
شکل ۱۲- منحنی ذوب ژن ACS1



شکل ۱۱- منحنی تکثیر ژن ACS1



شکل ۱۴- منحنی ذوب ژن ACO1



شکل ۱۳- منحنی تکثیر ژن ACO1

مرجع

- Abiri, R., Shaharuddin, N.A., Maziah, M., Yusof, Z.N.B., Atabaki, N., Sahebi, M., Valdiani, A., Kalhori, N., Azizi, P., Hanafi, M.M., 2017. Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environ. Exp. Bot.* 134, 33–44.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., 2010. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237–1249.
- Argueso, C.T., Hansen, M., Kieber, J.J., 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26, 92–105.
- Azzeme, A.M., Abdullah, S.N.A., Aziz, M.A., Wahab, P.E.M., 2016. Oil palm leaves and roots differ in physiological response, antioxidant enzyme activities and expression of stress-responsive genes upon exposure to drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 38, 1–12.
- Bai, Y., Lindhout, P., 2007. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Ann. Bot.* 100, 1085–1094.
- Barbosa, F., Arraes, M., Beneventi, M.A., Eugenia, M., Sa, L. De, Felipe, J., Paixao, R., Valeria, E., Albuquerque, S., Regina, S., Marin, R., Purgatto, E., Nepomuceno, A.L., Grossi-de-sa, M.F., 2015. Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biol.* 1–20.
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., Savouré, A., 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 278–284.
- Bergougnoux, V., 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol. Adv.* 32, 170–189.
- Bhowmik, D., Kumar, K.P.S., Paswan, S., Srivastava, S., 2012. Tomato-A Natural Medicine and Its Health Benefits. *Phytojournal* 1, 33–43.
- Booker, M.A., DeLong, A., 2015. Producing the Ethylene Signal: Regulation and Diversification of Ethylene Biosynthetic Enzymes. *Plant Physiol.* 169, 42–50.
- Chen, D., Ma, X., Li, C., 2014. A wheat aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, TaACO1, negatively regulates salinity stress in *Arabidopsis thaliana* 1815–

1827.

- Chen, H., Chen, X., Chen, D., Li, J., Zhang, Y., Wang, A., 2015. A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biol.* 15, 1–16.
- Chen, L., Yang, Y., Liu, C., Zheng, Y., Xu, M., Wu, N., Sheng, J., Shen, L., 2015. Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 962–968.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.-K., Sunkar, R., 2010. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. In: *Plant Stress Tolerance*. Springer, pp. 39–55.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444–451.
- Ciura, J., Kruk, J., 2018. Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 229, 32–40.
- Czarnocka, W., Karpiński, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol. Med.* 122, 4–20.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A., 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. Springer, pp. 155–166.
- Depaepe, T., Van Der Straeten, D., 2016. Ethylene. *Encycl. Appl. Plant Sci.* 1, 403–410.
- Ding, F., Liu, B., Zhang, S., 2017a. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 219, 264–271.
- Ding, F., Wang, M., Zhang, S., 2017b. Overexpression of a Calvin cycle enzyme SBPase improves tolerance to chilling-induced oxidative stress in tomato plants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 214, 27–33.
- Distelbarth, H., Nägele, T., Heyer, A.G., 2013. Responses of antioxidant enzymes to cold and high light are not correlated to freezing tolerance in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 15, 982–990.
- Duan, M., Feng, H.L., Wang, L.Y., Li, D., Meng, Q.W., 2012. Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato. *J. Plant Physiol.* 169, 867–877.

