

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی

مطالعه بیان ژن های درگیر در بیوسنتز سلولز در ژنوتیپ های

حساس و مقاوم گوجه فرنگی تحت تنش دمای پایین

نگارنده: فاطمه ایزانلو

اساتید راهنما

دکتر پرویز حیدری

دکترزینا قسیمی حق

بهمن ۱۳۹۷

تقدیم به

پدر و مادر مهربانم

که در سختی ها و دشواری های زندگی پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بودند.

تقدیر و تشکر

سپاس 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

چشمی از دامن دیدارش کوتاه است و اندیشه و فم وصف کنندگان از وصفش عاجز است. (صحیفه سجادیه)

به رسم ادب و به رسم شاکردی از محضر اساتید راهنمای گرامی سرکار خانم دکتر زیبا قیمی حق و جناب آقای دکتر پرویز

حیدری کمال سپاس را دارم که بازحات بی دریشان یاری رسان من در طول پایان نامه بودند. و از اساتید محترم، جناب

آقای دکتر امین ابراهیمی و جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک که زحمت داوری 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.

همچنین از دوست عزیزم سوسن حن زاده، و بهکلاسی های محترم آقایان سعید خانی، امیر صفاری، محمد نجاری و علی اکبر

زمندی که در تمام مراحل پایان نامه یاری ام نمودند سپاسگذارم.

تعمدنامه

اینجانب فاطمه ایزانلو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه بیان ژن های درگیر در بیوسنتز سلولز در ژنوتیپ های حساس و مقاوم گوجه فرنگی تحت تنش دمایی پایین تحت راهنمایی دکتر زیبا قسیمی حق و دکتر پرویز حیدری متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه 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 می باشد 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 پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، 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 می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

چکیده

گوجه‌فرنگی از جمله گیاهان گرمسیری است که نسبت به دماهای پایین حساس است و کاهش دما در همه مراحل رشد باعث تخریب دیواره سلولی و در نتیجه کاهش مقاومت به سرما می‌شود. در این پژوهش، الگوی بیان ژن‌های بیوسنتز سلولز و محتوی برخی آنزیم‌ها تحت تنش دمای پایین در دو گونه حساس به سرما (*S. lycopersicum cv. Moneymaker*) و مقاوم به سرما (*S. habrochaites LA1777*) گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ژن‌های *CesA1*، *CesA2* و *CesA5* دارای الگوهای بیان متفاوتی در گونه‌های مورد مطالعه بودند. بطوریکه در *S. lycopersicum cv. Moneymaker* افزایش بیان و در *S. habrochaites LA1777* کاهش بیان نشان دادند. ژن *CesA3* یکی از ژن‌های کلیدی در سنتز سلولز در دیواره سلولی است که تخریب و یا از بین رفتن آن باعث تخریب و مرگ گیاه می‌شود این ژن در گونه مقاوم بیشتر از حساس تحریک گردید. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اثر تنش سرما افزایش نشان داد به نحوی که در *S. habrochaites LA1777* بیشتر از *S. lycopersicum cv. Moneymaker* بود. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش سرما کاهش داشت که در *S. habrochaites LA1777* نسبت به گونه حساس بیشتر بود. میزان فعالیت مالون دی آلدئید و پرولین افزایش داشتند همچنین میزان پایداری غشا در هر دو گونه کاهش یافت که میزان کاهش در *S. lycopersicum cv. Moneymaker* بیشتر بود که نتایج نشان داد که تنش سرما باعث تخریب و از بین رفتن دیواره سلولی در گونه حساس *S. lycopersicum cv. Moneymaker* گردید و حساسیت به سرما را در این گونه را افزایش داد. نتایج تحقیق فوق حاکی از نقش ژن‌های سلولز سنتاز در تنش دمای پایین است و بعنوان اولین گزارش در زمینه الگوی بیان این ژن‌ها انجام شده است که می‌تواند در مطالعات عملکردی ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گوجه‌فرنگی، سرما، ژن‌های بیوسنتز سلولز، *CesA*

فهرست مطالب

۱	مقدمه (فصل اول).....
۲	۱-۱-۱ مقدمه.....
۳	۱-۱-۲ اهداف.....
۴	۱-۲ کلیات.....
۴	۱-۲-۱ خاستگاه.....
۴	۱-۲-۲ ارزش غذایی.....
۴	۱-۲-۳ آمار تولید ایران و جهان.....
۶	۱-۲-۴ گیاه‌شناسی.....
۷	۱-۲-۵ تنش.....
۷	۱-۲-۶ انواع تنش‌های محیطی.....
۱۰	۱-۲-۷ تشخیص سیگنال سرما و احساس دمای پایین.....
۱۱	۱-۲-۸ نشانه‌های خسارت سرمازدگی.....
۱۱	۱-۲-۹ خسارت مستقیم سرمازدگی.....
۱۳	۱-۲-۱۰ اثرات تنش سرمایی در سطح سلولی و نشت مواد محلول از غشاها.....

۱۱-۲-۱۱ اثرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تنش سرما بر گیاهان ۱۴

۱۲-۲-۱۲ تاثیرات سرما روی گوجه‌فرنگی ۱۵

۱۳-۲-۱۳ سازگاری به سرما ۱۵

۱۴-۲-۱۴ مقاومت به سرمازدگی ۱۷

۱۵-۲-۱۵ اختلال در فعالیت آنزیم‌ها ۱۸

۱۷-۲-۱۷ تنظیم‌کننده‌های اسمزی ۲۲

۱۸-۲-۱۸ دیواره سلولی ۲۴

۱۹-۲-۱۹ سلولز ۲۸

۳۳ مرور منابع (فصل دوم)

۱-۲-۱ سیگنال‌های درگیر در تنش سرما ۳۴

۲-۲ بررسی مسیرهای پاسخ به تنش سرما از دیدگاه مولکولی ۳۵

۳-۲ تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به دمای پایین ۳۷

۴-۲ ژن‌های تنظیم‌کننده پاسخ سرما ۳۸

۵-۲ بررسی اثر دمای پایین در گوجه‌فرنگی ۳۹

۶-۲ بررسی تغییرات دیواره سلولی در تنش سرما ۴۰

۷-۲ بررسی بیان ژن ۴۲

۸-۲ بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ۴۳

۴۵ مواد و روش‌ها (فصل سوم)

- ۱-۳ کشت مواد گیاهی و اعمال تیمارها در مرحله گیاهچه‌ای ۴۶
- ۳-۲ بررسی‌های بیوانفورماتیک ۴۶
- ۳-۲-۱ شناسایی ژن‌ها ۴۶
- ۳-۲-۲ رسم درخت فیلوژنتیک ۴۷
- ۳-۳ بررسی بیان ژن ۴۷
- ۱-۳-۳ استخراج RNA از برگ و ساقه گوجه فرنگی ۴۷
- ۳-۳-۲ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ۴۷
- ۳-۳-۳ حذف نمک‌ها ۴۸
- ۳-۳-۴ حذف DNA ژنومی از RNA ۴۸
- ۳-۳-۵ ساخت cDNA از نمونه‌های RNA ۴۹
- ۳-۳-۶ بررسی cDNA و آغازگرهای مورد مطالعه ۵۰
- ۳-۳-۷ واکنش q RT-PCR ۵۱
- ۳-۳-۸ انتخاب ژن‌ها و طراحی آغازگر جهت مطالعه بیان ژن ۵۲
- ۴-۳ بررسی تغییرات آنزیمی ۵۳
- ۱-۴-۳ تهیه بافر استخراج ۵۳
- ۲-۴-۳ استخراج محلول آنزیمی ۵۳
- ۳-۴-۳ اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز ۵۴
- ۳-۴-۴ روش اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۵۶
- ۳-۴-۵ عصاره‌گیری جهت سنجش فعالیت آنزیمی ۵۶

۳-۴-۶ محاسبه فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۵۶

۳-۴-۷ پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی‌آلدهید ۵۸

۳-۴-۸ اندازه‌گیری فعالیت پرولین ۵۸

۳-۴-۹ روش اندازه‌گیری میزان نشت یونی (EL) و شاخص پایداری غشا (MSI) ۶۰

۳-۵ آنالیز داده‌ها ۶۱

نتایج و بحث (فصل چهارم) ۶۳

۴-۱ نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک ۶۴

۴-۲-۱ آنالیز داده‌های ProtParam ۶۴

۴-۲-۲ ترسیم درخت فیلوژنتیک ۶۷

۴-۳ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa ۶۹

۴-۳-۱ بررسی کیفیت و کمیت RNA ۶۹

۴-۳-۲ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa1 ۷۰

۴-۳-۳ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa2 ۷۲

۴-۳-۴ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa3 ۷۴

۴-۳-۵ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa4 ۷۵

۴-۳-۶ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن Cesa5 ۷۷

۴-۴ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها ۷۹

۴-۴-۱ اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز ۷۹

۴-۴-۲ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۸۰

۴-۴-۳ اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید ۸۱

۴-۴-۴ اندازه‌گیری میزان پرولین ۸۲

۴-۴-۵ اندازه‌گیری پایداری غشا ۸۴

۴-۵ تعیین ضریب همبستگی بین صفات مورد مطالعه ۸۵

۸۹ نتیجه‌گیری و پیشنهادات (فصل پنجم)

۵-۱ نتیجه‌گیری ۹۰

۵-۲ پیشنهادات ۹۱

۹۳ فهرست منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ سطح زیر کشت گوجه فرنگی در کشورهای برتر ۵
- شکل ۱-۲ میزان تولید در هکتار گوجه فرنگی در کشورهای برتر ۵
- شکل ۱-۳ رده بندی کران کوئیست (Cronquist phylogenetic) و نمای شماتیک از گیاه گوجه فرنگی (*lycopersicon esculentum*) ۷
- شکل ۱-۴ گونه های اکسیژن فعال و مکانیسم دفاعی آنزیم های ضداکسنده ۲۰
- شکل ۱-۵ مراحل بیوسنتز پرولین: P5C دلتا - پرولین - ۵- کربوکسیلات: P5CR دلتا - پرولین - ۵- کربوکسیلات ردوکتاز، P5CS دلتا - پرولین - ۵- کربوکسیلات سنتتاز ۲۴
- شکل ۱-۴ درخت فیلوژنتیک توالی پروتئینی مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه فرنگی ۶۸
- شکل ۲-۴ بررسی کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد ۷۰
- شکل ۳-۴ بیان نسبی ژن *CesA1* در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی گراد در دو گونه حساس *S. habrochaites LA1777* و *lycopersicum cv. Moneymaker* ۷۱
- شکل ۴-۴ منحنی تکثیر بیان ژن *CesA1* ۷۰
- شکل ۴-۵ منحنی ذوب بیان ژن *CesA1* ۷۲
- شکل ۴-۶ بیان نسبی ژن *CesA2* در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی گراد در دو گونه حساس *S. habrochaites LA1777* و *lycopersicum cv. Moneymaker* ۷۳
- شکل ۴-۷ منحنی تکثیر بیان ژن *CesA2* ۷۱
- شکل ۴-۸ منحنی ذوب بیان ژن *CesA2* ۷۳

- شکل ۴-۹ بیان نسبی ژن Cesa3 در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس S. lycopersicum cv. Moneymaker و گونه مقاوم S. habrochaites LA1777 ۷۵
- شکل ۴-۱۰ منحنی تکثیر بیان ژن Cesa3 ۷۳
- شکل ۴-۱۱ منحنی ذوب بیان ژن Cesa3 ۷۵
- شکل ۴-۱۲ بیان نسبی ژن Cesa4 در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس S. lycopersicum cv. Moneymaker و گونه مقاوم S. habrochaites LA1777 ۷۷
- شکل ۴-۱۳ منحنی تکثیر بیان ژن Cesa4 ۷۴
- شکل ۴-۱۴ منحنی ذوب بیان ژن Cesa4 ۷۷
- شکل ۴-۱۵ بیان نسبی ژن Cesa5 در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس S. lycopersicum cv. Moneymaker و گونه مقاوم S. habrochaites LA1777 ۷۸
- شکل ۴-۱۶ منحنی تکثیر بیان ژن Cesa5 ۷۷
- شکل ۴-۱۷ منحنی ذوب بیان ژن Cesa5 ۷۸
- شکل ۴-۱۸ بررسی میزان فعالیت کاتالاز ۷۹
- شکل ۴-۱۹ بررسی میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز ۸۱
- شکل ۴-۲۰ بررسی میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدهید ۸۲
- شکل ۴-۲۱ بررسی میزان فعالیت پرولین ۸۳
- شکل ۴-۲۲ بررسی میزان پایداری غشا ۸۵

فهرست جداول

- جدول ۱-۳ لیست ترکیبات جهت حذف DNA ژنومی ۴۹
- جدول ۲-۳ لیست ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA ۴۹
- جدول ۳-۳ چرخه دمایی سنتز cDNA (PCR) ۵۰
- جدول ۴-۳ ترکیبات واکنش PCR ۵۰
- جدول ۵-۳ چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ۵۱
- جدول ۶-۳ لیست ترکیبات مواد برای واکنش qPCR ۵۱
- جدول ۷-۳ سیکل دمایی برای واکنش q RT-PCR ۵۲
- جدول ۸-۳ لیست ژن‌ها و پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق ۵۲
- جدول ۹-۳ مواد استفاده شده برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ۵۴
- جدول ۱-۴ نتایج حاصل از آنالیز توالی پروتئینی سایت PorotParam ۶۵
- جدول ۲-۴ تعیین ضریب همبستگی بین ژن‌های Cesa ۸۲
- جدول ۳-۴ تعیین ضریب همبستگی بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ۸۳

مقدمه (فصل اول)

۱-۱-۱ مقدمه

رشد و عملکرد گیاهان تابعی از عوامل محیطی و اثرات متقابل آنها است، این عوامل شامل عوامل آب و هوایی (بارندگی، دما، رطوبت، نور و باد)، رطوبت خاک، مواد غذایی و گازها بوده که بسته به مقدار آنها در محیط، رشد و نمو گیاه را افزایش یا کاهش می‌دهند. به علاوه، همه این عوامل برهم زننده تعادل آبی در سلول نظیر سرما، خشکی و شوری نقش مهمی در توزیع جغرافیایی گیاهان دارند (امام و همکاران، ۱۳۸۴). در موجودات زنده، تنش به معنی انحراف معنی‌دار از شرایط نرمال برای زندگی تعریف شده است. تنش‌های محیطی به دو گروه تنش‌های زیستی و تنش‌های غیرزیستی تقسیم می‌شوند. تنش‌های غیرزیستی شامل تنش‌های مربوط به آسیب‌های مکانیکی، ناهنجاری و اختلالات ناشی از افزایش و کاهش حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در گیاه و کاربرد علف‌کش‌ها، مشکلات ناشی از امواج الکترومغناطیس و تنش‌های مرتبط با آب، خاک و دما است. تنش سرما مهم‌ترین تنش محیطی دوران جوانه‌زنی گیاهان محسوب می‌شود. دمای پایین در مرحله جوانه‌زنی موجب استقرار نامناسب گیاه می‌شود و رشد ضعیف گیاهچه در این مرحله دستیابی به عملکرد مطلوب را تحت تاثیر قرار می‌دهد (ویتاموس و همکاران، ۲۰۰۸؛ ین و همکاران، ۲۰۰۹). در مناطق معتدله و در مورد گیاهانی که در فصل گرم کشت می‌شوند، مخصوصاً در جایی که کشت زود هنگام از هر نظر دارای مزایای فراوانی است، آسیب سرما امری اجتناب‌ناپذیر است. کشت زود هنگام دارای مزایای فراوانی است، به طوری‌که کشت زود هنگام به کشاورز این اجازه را می‌دهد تا بتواند به راحتی محصول خود را قبل از بارش باران و یا وقوع یخبندان برداشت کرده و یا در شرایط رقابتی در بازار، این نوع کشت کشاورز را قادر می‌کند تا محصول خود را زودتر به بازار ارائه دهد که از نظر اقتصادی بسیار مهم است. همچنین کشت زود هنگام به گیاه اجازه می‌دهد تا بتواند به راحتی از عوامل نامساعد محیطی

در هنگام گلدهی فرار کند و از آسیب‌های ناشی از آفات و بیماری‌های آخر فصل دور بماند. فواید و مزیت‌های کشت زود هنگام باعث شده است که محققین به مطالعه مقاومت به تنش سرما، در هنگام جوانه‌زنی، سبز شدن و استقرار گیاهچه علاقمند شوند.

تنش کاهش دما یک عامل کلیدی در کاهش عملکرد و دامنه کشت گیاه گوجه‌فرنگی محسوب می‌شود و همچنین در کشت‌های گلخانه‌ای، میزان مصرف انرژی را افزایش می‌دهد. این افزایش مصرف سوخت سبب افزایش هزینه‌ها و گازهای گلخانه‌ای می‌شود و افزایش این گازها باعث گرم شدن کره زمین می‌شود. بنابراین اصلاح گوجه‌فرنگی در راستای بهبود مقاومت به تنش کاهش دما، می‌تواند گامی بلند در توسعه این گیاه باشد. جهت اصلاح گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، شناخت مکانیسم‌های پاسخی گیاهان در برابر این تنش‌ها امر ضروری است. با توجه به اهمیت دیواره سلولی در گیاهان که به عنوان یک سپر دفاعی در برابر تنش‌های محیطی عمل می‌کند اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی تغییرات ترکیبات دیواره سلولی از جنبه‌های مولکولی (بررسی فعالیت ژن‌ها) و فیزیولوژیکی (پایداری غشاء، فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها) در گوجه‌فرنگی صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق گونه‌های حساس و مقاوم تحت شرایط دمای پایین و نرمال جهت بررسی تغییرات در دیواره سلولی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-۱-۱ اهداف

۱- کدامیک از ژن‌های بیوسنتز سلولز CesA در پاسخ به تنش دمای پایین بیشتر تغییر می‌کند.

۲- تنش دمای پایین چگونه بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی تاثیرگذار است

۱-۲ کلیات

۱-۲-۱ خاستگاه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicom L*) یکی از گیاهان مهم اقتصادی است. این گیاه بومی آمریکای جنوبی و مرکزی است. اهلی کردن گوجه‌فرنگی در مکزیک انجام شده بود نام *Lycopersicon esculentum Mille* توسط میلر در سال ۱۳۷۸ تعیین شد و بعدها به صورت جهانی مورد قبول همه محققین قرار گرفت. میلر جنس *Lycopersicon* را به دو زیر جنس *Eulypersicon* میوه قرمز و *Eripersicon* میوه سبز تقسیم‌بندی کرد. *Lycopersicon* دارای نه گونه است (قنادها و همکاران، ۱۳۸۲).

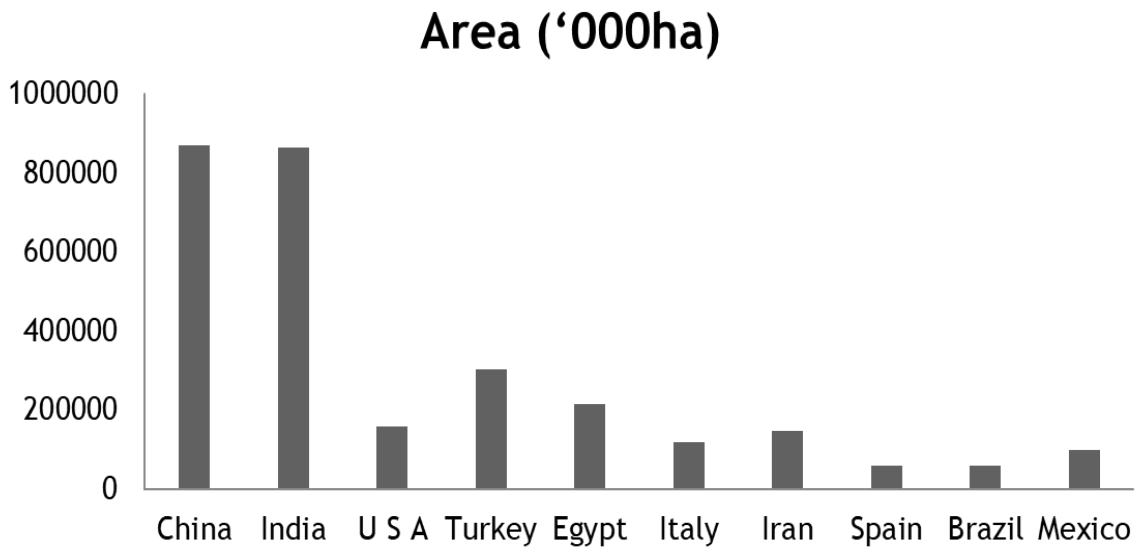
۱-۲-۲ ارزش غذایی

گوجه‌فرنگی در میان سبزیجات و میوه‌ها دارای بالاترین مقدار ویتامین و مواد معدنی است (استون، ۱۹۷۴). گوجه‌فرنگی نقش بزرگی در تغذیه انسان‌ها دارد. گوجه‌فرنگی بهترین منبع فسفر و روی و ویتامین A و B و C است (کوبلی و استیل، ۱۹۷۶؛ ورلا و همکاران، ۲۰۰۳؛ نیاکا و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین دارای اسید فولیک، اسید پنتوتنیک، بیوتین، ویتامین K، اسید نیکوتینیک، ریوفلاوین و تیامین است. مواد جامد محلول میوه شامل قندها و اسیدهای آلی است که از نظر کیفی مهم هستند. قندها که بیش از ۶۰ درصد مواد جامد محلول را تشکیل می‌دهند شامل گلوکز، فروکتوز و مقدار کمی ساکارز و رافینوز هستند.

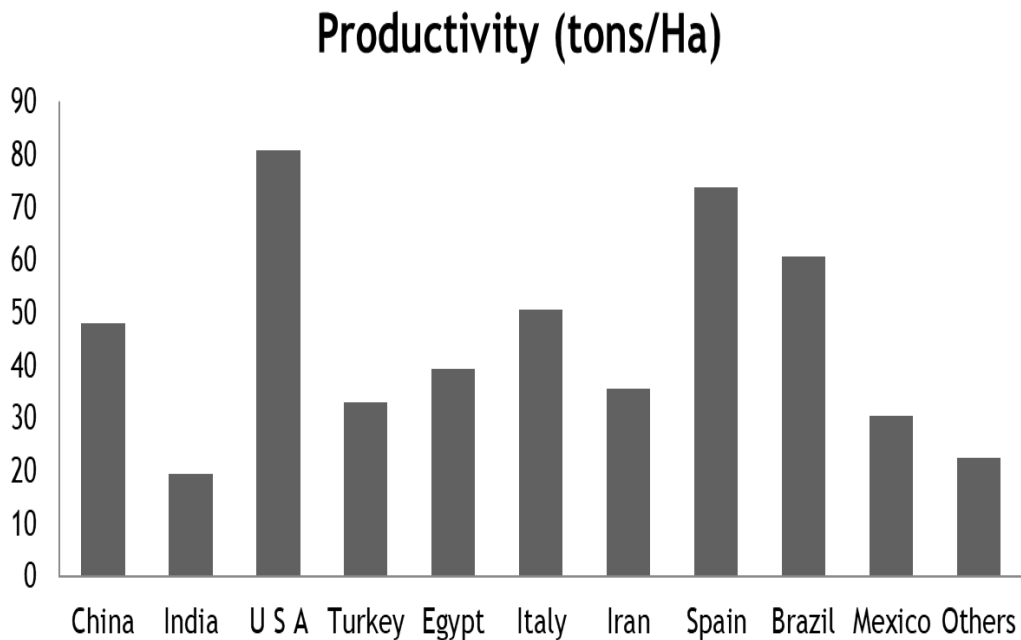
۱-۲-۳ آمار تولید ایران و جهان

در سال ۲۰۱۶ تولید جهانی گوجه‌فرنگی، ۱۷۶ میلیون تن بوده که از این میزان ۳/۵۷ درصد آن در آسیا تولید شده است. در همین سال، سهم ایران از تولید جهانی با حدود ۱۸۰ هزار هکتار سطح

زیر کشت، ۵/۶ میلیون تن بوده است (شکل ۱-۱). همچنین ایران، در بین ۱۰ کشور اول تولید کننده گوجه‌فرنگی، رتبه ششم را بعد از ترکیه و مصر، به خود اختصاص داده است (شکل ۲-۱) (فائو، ۲۰۱۶).



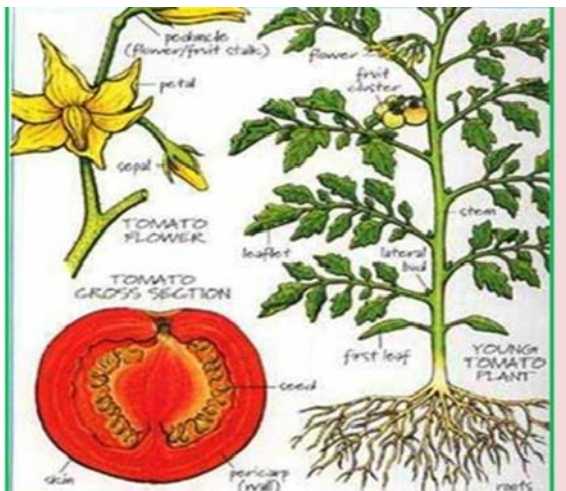
شکل ۱-۱ سطح زیر کشت گوجه فرنگی در کشورهای برتر



۲-۱ میزان تولید در هکتار گوجه‌فرنگی در کشورهای برتر

۴-۲-۱ گیاه‌شناسی

گوجه‌فرنگی گیاهی است علفی و یکساله که متعلق به خانواده بادمجانیان است. درکاشت نشایی از رشد ریشه کاسته می‌شود. ریشه‌های فرعی ابتدا به صورت افقی رشد می‌کنند و در دراز مدت، نگهداری گیاه را به عهده می‌گیرند. ساقه گوجه‌فرنگی به صورت سیمپودیال (Sympodial) رشد می‌کند. برگ‌ها مرکب و متناوب است. برگ‌ها و ساقه پوشیده از کرک‌های ریز هستند (پیوست، ۱۳۸۵). گل‌ها کامل، هرمافروdit و پنتامر است. دانه‌های گرده ۲-۴ روز زنده می‌مانند و کلاله ۲۰-۱۵ ساعت قبل از باز شدن گل‌ها در حرارت ۱۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد آماده پذیرش می‌شوند. گوجه‌فرنگی گیاهی خودگشن است اما ممکن است تحت شرایطی ۴۷-۱ درصد دگرگشنی طبیعی در آن رخ دهد. سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی در گونه‌های وحشی مشاهده شده می‌شود. میوه گوجه‌فرنگی یک نوع سته است که وزن آن از چند گرم تا بیش از یک کیلوگرم می‌رسد. لیکوپن و کاروتین، دلیل رنگ میوه هستند (قنادها و همکاران، ۱۳۸۲). گیاه گوجه‌فرنگی از گیاهان گرمسیری است که به دماهای پایین حساس بوده و کاهش دما در همه مراحل رشد می‌تواند باعث خسارت به این گیاه شود (کارادو و همکاران، ۲۰۱۴). گوجه‌فرنگی دارای تنوع زیاد و واریته‌های گوناگون است که از نظر رشد گیاه، کیفیت میوه، مقاومت به امراض و آفات تفاوت‌های زیادی با یکدیگر دارند. گوجه‌فرنگی دارای ارقام وحشی بوده که تا ارتفاع ۳۳۰۰ متر از دریا در پرو، اکوادور و شیلی رشد می‌کنند که ارقام وحشی دارای تحمل بیشتری به سرما هستند که می‌توان از این ارقام در بهبود و توسعه گوجه‌فرنگی استفاده کرد (چن و همکاران، ۲۰۱۵). گلخانه‌ها به عنوان محلی جهت تولید گیاهان گرمسیری و تولید خارج از فصل استفاده می‌شود اما تولید گوجه‌فرنگی در گلخانه نیاز به مصرف مقدر زیادی انرژی جهت کنترل دما دارد. کاهش دما اثراتی نامطلوب روی بوته‌های گوجه‌فرنگی و عملکرد محصول می‌گذارد (لیو و همکاران، ۲۰۱۲).



