

الحمد لله الذي
خلقنا من
الحمم



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

مطالعه اثرات ملاتونین بر گیاهچه های گوجه فرنگی تحت تنش سرما

نگارنده: فائزه مظلومی

استاد راهنما

دکتر پرویز حیدری

استاد مشاور

دکتر امین ابراهیمی

بهمن ۹۹

شماره: ۱۱۹
تاریخ: ۱۴۰۰/۲/۱۶

باسمه تعالی



فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای فائزه مظلومی با شماره دانشجویی ۹۶۳۵۷۱۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی تحت عنوان مطالعه اثرات ملاتونین بر گیاهچه های گوجه فرنگی تحت تنش سرما که در تاریخ ۱۳۹۹/۱۱/۲۷ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰	☐	ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸-۱۹	☒
ج) درجه خوب: نمره ۱۶-۱۷	☐	د) درجه متوسط: نمره ۱۴-۱۵	☐
ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد ☐			
نوع تحقیق: نظری ☐		عملی ☒	

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر پرویز حیدری	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	-
۳- استاد مشاور	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مهدی برادران فیروزآبادی	دانشیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر شاهرخ قرنچیک	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر مهدیه پارسائیان	استادیار	



نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر علی درختان شادمهری

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

فرم شماره ۲۲۲۴ تاریخ ۱۳۹۹/۲/۱۴
شماره: ۴۹۲۸۴/فای/خانم:
مدیر تحصیلات تکمیلی
جهت بررسی و اقدام لازم.

تقدیم اثر

ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان پایان نامه خود را تقدیم می نمایم به:

پدر و مادر عزیزم به خاطر تمام تلاش های محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی همیشه مشوق راهم بوده اند.

به استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت مراری نمودند.

و در آخر به تمام زنان و مردان سرزمینم که برای رسیدن به قله های رفیع دانش از هیچ تلاش و کوششی دریغ نمیکنند.

تشکر و قدردانی

تشکر شایان نثار از دستان که توفیق را رفیق را هم ساخت تا این مسیر را با موفقیت به پایان برسانم و این میسر نبود مگر با کمک خانواده عزیزم که همیشه در کنارم و مشوق را هم بوده اند. تشکر و قدردانی ویژه دارم از استاد فاضل و فریخته خود جناب آقای دکتر پرویز حیدری که بابت و راهنمایی خود همیشه چراغ را هم بوده اند. هم چنین از استاد مشاور خود جناب آقای دکتر امین ابراهیمی قدردانی می نمایم. پاسکزاری میکنم از تمام اساتید که تقدیرم که در تمام این سال ها از ایشان آموختم و ایستادن در قله های علم و معرفت را برایشان آرزو مندم.

تعهد نامه

اینجانب فائزه مظلومی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه اثرات ملاتونین بر گیاهچه های گوجه فرنگی تحت تنش سرما تحت راهنمایی 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 پژوهشهای 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 بافتهای 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: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷

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 .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

دمای پایین از جمله عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان گرمسیری همچون گوجه‌فرنگی است. گیاهان از مکانیسم‌های مختلفی جهت کاهش اثرات مخرب تنش سرما استفاده می‌کنند. ملاتونین بعنوان یک مولکول تنظیم‌کننده در برخی فرآیندهای رشد و توسعه گیاهان و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو درگیر است. هرچند اطلاعات کمی در زمینه نقش ملاتونین در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی همچون سرما وجود دارد. در این مطالعه، اثرات ملاتونین بر برخی رفتارهای فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های SAM در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های SAM سنتتاز سبب سنتز آنزیم S-Adenosyl methionine که در چندین مسیر بیوسنتزی مهم سلولی درگیر است، می‌شوند. در این مطالعه، ملاتونین در سه غلظت (۰، ۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و تیمار کاهش دما ۸ درجه سانتی‌گراد (بمدت ۳، ۶ و ۲۴ ساعت) در کنار دمای نرمال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار کاهش دما و ملاتونین بر صفات فیزیولوژیکی مانند فعالیت آنزیم کاتالاز، شاخص نشت الکترولیت، میزان مالون دی‌آلدئید و محتوی کلروفیل کل اثرات معناداری القا می‌کنند. بطور کلی تنش سرما سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید که نشان می‌دهد دمای بکار رفته سبب القا تنش اکسیداتیو شده است. البته کاربرد ملاتونین اثرات متفاوتی در طی تنش ایجاد کرد و محتوی کلروفیل کل تحت تیمار ملاتونین کاهش یافت و تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین توانست میزان فعالیت کاتالاز پس از ۲۴ ساعت از تنش سرما را کاهش دهد. در کل پاسخ‌های گوجه‌فرنگی تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و تداوم تنش سرما تا حدودی متفاوت از سایر واکنش‌ها بود که نشان‌دهنده القا مسیرهای ثانویه پاسخ به تنش در سلول‌های گیاه می‌باشد. همچنین بیان ژن‌های SAM تحت تاثیر تیمارهای بکار رفته قرار گرفت. بعنوان مثال، ژن SAM1 تحت تیمار ۳۰ میکرومولار ملاتونین و پس از شش ساعت از تنش سرما افزایش بیان نشان داد و ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثرات سرکوبگری بر بیان این ژن نشان داد. تیمار سرما بمدت ۶ ساعت بدون کاربرد ملاتونین و تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط نرمال، بیان ژن‌های SAM2، SAM3 و SAM5 را افزایش دادند. نتایج برهمکنش پروتئینی و نواحی پروموتور ژن‌های SAM نشان داد که این ژن‌ها در فرآیندهای مختلفی درگیر هستند و نقش مهمی در تنظیم مسیرهای پایین دست مرتبط به پاسخ به تنش و تنظیم رشد گیاهان برعهده دارند. نتایج این تحقیق یک دید اولیه از نقش ملاتونین در تنش سرما و همچنین نقش ژن‌های SAM ارائه داد که نتایج حاصل می‌تواند در کارهای مولکولی مرتبط به اصلاح گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تنش‌های غیر زیستی، آنتی‌اکسیدانت‌ها، بیان ژن، ژن‌های SAM، پایداری غشا.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۲-۱ هدف	۳
فصل دوم: کلیات و مرور منابع	۵
۲- کلیات	۶
۱-۲ خاستگاه گوجه فرنگی	۶
۲-۲ گیاهشناسی گوجه فرنگی	۶
۳-۲ ارزش غذایی	۸
۴-۲ آمار تولید گوجه فرنگی در جهان و ایران	۹
۵-۲ تنش	۱۰
۱-۵-۲ تنش زیستی	۱۰
۲-۵-۲ تنش غیرزیستی	۱۱
۱-۲-۵-۲ تنش سرما	۱۲
۲-۲-۵-۲ سنجش و هدایت سیگنال تنش سرما	۱۳
۳-۲-۵-۲ پاسخ های گیاه به تنش سرما	۱۴
۴-۲-۵-۲ عوامل رونویسی دخیل در تنش سرما	۱۴
۶-۲ هورمون های گیاهی	۱۶
۷-۲ ملاتونین	۱۷
۱-۷-۲ تاریخچه کشف ملاتونین	۱۷
۲-۷-۲ بیولوژی و عملکرد ملاتونین	۱۷
۱-۲-۷-۲ پاسخ ملاتونین در شرایط تنش غیرزیستی	۱۹
۳-۷-۲ مسیر بیوسنتز ملاتونین	۲۱
۸-۲ بیولوژی و مسیر بیوسنتز اتیلن	۲۳
۱-۸-۲ بیولوژی و مسیر بیوسنتز متیونین	۲۵
۲-۸-۲ آنزیم SAM	۲۷

۲۹.....	۹-۲ مرور منابع
۲۹.....	۱-۹-۲ پژوهش‌های انجام شده در زمینه آنزیم SAM.....
۳۲.....	۲-۹-۲ تحقیقات انجام شده بر روی اثر ملاتونین در گیاهان
۳۹.....	فصل سوم: مواد و روش‌ها.....
۴۰.....	۱-۳ زمان و محل آزمایش
۴۰.....	۲-۳ نحوه اجرای آزمایش
۴۰.....	۳-۳ کاشت مواد گیاهی
۴۱.....	۴-۳ بررسی خصوصیات آنزیمی
۴۱.....	۱-۴-۳ بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم کاتالاز
۴۱.....	۱-۴-۳-۱ تهیه بافر استخراج
۴۱.....	۲-۴-۳ استخراج محلول آنزیمی
۴۳.....	۲-۴-۳ اندازه‌گیری نشت الکتروولت
۴۳.....	۳-۴-۳ اندازه‌گیری شاخص مالون دی آلدئید
۴۴.....	۴-۴-۳ اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید.....
۴۵.....	۵-۳ بررسی‌های بیوانفورماتیک
۴۵.....	۱-۵-۳ شناسایی ژن‌ها
۴۵.....	۲-۵-۳ خصوصیات فیزیوشیمیایی
۴۶.....	۳-۵-۳ آنالیز پروموتورهای ژن‌های SAM.....
۴۶.....	۴-۵-۳ برهمکنش پروتئین‌ها
۴۶.....	۶-۳ تاثیر ملاتونین بر بیان ژن‌های SAM.....
۴۶.....	۱-۶-۳ انتخاب ژن‌ها
۴۶.....	۲-۶-۳ طراحی پرایمر جهت مطالعه بیان ژن‌ها.....
۴۷.....	۷-۳ استخراج RNA کل
۴۷.....	۱-۷-۳ مراحل استخراج RNA کل
۴۸.....	۱-۷-۳-۱ تهیه بافر استخراج
۴۸.....	۲-۷-۳-۱ مراحل انجام کار
۴۹.....	۸-۳ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۴۹	۳-۸-۱ نانودراپ
۵۰	۳-۸-۲ الکتروفورز
۵۰	۳-۸-۲-۱ تهیه بافر TBE
۵۰	۳-۹ سنتز cDNA
۵۲	۳-۱۰ بررسی cDNA و پرایمرهای مورد مطالعه
۵۳	۳-۱۱ واکنش qRT-PCR
۵۴	۳-۱۲ آنالیز داده‌ها
۵۷	فصل چهارم: نتایج و بحث
۵۸	۴-۱ بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی
۵۸	۴-۱-۱ فعالیت آنزیم کاتالاز
۶۱	۴-۱-۲ شاخص نشت الکترولیت
۶۳	۴-۱-۳ اندازه‌گیری شاخص مالون دی آلدئید (MDA)
۶۷	۴-۱-۴ محتوی کلروفیل و کارتنوئید
۶۹	۴-۲ بررسی بیان ژن‌های SAM
۶۹	۴-۲-۱ سطوح بیان ژن SAM1
۷۰	۴-۲-۲ سطوح بیان ژن SAM2
۷۱	۴-۲-۳ سطوح بیان ژن SAM3
۷۲	۴-۲-۴ سطوح بیان ژن SAM5
۷۵	۴-۳ آنالیز داده‌های بیوانفورماتیک
۷۶	۴-۳-۱ برآورد ساختار سه بعدی پروتئین‌های SAM
۷۷	۴-۴ روابط فیلوژنتیکی ژن‌های SAM
۷۸	۴-۵ شبکه برهمکنش ژن‌های SAM
۸۱	۴-۶ شناسایی نواحی تنظیمی در پروموتور
۸۵	فصل پنجم: نتیجه‌گیری و بحث
۸۶	۵-۱ نتیجه‌گیری کلی
۸۷	۵-۲ پیشنهادات
۸۸	منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲ میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران و جهان ۹
- شکل ۲-۲ مسیر وابسته به CBF ۱۵
- شکل ۳-۲ مسیر بیوسنتز ملاتونین در گیاهان ۲۳
- شکل ۴-۲ مسیر بیوسنتز اتیلن ۲۵
- شکل ۵-۲ مسیر بیوسنتز متیونین ۲۷
- شکل ۶-۲ نقش SAM در مسیرهای بیوسنتز اتیلن، متیونین، سیستئین، پلی آمین‌ها و متیلاسیون ۲۹
- شکل ۱-۴-الف- اثر تیمار با ملاتونین بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۵۸
- شکل ۱-۴-ب- اثر تیمار سرما بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۵۹
- شکل ۲-۴ اثرات متقابل دما و ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۰
- شکل ۳-۴ اثرات کاهش دما بر درصد نشت الکترولیت در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۲
- شکل ۴-۴ اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر درصد نشت الکترولیت در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۲
- شکل ۵-۴ اثرات دما بر محتوی MDA در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۵
- شکل ۶-۴ اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر میزان محتوی MDA در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۵
- شکل ۷-۴ اثرات متقابل دما و ملاتونین بر میزان محتوی MDA در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۶
- شکل ۸-۴ اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر محتوی کلروفیل کل در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ۶۸
- شکل ۹-۴ سطوح بیان ژن SAM1 ۷۰
- شکل ۱۰-۴ سطوح بیان ژن SAM2 ۷۱
- شکل ۱۱-۴ سطوح بیان ژن SAM3 ۷۲
- شکل ۱۲-۴ سطوح بیان ژن SAM5 ۷۳
- شکل ۱۳-۴ ساختار سه بعدی پیش بینی شده و نقاط برهمکنشی برای پروتئین‌های SAM ۷۷
- شکل ۱۴-۴ روابط فیلوژنتیکی ژن‌های SAM ۷۸
- شکل ۱۵-۴ برهمکنش ژن‌های اورتولوگ SAM در گیاه آراییدوپسیس ۸۰
- شکل ۱۶-۴-الف- توزیع عناصر Cis-acting در گیر در پاسخ به هورمون در پروموتور ژنهای SAM ۸۳
- شکل ۱۶-۴-ب- توزیع عناصر Cis-acting در گیر در پاسخ به تنش در پروموتور ژنهای SAM ۸۴

فهرست جداول

جدول ۱-۲ ارقام وحشی گوجه‌فرنگی	۷
جدول ۱-۳ لیست ژن‌ها و پرایمرهای بررسی شده در این تحقیق	۴۷
جدول ۲-۳ ترکیبات و نسبت‌های مورد استفاده برای ساخت رشته اول cDNA	۵۱
جدول ۳-۳ برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای ساخت رشته اول cDNA	۵۲
جدول ۴-۳ ترکیبات مورد نیاز در واکنش PCR	۵۲
جدول ۵-۳ چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)	۵۳
جدول ۶-۳ ترکیبات و نسبت‌های مورد نیاز برای واکنش qRT-PCR	۵۴
جدول ۷-۳ سیکل دمایی برای واکنش qRT-PCR	۵۴
جدول ۱-۴ تجزیه واریانس برای صفات فیزیولوژیکی مورد مطالعه	۵۸
جدول ۲-۴ خصوصیات فیزیوشیمیایی ژن‌های SAM	۷۶
جدول ۳-۴ لیست ژن‌های برهمکنش با اورتولوگ‌های SAM در گیاه آراییدوپسیس	۸۱
جدول ۴-۴ لیست نواحی تنظیمی مشاهده شده در پروموتور ژن‌های SAM	۸۳

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه

گیاهان ارگانیک های ساکن و حساس هستند که در طول چرخه زندگی با تنش های مختلف محیطی مانند خشکسالی، گرما، سرما، آلودگی هوا و فلزات سنگین و غیره روبرو می شوند. بیشتر گیاهان در اثر قرار گرفتن در معرض دماهای بالاتر یا پایین تر از دمای مطلوب برای رشد دچار آسیب های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف می شوند که نتایج این آسیب ها باعث کاهش عملکرد محصول و در نتیجه عملکرد تجاری پایین تر می شود.

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicom*) متعلق به خانواده Solanaceae یکی از رایج ترین سبزیجات است که در سراسر جهان رشد کرده و مصرف می شود (Asero, 2013). عوامل مختلفی بر رشد گوجه فرنگی موثر هستند از جمله این عوامل دما است که به عنوان یک عامل اصلی بر رشد گوجه فرنگی تاثیر دارد. گوجه فرنگی از جمله گیاهانی است که با آب و هوای نیمه گرمسیری و گرمسیری سازگار شده است و نسبت به سرما سازگاری ندارد (Zhang et al., 2004).

تنش کاهش دما یعنی دماهای بین ۰ تا ۲۰ درجه سانتی گراد یک عامل مهم است که بر رشد و توسعه و توزیع جغرافیایی گیاهان اثر می گذارد (Chinnusamy et al., 2007). صدمات متناسب با مدت زمان، دمای تنش و مرحله رشدی گیاه، به صورت عدم جوانه زنی بذر، کاهش رشد رویشی، کاهش میوه بندی و ... بروز می کند (Elizondo & Oyanedel, 2010; Weiss & Egea-Cortines, 2009). اثرات متداول تنش دمای پایین روی گیاهان شامل تولید بیش از حد گونه های اکسیژن واکنش پذیر (ROS)، کاهش جذب کربن فتوسنتزی، کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، آسیب غشاها و تغییرات بیان ژن است (Sun et al., 2018). گیاهان استراتژی هایی را برای انطباق با تنش دمای پایین و بدست آوردن تحمل در شرایط تنش ایجاد کرده اند (Chinnusamy et al., 2007). یکی از این روش ها استفاده از تنظیم کننده های رشد است. تنظیم کننده های رشد گیاه مولکول های چند منظوره ای هستند که به خاطر عملکردهای فیزیولوژیکی و همچنین نقش مهمی که در ایجاد مقاومت در گیاهان

در حال رشد تحت تنش‌های غیرزیستی و زیستی دارند، در گیاهان مشهور هستند (Guo et al., 2017; Tanveer et al., 2018).

ملاتونین یک تنظیم کننده رشد است که هم‌چنین تحمل تنش را در گیاهانی که در شرایط نامساعد مانند سرما رشد می‌کنند اعطا می‌کند. ملاتونین (N_استیل_۵_میتوکسی تریپتامین) یک مولکول پلی‌تروپیک است که به‌عنوان یک هورمون جانوری شناخته شده است و فعالیت‌های سلولی و فیزیولوژیکی زیادی بر عهده دارد و یک مولکول موجود در همه موجودات زنده از باکتری‌ها تا پستانداران یافت شده است (Altaf et al., 2020). اولین کشف ملاتونین در گیاهان توسط دوبلز و همکاران (۱۹۹۵) گزارش شد. بعداً، بروز واضح ملاتونین در تمام اندام‌های گیاهان از جمله میوه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها، ساقه‌ها، دانه‌ها و ریشه‌ها به اثبات رسیده است (Marino Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). ملاتونین به عنوان محرک زیستی جدید شناخته می‌شود، عملکردهای متنوعی در جنبه‌های مختلف رشد و فیزیولوژی گیاه دارد. هم‌چنین تحقیقات اخیر نقش تنظیمی ملاتونین در تنش‌های مختلف گیاهی از جمله تنش شوری، تنش سرما، تنش خشکی، کمبود مواد مغذی، رشد و نمو گیاه، گلدهی گیاه و پیری را نشان داده است (Santosh & Prianka, 2020). علاوه بر عملکردهای ذکر شده، ملاتونین هم‌چنین به عنوان یک پاک کننده قوی رادیکال‌های آزاد و هم‌چنین به عنوان یک مولکول آنتی اکسیدانی نقش مهمی دارد (C. Li et al., 2015). ملاتونین هم‌چنین نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر عفونت‌های بیماری‌زا دارد. بعلاوه توانایی بالایی در افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آنتی اکسیدان مانند کاتالازها، پراکسیدازها و غیره و بیان ژن رمزگذار آن‌ها دارد که در کنار آمدن با تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان نقش دارند (Santosh & Prianka, 2020).

۱-۲ هدف تحقیق

تنش سرما یک عامل اصلی محیطی است که بهره‌وری کشاورزی گیاهان را در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیری محدود می‌کند و باعث تلفات قابل توجه محصول می‌شود. گوجه‌فرنگی به عنوان یکی از محصولات پر

مصرف و هم‌چنین مهم اقتصادی است که در سراسر جهان کشت می‌شود و مانند سایر گیاهان گرمسیری، به تنش سرما حساس است و به راحتی در دماهای زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد آسیب می‌بیند. هم‌چنین ملاتونین یک تنظیم‌کننده گیاهی است که در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاهان از جمله پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده تاثیرگذار است. بر این اساس، در این پژوهش تغییرات ناشی از اثر ملاتونین طی تنش سرمای ۸ درجه سانتی‌گراد بر بیان ژن‌های *SAM* (درگیر در مسیر بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن و پلی‌آمین‌ها)، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانت‌ها، پایداری غشا و برخی صفات فیزیولوژیکی در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق اولین گزارش از اثرات ملاتونین بر فعالیت ژنهای *SAM* می‌باشد که می‌تواند در تحقیقات آینده مرتبط به اصلاح مولکولی گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

فصل دوم: کلیات و مرور منابع

۲ کلیات

۲-۱ خاستگاه گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی به‌عنوان یک گیاه مهم زراعی خاستگاه آن در جنوب‌غربی قاره آمریکا می‌باشد و اکثر گونه‌های وحشی این گیاه در کشور پرو شناسایی شده‌اند و از یک منطقه ساحلی در اکوادور تا شمال شیلی امتداد پیدا کرده است. آن‌ها در زیست‌گاه‌های متنوعی از جمله ساحل اقیانوس آرام در سطح دریا، دره‌های سبز و مناطق کوهستانی در ارتفاع ۳۳۰۰ متری گسترش یافته‌اند. گفته شده است گوجه‌فرنگی در مکزیک و آمریکای جنوبی اهلی شده است. سپس گوجه‌فرنگی در قرن ۱۶ از پرو وارد اروپا شد (Blanca et al., 2012). این گیاه با توجه به اهمیتی که دارد هم اکنون در اکثر نقاط دنیا به جز نقاطی که دارای زمستان‌های سرد هستند و محدود به کشت گلخانه‌ای شده‌اند پرورش داده می‌شود.

۲-۲ گیاه‌شناسی گیاه گوجه‌فرنگی

طبقه‌بندی گوجه‌فرنگی به صورت زیر است:

قلمرو: گیاهان

دسته: گیاهان گلدار

رده: دولپه‌ای‌ها

راسته: بادنجان‌سانان

تیره: سیب‌زمینیان

سرده: بادنجان

گونه: *S. lycopersicum*

نام علمی: *Solanum lycopersicum*

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* متعلق به خانواده بادمجانیان (Solanaceae) است که دارای ۳۰۰۰ گونه با منشا قدیمی (بادمجان) و منشا جدید (فلفل و سیب زمینی) می‌باشد. *Solanum lycopersicum* تنها گونه اهلی این جنس است و ۱۲ گونه وحشی دیگر در این جنس وجود دارد (Peralta et al., 2006). در جدول زیر نام گونه‌های وحشی شناخته شده این جنس آورده شده است (جدول ۱) (Blanca et al., 2012).

جدول ۱-۲- ارقام وحشی گوجه‌فرنگی شناخته شده

Solanum arcanum

Solanum corneliomulleri

Solanum habrochaites

Solanum chilense

Solanum peruvianum

Solanum peruvianum

Solanum neorickii

Solanum huaylasense

Solanum pennellii

Solanum cheesmaniae

Solanum galapagense

Solanum pimpinellifolium

Solanum chmielewskii

گوجه‌فرنگی یک گیاه دولپه‌ای دیپلوئید ($2n=24$)، چند ساله و با عمر محدود است. گیاهی علفی است که ساقه‌ها و برگ‌های آن دارای کرک‌های متراکم است. گل‌آذین آن با ۲ تا ۱۲ گل زرد رنگ به عرض ۱ تا ۲

سانتی‌متر و دارای ۵ لبه بر روی جام گل است. گوجه فرنگی گیاهی روز خنثی است (Quinet et al., 2006). گوجه‌فرنگی، گیاهی با خودباروری بالا و هموزیگوتی (خودسازگاری) است البته خودناسازگاری در گونه‌های وحشی آن دیده می‌شود (Breto et al., 1993; Miller & Tanksley, 1990; Villand et al., 1998). در مقایسه با مخزن غنی در گونه‌های وحشی، گوجه‌فرنگی کشت شده از نظر ژنتیکی ضعیف است. تخمین زده می‌شود که ژنوم ارقام گوجه‌فرنگی اهلی کمتر از ۵٪ از تغییرات ژنتیکی اقوام وحشی را دارا می‌باشند (Miller & Tanksley, 1990). اندازه میوه گوجه‌فرنگی اهلی بزرگ است، در حالی که گونه‌های گوجه‌فرنگی وحشی دارای میوه‌های ریزی هستند که برای تکثیر گونه ساخته شده‌اند و برای تغذیه انسان مناسب نیستند (Tanksley, 2004). گوجه‌فرنگی‌های وحشی میوه‌هایی دارند که تقریباً همیشه گرد هستند، در حالیکه ارقام موجود امروزه انواع مختلفی از اشکال را نشان می‌دهند (Tanksley, 2004). هرچند تفاوت‌هایی بین ارقام وحشی و اهلی شده گوجه‌فرنگی وجود دارد اما گونه‌های وحشی منابعی غنی از ژن‌هایی هستند که می‌شود از آن‌ها در کارهای اصلاحی استفاده کرد. گوجه‌فرنگی گیاهی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری می‌باشد که حساس به تنش‌های محیطی است و گونه‌های اهلی نسبت به گونه‌های وحشی هنگامی که در شرایط معتدل یا سردسیر قرار می‌گیرند نسبت به این تنش‌ها واکنش بیشتری از خود نشان می‌دهند.

۲-۳ ارزش غذایی

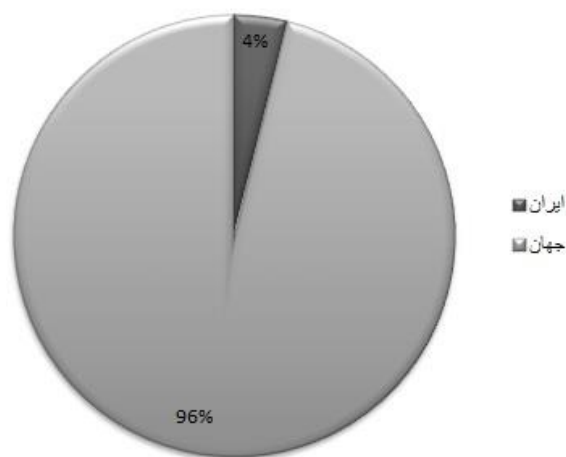
گوجه‌فرنگی همراه با فراورده‌های مشتق شده از آن، یکی از منابع اصلی کارتنوئید است که تقریباً ۸۰٪ از مصرف روزانه لیکوپن و فولات، اسیدآسکوربیک (ویتامین C)، فلاونوئیدها و پتاسیم را در رژیم غذایی تامین می‌کند (Ilahy et al., 2018). اما ارزش غذایی آن ممکن است بسته به عوامل مختلفی از جمله رقم، شرایط رشد، زمان برداشت و شرایط ذخیره سازی آن متفاوت باشد. عطر و طعم گوجه فرنگی را تعادل بین اسیدیته و محتوای قندها مشخص می‌کند، اما رنگ میوه‌ها به محتوای رنگدانه‌ها بستگی دارد، که هم‌چنین می‌تواند بر طعم گوجه‌فرنگی نیز

تأثیر بگذارد (Tiemann et al., 2017). هم‌چنین مصرف گوجه‌فرنگی تأثیر مفیدی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن مانند سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی دارد (Carluccio et al., 2016).