- Ebrahimi, M., Abdullah, S.N.A., Abdul Aziz, M., Namasivayam, P., 2016. Oil palm EgCBF3 conferred stress tolerance in transgenic tomato plants through modulation of the ethylene signaling pathway. *J. Plant Physiol.* 202, 107–120.
- Egea, I., Albaladejo, I., Meco, V., Morales, B., Sevilla, A., Bolarin, M.C., Flores, F.B., 2018. The drought-tolerant *Solanum pennellii* regulates leaf water loss and induces genes involved in amino acid and ethylene/jasmonate metabolism under dehydration. *Sci. Rep.* 8, 1–14.
- Elizondo, R., Oyanedel, E., 2010. Field Testing of Tomato Chilling Tolerance under Varying Light and Temperature Conditions. *Chil. J. Agric. Res.* 70, 552–558.
- Erba, D., Casiraghi, M.C., Ribas-Agustí, A., Cáceres, R., Marfà, O., Castellari, M., 2013. Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques. *J. Food Compos. Anal.* 31, 245–251.
- Eremina, M., Rozhon, W., Poppenberger, B., 2016. Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 797–810.
- Espartero, J., Pintor-Toro, J.A., Pardo, J.M., 1994. Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 25, 217–227.
- Fahimirad, S., 2013. Cold-induced Changes of Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxidation in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *J. Plant*
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Kononowicz, A.K., 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 120, 881–902.
- Ghanbari, F., Sayyari, M., 2018. Controlled drought stress affects the chilling-hardening capacity of tomato seedlings as indicated by changes in phenol metabolisms, antioxidant enzymes activity, osmolytes concentration and abscisic acid accumulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 229, 167–174.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gong, B., Li, X., Vandenlangenberg, K.M., Wen, D., Sun, S., Wei, M., Li, Y., Yang, F., Shi, Q., Wang, X., 2014. Overexpression of S-adenosyl-l-methionine synthetase increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnol. J.* 12, 694–708.
- González, M., Cid, M.C., Lobo, M.G., 2011. Usage of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds in health. In: *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp. 1123–1132.

- Guo, H., Ecker, J.R., 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 40–49.
- Iqbal, N., Trivellini, A., Masood, A., Ferrante, A., Khan, N.A., 2013. Current understanding on ethylene signaling in plants: The influence of nutrient availability. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 128–138.
- Jan, N., Majeed, U., Andrabi, K.I., John, R., 2018. Cold stress modulates osmolytes and antioxidant system in *Calendula officinalis*. *Acta Physiol. Plant.* 40, 0–16.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., Ovesná, J., 2010. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol.* 12, 395–405.
- Kazan, K., 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 20, 219–229.
- Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., 2018. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *J. Plant Physiol.* 226, 123–135.
- Khan, M.S., Ahmad, D., Khan, M.A., 2015. Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. *Electron. J. Biotechnol.* 18, 257–266.
- Kim, T.E., Kim, S.K., Han, T.J., Lee, J.S., Chang, S.C., 2002. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol. Plant.* 115, 370–376.
- Kimura, S., Sinha, N., 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop 3.
- Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., Bouzayen, M., Pirrello, J., 2018. Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant Sci.* 274, 137–145.
- Klay, I., Pirrello, J., Riahi, L., Bernadac, A., Cherif, A., Bouzayen, M., Bouzid, S., 2014. Ethylene response factor Sl-ERF.B.3 is responsive to abiotic stresses and mediates salt and cold stress response regulation in tomato. *Sci. World J.* 2014.
- Liu, H., Ouyang, B., Zhang, J., Wang, T., Li, H., Zhang, Y., Yu, C., Ye, Z., 2012. Differential Modulation of Photosynthesis, Signaling, and Transcriptional Regulation between Tolerant and Sensitive Tomato Genotypes under Cold Stress. *PLoS One* 7.
- Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., Liu, J., 2013. The Low Temperature Induced Physiological Responses of 2013, 1–8.
- Ma, C., Wang, Y., Gu, D., Nan, J., Chen, S., Li, H., 2017. Overexpression of S-