Kingdm: Planta
 Division: Magnoliophyta
 Class: Magnoliopsida
 Order: Solanales
 Family: Solanaceae
 Genus: *Lycopersicon*
 Species: *L. esculentum*

۳-۱ رده بندی کران کوئیست (Cronquist phylogenetic) و نمای شماتیک از گیاه گوجه

فرنگی

(*lycopersicon esculentum*)

۵-۲-۱ تنش

تنش در تعریف عبارتست از هر نیرویی که به جسم وارد می‌شود و بر اثر آن تغییراتی در ابعاد جسم به وجود می‌آید که آن تغییرات را استرین می‌گویند (انگوین و همکاران، ۲۰۰۹). در گیاهان استرس برابر با تحریکاتی است که منجر به برهم خوردن تعادل زیستی گیاه می‌شود. تنش در شرایطی پیش می‌آید که یک عامل محیطی، خارج از حد نرمال بر گیاه اثر گذارد. گیاهان در طی رشد خود با تنش‌های متعدد محیطی مواجه هستند که هر یک از این تنش‌ها می‌توانند بسته به میزان حساسیت و مرحله رشد گونه گیاهی اثرات متفاوتی بر رشد، متابولیسم و عملکرد آن‌ها داشته باشند (میرهادی، ۱۳۸۰).

۶-۲-۱ انواع تنش‌های محیطی

تنش‌های محیطی به دو دسته تقسیم می‌شوند:

الف) تنش‌های زیستی شامل: حمله آفات و بیماری‌ها، رقابت با علف‌های هرز و

ب) تنش‌های غیر زیستی شامل: تنش شوری، خشکی، فلزات سنگین، دما و (یابوتا، ۲۰۰۴).

۱-۶-۲-۱ تنش‌های غیر زیستی

رشد جمعیت انسانی و صنعت جهانی دو عامل تغییر آب و هوا هستند. هر دو این عوامل به صورت نمایی در حال افزایش است. بنابراین برای پاسخگویی به این نیازها تمامی زمین‌های قابل کشت به کاشت مواد غذایی اختصاص یافته‌اند. از طرفی تنش‌های محیطی غیرزنده مانند خشکسالی و شوری به طور قابل توجهی بر بقا گیاهان، رشد و توسعه آن‌ها اثر می‌گذارند و منجر به کاهش کیفیت، عملکرد و زیست توده گیاهی می‌شوند. تنش‌های غیرزیستی در سطوح مختلف بیوشیمیایی، فیزیکی، سلولی و مولکولی اثر می‌گذارند. مطالعات نشان داده‌اند که تنش‌های غیر زیستی جوانه‌زنی بذر، رشد بذر، رشد ریشه، بیوسنتز کلروفیل و فتوسنتز را محدود می‌کنند که ناشی از تنش اکسیداتیو و تولید ترکیبات گونه‌های فعال اکسیژن^۱ است که منجر به آسیب بیشتر به گیاه می‌شود. تنش‌های غیر زیستی باعث تغییر بیان ژن‌ها در طول مراحل مختلف رشد گیاه می‌شوند (ژانگ، ۲۰۱۵). عوامل متعددی از استرس‌های زیستی و غیرزیستی مثل شوری، خشکی، سرما و درجه حرارت‌های بالا به میزان قابل توجهی تولید محصول و کیفیت دانه را در کل جهان کاهش می‌دهند. در دهه‌های گذشته، نسبت تحمل به این تنش‌ها با به کارگیری روش‌های اصلاح سنتی و مدرن در گیاهان افزایش یافت که تا حدودی باعث بهبود برخی از محصولات شده است. بررسی مکانیسم‌های مختلف تشخیص سیگنال، انتقال و عناصر تنظیمی پایین دستی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی برای درک مکانیسم‌های مولکولی درگیر در مسیر پاسخ به استرس‌های غیر زیستی ارائه دهند (کومار، ۲۰۱۴).

^۱ ROS

۱-۱-۶-۲-۱ تنش دما

دما یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که بر رشد گیاهان و تولید محصولات زراعی تاثیر می‌گذارد. تنش دما خود به دو نوع تنش دمای بالا (گرما) و تنش دمای پایین (سرما) تقسیم‌بندی می‌شود (می و سانگ، ۲۰۱۰).

۱-۱-۶-۲-۲ تنش سرما

گیاهان دائما در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند. در بین تنش‌های محیطی، تنش سرما فاکتور کلیدی است که بر رشد، نمو و عملکرد محصول تاثیر می‌گذارد. سرما فاکتور محیطی است که توزیع جغرافیایی و فصل رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی را محدود کرده و کیفیت و کمیت محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. گیاهان مناطق معتدل مقاومت به دمای پایین را تحت عنوان سازش به سرما به دست آورده‌اند.

گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری نسبت به دماهای پایین (۱۰-۰ درجه سانتی‌گراد) حساس هستند و نسبت به تحمل سرما ناتوان‌اند (چینوسامی و همکاران، ۲۰۰۳). در طی سازش به سرما گیاهان مکانیسم‌های مولکولی و مورفولوژیکی بسیاری را برای کاهش خسارت ناشی از سرما توسعه می‌دهند. پاسخ به تنش سرما یک فرایند بسیار پیچیده برای بهبود صفات بیولوژیکی و مورفولوژیکی است (میورا و فورموتو، ۲۰۱۳). بسیاری از تغییرات فیزیکی و مولکولی در طی سازش به سرما رخ می‌دهد. در بین آن‌ها فعال‌سازی رونویسی و یا مهار ژن‌ها توسط دمای پایین اهمیت دارد (لی و همکاران، ۲۰۰۵). ژن‌های مقاومت به سرما پروتئین‌های مختلف مانند آنزیم‌های درگیر در تنفس و متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی، فنیل و آنتی‌اکسیدان‌ها، مولکول‌های چاپرونی، پروتئین‌های ضد یخ و سایر پروتئین‌ها را کد می‌کنند. بسیاری از ژن‌های پاسخ‌گو به سرما در راه‌انداز خود چند نسخه از عناصر سیس DRE/CRT دارند که دارای توالی CCGAC است (چینوسامی و همکاران، ۲۰۰۳). تغییر بیان بسیاری از ژن‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها در پاسخ به تنش سرما گزارش شده‌است.

همچنین تنظیم کننده‌های فاکتورهای پس از رونویسی و پس از ترجمه در پاسخ به سیگنال سرما ایفای نقش می‌کنند (میورا و همکاران، ۲۰۱۳).

۷-۲-۱ تشخیص سیگنال سرما و احساس دمای پایین

از نظر تئوریک، تغییر در درجه حرارت، باید در هر جایی از سلول قابل تشخیص باشد، اما غشاها و پروتئین‌ها تنها اجزای سلول هستند که نوسانات درجه حرارت بیشترین تاثیر را بر آن‌ها می‌گذارد. بنابراین، تغییرات ناشی از دما، به عنوان مثال در ساختمان، بسته بندی یا استقرار یک پروتئین، می‌تواند موجب آغاز یا تنظیم یک مسیر انتقال سیگنال شود که در نتیجه باعث بیان ژن‌های مسئول پاسخ به سرما، می‌گردد. در گیاهان، یکی از تنظیم کننده‌های رونویسی از ژن‌های مسئول پاسخ به دمای پایین، فاکتور CBF1 است که در جایگاه خارج از حوزه DNA اتصالی خود، بر اثر سرما دچار واسرشتگی می‌گردد (کانایا و همکاران، ۱۹۹۹).

گیرنده‌های غشایی و پروتئین‌های کانال یونی از دیگر اهدافی هستند که تحت تاثیر دما قرار می‌گیرند. گروه بزرگی از گیرنده‌های غشایی شامل پروتئین کینازهای گیرنده هستند. اتصال لیگاند به جایگاه خارج سلولی پروتئین گیرنده موجب تحریک عمل کینازی در درون سیتوپلاسم می‌گردد. اخیرا مشاهده شده است که ژن‌های پروتئین کیناز شبه گیرنده در آرآبیدوپسیس، در پاسخ به دمای پایین از بالا دست تنظیم می‌شوند (کرپس و همکاران، ۲۰۰۲).

در پروکاریوت‌ها، سیستم‌های تنظیمی دو بخشی، متشکل از هیستیدین کیناز با نقش حسگر متصل به غشاء و یک پروتئین تنظیم کننده پاسخ متناسب، برای حس وقایع محیط اطراف وجود دارد. تحریک غشاء به وسیله دمای پایین موجب القای اتوفسفریلاسیون پروتئین تنظیم کننده فوق می‌شود که این امر در نهایت منجر به فعال شدن مجموعه‌ای از ژن‌های پاسخ به سرما سنتز اسیدهای چرب می‌گردد. در گیاهان نیز وجود دو سیستم دو بخشی متشکل از مسیرهای انتقال سیگنال اتیلن و سایتوکینین تایید شده است (اورائو و همکاران، ۲۰۰۰). آسیب غشاها باعث افزایش تحریک گروهی از

ژن‌های مسئول واکنش به دمای پایین در شرایط سرمایی می‌شود، اما در شرایط تنش گرمایی تاثیری بر تحریک بیان این ژن‌ها ندارد (اینابا و همکاران، ۲۰۰۳).

۸-۲-۱ نشانه‌های خسارت سرمازدگی

در طول تنش سرما تغییر غیرعادی در یک گیاه رخ نمی‌دهد که جهت تشخیص فوری و دقیق خسارت مورد توجه قرار گیرد. نشانه‌های قابل مشاهده آسیب سرما با توجه به دما، طول مدت سرما، نوع محصول، مرحله رشدی و نوع بافت، ساعات روز و دیگر شرایط محیطی نظیر نور، باد، آب و عناصر غذایی تغییر می‌کنند. بسیاری از علائم سرمازدگی برای ظاهر شدن نیاز به زمان دارند. هرچند هنگامی که گیاه در درجه حرارت پایین قرار دارد علائم مشهودی را ایجاد نخواهد کرد، نشانه‌های سرمازدگی به تدریج و بخصوص هنگامی که گیاه به دماهای مطلوب رشد باز می‌گردد، ظاهر می‌گردند. قرارگیری به مدت طولانی‌تر در معرض تنش سرما، سبب می‌گردد که علائم تنش سریع‌تر ظاهر گردد (موراتا و لس، ۱۹۹۷). خسارت سرما قابل انتقال نیست؛ به عنوان مثال، وقتی یک بوته خیار به صورتی تقسیم شده بود که یک ساقه آن در معرض سرمازدگی قرار داشته باشد، خسارت سرما محدود به همان ساقه خواهد بود، بنابراین تنش سرما به صورت موضعی و احتمالا توسط هر سلول منفرد درک می‌شود. بنابراین، نشانه‌های خسارت سرمازدگی، ناشی از خسارت‌های وارده به هر سلول بوده و به دلیل اختلافات موجود در بین سلول‌ها، در گیاهان و بافت‌های مختلف آن‌ها نشانه‌های خسارت سرمازدگی متغیر است. خسارت سرمازدگی ممکن است به سه صورت مستقیم، غیرمستقیم و ثانویه رخ دهد (موراتا و لس، ۱۹۹۷).

۹-۲-۱ خسارت مستقیم سرمازدگی

آثار مستقیم خسارت تنش سرما معمولا در نتیجه قرار گرفتن بافت یا گیاه به مدت چندین ساعت در معرض سرما و یا چند دقیقه در معرض سرمای شدید ایجاد می‌شود. تنش سرما می‌تواند تغییرات

بسیاری در رفتار غشاها، چربی‌ها، آنزیم‌ها، رنگیزه‌ها و اسکلت سلولی گیاهان گرمسیری ایجاد کند. در سطح سلولی، سرما می‌تواند غشاء و ترکیب لیپیدی آن را بواسطه تغییر در وضعیت آب سلولی گیاه، تحت تاثیر قرار دهد، بعضی از تغییرات می‌توانند به عنوان تاثیرات اولیه‌ای تلقی شوند که منجر به عدم تعادل متابولیکی، تلفات آب، نشت یون و در آخر باعث مرگ سلول می‌شود. ایجاد بافت‌های نکروزه، تجزیه بافت، کم شدن رشد و عدم قدرت جوانه زنی بذر نیز برخی از اثرات مستقیم خسارت تنش سرما است (نگوین، ۲۰۰۹).

گیاهان با توجه به سرعت واکنش به سرما، به دو دسته تقسیم می‌شوند: گروه اول که علایم خسارت را ظرف چند ساعت یا حداکثر یک روز بروز می‌دهند. علایم خسارت در این گیاهان به دلیل مرگ پروتوپلاسم و نشت آن به درون فضاهای بین سلولی ایجاد می‌شود. خسارت سرما در ظاهر باعث بروز تغییرات متابولیکی شامل افزایش مقدار اتیلن در گیاه، سپس باعث تغییرات سلولی (نشت الکترولیتی) و در آخر بروز علایم خسارت در گیاه تحت تنش می‌شود. اگر به دلیل تنش سرما صدمات ناشی از آن به سرعت بروز کند، این حالت از تنش سرما را شوک سرمایی می‌نامند، این حالت در نتیجه کاهش ناگهانی دما در جریان رشد گیاهان پیش می‌آید و در اثر آن بلافاصله تراوایی غشا از بین رفته، غشا از دیواره جدا شده، سلول‌ها از نظر میکروسکوپی به حالت پلاسمولیز کاذب در می‌آیند و در نتیجه ترکیبات داخلی سلول از جمله پتاسیم (K^+) به سرعت به بیرون سلول نشت می‌کند. از تجمع این مواد در فضا بین سلولی تاول‌های آب‌سوخته‌ای به وجود می‌آید که در زیر آن‌ها آب جمع شده است. در مجموع پدیده آبکی شدن برگ‌های بالایی در بیشتر گونه‌های زراعی مهم اتفاق می‌افتد و در شدت‌های نوری بالا، این خسارت سریع‌تر می‌شود. این خسارت سرما برگشت ناپذیر (پلاستیک) است و بعد از برطرف شدن سرما، بهبود نخواهد یافت (لیمین و همکاران، ۱۹۹۷).

۱۰-۲-۱ اثرات تنش سرمایی در سطح سلولی و نشت مواد محلول از

غشاها

اثرات تنش سرما و تغییرات ناشی از وقوع آن در سطح سلولی و اندامها بروزمی کند که بازتاب آن در سطوح بالاتر (اندام گیاهی) مشاهده می‌شود. بررسی واکنش‌های سلولی در مقابله با سرما، پدیده‌هایی مانند از دست دادن فشار تورژسانس، واکوئولیزه شدن، برهم خوردن تعادل‌غشاء سیتوپلاسمی، وزیکوله شدن، کاهش جریان سیتوپلاسم، نشت مواد محلول از غشاها و اختلال کلی در اندامها را نشان می‌دهد، کاهش دما با تاثیر بر غشای سلولی آب درون سلولی، فعالیت آنزیم‌ها و فرآیندهای بیوشیمیایی، فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث کاهش انرژی متابولیکی در دسترس گیاهان زراعی می‌شود، در مورد خسارت ناشی از تنش سرما در سطح غشاهای اندامک‌ها و غشا سلولی، تقریباً اتفاق نظر وجود دارد. میزان جاری بودن غشاء سلولی، بستگی به میزان اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و دما دارد. دما یکی از مهم‌ترین عواملی است که بر سیالیت، پایداری و انعطاف پذیری غشا اثرگذار است. به همین دلیل است که از غشا به عنوان حسگر اولیه تنش سرما نام می‌برند (تایز و زایگر، ۲۰۰۲).

آسیب سرما علاوه بر سیالیت غشا باعث تغییر در خصوصیات فیزیکی غشا، تراوش مواد محلول و کاهش تبادلات پلاسم و برهم خوردن تعادل غشاء می‌شود. تغییر در حالت فیزیکی غشا باعث کاهش نفوذپذیری انتخابی غشا و فعالیت معمول آن گردد، منجر به اختلال در فعالیت‌های سلولی و اندامک‌ها می‌شود، که این امر نیز به نوبه خود می‌تواند باعث افزایش نفوذپذیری بافت‌های حساس و مقاوم به سرما در مقابل یون‌ها در دمای تنش‌زا شود (موراتا و لس، ۱۹۹۷). به صورت کلی، دمای پایین، فعالیت طبیعی مراحل فیزیولوژیکی را مختل می‌کند و باعث آسیب‌های برگشت‌پذیر در گیاهان و اختلال سراسری در مراحل سلولی و متابولیکی می‌شود (تایز و زایگر، ۲۰۰۲).

۱۱-۲-۱ اثرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تنش سرما بر گیاهان

تنش‌های محیطی مخصوصاً تنش سرما بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان تاثیر می‌گذارند. از جمله این تغییرات، تغییر در مقدار پرولین آزاد است که در واکنش به تنش‌های محیطی مانند تنش سرما و خشکی به میزان زیادی افزایش می‌یابد و سبب تثبیت غشا در هنگام تنش سرما می‌گردد. تجمع پرولین آزاد در بیشتر مواقع با مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها به ویژه دمای کم در ارتباط است. همچنین پرولین نقش مهمی در متابولیسم گیاهان تحت تنش دارد و در تنظیمات اسمزی سلول و نیز در محافظت پروتئین‌ها تاثیرگذار است. ذخیره قندهای محلول و نشاسته در دوره سرما به شدت تغییر می‌کند. مقاومت به سرما با افزایش مقدار کربوهیدرات‌های محلول در ارتباط است و کربوهیدرات‌هایی نظیر ساکارز، سوربیتول و رافینوز اولین زیر واحدهای محافظت کننده گیاهان هستند (افشاری، ۱۳۹۳). قرارگرفتن بافت گیاه در معرض دمای پایین، موجب انتقال کلسیم به سیتوپلاسم می‌شود و این در اثر تغییراتی است که در غشا به وجود می‌آید. نشت الکترولیت زمانی اتفاق می‌افتد که غشا در اثر خسارت سرما آسیب دیده باشد. افزایش میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در غشا می‌تواند موجب پایین آمدن دمای تغییر حالت غشا شده و مقاومت گیاه به تنش سرما را افزایش دهد (بوهن و همکاران، ۲۰۰۷). در گیاهان حساس به سرما که قادر به کنترل فتوسنتز نیستند، انرژی اضافی باعث تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد. گونه‌های اکسیژن فعال مخصوصاً به فرم آنیون رادیکال آزاد سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) احیا می‌گردد. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است اثر زیان‌آوری بر متابولیسم رشد و نمو سلول‌ها داشته باشد. ROSها می‌توانند با بیومولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدنوکلئیک‌ها واکنش دهند و پراکسیداسیون لیپید، دناتوره شدن پروتئین‌ها و جهش در DNA ایجاد کنند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی متنوعی برای حذف و کاهش ROS دارند که در سطوح مختلف تنش موثر است.

سیستم های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز ، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکورات پراکسیداز از مکانیسم های حفاظتی هستند (نظری و همکاران، ۲۰۱۲). دمای بحرانی و دمای کم به تشدید فعالیت های اکسیداسیونی سلولی و در نهایت قهوه ای شدن بافت ها که در اصل آسیب قطعی و برگشت ناپذیر است، منجر می شود.

۱۲-۲-۱ تاثیرات سرما روی گوجه فرنگی

پاسخ های گیاه گوجه فرنگی نسبت به تنش دمای پایین در همه جنبه ها حائز اهمیت است اما درک پاسخ های مولکولی و فیزیولوژیکی که منجر به تأثیر بر روی فنوتیب می شود و در فرایند سازگاری به کاهش دما درگیر هستند اهمیت خاصی دارد. ژن های رمزکننده آنزیم ها یا اجزای ساختمانی سلول ها که در محافظت مستقیم سلول ها در برابر صدمات ناشی از یخ زدگی شرکت دارد نقش مهمی در کاهش خسارت کاهش دما بازی می کنند (چن و همکاران، ۲۰۱۵). اغلب بیشتر تاثیرات استرس های محیطی به گونه ی گیاهی، گونه، سن گیاه، زمان اعمال استرس و شدت این استرس وابسته هستند. شناسایی یک الگوی واکنش به استرس در ساختار دیواره سلولی که بتواند سرما را تحمل کند یا نسبت به آن مقاوم باشد خیلی مشکل است اگرچه در بیشتر موارد دو مکانیسم اصلی انتخاب می شود. اول افزایش در سطح تولید و توسعه پروتئین های که سبب افزایش انعطاف پذیری دیواره سلولی می شوند و دوم، افزایش در ضخامت دیواره سلولی به وسیله تقویت دیواره ثانویه با همی سلولز و رسوب لیگنین است (لی گال و همکاران، ۲۰۱۵).

۱۳-۲-۱ سازگاری به سرما

سازگاری به سرما موجب تغییراتی در ترکیب پلی ساکاریدی و فعالیت آنزیم های بهبود دهنده دیواره سلولی می شود. در یک کشت سوسپانسیون سلول های انگور یا سیب، سازگاری به سرما با افزایش استحکام دیواره سلولی و کاهش اندازه روزه ها افزایش یافت. پدیدار شدن پکتین یک عامل

کلیدی در واکنش گیاه به استرس سرما است. غلظت پکتین در یک گیاه گرمسیری که در دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد رشد کرده بودند، نسبت به آن‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کرده بودند افزایش یافت (راجاشکار، ۲۰۰۸).

افزایش در غلظت همی سلولز می‌تواند استحکام دیواره سلولی را بالا ببرد، از فروپاشی سلول جلوگیری کند که به وسیله از دست دادن آب ایجاد می‌شود. کاهش در غلظت زیلوژ و گلوکز در ترکیبات غیر سلولزی در سازگاری به سرمای زمستانه برگ‌های کلزای دانه روغنی مشاهده شده بود (کوباکا زبالسک، ۱۹۹۹).

تاثیرات استرس سرما اغلب می‌تواند دیگر ترکیبات دیواره سلولی از قبیل پروتئین (arabinogalactanAGPs) را که در دیواره سلولی گیاه قرار دارند، را تحت تاثیر قرار دهد. چوبی شدن و تغییر در غلظت لیگنین می‌تواند در طول رشد در دمای پایین به خوبی اتفاق بیافتد. سنتز لیگنین می‌تواند در طول سازگاری به سرما بالا رود و در بهبود بخشیدن دیواره سلولی شرکت کند و بدین گونه از آسیب یخ‌زدگی و فروپاشی سلول جلوگیری نماید (دومن و همکاران، ۲۰۰۳). نسبت انباشتگی ترکیبات فنولیک مختلف در برگ‌ها، به دامنه دمای اعمال شده بستگی دارد. مشاهده شده است که افزایش در انباشتگی فرولیک اسید در برگ‌ها می‌تواند استحکام دیواره سلولی و همچنین مقاومت سلول به مکانیسم‌های استرس را افزایش دهد. ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین (CCR، PAL، COMT و CCOAOMT) در واکنش پاسخ به سرما موثر هستند (لی گال و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به اهمیت تنش دمای پایین در گسترش گوجه‌فرنگی و کاهش عملکرد آن، بهبود و اصلاح گوجه‌فرنگی در راستای افزایش تحمل به کاهش دما، می‌تواند گامی بلند در صرفه جویی در مصرف سوخت در گلخانه باشد و از طرف دیگر میزان آلودگی جو توسط گازهای گلخانه‌ای را کاهش داد.

۱۴-۲-۱ مقاومت به سرمازدگی

مقاومت در برابر تنش‌های محیطی در گیاهان اغلب به دو شکل اجتناب و تحمل صورت می‌گیرد. هنگام بروز سرما، گیاهان قادر به اجتناب از تنش نیستند، زیرا اجتناب به صورت کنترل دما در داخل موجود انجام می‌گیرد و گیاهان دارای چنین سازوکاری نیستند. بنابراین تنها شکل مقاومت به سرما در گیاهان، تحمل تنش است.

همه گیاهان نواحی معتدل و همه گیاهان سردساز به صورت معمول پس از قرارگیری در معرض سرما زنده می‌مانند و لذا مقاوم به سرما هستند. از طرف دیگر، گیاهان نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری مقاومت متغیر نسبت به سرما از خود نشان می‌دهند؛ بنابراین تلاش‌هایی جهت یافتن روش‌هایی برای اندازه‌گیری کمی مقاومت به سرما صورت گرفته است. ساده‌ترین روش آن است که گیاه را به مدت مشخصی در معرض دمای مورد نظر قرار داده و سپس میزان تحمل و خسارت وارده را بررسی نماییم. روش دیگر مشاهده جوانه‌زنی بذور در سرما است. در مراحل رشد رویشی معمولاً گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهان بالغ حساسیت بیشتری به سرما دارند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

محققین موارد زیر را به عنوان راهکارهای کلی ممکن برای مقاومت به تنش سرما پیشنهاد کرده-

اند :

۱- ایجاد تغییرات کیفی احتمالی در اجزاء اصلی دستگاه‌های متابولیکی که هر یک دارای منحنی واکنش به دما ویژه‌ای هستند.