۴-۲ آمار تولید گوجه‌فرنگی در جهان و ایران

گوجه‌فرنگی یکی از محبوب‌ترین و هم‌چنین دومین محصول مهم سبزیجات بعد از سیب‌زمینی در سراسر جهان است که ارزش سالانه آن ۹۰ میلیارد دلار است (FAOSTAT 2019). سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در ۵۰ سال گذشته تقریباً سه برابر افزایش یافته و به حدود ۵ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۵ رسیده است (Eurostat 2019). تولید گوجه‌فرنگی جهان در سال ۲۰۱۷، به میزان ۱۸۲ میلیون تن بود (FAOSTAT, 2019). چین و هند به ترتیب رتبه اول و دوم تولید گوجه‌فرنگی در جهان را به خود اختصاص داده‌اند (FAOSTAT, 2019; HSD, 2018). هم‌چنین ایران از بین ۳۷ تولیدکننده بزرگ جهان با ۶/۵ میلیون تن تولید، رتبه ششم را در سال ۲۰۱۳ به خود اختصاص داد (شکل ۲-۱) (FAOSTAT, 2014).

میزان تولید گوجه‌فرنگی



شکل ۲-۱- نسبت تولید گوجه‌فرنگی در ایران و جهان

۲-۵ تنش

تنش را می‌توان به عنوان تغییر ناگهانی در محیط بیش از حد مطلوب گیاه و عدم ایجاد تعادل هموستاتیک، تعریف کرد (Bostock et al., 2014). هم‌چنین تنش گیاه را می‌توان این‌چنین تعریف کرد: "هرگونه شرایط نامساعد یا ماده‌ای که بر متابولیسم، رشد و نمو گیاه تأثیر بگذارد یا آن را مسدود کند". تنش‌های گیاهی را می‌توان به عنوان تنش‌های "داخلی" که در درون گیاه و "خارجی" که در خارج از گیاه اتفاق می‌افتد طبقه‌بندی کرد. استرس‌های خارجی و درونی معمولاً به ترتیب "عوامل تنش" و "عوامل تنش‌زا" نامیده می‌شوند (Kranmer et al., 2010).

در طبیعت، گیاهان از زمان جوانه‌زنی بذر به‌طور مداوم تحت تنش‌های مختلفی قرار می‌گیرند. با توجه به پیچیدگی و تنوع شرایط مزرعه و از آنجا که عوامل مختلف تنش‌زا گاهی اوقات به‌صورت هم‌زمان بروز می‌کنند، رشد و تولیدمثل گیاه می‌تواند به‌شدت خدشه‌دار شود، که باعث تحریک مجموعه‌ای از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی یا بیوشیمیایی می‌شود. در بسیاری از موارد، این امر از دستیابی کامل پتانسیل ژنتیکی گیاهان به لحاظ بهره‌وری جلوگیری می‌کند (Rockström & Falkenmark, 2000). تنش‌ها بر حسب منشأ به دو دسته تنش‌های زیستی و غیرزیستی تقسیم بندی می‌شوند. هر دو شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی تأثیر منفی بر رشد گیاه دارند و اغلب اوقات تولید زراعی را تهدید می‌کنند.

۲-۵-۱ تنش زیستی

گیاهان با تنش‌های بیولوژیکی متعدد و شرایط نامساعد محیطی روبرو هستند. آن‌ها از طریق چندین مکانیسم مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ می‌دهند. تنش‌های زیستی در گیاهان توسط آفات، انگل و عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود که از زمان‌های بسیار قدیم شناخته شده‌اند (Schumann & D'Arcy, 2006). قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و ویروس‌ها عوامل بیماری‌زایی هستند که مسئول اصلی بیماری‌های گیاهی

هستند. انگل همراه با باکتری‌ها، باعث پژمردگی عروقی، لکه‌های برگ و شانکر و علائم دیگر می‌شوند و می‌توانند قسمت‌های مختلف گیاه را آلوده کنند. نماتدها محتویات سلول‌های گیاه را خارج می‌کنند و می‌توانند از تمام قسمت‌های گیاه تغذیه کنند، اما نماتدهای انگلی گیاهان، در درجه اول بیماری‌هایی را از طریق خاک ایجاد می‌کنند و به سیستم ریشه گیاهان حمله می‌کنند. آن‌ها علائم مربوط به کمبود مواد مغذی مانند پژمردگی یا کوتاه آمدن را ایجاد می‌کنند. ویروس‌ها نه تنها ضایعات موضعی بلکه آسیب سیستمیک نیز ایجاد می‌کنند که باعث توقف رشد، کلروز و بدشکلی در قسمت‌های مختلف گیاه می‌شود، اگرچه به‌ندرت میزبان خود را از بین می‌برند. از طرف دیگر، حشرات و کنه‌ها آفت شناخته شده‌ای هستند. آن‌ها از طریق تغذیه یا تخم‌گذاری به گیاهان آسیب می‌رسانند. حشرات هم‌چنین می‌توانند مانند ناقلین ویروس عمل کنند و آن‌ها را به طرق مختلف به گیاهان منتقل کنند (Schumann & D'Arcy, 2006). به‌منظور مقابله با تنش‌های زیستی، گیاهان سیستم ایمنی پیشرفته‌ای ایجاد کرده‌اند. گیاهان موانع فیزیکی مانند موم، کوتیکول ضخیم و تریکوم‌های اختصاصی دارند که از نشست حشرات یا عوامل بیماری‌زا در گیاه جلوگیری می‌کنند. گیاهان هم‌چنین برای محافظت از خود در برابر پاتوژن، ترکیبات شیمیایی تولید می‌کنند (Taiz & Zeiger, 2006).

۲-۵-۲ تنش غیر زیستی

گیاهان موجودات پیچیده‌ای هستند و پاسخ‌های مولکولی سلول‌ها به محیط آن‌ها بسیار پیچیده است. عوامل محیطی نقش مهمی در رشد، تمایز و توسعه سلول‌ها دارد و درنهایت تا ۷۰٪ می‌تواند تولید محصول را محدود کند. تنش غیرزیستی به‌عنوان شرایط محیطی مطرح می‌شود که رشد و عملکرد را به زیر سطح مطلوب کاهش می‌دهد. تنش‌هایی از قبیل سرما، یخ‌زدگی، خشکی، شوری، فلزات سنگین، تابش پرتوهای فرابنفش، شرایط غرقابی، دمای بالا و و آسیب‌های ناشی از کمبود و یا بیش بود برخی از عناصر خاک عملکردهای گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پاسخ گیاهان به تنش‌های غیر زیستی، پویا و پیچیده است که هم به‌صورت برگشت‌پذیر و هم به‌صورت برگشت ناپذیر رخ می‌دهند (Cramer et al., 2011). مقدار و مدت زمان تنش می‌تواند تاثیر قابل‌توجهی

بر روی پاسخ گیاهان داشته باشد (Pinheiro & Chaves, 2011; Tattersall et al., 2007). تنش تغییرات تدریجی و پیچیده‌ای در متابولیسم ایجاد می‌کند. یکی از اولین پاسخ‌های متابولیکی به تنش‌های غیر زیستی مهار سنتز پروتئین است (Liu & Howell, 2010). همچنین یکی دیگر از پاسخ‌های مولکولی گیاه تولید ^۱ROSها و ^۲RNSها است که فعالیت آنزیم و تنظیم ژن را اصلاح می‌کند (Goda et al., 2008; Mittler et al., 2011). علاوه بر این هورمون‌ها نیز تنظیم‌کننده‌های مهمی در پاسخ گیاهان به تنش غیر زیستی هستند (Chinnusamy et al., 2008; Hubbard et al., 2010). بسیاری از تنش‌های زیستی به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم بر سنتز، غلظت، متابولیسم و انتقال و ذخیره قندها تاثیر می‌گذارند. با توجه به مطالب ذکر شده یکی از عوامل محدود کننده رشد گوجه‌فرنگی تنش‌های دمای پایین می‌باشد که باعث می‌شود سطح زیر کشت گیاه کاهش پیدا کند و همچنین در گل‌خانه‌ها نیز مصرف انرژی زیادی داشته باشیم.

۲-۵-۲-۱ تنش سرما

تنش سرما یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی است که بر رشد و نمو گیاه، عملکرد و کیفیت محصول و توزیع جغرافیایی تأثیر منفی می‌گذارد. همچنین به‌عنوان یک عامل اصلی تعیین‌کننده فصل رشد و همچنین توزیع جغرافیایی گیاهان نیز می‌باشد (Chinnusamy et al., 2007). تنش سرما به‌عنوان یک تنش غیرزیستی به دو صورت تنش سرد (۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد) و تنش انجماد (کمتر از صفر درجه) و تنش دمای پایین (بین ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد) بروز می‌کند. به عنوان مثال، سرما می‌تواند مانع جذب آب در گیاهان شود، در حالی که یخ‌زدگی می‌تواند باعث کم شدن آب سلول به دلیل تشکیل یخ خارج سلول شود. گیاهان نواحی معتدل که مکانیسم سازگاری با سرما خود را تکامل داده‌اند نسبت به گیاهانی که در مناطق گرمسیری رشد پیدا کرده‌اند

¹Reactive Oxygen Species

²Reactive Nitrogen Species

آسیب کمتری وارد می‌بینند (Song et al., 2015)، که این فرآیند با تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی همراه است.

۲-۵-۲-۲ سنجش و هدایت سیگنال تنش سرما

گیاهان به دلیل ماهیت بی‌حرکتی که دارند برای بقا در شرایط نامساعد محیطی نیازمند سازگاری سریع و کارآمدی هستند. گیاهان با قرار گرفتن در معرض تنش سرما، سیالیت غشاهای سلولی خود را کاهش و استحکام آن‌ها را افزایش می‌دهند. همچنین باعث تغییر در ترکیب پروتئین و اسید نوکلئیک، غلظت متابولیت و وضعیت اکسایش سلولی می‌شوند (Örvar et al., 2000). تنش‌های محیطی از جمله سرما اولین بار توسط گیرنده‌های موجود در غشا سلول‌های گیاهی درک می‌شوند، سپس این سیگنال‌ها منتقل و باعث فعال شدن بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ مانند کلسیم، ROS، پروتئین کیناز، پروتئین فسفاتاز و آبشارهای سیگنالینگ لیپید می‌شوند. سرما باعث افزایش سطح کلسیم سیتوزولی از طریق کانال‌های کلسیم فعال شده با لیگاند توسط غشا می‌شود که این افزایش منجر به تقویت سیگنال از طریق فسفولیپیدها می‌شود (Chinnusamy et al., 2006; Vergnolle et al., 2005). علاوه بر این، به‌طور غیر مستقیم چندین مولفه سلولی دیگر وجود دارند که به عنوان اجزای اصلاح کننده پروتئین، نقشی در اصلاح فرآیندهایی مانند متیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، مریستولاسیون و فراگیر شدن پروتئین‌های سیگنالینگ دارند (Mahajan & Tuteja, 2005; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). مولکول‌های لیپید نیز در هدایت سیگنال در هنگام تنش سرما بسیار مهم هستند و اسید فسفاتیدیک به عنوان یک مولکول پیام‌رسان ثانویه عمل می‌کند که در طی تنش سرما به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند (Meijer & Munnik, 2003). ROSها (گونه‌های مخرب اکسیژن) نیز در هنگام قرار گرفتن در معرض تنش‌های مختلف غیرزیستی در سلول‌های گیاهان تجمع می‌یابند و به نظر می‌رسد که آن‌ها تأثیر زیادی در تنظیم بیان ژن تحت تنش سرما دارند. سیگنال ROS علاوه بر تأثیر بر روی اثرات کلسیم، می‌تواند اثرات خود را مستقیماً از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های واکنش‌دهنده منفی مانند عوامل رونویسی و پروتئین کینازها اعمال

کند. در نهایت، سازگاری با سرما شامل تنظیم دقیق بیان عوامل رونویسی است که در مجموع به عنوان ژن‌های سازگار با سرما شناخته می‌شوند (Thomashow, 1999; Viswanathan & Zhu, 2002).

۲-۵-۳ پاسخ‌های گیاه به تنش سرما

دمای پایین یکی از محدودیت‌های مهم محیطی است که بقاء، بهره‌وری و توزیع اکولوژیکی گیاهان را محدود می‌کند. گیاهان سازوکارهای سازگاری متنوعی را برای القای تحمل یخ زدگی در پاسخ به دمای پایین اما بدون یخ زدگی، که به عنوان سازگاری با سرما شناخته می‌شود، تکامل بخشیده‌اند. دمای پایین بر مجموعه گسترده‌ای از ژن‌ها تأثیر می‌گذارد و روند رونویسی را تغییر می‌دهد (Chinnusamy et al., 2007). تغییرات ناشی از درجه حرارت پایین در بیان ژن، مجموعه‌ای از تنظیمات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را ایجاد می‌کند. گیاهانی که تحت تنش سرما قرار می‌گیرند دارای اختلالاتی از قبیل آسیب به غشا، تولید بیش از اندازه ROSها، تغییر ماهیت پروتئین، تجمع محصولات سمی و ... در عملکردهای سلولی خود می‌شوند. گیاهان طی سازگاری با سرما با استفاده از مکانیسم‌های متعدد شامل تغییر در بیان ژن‌های درگیر در بیان تنش سرما، اصلاح ترکیب غشا، تولید مقادیر قابل توجهی املاح سازگار مانند پرولین و اسمولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هم‌چون کاتالاز و آسکوربات از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از سرما محافظت می‌کند (Kim et al., 2015).

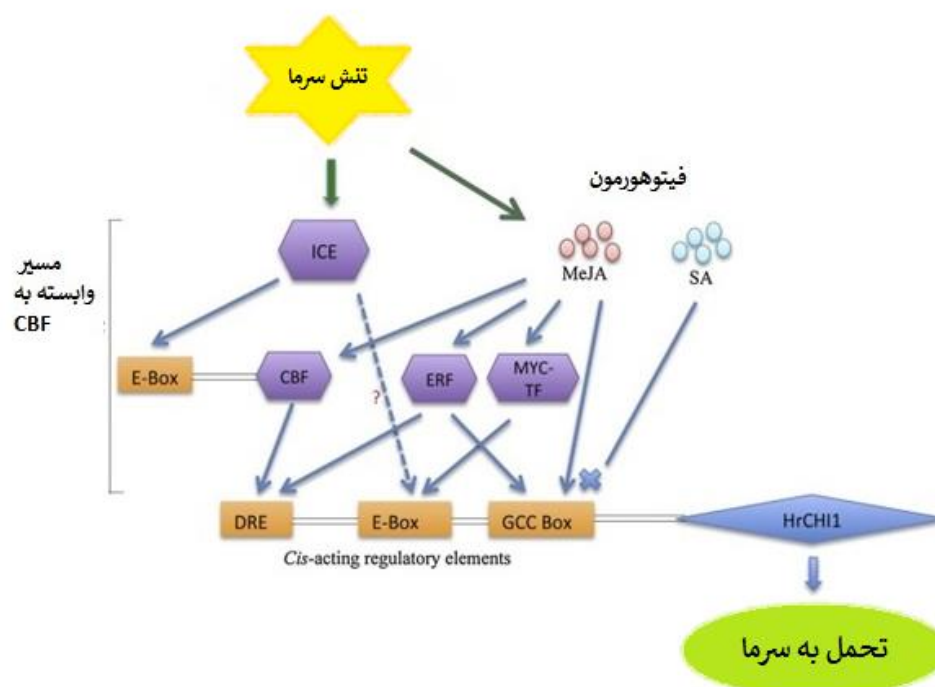
۲-۵-۴ عوامل رونویسی دخیل در تنش سرما

بسیاری از گونه‌های گیاهی مجموعه‌ای از مکانسیم‌ها را ایجاد کرده‌اند که به آن‌ها این امکان را می‌دهد تا اثرات منفی تنش سرما را به حداقل برسانند که یکی از آن مکانیزم‌ها تغییرات در بیان ژن‌های سازگار با سرما است. یکی از مسیرهای تنظیمی برای ایجاد تحمل به سرما، مسیر پروتئین‌های $CBF^1/DREB1^1$ (فاکتورهای

¹ Dehydration-Responsive Element-Binding protein1

² C-repeat Binding Factors

اتصال به نواحی غنی از C) است. پروتئین‌های CBFs به عنوان پروتئین متصل‌شونده به عنصر واکنش‌دهنده به کمبود آب (DREB1) شناخته شده‌اند. پروتئین‌های CBFs از طریق مجموعه‌ای از عوامل رونویسی متعلق به خانواده^۱ AP2 به توالی CRT/DRE^۲ متصل می‌شوند و بیان ژن COR که سازگار با سرما است را فعال می‌کنند (شکل ۲-۲) (Wang et al., 2017). ICE1^۳ یکی از عوامل رونویسی است که در پروموتورهای ژن‌های COR وجود دارد که در هنگام سرما در پروتئین‌های CBFs فعال و مسیر سیگنالینگ سرما را کنترل می‌کند (Chinnusamy et al., 2003; Gilmour et al., 1998).



شکل ۲-۲ مسیر وابسته به CBF در پاسخ گیاهان به تنش سرما

¹ APETALA2

² C-RepeaT/Dehydration Responsive Element

³ Inducer of CBF Expression1

۲-۶ هورمون‌های گیاهی

تنش‌های غیر زیستی، تنش‌های غیر زنده اکوسیستم هستند که بخش زنده این سیستم را تحت تاثیر قرار می‌دهند. گیاهانی که تحت تنش قرار می‌گیرند برای حفظ تعادل خود راهکارهایی دارند که یکی از آنها تولید مواد شیمیایی به نام هورمون است. هم‌چنین فرآیندهای مختلف رشد گیاه توسط "موادی" تنظیم می‌شوند که از یک قسمت گیاه به قسمت دیگر حرکت می‌کنند. مواد مورد بحث مولکول‌های کوچکی هستند که از مسیرهای مختلف متابولیکی ضروری حاصل می‌شوند. به طور کلی این ترکیبات در غلظت‌های بسیار کمی وجود دارند و به صورت محلی، در محل یا در نزدیکی محل سنتز یا در بافت‌های دور عمل می‌کنند (J. Park et al., 2017).

هورمون‌های گیاهی که از آنها با نام فیتوهورمون نیز یاد می‌شود گروهی از مواد آلی طبیعی هستند که با غلظت‌های پایین تمام جنبه‌های رشد و نمو گیاه را تنظیم می‌کند. سنتز هورمون‌های گیاهی موضعی است اما ممکن است در طیف وسیعی از بافت‌ها یا سلول‌های داخل بافت‌ها عمل کند (Davies, 2010). از جمله هورمون‌های مهم گیاهی می‌توان به اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سایتوکینین‌ها، اسید آبسزیک، اتیلن، اپی براسینواستروئیدها، سالیسیلات‌ها و جاسمونات‌ها اشاره کرد (Verma et al., 2016).

یکی از ترکیبات شبه هورمونی که جدیداً شناسایی شده و در جانوران و انسان به معنای هورمون شناخته شده است ولی در گیاهان به عنوان شبه هورمون معرفی شده است ملاتونین نام دارد. تحقیقات نشان داده است که ملاتونین در تنش‌های مختلف گیاهی از جمله سرما، خشکی، کمبود مواد مغذی و غیره اثرات مفیدی از خود بر جای گذاشته است. ملاتونین هم‌چنین توانایی بالایی در افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدان‌های آنزیمی و بیان ژن رمزگذار آنها دارد که در کنار آمدن با تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان نقش دارند (Zhang et al., 2016). بر این اساس، استفاده از ملاتونین به عنوان یک محرک زیستی غیر سمی طبیعی برای تولید محصولات پایدار با

کیفیت بالاتر و بدون تأثیر سو بر محیط خارجی می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد (Santosh & Prianka, 2020).

۷-۲ ملاتونین^۱

۱-۷-۲ تاریخچه کشف ملاتونین

ملاتونین از غده پینه‌آل گاو در سال ۱۹۵۸ کشف شد و به دلیل تأثیرات آن بر روی جمع شدن ملانین ('mela') در ملانوسیت‌های دوزیستان و همچنین مشتق شدن آن از سروتونین^۲ ('-tonin') ملاتونین نام‌گذاری شد (Reiter et al., 2010) در سال‌های بعد ملاتونین در طیف وسیعی از جانداران شناسایی شد (Lerner et al., 1958; Tan et al., 2016) حضور گسترده ملاتونین به ویژه در باکتری‌ها بدوی (سیانوباکتریوم و α -پروتئوباکتریوم) نشان می‌دهد که ملاتونین یک مولکول قدیمی است که در طول تکامل همه موجودات حفظ شده است. حدس زده می‌شود پس از آن که سیانوباکتریوم و α -پروتئوباکتریوم توسط پروکاریوت‌های اولیه بلعیده شدند، سرانجام به ترتیب به کلروپلاست و میتوکندری تبدیل شدند، به گونه ای که تمام ارگانیسم‌های تک سلولی و چند سلولی در نهایت این اندولامین حیاتی را در این اندامک‌ها تولید می‌کنند و با تنوع ارگانیسم‌ها، ملاتونین به همه موجودات سرایت می‌کند (Zhao et al., 2019).

۲-۷-۲ بیولوژی و عملکرد ملاتونین

ملاتونین یک هورمون حیوانی مهم با وزن مولکولی کم و یک ترکیب طبیعی ایندولامین است. همچنین نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای اساسی و حیاتی، از جمله تنظیم ریتم شبانه‌روزی، تولیدمثل فصلی، فعالیت

¹ melatonin

² serotonin

آنتی اکسیدانی، تقویت ایمنی و خواب دارد (Jiang et al., 2016; Reiter et al., 2018). همچنین وجود ملاتونین در گیاهان در سال ۱۹۹۵ به اثبات رسیده است (Zhao et al., 2019). اما هنوز به عنوان یک هورمون گیاهی مورد قبول قرار نگرفته و تحت عنوان یک القاگر یا تحریک کننده شناخته شده است (Shi et al., 2015).

چندین عامل محیطی از جمله نور، دما، فرایندهای مختلف رشد از جمله بلوغ میوه، رشد برگ، پیری، خشکسالی، سرما، گرما و تنش های محیطی مانند اشعه ماوراء بنفش-B می تواند بیوسنتز ملاتونین را در اندام های گیاهان تحریک کند (Santosh & Prianka, 2020). مشاهده شده است که ملاتونین به طور گسترده ای در انواع گیاهان از جمله گیاهان دارویی، سبزیجات، گیاهان میوه ای و غیره وجود دارد (Marino Bañón Arnao & Hernández- Ruiz, 2013). و در اندام های گیاهی متعددی مانند ریشه، ساقه، برگ، گل ها، میوه ها و دانه ها وجود دارد (ÇALIŞKAN et al., 2017). محتوی درون زرا ملاتونین در گونه های مختلف گیاه متفاوت است. این تغییرات قابل توجه محتوی ملاتونین درون زرا در میان گونه های مختلف گیاهی نشان می دهد که عملکرد ملاتونین از گیاهی به گیاه دیگر متفاوت است (Vitalini et al., 2011).

ملاتونین همچنین یک تنظیم کننده رشد است که به دلیل نقش های مهمی که در تنظیم رشد و نمو گیاه دارد، شناخته شده است (Kanwar et al., 2018). این عملکردهای متنوع از جوانه زنی بذر آغاز می شود و مشاهده شد که ملاتونین اثرات مشابهی مانند اکسین ها را در طی ریشه زایی نشان می دهد. علاوه بر این تأخیر در پیر شدن گیاهان، ذخیره سازی پس از برداشت از دیگر عملکردهای ملاتونین می باشد. غلظت ملاتونین همچنین به عنوان یک مرحله محدود کننده سرعت در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی عمل می کند. در غلظت های پایین، رشد را افزایش می دهد، در حالی که در غلظت های بالاتر، اثرات مهاری دارد (Chen et al., 2009). ملاتونین همچنین فرآیندهای مهم گیاه مانند مورفوژن، ریزوژن را تنظیم می کند (Murch et al., 2001).

نقش ملاتونین در گیاهان به عنوان یک عامل محافظ در برابر استرس های متعدد (بیوتیک و غیر زنده) اکنون کاملاً پذیرفته شده است (Wang et al., 2018). اخیراً موضعی در غشای پلاسما با ساختاری گیرنده مانند، که با پروتئین

G زیر واحد (GPA1) ارتباط برقرار می کند، در حالی که بیان آن در بافت های مختلف توسط ملاتونین ایجاد می شود منجر به شناسایی CAND2 / PMTR1 که گیرنده فیتوملاتونین در *Arabidopsis thaliana* می باشد، شده و ملاتونین را به عنوان یک هورمون گیاهی برجسته کرده است و نشان می دهد ملاتونین نقش خود را به موازات سایر هورمون های گیاهی انجام می دهد (Wei et al., 2018).

۲-۷-۲-۱ پاسخ ملاتونین در شرایط تنش غیر زیستی

- ملاتونین به عنوان یک محرک زیستی در شرایط تنش غیرزیستی بیان عناصر اصلی که در برابر عوامل تنش زا مانند گرما، سرما، خشکسالی، شوری، قلیایی، فلزات سنگین (Al و V، Pb، Cu، Cd، Zn) و همچنین عوامل شیمیایی (علف کش ها، مواد سمی)، تابش زیاد خورشید و اشعه ماورا بنفش تنظیم می کند (Sarafo et al., 2017; J. Zhang et al., 2017).

- برای خنثی کردن اثرات تنش اکسیداتیو و محافظت گیاهان در برابر اثرات مخرب گونه های اکسیژن واکنش پذیر و گونه های نیتروژن واکنش پذیر (ROS / RNS) ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان عالی عمل می کند. ملاتونین میزان ROS / RNS و ژن های مربوط به آنتی اکسیدان های آنزیمی، از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT)، و آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی مانند گلوتاتیون S-ترانسفراز (GSTP)، مونو هیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، و همچنین عناصر محافظ اسمولیت را از طریق تنظیم ژن های بیوسنتز پرولین تنظیم می کند و به این ترتیب آسیب اکسیداتیو را کاهش می دهد (Antoniou et al., 2017; Kaya & Doganlar, 2019; Sharma et al., 2020).

- علاوه بر این می توان به عنوان یک عامل ضد پیری از ملاتونین نام برد که از دستگاه فتوسنتز در برابر اثرات مخرب تنش محافظت می کند (B. Liang et al., 2018). ملاتونین ژن های اصلی پیری برگ مانند *SAG12* را مهار

و از تخریب مولکول کلروفیل توسط آنزیم‌هایی مانند، کلروفیلاز (کلاز)، فنوفیتیناز (PPH) و پراکسیداز تجزیه کننده کلروفیل (Chl-PRX) به دلیل بیان کم ژن‌هایی از جمله Chlase، PPH و Chl-PRX جلوگیری می‌کند و فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای را بهبود می‌بخشد (Sharma & Zheng, 2019). هم‌چنین ملاتونین آنزیم pheophorbide-a-اکسیژناز (PAO) که در متابولیسم کلروفیل نقش دارد را تنظیم می‌کند (Wang et al., 2013).

- هم‌چنین بسیاری از عناصر فتوسیستم‌ها، انتقال دهنده‌های الکترون و ژن‌های *ATPase* توسط ملاتونین تنظیم می‌شود و باعث افزایش نرخ فتوسنتز خالص، میزان تعرق، هدایت روزنه‌ای، عملکرد کوانتومی فتوسیستم II و سرعت انتقال الکترون فتوسنتزی نیز می‌گردد. ملاتونین هم‌چنین از طریق تنظیم پروتئین‌های کانال آنیون محافظ سلول و دهیدروین‌ها، عملکرد روزنه در شرایط نامطلوب بهینه می‌کند. در چرخه کالوین، ملاتونین بیان عناصر روبیسکو، دهیدروژنازهای گلیسرآلدئید-۳-فسفات و آنزیم‌های قند تبدیلی را تنظیم می‌کند. علاوه بر این، عناصر چرخه ASC-GSH، چرخه TCA و مسیرهای بیوسنتز میو اینوزیتول و اسیدهای چرب نیز توسط ملاتونین تنظیم می‌شوند (Marino B Arnao & Hernández-Ruiz, 2019a).

