دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم زراعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته اصلاح نباتات

بررسی آنالیز بیان ژن‌های آنتی اکسیدانتی تحت تنش شوری در *Sesamum indicum* L.

استاد راهنما

دکتر سید کمال کاظمی‌تبار

اساتید مشاور

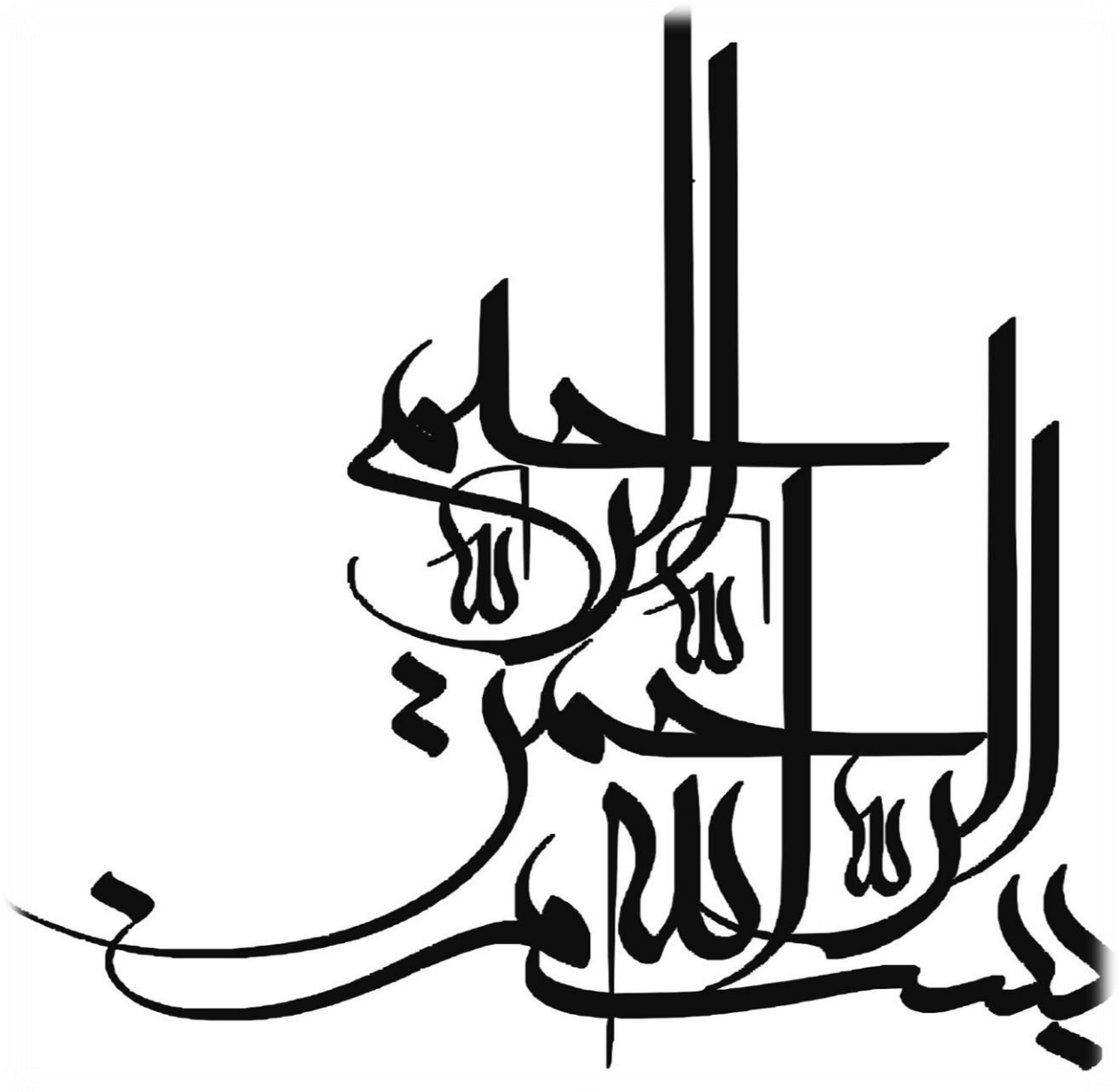
مهندس سید حمیدرضا هاشمی

دکتر غلامعلی رنجبر

نگارش:

سمیرا شاکری

بهمن ۱۳۹۱



تقدیم به

مقدستترین واژه ها در لغت نامه دلم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت آن می دانم.