۲- وقوع واکنش خاص در سیستم متابولیکی با کنترل یا به حداقل رساندن اختلالات ناشی از تغییر دما.

امروزه ثابت شده است بیان برخی از ژن‌های هدف این عوامل، باعث افزایش تحمل به سرما در گیاهان می‌شود. مقاومت به سرما نیاز به نسخه برداری از مجموعه‌ای از ژن‌ها دارد که در شرایط غیرسازگاری بیان نمی‌شوند.

مقاومت به سرما، خصوصیتی کمی تحت کنترل چندین ژن است که هر یک اثری کوچک ولی افزایشی بر روی تحمل به یخزدگی دارند. بیان این ژن‌ها تحت کنترل شرایط محیط موجب تغییرات فیزیولوژیکی، سلولی و مولکولی نظیر تغییر ترکیب لیپیدهای غشایی، تجمع محلول‌های سازگار، تغییر در مقدار فیتوهورمون‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و سنتز پروتئین‌های جدید می‌گردد (زین و بروس، ۲۰۰۰). بیشتر این تغییرات ناشی از تغییر در بیان ژن‌ها است. اخیراً بررسی‌ها اساس مولکولی این تغییرات را شناسایی کرده‌اند و منجر به شناسایی تعداد زیادی ژن که به وسیله دمای پایین تحریک می‌شوند، شده است. شناسایی اجزای مقاومت به سرما و فعال شدن مکانیزم‌های مولکولی آن، مرهون استفاده از چندین روش مختلف است. از جمله آن‌ها می‌توان به ردیابی مسیرهای سیگنال-دهی، با استفاده از بررسی مولکولی ژن‌های مسئول واکنش به سرما و نحوه بیان آن‌ها و مطالعه نحوه بیان مجموعه رونوشت‌های تولید شده در شرایط تنش سرما اشاره کرد (ویسواناتار و ژو، ۲۰۰۲).

۱۵-۲-۱ اختلال در فعالیت آنزیم‌ها

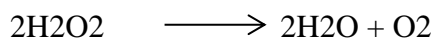
آنزیم‌ها به علت داشتن محدوده دمایی ویژه، تنها در محدوده دماهای ویژه‌ای، فعال هستند. در خارج از محدوده دمایی ویژه یک آنزیم خاص، ممکن است در سلول گیاهی پروتئین‌ها تجمع یافته، پارگی غشاها باعث تخریب سلول گردد، در این شرایط آنزیم‌ها با سوبستراهای غیراختصاصی تماس برقراری نمایند و باعث وقوع برخی از واکنش‌ها می‌شوند. این واکنش‌ها با تغییر در حرکت یون‌ها، آب و مواد آلی باعث آسیب سلولی می‌شوند. پیوندهای آبگریز که در تعیین ساختمان سوم پروتئین نقش دارند در شرایط قرار گرفتن گیاه در دمای پایین ضعیف می‌شوند. این امر باعث تغییر در انرژی جنبشی و یا تخصیص پیش ماده یک آنزیم تنظیم‌کننده کلیدی شود که باعث بروز خسارت ناشی از سرما گردد (ساریاما و تانیدا، ۱۹۹۵).

کاهش دما باعث تغییر غلظت و فعالیت آنزیم‌های تنظیم‌کننده فرآیندهای بیوشیمیایی درون سلول می‌شود. تغییر فعالیت آنزیم‌های درون سلول (کاهش یا افزایش) باعث تولید ترکیبات مختلفی

نظیر ترکیبات سمی و یا ترکیبات مفید و موثر دیگر که در مقاومت به سرما نقش دارند، می‌شود. در هنگام طلوع خورشید وقتی دمای مزرعه به پایین‌تر از ۱۲ درجه سانتی‌گراد است، در فعالیت آنزیمی برگ‌های ذرت اختلال ایجاد می‌شود؛ این تغییرات به ممانعت نوری سرما در فتوسیستم II نسبت داده می‌شود، ممانعت نوری زمانی اتفاق می‌افتد که میزان به دام افتادن نور (فوتون) از حد توانایی کلروپلاست برای انتقال و تبدیل انرژی آن به انرژی شیمیایی بیشتر شود. ممانعت نوری می‌تواند در دمای کم‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد، در شدت نوری بسیار پایین‌تر از شدت نور آفتاب در ذرت رخ دهد. ادامه به دام افتادن نور بدون انتقال موثر انرژی به دست آمده به آسیمیلایون کربن بسیار خطرناک است، زیرا انرژی به دست آمده به گیرنده‌های الکترون (مانند اکسیژن) که از لحاظ شیمیایی فعال هستند، رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تشکیل می‌دهند. این رادیکال‌ها سریعاً موجب آسیب به سلول می‌شوند که در نهایت باعث ایجاد فنوتیپی خاص از جمله نکروزه شدن و قهوه‌ای شدن (کلروز) برگ‌ها می‌گردد (گریوز و همکاران، ۱۹۹۶).

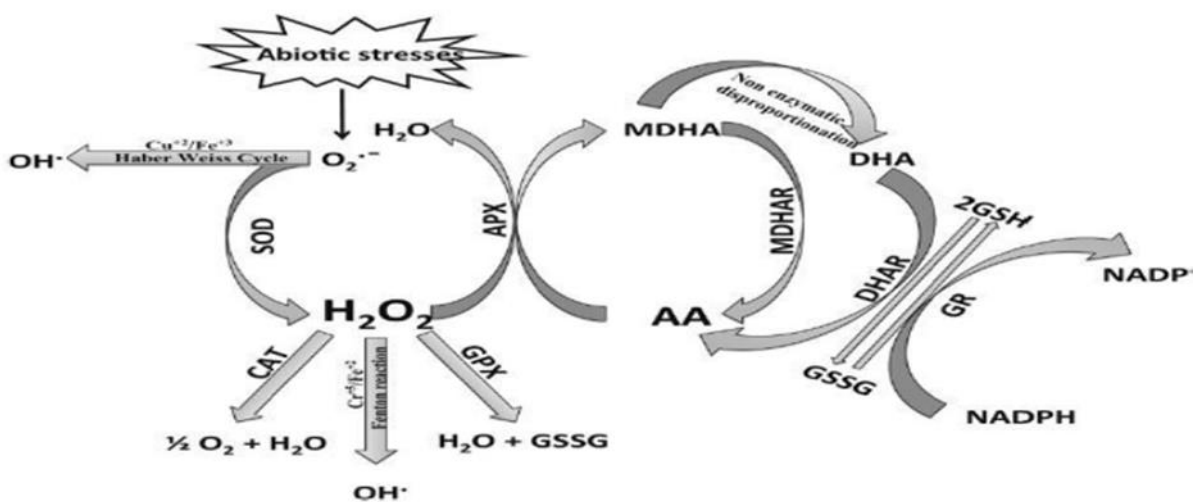
۱-۱۵-۲-۱ کاتالاز

کاتالازها پروتئین‌های حاوی هم هستند که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز و از سلول در برابر تاثیرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کنند.



محل تولید کاتالاز، پراکسیزوم و گلای‌اکسیزوم است (کیم و همکاران، ۲۰۰۸). این آنزیم در بافت‌های ذخیره چربی، گلای‌اکسیزوم به فراوانی یافت می‌شوند. کاتالاز نقش از بین بردن پراکسید حاصل از بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب چرخه‌ی نوری و کاتابولیسم پورین‌ها در گیاهان را برعهده دارد (جینگ و ژانگ، ۲۰۰۲). کاتالاز از مهم‌ترین ژن‌های آنزیم‌ساز است که مانند چرخه‌ی آسکوربات-گلوتاتیون، پراکسید هیدروژن را تجزیه و به آب تبدیل می‌کند. آنزیم پراکسید هیدروژن حاصل از بتا‌اکسیداسیون و افزایش فعالیت گلی‌کولات اکسیداز را در پراکسیزوم جمع‌آوری می‌نماید (کیانی و

همکاران، ۲۰۰۸). کاتالاز دارای سه آیزوزایم به نام‌های CAT-1، CAT-2 و CAT-3 است. آیزوزایم‌های کاتالاز در خواص شیمیایی و ویژگی‌های رشدی با یکدیگر اختلاف دارند. بعضی از آن‌ها در مرحله جوانه‌زنی سنتز شده و در متابولیسم‌های اسیدهای چرب شرکت می‌کنند و تعدادی از آن‌ها در فرایندهای پیر شدن، تنفس نوری و چوبی شدن دیواره شرکت می‌کنند. افزایش فعالیت کاتالاز در اثر تنش‌های محیطی در مقاوم نمودن گیاهان به شرایط نامساعد محیطی در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده اند (شکل ۱-۴) (گیل و توتجا، ۲۰۱۰).



شکل ۱-۴ گونه‌های اکسیژن فعال و مکانیسم دفاعی آنزیم‌های ضد اکسنده

۱۵-۲-۱ گایاکول پراکسیداز (GPX)

گایاکول پراکسیداز جهت تجزیه H_2O_2 به ترکیبات فنولی گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون نیاز دارد تا بتواند پراکسید هیدروژن را تجزیه کند. این آنزیم به فراوانی در آپوپلاست یافت می‌شود. گایاکول پراکسیدازها جز گلیکوپروتئین‌ها هستند که در سیتوزول، واکوئل، دیواره سلولی و فضای خارج سلولی وجود دارند و گروه دیگر از آن‌ها گلیکوسیلیات‌ها هستند که در کلروپلاست و سیتوزول قرار

دارند و این گروه از گلوکاتیون به عنوان دهنده الکترون استفاده می کنند و سوپسترای آن ها پراکسید هیدروژن و هیدرو پراکسیداز آلی است (ویرانگامالیاه و همکاران، ۲۰۱۱).

۳-۱۵-۲-۱ مالون دی آلدئید (MDA)

تجزیه اکسیداتیو لیپیدها را پراکسید شدن لیپید می گویند. فرآیندی که رادیکال های آزاد از الکترون های لیپیدهای دیواره ی سلولی، باعث آسیب های سلولی می شوند. پراکسید شدن لیپیدها به وسیله رادیکال های آزاد صورت می گیرد. پایداری غشای سلولی به صورت گسترده به منظور نشان دادن میزان مقاومت استفاده می شود و پایداری غشای سلولی با مقاومت آن ها به تنش های غیرزیستی همبستگی دارد (پرماچاندر، ۱۹۹۲). مطالعات نشان می دهد، در طول دوره سازگاری به سرما چه به صورت مصنوعی و یا سازگاری که به صورت طبیعی در طبیعت رخ می دهد میزان پایداری غشا سلولی بالا می رود (یومورا و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر این بیان شده است در شرایط سرما تغییرات ساختاری و عملکردی در غشای پلاسمایی رخ می دهد که پایداری غشای پلاسمایی را افزایش می دهد. همچنین مشخص شده است که بسیاری از تغییراتی که در طول سازگاری به سرما و تنش سرمایی در غشای سلولی رخ می دهد قابل بازگشت هستند، اما اگر میزان تنش زیاد باشد تغییرات غیر قابل بازگشتی رخ می دهد که باعث مرگ سلول می شود (لستر، ۱۹۸۵). در اکثر مواقع علائم تنش که سبب آسیب گیاهان می شوند بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت تنش ظاهر می شوند. اگرچه این مدت در گیاهان مختلف، به میزان حساسیت هر گیاه به تنش سرما بستگی دارد. بنابراین، میزان آسیب های ناشی از تنش با افزایش طول دوره دمای پایین افزایش می یابد. واکنش های پراکسید شدن در میان اسیدهای چرب با توجه به تعداد و موقعیت باندهای دوگانه در زنجیره اسیدهای چرب متفاوت است. اکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع به وسیله رادیکال های اکسیژن، محصولات متنوعی مانند MDA تولید می کنند (برادلی و مین، ۱۹۹۲). MDA محصول رایج پراکسید شدن لیپید است و به عنوان یک شاخص مهم برای تشخیص آسیب های تنش اکسیداتیو به کار می رود (جانرو، ۱۹۹۰). بنابراین افزایش

پراکسید شدن لیپید در تنش های محیطی گزارش شده است (موران و همکاران، ۱۹۹۴؛ پراساد، ۱۹۹۶).

۱۷-۲-۱-تنظیم کننده های اسمزی

۱-۲-۱۷-۱ پرولین

تحت شرایط تنش های محیطی، بسیاری از گیاهان چند نوع از محلول های مشابه مانند: پرولین، گلايسين بتائين، قندها و پلیالها را انباشته می کنند. پرولین و بتائین محلول های کاملاً شناخته شده هستند که یک نقش اساسی در فرآیند تنظیم اسمتیک در موجودات مختلف از جمله گیاهان عالی را برعهده دارند (آختر بانوا و همکاران، ۲۰۰۹). پرولین یکی از مهم ترین اجزای تشکیل دهنده محلول های سازگار در بیشتر گیاهان است که در استرس های محیطی مختلف مانند سرما، خشکی، شوری، دمای بالا و کمبود مواد غذایی تجمع می یابد (هاسگاو و همکاران، ۲۰۰۰ و هور و همکاران، ۲۰۰۴) همچنین در پاسخ به استرس های زیستی نیز مقدار آن افزایش می یابد (قاسمیور و کیانیان، ۲۰۰۱). پرولین مقاومت در برابر یخ زدگی در گیاهان تراریخت را موجب می شود (نانجو و همکاران، ۱۹۹۹). در دماهای پایین، میزان پرولین در بسیاری از گونه های مقاوم به سرما افزایش می یابد. نقش حفاظتی پرولین برای گیاهان در معرض تنش توسط دماهای پایین به توانایی تنظیم اسمتیک گیاه مربوط است که سلول را از دهیدراته شدن در دماهای پایین حفظ می کند. دمای پایین موجب راه اندازی مکانیسم سنتز پرولین در میوه ها می شود (ژائو و همکاران، ۲۰۰۹). پرولین همچنین در تنش سرما موجب تحریک آب به داخل سلول و کاهش خروج آب از داخل سلول به بیرون می شود و در نتیجه موجب اتساع غشاء پروتوپلاسم و افزایش حجم سلول می شود و دهیدراسیون سلولی را کاهش می دهد (پارک و همکاران، ۲۰۰۶). برای سنتز پرولین در گیاهان عالی دو روش وجود دارد. در روش اول، ماده اولیه برای بیوسنتز پرولین،

گلوتامات است که در ابتدا به مولکول واسطه گلوتامیک سمی آلدئید احیا می‌شود. ترکیب اخیر توسط دلتا پیرولین-5- کربوکسیلات سنتتاز^۱ با از دست دادن یک مولکول آب برای بسته شدن حلقه، تشکیل مولکول دلتا - پیرولین-5- کربوکسیلات^۲ را می‌دهد که این مولکول نیز در نهایت توسط آنزیم دلتا پیرولین-5- کربوکسیلات ردوکتاز^۳ احیا می‌گردد و به پیرولین تبدیل می‌شود. در روش دوم اورنیتین توسط اورنیتین-δ--آمینو ترانسفراز^۴ به دلتا - پیرولین-5- کربوکسیلات تبدیل شده که در نهایت به پیرولین تبدیل می‌گردد. پیرولین به سرعت توسط آنزیم‌های میتوکندریایی پیرولین دهیدروژناز^۵ و پیرولین ۵ کربوکسیلات دهیدروژناز^۶ تجزیه می‌گردد (شکل ۱-۵) (بلوم و ابرکون، ۱۹۷۶).

^۱ P5CS

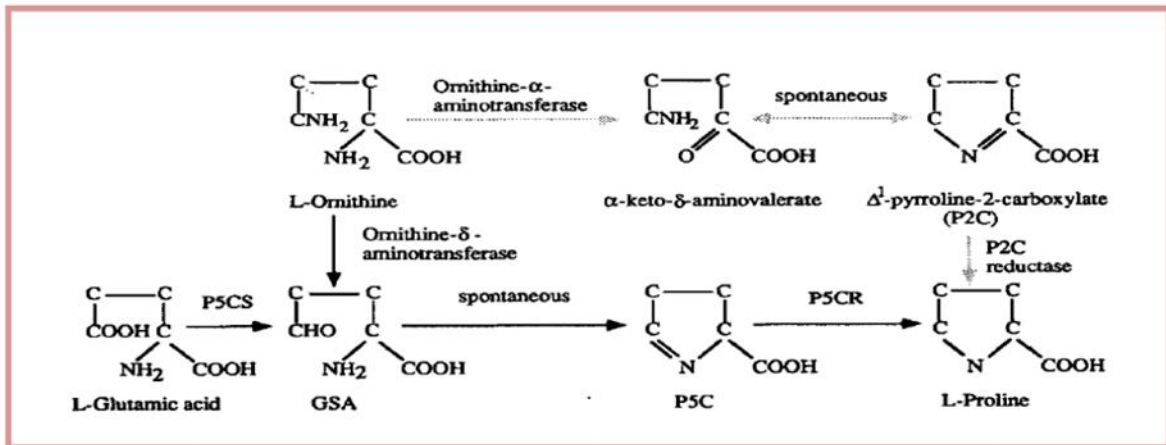
^۲ P5C

^۳ P5CR

^۴ OAT

^۵ ProDH

^۶ P5CH



شکل ۱-۵ مراحل بیوسنتز پرولین: P5C دلتا - پرولین - ۵-کربوکسیلات: P5CR دلتا -

پرولین - ۵-کربوکسیلات ردوکتاز: P5CS دلتا - پرولین - ۵-کربوکسیلات سنتتاز

۱۸-۲-۱ دیواره سلولی

۱-۱۸-۲-۱ نشت الکترولیت (یون‌ها)

واضح‌ترین نتیجه قابل بررسی آسیب ناشی از یخ‌زدگی در بافت‌های گیاه، افزایش نشت محلول‌های سلولی (الکترولیت‌ها)، در اثر تغییر نفوذپذیری غشا است، در این شرایط متابولیت‌ها و یون‌های داخل سلول به درون فضای بین سلولی، و از آنجا به بیرون از بافت‌ها، نشت می‌کنند. با اندازه‌گیری میزان نشت پذیری غشای سلول‌ها، میزان تحمل ارقام مختلف گیاهان را به تنش یخ‌زدگی می‌توان مشخص کرد (میرمحمدی میبیدی و همکاران، ۱۳۸۱). افزایش مواد محلول در آب، هدایت الکتریکی آن را افزایش می‌دهد. بنابراین با اندازه‌گیری این متغیر، می‌توان مقدار الکترولیت‌های محلول در آب را مشخص کرد (موراتا و تاتسومی، ۱۹۷۹).

میزان نشت الکترولیت‌ها با شدت آسیب وارده بر سلول‌های گیاهی متناسب است. با این حال، در این شرایط سلول‌های مرده تمام محتوی خود را تخلیه می‌کنند. اگر تراکم سلول‌های آسیب

دیده در بافت‌های مورد آزمایش، در پاسخ به تنش سرمازدگی تغییر کند، یعنی بعضی از سلول‌ها از بین بروند و بعضی دیگر زنده بمانند، در نتیجه، مقدار الکترولیت‌های نشتی نیز متناسب با تعداد این سلول‌ها تغییر خواهند کرد. بنابراین، نتایج حاصل از این روش به نوع بافت، شدت تنش یخ زدگی، جنس و گونه گیاه بستگی دارد (بورسه، ۱۹۹۸؛ لوییت، ۱۹۸۰). بررسی‌ها نشان داد که میزان تحمل به سرما در بین واریته‌ها و ارقام زراعی گونه‌های مختلف متفاوت است و مقدار نشت الکترولیتی آن‌ها در پاسخ به تنش یخ زدگی یکسان نیست (موراتا و تاسومی، ۱۹۷۹؛ لیندن، ۲۰۰۲؛ هاردوئیک و آنرووس، ۱۹۸۰؛ یوسفی، ۱۳۸۷). نتایج آزمایش نظامی و همکاران، ۱۳۸۹ نشان داد که نشت الکترولیتی از بافت‌های تحت تنش یخ زدگی، فقط در برخی از گیاهان دیده می‌شود. آن‌ها همچنین بیان کردند که پدیده نشت الکترولیتی، یک صفت عمومی برای تمامی گونه‌های حساس به یخ زدگی نیست. در مناطق معتدله وقوع تنش سرما در زمستان، در اکثر مواقع سبب بروز خسارت-های شدید در گیاهان می‌شود. تاثیر سرما و یخ‌زدگی در گیاه به شدت سرما، مدت آن و مرحله رشدی گیاه بستگی دارد و در این میان مدت سرما نسبت به شدت سرما موثر است (نظامی و همکاران، ۱۳۸۹). تغییر در ساختار غشاء در اثر سرما باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های حساس به سرما می‌گردد (میرعشقی و خلیل زاده، ۱۳۸۱؛ پائول، ۱۹۸۱). بنابراین به نظر می‌رسد که پائین‌تر بودن درصد نشت مواد در ارقام مقاوم، احتمالاً نشان دهنده تحمل بیشتر این ارقام نسبت به تنش یخ زدگی باشد. در بررسی منحنی برازش داده شده نشت الکترولیت‌ها در ارقام کلزا مشاهده شد که شیب منحنی نشت الکترولیت برای همه ارقام مورد بررسی در شرایط سازگاری به سرما نسبت به عدم سازگاری بع سرما ملایم‌تر است. این امر نشان می‌دهد که در شرایط تنش سرما ژنوتیپ‌های سازگار شده در مقایسه با تیمار سازگار نشده از سرعت نشت الکترولیت کمتری برخوردار هستند (نظامی و همکاران، ۱۳۸۶).

۲-۱۸-۲-۱ پایداری دیواره سلولی

دیواره‌ی سلولی در گیاهان دارای ساختار پیچیده‌ای است که در تعیین اندازه و شکل سلول، رشد و نمو، ارتباطات داخل سلولی و میانکنش سلول با محیط اطراف مرتبط است (میچلی، ۲۰۰۱). دیواره‌ی سلولی در گیاهان شامل پلی‌ساکاریدهای مختلف و پروتئین‌های ساختاری است. علاوه بر آن بسته به نوع سلول، ترکیبات غیرپلی‌ساکاریدی دیگری مانند لیگنین یا کوتین و سوبرین نیز موجود است. سلولز، پلی‌ساکارید اصلی دیواره‌ی سلولی، پلیمری خطی از D-گلوکز با اتصال 1 به 4-β است که به صورت میکروفیبریل‌های سازمان یافته استحکام و سختی دیواره‌ی سلولی را باعث می‌شود. میکروفیبریل‌ها در ماتریسی متشکل از پکتین، همی‌سلولز و پروتئین قرار دارند (ریتر، ۲۰۰۲). پکتین، جز اصلی تیغه میانی و دیواره‌ی اولیه در گیاهان دولپه است که ۳۵-۳۰ درصد وزن خشک دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد این مقدار در خانواده گندمیان به ۱۰-۵ درصد کاهش می‌یابد. پکتین پلی-ساکارید پیچیده‌ای با ۱۷ منوساکارید مختلف و غنی از گالاکتورونیک اسید است. بر اساس ساختار ستون اصلی مولکول و تنوع زنجیره‌های جانبی، چهار نوع پلی‌ساکارید پکتینی شامل هموگالاکتورونان^۱، رامنوگالاکتورونان^۲ I، رامنوگالاکتورونان^۳ II و زایلوگالاکتورونان^۴ (اوودو، ۲۰۰۹). پکتین از نوکلئوتید قندها با حداقل ۵۳ گلیکوزیل ترانسفراز مستقر در دستگاه گلژی سنتز می‌شود (هاندفورد، ۲۰۰۶). مطالعات ایمنوسیتوشیمی نشان داده است که هموگالاکتورونان و رامنوگالاکتورونان در سیستم‌های بخش سیس پلیمریز می‌شوند، در بخش میانی متیلاستریفیه می‌گردد و در بخش ترانس زنجیره‌های جانبی اضافه، سپس به صورت نسبتاً متیل استریفیه شده به دیواره‌ی سلولی ترشح می‌شوند که انواع مختلفی از اتصالات کووالانی، یونی و پیوند هیدروژنی را تشکیل می‌دهند (اتیچا و همکاران، ۲۰۰۵). همی‌سلولز همانند پکتین، پلی‌ساکارید غیریکنواخت و

^۱HGA

^۲RGI

^۳RGII

^۴XGA

بی‌شکل است که در دستگاه گلژی ساخته می‌شود و از طریق کیسه‌های گلژی به دیواره سلولی به عنوان پوشش سطح میکروفیبریل‌های سلولزی ترشح می‌شود. همی‌سلولز مانند سلولز دارای واحدهای قندی با اتصال β -1 به 4 است اما برخلاف سلولز دارای زنجیره‌های جانبی نیز می‌باشد. ترکیبات همی‌سلولزی به دو نوع همی‌سلولز A و همی‌سلولز B تقسیم می‌شوند. تفاوت این دو نوع همی‌سلولز در نوع قندهای تشکیل دهنده و شارژ الکتریکی آن‌ها می‌باشد. همی‌سلولز A دارای زایلوز و از نظر شارژ الکتریکی اسیدی، اما همی‌سلولز B دارای زایلوگلوکان و از نظر الکتریکی خنثی است (ساکورای و همکاران، ۱۹۸۷). به دلیل ماهیت پلیمرها، تعداد زیادی از پیوندهای داخل دیواره سلولی، محافظت کننده و تقویت کننده ساختار آن هستند. بنابراین خانواده‌های مختلف آنزیمی و ایزوزیم‌های مختلف آن‌ها این پیوندها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تغییرات ساختاری در ترکیبات و دینامیک دیواره سلولی به عنوان مهم‌ترین فاکتور مسئول در تغییرات بافتی در نظر گرفته می‌شود. تغییرات در پکتین، همی‌سلولز و سلولز همگی مسئول تغییر ساختار دیواره سلولی هستند. این تغییرات نه تنها موجب تغییراتی در حلالیت و دپلمریزاسیون پلی ساکاریدها می‌شوند بلکه بازآرایی اتصالاتشان را نیز شامل می‌شود (کاسگراو، ۱۹۸۹ و نیشیتانی، ۲۰۰۲). تغییر در ساختار پکتین نقش مهمی در فرایندهای رشد و نمو در گیاهان دارند (ایتیچا و همکاران، ۲۰۰۵ و میچلی، ۲۰۰۱ و پلوکس و همکاران، ۲۰۰۷).