- جنبه‌های زیادی از متابولیسم وجود دارد که به نظر می‌رسد ملاتونین در آن‌ها شرکت می‌کند. گیاهان تحت تیمار با ملاتونین غلظت بالاتری از متابولیت‌ها از جمله پرولین و کربوهیدرات (گلوکز، مالتوز، فروکتوز، ساکارز و ترهالوز) را نشان می‌دهند. بنابراین، در شرایط تنش غیر زنده اثرات مفیدی را ایجاد می‌کند (Marino B Arnao & Hernández-Ruiz, 2019a).

- نقش ملاتونین در متابولیسم ثانویه مشخص شده است، و هم‌چنین بیوسنتز آنتوسیانین و فلاونوئیدها را نیز تنظیم می‌کند (D. Liang et al., 2018; Zhang et al., 2016) و هم‌چنین مراحل بیوسنتز کاروتنوئید را تنظیم می‌کند (Sarafi et al., 2017).

- هم‌چنین ملاتونین بیان ژن‌های بیوسنتز خود را تنظیم می‌کند. بنابراین، بیان ژن‌های *ASMT*، *SNAT*، *TDC* و *COMT* در شرایط تنش رخ می‌دهد و باعث افزایش در سطح ملاتونین درون‌زا می‌شود. در شرایط مختلف تنش،

افزایش اولیه H_2O_2 با افزایش ملاتونین دنبال می‌شود، که به نظر می‌رسد مسئول بیان گیرنده القا کننده خود و پاسخ‌های واسطه‌ای آن باشد (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018; J. Wei et al., 2018). ROS و RNS می‌توانند بیان آنزیم‌های بیوسنتز ملاتونین گیاهی را القا کنند و ملاتونین می‌تواند به طور مستقیم و غیرمستقیم با ROS و RNS تعامل داشته باشد و یک شبکه پیچیده از واکنش‌های شیمیایی ایجاد کند.

- ملاتونین بیان چندین عنصر (آنزیم‌ها، گیرنده‌ها و فاکتورهای رونویسی) را در بیوسنتز و کاتابولیسم اکسین، جیبرلین‌ها، سیتوکینین‌ها، ABA، اتیلن، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و براسینواستروئیدها تنظیم می‌کند و همچنین در متابولیسم‌های مرتبط به بیوسنتز پلی‌آمین‌ها نیز درگیر می‌باشد (Gong et al., 2017). هرچند که در ارتباط با مشارکت احتمالی ملاتونین در گلدهی و تولید مثل (پارتنوکاری) هنوز اطلاعات کمی در دسترس است (Liu et al., 2018).

- و در آخر ملاتونین به عنوان یک تنظیم کننده در برابر حملات پاتوژن‌های گیاهی، ویروسی، قارچی و باکتریایی نیز عمل می‌کند و یک نقش اصلی را در پاسخ پاتوژن دارد که در مسیر پاسخ به تنش‌های زیستی معمولاً با فیتوهورمون‌هایی هم‌چون اتیلن، ABA، اسید سالیسیلیک (SA) و اسید جاسمونیک درگیر است (Marino B & Arnao & Hernández-Ruiz, 2019a).

۲-۷-۳ مسیر بیوسنتز ملاتونین

اسیدآمین ترپتوفان به‌عنوان پیش‌ماده اصلی مسیر بیوسنتز ملاتونین در تمام موجودات شناخته شده است. در گیاهان مسیر بیوسنتز ملاتونین شامل پنج مرحله است که در مرحله اول اسید آمینه ترپتوفان توسط ترپتوفان دکربوکسیلاز (TDC^1) دکربوکسیله می‌شود و به تریپتامین^۲ تبدیل می‌شود. سپس این آمین توسط

¹ tryptophan decarboxylase

² tryptamine

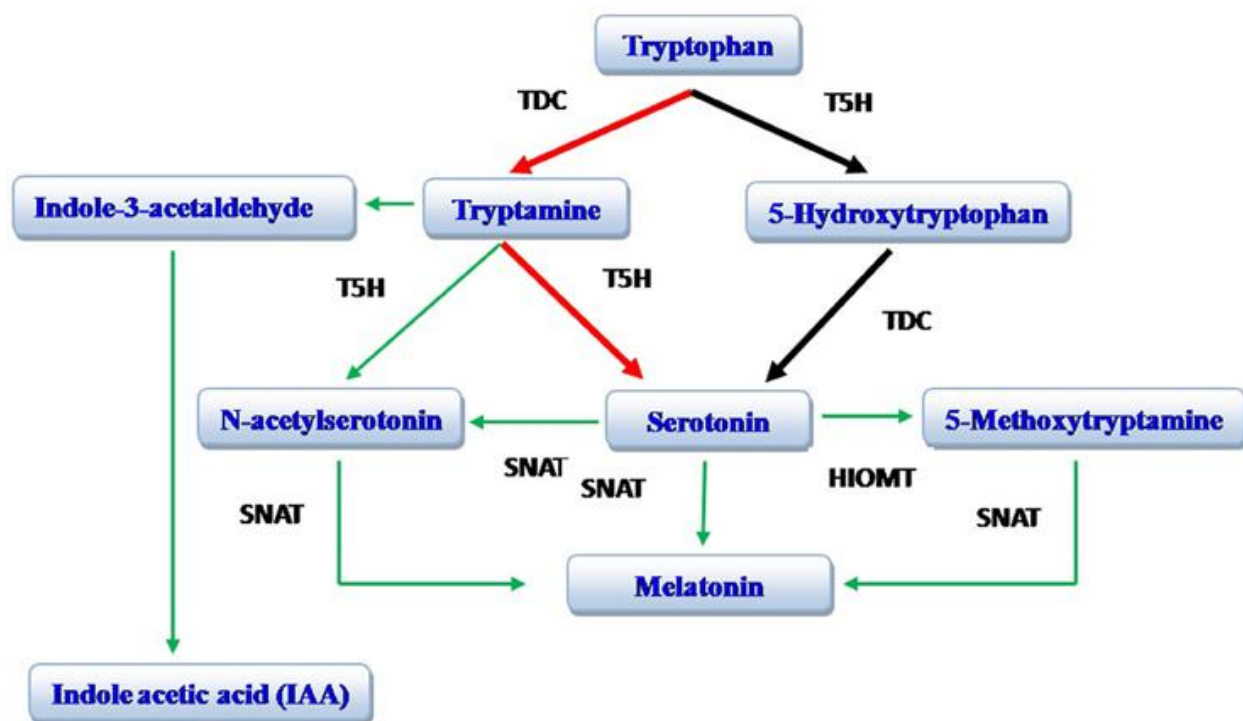
تریپتامین_۵_ هیدروکسیلاز ($5HT$)، هیدروکسیل و به ۵-هیدروکسی تریپتامین معروف به سرتونین تبدیل می‌شود. سپس آنزیم سرتونین N_ استیل ترانسفراز ($SNAT$) بر روی سرتونین اثر گذاشته و آن را تبدیل به N_ استیل سرتونین می‌کند که در نهایت با استیل‌اسیون O_ متیل ترانسفراز ($ASMT$) یا هیدروکسی ایندول- متیل ترانسفراز ($HIOMT$) به ملاتونین تبدیل می‌شود (شکل ۲-۳) (Nawaz et al., 2016; Santosh & Prianka, 2020).

مسیر دیگر تولید ملاتونین تبدیل سرتونین به ۵-متوکسی-تریپتامین است که توسط $HIOMT$ کاتالیز می‌شود و سرانجام ۵- متوکسی-تریپتامین توسط واکنش کاتالیزوری آنزیم $SNAT$ به ملاتونین تبدیل می‌شود (Tan et al., 2016).

¹ tryptamine 5-hydroxylase

² serotonin N-acetyltransferases

³ acetylserotonin O-methyltransferases



شکل ۳-۲ مسیر شناخته شده بیوسنتز ملاتونین در گیاهان

۸-۲ بیولوژی و مسیر بیوسنتز اتیلن

اتیلن به عنوان یک هورمون اصلی و گازی به صورت هیدروکربن ساده است (C_2H_4) و مجموعه متنوعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی به ویژه رسیدن میوه، پیری، انقراض و سیگنال دهی را تنظیم می کند (Park et al., 2017).

بیوسنتز اتیلن از طریق یک مسیر متابولیکی ساده انجام می شود. اتیلن از اسید آمینه متیونین (1Met) که از طریق آنزیم S-آدنوزیل متیونین سنتتاز (SAM^2) تبدیل به S-آدنوزیل متیونین ($S-AdoMet^3$) می شود. سپس

¹ Methionine

² S-Adenosyl Methionine synthetase

³ S-Adenosyl Methionine

با اثر ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید سنتاز (ACS^۱) بر روی SAM، ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC^۲) و ۵-متیل تیو آدنوزین (MTA^۳) تولید می‌شوند که در حضور اکسیژن، ACC از طریق آنزیم ۱-آمینوسیکلو پروپان-۱-کربوکسیلیک اسید اکسیداز (ACO^۴) به دی‌اکسیدکربن و سیانید تبدیل می‌شود. ۵-متیل تیو آدنوزین تولید شده از طریق ACS برای سنتز متیونین جدید از طریق چرخه یانگ بازیافت می‌شود. بازیافت MTA سرعت بیوسنتز اتیلن را در نبود متیونین حفظ می‌کند (شکل ۲-۴). همچنین سیانید تولید شده نیز از طریق بتا-سیانوآلانین سنتاز متابولیزه و به بتا-سیانوآلانین^۵ و آسپارژین تبدیل می‌شود تا از تجمع آن در گیاهانی که میزان بیوسنتز اتیلن آن‌ها زیاد است جلوگیری شود (Pattyn et al., 2020).

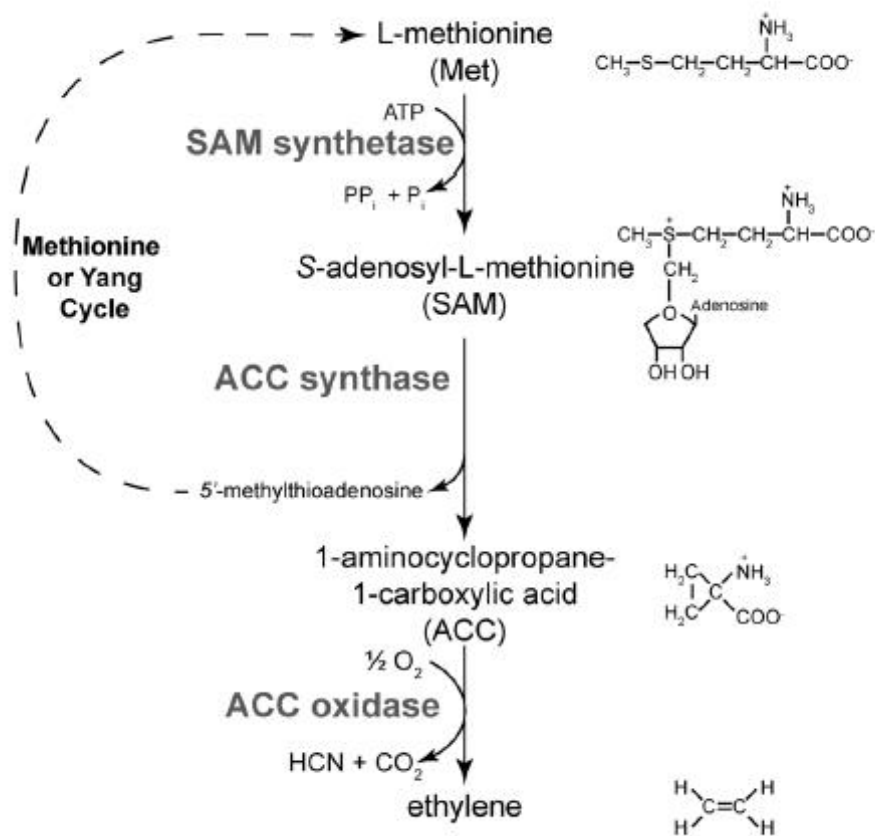
¹ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid synthase

² 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid

³ 5'-Methylthioadenosine

⁴ 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid oxidase

⁵ β - cyanoalanine



شکل ۴-۲ مسیر شناخته شده بیوسنتز اتیلن در گیاهان و وجود SAM در این مسیر

۲-۸-۱ بیولوژی و مسیر بیوسنتز متیونین

متیونین (Met) از خانواده اسیدهای آمینه آسپاراتات است. اسید آمینه پروتئینی متیونین یا به طور مستقیم مانند شروع ترجمه mRNA یا به صورت غیر مستقیم از طریق تجزیه فرآورده اصلی خود (SAM) تولید می شود و در بسیاری از عملکردهای ضروری و متابولیسم های سلولی درگیر است. به همین دلیل سنتز، تجمع و مصرف متیونین به شدت کنترل می شود (Matthews, 1999; Hesse and Hoefgen, 2003). متیونین به عنوان یک آمینواسید ضروری در رژیم غذایی حیوانات غیر نوشخوارکننده و همچنین پستانداران تک معده که توانایی سنتز نیمی از ۲۰ اسید آمینه پروتئینی را دارند الزامی است. غلات و حبوبات دارای مقدار کمی متیونین هستند (Table

and Higgins, 1998; Hesse et al, 2001). متیونین یک متابولیت اساسی در سلول‌های گیاهی است زیرا پس از تبدیل به SAM، سطح چندین متابولیت اساسی از جمله اتیلن، پلی آمین‌ها، بیوتین و فیتوسیدروفورها را کنترل می‌کند (Galili et al., 2016).

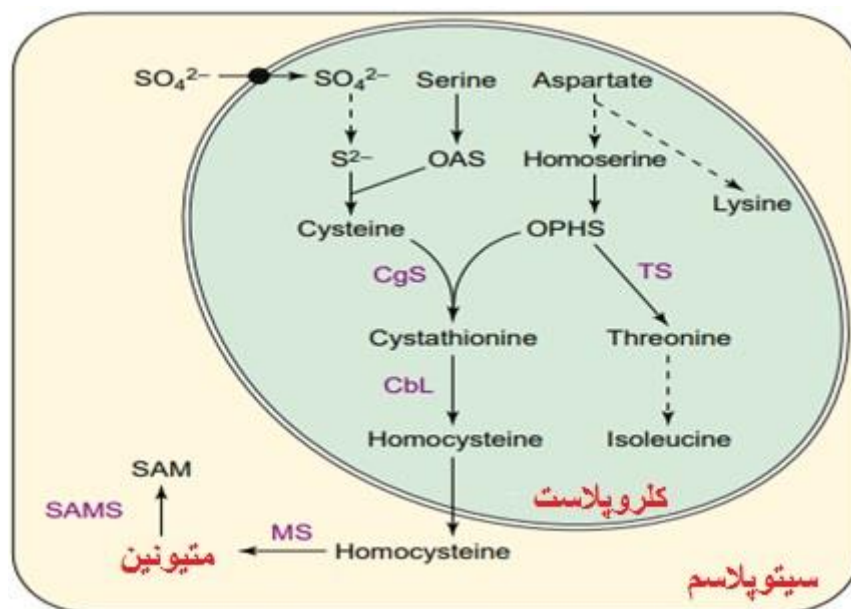
در گیاهان، O₂ فسفوهوموسرین (OPH¹) پیش‌ماده مشترک ترئونین و متیونین است. O₂ فسفوهوموسرین یا به‌طور مستقیم توسط ترئونین سنتاز (TS²) به ترئونین تبدیل می‌شود و یا در مکانیزمی سه مرحله‌ای از طریق متراکم شدن سیستئین و OPH توسط آنزیم سیستاتیونین گاما سنتاز (CgS³) تبدیل به سیستاتیونین⁴ و متعاقب آن با اثر آنزیم سیستاتیونین گاما سنتاز (CgS) به هوموسیستئین تبدیل می‌شود سپس با اثر آنزیم متیونین سنتاز تبدیل به متیونین می‌شود. سرانجام، حدود ۲۰٪ از متیونین در پروتئین‌ها گنجانده می‌شود در حالی که ۸۰٪ آن به SAM به عنوان محصول نهایی مسیر بیوسنتز متیونین تبدیل می‌شود (شکل ۲-۵) (Hesse & Hoefgen, 2003).

¹ O-phosphohomoserine

² threonine synthase

³ Cystathionine γ -synthase

⁴ cystathionine



شکل ۲-۵ مسیر شناخته شده بیوسنتز متیونین در گیاهان و نقش آنزیم‌های SAMS و هموسیستئین در این مسیر

۲-۸-۲ آنزیم SAM

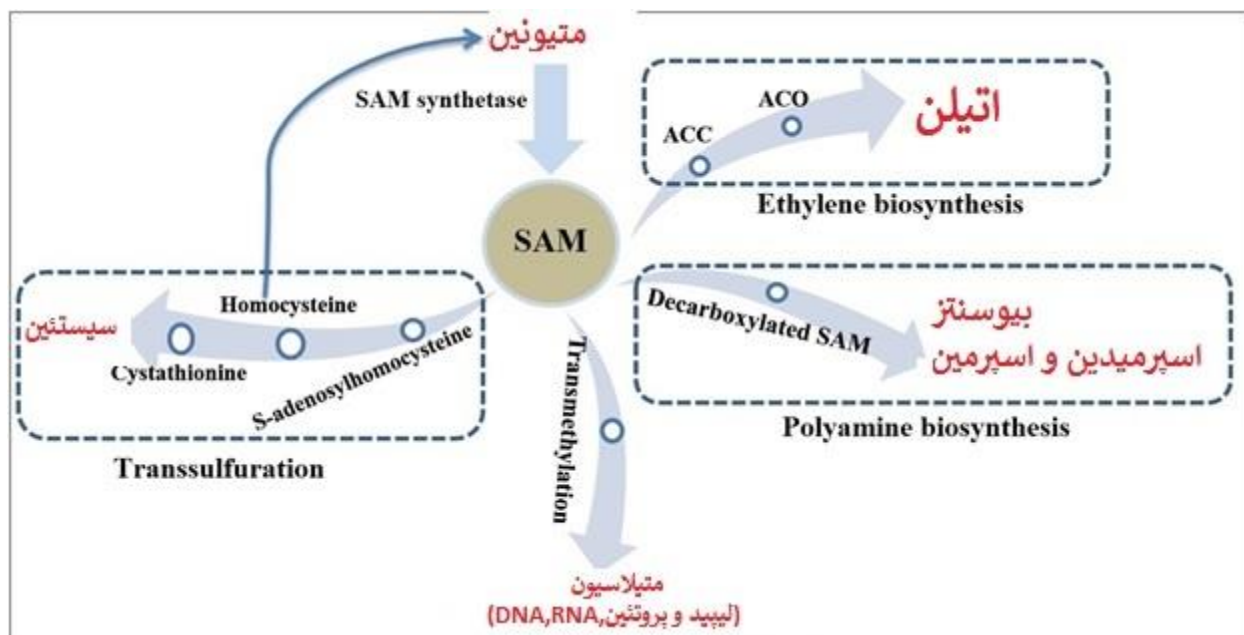
S-Adenosyl-L-methionine (SAM) یک مولکول اصلی در سلول‌های یوکاریوتی است که در چندین واکنش مهم بیولوژیکی شرکت می‌کند (Heidari et al., 2020). SAM توسط آنزیم S-آدنوزیل متیونین سنتتاز (SAMS) از متیونین و آدنوزین تری فسفات (ATP) کاتالیز می‌شود (Heidari et al., 2020).

SAM در مسیرهای مختلفی مانند اتیلن (در گیاهان)، نیکوتین آمین، مسیرهای بیوسنتز پلی آمین، ترانس سولفوراسیون و مسیر متابولیسم متیونین نقش دارد (Chen et al., 2016; Sauter et al., 2013) (شکل ۶). علاوه بر این، SAM در بیوسنتز لیگنین و پاسخ به تنش‌های محیطی شرکت می‌کند و در چندین فرآیند سلولی نقش اساسی دارد. SAM به طور گسترده به عنوان اهدا کننده گروه متیل شناخته می‌شود، بسیاری از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و مولکول‌های کوچک به طور عمده توسط SAM متیله می‌شوند (Heidari et al., 2020).

SAM به عنوان یک نمک سولفونیوم، در ساختار خود دارای یک اتم گوگرد است که در انتقال گروه متیل به اتم‌های هسته دوست مانند اتم کربن C5 رشته‌های DNA، اتم نیتروژن (در گروه آمینه گلیسین)، اتم گوگرد (در واکنش متیلاسیون S تیوپورین ها)، اتم اکسیژن (در واکنش متیلاسیون O کاتکول آمین) و اتم آرسنیک نقش دارد (Heidari et al., 2020). بعلاوه، گروه‌های آمینوپروپیل درگیر در بیوسنتز پلی‌آمین و اتیلن و گروه‌های متیلن درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب سیکلوپروپیل از SAM به عنوان منبع دهنده متیل استفاده می‌کنند (Heidari et al., 2020). در مسیر ترانس سولفوراسیون، آنزیم SAM در تبدیل هموسیستئین به سیستئین به عنوان پیش ماده آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی مانند گلوتاتیون شرکت می‌کند. پس از متیلاسیون، SAM به S-adenosylhomocysteine (SAH) تبدیل می‌شود که یک مهار کننده شدید واکنش‌های متیلاسیون است. آنزیم هیدرولاز S-adenosylhomocysteine SAH را به هموسیستئین و آدنوزیل تبدیل می‌کند (Lee et al., 2018). مطالعات اخیر نشان داده است که چندین بیماری انسانی مانند سکته مغزی، زوال عقل، پوکی استخوان، بیماری آلزایمر و بیماری عروق کرونر، با هموسیستئین کل پلاسما در ارتباط است (Chen et al., 2015; Lee et al., 2018). بعلاوه، SAM بستری برای بیوسنتز پلی‌آمین و اتیلن است. پلی‌آمین‌ها هورمون‌های مهمی در ارگانیسم‌های یوکاریوتی هستند و رشد سلول‌ها را در طی چندین فعالیت از جمله پاسخ‌های استرس، رشد گرده و گل و محافظت از فتوسیستم دو تنظیم می‌کنند. در بیوسنتز پلی‌آمین، SAM توسط دکربوکسیلاز S-آدنوزیل متیونین (SAMDC) به آنزیم S-adenosylmethioninamine (هم‌چنین به عنوان SAM دکربوکسیله شناخته می‌شود) تبدیل می‌شود (Heidari et al., 2020).

S-adenosylmethioninamine به عنوان یک اهدا کننده آمینوپروپیل، در بیوسنتز پلی‌آمین‌ها مانند اسپرمین و اسپرمیدین از پوترسین استفاده می‌شود (شکل ۶) (Sauter et al., 2013). علاوه بر این، SAM در سنتز اسید ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک (ACC) توسط ACC سنتاز (ACS) شرکت می‌کند. ACC به عنوان پیش ماده، توسط ACC اکسیداز (ACO) به اتیلن تبدیل می‌شود (Heidari et al., 2020). مطالعات قبلی نشان می‌دهد

که ژن‌های درگیر در چرخه SAM (شکل ۶) نقش مهمی در تنظیم رشد سلول و پاسخ‌های استرس دارند. به عنوان مثال، تنظیم کم ژن‌های SAMDC باعث کاهش زنده ماندن گرده، طول گیاه و تحمل تنش غیر زنده در برنج تراریخته می‌شود (Chen et al., 2014). علاوه بر این، بیان بیش از حد SAMDC باعث افزایش تحمل به خشکی در Arabidopsis، تحمل استرس کلرید سدیم در برنج و تحمل تنش بیوتیکی و غیر زنده در گوجه فرنگی می‌شود. آنزیم SAM سنتتاز (SAMS)، هم‌چنین به عنوان متیونین آدنوزیل ترانسفراز (MAT) شناخته می‌شود، SAM را از متیونین کاتالیز می‌کند (Heidari et al., 2020).



شکل ۶-۲ نقش SAM در مسیرهای بیوسنتز اتیلن، متیونین، سیستئین، پلی‌آمین‌ها و متیلاسیون

۹-۲ مرور منابع

۹-۲-۱ پژوهش‌های انجام شده در زمینه آنزیم SAM

-برای بررسی اثر SAM بر روی مسیر بیوسنتز اتیلن و پلی آمین و متیلاسیون، پل و همکارانش (۲۰۱۳) مطالعه‌ای بر روی گوجه‌فرنگی تحت تیمار ۱- متیل-سیکلوپروپان (MCP-1^۱) انجام دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که تجمع SAH^۲ در نمونه‌های شاهد بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با MCP-1 بود که این S-آدنوزین-L-هموسیستئین (SAH) باعث مهار بیش از حد متیلاسیون‌های وابسته به SAM می‌شود. هم‌چنین بیان S-آدنوزین-L-هموسیستئین هیدرولاز (SAHH^۳) در نمونه شاهد بیشتر از نمونه تیمار شده بود اما به دلیل اینکه بیان آدنوزین کیناز (ADK^۴) به شدت مهار می‌شد، باعث تجمع آدنوزین و به نوبه خود باعث مهار SAHH می‌شد. نتایج نشان داده است که نسبت SAH/SAM در اواخر دوره رسیدن به شدت افزایش می‌یابد و باعث کاهش متیلاسیون DNA در بافت پریکارپ گوجه‌فرنگی می‌شود. هم‌چنین در بررسی پلی آمین، هر سه پلی آمین (پوترسین^۵، اسپرمیدین^۶ و اسپرمین^۷) در مقادیر بیشتری برای نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد وجود داشتند که نشان‌دهنده این است که با کاهش میزان مصرف SAM توسط مسیر اتیلن، این مقدار SAM برای بیوسنتز پلی آمین‌ها استفاده شده است. هم‌چنین بیان SAM دکربوکسیلاز (SAMDC^۸) در نمونه‌های تیمار شده به شدت پایین تر بود که نشان می‌دهد هنگامی که سنتز اتیلن کم است به SAMDC کمتری برای دکربوکسیلاسیون SAM برای بیوسنتز پلی آمین نیاز است که هرچه به سمت مراحل نهایی رسیدگی می‌رویم به موازات افزایش تولید اتیلن بیان SAMDC برای میوه تحت تیمار افزایش می‌یابد. از طرفی در بررسی اتیلن مشاهده کردند که نمونه‌های تیمار شده در مقایسه

¹ 1-methylcyclopropane

² S-adenosyl-L-homocysteine

³ S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase

⁴ adenosine kinase

⁵ putrescine

⁶ spermidine

⁷ spermine

⁸ SAM decarboxylase

با نمونه‌های تیمار نشده محتوی ACC بالاتری نشان می‌دهند و محتوی ۱- مالونیل آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیل اسید ($MACC^1$) در نمونه‌های تیمار شده کمتر بود که مشخص می‌کرد فعالیت $MACC$ تحت کنترل اتیلن است. هم‌چنین فعالیت ACS در نمونه‌های تحت تیمار به شدت مهار می‌شد در نتیجه تولید اتیلن در نمونه‌های تیمار شده در مراحل قبل از رسیدگی به شدت سرکوب می‌شد و SAM موجود احتمالاً در سایر مسیرها مورد استفاده قرار می‌گرفت. در مرحله رسیدگی که میزان تولید اتیلن بالا است مقادیر زیاد SAM موجود است که مقدار زیادی از آن می‌تواند فعالیت ACS را مهار کند که نشان دهنده کنترل دقیق سطح SAM در طی تولید بالای اتیلن است تا بستر کافی برای تولید اتیلن، بیوسنتز پلی‌آمین و متیلاسیون و سایر مسیرهای بیوسنتز وابسته به SAM فراهم شود (Poel et al., 2013).