پدر، مهربانی مشفق، بردبار و حامی.

همسرم که نشانه لطف الهی در زندگی من است.

برادران و خواهرانم، همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم.

تقدیر و تشکر

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمون مان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزی مان ساخت.

از پدر عزیز و مادر فداکارم به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتی، و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند، بی نهایت سپاسگزارم.

از زحمات، جناب آقای دکتر سید کمال کاظمی تبار که با راهنمایی ها و نظرات گوهربار خود راه گشای اینجانب بوده اند، کمال تشکر را دارم. بی شک انجام این پژوهش بدون کمک فکری، همکاری و هدایت این استاد متواضع و اندیشمند غیر ممکن می نمود و همنشینی و شاگردی ایشان را که از بزرگترین افتخارات و شیرین ترین لحظات زندگی ام می باشد، منت دار محبت های کارساز این عزیز هستم.

استاد گرانقدر مشاور جناب آقای دکتر رنجبر در طول این پژوهش از همکاری و همفکریشان بهره برده ام، بی نهایت سپاسگزارم.

بر خود لازم می دانم که از زحمات بی دریغ و راهنمایی های ارزشمند استاد گرامی جناب مهندس هاشمی که با نظرات شیوا و راه گشایشان بر غنای علمی این تحقیق افزودند، قدردانی و حق شناسی نمایم.

از صبر و بردباری اساتید بزرگوار آقایان دکتر نخعی و دکتر باقری که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر تاجیک که مدیریت جلسه دفاع ام را پذیرفته اند، بسیار سپاسگزارم.

در نهایت از تمامی دوستان و همکلاسی های عزیزم بخصوص بچه های آزمایشگاه اصلاح نباتات به خاطر لحظات خوب با هم بودنمان سپاسگزارم.