۳-۱۸-۲-۱ عوامل مؤثر بر تنظیم و کنترل انبساط پذیری دیواره‌ی سلولی

کنترل انبساط پذیری دیواره‌ی سلولی عامل مهمی در رشد گیاهان به شمار می‌رود. انبساط دیواره‌ی سلولی توسط فشار تورگر ایجاد و با رفتار مکانیکی دیواره حمایت می‌گردد (جارویس و ام سی کان، ۲۰۰۰). جهت تداوم رشد، علاوه بر سنتز مواد جدید، ساختار دیواره نیز بایستی متحمل تغییر گردد. در میان آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی دیواره‌ی سلولی پراکسیدازها و پکتین متیل استرازها از اهمیت خاصی برخوردار هستند. افزایش فعالیت پراکسیدازها به سفت و چوبی شدن دیواره منجر می‌شود که

در بسیاری موارد با کاهش رشد همراه است (کاسگراو، ۱۹۹۷). همچنین ارتباط بین میزان رشد و درجه‌ی متیل استریفیکاسیون هموگالاکتورونان‌ها و فعالیت پکتین‌متیل‌استراز در تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله هیپوکوتیل آرابیدوپسیس (دریشایرو همکاران، ۲۰۰۷) و سلول‌های چوبی در حال تمایز در صنوبر (سیدلکا و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش داده شده است.

۴-۱۸-۲-۱ پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی گیاه

پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی بیشتر شامل ترکیبات آلی موجود در طبیعت هستند. آن‌ها بیش از ۹۰ درصد دیواره سلولی را شامل می‌شوند و به سه گروه: سلولز، همی سلولز و پکتین تقسیم می‌شوند (ام سی نیل و همکاران، ۱۹۸۴). سلولز مهم‌ترین پلی‌ساکارید دیواره سلولی است که شامل یک پلیمر خطی β -1,4 پیوسته شده با دنباله D-گلوکز است. سلولز به عنوان یک ساختار پلیمرکننده حضور دارد و نقش اصلی آن استحکام دیواره سلولی گیاه است (سالحیموو همکاران، ۲۰۰۰). همی سلولزها پلی‌ساکاریدهایی هستند که نسبت به سلولز ناهمگن، و دومین ساختار مهم در دیواره سلولی گیاه هستند (ویلکی و وو، ۱۹۷۷). ساختار دوم همی سلولز که عموماً در گیاهان چوبی و علفی پیدا می‌شود، گلوکومانان است که شامل یک زنجیره β -1,4 پیوسته با D-مانوز و D-گلوکز به همراه گروه‌های جانبی D-گالاکتوز است (تایمل، ۱۹۶۷).

۴-۱۹-۲-۱ سلولز

سلولز ($C_6H_{12}O_6$) بیوپلیمر فراوان و ساختار برجسته دیواره سلول‌های گیاهی است. سلولز به عنوان یک مولفه مرکزی برای مورفوژن گیاهی است و بخش عمده‌ای از زیست توده گیاهی را تشکیل می‌دهد. سلولز از زنجیره‌های گلوکان با پیوند β -1,4 تشکیل شده است که با استفاده از پیوندهای هیدروژنی متصل می‌شوند تا میکروفیبریل‌های paracrystalline را تشکیل دهند (هیوژن و همکاران، ۲۰۱۷).

در بسیاری از گیاهان، سلولز توسط یک مجموعه سلولز سنتاز (CesA) در غشای پلازما سنتز می‌شود (هیوژن و همکاران، ۲۰۱۷). میکرو فیبریل‌های سلولز حاوی ۳۶ زنجیره گلوکان هستند که هر یک با یک واحد سلولز سنتاز (CesA) سنتز شده‌اند (ماکسیم چانترئو و همکاران، ۲۰۱۵). میکرو فیبریل‌ها از C ساخته شده‌اند (نیل جی. تایلر، ۲۰۰۸) که عمدتاً بلوری هستند و در برخی از مناطق CMF غیر بلوری دارند. قطر CMF‌ها از گونه‌ای به گونه متفاوت است. هر فیبر ابتدایی توسط یک CSC سنتز می‌شود بنابراین تعدادی زنجیره در یک فیبر ابتدایی و تعدادی از زیر واحدهای کاتالیزوری یا پروتئین‌های سلولز سنتاز (CesA) در یک ذره CSC پیوند می‌یابند (مانوچ کومار و سیمون تورنر، ۲۰۱۴). اندازه‌گیری وزن مولکولی زنجیره‌های گلوکان به طور منفرد دشوار است که احتمالاً به دلیل تخریب زنجیره‌ها در طول استخراج است (نیل جی. تایلر، ۲۰۰۸).

در دیواره ثانویه در پنبه درجه پلیمریزاسیون C (DP) بین ۱۴۰۰۰-۱۵۰۰۰ است البته تعدادی از قطعات سلولز با وزن مولکولی کمتر نیز وجود دارد که ممکن است زنجیره‌های میکرو فیبریل درون هسته باشند (بورت، ۲۰۰۰). سلولز دیواره اولیه ممکن است دارای وزن مولکولی پایین‌تر با اندازه DP ۸۰۰۰ باشد. دلیل این تفاوت در DP بین زنجیره‌های سلولزی دیواره سلولی اولیه و ثانویه ناشناخته است، اما ممکن است ناشی از تفاوت در ترکیب و تجمع میکرو فیبریل‌ها باشد (براون، ۲۰۰۴). CesA بخشی از خانواده CAIY glycosyl transferase است و پلیمریزاسیون β -1,4 گلوکان را با استفاده از UDP-glycose به عنوان یک سوبسترا کاتالیز می‌کند. CesA ها پروتئین‌های بزرگی هستند که حاوی ۸ غشا بوده و دارای یک منطقه سیتوزولی هستند که حاوی مولکول D-D-D-QxxRW در فعالیت کاتالیزوری است. CesA ها متعلق به یک خانواده بزرگ پروتئینی هستند که بیش از ۹ زیر خانواده به نام Cellulose synthase-like (CSL) دارند که توالی آن‌ها مشابه توالی CesA است (ماکسیم چانترئو و همکاران، ۲۰۱۵).

در *Arabidopsis* ۱۰ ژن *CesA* شناسایی شده‌اند (ماکسیم چانترئو و همکاران، ۲۰۱۵) که به دو گروه تقسیم می‌شوند گروه اول در سنتز سلولز در دیواره سلولی اولیه و گروه دوم در سنتز سلولز در دیواره ثانویه دخیل هستند گروه اول شامل *CesA1, CesA3* و یکی از چهار پروتئین *CesA6-like* (*CesA6, CesA2, CesA5, CesA9*) هستند. *CesA1* و *CesA3* برای رشد گیاه ضروری هستند و جهش در هر کدام منجر به مرگ گیاه می‌شود. در حالی که جهش در هریک از پروتئین‌های *CesA6-like* باعث رشد خفیف در گیاه می‌شود. جهش دوگانه *CesA6* و *CesA5* برای جوانه گیاه کشنده است و جهش سه گانه *CesA2* و *CesA6* و *CesA9* برای دانه گرده کشنده است که این احتمالاً به دلیل بیان *CesA9* در بافت‌های گلدار است. زیرا بیان *CesA2* یا *CesA5* توسط یک راه‌انداز *CesA6* هدایت می‌شود، تنها جزئی از فنوتیپ‌های جهش یافته *CesA6* است و ممکن است هر ژن *CesA6-like* عملکرد خاصی در گیاه داشته باشند (هیوژن هو و همکاران، ۲۰۱۷).

بیان بیش از حد هریک از سه ژن *CesA6-like* (*CesA5, CesA2, CesA6*) می‌تواند بیوسنتز سلولز را در *Arabidopsis* افزایش دهد و بر اندازه دانه‌های میکروفیبریل سلولز در شرایط آزمایشگاهی تاثیر بگذارد که این احتمالاً به دلیل افزایش حرکت *CesA*‌های دیواره اولیه است همچنین افزایش بیان در هر کدام باعث افزایش تقسیم سلولی و همچنین افزایش میزان دیافراگم دیواره سلولی است بنابراین بیان بیش از حد برخی از ژن‌های *CesA6-like* رشد گیاه را افزایش می‌دهد. تغییرات در بیان ژن‌های *CesA* در دیواره اولیه ممکن است راهی برای افزایش سنتز سلولز و تولید زیست توده در گیاهان باشد. بیان بیش از هر یک از سه ژن *CesA6-like* بیان دیگر *CesA*‌های دیواره اولیه به استثنای *CesA9* که عمدتاً در بافت گره بیان می‌شود را افزایش می‌دهد (هیوژن هو و همکاران، ۲۰۱۷).

گروه دوم شامل *CesA7, CesA4, CesA8* است که ایزوفرم‌های ضروری برای سنتز دیواره ثانویه هستند دو پروتئین *CesA4* و *CesA8* که سنتز دیواره سلولی دخیل هستند بیشتر در بافت‌های داخلی بیان می‌شوند (ماکسیم چانترئو و همکاران، ۲۰۱۵)

مطالعات نشان داده است که اگر یکی از پروتئین‌های CesA دیواره ثانویه غایب باشد دو ژن دیگر نمی‌توانند با یکدیگر تعامل داشته باشند که این نشان می‌دهد که تعاملات خاصی برای پروتئین CesA دیواره ثانویه وجود دارد به عنوان مثال زمانی که یکی از سه ژن وجود نداشته باشد دو ژن دیگر نمی‌توانند بافت xylem را توسعه دهند (نیل جی تایلور، ۲۰۰۷).

مرور منابع (فصل دوم)

۱-۲ سیگنال‌های درگیر در تنش سرما

تاکنون در گیاهان گیرنده خاصی برای دریافت سیگنال ناشی از تنش سرما و دماهای پایین شناخته نشده است و به نظر می‌رسد که گیرنده‌های درگیر در تنش‌های غیرزیستی مشترک هستند (میورا و فورموتو، ۲۰۱۳). گیاهان ممکن است دمای پایین را از طریق تغییر در صفات فیزیکی غشا احساس کنند، زیرا سیالیت غشا در طول تنش سرما کاهش می‌یابد. در حقیقت غشا استحکامش زیاد می‌شود که می‌تواند بیان ژن‌های COR (cold-responsive) را افزایش دهد (اوروار و همکاران، ۲۰۰۰). در عرض چند ثانیه پس از یک شوک سرمایی افزایش انتقال سطوح Ca^{2+} در سیتوسول روی می‌دهد، افزایش سختی غشاء، باعث تغییر فعالیت کانال‌های یونی کلسیم می‌شود و به دنبال آن Ca^{2+} سیتوسولی را افزایش می‌دهد. سپس سیگنال Ca^{2+} به هسته منتقل می‌شود و این افزایش انتقال باعث بیان ژن‌های COR می‌شود. Ca^{2+} القا شده تحت تاثیر تنش سرما از طریق مسیره‌های مختلف کد می‌شود. گیاهان دارای گروه‌هایی از گیرنده‌های کلسیم شامل CaM (calmodulin)، CDPKs (Ca²⁺-dependent protein kinases)، CCaMK (Ca²⁺/CaM - dependent protein kinases)، CMLs (CaM-like) kinases، CAMTA (CaM-binding transcription activator)، CBLs (calcineurin B-like protein)، و CIPKs (CBL-interacting protein kinases) هستند. آنالیزهای ژنتیکی نشان داد که CDPKs به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت عمل کرده در حالی که Calmodulin3 به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی بیان ژن و مقاومت به تنش سرما عمل می‌کند. CBLs سیگنال کلسیم را از راه تعامل با خانواده CIPKs تقویت می‌کنند. CBL1 پاسخ به سرما را از راه تعامل با CIPK7 تنظیم می‌کند. CAMTA3 به عنوان تنظیم‌کننده مثبت بیان CBF2/DREB1 از راه اتصال به عناصر تنظیمی (CG-1 element vCGCGb) در راه‌انداز آن شناسایی شده است. CAMTA در تنظیم بیان CBF3/DREB1 A نقشی ندارند زیرا عناصر CG-1 در راه‌انداز آن‌ها وجود ندارد (لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ میورا و فورموتو، ۲۰۱۳).

فسفوریل‌اسیون پروتئین‌ها در پاسخ به سرما و سرکوب فعالیت فسفاتاز پروتئین نیز ممکن است وسیله‌ای برای حس دمای پائین توسط گیاه فراهم آورد. MPK(mitogen- activated protein kinase) در تنظیم سیگنال سرما و مقاومت به سرما نقش ایفا می‌کند. در آرابیدوپسیس MPK6 and MPK4 توسط MMK2 (MAP kinase kinase2) در اثر تنش سرما فسفریله می‌شود. افزایش بیان MMK2 باعث افزایش بیان CBF/DREB1ها می‌شود و مقاومت به تنش سرما را افزایش می‌دهد(میورا و فورموتو، ۲۰۱۳).

۲-۲ بررسی مسیرهای پاسخ به تنش سرما از دیدگاه مولکولی

سازگاری به سرما ناشی از فرایندهای فیزیولوژیکی و تغییرات مولکولی مانند رونویسی از ژن‌های خاص، تجمع پروتئین‌های حفاظتی و سایر متابولیت‌های درگیر در هموستازی سلول است. خانواده فاکتورهای CBF/DREB1(C-repeat binding factor/Dehydration-responsive element) از خانواده فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors) یکی از بهترین فاکتورهای رونویسی مطالعه شده در سیگنال‌های دمایی بر روی گیاهان است. این فاکتورهای رونویسی برای اولین بار در آرابیدوپسیس شناسایی شدند. پس از کاهش دما به سرعت تحریک رونویسی CBFها رخ می‌دهد، در نتیجه به دنبال آن افزایش بیان ژن هدف که نقش مهمی در سازش به سرما دارد را باعث می‌شود. در گونه‌های چوبی درگیر بودن ژن‌های CBF در سازگاری به سرما گزارش شده است. تنش سرما باعث بیان خانواده CBF از فاکتورهای رونویسی (TFs) می‌شود که به نوبه خود منجر به فعال شدن بسیاری از ژن‌های پایتن دستی می‌گردند و تحمل به سرما و انجماد در گیاهان رخ می‌دهد. CBF/DREB1 به عناصر سیس A/GCCGAC, CRT/DRE در راه‌انداز ژن‌های COR متصل می‌شوند و بیان آن‌ها را تنظیم می‌کنند (ماریویاما و همکاران، ۲۰۰۴). CBF/DREB1ها به خانواده فاکتورهای رونویسی نوع ERF/AP2(ethylene-responsive element binding factor/APETALA2) تعلق دارند (مایزوی و همکاران، ۲۰۱۱). آنالیزهای ژنومیکی ترتیب قرار گرفتن ژن‌های CBF/DREB1(CBF1/DREB1B-

CBF3/DREB1A—CBF2/DREB1C) را بر روی جفت کروموزوم ۵ آرابیدوپسیس معین کرده‌اند. در شرایط تنش سرما CBF1/DREB1B و CBF3/DREB1A نسبت به CBF2/DREB1C زودتر تحریک می‌شوند (مدینا و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین آنالیزهای ترانسکریپتوم در گیاه تراریخته‌ی افزایش بیان CBF/DREB1 آرابیدوپسیس، نشان می‌دهد که حدود ۱۲ درصد از ژن‌های COR توسط CBF/DREB1 کنترل می‌شوند، اما ژن هدف معینی برای این ۳ فاکتور CBF به طور معنادار مشاهده نشد. برخی از فاکتورهای رونویسی مانند STZ/ZAT10، C2H2-type zinc finger، RAP2.1، ERF/AP2 به تنظیم CBF وابسته هستند. اگرچه تفاوت عملکردی بین ژن‌های CBF وجود ندارد، یک آنالیز ژنتیکی با موتانت cbf2 نشان داد که مقاومت به سرما و بیان CBF1/DREB1B و CBF3/DREB1A در موتانت cbf2 افزایش می‌یابد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که CBF2/DREB1C یک تنظیم کننده منفی برای هر دو CBF1/DREB1B و CBF3/DREB1A است (تویلو و همکاران، ۲۰۰۴). هومولوگ CBF/DREB1 در بسیاری از گونه‌های گیاهی مختلف شناسایی شده‌اند. بررسی نقش عملکردی این هومولوگ‌ها نشان داد که نقش عملکردی مشابهی با CBF/DREB1 در آرابیدوپسیس دارند. افزایش بیان این هومولوگ‌ها در چندین گونه تراریخته مثل برنج و تنباکو باعث افزایش بیان ژن‌های پاسخ دهنده به سرما و مقاومت به سرما شده است. از طرفی بیان CBF/DREB1 در جو یا آرابیدوپسیس با گونه‌های دیگر مانند گندم، برنج و سیب زمینی تحت تنش سرما متفاوت است. در بعضی از گیاهان با افزایش بیان این فاکتورها، افزایش معنی‌داری در مقاومت به سرما مشاهده نمی‌شود که می‌تواند تفاوت در عملکرد CBF/DREB1 را در گونه‌های متفاوت نشان دهد (میورا و فورموتو، ۲۰۱۳). علاوه بر این، در گیاه تراریخته برنج با بیان AtCBF1 آرابیدوپسیس، در مقاومت به سرما تفاوت معنی‌داری با گیاه نوع وحشی وجود ندارد (لی و همکاران، ۲۰۰۴). با این حال، افزایش بیان CBF مشتق شده از تک لپه‌ها مانند HvCBF4 جو در برنج باعث افزایش مقاومت نسبت به سرما می‌گردد (اه و همکاران، ۲۰۰۷). فاکتورهای رونویسی MYB بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیولوژیکی مانند متابولیسم ثانویه، نمو گیاه و پاسخ به استرس‌ها را تنظیم می‌کند. فاکتورهای

رونویسی AtMB14 و Atmyb15 در مسیر سیگنالینگ پاسخ به سرما مهم است. AtMB14 و Atmyb15 بیان ژن‌های CBF را به صورت منفی تنظیم می‌کند. استفاده از microRNA مصنوعی برای مهار این فاکتورهای رونویسی باعث افزایش مقاومت به تنش سرما در آرابیدوپسیس شده است (چن و همکاران، ۲۰۱۳). CBFها برای حفاظت از پروتئین‌ها و غشا سلولی میزان پرولین و قند سلول را افزایش می‌دهند (گلیمور و همکاران، ۲۰۰۰ و پیرس، ۲۰۰۱).

افزایش بیان ژن SICBF1 گوجه‌فرنگی در آرابیدوپسیس تراریخت، ژن‌های هدف CBF و مقاومت به سرما را تحریک می‌کند، در حالی که افزایش بیان SICBF1 و یا AtCBF3 آرابیدوپسیس در گیاه تراریخته گوجه‌فرنگی، منجر به ایجاد مقاومت به سرما نمی‌گردد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۴).

۲-۳ تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به دمای پایین

بررسی‌های اخیر منتج به شناسایی تعداد زیادی ژن که به وسیله دمای پایین تحریک می‌شوند، شده است. ژن‌های مسئول واکنش به سرما که تاکنون شناسایی شده‌اند، در دو گروه متمایز قرار گرفته‌اند. نخست ژن‌های رمزکننده آنزیم‌ها یا اجزای ساختمانی سلول‌ها که در محافظت مستقیم سلول‌ها در برابر صدمات ناشی از سرما شرکت می‌کنند، دوم ژن‌های رمزکننده فاکتورهای رونویسی و دیگر پروتئین‌های تنظیم‌کننده که باعث تنظیم واکنش به دمای پایین در سطح رونویسی و چه در سطح پس از رونویسی، می‌شوند (توماشو، ۲۰۰۱).

مقاومت به سرما مستلزم تغییر سطح بیان تعدادی از ژن‌ها است، ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما، دارای الگوی بیان پیچیده‌ای، هم در سطح رونویسی و هم پس از رونویسی، هستند. دمایی که در آن بیان ژن تحریک می‌گردد و دمایی که حداکثر واکنش ژن‌ها صورت می‌گیرد، در مورد ژن‌های مختلف متفاوت است، شدت پاسخ ژن‌ها به تدریج و با کاهش دما، افزایش می‌یابد، بیان این ژن‌ها هم در سطح نسخه‌برداری و هم پس از نسخه‌برداری کنترل می‌گردد (هاگز و دون، ۱۹۹۶). ژن‌های شناخته شده

مسئول پاسخ به سرما، اکثراً به دیگر تنش‌ها نظیر خشکی و شوری نیز واکنش نشان می‌دهند، در حالی که بعضی از آن‌ها فقط مخصوص واکنش به سرما هستند (شینوزاکی، ۲۰۰۰).

بررسی بیان ژن‌ها در سطح رونویسی مشخص کرد، که در گیاهان تغییرات زیادی در بیان تعدادی از ژن‌ها در واکنش به تنش سرما رخ می‌دهد، از حدود ۸۰۰۰ ژن مورد بررسی شده آرابیدوپسیس، ۲۰۸۶ ژن در پاسخ به سرما نقش دارند که ۴۲ درصد از آنها تحریکی هستند. این نشان می‌دهد که ۲۵ درصد از مجموعه ژن‌های فعال آرابیدوپسیس می‌توانند به دمای پایین واکنش نشان دهند (کریس و همکاران، ۲۰۰۲).

بسیاری از ژن‌های مسئول واکنش به سرما، در مراحل اولیه و میانی سازگاری با سرما، فقط به صورت موقتی فعال می‌گردند. همچنین نحوه بیان حدود ۸۰۰۰ ژن آرابیدوپسیس را در پاسخ به دمای پایین تعیین کرده‌اند. مشخص شد که از ۲۱۸ ژنی که با شدت ۳ برابر در واکنش به دمای پایین فعال شده بودند، ۱۵۶ ژن به صورت موقتی بیان می‌شوند. بررسی نحوه بیان ژن‌ها نشان داد که واکنش به دمای پایین باعث تغییر بیان تعداد زیادی ژن می‌شود و الگوی زمانی بیان این ژن‌ها متفاوت است (فلورو و توماشو، ۲۰۰۲).

۴-۲ ژن‌های تنظیم کننده پاسخ سرما

بسیاری از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس بعد از قرار گرفتن در دمای پایین، در برابر انجماد مقاومت نشان می‌دهند. که سازگاری به سرما نامیده می‌شود، که در ارتباط با القا بیان ژن‌های COR (cold-regulated) توسط عناصر C-repeat/drought-responsive element (CRT/DRE) است (جاگلو و همکاران، ۱۹۹۸). ژن‌های CAS (Cold و LTI (Low temperature induced) acclimation specific) و kin (Cold induced) و RD (responsive to dessication) به عنوان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش سرما شناسایی شده‌اند. بیان ژن‌های COR برای سازگاری و مقاومت به سرما اهمیت دارند. COR47، COR15A، COR6.6، COR78/RD29A در آرابیدوپسیس و دیگر

گیاهان، dehydrin ها که از شناخته شده ترین پروتئین های گروه دوم (LEA II) هستند را کد می کنند و تحت تنش سرما تحریک می شوند (میورا و فورموتو، ۲۰۱۳). پروتئین های LEA در پاسخ به تنش های محیطی بیان می شوند و موجب پایداری گیاه در برابر تنش، محافظت و پایداری غشا و سایر ساختارهای سلولی، جلوگیری از تجزیه یون ها و پروتئین ها می شوند (بارتلز و همکاران، ۲۰۰۷). دی هیدرین هایی مثل WCOR410 در گندم، DHN5 در جو، PCA60 در هلو و CuCOR19 در مرکبات مقاومت به سرما را افزایش می دهند. علاوه بر این، بیان HSP (Heat Shock Protein) تحت تنش سرما در گیاهان تحریک می شود. HSP ها در محافظت از غشا و جلوگیری از تجزیه پروتئین ها عمل می کنند. بعضی از پروتئین های مرتبط با بیماری زایی (PR (pathogen-related) مانند PR1، PR5 (thaumatin-like protein) و -1,3 β PR2 (glucanase) در آرابیدوپسیس تحت تنش سرما تحریک می شوند. PR11 (chitinases) ، PR10 (Bet v-1 homologues) و PR14 (lipid transfer proteins) در چندین گونه تحت تنش سرما تحریک پذیر هستند (سئو و همکاران، ۲۰۰۸). افزایش بیان WCOR410 در توت فرنگی موجب افزایش مقاومت به سرما می شود (هوود و همکاران، ۲۰۰۴). فعالیت ضد انجماد β -1,3-glucanase کیتینازها و پروتئین های شبه thaumatin مانع از تشکیل یخ در فضای درون سلولی و فضای آپوپلاستی و پسابیدگی سلول می شود. علاوه بر این پروتئین ها، بسیاری از آنزیم ها مانند آنزیم های درگیر در سیستم های دفع سموم ، آنتی اکسیدان ها، فتوسنتز، متابولیسم لیگنین، متابولیسم ثانویه، تشکیل دیواره سلولی پلی ساکاریدی و... در پاسخ به تنش سرما موثر هستند.

۵-۲ بررسی اثر دمای پایین در گوجه فرنگی

در مطالعه ای که به تاثیر اثر دمای پایین در گوجه فرنگی پرداختند آن ها از گونه های *Solanum lycopersicum* و *Solanum habrochites* به همراه اینبرد لاین های حاصل از تلاقی آن ها جهت این بررسی استفاده کردند. نتایج اولیه نشان داد گونه LA3969 نسبت به والد مقاوم به دمای پایین (S. *habrochites* LA1777) مقاوم تر است. جهت تعیین ژن های درگیر در مسیر مقاومت به سرما، والدین

به همراه گونه LA3969 تحت شرایط دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز قرار گرفتند. نتایج بررسی رونوشت‌ها با استفاده از روش میکروارایه نشان داد که ۱۶۱۳، ۱۴۵۶ و ۱۵۲۳ ژن به ترتیب در LA1777، LA3969 و LA4024 در پاسخ به تنش سرما القاء می‌شوند. نتایج آنالیز Gene ontology (GO) تعیین کرد که مسیرهای القاء هورمونی، مسیر پاسخ به ROS و پیام‌رسانی وابسته به کلسیم دارای تغییرات معنی‌داری بین گونه‌های حساس و مقاوم است و ۹۲ ژن دارای بیان افتراقی بین *S. lycopersicum cv. Moneymaker* و مقاوم معرفی گردیدند (لیو و همکاران، ۲۰۱۲).