- برای بررسی عملکرد $SAMS1$ ، گنگ و همکارانش (۲۰۱۴) مطالعه‌ای بر روی گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته برای ژن $SAMS1$ و گیاهان گونه وحشی (WT) در شرایط تنش قلیایی انجام دادند. مشاهده شد ۲۷ روز بعد از تنش قلیایی بیان بیش از حد $SAMS1$ بقای گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد در حالی که گیاهان گونه وحشی در این شرایط دوام نیاوردند. در طی بررسی‌ها مشخص شد که گونه‌های تراریخته در مقایسه با گونه‌های گونه وحشی در شرایط قلیایی مقدار زیست‌توده بیشتری نشان می‌دادند. هم‌چنین بیان بیش از حد $SAMS1$ می‌تواند از سیستم غشا سلول در برابر آسیب اکسیداتیو تحت تنش قلیایی محافظت کند. به همین دلیل سیستم فتوسنتز نیز تحت تاثیر بیان بیش از حد $SAMS1$ در گیاهان تراریخته از آسیب کمتری نسبت به گیاهان گونه وحشی برخوردار شدند. علاوه بر این در تیمار ۱۲ روزه، فعالیت پلی‌آمین در ریشه گیاهان تراریخته به طور چشم‌گیری بالاتر از گیاهان وحشی بود. بیان زیاد $SAMS1$ در گیاهان تراریخته منجر به ثابت ماندن متابولیسم اتیلن شده و افزایش تحمل تنش قلیایی اعطا شده توسط $SAMS1$ عمدتاً به دلیل مسیر پلی‌آمین هست. در طی تنش قلیایی مشخص شد $SAMS1$ باعث تجمع کمتر H_2O_2 در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان WT شد. در مطالعه حاضر، نشان

¹ 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid

داده شد که بیان بیش از حد *SAMS1* به طور چشمگیری تحمل تنش قلیایی را در گیاهان گوجه فرنگی ایجاد می کند (Gong et al., 2014).

-مطالعه‌ای که اسپارتر و همکارانش بر روی cDNA گوجه‌فرنگی‌هایی که تحت تنش شوری و تیمار با ABA انجام داد منجر به جداسازی *SAM1* cDNA شد. بعد از آن با آنالیز DNA کل به وجود حداقل ۴ ژن رمزگذار سنتتازهای AdoMet در گوجه‌فرنگی پی بردند. رونوشت ژن‌های *SAM* گوجه‌فرنگی در اندام‌های متمایز فراوانی نسبی مختلفی را نشان دادند. در بررسی عملکردهای ژن‌های *SAM* در طی تنش شوری و تیمار^۱ ABA مشخص شد که سطح *SAM2* و *SAM3* در برگ‌ها بر اثر تنش در ابتدا به‌طور موقت کاهش و پس از ۷۲ ساعت به حالت کنترل برمی‌گردد. تیمار ABA نیز تغییرات مشابهی را در سطح mRNA ایجاد کرد که پس از ۲۴ ساعت نیز ادامه داشت. در مقابل، افزایش فراوانی mRNA *SAMs* بر تنش شوری یک پاسخ پایدار بود. این ماندگاری و این واقعیت که ABA نیز الگوی مشابهی از تجمع رونوشت را ایجاد کرده‌اند، نشان می‌دهد *SAM* برای سازگاری گیاه با تنش‌های شوری و اسمزی مورد نیاز بوده و ممکن است ABA در تنظیم مجدد رونوشت *SAM* شرکت کند (Espartero et al., 1994).

۲-۹-۲ برخی تحقیقات انجام شده بر روی اثر ملاتونین در گیاهان

-دینگ و همکارانش (۲۰۱۷) در طی آزمایشی به بررسی اثر ملاتونین بر روی گوجه‌فرنگی، تحت تنش سرما پرداختند. مشخص شد بعد از ۲۴ ساعت تنش سرما، بیان ژن *SBPase*^۲ که یک آنزیم اصلی در چرخه کالوین است، در گیاهان تیمار شده با ملاتونین به صورت محلول پاشی افزایش یافته است که افزایش فعالیت این ژن به افزایش شارژ کربن کمک می‌کند و در نتیجه باعث بهبود سیستم فتوسنتزی می‌شود. علاوه بر این در گیاهان تیمار

^۱ Absciscic acid

^۲ sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

شده با ملاتونین محتوی 'MDA و نشت الکترولیت کاهش پیدا می‌کند که نشان‌دهنده نقش ملاتونین در کاهش استرس‌های اکسیداتیو در شرایط تنش سرما است. هم‌چنین ملاتونین باعث افزایش تولید متابولیت‌هایی مانند پلی‌آمین‌ها و پرولین نیز شد. با کاهش تجمع ROSها و آسیب‌های اکسیداتیو فعالیت‌های آنزیمی و تجمع آنتی-اکسیدان‌ها را در گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما افزایش داد (Ding et al., 2017).

- در مطالعه‌ای دانه‌های سویا پوشش داده شده با ملاتونین مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد که ملاتونین باعث افزایش رشد سویا می‌شود و تعداد جوانه و تعداد دانه را افزایش می‌دهد. هم‌چنین ملاتونین، تحمل سویا به تنش شوری و خشکی را افزایش داد. آنالیز تغییر رونوشت ژن‌ها نشان داد که تنش شوری مانع بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند فعالیت اکسیدوردوکتاز و فعالیت متابولیسم‌های ثانویه می‌شود اما پیش تیمار ملاتونین سبب افزایش بیان این ژن‌ها شد و اثرات بازدارنده تنش شوری بر بیان این ژن‌ها کاسته شد. آنالیزهای دقیق‌تر نشان داد که ملاتونین احتمالاً نقش خود را در سویا از طریق افزایش ژن‌های دخیل در تقسیم سلولی، فتوسنتز، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، بیوسنتز اسیدهای چرب و متابولیسم آسکوربات ایجاد کرده است (Wei et al., 2015).

- مطالعه‌ای دیگر برای ایجاد چگونگی تغییر محتوای ملاتونین در گیاهان در اثر تنش ناشی از عوامل شیمیایی در نظر گرفته شده است. برای این منظور گیاهان جو در معرض عوامل مختلف شیمیایی مانند کلرید سدیم، سولفات روی، پراکسید هیدروژن قرار گرفتند. طی زمان‌های مختلف، محتوای ملاتونین در ریشه‌های تیمار شده و ریشه‌های شاهد با استفاده از طیف‌سنج جرمی و کروماتوگرافی مایع با تشخیص فلورسانس اندازه‌گیری شد. داده‌ها حاکی از آن بود که محتوای ملاتونین در ریشه‌ها به علت تنش افزایش می‌یابد. داده‌ها برای اولین بار تأیید کردند که عوامل ایجاد تنش شیمیایی می‌توانند باعث افزایش بیوسنتز ملاتونین در ریشه‌های جو شوند. چنین افزایشی در ملاتونین

¹ Malondialdehyde

احتمالا نقش آنتی اکسیداتیو مهمی در برابر تنش ناشی از عوامل شیمیایی و سایر تنش‌های زیستی دارد (Arnao & Hernández-Ruiz, 2009).

-بررسی این که آیا گیاهان غنی از ملاتونین می‌توانند در برابر شرایط تنش مقاوم باشند یا خیر، در یک تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت. گیاه برنج ترانس ژن غنی از ملاتونین تحت استفاده از علف‌کش butafenacil بررسی شد و مشاهده کردند که در هر دو تیمار، دانه برنج در شرایط تاریکی جوانه زده و رشد کرد ولی با انتقال به نور، گیاهی که دارای ملاتونین بود فنوتیپ‌های مقاوم را نشان داد و هم‌چنین بعد از تیمار با علف‌کش butafenacil مشاهده شد که گیاه ملاتونین بیشتری نسبت به غیر ترانس ژن‌ها تولید می‌کند (Park et al., 2013).

-در مطالعه‌ای نقش احتمالی ملاتونین بر پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیک شامل متابولیسم اکسیژن و اکسیددهنده در گوجه‌فرنگی تحت تنش شبیه به باران اسیدی که باعث مهار رشد، آسیب به کلروپلاست، فتوسنتز و افزایش انباشت ROS و پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان گوجه‌فرنگی می‌شود بررسی کردند. برای مقابله با آثار مضر تنش باران اسیدی، گیاهانی که تحت تنش بودند هر دو ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش دادند. در عین حال تیمار با ملاتونین باعث تقویت تحمل تنش باران اسیدی توسط ترمیم کلروپلاست، بهبود عملکرد فتوسنتز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهانی است که تحت تاثیر باران اسیدی قرار گرفتند. با این حال، این اثرات ملاتونین وابسته به غلظت هستند و در این مطالعه مشخص شد تیمار با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین، تحمل تنش باران اسیدی را با افزایش فتوسنتز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ROS در گوجه‌فرنگی بهبود می‌بخشد (Debnath et al., 2018).

-در مطالعه‌ای دیگر تیمار با ملاتونین و آنالیز مربوط به ژن‌هایی که متابولیسم‌های نیتروژن، کربوهیدرات‌ها، تری‌کربوکسیلیک اسیدها و متابولیسم‌های ثانویه را بر عهده داشتند شواهدی مبنی بر نقش محافظتی ملاتونین در پاسخ به تنش‌های بی‌رویه در گیاه bermudagrass، از طریق فعال‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها و فرآیند هموستازی ارائه شده است (Shi et al., 2015).

-همچنین تاثیر کاربردهای بلند مدت ملاتونین بر روی کیفیت و عملکرد میوه گوجه‌فرنگی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. گیاهانی که بذر آنها قبل از جوانه‌زنی در ملاتونین خیسانده شده بود محتوی اسید آسکوربیک و لیکوپن و عنصر کلسیم آنها افزایش و محتوی N، Mg، Cu، Zn، Fe، Mn کاهش یافته بود. در مقابل گیاهانی که بعد از جوانه‌زنی به صورت هفتگی با محلول ملاتونین آبیاری شده بودند محتوی اسید آسکوربیک و لیکوپن و اسید سیتریک و عنصر p آنها افزایش یافته بود. این مطالعه نقش ملاتونین در افزایش عملکرد میوه و کیفیت گوجه‌فرنگی ارائه می‌دهد (Liu et al., 2016).

- در آزمایشی اثرات ملاتونین را با دزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) بر رشد و فتوسنتز نهال‌های کیوی تحت تنش خشکی بررسی کردند. مشاهده شد تنش خشکی تجمع زیست توده را به شدت سرکوب کرده به غشای سلولی آسیب و فتوسنتز را در نهال کیوی مهار می‌کند. با این حال، آبیاری با ملاتونین باعث کاهش خسارت ناشی از خشکسالی به صورت توسعه سیستم ریشه‌ای، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب رنگدانه‌ها، کاهش تخریب غشای سلولی شد، تجمع اسمولیت را تقویت کرد و تخریب یا سنتز پروتئین‌های خاص را مهار کرد. علاوه بر این، ملاتونین با مهار بسته شدن روزنه، افزایش جذب انرژی نور و تقویت انتقال الکترون در PSII، فتوسنتز را بهبود بخشید. علاوه بر این، رونویسی ۱۱ ژن برای آنزیم‌های دخیل در تثبیت CO₂ در پاسخ به ملاتونین تنظیم مجدد شد. این نتایج نشان می‌دهد که ملاتونین مکمل می‌تواند به‌طور موثری سرکوب تجمع زیست توده و فتوسنتز ناشی از خشکسالی را بهبود بخشد و بنابراین سازگاری نهال را با تنش خشکی افزایش دهد (Liang et al., 2019).

-برای بررسی اثر ملاتونین روی سنتز اکسین در ریشه آرابیدوپسیس مطالعه روی اکوتیپ Columbia-0 آرابیدوپسیس تالیانا به عنوان نمونه وحشی انجام شد. به منظور بررسی اینکه آیا ملاتونین روی بیوسنتز اکسین تاثیری دارد یا خیر، اثر ملاتونین را روی سطح رونوشت‌های ژن‌های بیوسنتز اکسین (YUC) و همچنین روی ژن‌های PIN Formed که به‌طور مستقیم در انتقال اکسین در ریشه گیاهان نقش دارند بررسی شد. نتایج نشان داد که پس از ۶۰۰ میکرومول تیمار ملاتونین، محتوی اکسین و همچنین سطح نسبی PIN1,3,7 در ریشه‌های

آرابیدوپسیس به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. برای اطمینان از نتایج به دست آمده طی آزمایشی، مشاهده شد که اندازه مریستم ریشه نهال‌های آرابیدوپسیس، با تیمار ۰.۵ نانومولار IAA به مدت ۸ روز تغییری نکرد اما وقتی این تیمار با ۶۰۰ میکرومولار ملاتونین همراه شد به شدت اندازه مریستم ریشه را کاهش داد و در نهایت بیان داشتند که ملاتونین بیوسنتز اکسین را به‌طور منفی تنظیم می‌کند (Wang et al., 2016).

- در یک مطالعه‌ای دیگر، اثرات ملاتونین برونزا بر برگ‌های سیب و بررسی نقش فیزیولوژیکی احتمالی آن در تأخیر پیری برگ مورد مطالعه قرار گرفت. برگ‌های جدا شده تحت تیمار با محلول‌های ۱۰ میلی‌مولاری ملاتونین به وضوح کاهش روند پیری ناشی از تاریکی را نشان دادند. ملاتونین کاهش طبیعی محتوای کلروفیل و حداکثر کارایی بالقوه فتوسیستم II (F_v / F_m) را به تأخیر انداخت. همچنین سطح رونوشت یک ژن کلیدی تخریب کلروفیل، به نام فاید اکسیژناز (PAO) و ژن مرتبط با پیری (*SAG12*) را سرکوب کرد. تجمع H_2O_2 توسط ملاتونین برونزا مهار شد، که ممکن است ناشی از مهار مستقیم گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر توسط ملاتونین و افزایش پراکسیداز آسکوربات (APX^1) باشد که هم در mRNA و هم در سطح فعالیت پروتئین عمل می‌کند. تیمار ملاتونین همچنین منجر به حفظ محتوای بالاتر اسید اسکوربیک (AsA^2) و گلوتاتیون (GSH^3) و دهیدرواسکوربات (DHA) و گلوتاتیون اکسید شده کمتر (GSSG) در مقایسه با شاهد شد (Wang et al., 2012).

- در آزمایشی کایا و همکارانش (۲۰۱۹)، تأثیر تیمار ملاتونین را بر روی تنش علف‌کش پن دیمتالین ($Pend^4$)، پلی‌اتین گلیکول (PEG^5) در شرایط خشکی بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که محتوای کلروفیل در گیاهان بدون اعمال ملاتونین مخصوصاً در گروه تیمار شده با PEG کاهش می‌یابد. اما پیش تیمار با ملاتونین میزان

¹ ascorbate peroxidase

² ascorbic acid

³ glutathione

⁴ pendimethaline

⁵ polyethylene glycol

کلروفیل را در گروه کنترل و تنش افزایش داد. همچنین در این آزمایش مشخص شد که محتوی نسبی آب (RWC¹) در مقایسه با شاهد در گروه‌های بدون ملاتونین کاهش پیدا می‌کند. اما تیمار با ملاتونین باعث افزایش RWC شد. همچنین تیمار با ملاتونین باعث تجمع پرولین و افزایش ملاتونین درون‌زا و نیز کاهش مالون‌آلدئید می‌شود. در این مطالعه برآورد شد که ملاتونین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و به این ترتیب از ترکیبات سلولی در برابر فشارهای اکسیداتیو محافظت می‌کند (Kaya & Doganlar, 2019).

-صدیقی و همکارانش (۲۰۱۹)، نقش ملاتونین را به عنوان یک عامل طبیعی در فعالیت‌های رنگدانه‌های فتوسنتزی، میزان تولید اسمولیت‌ها از طریق اندازه‌گیری پرولین و متابولیسم کربوهیدرات و همچنین عملکرد ملاتونین را در سیستم آنتی‌اکسیدانی تحت تنش شوری بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که در شرایط غیر شوری استفاده از غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار ملاتونین رشد گیاه را بهبود می‌بخشد. همچنین گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با NaCl افزایش تخریب کلروفیل، نشت الکترولیت، مالون دی‌آلدئید و ROS را نشان دادند که استفاده از ملاتونین به صورت محلول پاشی باعث بهبود رشد گیاه و کاهش سطح موارد گفته شده از طریق تنظیم مجدد آنزیم‌های فتوسنتزی، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و تنظیم چرخه ASC-GSH می‌شود. این نتایج حاکی از آن است که ملاتونین در شرایط تنش اثرات مضر تنش شوری بر رشد گوجه‌فرنگی را کنترل می‌کند (Siddiqui et al., 2019).

-طی مطالعه‌ای مشخص شد که تنش شوری اعمال شده بر روی گیاهچه‌های پسته باعث مهار رشد گیاه می‌شود که با اعمال تیمار ملاتونین به‌طور قابل‌توجهی خصوصیات مورفولوژیکی رشد را در سطوح مختلف شوری بهبود بخشید. همچنین ملاتونین با افزایش اسید ایندول استیک درون‌زا در ریشه گیاهچه، رشد ریشه را تحریک می‌کند و باعث افزایش وزن تازه و خشک ریشه می‌شود. علاوه بر این نتایج نشان داده است که ملاتونین منجر به افزایش قابل‌توجه ملاتونین درون‌زا، سطح پلی‌آمین‌های آزاد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کلروفیل و نشت الکترولیت

¹ relative water content

می‌شود. از این یافته‌ها مشخص شد ملاتونین تنظیم کننده مثبتی در پاسخ به تنش گیاه است و تحمل نهال پسته را به تنش شوری بهبود می‌بخشد (Kamiab, 2020).

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ زمان و محل آزمایش

کشت گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* Moneymaker و اعمال تیمارهای مورد آزمایش در شرایط قابل کنترل در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد.

۳-۲ نحوه اجرای آزمایش

این تحقیق به صورت فاکتوریل با دو عامل در قالب طرح فاکتوریل با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول آزمایش شامل غلظت‌های مختلف ملاتونین (۰، ۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و اثر کاهش دما (۸ درجه سانتی‌گراد) در زمان‌های مختلف (۳، ۶ و ۲۴ ساعت) و دمای نرمال به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد.

۳-۳ کاشت مواد گیاهی

بذرهای رقم *Solanum lycopersicum* Moneymaker (گونه تجاری) گیاه گوجه‌فرنگی از کمپانی ENZA ZADEN هلند تهیه شد. بذرهای ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم ۰.۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند. سپس در گلدان‌های حاوی پرلیت و پیت‌ماس استریل شده (۲:۱) کشت شدند. در هر گلدان ابتدا ۵ بذر کشت شد و پس از رشد یافتن آن‌ها ۳ تا از بهترین گیاهچه‌ها در هر گلدان باقی ماند. شرایط کشت بدین صورت بود که گیاهچه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های ۴۰ روزه جهت تیمار ملاتونین مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا ملاتونین در غلظت‌های مختلف (۰، ۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) تهیه شد و به صورت اسپری بر روی گیاهچه‌ها اعمال تیمار شد. این کار به صورت یک روز در میان به مدت ۷ روز تکرار گردید. پس از این مدت گیاهچه‌ها به دو دسته تقسیم شدند و نیمی از آن‌ها به اتافک رشد با دمای ۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و نیمی دیگر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند. سپس در

دوره‌های زمانی ۳، ۶ و ۲۴ ساعت از گیاهچه‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های برداشت شده بلافاصله در ازت مایع و سپس به فریزر ۸۰- جهت انجام سایر آنالیزها منتقل شدند.

۳-۴ بررسی خصوصیات آنزیمی

۳-۴-۱ سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم کاتالاز

برای ارزیابی مکانیسم تحمل به سرما توسط ملاتونین، ما تغییرات در فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز را به روش زیر بررسی کردیم.

۳-۴-۱-۱ تهیه بافر استخراج

مقدار ۲۴/۰ گرم Tris-HCL در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده برای تهیه بافر استخراج حل شد و با محلول هیدروکلریک اسید ۱ نرمال، pH آن بر روی ۷/۸ تنظیم شد و محلول مورد نظر ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد.

۳-۴-۱-۲ استخراج محلول آنزیمی

- در ابتدا ۲۵/۰ گرم از نمونه برگ توسط ازت مایع در هاون چینی به صورت پودر درآمد و به فالكون‌های ۱۵ میلی لیتری انتقال پیدا کرد.
- بعد از آن، به هر فالكون، ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج اضافه شد.
- نمونه‌ها ورتکس شدند و بعد از آن ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.
- فاز بالایی فالكون‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری جدید منتقل و ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند.

برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار را ترکیب کرده و سپس با دستگاه اسپکتوفتومتری و در طول موج ۲۴۰ نانومتری اندازه گیری صورت گرفت. فعالیت آنزیم به مدت ۳ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه ای اندازه گیری و ثبت شد. ضمن این که بلافاصله بعد از اضافه کردن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز شد و نمونه ها به سرعت در دستگاه قرار گرفتند (Chance and Maehly, 1995).

فعالیت آنزیم کاتالاز براساس فرمول زیر محاسبه گردید.

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

U : واحد آنزیمی

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

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

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

d_f : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

t : مدت زمان واکنش (۱۸۰ ثانیه)

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

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

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

۳-۴-۲ اندازه‌گیری نشت الکتrolیت

اثرات تنش سرما بر نفوذ پذیری غشا تحت تیمار ملاتونین با اندازه‌گیری نشت الکتrolیت (EL) به روش زیر به‌دست آمد:

- درون فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری آب دوبار تقطیر و ۰/۱ گرم نمونه برگی از هر تیمار آزمایشی ریخته شد.
- بعد از آن، فالكون‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.
- هدایت الکتریکی نمونه‌ها با دستگاه EC متر بعد از درآوردن نمونه‌ها از حمام آب گرم اندازه‌گیری شد.
- مجدداً نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.
- پس از گذشت این زمان و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای اتاق هدایت الکتریکی نمونه‌ها برای بار دوم اندازه‌گیری شد.

درصد نشت الکتrolیت از غشاء سلول از طریق جایگذاری داده‌ها در فرمول زیر به‌دست آمد.

$$EL\% = (1 - EC1/EC2) * 100$$

۳-۴-۳ اندازه‌گیری شاخص مالون دی آلدئید

اثرات تنش سرما بر روی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی تحت تیمار ملاتونین به روش زیر به‌دست آمد:

- در ۱۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۵٪، ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های برگی را ریخته و مخلوط کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوز شدند.
- ۲ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل را با ۲ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪ ترکیب گردید.
- ترکیب به‌دست آمده در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و سپس سریعاً خنک گردید.

○ بعد از این مرحله، مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوز شدند.

در نهایت در طول موج ۴۵۰، ۵۳۲، ۶۰۰ نانومتر جذب نمونه‌ها ثبت شد و از طریق فرمول زیر میزان مالون دی آلدئید محاسبه شد (Meng et al, 2012).

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

۳-۴-۴ اندازه‌گیری کلروفیل a و b و کارتنوئید

برای بررسی نقش ملاتونین در بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتز تحت شرایط تنش و غیر تنش، غلظت کلروفیل به روش لیچتن تالر و ولبراون (۱۹۸۳) زیراندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل به عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی پذیرفته شده است (Lichtenthaler and Wellburn, 1983).

برای به دست آوردن مقدار کلروفیل برگ به‌طور تصادفی از برگ‌ها نمونه‌برداری انجام گرفت. اندازه‌گیری کارتنوئید و کلروفیل به‌روش بدون لهیدگی انجام گرفت. برای این کار ۵۰ میلی گرم بافت برگ را با ۵ میلی لیتر از دی متیل سولفوکسید مخلوط کرده و در آون با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت قرار دادیم. بعد از آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، مقدار جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۵ نانومتر ثبت شد و با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a و b و کارتنوئید به دست آمد.

$$Chl_a = (12.19 A_{665}) - (3.45 A_{645})$$

$$Chl_b = (21.99 A_{645} - 5.32 A_{665})$$

$$Chl_t = Chl_a + Chl_b$$

$$\text{Cartenoeid} = (1000 \text{ A470} - 2.14\text{Chl}_a - 70.16\text{Chl}_b) / 200$$

۵-۳ بررسی‌های بیوانفورماتیک ژن‌های SAM

۱-۵-۳ شناسایی ژن‌ها

ژن‌های SAM موجود در مسیر بیوسنتز اتیلن و پلی‌آمین‌ها در گوجه‌فرنگی با استفاده از سایت 'Plantcyc' شناسایی شدند. همچنین توالی‌های پروتئینی و رونوشت ژن‌های SAM در گوجه‌فرنگی از سایت 'The Sol Genomics Network (SGN)' دریافت شد.

۲-۵-۳ خصوصیات فیزیکوشیمیایی

خصوصیات فیزیکوشیمیایی مانند وزن مولکولی، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری و شاخص GRAVY پروتئینی SAM با استفاده از نرم‌افزار ProtParam در پایگاه داده 'Expasy' بررسی شد. جهت تعیین نواحی فعال و یا همان دومین‌های پروتئینی، توالی اسیدهای آمینه ژن‌های SAM گوجه‌فرنگی، با استفاده از سایت 'Conserved Domains Database' (CDD) مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین آنالیز هم‌ردیفی چندگانه و رسم درخت فیلوژنی توالی اسیدهای آمینه SAM را با استفاده از ابزار Omega پایگاه داده 'EMBL-EBI' مورد آنالیز قرار گرفت و رسم شد.

¹ <https://www.plantcyc.org/>

² <https://solgenomics.net/>

³ <https://web.expasy.org/protparam/>

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>

⁵ <https://www.ebi.ac.uk/>

۳-۵-۳ آنالیز پروموتور ژن‌های SAM

جهت شناسایی نواحی تنظیمی در ناحیه پروموتور، یک ناحیه ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی بالادست ژن‌های SAM به عنوان ناحیه پروموتوری مورد بررسی قرار گرفت. توالی ناحیه پروموتوری با استفاده از برنامه PlantCARE مورد آنالیز قرار گرفت و نواحی تنظیمی درگیر در پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

۳-۵-۴ برهمکنش پروتئینی

برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌های SAM بر اساس اورتولوگ‌های آن‌ها در گیاه مدل آرابیدوپسیس با استفاده از سایت STRING ترسیم شد. ژن‌های مرتبط با مسیرهای بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و سیستئین و هم-چنین مسیرهای مهم مولکولی و پیام‌رسانی با ژن‌های SAM مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۶-۱ تاثیر ملاتونین بر بیان ژن‌های SAM

۳-۶-۱-۱ انتخاب ژن‌ها

پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی، چهار ژن SAM جهت بررسی تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش سرما و تیمار ملاتونین در برگ‌های این گیاه انتخاب شدند.

۳-۶-۲ طراحی پرایمر جهت مطالعه بیان ژن‌ها

پرایمر ژن‌های SAM بر اساس ناحیه کدکننده (CDS) با استفاده از نرم افزار آنلاین Primer3 طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده سپس توسط نرم افزار Clone Manager Suit مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس

پرایمرهایی که دارای بیشترین کارایی بودند توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. اطلاعات دقیق آغازگرها در جدول ۳-۱ ارائه شده است. همچنین در این مطالعه از *Elongation Factor* به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. جدول ۳-۱ لیست ژن‌ها و خصوصیات پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق. حروف F و R بترتیب نشان‌دهنده پرایمر رفت و پرایمر برگشت می‌باشد.