سمیرا شاکری

بهمن ۱۳۹۱

فهرست مطالب

۱ مقدمه و کلیات ۳

۱-۱ مقدمه ۳

۱-۲ کلیات ۶

۱-۲-۱-۱ ترکیبات شیمیایی و داروئی ۶

۱-۲-۲ گیاهان و تنش‌های محیطی ۷

۱-۲-۲-۱ تنش شوری ۹

۱-۲-۲-۲ شوری در ایران و جهان ۹

۱-۲-۲-۳ تنش شوری و اختلال در فعالیت‌های گیاه ۱۰

۱-۲-۲-۴ سازوکارهای تحمل و مقاومت به شوری در گیاهان ۱۱

۱-۲-۲-۵ مکانیسم‌های احتمالی فعال در پاسخ به تنش‌ها در گیاهان ۱۲

۱-۲-۲-۶ اثر تنش شوری بر تشکیل رادیکال‌های آزاد ۱۳

۱-۲-۳ آنزیم ها ۱۳

۱-۲-۳-۱ ۱صول کلی واکنش های آنزیمی ۱۵

۱-۲-۳-۲ سوپراکساید دیسموتاز ۱۵

۱-۲-۳-۳ کاتالاز ۱۶

۱-۲-۳-۴ آسکوربات پراکسیداز ۱۷

۱-۲-۳-۵ پلی‌فنل اکسیداز ۱۸

۱-۲-۴ بررسی بیان ژن‌های واکنشی دفاعی ۱۹
۱-۲-۵ بیان ژن ۲۰
۱-۲-۵-۱ اندازه گیری بیان ژن ۲۰
۱-۲-۵-۲ آنالیز بیان ژن و روش‌های بررسی بیان ژن مبتنی بر PCR ۲۱
۱-۲-۶ Real-Time PCR ۲۲
۱-۲-۶-۱ تعریف و مفهوم Real-time PCR ۲۲
۱-۲-۶-۲ استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت DNA مانند SYBR Green ۲۲
۱-۲-۶-۳ مزایای روش Real-time PCR ۲۳
۱-۲-۶-۴ روش‌های سنجش با Real-time PCR ۲۳
۱-۲-۶-۵ روش بررسی کمی بیان ژن یا quantetive real-time PCR ۲۳
۱-۲-۶-۶ آنالیز کمی mRNA با استفاده از Real-Time PCR ۲۶
۱-۲-۶-۷ تعیین کمیت نسبی ۲۶
۱-۲-۶-۷-۱ کمیت نسبی نرمال شده در برابر توده‌ی واحد ۲۷
۱-۲-۶-۷-۲ کمیت نسبی نرمال شده به یک ژن رفرنس ۲۷
۱-۲-۶-۷-۳ متدهای قابل استفاده برای کمیت نسبی با استفاده از یک ژن رفرنس ۲۹
۱-۲-۶-۷-۳-۱ روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (لیواک) ۳۰
۱-۲-۶-۷-۳-۲ متد ΔC_T با استفاده از یک ژن رفرنس ۳۱
۱-۲-۶-۷-۳-۳ روش Pfaffl ۳۱
۲ بررسی منابع ۳۴
۲-۱ تاثیر تنش شوری بر بیان ژن‌ها و دستورزی گیاهان برای افزایش تحمل شوری ۳۸
۳ مواد و روش‌ها ۴۲
۳-۱ تهیه مواد گیاهی ۴۲
۳-۲ مطالعات بیوشیمیایی ۴۴

۳-۲-۱ سنجش فعالیت آنزیم‌ها..... ۴۴
۳-۲-۱-۱ تهیه عصاره گیاهی..... ۴۴
۳-۲-۱-۲ استخراج پروتئین..... ۴۴
۳-۲-۱-۲-۱ سنجش غلظت پروتئین به روش (Bradford 1976)..... ۴۴
۳-۲-۱-۲-۲ رسم منحنی استاندارد..... ۴۵
۳-۲-۱-۳ فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز..... ۴۵
۳-۲-۱-۴ فعالیت آنزیمی کاتالاز..... ۴۶
۳-۲-۱-۵ فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز..... ۴۶
۳-۲-۲ تجزیه و تحلیل آماری..... ۴۷
۳-۳ مطالعات مولکولی..... ۴۷
۳-۳-۱ طراحی پرایمر..... ۴۷
۳-۳-۲ استخراج RNA..... ۴۹
۳-۳-۲-۱ استخراج RNA با روش ترایزول..... ۴۹
۳-۳-۲-۲ بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده..... ۵۰
۳-۳-۲-۲-۱ الکتروفورز..... ۵۰
۳-۳-۲-۲-۲ اسپکتروفوتومتری..... ۵۰
۳-۳-۳ تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNase..... ۵۰
۳-۳-۴ سنتز cDNA تک رشته ای از RNA کل..... ۵۱
۳-۳-۵ Real-Time PCR..... ۵۲
۳-۳-۵-۱ انتخاب ژن‌های رفرنس..... ۵۲
۳-۳-۵-۲ بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی..... ۵۳
۳-۳-۵-۳ بهینه‌سازی شرایط واکنش Real- Time PCR..... ۵۳
۳-۳-۵-۴ کنترل آلودگی Real- Time PCR..... ۵۴
۳-۳-۵-۵ چرخه‌های حرارتی Real- Time PCR..... ۵۴