- adenosyl-L-methionine synthetase 2 from sugar beet M14 increased arabidopsis tolerance to salt and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–16.
- Ma, X., Chen, C., Yang, M., Dong, X., Lv, W., Meng, Q., 2018. Cold-regulated protein (SICOR413IM1) confers chilling stress tolerance in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 124, 29–39.
- Maleki, M., Ghorbanpour, M., 2018. *Cold Tolerance in Plants: Molecular Machinery Deciphered, Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants.* Elsevier Inc.
- Medina, T., Gabriela, S., Figueroa, A., Gustavo, J., Cauih, D., 2017. Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México.
- Miura, K., Furumoto, T., 2013. Cold signaling and cold response in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5312–5337.
- Moieni-korbekandi, Z., Karimzadeh, G., Sharifi, M., 2014. Cold-induced Changes of Proline, Malondialdehyde and Chlorophyll in Spring Canola Cultivars 4, 1–11.
- Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *Plant Physiol.* 169, 32–41.
- Ntatsi, G., Savvas, D., Kläring, H.-P., Schwarz, D., 2014. Growth, Yield, and Metabolic Responses of Temperature-stressed Tomato to Grafting onto Rootstocks Differing in Cold Tolerance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139, 230–243.
- Peleg, Z., Blumwald, E., 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 290–295.
- Quinet, M., Dubois, C., Goffin, M.-C., Chao, J., Dielen, V., Batoko, H., Boutry, M., Kinet, J.-M., 2006. Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *J. Exp. Bot.* 57, 1381–1390.
- Roeder, S., Dreschler, K., Wirtz, M., Cristescu, S.M., Van Harren, F.J.M., Hell, R., Piechulla, B., 2009. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. *Plant Mol. Biol.* 70, 535–546.
- Roje, S., 2006. S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67, 1686–1698.
- Ruduś, I., Sasiak, M., Kepczyński, J., 2013. Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiol. Plant.* 35, 295–307.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Hurry, V., 2009. Chapter 2 Cold

Signalling and Cold Acclimation in Plants, 1st ed, Advances in Botanical Research. Elsevier Ltd.

- Sánchez-Aguayo, I., Rodríguez-Galán, J.M., García, R., Torreblanca, J., Pardo, J.M., 2004. Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220, 278–285.
- Sant’Ana, D.V.P., Lefsrud, M., 2018. Tomato proteomics: Tomato as a model for crop proteomics. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 239, 224–233.
- Schaller, G.E., 2012. Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biol.* 10, 9.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., Yang, S., 2012. Ethylene Signaling Negatively Regulates Freezing Tolerance by Repressing Expression of *CBF* and Type-A *ARR* Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2578–2595.
- Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S., Yim, W. jong, Sa, T., 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 427–434.
- Sun, X., Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S.K., Wang, Y., Chen, L., Li, S., Xin, H., 2016. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. *Sci. Rep.* 6, 1–14.
- Tsuchisaka, A., Yu, G., Jin, H., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, X., Gao, S., Theologis, A., 2009. A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*.
- udesh Kumar Yadav, , 2009. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 50, 1–13.
- Vanderstraeten, L., Van Der Straeten, D., 2017. Accumulation and Transport of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) in Plants: Current Status, Considerations for Future Research and Agronomic Applications. *Front. Plant Sci.* 8, 1–18.
- Wang, B., Wang, Y., Li, J., 2017. Hormone Metabolism and Signaling in Plants Strigolactones, Hormone Metabolism and Signaling in Plants.
- Wang, K.L.-C., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14, S131–S151.
- Wang, X., Oh, M.W., Komatsu, S., 2016. Characterization of S-adenosylmethionine