Gene ID	اسم ژن	Primer (5'-3')	دما اتصال (C°)	طول محصول
<i>Solyc06g005060</i>	<i>EF</i>	F:CGTGGTTATGTTGCCTCAAA R:ACAGCAATGTGGGAAGTGTG	۶۱	۱۴۶
<i>Solyc01g094190</i>	<i>SAM1</i>	F:TGATCGAGTTTCCAGGGTTC R:CGCGGTAAACAGTTGATGAG	۶۱	۱۰۱
<i>Solyc01g101060</i>	<i>SAM2</i>	F: TGACAACGGTGCTATGGTTC R:CTTGATGACACGCTCTTTGTG	۶۱	۱۱۵
<i>Solyc04g049200</i>	<i>SAM3</i>	F: TGCAGCTTACGGTCACTTTG R: CAAGCTTTTGGCTTGAGGAC	۶۱	۷۷
<i>Solyc09g008280</i>	<i>SAM4</i>	F:AGATCACAACCAAGGCCAAG R:AGGTGAAGTGAAGCCAATGC	۶۱	۱۱۶
<i>Solyc10g083970</i>	<i>SAM5</i>	F:CATGTTTGGCTATGCCACTG R:GCCAAGAGCAAGTTCCATTC	۶۱	۷۸

۳-۷ استخراج RNA کل

۳-۷-۱ مراحل استخراج RNA کل

برای استخراج RNA کل از گیاه گوجه‌فرنگی از روش فنل داغ استفاده شد که جهت این کار بافر استخراج

تهیه و سپس RNA کل استخراج شد.

۳-۷-۱-۱ تهیه بافر استخراج

برای تهیه بافر استخراج از ترکیب، NaCl (۰/۲۵ مولار)، EDTA (۲۰ مولار)، Tris-HCl (۰/۰۵ مولار، pH= 7.5)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱٪ حجمی و پلی ونیل پرولیدن ۴٪ حجمی استفاده شد و pH محلول بر روی ۸ تنظیم و محلول موردنظر استریل شد. علاوه بر بافر استخراج محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل به نسبت ۲۴:۱ و هم‌چنین محلول فنل -کلروفرم ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۱ تهیه شد.

۳-۷-۱-۲ مراحل انجام کار

استخراج RNA به روش هات فنل به شرح زیر انجام گرفت:

- ۵۰-۱۰۰ میلی گرم بافت برگ در هاون چینی توسط نیتروژن مایع پودر گردید و به میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری انتقال داده شد.
- به هر میکروتیوب ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۷۵۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوامیل (CI) و ۳۰ میکرولیتر بتا-مرکاپتانول اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه ورتکس گردید و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند.
- سپس، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.
- مایع شفاف (فاز بالایی) به میکروتیوب Rnase-free جدید منتقل شد و به حجم برابر با آن فنل کلروفرم ایزوامیل (PCI) اضافه گردید.
- سپس، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.
- بعد از آن، فاز بالایی برداشته شد و به میزان ۰/۱ حجم آن از سدیم استات ۳ مولار و ۲/۵ برابر حجم آن الکل ۱۰۰٪ اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شد.
- سپس، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

- بعد از سانتریفیوژ سوپرناتانت دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل و ۵۰ میکرولیتر لیتیم کلراید ۱۰ مولار به نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.
- مجدد، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.
- سوپرناتانت حذف ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.
- سپس، سوپرناتانت مجدداً حذف و به مدت ۵-۱۰ دقیقه رسوب سفیدرنگ در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود.
- رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شد.

۳-۸ بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

۳-۸-۱ نانودراپ

فناوری نانودراپ با استفاده از کشش سطحی، نمونه‌های میکرو حجم را بین دو پایه نوری بدون استفاده از کووت نگه می‌دارد و اندازه‌گیری می‌کند. این دستگاه از این فناوری برای اندازه‌گیری سریع و آسان ۰/۵ تا ۲ میکرولیتر قطره پروتئینی، DNA، RNA و سایر مولکول‌های زیستی استفاده می‌کند. این قابلیت برای استفاده از مقادیر کمتری از مواد برای تجزیه و تحلیل، به‌طور فزاینده‌ای اهمیت پیدا کرده است. با این حال، سهولت استفاده، چرخه اندازه‌گیری سریع و دامنه غلظت گسترده نیز اسپکتروفتومتر را در صورت وجود مقادیر فراوان نمونه نیز مناسب می‌کند (Desjardins et al., 2009). نسبت OD_{۲۶۰} به OD_{۲۸۰} درجه خلوص RNA را مشخص می‌کند که این نسبت (A_{260/280}) تقریباً بایستی در محدوده ۲-۱/۸ باشد؛ که در صورت وجود آلودگی‌های پروتئینی این نسبت کاهش می‌یابد. نسبت OD_{۲۶۰} به OD_{۲۳۰} میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی‌ساکارید را نشان می‌دهد. در این مطالعه با استفاده از دستگاه نانودراپ Implen NanoPhotometer غلظت و کیفیت RNA استخراج شده تعیین گردید.

۳-۸-۲ الکتروفورز

ژل الکتروفورز یک روش گسترده برای جداسازی، تجزیه و تحلیل و تصفیه مولکول‌های مختلف بیولوژیکی مانند اسید دئوکسی ریبونوکلیک (DNA)، اسید ریبونوکلیک (RNA)، پلی پپتیدها، پروتئین‌ها و همچنین ذرات نانو و سایر مواد است. در ژل الکتروفورز، یک میدان الکتریکی برای حرکت مولکول‌ها از طریق ماتریس ژل اعمال می‌شود و تحرک الکتروفورتیک هر مولکول نه تنها به بار، اندازه و شکل آن، بلکه همچنین به خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماتریس ژل مانند مقدار pH، ترکیب نمک‌ها و اندازه منافذ ماتریس ژل بستگی دارد (Suh & Petrov, 2016). بدین منظور برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، ۵ ماکرولیتر از نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ دارای اتیدیوم بروماید بارگذاری شد. سپس با استفاده از دستگاه عکس‌برداری ژل، کیفیت باندها بررسی شد.

۳-۸-۲-۱ تهیه بافر TBE

محلول TBE 5X را با وزن ۵۴ گرم با تریس (FW=121.14) و ۲۷/۵ گرم اسید بوریک تهیه شد و هر دو در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ۰.۵ مولار EDTA (pH=8) را اضافه کرده و محلول را به حجم نهایی یک لیتر رساندیم. برای الکتروفورز ژل آگارز از بافر TBE با غلظت ۰/۵ (۱:۱۰) از محلول غلیظ استفاده شد.

۳-۹ سنتز cDNA

یک روش معمول برای مطالعه بیان ژن، تولید DNA مکمل (cDNA) است. در این تکنیک، مولکول‌های mRNA موجود در ارگانیسم از عصاره سلول‌ها یا بافت‌های موجود زنده جدا می‌شوند. از این مولکول‌های mRNA

خالص، با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (RT) یا DNA پلیمرازهای دارای فعالیت RT، مولکول‌های cDNA تک رشته ساخته می‌شود.

برای ساخت اولین رشته cDNA از نمونه‌های RNA مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت:

- مواد جدول ۲-۳ به میکرو تیوب واکنش افزوده شد (تمام این مراحل بر روی یخ انجام شد).
- میکرو تیوب‌ها به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند و سپس در دستگاه PCR با برنامه دمایی جدول ۳-۳ قرار گرفتند.
- cDNA ساخته شده بلافاصله به ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شد تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

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

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

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

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

۳-۱۰ بررسی cDNA و پرایمرهای مورد مطالعه

با استفاده از دستگاه PCR دمای بهینه پرایمرها برای استفاده در واکنش qRT-PCR و بررسی cDNA ارزیابی شد. محلول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز طبق جدول ۳-۴ آماده شد و همه پرایمرها مورد بررسی قرار گرفتند. چرخه دمایی واکنش PCR طبق جدول ۳-۵ انجام گرفت.

جدول ۳-۴ ترکیبات مورد نیاز در واکنش PCR

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

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

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان
Initial denaturation	۹۵	۴ دقیقه
Denaturation	۹۵	۳۰ ثانیه
Annealing	۶۱	۳۰ ثانیه
Extention	۷۲	۴۰ ثانیه
Final extention	۷۲	۶ دقیقه
	۴	Hold

۳-۱۱ واکنش qRT-PCR

تجزیه و تحلیل بیان ژن در تحقیقات بیولوژیکی بسیار مهم و محبوب است و می‌تواند با درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی زمینه بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی را فراهم کند. qRT-PCR به دلیل مزایای خاص آن از جمله حساس و دقیق بودن، به یکی از متداول‌ترین فناوری‌ها برای تجزیه و تحلیل بیان ژن در سال‌های اخیر تبدیل شده است.

در این مطالعه واکنش qRT-PCR با استفاده از SYBR Green master mix شرکت Thermo Scientific و طبق دستورالعمل آن اجرا شد (جدول ۳-۶ و ۳-۷). جهت محاسبه بیان نسبی ژن‌ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

جدول ۳-۶ ترکیبات و نسبت‌های مورد نیاز برای واکنش qRT-PCR

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

جدول ۳-۷ سیکل دمایی مورد استفاده در این مطالعه برای واکنش qRT-PCR

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

۱۲-۳ آنالیز داده‌ها

کلیه آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت. تحلیل داده‌ها و تجزیه واریانس برای صفات آنزیمی و

فیزیولوژیکی براساس طرح فاکتوریل صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی (در سطح p-

0.05 < value) انجام شد. برای داده‌های بیانی، تفاوت بیان هر ژن نسبت به شرایط کنترل (دمای نرمال)، با استفاده از آزمون t-Student صورت گرفت. همچنین از نرم‌افزار Graph Pad Prism جهت ترسیم گراف‌ها استفاده شد.

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که دما و تیمار ملاتونین بر روی صفات فیزیولوژیکی مانند فعالیت آنزیم

کاتالاز (CAT)، شاخص نشت الکترولیت (ELI)، محتوی مالون دی آلدئید (MDA) و محتوی کلروفیل کل

(Chl.T) اثرات معناداری دارد (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس برای صفات فیزیولوژیکی شامل فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، شاخص نشت الکترولیت (ELI)، محتوی مالون دی آلدئید (MDA) و محتوی کلروفیل a (Chl.a)، کلروفیل b (Chl.b)، کلروفیل کل (Chl.T) و کارتنوئید (Car.).

منابع تغییرات	درجه آزادی	صفات مورد اندازه گیری						
		Car.	Chl.T	Chl.b	Chl.a	MDA	ELI	CAT
دما	۳	۱۰۵,۴۲	۷,۰۱	۱۵,۸۲	۳,۵۳	۰,۴۵۲ **	۰,۰۲۷ *	۰,۶۵ **
ملاتونین	۲	۵,۴۴	۶۹,۲۹*	۶۱,۲۷	۰,۹۲	۰,۱۱۶ *	۰,۰۳۸ *	۰,۰۸ **
دما*ملاتونین	۶	۱۶۸,۱۵	۱۹,۸۵	۱۱,۱۳	۱,۷۰	۰,۲۲۴ **	۰,۰۱۲	۰,۳۸ **
خطا	۲۴	۵۷,۲۷	۱۷,۵۵	۲۱,۷۵	۲,۱۹	۰,۰۱۸	۰,۰۰۶	۰,۰۱
CV%	-	۱۹,۳۷	۱۱,۵۵	۹,۸۸	۱۲,۳۲	۱۴,۰۶	۹,۳۲	۱۵,۸۵

* و ** به ترتیب نشان دهنده معناداری در سطح پنج و یک درصد می باشد.

۴-۱-۱ فعالیت آنزیم کاتالاز

برای صفت میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که دما، ملاتونین و هم چنین اثر

متقابل این دو فاکتور، در سطح ۱٪ اثر معناداری روی محتوی آنزیم کاتالاز دارد (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه

میانگین برای اثر تیمار ملاتونین بر مقدار آنزیم کاتالاز حاکی از آن بود که غلظت های مختلف ملاتونین (۳۰ و

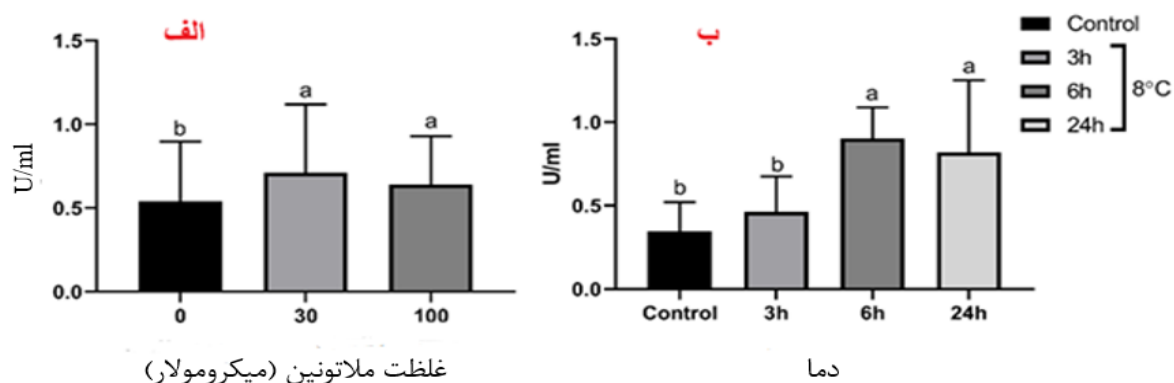
۱۰۰ میکرومولار) باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شده و این افزایش در غلظت ۳۰ میکرومولار به بیشترین

مقدار رسیده است (شکل ۴-۱ الف). هم چنین نتایج مقایسه میانگین برای اثرات دما بر میزان آنزیم کاتالاز نشان

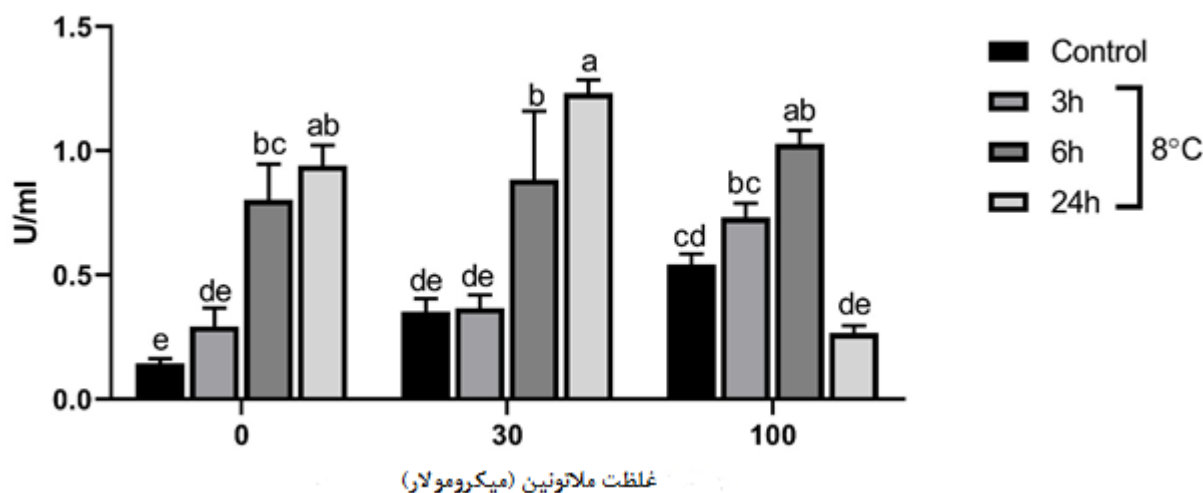
داد که با افزایش دما مقدار این آنزیم نیز افزایش پیدا می کند و بیشترین مقدار آن پس از شش ساعت تیمار تنش

سرما و کمترین مقدار آن در سه ساعت اولیه تنش سرما مشاهده شد (شکل ۴-۱ ب). از نتایج مقایسه میانگین

برای اثرات متقابل ملاتونین و دما مشخص شد که غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین همراه با شش و ۲۴ ساعت تیمار تنش سرما باعث افزایش بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز شده‌اند. اما غلظت ۱۰۰ میکرومولار نتایج متفاوتی را مشخص نمود. به طوریکه این غلظت ملاتونین همراه با تیمار سه و شش ساعت تنش سرما افزایش آنزیم کاتالاز را نشان داد اما در تیمار ۲۴ ساعت تنش سرما، مقدار آنزیم کاتالاز به کمترین مقدار رسید (شکل ۴-۲). احتمالا با تداوم سرما و کاربرد ملاتونین، گیاهان توانسته‌اند مکانیسم‌های حفاظتی خود را ارتقا دهند و در نتیجه میزان ROSها کاهش یافته و این منجر به کاهش فعالیت کاتالاز شده است.



شکل ۴-۱- اثرات تیمار با ملاتونین (الف) و تنش دمایی (ب) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۰.۵٪) بین تیمارها است.



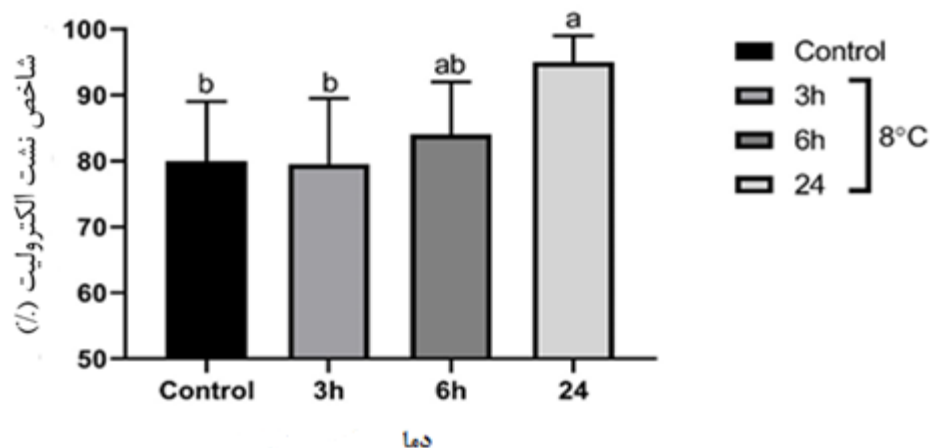
شکل ۴-۲- اثرات متقابل دما و ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.

تنش غیرزیستی باعث عدم تعادل بین تولید ROS و مهار آن‌ها می‌شود و منجر به استرس اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود (Hussain et al., 2018). این عدم مهار ROS منجر به تجمع بیش از حد ROS در سلول‌های گیاهی و در نتیجه اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون غشاهای چربی و آسیب به مواد ژنتیکی می‌شود. به دلیل اثرات مضر ROS، سلول‌ها مجبور شده‌اند از مکانیسم‌های مختلف و موثر سم‌زدایی متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده کنند. یکی از این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی معروف کاتالاز (CAT) است که برای محافظت از گیاهان در برابر فشارهای غیرزیستی تجمع می‌یابد (Dreyer & Dietz, 2018; Wang et al., 2020)، و با کاهش H_2O_2 به H_2O و H_2O_2 را از بین می‌برد. همچنین مشخص شده است که در گیاهان تحت تنش غیرزیستی، ملاتونین آنزیم‌های مهار کننده H_2O_2 مانند CAT، POD و APX را افزایش می‌دهد (C. Li et al., 2015). این فعالیت افزایش‌یافته آنزیم‌های فوق‌الذکر منجر به کاهش H_2O_2 در سلول‌های گیاهی می‌شود که نشان‌دهنده درگیری مستقیم ملاتونین در مهار H_2O_2 است که توسط دستگاه‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در سلول‌ها (ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز) انجام می‌شود (Galano et al., 2013; C. Li et al., 2015). نتایج تحقیق ما نشان داد که غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین در هنگام تنش سرما منجر به افزایش محتوی

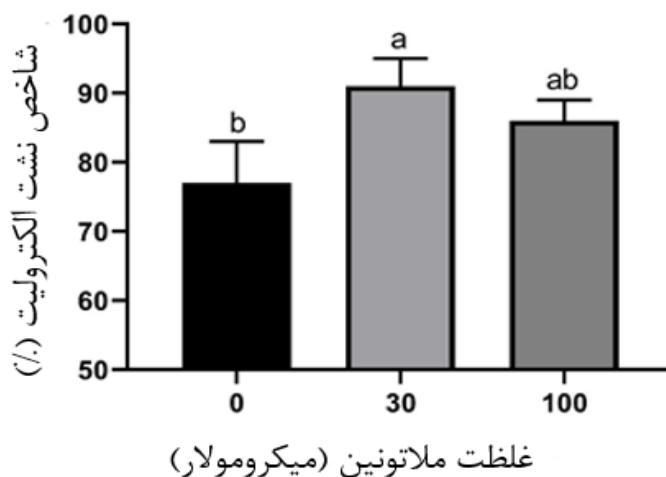
آنزیم کاتالاز می‌شود و بیشترین مقدار این آنزیم در تیمار ۲۴ ساعت تنش سرما مشاهده شده است. بالعکس غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز را در تیمار شش ساعت تنش سرما نشان داد و با تداوم سرما مقدار آنزیم کاتالاز کاهش پیدا کرد. این نتایج تفاوت معناداری با سطح عدم مصرف ملاتونین نشان نداد. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین می‌تواند برای گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی سمی باشد و باعث تولید اکسیدانت توسط خود گیاه شود که همراه با تداوم سرما منجر به عدم توانایی پاسخ گیاه به تنش شده و در نتیجه گیاه مقدار آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز را کاهش داده باشد. البته احتمال دیگر آنست که گیاهان توانسته‌اند با تداوم تنش کاهش دما، مکانیسم‌های حفاظتی خود را فعال کرده و میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها را کاهش داده‌اند که این خود باعث کاهش فعالیت کاتالاز شده است. همچنین احتمال دارد که گیاه از آنتی-اکسیدان‌های دیگر با تداوم تنش استفاده کرده باشد. نتایج تحقیق حاضر با تحقیق کامیاب (۲۰۲۰)، که گزارش کرد ملاتونین فعالیت آنزیم کاتالاز را تحت تنش شوری افزایش می‌دهد مطابقت دارد (Kamiab, 2020).

۴-۱-۲ شاخص نشت الکترولیت

برای صفت شاخص نشت الکترولیت (EL)، نتایج جدول تجزیه واریانس مشخص کرد، دما و ملاتونین در سطح ۵٪ بر محتوی نشت الکترولیت اثرات معناداری دارند. اما برهمکنش این دو عامل اثر معناداری نشان نداد (جدول ۴-۱). نتایج مقایسات میانگین به روش توکی برای اثرات دما بیان کرد که در تیمار ۲۴ ساعت تنش دمای پایین میزان EL افزایش پیدا کرده است و کمترین میزان آن در شرایط نرمال و همچنین سه ساعت پس از سرما مشاهده شد (شکل ۴-۳). همچنین اثرات ملاتونین بر میزان نشت الکترولیت نشان داد که غلظت‌های مختلف ملاتونین (۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) هر دو باعث نشت الکترولیت شده‌اند اما غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین بیشترین تاثیر را بر روی عدم پایداری غشا داشته و باعث افزایش محتوی نشت الکترولیت شده است. در حالیکه غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین مقدار نشت الکترولیت را نسبت به غلظت ۳۰ میکرومولار کاهش داده است. بین غلظت ۱۰۰ میکرومولار و شاهد (عدم کاربرد ملاتونین) تفاوت معناداری مشاهده نشد (شکل ۴-۴).



شکل ۳-۴- اثرات کاهش دما بر درصد نشت الکترولیت در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.



شکل ۴-۴- اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر درصد نشت الکترولیت در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.

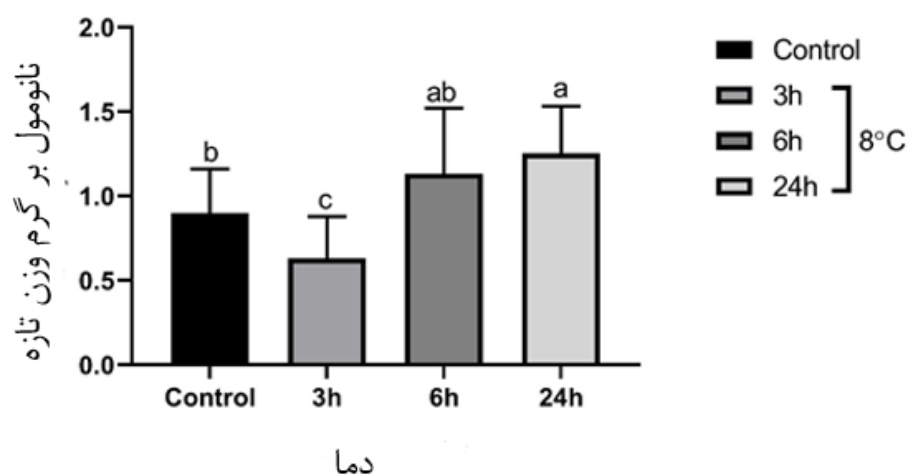
ثبات غشای سلولی یا نشت الکترولیت به عنوان شاخص آسیب سلولی ناشی از تنش‌های غیرزیستی شناخته شده است (Siddiqui et al., 2019). عوامل تنش‌زا به طور قابل توجهی بر ترکیب غشا تاثیر می‌گذارند، زیرا غشاها به عنوان حسگرهای اولیه دما عمل می‌کنند و نفوذپذیری انتخابی غشا را در برابر یون‌ها و سایر مولکول‌ها حفظ می‌کنند. در شرایط تنش، القای شدید سیستم‌های مولد ROS یا مهار ضعیف ROS می‌تواند به

بسیاری از ترکیبات سلولی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه بزند (Hu et al., 2006; Taşgın et al., 2016). صدمات ناشی از ROS با تغییر ساختمان غشا، نفوذپذیری نسبی غشا سلول را افزایش و منجر به نشت الکترولیت می‌شود. گیاهان می‌توانند با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش‌ها مقاومت کنند. با این حال، وقتی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ناکافی است، می‌توان مقاومت آن‌ها را از طریق استفاده برون‌زا از برخی ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی افزایش داد (Afreen et al., 2006; Kaya & Doganlar, 2016). یکی از این ترکیبات که برای افزایش مقاومت در برابر تنش از طریق برون‌زا استفاده می‌شود، ملاتونین است. ملاتونین نقش اساسی در تنظیم میزان ROS در گیاهان بازی می‌کند (Marino B Arnao & Hernández-Ruiz, 2019b; Marino Bañón Arnao & Hernández-Ruiz, 2019). در تحقیق حاضر، تنش دمایی پایین منجر به افزایش نشت الکترولیت گردید (شکل ۴-۳). در حقیقت سرما موجب افزایش آسیب به غشا سلولی شده و محتویات درونی سلول، به خارج از سلول هدایت شده‌اند. در آزمایشات مختلف مانند تحقیق هان و همکاران (۲۰۱۷)، نیز گیاهچه‌های برنج را با غلظت‌های ۲۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تیمار کردند و نتایج به‌دست آمده از نشت الکترولیت بافت‌های برگ برنج حاکی از آن بود که محتوی EL در پاسخ به تیمار سرما به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد، در حالی که پیش تیمار ملاتونین شاخص EL را کاهش داده بود (Han et al, 2017). نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده در تحقیقات مورد مطالعه دیگر متفاوت است که می‌تواند با توجه به نوع گیاه، ژنوتیپ گیاه، سن گیاه و عوامل محیطی دیگر اثرات متفاوتی بگذارد. احتمال دارد غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش اثرات سمیت بر روی گیاهچه گوجه‌فرنگی داشته باشند به همین دلیل استفاده از غلظت‌های ۳۰ و بیشتر از ۳۰ میکرومولار بصورت اسپری پاشی برای گوجه‌فرنگی رقم Moneymaker توصیه نمی‌شود.