در مطالعه‌ای اثر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های یک و ۱۲ ساعت در گونه‌های مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی با استفاده از آنالیز کامل رونوشت‌ها با استفاده از روش RNA-seq و بررسی تغییرات آنزیم‌ها و آنتی‌اکسیدانت‌ها مورد ارزیابی قرار دادند. حدود ۲۱ و ۲۳ درصد از ژن‌ها به ترتیب در *S. habrochaites LA1777* و *S. lycopersicum cv. Moneymaker* تحت تنش سرما دارای بیان افتراقی نسبت به شرایط نرمال بودند. مسیرهای ژنی UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase، مسیر مولکولی پروتئین‌های serine/threonine-protein و مسیرهای پاسخ به بیوسنتز لیگنین را به عنوان مسیرهای درگیر در مقاومت به سرما معرفی کردند (چن و همکاران، ۲۰۱۵).

۶-۲ بررسی تغییرات دیواره سلولی در تنش سرما

در مطالعه‌ای تغییرات فعالیت پکتین در دیواره سلولی مورد بررسی قرار گرفت. افزایش فعالیت PME در سازگاری به سرمای کلزا مشاهده شده بود که این امر با یک افزایش در استحکام دیواره سلولی در برگ همراه بود. این استحکام منجر به یک دمتیل استریفیکیشن پکتین می‌شود که گروه آزاد کربوکسیل و یون میانجیگر Ca^{2+} متصل شده به این گروه‌های کربوکسیل به وسیله ساختن یک ژل سفت پکتات را به وجود می‌آورد (سولکا و همکاران، ۲۰۰۸).

در مطالعه‌ای فعالیت آنزیم PME تحت دو دمای مختلف در ریشه دو وارپته مختلف کاسنی مورد بررسی قرار گرفت. طی نتایج به دست آمده فعالیت PME در هر دو وارپته بدون تناقض در طول تابستان بالا و سپس کاهش یافت. اگرچه کاهش فعالیت PME در وارپته Nausica که به سرما بیشتر حساس بوده نسبت به وارپته Arancha بیشتر بود که در وارپته Arancha فعالیت PME با پایان فصل سرما دوباره بازیابی می‌شود (دونر و همکاران، ۲۰۰۶).

اسیده‌های چرب اشباع در غشای لیپیدی غیر اشباع می‌شوند که باعث سیالیت غشا می‌شوند. یک کاهش در دما باعث کاهش در سیالیت غشا می‌شود که به وسیله یک سفتی سنج بیان می‌شود. در باکتری *Cyanobacterium Synechocystis sp. PPC680* که چهار ژن برای Acil-lipid غیر اشباع دارد (desA, desB, desC, desC) که بیان سه ژن از آن‌ها در واکنش به کاهش دما افزایش پیدا می‌کند (لوس و موراتا، ۲۰۰۰).

در گیاهان *Mioscanthus* به محض پدیدار شدن سرما تغییراتی در دیواره سلولی ایجاد می‌شود. در گیاهان رشد یافته در مرحله جوانی یک افزایش در غلظت β -D glucan در طول سازگاری به سرما مشاهده شده بود. در حالیکه در ریشه‌های گندم کشت شده در قبل از یک دوره دمای پایین (۲ درجه سانتی گراد) سنتز همی سلولز بهبود یافته بود. سنتز همی سلولز در طی اولین ۲۴ ساعت کاربرد استرس افزایش پیدا می‌کند. در مقایسه در اولین ساعت ظاهر شدن دمای پایین یک کاهش در نسبت β -glucan و glucuronoarabinoxyle منشعب شده رخ داد در حالی که یک افزایش در β -glucosidase و fucosidase مشاهده شده بود. فعالیت glycosidase می‌تواند دلیل سازگاری زودگذر GXAG در بافت‌های زمستانه گندم در طول اولین ساعت سازگاری با ۲ درجه سانتی گراد باشد (زابوتین و همکاران، ۱۹۹۸).

در مطالعه‌ای که نشاهای توت فرنگی برای مدت زمان‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰ روز در اتاق رشد با دمای ۵ درجه سانتی گراد قرار داده شده بودند و میزان پراکسید شدن لیپیدهای غشا در سلول‌های بافت‌های

برگی را اندازه‌گیری شد رابطه خطی بین افزایش طول دوره سرما و تخریب غشا وجود نداشت و میزان پراکسید شدن غشا در روز ۷ کمتر از روز ۴ بود. علت این امر می‌تواند سازگاری به سرما در بافت‌های برگی در روز ۷ سرما باشد (گولن و همکاران، ۲۰۰۸).

محققین بیان داشتند که تفاوت‌های موجود در مقدار نشت الکترولیت‌ها از نمونه‌های برگ گیاهانی مانند برنج و گوجه فرنگی تحت تنش سرما زدگی با مقادیر مقاومت به سرما در این گیاهان همبستگی دارد. این نتایج نشان‌دهنده این است که تنش سرما باعث اختلال در غشاءهای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها از سلول می‌شود، بنابراین اندازه‌گیری میزان نشت از بافت‌های تحت تنش سرما معیار قابل قبولی برای مقاومت به تنش سرما است (میرمحمدی میبیدی، ۱۳۸۹)

در مطالعه‌ای با بررسی نمودارهای حاصل از روند نشت الکترولیت در سه اکوتیپ از گیاه *Paspalum vaginatum* Swartz تغییرات درصد نشت مواد را با کاهش دما در برگ‌ها، طوقه و ریشه به صورت سیکموئیدی گزارش کردند و مشاهده شد که میزان نشت الکترولیت‌ها در بخش‌های تطابق یافته دو اکوتیپ گونه مذکور در مقایسه با بخش‌های غیر تطابق یافته کمتر بوده است. محققین شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها را به عنوان یکی از مهم‌ترین نشانه‌های مرگ ناشی از تنش سرما در گیاه معرفی کردند و بیان کردند که نمودار نشت الکترولیت‌ها در گونه‌های سازگار با تنش سرما از شیب کمتری برخوردار هستند در صورتی که در گونه‌های حساس به تنش سرما، این شیب تندتر است (کاردونا و همکاران، ۱۹۹۷).

۷-۲ بررسی بیان ژن

در مطالعه‌ای که روی گیاه برنج انجام شد ۴۵ ژن *CesA/CSL* شناسایی شد. با آنالیز میکروآرای ۳۰ نمونه بافت که کل مراحل زندگی برنج را پوشش می‌دهد نشان داده شد که بیان ژن *osCesA* نسبتاً بالا و *osCSL* نسبتاً متغیر است. الگوی بیان *osCesA/CSL* و *BCL1* به طور گسترده با *osCesA/CSL* بیان می‌شوند. می‌توانند به سه گروه اصلی با ده زیر شاخه تقسیم شوند. که هر کدام

بیان مشترک در بافت‌ها را نشان می‌دهد که اساساً به خاطر ساختار متمایز دیواره سلولی است. ژن-های osCesA3,1,8 به طور خاص در دیواره سلولی اولیه و osCesA4,7,9 در دیواره سلولی ثانویه بیان می‌شوند که این نتایج مشابه نتایج در آرابیدوپسیس است. osCesA5/osCesA6 به احتمال زیاد بخشی از osCesA3 در بافت‌های خاص باشد (لینگیانگ وانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

در مطالعه‌ای پروفایل بیان نه ژن سلولز سنتاز همراه با دیگر ژن‌های مرتبط با دیواره در ساقه گیاه یونجه تحت تنش‌های مختلف (سرما، گرما، شوری) و زمان‌های مختلف (۰، ۲۴، ۷۲، ۹۶ ساعت) آنالیز و تجزیه و تحلیل شد. در این آزمایش ۲ پاسخ اصلی برای گروه‌های خاص ژنی (ژن‌های تحت تنش سرما، گرما و شوری) شناسایی شد. آنالیز فیلوژنتیک پیدایش ۶ سلول Cesa با پروتئین‌های درگیر در بیوسنتز دیواره سلولی اولیه و ثانویه را نشان داد. mtCesA6-F ، mtCesA1 ، mtCesA3 ، mtCesA6- و mtCesA7- B و mtCesA6 به دیواره سلولی اولیه تعلق دارند در حالیکه mtCesA7-A ، mtCesA4 ، mtCesA7- B و mtCesA8 به دیواره سلولی ثانویه تعلق دارند. اگرچه mtCesA7-B و mtCesA6-F پایین‌ترین درصد شناسایی را نشان دادند که بر اساس درخت فیلوژنتیک آن‌ها را به عنوان نمایندگان Cesa6 و Cesa7 طبقه‌بندی می‌کنند. Cesa های اولیه mtCesA3 و mtCesA1 نشان دهنده سطح بیان بالاتری در ساقه بودند که نقش این ژن‌ها در بیوسنتز دیواره سلولی یونجه را نشان می‌دهد (جی جئوریرو و همکاران، ۲۰۱۴).

۲-۸ بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی

در مطالعه‌ای میزان پروتئین کل، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا تحت تنش سرمای ۵ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین کل، پرولین و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، اسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز تحت تنش سرما نداشتند (منصور افشار محمدیان، ۱۳۸۶).

در مطالعه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو رقم برنج، در زمان مواجهه با تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که دمای پایین موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز، کاتالاز و آسوربات پراکسیداز در برگ و ریشه هر دو رقم شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید در طی تنش سرما افزایش معنی‌داری داشت. تنش سرما باعث کاهش معنی‌دار پروتئین محلول برگ و ریشه هر دو رقم شد (حسن‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳).

برای درک بهتر پاسخ ارقام انگور به تنش دمای پایین، تغییرات آنزیمی در زمان‌های مختلف بعد از تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که با کاهش دما فعالیت آنزیمی تغییر می‌کند. فالیته آنزیم گایاکول پراکسیداز در تمامی ارقام در محدوده زمانی ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش سرما به حداکثر رسید و پس از آن بدون تغییر باقی ماند. در حالی که حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در بین ارقام مورد آزمایش در محدوده زمانی ۸ ساعت مشاهده گردید. همچنین شرایط تنش موجب افزایش محتوی پروتئین کل در نمونه‌های مورد آزمایش گردید (کریمی و همکاران، ۱۳۹۳).

مواد و روش ها (فصل سوم)

۳-۱ کشت مواد گیاهی و اعمال تیمارها در مرحله گیاهچه‌ای

بذرهای دو گونه گوجه‌فرنگی، *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (حساس به سرما) و *S. habrochaites* LA1777 (مقاوم به سرما) که از شرکت ENZA Zaden فراهم گردید و بذور ضدعفونی شده در گلدان‌های حاوی پیت ماس و پرلیت با نسبت ۲:۱ (که در اتوکلاو استریل شده بودند) کشت شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور گونه و دما در سه تکرار انجام شد. هر گلدان که دارای سه گیاهچه بود به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. شرایط رشد گیاهچه بصورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در اتاقک های رشد (دانشکده کشاورزی بسطام) کشت گردیدند. بعد از ۴ هفته جهت اعمال تیمار دمای پایین، نیمی از گیاهچه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و به مدت ۳ روز در این اتاقک قرار گرفتند و نیمی دیگر گیاهچه‌ها در دمای ۲۳ سانتی‌گراد باقی ماندند. برای مطالعه پروفایل بیانی ژن‌ها و تغییرات آنزیم، اندام هوایی گیاهچه‌های هر دو جنس گیاه گوجه‌فرنگی بعد سه روز قرار گرفتن در دمای پایین (۱۰ درجه سانتی‌گراد) برش داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد برای استخراج mRNA و بررسی محتوای آنزیمی نگهداری گردیدند.

۳-۲ بررسی‌های بیوانفورماتیک

۳-۲-۱ شناسایی ژن‌ها

ژن‌های مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه‌فرنگی، با استفاده از سایت [Plantcyc\(https://www.plantcyc.org\)](https://www.plantcyc.org) شناسایی شد.

توالی رونوشت و پلی‌پپتید ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه‌فرنگی از سایت The Sol Genomics Network (SNG) (<https://solgenomics.net/>)، به دست آمد.

خصوصیات بیوشیمیایی مثل طول، وزن مولکولی (MW) ، (PL)، شاخص آلیفاتیک، شاخص بی- ثباتی و (GRAVY) توالی پلی پپتید ژن های مسیر بیوسنتز سلولز با استفاده از ابزار Expasy Database ProtParam انجام شد.

۳-۲-۲ رسم درخت فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیک به وسیله نرم افزار MEGA-6 طبق الگوریتم Neighbor Joining و Bootstrap 1000 انجام گردید.

۳-۳ بررسی بیان ژن

۳-۳-۱ استخراج RNA از برگ و ساقه گوجه فرنگی

کل RNAها با استفاده از روش RNAX- plus (SINACLON) استخراج گردید.

۳-۳-۲ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۳-۳-۲-۱ الکتروفورز

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز انجام گردید. ۲ میکرولیتر از نمونه های RNA ، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. پس از رنگ آمیزی، با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل، باندهای مورد نظر بررسی شد.

۳-۳-۲-۲ نانو دراپ

از دستگاه Thermo Nano Drop 2000 برای تعیین کیفیت RNAهای استخراج شده استفاده شد. حداکثر جذب RNA، در ۲۶۰ نانومتر است. در این طول موج یک واحد جذب (OD) معادل ۴۰ میکروگرم RNA در هر میکرولیتر است. نسبت OD ۲۶۰ به OD ۲۸۰ درجه خلوص RNA را مشخص

می‌کند که این نسبت (A260/280) تقریباً بایستی در محدوده ۲-۱/۸ باشد؛ که در صورت وجود آلودگی‌های پروتئینی این نسبت کاهش می‌یابد. نسبت ۲۶۰OD به ۲۳۰OD میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی‌ساکارید را نشان می‌دهد.

۳-۳-۳ حذف نمک‌ها

به منظور حذف نمک‌های باقی‌مانده در RNA استخراج شده، از پروتکل زیر استفاده شد:

- ۱۰ میلی‌لیتر آمونیوم استات ۲/۵ مولار به محلول RNA استخراج شده اضافه گردید.
- سپس ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد 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 سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰rpm سانتریوفیوژ شد.
- سوپرناتانت دور ریخته و ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه گردید و ورتکس شد.
- پس از آن، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰rpm سانتریوفیوژ گردید.
- سوپرناتانت مجدداً حذف و برای چند دقیقه اجازه داده شد تا رسوب سفیدرنگ در دمای اتاق خشک شود.

رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد.

۳-۳-۴ حذف DNA ژنومی از RNA

جهت حذف DNA ژنومی از RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده و مراحل زیر انجام گردید:

ترکیبات موجود در جدول ۱-۳ به تیوب RNase free اضافه گردید.

جدول ۱-۳ لیست ترکیبات استفاده شده جهت حذف DNA ژنومی

ترکیب	حجم
RNA	۱ میکروگرم (بر حسب میزان غلظت RNA)
بافر واکنش 10X با MgCl ₂	۱ میکرو لیتر
DNase 1, RNase free	۱ واحد (۱ میکرو لیتر)
آب تیمار شده با DEPC	حجم به ۱۰ میکرو لیتر برسد

تیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

یک میکرو 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.

۳-۳-۵ ساخت cDNA از نمونه های RNA

ساخت cDNA از نمونه های RNA طبق دستورالعمل شرکت SINACLON و با استفاده از کیت

WiScriptTM RT Master و به صورت زیر انجام شد:

مواد جدول به تیوب واکنش اضافه گردید.

جدول ۲-۳ لیست ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA

ترکیب	حجم (میکرو لیتر)
RNA مورد آزمایش	۹
آغازگر 15(dT)	۱
میکروگرم برای واکنش آنزیم RT	۱۰

سپس درب تیوپ‌ها بسته شده و یک سانتریفیوژ خیلی کوتاه انجام داده شد. پس از آن تیوپ‌ها به دستگاه PCR انتقال داده شد.

جدول ۳-۳ چرخه دمایی سنتز cDNA (PCR)

مدت زمان	دما (سانتی‌گراد)
۱۰ دقیقه	۲۵
۳۰ دقیقه	۴۲
۵ دقیقه	۸۵
∞	۴

۳-۳-۶ بررسی cDNA و آغازگرهای مورد مطالعه

جهت به دست آوردن دمای بهینه آغازگرها برای واکنش QRT-PCR و بررسی cDNA، از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) طبق جدول محلول واکنش فراهم شد و همه آغازگرها در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. چرخه دمایی واکنش PCR طبق جدول انجام گرفت و محصول تکثیر واکنش توسط ژل آگارز ۱ درصد مورد آزمایش قرار گرفت.

جدول ۳-۴ ترکیبات واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
PCR master Mix	۱۰

۲	آغازگر (رفت و برگشت)
۱	cDNA
۷	آب
۲۰	حجم نهایی

جدول ۳-۵ چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

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

۳-۳-۷ واکنش q RT-PCR

واکنش q RT-PCR با استفاده از Maxima SYBR Green/ROX- Master Mix (2X) شرکت

Thermo Scientific و طبق دستورالعمل تهیه و استفاده گردید.

جدول ۳-۶ لیست ترکیبات مواد برای واکنش q PCR

حجم (میکرولیتتر)	ترکیبات
۵	Maxima SYBR Green/ROX- Master Mix (2X)
۰/۷	آغازگر
۲	Template cDNA ≤ 500 ng
۲/۳	Water, nuclease-free
۱۰	حجم نهایی

جدول ۳-۷ سیکل دمای برای واکنش RT-PCR q

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

۳-۳-۸ انتخاب ژن‌ها و طراحی آغازگر جهت مطالعه بیان ژن

شش ژن از میان ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز سلولز و همچنین درگیر در تنش سرما طبق سایت RNA-seq، در برگ گیاهان توسعه یافته انتخاب گردید. آغازگرها با نرم افزار آنالاین Primer3 (frodo.wi.mit.edu) طراحی و با نرم افزار Clone Manager Suit ارزیابی شدند

جدول ۳-۸ لیست ژن‌ها و آغازگرهای طراحی شده که در این تحقیق

Name	Primer (5'-3')	Temperature	Leng
EF	F: CGTGGTTATGTTGCCTCAAA R: ACAGCAATGTGGGAAGTGTG	57.30	20
CesA1	F: CGAGGACATTCCGGTTTAAG R: TTACACTCCACGCAAGCAAC	57.30	20
CesA2	F: TTCGGTTACGACGCTATGTG R: TCAGGGCAAATCCTCTTCAC	57.30	20
CesA3	F: AGTTGATTGGCCCTGCTATG R: TCTTCACTCCCATTCCCAAG	57.30	20
CesA4	F: GCAAAGATTCCGATCTACCG	57.30	20

	R: TCGGTGGGATAATCAAGAGC		
CesA5	F: CAAAGCCACCGACAAATCTC	57.30	20
	R: AGGCCAGCGTATTTGACATC		

از دستگاه Applied Biosystems 7300 جهت مطالعه بیان ژن ها استفاده شد. واکنش RT-qPCR با استفاده SYBR Green master mix (SINACLON) و طبق دستورالعمل آن در سه تکرار مستقل انجام گردید. از ژن EF به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. جهت محاسبه بیان نسبی از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (زیایو راثو، ۲۰۱۳).

۴-۳ بررسی تغییرات آنزیمی

۱-۴-۳ تهیه بافر استخراج

برای تهیه بافر استخراج ۲/۴۲۳ گرم تریس Tris HCl در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و با استفاده از محلول هیدروکلریدریک 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 ۲۰ میلی لیتر گلیسرول به آن اضافه شده و حجم نهایی به ۲۰۰ میلی لیتر رسید.

۲-۴-۳ استخراج محلول آنزیمی

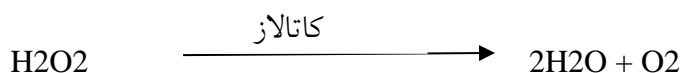
بعد از قرار دادن ۰/۲۵ گرم از نمونه برگگی در هاون چینی، مقداری ازت مایع روی آن ریخته شد و سپس توسط هاون بخوبی سائیده شد و به حالت پودر درآمد. پودر حاصل به فالكون های پانزده میلی-لیتری منتقل و به آن ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج افزوده شد. پس از ورتکس پودر نمونه و بافر استخراج، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی داخل

فالكون‌هاى پانزده ميلى‌ليترى به تيوب‌هاى دو ميلى‌ليترى منتقل شد و مجدداً به مدت ۱۵ دقيقه با سرعت $13000 \times g$ در دماى 4 ± 1 درجه سانتى‌گراد سانتریفیوژ شدند.

از اين عصاره بدست آمده براى قرائت سنجش كمى فعاليت آنزيم كاتالاز استفاده شد.

۳-۴-۳ اندازه گيرى فعاليت كاتالاز

فعاليت آنزيم كاتالاز (CAT) در دماى ۲۵ درجه سانتى‌گراد با استفاده از اسپكتروفوتومتري و به روش ابي (۱۹۸۴) اندازه‌گيرى شد. براى سنجش فعاليت آنزيم‌ها از دستگاه اسپكتروفوتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ ميكروليتر بافر فسفات پتاسيم (PH = 7) ۵۰ ميلى مولار، ۵ ميكروليتر پراكسيدهيدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ ميكروليتر عصاره آنزيم بوده و فعاليت آنزيم با فاز تاخيري صفر ثانيه‌اى، به مدت ۳ دقيقه و در فواصل زمانى ۲۰ ثانيه‌اى ثبت شد. آنزيم كاتالاز بدون نياز به عامل احياء كننده طبق معادله H_2O_2 را به H_2O و O_2 تبديل مى‌كند.



حداكثر جذب پراكسيد هيدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر صورت مى‌گيرد، از اين رو با آغاز واكنش بوسيله آنزيم كاتالاز به تدريج از ميزان پراكسيد هيدروژن در مخلوط واكنش كم و در نتيجه ميزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر نيز کاهش مى‌يابد.

جدول ۳-۹ مواد استفاده شده براى سنجش فعاليت آنزيم كاتالاز

ماده	مولاريت	ميزان مورد نياز (ميكروليتر)
بافر فسفات پتاسيم (pH= 7)	۵۰ ميلى مولار	۳۰۰۰

۵	۳/۱۴ مولار	هیدروژن پراکسید
۱۰۰		عصاره آنزیم
۳۱۰۵		حجم کل

فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (ΔOD) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین 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

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

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

df : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۱۸۰ ثانیه)

Vs : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۲۰ 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).

۴-۴-۳ روش اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

۴-۴-۵ عصاره گیری جهت سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور استخراج آنزیم گایاکول مقدار ۰/۲۵ گرم از برگ های فریز شده را در یک هاون چینی سرد ریخته و روی یخ قرار داده شد. سپس نمونه را با ازت مایع پودر کرده و به تیوپ های ۲ میلی لیتری انتقال داده و مقدار ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷) که از قبل تهیه شده و مقدار ۰/۰۲۵ گرم PVP به آن اضافه می گردد و سپس به سانتریفوژ با ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل گردید. پس از اتمام سانتریفوژ از فاز شناور رویی برای اندازه گیری میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز استفاده می شود.

۴-۴-۶ محاسبه فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

از مهم ترین آنزیم های آنتی اکسیدانت است که نقش مهمی در خنثی کردن اثرات منفی گونه های اکسیژن فعال دارد. این آنزیم H₂O₂ را به آب تبدیل می نماید. در این واکنش گایاکول به عنوان دهنده الکترون است که در حضور آن آنزیم پراکسیداز باعث احیا پروکسید هیدروژن به آب می گردد. در اثر این عمل گایاکول به ترکیب رنگی تتراگایاکول تبدیل می شود. به همین علت با شروع واکنش بوسیله آنزیم پراکسیداز به تدریج بر میزان تتراگایاکول افزوده می شود.

مخوط واکنش شامل موارد زیر بود:

بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

گایاکول (۰/۱۲۴۱۴) گرم گایاکول در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر) به میزان ۷۵۰ میکرولیتر

H₂O₂ ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم (تهیه ۵ میلی لیتر H₂O₂ ۷۰ میلی مولار:

۴/۹۶ میلی لیتر بافر + ۳۵ میکرو لیتر (H₂O₂) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر

آب مقطر استریل به میزان ۱۴۰۰ میکرولیتر

عصاره آنزیمی ۲۰ میکرولیتر

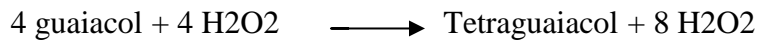
برای بلنک کردن دستگاه از همه مواد جز عصاره آنزیمی استفاده می‌گردد.

محلول حاصل در کووت در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در زمان ۶۰ ثانیه توسط دستگاه

اسپکتروفوتومتر نور مرئی قرائت گردید.

آنزیم پراکسیداز با استفاده از ترکیبات فنلی گایاکول به عنوان دهنده الکترون طبق معادله زیر

پراکسید هیدروژن را به آب احیا می‌کند:



در اثر عمل گایاکول به تترا گایاکول تبدیل می‌شود. از این رو با آغاز واکنش بویسله آنزیم

پراکسیداز به تدریج بر میزان گایاکول افزوده می‌شود. و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۴۷۰

نانومتر افزایش می‌یابد.

میزان فعالیت آنزیم گایاکول بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه بر گرم

وزن تازه بیان شد.

محاسبه فعالیت آنزیم گایاکول :

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

U : واحد آنزیمی

ΔA_{470} : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

۱ : با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن در معادله تعیین می‌گردد که معادل ۴ می‌باشد.

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

df : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۶۰ ثانیه)

V_s : 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).

۷-۴-۳ پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدئید

۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ‌گی در ۱۵ میلی لیتر از محلول ۵ درصد تری کلرو استیک اسید هموژن و به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریوفیوژ گردید. ۲ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۶۷ درصد تیوباریتوریک 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 ۶۰۰۰ rpm سانتریوفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از فرمول زیر محاسبه شد.

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

۸-۴-۳ اندازه گیری فعالیت پرولین

برای اندازه گیری فعالیت پرولین از روش بیتز و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد.

آماده سازی محلول ها:

۱. فسفریک اسید ۶ مولار: ۱ ۴۱/۲ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد با دانسیته 68.1 Kg/L به

آب مقطر افزوده و سپس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد.

۲. سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪: ۳ گرم پودر سولفوسالیسیلیک اسید را در آب مقطر حل نموده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۳. اسید ناین هیدرین: مقدار ۱/۲۵ گرم پودر اسید ناین هیدرین را در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار آماده شده به آن اضافه گردید.