- synthetases in soybean under flooding and drought stresses. *Biol. Plant.* 60, 269–278.
- Weiss, J., Egea-Cortines, M., 2009. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *J. Appl. Genet.* 50, 311–319.
- Xu, S.C., Li, Y.P., Hu, J., Guan, Y.J., Ma, W.G., Zheng, Y.Y., Zhu, S.J., 2010. Responses of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings. *Agric. Sci. China* 9, 1594–1601.
- Yahia, N., Bouira, A., Cheriet, C., Zohra Fyad-Lameche, F., 2016. Aerials and Roots Vegetative Tissues Differ in Guaiacol Peroxidases Responses to Cold Stress in Two Contrasting *Medicago ciliaris* Populations. *Mol. Plant Breed.*
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance To Dehydration and Cold Stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803.
- Yang, L., Zu, Y.G., Tang, Z.H., 2013. Ethylene improves Arabidopsis salt tolerance mainly via retaining K⁺ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na⁺ content. *Environ. Exp. Bot.* 86, 60–69.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E., 1984. Yang1984.
- Yin-hual, C., Bol, O., Han-xia, L.I., Zhi-biaol, Y.E., 2006. isolation and Characterization of El I Gene Promoter from Tomato. *Agric. Sci. China* 5, 661–669.
- Yu, C., Song, L., Song, J., Ouyang, B., Guo, L., Shang, L., Wang, T., Li, H., Zhang, J., Ye, Z., 2018. ShCIGT, a Trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with SnRK1 in tomato. *Plant Sci.* 270, 140–149.
- Yu, Y., Yang, D., Zhou, S., Gu, J., Wang, F., Dong, J., Huang, R., 2017. The ethylene response factor OsERF109 negatively affects ethylene biosynthesis and drought tolerance in rice. *Protoplasma* 254, 401–408.
- Zhang, T., Zhao, X., Wang, W., Pan, Y., Huang, L., Liu, X., Zong, Y., Zhu, L., Yang, D., Fu, B., 2012. Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in two contrasting rice genotypes. *PLoS One* 7.
- Zhang, X., Fowler, S.G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S.Y., Stockinger, E.J., Thomashow, M.F., 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant J.* 39, 905–919.
- Zhang, Z., Huang, R., 2010. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 73, 241–249.

Zhang, Z., Zhang, H., Quan, R., Wang, X.-C., Huang, R., 2009. Transcriptional Regulation of the Ethylene Response Factor LeERF2 in the Expression of Ethylene Biosynthesis Genes Controls Ethylene Production in Tomato and Tobacco. *Plant Physiol.* 150, 365–377.

Abstract

Tomato plants are sensitive to cold with a vast, global culture. Ethylene hormone interferes with non-living stresses such as cold stress. Therefore, aimed at better understanding of the mechanisms of cold responses in tomato, the activity of antioxidant enzymes and the expression of some genes that are involved in the biosynthesis of ethylene was investigated in the two different species including *S.habrochaites* (resistant to cold) and *S.lycopersicum* (sensitive To cold). The results showed that under temperature stress of 4 ° C, SAM1, SAM2, SAM3, SAM4, SAM5, ACS1 and ACO1 genes had increased expression in sensitive species, whereas under cold stress in resistant species SAM1, SAM3 , SAM4 and ACS1 increased expression and SAM2 and ACO1 genes reduced expression, and there was no significant change in expression of SAM5 gene. The difference in the expression of ACO1 gene under cold stress in two resistant and sensitive species indicates that ethylene might negatively regulates cold tolerance in tomatoes. Also, the activity of antioxidant enzymes such as catalase and guaiacol peroxidase decreased under stress conditions in both tomato species. The increase in electrolyte leakage and malondialdehyde was also lower in resistant species in comparison to sensitive species at 4 °C. The results of this study are the first report of the role of SAM genes in cold stress, which can be used to identify cellular signaling paths and to create resistant lines.

Key words: Tomato, Cold Stress, Ethylene, Gene Expression, SAM, ACS, ACO



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Agriculture

**M.Sc. Thesis in Horticultural science-Biotechnology and Molecular
Genetic of Horticultural Crops**

**Study of cold stress effect on expression pattern
of ethylene signaling involved genes in tomato**

By: Soosan Hasanzadeh

**Supervisor:
Dr. Ziba Ghasimi Hagh
Dr. Parviz Heidari**

**Advisor:
Dr. Hojjatollah Bodaghi**

Jan, 2019