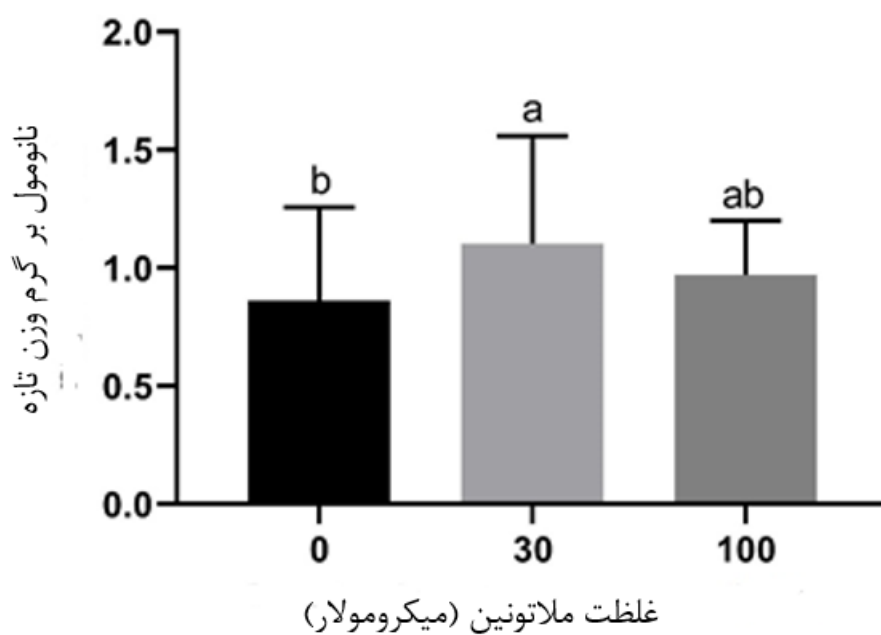
۴-۱-۳ شاخص مالون دی‌آلدهید (MDA)

نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفت شاخص مالون دی‌آلدهید نشان داد که تیمار کاهش دما در سطح ۱٪ و تیمار ملاتونین در سطح ۵٪ بر محتوی مالون دی‌آلدهید اثرات معناداری دارند. همچنین برهمکنش این دو

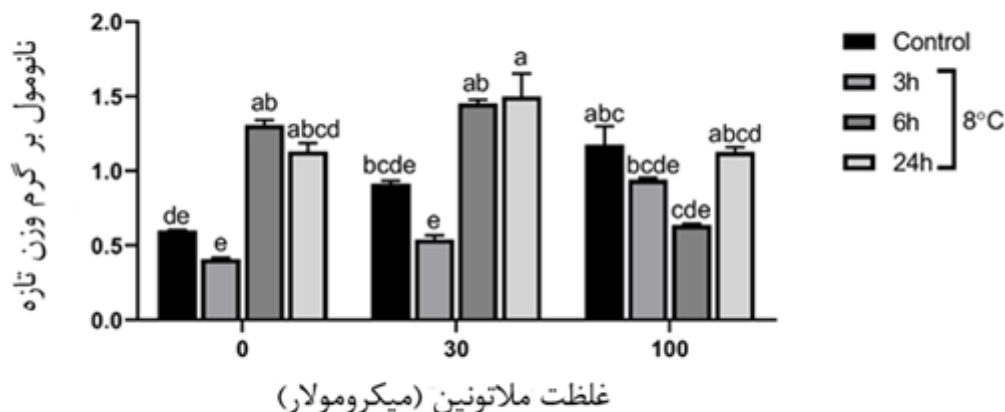
عامل نیز در سطح ۱٪ اثرات معناداری نشان داد (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه میانگین برای اثرات دما بر میزان MDA گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مشخص کرد که بیشترین مقدار MDA در ۲۴ ساعت پس از تنش سرما رخ می‌دهد و کمترین مقدار آن در سه ساعت پس از تنش سرما نمایان شد که اثرات معناداری در سطح ۵٪ با تیمار شاهد نشان دادند. (شکل ۴-۵). همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها برای اثرات ملاتونین نشان داد که غلظت ۳۰ میکرومولار، بیشترین تاثیر را بر روی پراکسیداسیون لیپید غشا داشته است و اثر معناداری با تیمار شاهد دارد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث کاهش محتوی مالون دی آلدئید شده است. هرچند بین غلظت ۱۰۰ میکرومولار و شاهد (عدم کاربرد ملاتونین) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴-۶). علاوه بر این، نتایج مقایسه میانگین برای اثرات متقابل دما و ملاتونین نتایج متفاوتی را مشخص نمود. با توجه به اهمیت اثرات متقابل، نتایج این بخش بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. در این تحقیق غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین همراه با تیمار شش و ۲۴ ساعت تنش سرما بیشترین مقدار محتوی MDA را نشان دادند و غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین مقدار محتوی MDA را نسبت به غلظت ۳۰ میکرومولار کاهش داده است. (شکل ۴-۷). نتایج این تحقیق نشان داد که در ساعت اولیه تنش کاهش دما، غلظت ۳۰ ملاتونین سبب کاهش MDA اما غلظت ۱۰۰ میکرومولار پس از شش ساعت تنش کاهش دما، سبب کاهش MDA می‌شود.



شکل ۴-۵- اثرات دما بر محتوی MDA در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.



شکل ۴-۶- اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر میزان محتوی MDA در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.



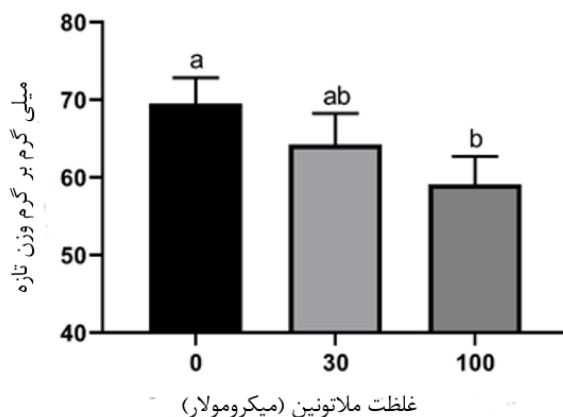
شکل ۴-۷- اثرات متقابل دما و ملاتونین بر میزان محتوی MDA در گیاهچه های گوجه فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشاندهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.

تنش های غیرزیستی مختلف از جمله دمای پایین، با فعال سازی آنزیم های مختلف مانند فسفولیپازها باعث تخریب لیپیدهای غشائی می شود. یکی از آسیب های سلولی مهم که به دلیل قرار گرفتن در معرض تنش، در نتیجه افزایش تجمع ROS روی گیاهان مشاهده شده است، پراکسیداسیون لیپید غشا است (Kaya & Doganlar, 2019). مالون دی آلدئید یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و یک نشانگر زیستی قابل اطمینان برای آسیب سلول به گیاهان تحت تنش محسوب می شود (Gill & Tuteja, 2010). همچنین ملاتونین یک آنتی اکسیدان قوی با ظرفیت بالای مهار ROS است و باعث کاهش تجمع محصولات اکسیداسیون در گیاهان تحت تنش های مختلف غیر زیستی می شود (Sharma & Zheng, 2019). در این تحقیق نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تنش سرما (بدون کاربرد ملاتونین) محتوی MDA افزایش می یابد. نتایج متفاوت کاربرد ملاتونین حاکی از آن بود که در شرایط تنش غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین با افزایش مدت زمان سرما بیشترین مقدار MDA را نشان داد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین مقدار کمتری از MDA را نشان داد و

کمترین مقدار MDA در این غلظت پس از تیمار شش ساعت دمای پایین مشاهده شد. با توجه به این نتایج مشخص شد غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین تاثیری بر حفظ محتوی MDA ندارد. در حالیکه غلظت ۱۰۰ میکرو-مولار مانع پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی می‌شود. در نتیجه از آسیب یا مرگ سلول نیز جلوگیری می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد ملاتونین مولکولی وابسته به دز است که در دزهای مختلف عملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهد. مشابه یافته‌های ماکوی و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش دادند که سطح MDA در نهال گندم در معرض خشکسالی افزایش یافته و تیمار ملاتونین برونزا میزان MDA را کاهش می‌دهد. کاهش محتوای MDA به دلیل کاربرد ملاتونین می‌تواند با از بین بردن اثر منفی تنش توسط ملاتونین و افزایش تحمل تنش گیاهان توسط ملاتونین همراه باشد (Kaya & Doganlar, 2019).

۴-۱-۴ محتوی کلروفیل و کارتنوئید

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که دما و ملاتونین بر روی محتوی کلروفیل و کارتنوئید اثرات معناداری ایجاد نمی‌کند. هرچند اثرات ملاتونین به تنهایی بر روی محتوی کلروفیل کل در سطح ۵٪ معنادار شد (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه میانگین برای اثرات ملاتونین بر روی محتوی کلروفیل کل نشان داد که با افزایش ملاتونین مقدار کلروفیل کاهش معناداری نسبت به شاهد (عدم کاربرد ملاتونین) دارد (شکل ۴-۸). غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین هرچند که باعث کاهش کلروفیل کل شد ولی تفاوت معناداری نسبت به شاهد ایجاد نکرد.



شکل ۴-۸- اثرات ملاتونین در غلظت‌های مختلف بر محتوی کلروفیل کل در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی. حروف متفاوت بر روی میزان انحراف معیار نشان‌دهنده اختلاف معنادار (سطح ۵٪) بین تیمارها است.

در گیاهان، فتوسنتز یکی از مهم‌ترین فرآیندهای اصلی فیزیولوژیکی است که رشد و نمو گیاه را تعیین می‌کند و مسئول تولید ماده خشک است. مانند سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، روند فتوسنتز تحت تأثیر تنش‌های مختلف محیطی قرار می‌گیرد. محتوی کلروفیل به عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی پذیرفته شده است. ملاتونین از دستگاه فتوسنتز در برابر اثرات مخرب خشکسالی محافظت می‌کند و در نتیجه کارایی فتوسنتز گیاهان را بازیابی می‌کند (Liang et al., 2018). ملاتونین از تخریب مولکول کلروفیل در هنگام تنش غیرزیستی جلوگیری می‌کند و فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه ای را بهبود می‌بخشد (Karaca & Cekic, 2019; Liang et al., 2018). تخریب کلروفیل توسط آنزیم‌هایی مانند، کلروفیلاز (کلاز)، فنوفیتیناز (PPH) و پراکسیداز تجزیه کننده کلروفیل (Chl-PRX) کاتالیز می‌شود (Ma et al., 2018). کاهش تخریب کلروفیل پس از تیمار با ملاتونین به دلیل بیان کم ژن‌ها از جمله *Chlase*، *PPH* و *Chl-PRX* است (Ma et al., 2018). علاوه بر این، ملاتونین هم‌چنین محتوی رنگدانه‌های جانبی فتوسنتزی مانند کاروتنوئیدها را تحت تنش غیرزیستی بازیابی می‌کند (Liang et al., 2019). آنزیم دیگری به نام pheophorbide-a-اکسیژناز (PAO)، در متابولیسم کلروفیل نقش دارد. ملاتونین سطح رونوشت PAO را کاهش می‌دهد و در

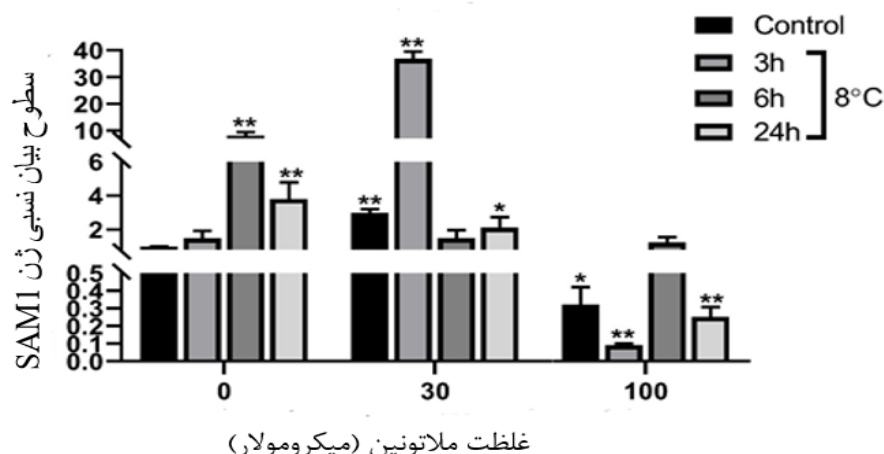
نتیجه از سرعت تخریب کلروفیل در شرایط تنش کاهش می‌یابد (Wang et al., 2013). مطالعات قبلی نقش ملاتونین را در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط تحت استرس سرما نشان داده‌اند. به عنوان مثال ملاتونین برون‌زا ممکن است با افزایش جذب کربن فتوسنتزی، که حداقل تا حدی به افزایش بیان *SlSBP* و فعالیت *SBPase* نسبت داده می‌شود، به تحمل سرما در گیاهان گوجه‌فرنگی کمک کند (Li et al., 2016). کاروتنوئیدها ترکیباتی هستند که از طریق حذف ROS یا سرکوب پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانی دارند. در تحقیق حاضر غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین باعث کاهش کلروفیل کل شد ولی تفاوت معناداری نسبت به شاهد ایجاد نکرد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهند استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین می‌تواند باعث تجزیه کلروفیل یا کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی شود و در نتیجه این حالت می‌تواند باعث کاهش رشد گیاه شود. لذا توصیه می‌شود که از غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین برای گوجه‌فرنگی رقم Moneymaker استفاده نشود. در مطالعات قبلی دینگ و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش داد که استفاده از ملاتونین به حفظ سطح نرمال تر کلروفیل در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما منجر می‌شود (Ding et al., 2017). هرچند که نتایج متفاوتی در تحقیقات گذشته مشاهده شد ولی مطالعه حاضر متفاوت از این نتایج بود که این نیز می‌تواند به علت رقم مورد استفاده، سن گیاهچه غلظت بکار رفته و عوامل تاثیر گذار دیگر باشد.

۴-۲ بررسی بیان ژن‌های *SAM*

۴-۲-۱ سطوح بیان ژن *SAM1*

بررسی الگوی بیانی برای ژن *SAM1* نشان داد که تنش سرما پس از گذشت شش ساعت اثر افزایش بیان بر روی بیان این ژن گذاشته و زمان‌های شش و ۲۴ ساعت توانستند بیان ژن را ارتقا بدهند. اما بیشترین میزان افزایش پس از شش ساعت تنش سرما مشاهده شد (شکل ۴-۹). اعمال تیمار ملاتونین در غلظت ۳۰ میکرومولار در نبود سرما، افزایش بیان ژن *SAM1* را القا کرد و بالعکس افزایش غلظت ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار) باعث

کاهش بیان این ژن شد. برهمکنش سرما و ملاتونین نتایج متفاوتی را نشان داد. در تیمارهایی که تنش سرما همراه با ملاتونین با غلظت ۳۰ میکرومولار اعمال شده بود بیان ژن *SAM1* افزایش پیدا کرد و این افزایش در سه ساعت اول بیشترین مقدار را نشان داد. اما با تداوم سرما مقدار آن کاهش پیدا کرد. استفاده از ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در همه تیمارهای بکار رفته، اثر کاهشی بر روی بیان این ژن داشت (شکل ۴-۹).

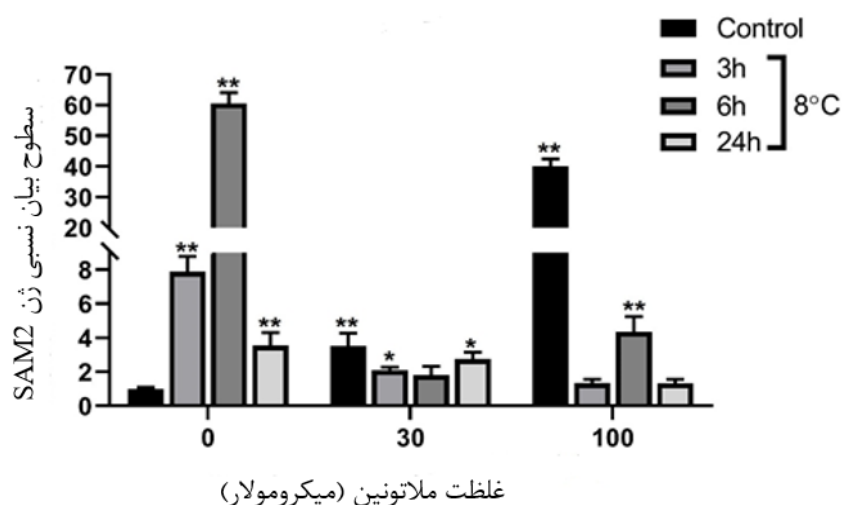


شکل ۴-۹- سطوح بیان ژن *SAM1* تحت تیمار ملاتونین و تنش دمای پایین در گیاهچه گوجه‌فرنگی. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح پنج و یک درصد با نمونه شاهد می‌باشد.

۴-۲-۲ سطوح بیان ژن SAM2

الگوی بیانی ژن *SAM2* نشان داد که تنش سرما اثر افزایشی بر روی بیان ژن *SAM2* داشته و بیشترین مقدار بیان پس از گذشت شش ساعت مشاهده شد. همچنین نتیجه بدست آمده از بیان ژن *SAM2* در تیمار شاهد (دمای نرمال و بدون استفاده از ملاتونین)، مشخص کرد به کاربرد ملاتونین با غلظت‌های مختلف (۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بیان این ژن را افزایش داده است (شکل ۴-۱۰). غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط بدون تنش سرما، بیشترین افزایش بیان را نشان داد که ۴۰ برابر تیمار شاهد بود. همچنین بین تیمار دمایی و کاربرد ملاتونین برهمکنش‌های معناداری مشاهده شد و بیشترین بیان ژن *SAM2* در کاربرد ملاتونین ۱۰۰ میکرومولار

و پس از شش ساعت در دمای پایین رخ داد. در کل می‌توان نتیجه گرفت که ملاتونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، اثراتی تقریباً بیشتر نسبت به ملاتونین ۳۰ میکرومولار بر بیان این ژن داشته است (شکل ۴-۱۰). در کل می‌توان بیان داشت بیان ژن SAM2 بیشتر تحت تنش سرما افزایش می‌یابد.

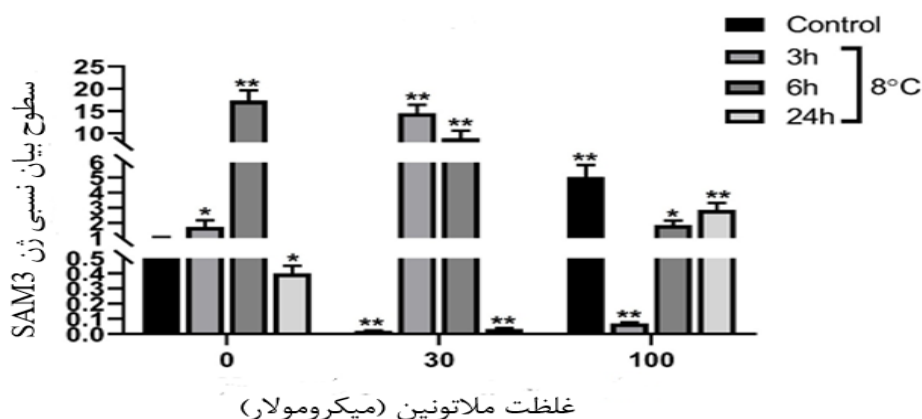


شکل ۴-۱۰- سطوح بیان ژن SAM2 تحت تیمار ملاتونین و تنش دمای پایین در گیاهچه گوجه‌فرنگی. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح پنج و یک درصد با نمونه شاهد می‌باشد.

۴-۲-۳ سطوح بیان ژن SAM3

در گیاهچه‌هایی که تحت تنش سرما و بدون تیمار ملاتونین قرار گرفته بودند، تداوم سرما بیان ژن SAM3 را افزایش داد و بیشترین مقدار بیان این ژن شش ساعت پس از تنش سرما و تقریباً ۱۵ برابر تیمار شاهد مشاهده گردید. هم‌چنین مشخص شد تداوم سرما اثر کاهشی بر روی بیان این ژن دارد (شکل ۴-۱۱). در نبود سرما، غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین اثر کاهشی بر روی بیان این ژن داشته ولی افزایش غلظت ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار) بیان این ژن را تحریک کرده است. برهم‌کنش ملاتونین و سرما متفاوت بود و زمانی که گیاهچه‌های

تحت تنش سرما را با غلظت‌های ۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تیمار شدند، ملاتونین روی بیان این ژن اثر گذاشته و باعث افزایش بیان ژن *SAM3* شد و بیشترین مقدار بیان آن در غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد. در این غلظت در سه ساعت اولیه برداشت و زمانی که گیاه در اوایل تنش سرما قرار داشت بیان این ژن افزایش نشان داد، اما با افزایش زمان سرما (۲۴ ساعت)، ملاتونین نتوانست اثری بر روی افزایش این ژن داشته باشد و بیان ژن *SAM3* کاهش پیدا کرد. بالعکس زمانی که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین را همراه با سرما به کار بردیم ملاتونین در ابتدا منجر به کاهش بیان این ژن شد اما با تداوم سرما بر روی بیان این ژن اثر افزایشی داشته است (شکل ۴-۱۱).

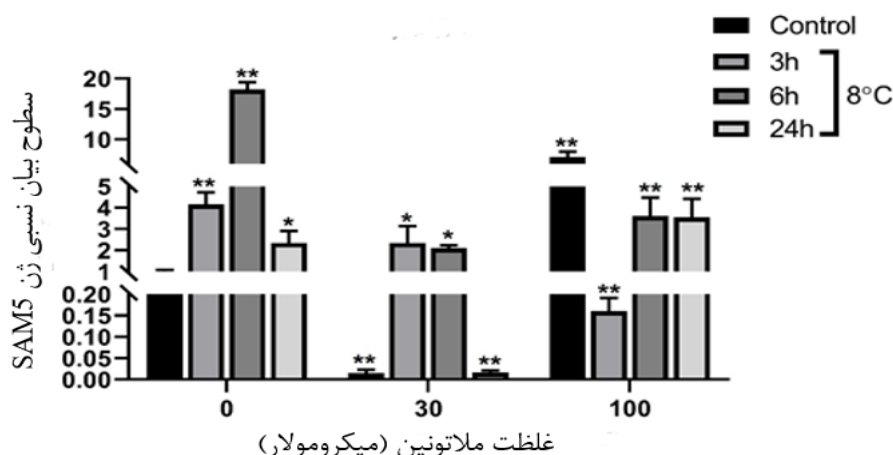


شکل ۴-۱۱- سطوح بیان ژن *SAM3* تحت تیمار ملاتونین و تنش دمای پایین در گیاهچه گوجه‌فرنگی. * و ** به ترتیب نشان-دهنده تفاوت معناداری در سطح پنج و یک درصد با نمونه شاهد می‌باشد.

۴-۲-۴ سطوح بیان ژن *SAM5*

بررسی الگوی بیانی ژن *SAM5* نشان داد که تنش سرما بیان ژن *SAM5* را القا کرده و اثر افزایشی بر روی بیان این ژن داشته است. بیشترین بیان این ژن در زمان تنش سرما پس از گذشت شش ساعت مشاهده شد که تقریباً ۲۰ برابر تیمار شاهد بود. استفاده از تیمار ملاتونین اثرات متفاوتی را نشان داد (شکل ۴-۱۲). تحت شرایط دمای نرمال (۲۵ درجه سانتی‌گراد)، غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین اثر کاهشی بر روی بیان ژن *SAM5* داشته و

غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در سه و شش ساعت پس از گذشت تنش سرما منجر به افزایش بیان ژن *SAM5* شد. اما تداوم سرما اثر کاهشی بر روی بیان این ژن گذاشته است. اثر متقابل سرما و غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در ابتدا منجر به کاهش بیان این ژن شد و اثر کاهشی روی بیان آن داشت اما با افزایش مدت زمان سرما میزان بیان ژن *SAM5* افزایش پیدا کرد (شکل ۴-۱۲).



شکل ۴-۱۲- سطوح بیان ژن *SAM5* تحت تیمار ملاتونین و تنش دمای پایین در گیاهچه گوجه‌فرنگی. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح پنج و یک درصد با نمونه شاهد می‌باشد.

ژن‌های *SAM* در پاسخ به تنش سرما درگیر بودند:

الگوی بیان اعضای یک خانواده ژنی می‌تواند جنبه‌هایی از عملکرد آن‌ها را تحت شرایط مختلف بیولوژیکی نشان بدهد. ژن‌های خانواده *SAM* در مسیرهای مختلفی مانند اتیلن (در گیاهان)، نیکوتین آمین و مسیرهای بیوسنتز پلی آمین، ترانس سولفوراسیون، مسیر متابولیسم متیونین (Sauter et al., 2016; Y. Chen et al., 2013)، مشارکت در بیوسنتز لیگنین و پاسخ به تنش‌های محیطی و به عنوان اهدا کننده گروه متیل در بسیاری از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و مولکول‌های کوچک درگیر هستند اما کارهای محدودی در زمینه این خانواده کوچک ژن صورت گرفته است. نتایج بیان این ژن تحت تنش دمای پایین و کاربرد ملاتونین

نشان داد که این ژن‌ها تفاوت‌هایی در پاسخ به محرک‌های بیرونی دارند (Heidari et al., 2020). به طوری‌که ژن‌های *SAM2* و *SAM5* در کاربرد بیشتر ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار) دارای بیشترین بیان بودند. اما غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین اثرات بارزتری بر بیان ژن‌های *SAM1* و *SAM3* گذاشت. ملاتونین به عنوان یک تنظیم کننده رشد در گیاهان شناخته شده است و همچنین در گیاهانی که در شرایط نامساعد محیطی مانند سرما رشد می کنند تحمل تنش را افزایش می‌دهد (Campos et al., 2019; Zhao et al., 2019). این مولکول‌ها همچنین نقش مهمی در ایجاد مقاومت در گیاهان در حال رشد تحت تنش‌های غیرزنده‌ای مانند فلزات سنگین، دما، سموم دفع آفات و خشکسالی دارند (Tanveer et al., 2018). ملاتونین بر فرآیندهایی مانند تقویت رشد، القای ریشه‌زایی، تروپیسم، ترویج جوانه‌زنی بذر و فتوسنتز تأثیر می‌گذارد (Marino B Arnao & Hernández-Ruiz, 2019a). همچنین فرآیندهای دیگر، مانند رسیدن یا پیری، ساعت بیولوژیکی داخلی و پارتنوکاری را تنظیم می‌کند (Kohli et al., 2017). نتایج تحقیق حاضر نیز از اثر این ترکیب بر روی بیان ژن‌های *SAM* داشت. لذا احتمال دارد این ترکیب بر روی مسیرهای پایین دست *SAM* اثرات مستقیم و غیر مستقیمی داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تنش دمای پایین بر بیان ژن‌های *SAM* تأثیر گذار است. به طوریکه با اعمال تنش سرما ژن‌های *SAM* افزایش بیان نشان دادند و بیان آن‌ها در مدت زمان شش ساعت تنش سرما بیشترین مقدار را دارا بود، به جز ژن *SAM3* که در تیمار ۲۴ ساعت تنش سرما کاهش بیان را نشان داد. ژن *SAM2* نشان داد که بیشترین تأثیر را بر تنش سرما دارد، به طوریکه پس از شش ساعت به بیشترین بیان خود رسید. این ژن می‌تواند در کارهای مولکولی در زمینه افزایش مقاومت به سرما در کارهای اصلاحی آینده مورد توجه قرار بگیرد. بیان ژن‌های *SAM* تحت تنش‌های غیرزیستی نیز در کارهای گذشته حاکی از نقش بارز این ژن‌ها دارد. به طوریکه نتایج تحقیق حاضر با نتایج پول و همکارانش (۲۰۰۹)، که اعلام کردند بیان ژن‌های *SAM* در گیاه جینسینگ، تحت تنش‌های مختلف غیرزیستی شامل تنش شوری، اسیدسالیسیلیک، اسید آسزیک و تنش دمای پایین در زمان‌های مختلف طی ۲-۷۲ ساعت پس از تیمار به طور قابل توجهی افزایش یافت و ممکن است به محافظت گیاه در برابر تنش غیرزیستی کمک کند، مطابقت داشت (Pulla et al., 2009).