۴. استاندارد ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پرولین: ۰/۰۱۰۰ گرم پرولین را در آب مقطر حل نموده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۵. استانداردهای ۰, ۴, ۸, ۱۲, ۱۶ و ۲۰ میلی گرم در لیتر پرولین: به ترتیب ۰, ۲, ۴, ۶, ۸ و ۱۰ میلی لیتر از استاندارد ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پرولین برداشته و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد.

۶. تولوئن.

روش کار:

۱. ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی را با هاون خرد شده و درون یک تیوب ریخته شد، سپس ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد آماده شده را به آن اضافه نموده و نمونه را درون یخ قرار داده شد.

۲. تیوب را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا گردید. می توان به جای سانتریفیوژ از قیف شیشه ای و کاغذ صافی برای صاف کردن نمونه ها استفاده کرد.

۳. مقدار ۲ میلی لیتر از عصاره صاف شده را درون تیوب جدید ریخته و ۲ میلی لیتر اسید ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس خوب مخلوط شد.

۴. همزمان مقدار ۲ میلی لیتر از محلول‌های استاندارد صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی گرم در لیتر پرولین را درون تیوب‌های جدید ریخته و ۲ میلی لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آن‌ها افزوده و سپس خوب مخلوط شد.

۵. نمونه‌ها را در حمام آب گرم به مدت ۱ ساعت حرارت داده و سپس درون حمام یخ قرار داده شد.

۶. مقدار ۴ میلی لیتر تولوئن به محلول اضافه نموده و آن را به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد.

استانداردهای پرولین محلول در فاز تولوئن را به اندازه لازم در کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و مقدار پرولین را در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت کرده و منحنی استاندارد رسم شد. سپس میزان جذب در نمونه‌های گیاهی را قرائت نموده و با قراردادن آن در معادله خط مقدار پرولین آمد. توجه: نمونه‌ها و محلول ناین‌هیدرین را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۹-۴-۳ روش اندازه‌گیری میزان نشت یونی (EL) و شاخص پایداری

غشا (MSI)

برای اندازه‌گیری میزان کمی این شاخص‌ها از روش سایرام (۱۹۹۴) استفاده خواهد شد. براساس این روش ۰/۱ گرم برگ را داخل ۱۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده قرار داده شده سپس نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه داخل آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد دستگاه بن‌ماری قرار داده و میزان هدایت الکتریک (EC) آن‌ها با دستگاه EC متر قرائت می‌گردد (C1). سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه داخل حمام بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و برای بار دوم هدایت الکتریکی آن‌ها قرائت می‌گردد (C2). براساس روابط زیر شاخص‌های مورد نظر محاسبه خواهند شد.

$$MSI=(1-C1/C2)*100$$

$$EL=C1/C2$$

۳-۵ اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی

۳-۵ آنالیز داده‌ها

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

Excel انجام گرفت.

نتیج و بحث (فصل پھارم)

۱-۴ نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک

ژن‌های مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه‌فرنگی با استفاده از سایت Plantcyc (<https://www.plantcyc.org>) که شامل ۲۶ ژن است شناسایی شدند (جدول ۴-۱).

خصوصیات بیوشیمیایی مثل طول، وزن مولکولی (MW)، (PL)، شاخص آلیفاتیک، شاخص بی-ثباتی و (GRAVY) توالی پلی‌پپتید ژن‌های مسیر بیوسنتز سلولز با استفاده از ابزار Expasy Database ProtParam و طبق جدول ۴-۱ به دست آمد.

ProtParam برنامه‌ای است که از طریق سرور ExPASy به صورت آنلاین انجام می‌گردد و در حقیقت روشی مناسب برای شناسایی بسیاری از خصوصیات فیزیکوشیمیایی ساده به دست آمده از توالی پروتئین مورد نظر (که همان پارامترهای مربوط به پروتئین است) است.

۱-۲-۴ آنالیز داده‌های ProtParam

طول: با توجه نتایج حاصل در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن *Solyc03g097050.3.1* دارای بیشترین طول اسیدآمینه است و ژن *Solyc08g023380.1.1* دارای کمترین طول اسیدآمینه است. (جدول ۴-۱).

وزن مولکولی: در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن *Solyc07g005840.2.1* دارای بیشترین وزن مولکولی و ژن *Solyc05g016470.1.1* دارای کمترین وزن مولکولی است.

pI: در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن *Solyc09g031570.1.1* دارای بیشترین pI و ژن *Solyc09g055560.1.1* دارای کمترین pI است. pI نقطه ی ایزوالکتریک pH است که در آن یک مولکول خاص هیچ شارژ الکتریکی خالص ندارد. نام nomenklatura استاندارد برای نشان دادن نقطه ایزوالکتریک pH است (جدول ۴-۱).

شاخص آلیفاتیک: در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن Solyc11g050810.1.1 پایدارترین ژن و ژن Solyc09g031570.1.1 ناپایدارترین ژن است. این پارامتر در حقیقت تخمینی کلی در مورد پایداری پروتئینی مورد نظر در لوله آزمایش است. اگر ضریب حاصل زیر ۴۰ بود به طور معمول پایدار است و اگر بالای ۴۰ بود ناپایدار می‌باشد (جدول ۴-۱).

شاخص بی‌ثباتی: در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن‌های Solyc05g016470.2.1 و Solyc03g097050.3.1 و Solyc00g030000.1.1 و Solyc07g005840.2.1 و Solyc12g014430.2.1 و Solyc03g005450.3.1 و Solyc08g023380.1.1 و Solyc08g061100.3.1 و Solyc08g082670.3.1 ناپایدار هستند و بقیه ژن‌ها در حالت پایدار قرار دارند. پارامتر نیمه عمر در حقیقت یک پیش‌بینی کلی از زمانی است که نیمی از مقدار پروتئین‌های موجود در سلول ناپایدار می‌گردد (جدول ۴-۱).

GRAVY (میانگین کلی هیدروپاتیسیته): در بین ژن‌های مورد بررسی بیوسنتز سلولز ژن Solyc11g050810.1.1 دارای بیشترین GRAVY و ژن Solyc08g008400.2.1 دارای کمترین GRAVY است. مقدار GRAVY برای یک پپتید یا پروتئین به صورت مجموع مقدار hydrowhay همه اسیدهای آمینه محاسبه می‌شود، که توسط تعداد بقایای توالی تقسیم می‌شود (جدول ۴-۱).

Predicted location(s) جایگاه قرارگیری ژن‌ها در سلول را نشان می‌دهد که از بین ۲۶ ژن شناسایی شده در مسیر بیوسنتز سلولز ۷ ژن در دیواره سلولی قرار دارند (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱ بررسی ژن‌های مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه‌فرنگی از سایت PorotParam

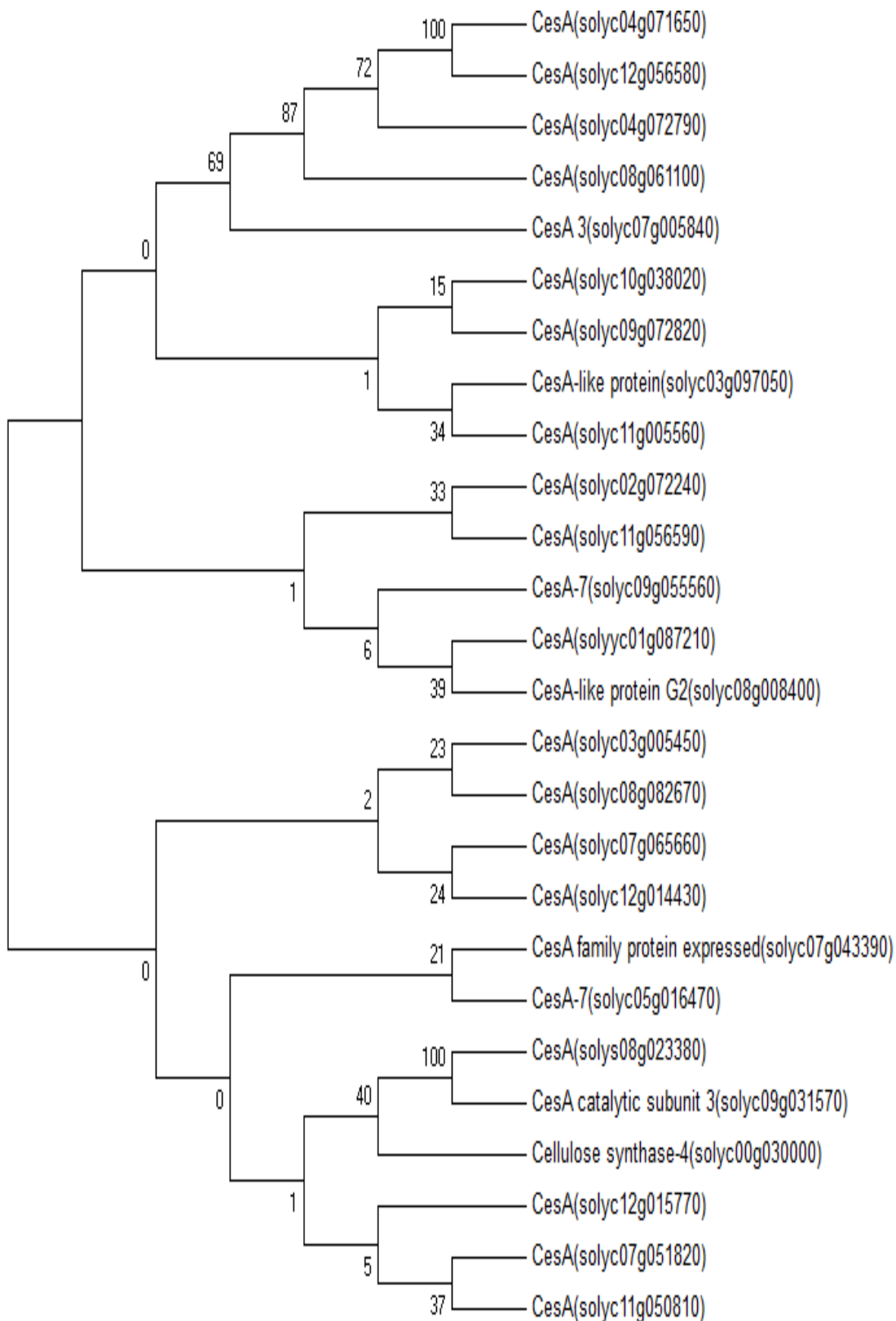
Gene ID	name	Length	molecular weight	theoretical pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Predicted location(s)
Solyc03g097050.3.1	CesA-like protein	1139	127863.43	7.28	unstable	81.67	-0.247	Chloroplast
Solyc09g072820.3.1	CesA	1048	119343.35	8.15	stable	84.07	-0.257	Chloroplast
Solyc01g087210.3.1	CesA	1083	120816.5	7.19	stable	85.22	-0.17	Chloroplast
Solyc08g061100.3.1	CesA	1086	121639.22	6.31	unstable	85.64	-0.202	Chloroplast
Solyc11g005560.2.1	CesA	1086	122267.8	6.44	stable	87.57	-0.14	Chloroplast
Solyc12g056580.2.1	CesA	1083	121807.57	7.07	stable	86.49	-0.172	Chloroplast
Solyc07g005840.2.1	CesA3	1137	127629.99	6.21	unstable	83.8	-0.197	Chloroplast
Solyc02g072240.3.1	CesA	973	110226.73	6.33	stable	86.33	-0.109	Chloroplast
Solyc04g071650.3.1	CesA	1090	122678.5	7.04	stable	86.57	-0.181	Chloroplast
Solyc04g072790.2.1	CesA	1070	121624.67	6.24	unstable	86.52	-0.176	Chloroplast
Solyc10g038020.2.1	CesA	115	12720.78	7.71	stable	87.22	0.106	Chloroplast. Mitochondrion
Solyc09g055560.1.1	CesA-7	173	20399.16	5.11	stable	86.65	-0.269	Cytoplasm. Nucleus
Solyc11g056590.2.1	CesA	171	19082.91	9.21	stable	68.42	-0.47	Chloroplast. Nucleus
Solyc07g065660.3.1	CesA	732	84234.21	6.42	stable	91.11	-0.044	Chloroplast. Golgi apparatus
Solyc07g043390.3.1	CesA family protein expressed	478	54763.4	7.55	stable	89.14	-0.102	Chloroplast. Cytoplasm
Solyc08g023380.1.1	CesA	65	7745.9	6.23	unstable	79.38	-0.062	Chloroplast. Cytoplasm. Golgi apparatus. Nucleus
Solyc09g031570.1.1	CesA catalytic subunit 3	69	8141.41	10.01	stable	98.84	0.03	Cell membrane. Chloroplast. Nucleus
Solyc07g051820.3.1	CesA	743	84014.83	8.53	stable	96.5	0.121	Cell membrane. Chloroplast. Golgi apparatus
Solyc12g015770.2.1	CesA	775	88394.46	8.58	stable	93.33	-0.03	Cell membrane. Golgi apparatus
Solyc12g014430.2.1	CesA	728	82752.63	6.3	unstable	90.37	0.078	Cell membrane. Golgi apparatus
Solyc00g030000.1.1	Cellulose synthase-4	500	57401.49	8.72	unstable	80.7	-0.136	Cell membrane
Solyc08g008400.2.1	CesA-like protein G2	182	20983.66	5.52	stable	76.1	-0.362	Cell membrane
Solyc03g005450.3.1	CesA	740	84513.28	6.83	unstable	94.15	0.112	Cell membrane
Solyc11g050810.1.1	CesA	239	26798.78	7.69	stable	0.671	0.671	Cell membrane
Solyc08g082670.3.1	CesA	752	85780.9	7	unstable	86.48	-0.008	Cell membrane
Solyc05g016470.1.1	CesA-7	61	6793.89	6.52	stable	89.51	0.002	Nucleus

۲-۲-۴ ترسیم درخت فیلوژنتیک

هدف مطالعات فیلوژنتیکی یا فیلوژنی بازسازی تاریخچه حیات و توضیح گوناگونی موجودات زنده است. این روند و تاریخچه را می‌توان به صورت یک درخت بزرگ نشان داد. اصل اساسی در فیلوژنی دسته بندی موجودات زنده بر مبنای میزان شباهت آن‌ها به یکدیگر است، در واقع ما فرض می‌کنیم که هرچه دو گونه بیشتر به هم شبیه باشند، جد مشترک آنها در درخت فیلوژنتیکی به آن‌ها نزدیک‌تر است فیلوژنتیک نوع خاصی از فیلوژنی است که مبنای آن مقایسه ژن‌های هم‌پایه در گونه‌های مختلف و یافتن میزان ارتباط و نزدیکی گونه‌ها به هم است که مبنای آن مقایسه ژن‌های هم‌پایه در گونه‌های مختلف و یافتن میزان ارتباط و نزدیکی گونه‌ها به هم است. حتی با روش‌های فیلوژنتیک می‌توان ژن‌های مختلف یک خانواده را بررسی و تاریخچه تکاملی ژن‌های یک خانواده را نیز یافت.

در سطح مولکولی نیز مطالب زیادی وجود دارند که با علم فیلوژنتیک قابل کشف هستند. وقتی تاریخچه یک خانواده از پروتئین‌ها را بررسی می‌کنیم رد پای جهش‌های ژنی، حذف‌ها، دو برابر شدن‌ها، پیدایش دو گونه از یک گونه، از دست دادن یا به دست آوردن یک عملکرد خاص، غیرفعال شدن و دیگر وقایعی که اثرات آن‌ها باعث پیدایش جهان به شکل امروزی‌اش شده است.

بر اساس درخت فیلوژنتیک ژن‌های مسیر بیوسنتز سلولز ژن‌ها به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند که ژن‌هایی که دارای خصوصیات فیزیکی شیمیایی مشابهی هستند جد فیلوژنتیکی مشابهی دارند به عنوان مثال ژن Solyc12g056580.2.1 و Solyc04g071650.3.1 که دارای خصوصیات فیزیکی شیمیایی خیلی نزدیک به هم دارند در درخت فیلوژنتیک بسیار نزدیک‌تر به هم قرار دارند.

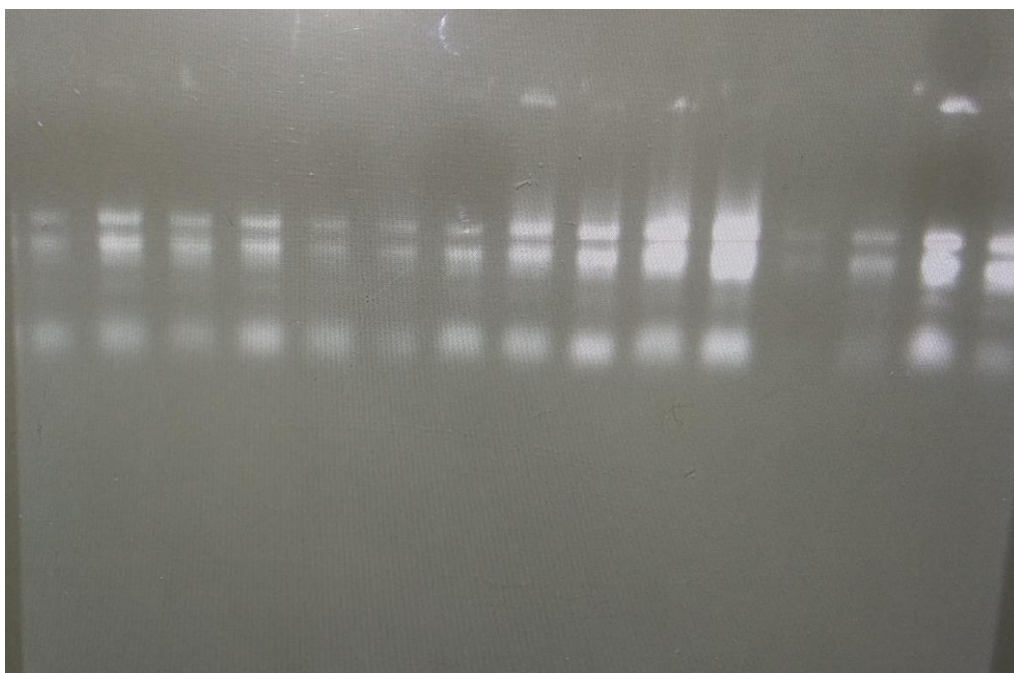


شکل ۴-۱ درخت فیلوژنتیک توالی پروتئینی مسیر بیوسنتز سلولز در گوجه‌فرنگی

۳-۴ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن *Cesa*

۳-۴-۱ بررسی کیفیت و کمیت RNA

نتایج استخراج RNA از گونه‌های *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker (حساس به سرما) و *S. habrochaites* LA1777 (مقاوم به سرما) تحت دو تیمار کنترل و دمای پایین نشان داد که RNA استخراج شده فاقد آلودگی DNA و پروتئین است. مشاهده سه باند ایجاد شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد 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 که به دلیل این که طول بیشتری دارد در بالا قرار می‌گیرد، دیگری مربوط به ۱۸s rRNA و آخری مربوط به ۵s rRNA 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.



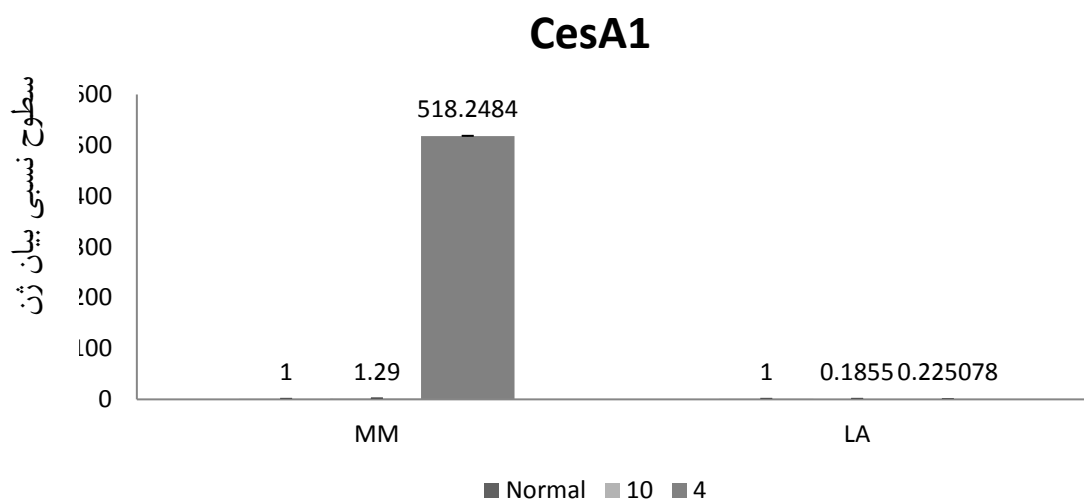
شکل ۲-۴ بررسی کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

۲-۳-۴ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن *CesA1*

نتایج بیان ژن *CesA1* طبق شکل ۳-۴ نشان داد که بیان این ژن در گونه حساس *S. lycopersicum cv. Moneymaker* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان یافته است به طوری که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰۰ برابر افزایش بیان نسبت به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد داشت. در گونه مقاوم *S. habrochaites LA1777* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان پیدا کرد در صورتی که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان نشان داد اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

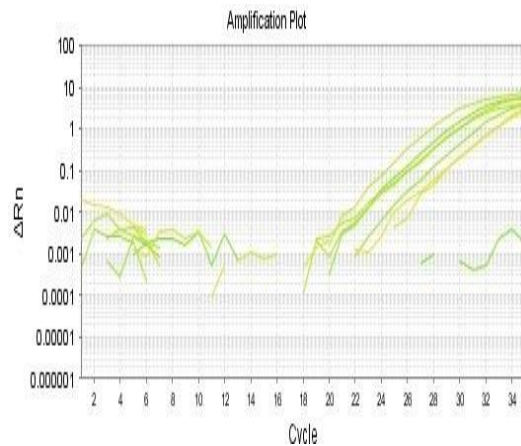
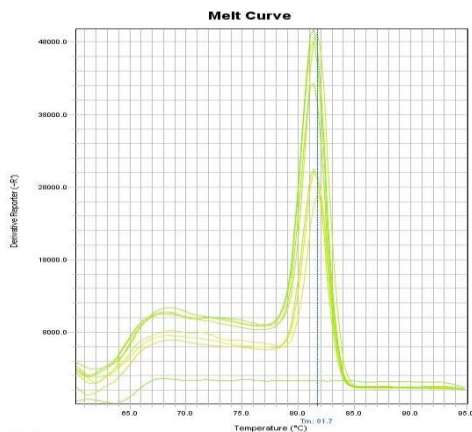
CesA1 جز پروتئین‌های مربوط به سنتز سلولز در دیواره سلولی اولیه است و برای رشد گیاه ضروری بوده و جهش در آن باعث مرگ گیاه می‌شود. افزایش در بیان CesA1 باعث افزایش سنتز سلولز در دیواره اولیه می‌شود و تولید زیست توده گیاهی را افزایش می‌دهد (هیوزن و همکاران، ۲۰۱۷).

مشابه تحقیق حاضر، جوئیرو و همکاران، ۲۰۱۴ مشاهده کردند که CesA1 در گیاه یونجه در پاسخ به استرس‌های زیستی تغییر معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۳-۴ بیان نسبی ژن CesA1 در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس S.

S. habrochaites LA1777 و گونه مقاوم **lycopersicum cv. Moneymaker**



شکل ۴-۵ منحنی ذوب بیان ژن

شکل ۴-۴ منحنی تکثیر بیان ژن CesA1

CesA1

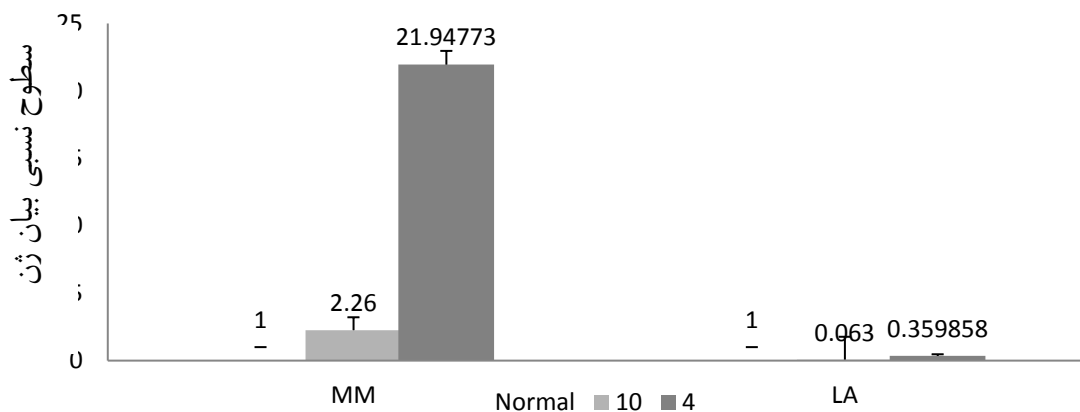
۴-۳-۳ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن CesA2

نتایج بیان ژن CesA2 مطابق با شکل ۴-۶ نشان داد که بیان این ژن در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum cv. MoneyMaker* در دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان یافته است در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان ۱۰ برابری نسبت به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد. و در گونه مقاوم به سرما *S. habrochaites LA1777* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمایی ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان پیدا یافته است در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان داشت اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

CesA2 جز پروتئین‌های مربوط به CesA6-like است که در سنتز سلولز در دیواره سلولی اولیه دخیل است. جهش در CesA2 موجب رشد خفیف در گیاه می‌شود. افزایش بیان CesA2 باعث افزایش سنتز سلولز در دیواره اولیه می‌شود و تولید زیست توده گیاهی را افزایش می‌دهد. جهش سه

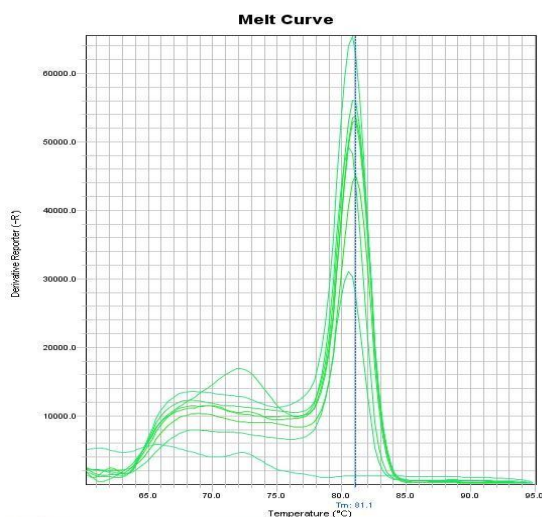
گانه Cesa9, Cesa6, Cesa2 برای دانه گرده کشنده است که این احتمالا به این دلیل است که Cesa9 در بافت‌های گلدار بیان می‌شود (هیوژن و همکاران، ۲۰۱۷).

Cesa2

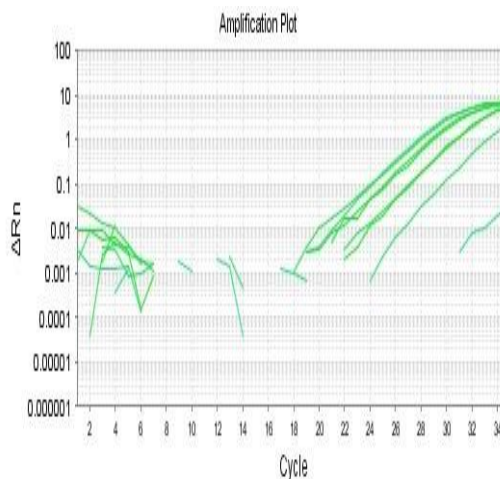


شکل ۴-۶ بیان نسبی ژن Cesa2 در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس S.

S. habrochaites LA1777 و گونه مقاوم *lycopersicum cv. Moneymaker*



شکل ۴-۸ منحنی ذوب بیان ژن Cesa2



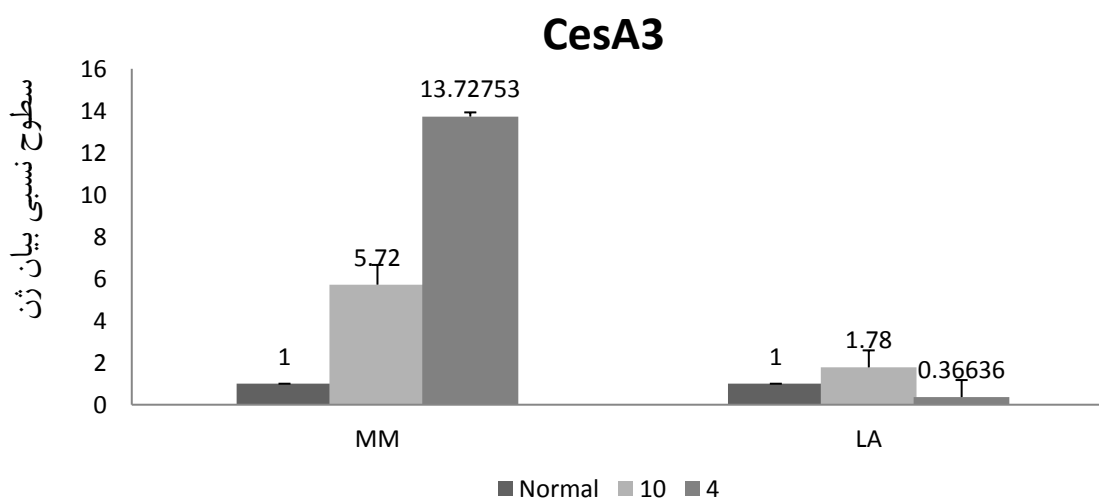
شکل ۴-۷ منحنی تکثیر بیان ژن Cesa2

۴-۳-۴ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن CesA3

نتایج بیان ژن CesA3 طبق شکل ۴-۹ نشان داد که بیان این ژن در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum cv. Moneymaker* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان یافته است اما در دمای ۴ درجه نسبت به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد دو برابر افزایش بیان نشان داد. و در گونه مقاوم به سرما *S. habrochaites LA1777* در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان داشت در حالی که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان نشان داد.

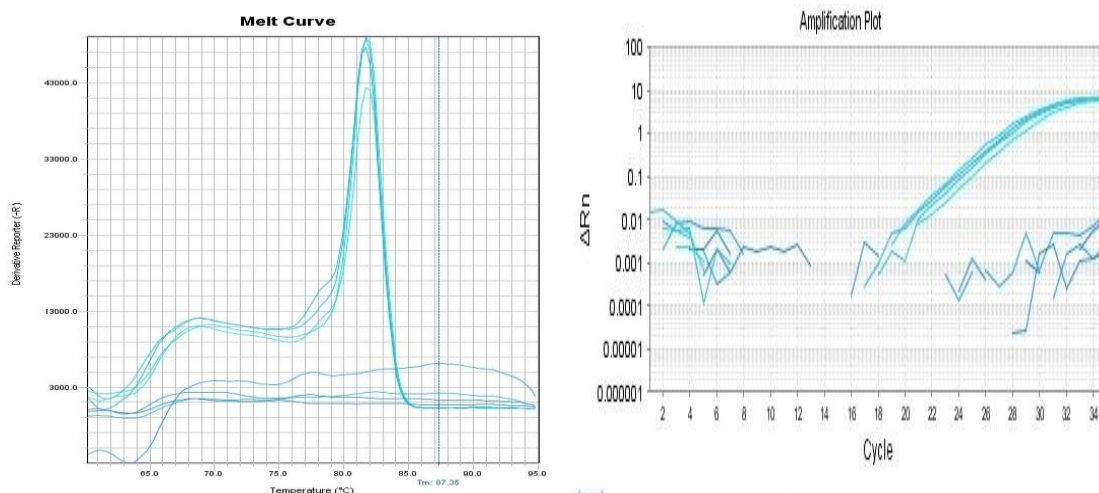
CesA3 جز پروتئین‌های مربوط به سنتز سلولز در دیواره سلولی اولیه است و برای رشد گیاه ضروری بوده و جهش در آن باعث مرگ گیاه می‌شود. افزایش در بیان CesA3 باعث افزایش سنتز سلولز در دیواره اولیه می‌شود و تولید زیست توده گیاهی را افزایش می‌دهد (هیوزن و همکاران، ۲۰۱۷).

مشابه تحقیق حاضر، جوئیرو و همکاران، ۲۰۱۴ مشاهده کردند که mtCesA3 در گیاه یونجه در پاسخ به استرس شوری تغییر معنی‌داری نشان داد و بعد از ۹۶ ساعت به حداکثر بیان خود رسید.



شکل ۹-۴ بیان نسبی ژن **CesA3** در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس *S.*

S. habrochaites LA1777 و گونه مقاوم *lycopersicum cv. Moneymaker*



شکل ۴-۱۱ منحنی ذوب بیان ژن **CesA3**

شکل ۴-۱۰ منحنی تکثیر بیان ژن **CesA3**

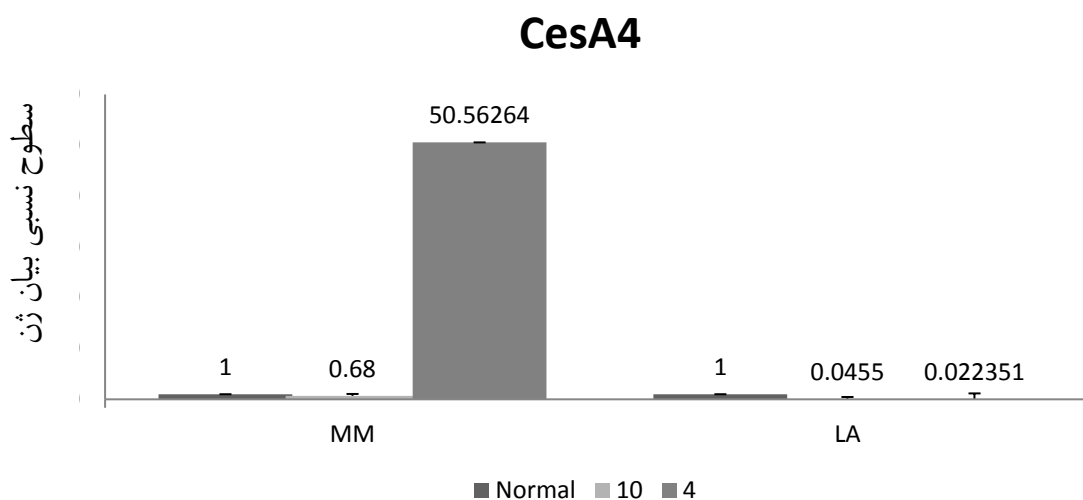
۵-۳-۴ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن **CesA4**

نتایج بیان ژن **CesA4** طبق شکل ۴-۱۲ نشان داد که بیان این ژن در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum cv. Moneymaker* در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان نشان داد اما در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان نشان داد. و در گونه مقاوم *S. habrochaites LA1777* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمایی ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان نشان داد.

CesA4 جز پروتئین‌های مربوط به سنتز سلولز در دیواره سلولی ثانویه است. بیشتر در بافت‌های داخلی وجود دارد و در توسعه بافت زایلیم دخیل است. اگر در دیواره ثانویه یکی از پروتئین‌های مربوط

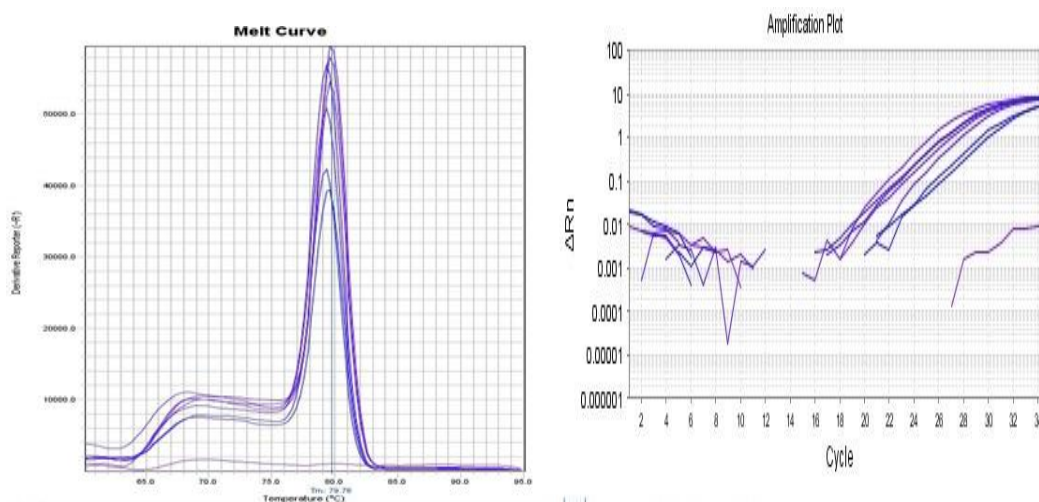
به سنتز سلولز غایب باشد دو پروتئین دیگر نمی‌توانند با یکدیگر تعامل داشته باشند (هیوژن و همکاران، ۲۰۱۷).

مشابه تحقیق حاضر، جوئیرو و همکاران، ۲۰۱۴ مشاهده کردند که mtCesA4 در گیاه یونجه در پاسخ به استرس گرما کاهش بیان یافت که بعد از ۲۴ ساعت تنش گرما به کم‌ترین مقدار در بیان رسید.



شکل ۴-۱۲ بیان نسبی ژن *CesA4* در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس *S.*

S. habrochaites LA1777 و گونه مقاوم *lycopersicum* cv. *Moneymaker*



شکل ۴-۱۴ منحنی ذوب بیان ژن *CesA4*

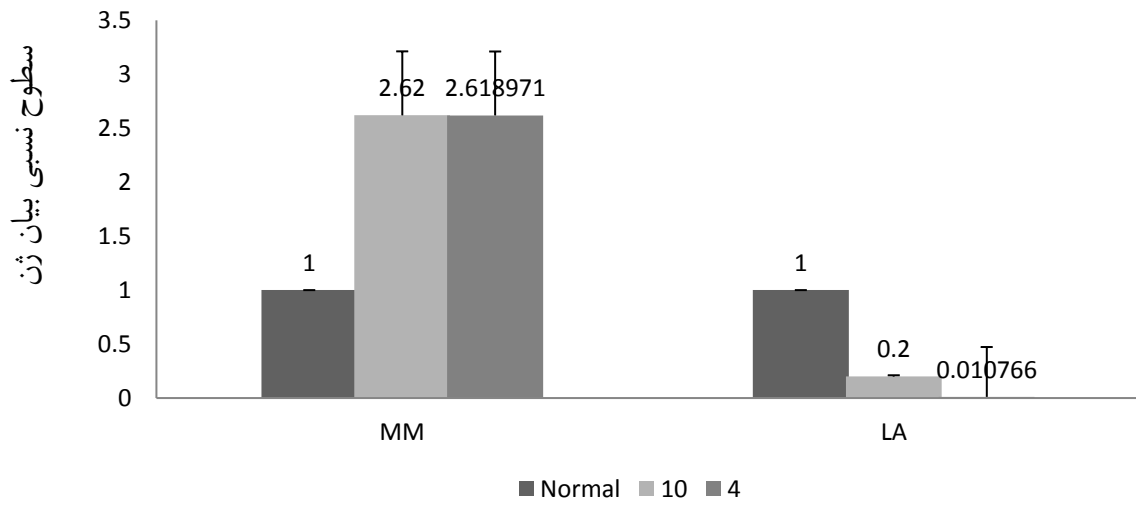
شکل ۴-۱۳ منحنی تکثیر بیان ژن *CesA4*

۴-۳-۶ بررسی تغییرات سطوح بیان ژن *CesA5*

نتایج بیان ژن *CesA5* طبق شکل ۴-۱۵ نشان داد که بیان این ژن در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum* cv. *Moneymaker* در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد افزایش بیان نشان دادند در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۱۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. و در گونه مقاوم *S. habrochaites* LA1777 در دمای ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمایی ۲۳ درجه سانتی‌گراد کاهش بیان نشان داد.

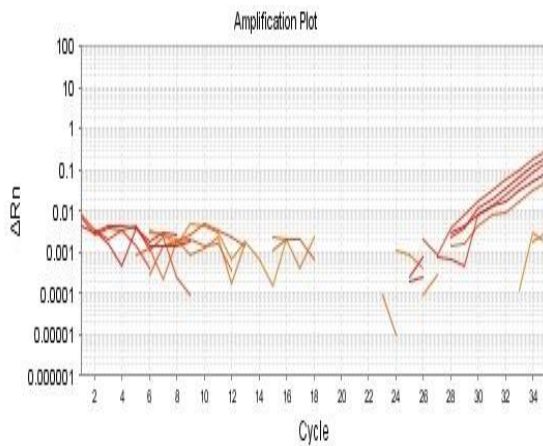
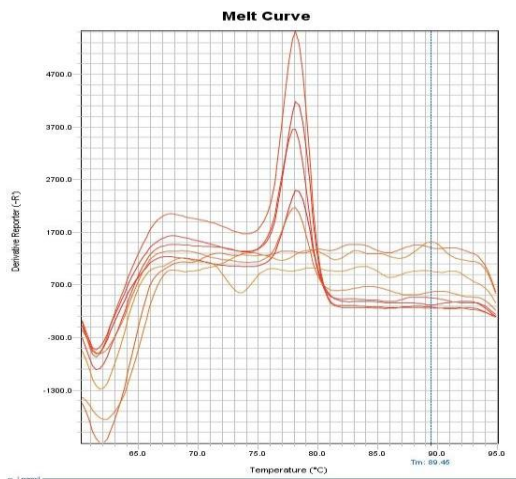
CesA5 جز پروتئین‌های مربوط به *CesA6-like* است که در سنتز سلولز در دیواره سلولی اولیه دخیل است. جهش در *CesA5* موجب رشد خفیف در گیاه می‌شود. افزایش بیان *CesA5* باعث افزایش سنتز سلولز در دیواره اولیه می‌شود و تولید زیست توده گیاهی را افزایش می‌دهد. جهش دوگانه *CesA5* و *CesA6* برای جوانه گیاه کشنده است (هیوژن و همکاران، ۲۰۱۷).

CesA5



شکل ۱۵-۴ بیان نسبی ژن *CesA5* در دمای ۲۳ و ۱۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد در دو گونه حساس

S. habrochaites LA1777 و گونه مقاوم *lycopersicum* cv. Moneymaker



شکل ۴-۱۷ منحنی ذوب بیان ژن

شکل ۴-۱۶ منحنی تکثیر بیان ژن *CesA5*

CesA5

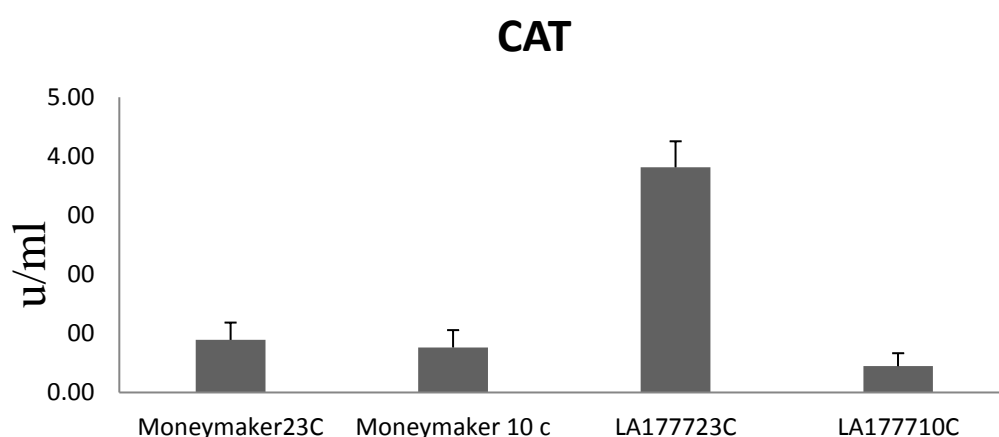
۴-۴ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

۴-۴-۱ اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم طبق شکل ۴-۱۸ نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در طی دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت به طوری‌که در گونه مقاوم به سرما *S. habrochaites* LA1777 پس از سه روز تنش دمای ۱۰ درجه‌ای کاهش پنج برابری نسبت به میزان فعالیت آن در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum cv. Moneymaker* داشت. (نمودار ۴-۶).

این آنزیم نقش مهمی در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم (سکین و همکاران، ۲۰۱۰) و میتوکندری (فویرونکتور، ۲۰۰۰) دارا است. با فعالیت این آنزیم H_2O_2 به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود (بلوخینا و فاگروستدت، ۲۰۱۰).

مشابه با نتایج آزمایش ما لیبو و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که میزان کاتالاز در وارپته مقاوم به سرما LA1777 در اثر سرما به صورت معنی‌داری کاهش یافت اما در وارپته حساس LA42024 پس از ۵ روز تیمار سرما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

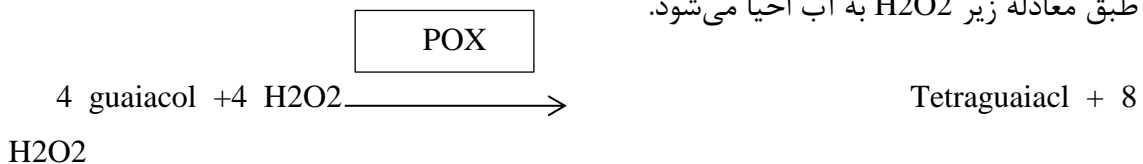


شکل ۴-۱۸ بررسی میزان فعالیت کاتالاز

۲-۴-۴ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز طبق شکل ۴-۱۹ نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز پس از سه روز تنش دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت به طوری که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گونه مقاوم به سرما *S. habrochaites* LA1777 سه برابر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گونه حساس به سرما *S. lycopersicum* cv. Moneymaker بود. پراکسیداز جهت تجزیه H_2O_2 به ترکیبات فنولی گایاکول به عنوان دهنده الکترون نیاز دارد و

طبق معادله زیر H_2O_2 به آب احیا می‌شود.

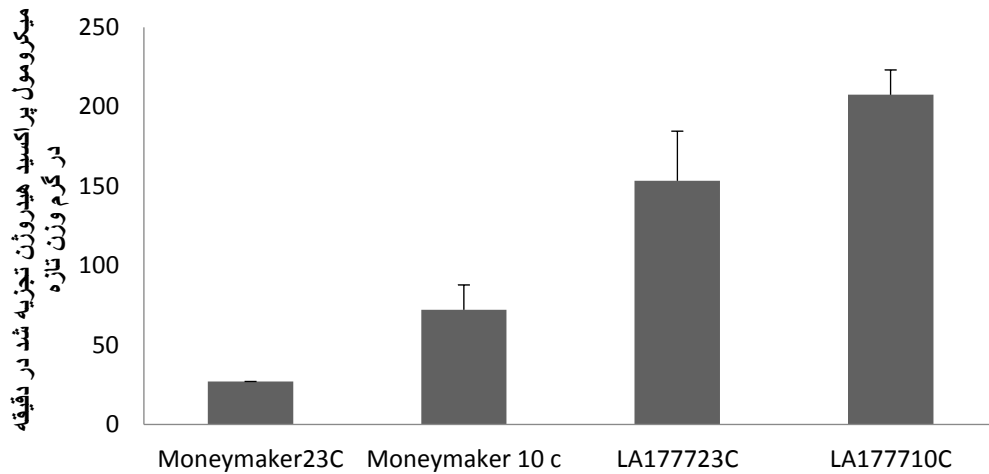


جایگاه تولید پراکسیدازها در سیتوزول است. در گیاهان عالی آنزیم پراکسیداز در تعدادی از فرایندهای سلولی مثل مکانیسم دفاعی میزبان، اتصال عرضی مونومرهای گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی، عمل چوبی شدن و چوب پنبه‌ای شدن شرکت می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تنش‌های محیطی در تعداد زیادی از گیاهان گزارش شده است (کوپرو و همکاران، ۲۰۱۲).

مشابه با تحقیق حاضر، بازدید وحیدی و شریفی (۱۳۹۵) مشاهده کردند که میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در دو رقم گیاه چای تحت تنش دمایی پایین افزایش یافت.

مشابه با تحقیق حاضر، دانشمند (۱۳۹۵) مشاهده کرد که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه گوجه فرنگی تحت تنش اکسیداتیو قرار گرفتند افزایش یافت اما در صورتی که از تیمار آسکوربیک در طی تنش استفاده شد کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد.

Gayacol



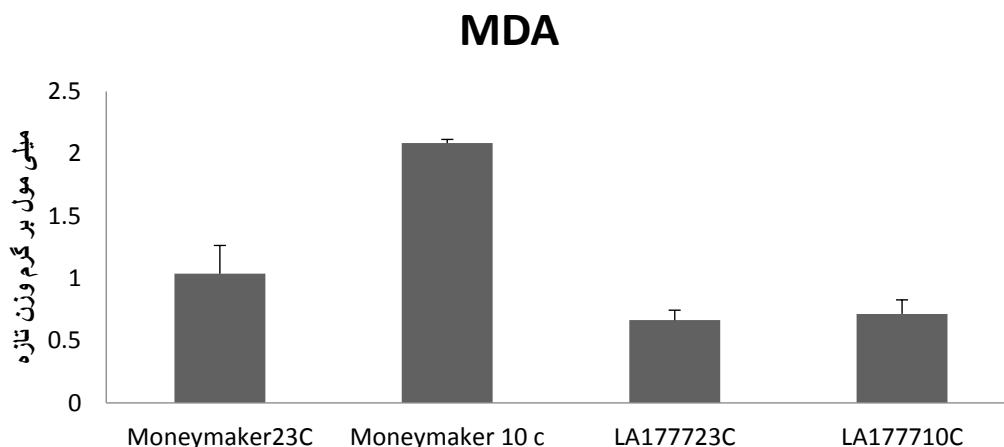
شکل ۴-۱۹ بررسی میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز

۳-۴-۴ اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید

نتایج حاصل از بررسی فعالیت مالون‌دی‌آلدهید طبق شکل ۴-۲۰ نشان داد که میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدهید پس از سه روز تنش دمای ۱۰ درجه‌ای در گونه حساس *S. lycopersicum* cv. Moneymaker و گونه مقاوم *S. habrochaites* LA1777 افزایش یافت اما میزان افزایش در *S. lycopersicum* cv. Moneymaker سه برابر میزان مالون‌دی‌آلدهید در *S. habrochaites* LA1777 بود.

مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان یک شاخص برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نشان‌دهنده آسیب به غشا سلول است (لیو وهمکاران، ۲۰۰۹). زیرا این ترکیب تحت تاثیر تخریب و پراکسید شدن غشا سلولی آزاد می‌شود (بهاتارچارجی و موخرجی، ۲۰۰۲).

مشابه نتایج تحقیق حاضر، لیو و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که تمام واریته‌های گوجه فرنگی که در معرض دمای پایین قرار داشتند افزایش نشت الکترولیت و محتوای MDA را نشان دادند اما دو گونه مقاوم به سرما پس از ۳ دقیقه تنش سرما به طور معنی‌داری پایین‌تر بود.



شکل ۴-۲۰ بررسی میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدئید

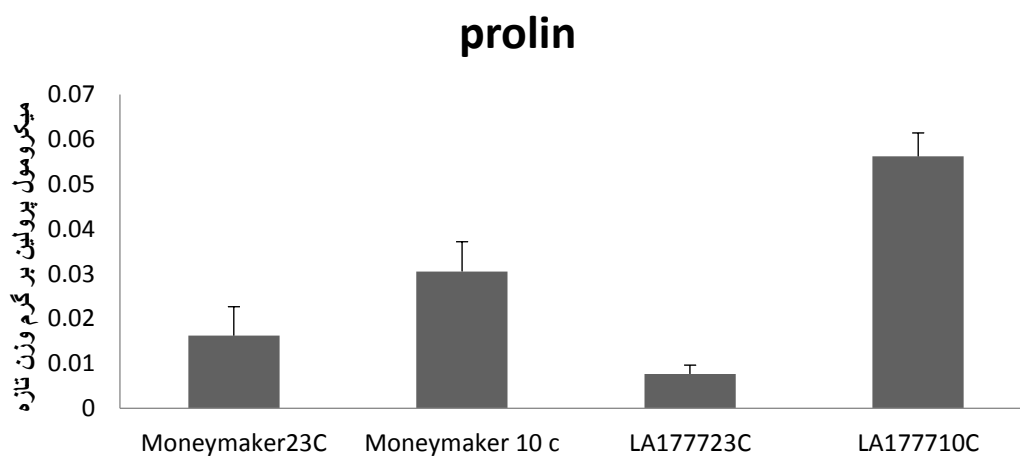
۴-۴-۴ اندازه‌گیری میزان پرولین

نتایج حاصل از بررسی پرولین طبق شکل ۴-۲۱ نشان داد که میزان انباشت پرولین پس از سه روز تنش دمای ۱۰ درجه‌ای در هر دو *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker و مقاوم *S. habrochaites* LA1777 افزایش یافت اما میزان انباشت پرولین در *S. habrochaites* LA1777 دو برابر میزان انباشت پرولین در *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker بود.