۳-۴ آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های SAM

با استفاده از سایت Plantcyc، ۶ ژن مربوط به آنزیم SAM، در گوجه‌فرنگی شناسایی شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن که با استفاده از ابزار ProtParam سایت EXPASY به دست آمده بود، در جدول ۲-۴ ارائه شده است. با توجه به داده‌های حاصل طول‌ترین پروتئین مربوط به ژن‌های Solyc01g101060 (SAM2) و Solyc12g099000 (SAM6) و کوتاه‌ترین پروتئین مربوط به ژن Solyc04g049200 (SAM3) بود (جدول ۲-۴). شاخص وزن مولکولی (MW) که نشانگر وزن مولکولی تمامی اسیدهای آمینه در یک توالی بر حسب کیلو دالتون است، نشان داد که Solyc04g049200 (SAM3) کمترین وزن مولکولی با ۱۰/۸۳ کیلو دالتون را دارد. نقطه ایزوالکتریک (pI)، pH ای است که در آن یک مولکول خاص هیچ بار الکتریکی خالصی ندارد و به عبارتی به لحاظ الکتریکی خنثی است. بر اساس نتایج SAM5 با ۶/۱۲ و SAM6 با ۴ بترتیب کمترین و بیشترین pI را نشان دادند. شاخص ناپایداری (Instability index) در حقیقت تخمینی کلی در مورد پایداری پروتئین مورد نظر در لوله آزمایش است. که با توجه اطلاعات به دست آمده تمامی پروتئین‌های SAM حالت پایدار دارند. شاخص آلیفاتیک (Aliphatic index) یک پروتئین به صورت حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلفا (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) تعریف می‌شود. این ممکن است به عنوان یک عامل مثبت برای افزایش قابلیت استحکام در مقابل حرارت در پروتئین‌های کروی مورد توجه قرار گیرد. این شاخص برای SAM1 بیشترین و برای SAM5 کمترین مقدار را دارا بود. بر اساس شاخص GRAVY، همه پروتئین‌های SAM بعنوان پروتئین‌های آبدوست برآورد شدند. Subcellular localization بیانگر موقعیت قرار گرفتن پروتئین‌ها در سلول است. نتایج نشان داد که پروتئین‌های SAM در نقاط مختلفی از سلول از جمله کلروپلاست، دستگاه گلژی و هسته پراکنده شده‌اند (جدول ۲-۴). نتایج فوق حاکی از تنوع زیاد این پروتئین‌ها دارد که نشان‌دهنده درگیر بودن آن‌ها در فعالیت‌های متفاوت سلولی است.

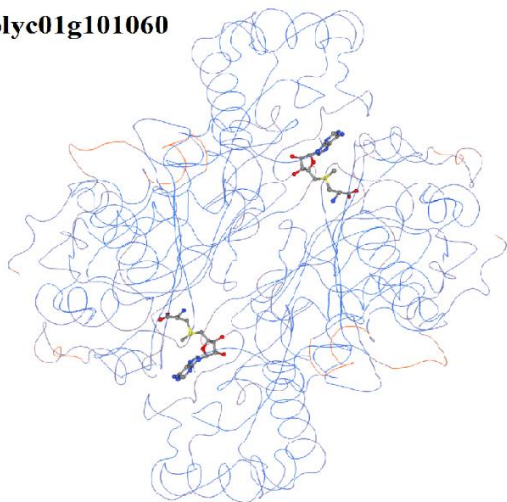
جدول ۴-۲ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ژن‌های SAM

Locus ID	Gene name	Length (aa)	MW (KDa)	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
<i>Solyc01g094190</i>	<i>SAM1</i>	324	35.56	5.98	Stable	91.76	-0.034	Golgi apparatus
<i>Solyc01g101060</i>	<i>SAM2</i>	393	43.30	5.51	Stable	82.8	-0.335	Chloroplast
<i>Solyc04g049200</i>	<i>SAM3</i>	96	10.83	5.62	Stable	90.21	-0.408	Chloroplast, Nucleus
<i>Solyc09g008280</i>	<i>SAM4</i>	390	42.65	5.76	Stable	82.95	-0.283	Chloroplast
<i>Solyc10g083970</i>	<i>SAM5</i>	390	42.66	6.12	Stable	80.97	-0.313	Chloroplast
<i>Solyc12g099000</i>	<i>SAM6</i>	393	43.08	5.41	Stable	84.05	-0.311	Chloroplast

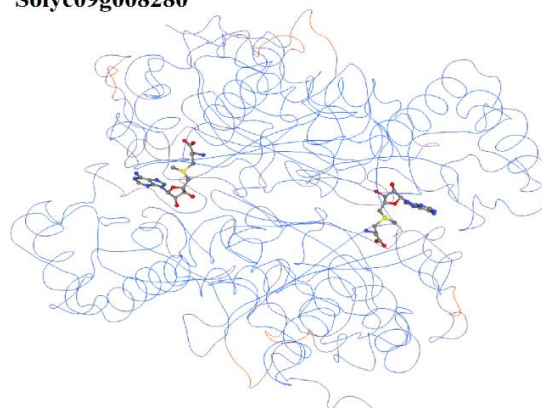
۴-۳-۱ برآورد ساختار سه بعدی پروتئین‌های SAM

نتایج پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین‌های SAM نشان داد که چهار پروتئین SAM دارای نواحی برهمکنش با یون‌ها می‌باشند. هم‌چنین ناحیه برهمکنش S-Adenosyl methionine در ساختار آن‌ها نیز مشاهده شد (شکل ۴-۱۳). پیش‌بینی نواحی برهمکنش نقش مهمی در تعیین عملکرد پروتئین‌ها دارد و امکان برآورد نواحی درگیر و برهمکنش این پروتئین در سایر پروتئین‌ها وجود دارد (Heidari et al., 2020). نقش مهم SAM ها در مسیرهای مهم سلولی و درگیر بودن در چند مسیر بیوسنتزی (از جمله اتیلن در گیاهان، نیکوتین آمین و مسیرهای بیوسنتز پلی آمین، ترانس سولفوراسیون و مسیر متابولیسم متیونین)، مشخص شده است (Chen et al., 2016; Sauter et al., 2013). وجود این نواحی برهمکنش و مطالعه بیشتر ساختار پروتئین‌ها در مهندسی مسیرهای درگیر مفید است.

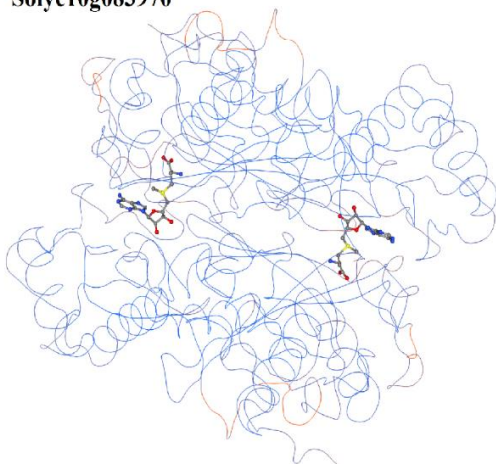
Solyc01g101060



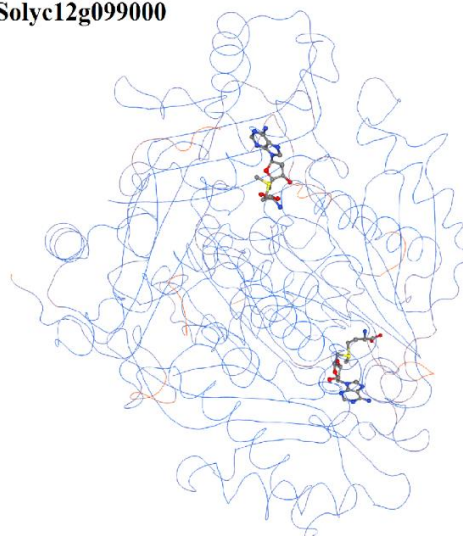
Solyc09g008280



Solyc10g083970



Solyc12g099000



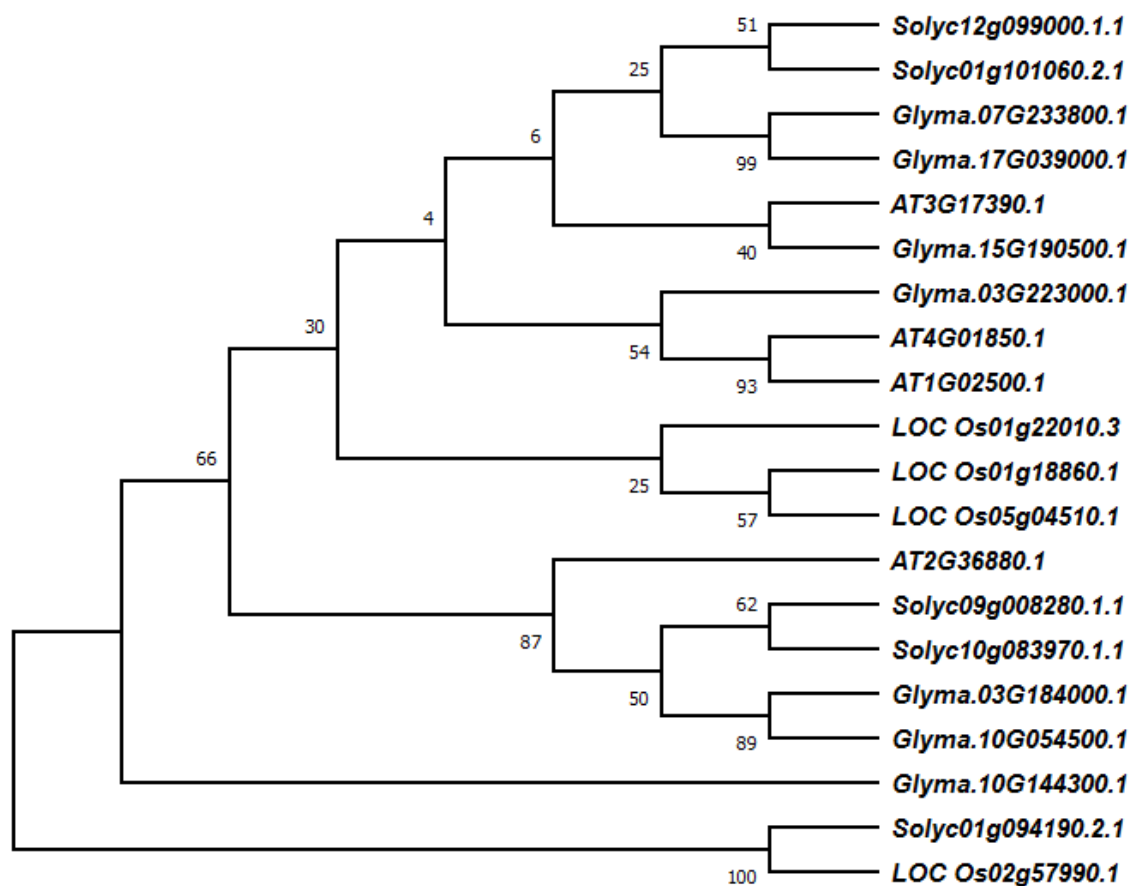
شکل ۴-۱۳- ساختار سه بعدی پیش بینی شده و نقاط برهمکنشی برای پروتئین‌های SAM

۴-۴ روابط فیلوژنتیکی ژن‌های SAM

نتایج فیلوژنتیکی برای ژن‌های SAM با سایر اورتولوگ‌های آن در گیاهانی هم‌چون آرابیدوپسیس، برنج و

سویا نشان داد که ژن‌های SAM در گیاه گوجه‌فرنگی بیشترین شباهت را به ژن‌های SAM گیاه سویا دارند (شکل

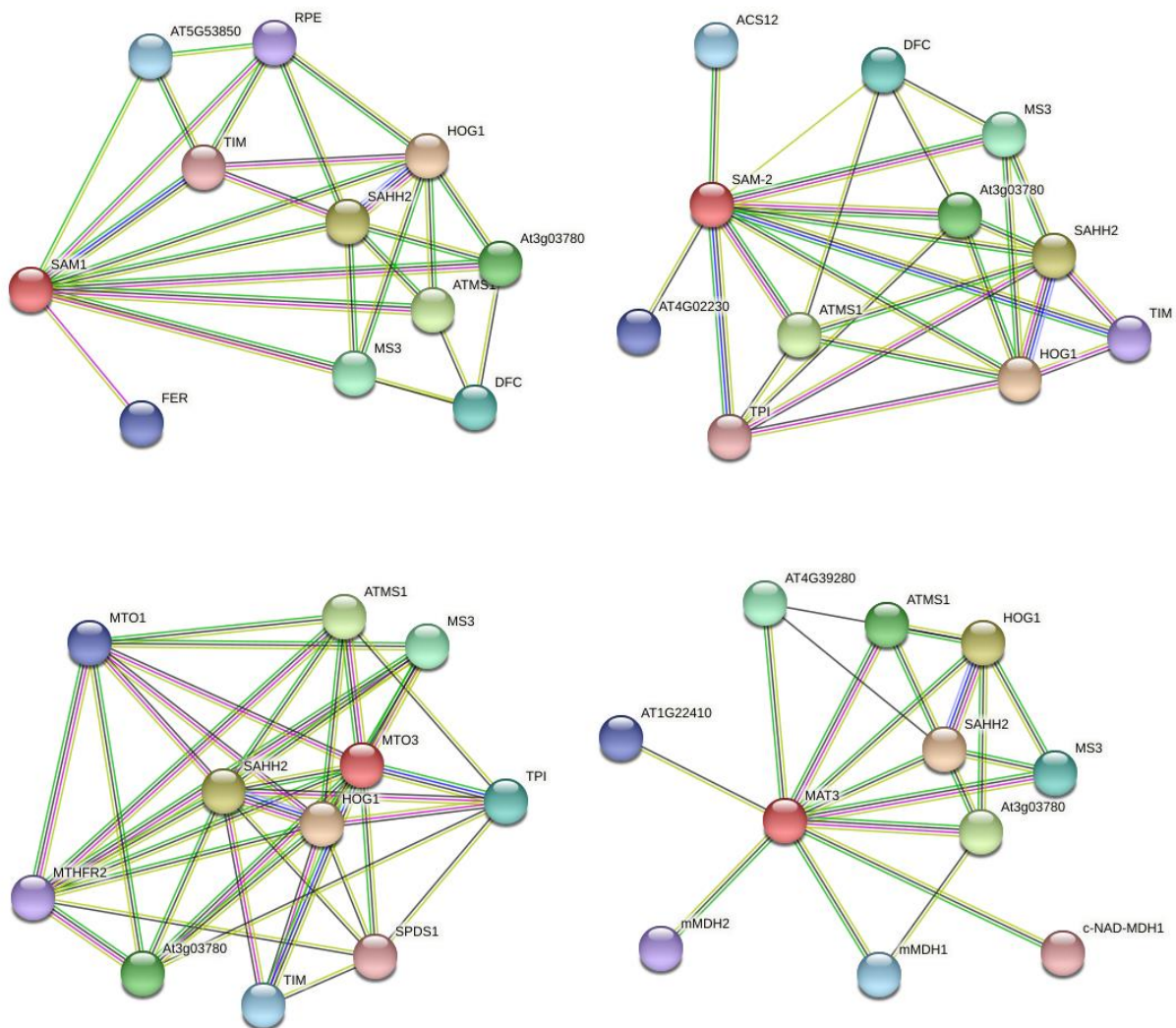
۴-۱۴). براساس درخت فیلوژنی، ژن‌های *SAM* دارای تفاوت‌های ساختاری با یکدیگر هستند. این تفاوت ساختاری بر عملکرد آن‌ها اثر می‌گذارد.



شکل ۴-۱۴- روابط فیلوژنتیکی ژن‌های *SAM* در گیاهان گوجه فرنگی (با *soly* شروع شده اند)، سویا (با *Glyma* شروع شده اند)، آرابیدوپسیس (با *AT* شروع شده اند) و برنج (با *LOC* شروع شده اند).

۴-۵ شبکه برهمکنشی ژن‌های *SAM*

برهمکنش پروتئین-پروتئین ژنهای SAM بر اساس اورتولوگهای آنها در گیاه مدل آرابیدوپسیس ترسیم شد (شکل ۴-۱۵). نتایج نشان داد که تعدادی ژن مرتبط با مسیرهای بیوسنتز پلی آمینها و سیستمین و همچنین مسیرهای مهم مولکولی و پیام رسانی با ژنهای SAM برهمکنش دارند. همچنین نتایج نشان داد پروتئینهای H0G1 و SAHH2 با هر ۴ ژن SAM برهمکنش دارند که این پروتئینها در هیدرولاز S-آدنوزین-L-هوموسیستئین شرکت می کنند. همچنین پروتئینهای ATMS1 و MS3 که در متیل ترانسفراز، ۵-متیل تترا هیدروپترول تری گلوتامات-هوموسیستئین نقش دارند با هر ۴ ژن SAM برهمکنش نشان دادند (جدول ۴-۲). سایر پروتئینها فقط با برخی از ژنهای SAM به طور مستقیم برهمکنش داشتند و با سایر ژنها برهمکنش غیر مستقیم نشان دادند. پروتئینهایی که با ژنهای SAM1 برهمکنش نشان دادند، شامل: DFC (درگیر در سنتز فلی پلی گلوتامات)، FER (به عنوان یک پروتئین کینازهای گیرنده Malectin) و RPE (درگیر در مسیر ریبولوز-۵-فسفات-۳-پی-مراز mRNA) آرابیدوپسیس تالیانا می باشد. همچنین برهمکنش بین پروتئینهای MG1، ACS4 و SAMDC با ژن SAM2 مشاهده شد. پروتئینهای MG1 در کاتالیز متیونین گاما لیاز دخیل هستند و ACS4 در مسیر سنتز ۱-آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات وجود دارد و SAMDC در دکربوکسیله کردن S-آدنوزیل متیونین نقش دارد. همچنین mMDH1 و mMDH2 که در دهیدروژنه کردن پروتئینهای خانواده لاکتات و ملات حضور دارند با ژن MAT3 (SAM3) برهمکنش نشان دادند. ژنهای MTO1 با پروتئینهای SPDS1 که در ایزومراز تری فسفاتهای سیتوزول نقش دارند و MTHFR2 که در مسیر متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز است برهمکنش داشتند. پروتئین TIM که در ایزومراز تری فسفاتهای کلروپلاست نقش دارد با ژنهای MTO1 (SAM4) و SAM1 برهمکنش نشان داد.



شکل ۴-۱۵- برهمکنش ژن‌های اورتولوگ SAM در گیاه آرابیدوپسیس

جدول ۴-۳- لیست ژن‌های برهمکنش با اورتولوگ‌های SAM در گیاه آرابیدوپسیس

ژن برهمکنش	عملکرد	اسم ژن
<i>MTO1</i> و <i>SAM1</i> , <i>SAM2</i> , <i>MAT3</i>	S-آدنوزین-L-هوموسیستئین هیدرولاز	<i>HOG1</i>
<i>MTO1</i> و <i>SAM1</i> , <i>SAM2</i> , <i>MAT3</i>	-هوموسیستئین هیدرولاز-L-آدنوزین-S	<i>SAHH2</i>
<i>MTO1</i> و <i>SAM1</i> , <i>SAM2</i> , <i>MAT3</i>	۵-متیل تترا هیدروپترول تری گلو تامات-هوموسیستئین متیل ترانسفراز	<i>ATMS1</i>
<i>MTO1</i> و <i>SAM1</i> , <i>SAM2</i> , <i>MAT3</i>	۵-متیل تترا هیدروپترول تری گلو تامات-هوموسیستئین متیل ترانسفراز	<i>MS3</i>
<i>MTO1</i>	ایزومراز تری فسفات سیتوزولی	<i>TPI</i>
<i>SAM1</i> , <i>MTO1</i>	ایزومراز تری فسفات کلروپلاستی	<i>TIM</i>
<i>MTO1</i>	خانواده پروتئین ترانسفرازهای وابسته به پیریدوکسال فسفات	<i>MT01</i>
<i>MTO1</i>	سنتز اسپرمیدین	<i>SPDS1</i>
<i>MTO1</i>	ردوکتاز متیلن تترا هیدروفولات	<i>MTHFR2</i>
<i>MAT3</i>	خانواده پروتئین‌های لاکتات/مالات دهیدروژناز	<i>mMDH1</i>
<i>MAT3</i>	خانواده پروتئین‌های لاکتات/مالات دهیدروژناز	<i>mMDH2</i>
<i>SAM1</i>	سنتز فلی پلی گلو تامات	<i>DFC</i>
<i>SAM1</i>	خانواده پروتئین کیناز گیرنده Malectin	<i>FER</i>
<i>SAM1</i>	ریبولوز-۵-فسفات-۳-پی‌مراز mRNA آرابیدوپسیس تالیانا	<i>RPE</i>
<i>SAM2</i>	متیونین گاما لیاز	<i>MG1</i>
<i>SAM2</i>	سنتز ۱-آمینو سیکلو پروپان-۱-کربوکسیلات	<i>ACS4</i>
<i>SAM2</i>	آنزیم S-آدنوزیل متیونین دکربوکسیلاز	<i>SAMDC</i>

۴-۶ شناسایی نواحی تنظیمی در پروموتور

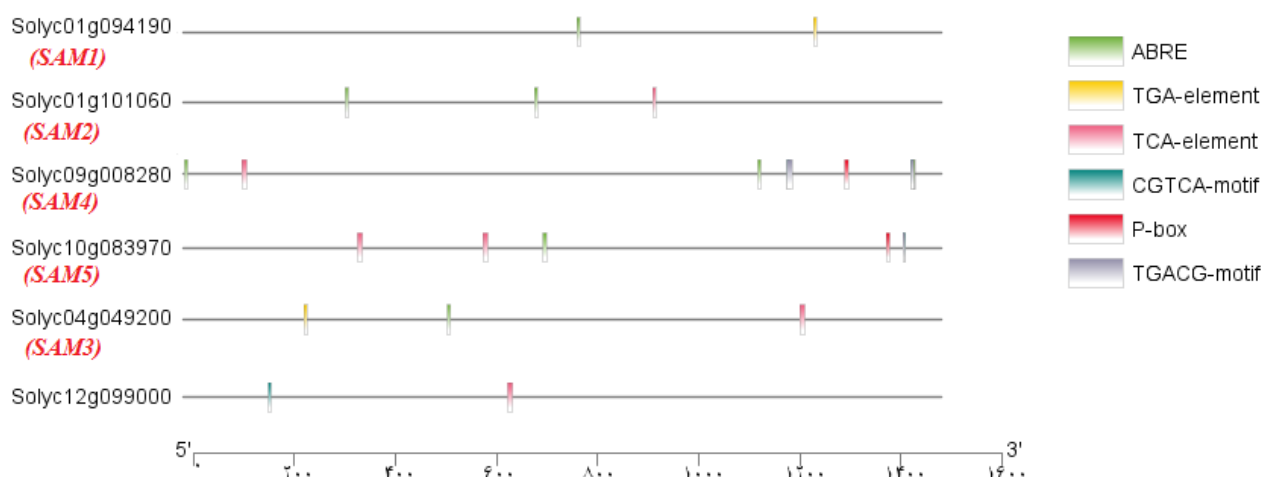
بررسی نواحی پروموتوری ژن‌های SAM نشان داد نواحی کلیدی مهمی که درگیر در پاسخ به هورمون و تنش‌های غیرزنده و زنده هستند در ناحیه بالادست ژن‌های SAM وجود دارد (جدول ۴-۳). عناصر ABRE که به عنوان یک عنصر تنظیمی مهم درگیر در پاسخ به هورمون آبسزیک اسید شناخته شده است در پروموتور همه ژن‌های SAM مشاهده شد (شکل ۴-۱۶). وجود این عنصر تنظیمی مهم در پروموتور ژن‌ها نشان‌دهنده اهمیت

این ژن‌ها در پاسخ فیتوهورمون‌ها و درگیر بودن در فرایندهای تنظیمی وابسته به هورمون است. عناصر تنظیمی *P-box* (پاسخ به جیبرلین) در پروموتور ژن‌های *SAM3*، *SAM4* و *SAM5* مشاهده شد در حالیکه عنصر تنظیمی *TGA-element* که در پاسخ به اکسین درگیر است در پروموتور ژن‌های *SAM1* و *SAM3* شناسایی شد (شکل ۴-۱۶). عناصر تنظیمی *TCA-element* (پاسخ به اکسین) در پروموتور تمامی ژن‌های *SAM* به جز ژن *SAM1* نیز مشاهده شد (شکل ۴-۱۶). عناصر *CGTCA-motif* که در پاسخ به متیل جاسمونات درگیر است در پروموتور ژن‌های *SAM* رویت شد (شکل ۴-۱۶-الف). علاوه براین عناصر *TGACG-motif* نیز در پاسخ به متیل جاسمونات درگیر هستند و در پروموتور ژن‌های *SAM4* و *SAM5* مشاهده شدند (شکل ۴-۱۶). عناصر *LTR* که در مسیرهای سیگنالینگ پاسخ به سرما درگیر است در پروموتور ژن‌های *SAM1* و *SAM2* شناسایی شد (شکل ۴-۱۷). عناصر *MBS*، به عنوان ناحیه اتصال *MYB* و همچنین در پاسخ به تنش خشکی در پروموتور ژن‌های *SAM1* و *SAM5* و عناصر *MYB* که در پاسخ به تنش خشکی درگیر است در پروموتور همه ژن‌های *SAM* مشاهده شد (شکل ۴-۱۷). عناصر *MYC* که در در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر است نیز در پروموتور همه ژن‌های *SAM* مشاهده شد (شکل ۴-۱۷). عناصر *WUN-motif* که در پاسخ به زخم و تنش‌های زیستی مشارکت می‌کنند در پروموتور ژن‌های *SAM4* و *SAM5* مشاهده شدند (شکل ۴-۱۷). عناصر *TC-rich repeats* که به طور کلی در پاسخ به تنش درگیر است در پروموتور ژن *SAM3* و *SAM5* مشاهده شد (شکل ۴-۱۷). طبق نتایج بیان و بیوانفورماتیکی، ژن *SAM2* که تحت تنش سرما بیشترین بیان را نشان داده، می‌تواند با ژن‌های *MG1*، *ACS4* و *SAMDC* برهمکنش نشان داده و احتمالاً در مسیرهای مقاومت یا افزایش مقاومت به تنش سرما درگیر باشند. همچنین با بررسی نواحی پروموتوری مشخص شد که عناصر *LTR* که در مسیرهای سیگنالینگ پاسخ به سرما درگیر است در پروموتور ژن‌های *SAM1* و *SAM2* وجود دارند (شکل ۴-۱۷). عناصر *MYC* که در در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر هستند نیز در پروموتور همه ژن‌های *SAM* مشاهده شد. عناصر *TC-rich repeats* که به طور کلی در پاسخ به تنش درگیر است در پروموتور ژن *SAM3* و *SAM5* مشاهده شد. طبق این

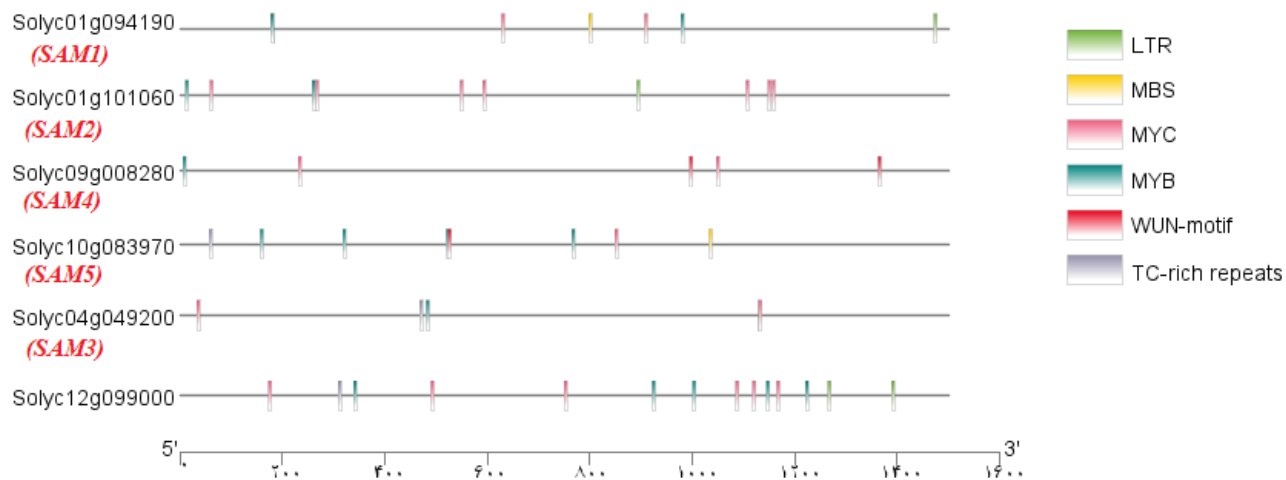
نتایج، ژن‌های SAM در گوجه‌فرنگی پتانسیل بالایی در مشارکت در فرایندهای مختلف سلولی دارند که تمرکز بر این خانواده کوچک ژنی در کارهای مولکولی مرتبط با اصلاح گوجه‌فرنگی توصیه می‌گردد.