پرولین به عنوان یک اسمولیت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش‌هایی مانند دمای پایین کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نقش اساسی را ایفا می‌کند و به عنوان چپرون شیمیایی (chemical chaperone) باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی جلوگیری می‌کند (یامچی و همکاران، ۱۳۸۳)

و در شرایط تنش ، تجمع آن سریع‌تر از اسیدآمین‌های دیگر رخ می‌دهد (لینهوس و برگمن ، ۱۹۹۵).

مشابه با نتایج تحقیق حاضر، لیو و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که محلول‌های سازگار، مانند پرولین و کربوهیدرات‌ها، نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلول و حفظ یکپارچگی غشا دارند. بنابراین تفاوت در انباشت پرولین و قندهای محلول در بین گونه‌های مقاوم و حساس در تنش سرما را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در طول استرس سرما، محتوای پرولین به‌طور پیوسته در LA1777 افزایش یافت. میزان پرولین پس از ۵ روز تیمار سرما، در LA1777 به طور معنی‌داری بالاتر از LA42024 بود. اما اختلاف معنی‌داری در محتوای پرولین بین LA3969 و LA42024 در طی تنش سرما مشاهده نشد.



شکل ۴-۲۱ بررسی میزان فعالیت پرولین

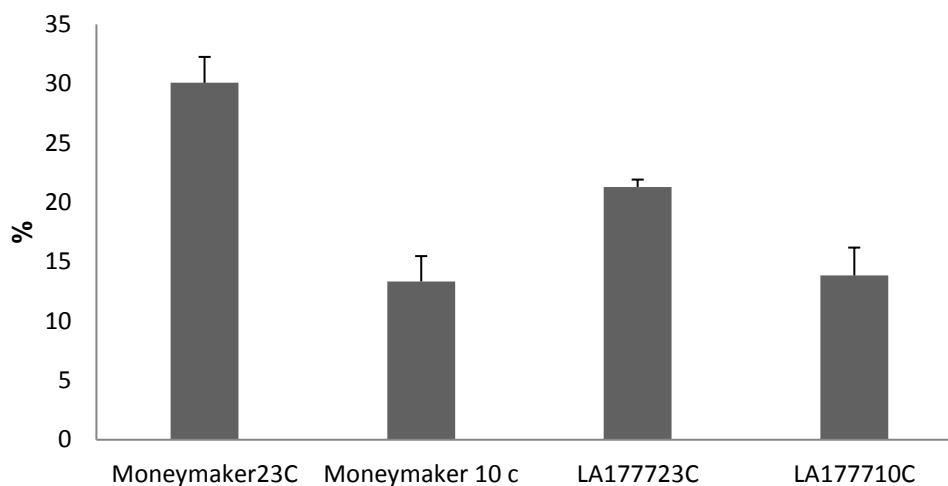
۴-۴-۵ اندازه گیری پایداری غشا

نتایج حاصل از بررسی پایداری غشا طبق شکل ۴-۲۴ نشان داد که میزان پایداری غشا در دو گونه حساس به سرما *S. lycopersicum* cv. Moneymaker و گونه مقاوم به سرما *S. habrochaites* LA1777 پس از ۳ روز تنش ۱۰ درجه‌ای در هر دو گونه کاهش یافت اما میزان تغییر و کاهش در *S. lycopersicum* cv. Moneymaker دوبرابر کاهش در *S. habrochaites* LA1777 بود در حالیکه در هر دو گونه پس از تنش میزان MSI به یک اندازه بود (شکل ۴-۱۰).

آسیب سرما باعث تغییرات در خصوصیات فیزیکی غشا، تراوش مواد محلول و کاهش تبادلات پلازما باعث برهم خوردن تعادل غشا می‌شود. تغییر در حالت فیزیکی غشا باعث کاهش نفوذپذیری انتخابی غشا و فعالیت معمول آن شده، منجر به اختلال در فعالیت‌های سلولی و اندامک‌ها می‌شود که این نیز به نوبه خود باعث افزایش نفوذپذیری بافت‌های حساس و مقاوم به سرما در مقابل یون‌ها در دمای تنش‌زا می‌شود (موراتاوس، ۱۹۹۷). به طور کلی، دما پایین، فعالیت طبیعی مراحل فیزیولوژیکی را مختل کرده و باعث آسیب‌های برگشت‌پذیر در گیاهان و اختلال سراسری در مراحل سلولی و متابولیکی می‌شود (تایزوزایگر، ۲۰۰۲).

برخلاف نتایج تحقیق حاضر، لیو و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که گوجه‌فرنگی‌هایی که در معرض دمای پایین قرار داشتند گونه‌های مقاوم به سرما LA1777 نسبت به گونه حساس به سرما LA42024 ضایعات شدیدی در غشا داشتند.

MSI



شکل ۴-۲۲ بررسی میزان پایداری غشا

۴-۵ تعیین ضریب همبستگی بین صفات مورد مطالعه

جدول ۴-۲ ضریب همبستگی بررسی بیان ژن Cesa

CesA4	CesA3	CesA2	CesA1	
			0.608576*	CesA2
		0.582947	0.169027	Cesa3
	-0.07928	0.092737	0.446843	CesA4
0.135406	0.299101	0.171665	-0.26039	CesA5

طبق جدول ضریب همبستگی بین ژن‌های CesA1 و CesA2 ۶۰ درصد همبستگی مثبت وجود

دارد در حالی که بین دیگر ژن‌های Cesa همبستگی وجود ندارد.

جدول ۳-۴ ضریب همبستگی بین فعالیت آنتی اکسیدان‌ها

<i>MDA</i>	<i>MSI</i>	<i>GPX</i>	<i>CAT</i>	
			0.712267*	GPX
		0.559792	0.954948*	MSI
	-0.21137	-0.81221*	-0.43848	MDA
-0.28955	0.766555*	0.553136	0.728826*	PRO

طبق جدول ۳-۴ کاتالاز با آنزیم گایاکول پراکسیداز ، پایداری غشا و پرولین همبستگی مثبت وجود دارد. همچنین بین پایداری غشا و پرولین نیز همبستگی مثبت وجود دارد. در حالی که بین گایاکول پراکسیداز و مالون‌دی‌آلدئید همبستگی منفی وجود دارد.

نتیجہ گیری و پیشہادات (فصل پنجم)

۱-۵ نتیجه گیری

در این پژوهش اثر تنش دمای پایین روی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز سلولز در دیواره سلولی در دو گونه متفاوت از نظر مقاومت به سرما مورد بررسی قرار گرفت. مقاومت به سرما مستلزم تغییر سطح بیان تعدادی از ژن‌ها است، ژن‌های پاسخ دهنده به سرما دارای الگوی پیچیده‌ای هم در سطح رونویسی و هم پس از رونویسی هستند. دمایی که در آن ژن القا می‌شود و دمایی که حداکثر واکنش ژن‌ها صورت می‌گیرد در گیاهان مختلف متفاوت است. شدت پاسخ ژن‌ها به تدریج و با کاهش دما، افزایش می‌یابد. نتایج بیان ژن‌های CesA نشان داد که ژن‌های CesA به جز CesA4 در گونه حساس افزایش بیان داشتند در حالیکه ژن‌های CesA به جز CesA3 در گونه مقاوم کاهش بیان داشتند که می‌توان دلیل این تفاوت در بیان ژن‌ها بین گونه حساس و مقاوم را به مکانیسم درک سرما ربط داد به این صورت که گونه حساس به سرما سریعتر سرما را درک می‌کند اما گونه مقاوم به دلیل مقاوم بودن به سرما دمای پایین را دیرتر درک کرده و برای تغییر در سطوح بیان ژن‌ها نیاز به دمای پایین‌تر و مدت زمان بیشتر دارد.

همچنین می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در سطوح بیان ژن‌های CesA در دیواره اولیه ممکن است راهی برای افزایش سنتز سلولز و تولید زیست توده در گیاهان باشد که به موجب آن مقاومت به سرما در گیاهان ایجاد می‌شود.

تاکنون گیرنده‌های خاصی برای دریافت سیگنال ناشی از تنش سرمایی و دمای پایین شناخته نشده است و به نظر می‌رسد گیرنده‌های درگیر در تنش‌های غیر زیستی مشترک هستند. گیاهان ممکن است دمای پایین را از طریق تغییر در صفات فیزیکی غشا حس کنند زیرا سیالیت غشا در طول تنش سرما کاهش می‌یابد. در حقیقت غشا استحکامش زیاد می‌شود که می‌تواند بیان ژن‌های COR را افزایش دهد. در این پژوهش نیز میزان پایداری غشا در هر دو گونه حساس و مقاوم به سرما پس از سه روز تنش دمای پایین کاهش یافت. همچنین مالون‌دی‌الدئید که محصول پراکسیداسیون

لیپیدی است تحت تاثیر تخریب و پراکسید شدن غشا سلولی آزاد می‌شود و نشان دهنده آسیب به غشا سلول است که در این پژوهش نیز میزان مالون‌دی‌الدئید پس از تنش دمایی پایین در گونه حساس به میزان سه برابر افزایش یافت که در نتیجه آن نشت الکتروولیت و پایداری غشا کاهش یافت. پرولین یک نقش حفاظتی در گیاهان تنش دیده بازی می‌کند و تحت شرایط تنش بیشتر تجمع می‌یابد. و در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر است در نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز میزان تجمع پرولین در گونه مقاوم به میزان دو برابر بیشتر از گونه حساس تجمع یافت. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه مقاوم کاهش پنج برابری نسبت به گونه حساس نشان داد در حالیکه میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گونه مقاوم افزایش سه برابری نسبت به گونه حساس داشت.

نتایج تحقیق فوق حاکی از نقش ژن‌های سلولز سنتاز در تنش دمایی پایین است و بعنوان اولین گزارش در زمینه الگوی بیان این ژن‌ها انجام شده است که می‌تواند در مطالعات عملکردی ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

۲-۵ پیشنهادات

- ۱- اندازه‌گیری میزان سلولز و همی‌سلولز
- ۲- اندازه‌گیری میزان لیگنین
- ۳- ایجاد لاین‌های موتانت برای هر کدام از ژن‌های Cesa
- ۴- اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی در دوره‌های طولانی‌تر سرما
- ۵- کاربرد هورمون‌های مختلف و بررسی اثرات آن‌ها روی تغییرات بیان ژن‌های سلولز

فهرست منابع

افشار محمدیان م. انصاری پیری ز. (۱۳۸۶)، "تاثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آنتی اکسیدان‌های آنزیمی گیاه استویا" مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، شماره ۲، دوره ۳۰: ص ۱۵۴-۱۴۰.

بازید وحدتی ح. و شریفی ر. (۱۳۹۵)، "بررسی تغییرات آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و پروتئین کل در پاسخ به تنش در برخی رقم‌های چای" پنجمین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار.

پیوست، غ. (۱۳۸۵)، "سبزیکاری"، انتشارات دانش پذیر، ص ۳۹۲.

حسن‌دخت، م. (۱۳۹۱)، "تکنولوژی تولید سبزی"، انتشارات سلسله ص ۱۱۲.

حسن‌نژاد ز. سید نژاد م. گیلانی ع. حسیبی پ. (۱۳۹۳) "اثر تنش سرما بر فعالیت آنزیم‌های آننتی اکسیدانی گیاهچه دو رقم برنج" مجله تولیدات گیاهی، شماره ۲، دوره ۳۷: ص ۲۷-۳۷.

دانشمند ف. (۱۳۹۲) "پاسخ سیستم دفاع آننتی اکسیدان گیاه گوجه‌فرنگی به تنش کم آبی و برهم کنش آن با آسکوربیک اسید" زیست‌شناسی گیاهی ایران، شماره ۱۹، دوره ۶: ص ۷۲-۵۷.

کافی، م.، برزوئی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع.، و نباتی، ج. (۱۳۸۸) "فیزیولوژی تنش‌های

محیطی در گیاهان" انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۵۰۲ صفحه.

کریمی علویچه م. عبادی ع. موسوی ا. سلامی غ. (۱۳۹۳) "بررسی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و پروتئین کل در پاسخ به تنش سرما در برخی ارقام انگور" نشریه علوم باغبانی، دوه ۲۹، شماره ۱.

گالشی، س.، ترابی، ب.، رسام، ق.، راحمی کاریزکی، ع.، و برزگر، ا. (۱۳۸۸) "تنش و مدیریت آن در

گیاهان" ترجمه (انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان).

میرمحمدی میبیدی، ع.، و ترکش اصفهانی، س. (۱۳۸۸) "جنبه‌های فیزیولوژیک و به‌نژادی تنش-های سرما و یخ‌زدگی گیاهان زراعی" انتشارات گلبن. ۳۳۶ صفحه.

Achard P. Gong F. Cheminant S. Alioua M. Hedden P. and Genschik P. 2008. The cold-inducible CBF1 Factor-Dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism. *The Plant Cell* 20:2117-29.

Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, M., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., and Altabella, T. 2006. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett.* 28: 1867-1876.

Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-379.

Bartels D. Phillips J. and Chandler J. 2007. Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. *Plant Desiccation Tolerance* 35:115-37.

Bhattacharjee S. and Mukherjee A.K. 2002 Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology* 30: 279-287.

Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science.* 89: 1113-1121.

Blokhina O. and Fagerstedt K.V. 2010 Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (5):359-373.

Bohn M. Lüthje S. Sperling P. Heinz E. and Dörffling K. 2007. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *Journal of Plant Physiology* 164:146-56.

Bolwell, C., and Fluhr, R. 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5: 241-245.

Cavalcanti, F.R., Vilela Resende, M.L., Matos Santos Lima, J.P., Gomes Silveira, J.A., and Abreu Oliveira, J.T. 2006. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 68: 198-208.

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 Biology*. 15:132.

Chinnusamy V. Ohta M. Kanrar S. Lee B.H. and Hong X. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 17:1043-54.

Close, T.J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperatures. *Physiol. Plant*. 100: 291-296.

Corrado G, Caramante M, Piffanelli P, Rao R .2014.Genetic diversity in Italian tomato landraces : Implications for the development of core collection, *Scientia Horticulturae* 168, 138-144.

Cosgrove D 1989 Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* 177, 121-130.

Derbyshire P, McCann M and Roberts K .2007. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyl is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology* 7, 31-42.

Eticha D, Stass A and Horst W J 2005 Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant Cell and Environment* 28, 1410-1420.

Eticha D, Stass A and Horst W J 2005 Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant Cell and Environment* 28, 1410-1420. *EVELOPMENT* 17:1043–1054.

Foyer, C H., Vanacker, H., Gomez, L.D., and Harbinson, J. 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 659-668.

Foyer, C.H., M, Lelandais., and Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92: 696-717.

Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010 Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

Gilmour S.J. Sebolt A.M. Salazar M.P. Everard J.D. and Thomashow M.F. 2000. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124:1854-65.

Gong, M., Chen, B., Li, Z.G., and Guo, L.H. 2001. Heat shock induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Plant Physiol.* 158: 1125-1130.

Greaves, J. A., Rufener, G., K., Chang M.T., and Koehler, P. 1996. Development of resistance to pursuit herbicide in corn the IT gene. Proceedings of the 48 th Annual Corn and Sorghum Research Conference. 104-108.

Gulen, H., Cetinkaya, C., Kadioglu, M., Kesici, M., Cansev, A. and Eris, A. 2008. Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*). Plants Under Low Temperature. *Journal of Biological. Environmental, Science.* 2: 95-100.

Gusta, L.V., Trischuk, R., and Weiser, C.J. 2005. Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* .24: 308-318.

Handford M .2006. Biosynthesis of plant cell walls. *Ciencia e Investigación Agraria* 33, 179- 196.

Hughes, M. A and Dunn, M. A. 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*, 47: 291- 305

Inze, D., and Van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 6:153-158.

Jaglo-Ottosen K.R. Gilmour S.J. Zarka D.G. Schabenberger O. and Thomashow M.F. 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280:104-6.

Janda, T., Szalai, G., and Paldi, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.

Jarvis M C and McCann M C .2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall:

Concepts and methodology. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 1-13.

Joo, JH., Bae, Y.S., and Lee, J.S. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol.* 126: 1055-1060.

Kanaya, E., Nakajima, N., Morikawa, K., Okada, K., and Shimura, Y. 1999. Characterization of the transcriptional activator CBF1 from *Arabidopsis thaliana*. Evidence for cold denaturation in regions outside the DNA binding domain. *J Biol Chem.* 274: 16068-16076.

Kim, Y.-H., Kim, C.Y., Song, W.-K., Park, D.-S., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., Bang, J.-W., and Kwak, S.-S. (2008) Overexpression of sweetpotato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta*, 227, 867-881.

Koyro, H.-W., Ahmad, P., and Geissler, N. 2012 Abiotic stress responses in plants: an overview. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*.

Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, JF. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, somatic and cold stress. *Plant Physiol* 130: 2129-2141.

Kubacka-Zebalska, M, Kacperska, A. 1999. Low temperature-induced modifications of cell wall content and polysaccharide composition in leaves of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) *Plant Sci*, 148, 59–67.

Le Gall H, Philippe F, Domon J, Gillet F, Pelloux J, Rayan C .2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic stress. Doi :10.3390/plants4010112, 112-166.

Lee B.H. Henderson D.A. and Zhu J.K. 2005. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell* 17:3155-75.

Lee S.C. Huh K.W. An K. An G. and Kim S.R. 2004. Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor, CBF1/DREB1b, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells* 18:107-14.

Leinhose V. and Bergman H. 1995. Changes in the yield lignin content and protein pattern of barley induced by drought stress. *Angewandte-Botanik* 69: 206-210.

Lejeune-Hénaut I, Brancourt-Hulmel M, Pelloux J, et al .2013. Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 51–61.

Limin, A.E., Danyluk, J., Flower, L.P., Chavin, F.R., and Sarhan, F. 1997. Chromosome mapping of low temperature induced Wcs120 family genes and regulation of cold tolerance expression in wheat. *Molecular and General Genetics*.Germany. 253: 720-727.

Lissarre M. Ohta M. Sato A. and Miura K. 2010. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signaling & Behavior* 5:948-52.

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(11): e50785.

Liu Z.J., Zhang X.L., Bai J.G., Suo B.X., Xu P.L. and Wang L. 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in droughtstressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)* 121(2): 138–143.

Mahajan S, Tuteja N .2005. Cold, salinity and drought stresses. An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 139-158.

Maruyama K. Sakuma Y. Kasuga M. Ito Y. and Seki M. 2004. Identification of cold- inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal* 38:982.

Madam B. Rahemi M. Mousavi A. and Martínez-Gómez P. 2011. Evaluation of the behavior of native Iranian almond species as rootstocks. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2:29-34. 93.

McKersie, B.D and Bowley, S.R. 1998. Active oxygen and freezing tolerance in transgenic plants. In *Plant Cold Hardiness*. Plenum Press New York. pp. 203-212.

Mckersie, B.D. 2004. Oxidative stress. Dept of Crop Science, University of Guelph, [online]. [http://www. Oxidative stress. Htm](http://www.Oxidative stress. Htm) [15 Dec 2004].

Medina J. Catalá R. and Salinas J. 2011. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science* 180:3-11.

Mei, Y. Song, S. 2010. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *Zhejiang University Science*, 11: 965-972.

Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6, 414-419.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Annual Review of Plant Science*. 7: 405-415.

Miura K. and Furumoto T. 2013. Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14:5312-37.

Miura K. and Hasegawa P.M. 2010. Sumoylation and other ubiquitin-like posttranslational modifications in plants. *Trends in Cell Biology* 20:223-32.

Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Aparicio-Trejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194: 346-352.

Murata, N., and Los, D.A. 1997. Membrane fluidity and temperature perception.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461: 205–210.

Nazari M. Amiri R.M. Mehraban F. and Khaneghah H.Z. 2012. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:183-9.

Nguyen, H.T., Leipner, J., Stamp, P., and Guerra-Peraza, O. 2009. Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 116-122.

Nguyen, H. Leipner, J. Stamp, P. 2009. Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by

suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* ,47: 116-122.

Yabuta, Y. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiology* , 45: 1586-1594.

Nishawar, J. 2009. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electronic Journal of Biotechnology* , ISSN: 0717-3458.

Taiz, L. Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. Sinauer Association, Inc, Publisher, pp. 792.

Nishitani K. 2002. A genome-based approach to study the mechanisms by which cell wall type is defined and constructed by the collaborative actions of cell wall related enzymes. *Journal Plant Research* 115, 303-307.

Oh S.J. Kwon C.W. Choi D.W. Song S.I. and Kim J.K. 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5:646-56.

Örvar B.L. Sangwan V. Omann F. and Dhindsa R.S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23:785-94.

Ovodov Y S 2009 Current Views on Pectin Substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 35, 269-284.

Pelloux J r m, Ruste´ rucci C and Mellerowicz E J 2007 New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* 12 267-277.

Prasad, T. K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal*, 10: 1017- 1026.

Premachandra, G. S., Saneoka, H., Fujita, K. and Ogata, S. 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany*, 43: 1569- 1576.

Rajashekar C.B, Lafta A .1996. Cell-wall changes and cell tension in response to cold acclimation and exogenous abscisic acid in leaves and cell cultures. *Plant Physiol.* 111, 605–612.

Reiter W-D .2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 536-542.

Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garret, D.K., Mahan, J.R., and Allen R.D. 2000. stress tolerance in transgenic tobacco seedling that overexpress glutathione transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41:1229-1234.

Sakurai N, Tanaka S and Kuraish S 1987 Changes in cell wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. *Plant and Cell Physiology* 28, 1059- 1070.

Saruyama, H., Tanida, M., 1995. Effect of chilling on activated oxygen scavenging enzymes in low temperature sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa*, L.). *Plant Science.* 109: 105-113.

Scandalios, J.G. 2006. Oxidative stress responses what have genome scale studies taught us? *Genome Biol.* 3:1019.1-1019.6.

Seo P.J. Lee A.K. Xiang F. and Park C.M. 2008. Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant and Cell Physiology* 49:334-44.

Shen, W., Nada, K., and Tachibana, S. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiol.* 124: 431-439.

Siedlecka A, Wicklund S, Péronne M A, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B and Mellerowicz E J 2008 Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiology* 146, 554-565.

Singh, D.P. 2003. Oxidative stress in: *Stress Physiology*. New International (P) Limited New Delhi. pp. 41.

Sitt, M., and V, Hurry. 2002. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr.Opin. Plant Biol.* 5: 199-206.

Solecka D, Zebrowski J, Kacperska A (2008). Are involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants? *Ann. Bot*101, 521–530.

Strand, A., Fpyer ,C.H., Gustafsson, P., Gardestrm, P., and V, Hurry. 2003. Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ.* 26: 253-535.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology* (3th ed). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Thomashow, M. F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? *Plant Physiology*, 125:89- 93.

Thonar C, Liners F, van Cutsem P .2006. Polymorphism and modulation of cell wall esterase enzyme activities in the chicory root during the growing season. *J. Exp. Bot*, 57, 81–89.

Viswanathar, C., and Zhu, J.K. 2002. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Phil Trans R Soc Lond B.* 357: 877-886.

Voragen A.G.J .1998. Alterations in cell walls of winter wheat roots during low temperature acclimation. *J. Plant Physiol*, 152, 473–479.

Wolkers, W.F., S., McCredy., W.F, Brandt., Lindsey, G.G., and Hoekstra, F.A. 2001. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim. Acta.*12: 196-206.

Xin, Z., and Browse, J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.* 23: 893-902.

Xu, H., and Heath. M.C. 1998 .Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell.* 10: 585-597.

Zhang S. Wang Y. Li K. Zou Y. Chen L. and Li X. 2014. Identification of cold-responsive miRNAs and their target genes in nitrogen-fixing nodules of soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 15:13596-614.

Zhang X. Fowler S.G. Cheng H. Lou Y. and Rhee S.Y. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 39:905-19.

Zhu, W., Zhao, D., Maio, Q., Xue, T., Li, X., and Zheng, C. 2009. *Arabidopsis thaliana* Metallothionein, AtMT2a, Mediates ROS Balance during Oxidative Stress. *Plant Biol.* 52: 585-592.

Abstract

Tomatoes are tropical plants that are sensitive to low temperatures, and the reduction in temperature at all stages of growth leads to the destruction of the cell wall and thus the loss of cold resistance, which causes damage to the plant. In this research, the pattern of expression of cellulose biosynthesis genes and the content of certain enzymes under low-temperature stress in two cold-resistant (*S. lycopersicum* cv. MoneyMaker) and cold resistant tomato (*S.habrochaites* LA1777) tomatoes were investigated. The results showed that *CesA1*, *CesA2* and *CesA5* genes had different expression patterns in the studied species, so that in *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker increased expression and in *S. habrochaites* LA1777 decreased expression. The *CesA3* gene is one of the key genes in cellulose synthesis in the cell wall, whose destruction or destruction causes plant destruction and death, was induced in resistant species more than susceptible. The activity of the enzyme guaiac peroxidase increased as a result of cold stress, so that in *S. habrochaites* LA1777 more than *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker Also, catalase activity decreased under cold stress, which was higher in susceptible species than in *S. habrochaites* LA1777. The activity of malondialdehyde and proline increased, and the membrane stability in both species decreased, which decreased in *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker was more likely to be thought that the cold stress caused the destruction and destruction of the cell wall in the sensitive species *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker and increase the sensitivity to cold in this species.

The results of this study indicate the role of cellulose synthase genes in low temperature stress and as the first report on the pattern of expression of these genes, which can be used in genes functional studies.

Keywords (5 to 7 keywords): Tomato, *CesA*, Guaiacol peroxidase, Catalase, Malondialdehyde, Membrane stability, proline



Shahrood University of
Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc.(M.A. or Ph.D.) Thesis in Biochemistry and molocular Genetics of Horticultural
Products

***study of expression pattern of cellulose
biosynthesis genes in cold-sensetive
and tolerant tomato genotypes under
low temperture***

By:

Fatemeh Izanloo

Supervisor:

Dr. Ziba Ghasimihagh

Dr. Parviz Heydari

January,2019