جدول ۴-۴- لیست نواحی تنظیمی مشاهده شده در پروموتور ژن‌های SAM

نام ناحیه تنظیمی	توالی	عملکرد
ABRE	CACGTG	درگیر در پاسخ به آبسیزیک اسید
LTR	CCGAAA	درگیر در پاسخ به تنش سرما
MBS/MYB	CAACTG	ناحیه اتصال MYB و درگیر در پاسخ به خشکی
MYC	CAATTG	درگیر در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی
TGA-element	AACGAC	درگیر در پاسخ به اکسین
TCA-element	CCATCTTTT	درگیر در پاسخ به سالیسیک اسید
CGTCA-motif	CGTCA	درگیر در پاسخ به متیل جاسمونات
P-box	CCTTTTG	درگیر در پاسخ به جیبرلین
TGACG-motif	TGACG	درگیر در پاسخ به متیل جاسمونات
WUN-motif	AAATTACT	درگیر در پاسخ به زخم و تنش‌های زیستی
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	درگیر در پاسخ به تنش



شکل ۴-۱۶- توزیع عناصر Cis-acting درگیر در پاسخ به هورمون در پروموتور ژن‌های SAM



شکل ۴-۱۷- توزیع عناصر Cis-acting درگیر در پاسخ به تنش در پروموتور ژن‌های *SAM*

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱ نتیجه گیری کلی

در این پژوهش اثر تیمار ملاتونین در طی تنش سرما بر روی بیان ژن‌های SAM و برخی صفات فیزیولوژیکی در گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق به صورت زیر خلاصه شده است:

- فعالیت ژن‌های SAM تحت تنش دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در سری زمان‌های مختلف (۳، ۶ و ۲۴ ساعت) تغییر پیدا می‌کند که نشان‌دهنده درگیر بودن این ژن‌ها در پاسخ به کاهش دما می‌باشد و سرما باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود.
- غلظت‌های متفاوت ملاتونین (۳۰ و ۱۰۰ میکرومولار) اثرات مختلفی را بر روی بیان ژن‌های SAM داشته است. غلظت ۳۰ میکرومولار ملاتونین در نبود تنش سرما اثر کاهشی بر روی بیان ژن‌های SAM3 و SAM5 گذاشت اما وقتی با تنش سرما همراه شد نتایج حاکی از افزایش بیان این ژن‌ها بود.
- غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین با تداوم سرما بیان ژن‌های SAM را القا می‌کند و مشخص شد که کاربرد ملاتونین ۱۰۰ میکرومولار در شرایط تنش سرما بیشترین تاثیر را بر روی القای بیان ژن‌های SAM دارد.
- عناصر پاسخ به هورمون و عوامل رونویسی درگیر در پاسخ به تنش در پروموتور ژن‌های SAM مشاهده شد که نشان‌دهنده درگیر بودن این ژن‌ها در فرایندهای مهم سلولی است.
- ملاتونین اثرات متغیری بر فعالیت کاتالاز تحت تنش سرما و شرایط کنترل گذاشت و در کل تیمار ملاتونین سبب افزایش فعالیت کاتالاز در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود.
- نتایج تحقیق حاضر نشان داد، محتوی کلروفیل کل تحت تیمار ملاتونین کاهش می‌یابد که نشان از تجزیه رنگدانه‌ها طی اعمال ملاتونین می‌باشد.

- غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین محتوی مالون دی آلدئید و نشت الکترولیت را در مقایسه با گیاهانی که ملاتونین دریافت نکرده‌اند تحت تنش سرما کاهش داده است که نشان از تاثیر این دز ملاتونین بر پایداری دیواره سلولی دارد.

۲-۵ پیشنهادات

۱. اثرات ملاتونین بر بیان سایر ژن‌های کلیدی درگیر در پاسخ به تنش سرما بررسی شود.
۲. تغییرات محتوی متابولیت‌های پایین دست مسیر SAM بررسی گردد تا رابطه دقیق از فعالیت SAMها به دست آید.
۳. محتوی ملاتونین داخل گیاه مورد مطالعه قرار گیرد تا درک بهتری از اثرات این مولکول به دست آید.
۴. اثرات ملاتونین بر روی تغییرات محتوی هورمون‌ها در ریشه و اندام هوایی بررسی شود تا برهمکنش بین آنها مشخص شود.
۵. تهیه پروفایل کامل بیان ژن‌ها در گوجه‌فرنگی تحت تیمار ملاتونین و سرما پیشنهاد می‌گردد تا درک بهتری از سیستم‌های پاسخ گیاهان و اثرات ملاتونین به دست آید.

- Afreen, F., Zobayed, S. M. A., & Kozai, T. (2006). Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 108–115.
- Altaf, M. A., Shahid, R., Ren, M. X., Naz, S., Altaf, M. M., Qadir, A., Anwar, M., Shakoor, A., & Hayat, F. (2020). Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in tomato seedlings. *Biologia Plantarum*, 2020, Vol. 64, p. 604-615.
- Antoniou, C., Chatzimichail, G., Xenofontos, R., Pavlou, J. J., Panagiotou, E., Christou, A., & Fotopoulos, V. (2017). Melatonin systemically ameliorates drought stress-induced damage in *Medicago sativa* plants by modulating nitro-oxidative homeostasis and proline metabolism. *Journal of Pineal Research*, 62(4), e12401.
- Arnao, Marino B, & Hernández-Ruiz, J. (2019a). Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? *Trends in Plant Science*, 24(1), 38–48.
- Arnao, Marino B, & Hernández-Ruiz, J. (2019b). Melatonin as a chemical substance or as phytomelatonin rich-extracts for use as plant protector and/or biostimulant in accordance with EC legislation. *Agronomy*, 9(10), 570.
- Arnao, Marino B, & Hernández-Ruiz, J. (2009). Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 295–299.
- Arnao, Marino B, & Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of Pineal Research*, 59(2), 133–150.
- Arnao, Marino Bañón, & Hernández-Ruiz, J. (2013). Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1212–1214.
- Arnao, Marino Bañón, & Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: A model for the plant redox network. *Melatonin Research*, 2(3), 152–168.
- Asero, R. (2013). Tomato allergy: clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 23(1), 37–42.

- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PloS One*, 7(10), e48198.
- Bostock, R. M., Pye, M. F., & Roubtsova, T. V. (2014). Predisposition in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 517–549.
- Breto, M. P., Asins, M. J., & Carbonell, E. A. (1993). Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(1), 113–120.
- ÇALIŞKAN, U. K., Ceylan, A. K. A., & Emrah, B. O. R. (2017). Melatonin in edible and non-edible plants. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 75.
- Campos, C. N., Ávila, R. G., de Souza, K. R. D., Azevedo, L. M., & Alves, J. D. (2019). Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants. *Agricultural Water Management*, 211, 37–47.
- Carluccio, F., Lenucci, M., Piro, G., Siems, W., & Luño, J. (2016). Integrated Medicine with vegetable derived antioxidant and vitamin D: effects on oxidative stress and bone mineral metabolism of aged patients with renal disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 6(6), 379–387.
- Chen, H., Liu, S., Ji, L., Wu, T., Ma, F., Ji, Y., Zhou, Y., Zheng, M., Zhang, M., & Huang, G. (2015). Associations between Alzheimer's disease and blood homocysteine, vitamin B12, and folate: a case-control study. *Current Alzheimer Research*, 12(1), 88–94.
- Chen, M., Chen, J., Fang, J., Guo, Z., & Lu, S. (2014). Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced plant length, pollen viability, and abiotic stress tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(3), 311–322.
- Chen, Q., Qi, W., Reiter, R. J., Wei, W., & Wang, B. (2009). Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of Plant Physiology*, 166(3), 324–328.
- Chen, Y., Zou, T., & McCormick, S. (2016). S-adenosylmethionine synthetase 3 is important for pollen tube growth. *Plant Physiology*, 172(1), 244–253.

- Chinnusamy, V., Gong, Z., & Zhu, J. (2008). Absciscic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1187–1195.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B., Hong, X., Agarwal, M., & Zhu, J.-K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development*, 17(8), 1043–1054.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12(10), 444–451.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 52–61.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11(1), 1–14.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In *Plant hormones* (pp. 1–15). Springer.
- Debnath, B., Hussain, M., Irshad, M., Mitra, S., Li, M., Liu, S., & Qiu, D. (2018). Exogenous melatonin mitigates acid rain stress to tomato plants through modulation of leaf ultrastructure, photosynthesis and antioxidant potential. *Molecules*, 23(2), 388.
- Desjardins, P., Hansen, J. B., & Allen, M. (2009). Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 33, e1610.
- Ding, F., Liu, B., & Zhang, S. (2017). Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 219, 264–271.
- Dreyer, A., & Dietz, K.-J. (2018). Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. *Antioxidants*, 7(11), 169.
- Elizondo, R., & Oyanedel, E. (2010). Caracterización de la Tolerancia al Frío en Tomate Dependiente de las Condiciones de Luz y Temperatura. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 552–558.
- Espartero, J., Pintor-Toro, J. A., & Pardo, J. M. (1994). Differential accumulation of S-

- adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology*, 25(2), 217–227.
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 245–257.
- Galili, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153–178.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16(4), 433–442.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., & Aoki, K. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal*, 55(3), 526–542.
- Gong, B., Li, X., VandenLangenberg, K. M., Wen, D., Sun, S., Wei, M., Li, Y., Yang, F., Shi, Q., & Wang, X. (2014). Overexpression of S-adenosyl-l-methionine synthetase increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 694–708.
- Gong, X., Shi, S., Dou, F., Song, Y., & Ma, F. (2017). Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* Rehd. by regulating the biosynthesis of polyamines. *Molecules*, 22(9), 1542.
- Guo, H., Feng, X., Hong, C., Chen, H., Zeng, F., Zheng, B., & Jiang, D. (2017). Malate secretion from the root system is an important reason for higher resistance of *Miscanthus sacchariflorus* to cadmium. *Physiologia Plantarum*, 159(3), 340–353.
- Heidari, P., Mazloomi, F., Nussbaumer, T., & Barcaccia, G. (2020). Insights into the SAM Synthetase Gene Family and Its Roles in Tomato Seedlings under Abiotic Stresses and

- Hormone Treatments. *Plants*, 9(5), 586.
- Hernández-Ruiz, J., & Arnao, M. B. (2018). Relationship of melatonin and salicylic acid in biotic/abiotic plant stress responses. *Agronomy*, 8(4), 33.
- Hesse, H., & Hoefgen, R. (2003). Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8(6), 259–262.
- Hu, Z., Fan, J., Xie, Y., Amombo, E., Liu, A., Gitau, M. M., Khaldun, A. B. M., Chen, L., & Fu, J. (2016). Comparative photosynthetic and metabolic analyses reveal mechanism of improved cold stress tolerance in bermudagrass by exogenous melatonin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 94–104.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development*, 24(16), 1695–1708.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9, 393.
- Ilahy, R., Siddiqui, M. W., Tlili, I., Montefusco, A., Piro, G., Hdider, C., & Lenucci, M. S. (2018). When color really matters: horticultural performance and functional quality of high-lycopene tomatoes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(1), 15–53.
- Jiang, C., Cui, Q., Feng, K., Xu, D., Li, C., & Zheng, Q. (2016). Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 82.
- Kamiab, F. (2020). Exogenous melatonin mitigates the salinity damages and improves the growth of pistachio under salinity stress. *Journal of Plant Nutrition*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1730898>
- Kanwar, M. K., Yu, J., & Zhou, J. (2018). Phytomelatonin: recent advances and future prospects. *Journal of Pineal Research*, 65(4), e12526.
- Karaca, P., & Cekic, F. Ö. (2019). Exogenous melatonin-stimulated defense responses in tomato

- plants treated with polyethylene glycol. *International Journal of Vegetable Science*, 25(6), 601–609.
- Kaya, A., & Doganlar, Z. B. (2016). Exogenous jasmonic acid induces stress tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum*) exposed to imazapic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 470–479.
- Kaya, A., & Doganlar, Z. B. (2019). Melatonin improves the multiple stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, 256, 108509.
- Kim, Y. S., Lee, M., Lee, J.-H., Lee, H.-J., & Park, C.-M. (2015). The unified ICE–CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 89(1–2), 187–201.
- Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Kumar, V., Kaur, P., & Bhardwaj, R. (2017). Synergistic effect of 24-epibrassinolide and salicylic acid on photosynthetic efficiency and gene expression in *Brassica juncea* L. under Pb stress. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 943–953.
- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R. P., & Seal, C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188(3), 655–673.
- Lee, H.-O., Wang, L., Kuo, Y.-M., Andrews, A. J., Gupta, S., & Kruger, W. D. (2018). S-adenosylhomocysteine hydrolase over-expression does not alter S-adenosylmethionine or S-adenosylhomocysteine levels in CBS deficient mice. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 15, 15–21.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587.
- Li, C., Tan, D.-X., Liang, D., Chang, C., Jia, D., & Ma, F. (2015). Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 669–680.
- Li, H., Dong, Y., Chang, J., He, J., Chen, H., Liu, Q., Wei, C., Ma, J., Zhang, Y., & Yang, J. (2016). High-throughput microRNA and mRNA sequencing reveals that microRNAs may be involved in melatonin-mediated cold tolerance in *Citrullus lanatus* L. *Frontiers in Plant*

Science, 7, 1231.

- Liang, B., Ma, C., Zhang, Z., Wei, Z., Gao, T., Zhao, Q., Ma, F., & Li, C. (2018). Long-term exogenous application of melatonin improves nutrient uptake fluxes in apple plants under moderate drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 650–661.
- Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., Lin, L., Deng, Q., & Luo, X. (2019). Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 246, 34–43.
- Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., & Lv, X. (2018). Exogenous melatonin application delays senescence of kiwifruit leaves by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. *Frontiers in Plant Science*, 9, 426.
- Liu, J.-X., & Howell, S. H. (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *The Plant Cell*, 22(9), 2930–2942.
- Liu, J., Zhai, R., Liu, F., Zhao, Y., Wang, H., Liu, L., Yang, C., Wang, Z., Ma, F., & Xu, L. (2018). Melatonin induces parthenocarpy by regulating genes in gibberellin pathways of ‘Starkrimson’ pear (*Pyrus communis* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 946.
- Liu, J., Zhang, R., Sun, Y., Liu, Z., Jin, W., & Sun, Y. (2016). The beneficial effects of exogenous melatonin on tomato fruit properties. *Scientia Horticulturae*, 207, 14–20.
- Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S., & Huang, B. (2018). Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 145, 1–11.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139–158.
- Meijer, H. J. G., & Munnik, T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 265–306.
- Miller, J. C., & Tanksley, S. D. (1990). Effect of different restriction enzymes, probe source, and probe length on detecting restriction fragment length polymorphism in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(3), 385–389.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300–309.
- Murch, S. J., Campbell, S. S. B., & Saxena, P. K. (2001). The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 786–793.
- Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R. J., Niu, M., & Hameed, S. (2016). Melatonin: current status and future perspectives in plant science. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1230.
- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., & Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23(6), 785–794.
- Park, J., Lee, Y., Martinoia, E., & Geisler, M. (2017). Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biology*, 15(1), 1–15.
- Park, S., Lee, D., Jang, H., Byeon, Y., Kim, Y., & Back, K. (2013). Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 258–263.
- Pattyn, J., Vaughan-Hirsch, J., & Van de Poel, B. (2020). The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytologist*.
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882.
- Pulla, R. K., Kim, Y.-J., Parvin, S., Shim, J.-S., Lee, J.-H., Kim, Y.-J., In, J.-G., Senthil, K. S., & Yang, D.-C. (2009). Isolation of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from Panax ginseng CA meyer and analysis of its response to abiotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 267.
- Quinet, M., Dubois, C., Goffin, M.-C., Chao, J., Dielen, V., Batoko, H., Boutry, M., & Kinet, J.-M. (2006). Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their

- flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1381–1390.
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., & Fuentes-Broto, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. In *Progress in brain research* (Vol. 181, pp. 127–151). Elsevier.
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., & Sharma, R. (2018). Historical perspective and evaluation of the mechanisms by which melatonin mediates seasonal reproduction in mammals. *Melatonin Research*, 1(1), 59–77.
- Rockström, J., & Falkenmark, M. (2000). Semiarid crop production from a hydrological perspective: gap between potential and actual yields. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(4), 319–346.
- Santosh, K. B., & Prianka, H. (2020). Melatonin Plays Multifunctional Role in Horticultural Crops Against Environmental Stresses: A Review. *Environmental and Experimental Botany*, 104063.
- Sarafi, E., Tsouvaltzis, P., Chatzissavvidis, C., Siomos, A., & Therios, I. (2017). Melatonin and resveratrol reverse the toxic effect of high boron (B) and modulate biochemical parameters in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 173–182.
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M. C., Hell, R., & Wirtz, M. (2013). Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochemical Journal*, 451(2), 145–154.
- Schumann, G. L., & D’Arcy, C. J. (2006). *Essential plant pathology*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chong, S., Yan, D., Li, Z., Yuan, H., & Zheng, B. (2020). Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. *Science of The Total Environment*, 713, 136675.
- Sharma, A., & Zheng, B. (2019). Melatonin mediated regulation of drought stress: physiological and molecular aspects. *Plants*, 8(7), 190.

- Shi, H., Tan, D., Reiter, R. J., Ye, T., Yang, F., & Chan, Z. (2015). Melatonin induces class A1 heat-shock factors (HSFA 1s) and their possible involvement of thermotolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 335–342.
- Siddiqui, M. H., Alamri, S., Al-Khaishany, M. Y., Khan, M. N., Al-Amri, A., Ali, H. M., Alaraidh, I. A., & Alsahli, A. A. (2019). Exogenous melatonin counteracts NaCl-induced damage by regulating the antioxidant system, proline and carbohydrates metabolism in tomato seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 353.
- Song, Y., Liu, L., Feng, Y., Wei, Y., Yue, X., He, W., Zhang, H., & An, L. (2015). Chilling-and freezing-induced alterations in cytosine methylation and its association with the cold tolerance of an alpine subnival plant, *Chorispora bungeana*. *PLoS One*, 10(8), e0135485.
- Suh, M.-H., & Petrov, V. (2016). *Prefabricated, self-contained gel electrophoresis module*. Google Patents.
- Sun, L., Li, X., Wang, Z., Sun, Z., Zhu, X., Liu, S., Song, F., Liu, F., & Wang, Y. (2018). Cold priming induced tolerance to subsequent low temperature stress is enhanced by melatonin application during recovery in wheat. *Molecules*, 23(5), 1091.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Tan, D., Hardeland, R., Back, K., Manchester, L. C., Alatorre-Jimenez, M. A., & Reiter, R. J. (2016). On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. *Journal of Pineal Research*, 61(1), 27–40.
- Tanksley, S. D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S181–S189.
- Tanveer, M., Shahzad, B., Sharma, A., Biju, S., & Bhardwaj, R. (2018). 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: a review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 69–79.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., & Popova, L. P. (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67(7), 710–715.

- Tattersall, E. A. R., Grimplet, J., DeLuc, L., Wheatley, M. D., Vincent, D., Osborne, C., Ergül, A., Lomen, E., Blank, R. R., & Schlauch, K. A. (2007). Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Functional & Integrative Genomics*, 7(4), 317–333.
- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 571–599.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F. R., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Rambla, J. L., Beltran, K. S. O., Taylor, M., & Zhang, B. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391–394.
- Van de Poel, B., Bulens, I., Oppermann, Y., Hertog, M. L., Nicolai, B. M., Sauter, M., & Geeraerd, A. H. (2013). S-adenosyl-l-methionine usage during climacteric ripening of tomato in relation to ethylene and polyamine biosynthesis and transmethylation capacity. *Physiologia Plantarum*, 148(2), 176–188.
- Vergnolle, C., Vaultier, M.-N., Taconnat, L., Renou, J.-P., Kader, J.-C., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2005). The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiology*, 139(3), 1217–1233.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1), 86.
- Villand, J., Skroch, P. W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C. G., & Nienhuis, J. (1998). Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Science*, 38(5), 1339–1347.
- Viswanathan, C., & Zhu, J.-K. (2002). Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1423), 877–886.
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Simonetti, P., Faoro, F., Fico, G., & Iriti, M. (2011). The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *Journal of Pineal Research*, 51(3), 331–337.

- Wang, D.-Z., Jin, Y.-N., Ding, X.-H., Wang, W.-J., Zhai, S.-S., Bai, L.-P., & Guo, Z.-F. (2017). Gene regulation and signal transduction in the ICE–CBF–COR signaling pathway during cold stress in plants. *Biochemistry (Moscow)*, 82(10), 1103–1117.
- Wang, M., Zhang, S., & Ding, F. (2020). Melatonin Mitigates Chilling-Induced Oxidative Stress and Photosynthesis Inhibition in Tomato Plants. *Antioxidants*, 9(3), 218.
- Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z., Liang, D., & Ma, F. (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 292–302.
- Wang, P., Yin, L., Liang, D., Li, C., Ma, F., & Yue, Z. (2012). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*, 53(1), 11–20.
- Wang, Q., An, B., Wei, Y., Reiter, R. J., Shi, H., Luo, H., & He, C. (2016). Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1882.
- Wang, Y., Reiter, R. J., & Chan, Z. (2018). Phytomelatonin: a universal abiotic stress regulator. *Journal of Experimental Botany*, 69(5), 963–974.
- Wei, J., Li, D., Zhang, J., Shan, C., Rengel, Z., Song, Z., & Chen, Q. (2018). Phytomelatonin receptor PMTR 1-mediated signaling regulates stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Journal of Pineal Research*, 65(2), e12500.
- Wei, W., Li, Q.-T., Chu, Y.-N., Reiter, R. J., Yu, X.-M., Zhu, D.-H., Zhang, W.-K., Ma, B., Lin, Q., & Zhang, J.-S. (2015). Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 695–707.
- Weiss, J., & Egea-Cortines, M. (2009). Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Journal of Applied Genetics*, 50(4), 311–319.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 781–803.

- Zhang, J., Zeng, B., Mao, Y., Kong, X., Wang, X., Yang, Y., Zhang, J., Xu, J., Rengel, Z., & Chen, Q. (2017). Melatonin alleviates aluminium toxicity through modulating antioxidative enzymes and enhancing organic acid anion exudation in soybean. *Functional Plant Biology*, 44(10), 961–968.
- Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., Li, S., Zhang, L., Qi, Y., & Ren, S. (2016). Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7, 197.
- Zhang, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J., & Thomashow, M. F. (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39(6), 905–919.
- Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., & Reiter, R. J. (2019). Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 249.

Abstract

Low temperatures are the negative factors limiting the growth and performance of tropical plants such as tomato. Besides, plants use various mechanisms to reduce the destructive effects of cold stress. Melatonin, as a regulatory molecule, is involved in plant growth and development processes and it can reduce the adverse effects of oxidative stress. However, molecular mechanisms of melatonin in response to abiotic stress are still unknown in plant species. In the current study, the melatonin effects on some physiological manners and expression of *SAM* genes were investigated in tomato seedlings under cold stress. *SAM* synthetase genes encode the S-Adenosyl methionine enzyme, which is involved in several critical cell biosynthetic pathways. In the present study, melatonin at three concentrations (0, 30, and 100 μ M), and temperature treatment at 8 ° C (for 3, 6, and 24 hours) along with normal temperature were tested. The results of analysis of variance (ANOVA) revealed that temperature reduction and melatonin treatment had significant effects on physiological traits such as catalase activity, electrolyte leakage index, malondialdehyde and total chlorophyll content. Overall, cold stress increased the activity of catalase and electrical leakage, indicating that oxidative stress can be induced by cold stress. However, melatonin application caused diverse effects during cold stress, whereas the total chlorophyll content was decreased under melatonin treatment and 100 μ M melatonin treatment could reduce the catalase activity after 24 hours of cold stress. In general, the tomato responses in the 100 mM melatonin treatment and the persistence of cold stress were different, indicating that the secondary stress response pathways might be induced in plant cells. In addition, the expression patterns of *SAM* genes were affected by the applied treatments. For instance, *SAM1* was up-regulated under cold stress for 6 hours and 30 μ M melatonin while melatonin at 100 μ M showed a suppressive effect on *SAM1*. Besides, the expression levels of *SAM2*, *SAM3*, and *SAM5* were sharply up-regulated in response to cold treatment for 6 hours without melatonin application as well as 100 μ M melatonin treatment under normal temperature. The results of protein-protein interaction and promoter analysis of *SAM* genes revealed that this small gene family is involved in various cellular processes and play an important role in regulating downstream pathways related to stress responses and plant growth. Our findings provide an initial insight into the role of melatonin in response to cold stress as well as the role of *SAM* genes, which can be used in next molecular studies related to tomato breeding.

Keywords: Abiotic stresses, antioxidants, gene expression, *SAM* genes, membrane stability.



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis Plant biotechnology

Study of Melatonin Effects on Tomato Seedlings under Cold Stress

By: Faezeh Mazloomi

Supervisor:

Dr. Parviz Heidari

Advisor:

Dr. Amin Ebrahimi

February 2021