۳-۳-۶ تجزیه و تحلیل مشاهدات ۵۵

۴ نتایج ۵۷

۴-۱ استخراج RNA کل از بافت برگ و ریشه ۵۷

۴-۲ طراحی پرایمر ۵۸

۴-۳ بررسی اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از REAL- TIME PCR ۵۹

۴-۳-۱ الکتروفورز ژل اگارز ۵۹

۴-۳-۲ Melting curve analysis ۵۹

۴-۴ انتخاب ژن رفرنس ۶۱

۴-۵ انتخاب ژن رفرنس تحت مراحل مختلف نمو و تحت تنش در بافت برگ ۶۱

۴-۵-۱ انتخاب بهترین ژن کنترل داخلی به روش Pairwise ۶۱

۴-۶ انتخاب ژن رفرنس تحت مراحل مختلف نمو و تحت تنش در بافت ریشه ۶۳

۴-۶-۱ انتخاب بهترین ژن کنترل داخلی به روش Pairwise ۶۳

۴-۷ نتایج بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی با استفاده از روش REAL-TIME PCR ۶۵

۴-۷-۱ الگوی تظاهر ژن سوپراکساید دیسموتاز در پاسخ به تنش شوری ۶۷

۴-۷-۲ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۶۹

۴-۷-۳ الگوی تظاهر ژن کاتالاز در پاسخ به تنش شوری ۷۱

۴-۷-۴ فعالیت آنزیم کاتالاز ۷۳

۴-۷-۵ الگوی تظاهر ژن پلی‌فنل اکسیداز در پاسخ به تنش شوری ۷۵

۴-۷-۶ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۷۶

۴-۸ نتیجه‌گیری کلی ۷۹

۴-۹ پیشنهادات ۸۱

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: منحنی تکثیر فازهای REAL –TIME PCR..... ۲۵

شکل ۳-۱: نمودار استاندارد پروتئین..... ۴۵

شکل ۴-۱: نتایج الکتروفورز RNAهای استخراج شده در بافت برگ و بافت ریشه..... ۵۷

شکل ۴-۲: نتایج RNAهای، DNASEI زده در بافت برگ و بافت ریشه..... ۵۷

شکل ۴-۳: الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای دقیق REAL- TIME PCR ۵۹

شکل ۴-۴: منحنی ذوب محصولات PCR ژن ALPHA- TUBULIN، BETA- ACTIN، EFA-4 و UBQ5 ..... ۶۰

شکل ۴-۵: منحنی ذوب محصولات PCR ژن SOD، CAT و PPO..... ۶۰

شکل ۴-۶: میانگین مقادیر بیان پایداری (M) ژن‌های مرجع کاندید با استفاده از آنالیز GENORM، در بافت برگ..... ۶۲

شکل ۴-۷: میانگین مقادیر بیان پایداری (M) ژن‌های مرجع کاندید با استفاده از آنالیز GENORM، در بافت برگ..... ۶۳

شکل ۴-۸: میانگین مقادیر بیان پایداری (M) ژن‌های مرجع کاندید با استفاده از آنالیز GENORM، در بافت ریشه ۶۴

شکل ۴-۹: میانگین مقادیر بیان پایداری (M) ژن‌های مرجع کاندید با استفاده از آنالیز GENORM، در بافت ریشه..... ۶۵

شکل ۴-۱۰: روند تغییرات بیان ژن سوپراکساید دیسموتاز در بافت برگ گیاه کنجد..... ۶۸

شکل ۴-۱۱: روند تغییرات بیان ژن سوپراکساید دیسموتاز در بافت ریشه گیاه کنجد..... ۶۸

شکل ۴-۱۲: اثر متقابل بین زمان و سطوح تنش برای فعالیت آنزیم سوپراکسایدیسموتاز..... ۶۹

شکل ۴-۱۳:مقایسه دو روش بیوشیمیایی و ریل‌تایم‌پی‌سی‌ار جهت بیان ژن سوپراکساید‌دیسموتاز.... ۷۱

شکل ۴-۱۴: روند تغییرات بیان ژن کاتالاز در بافت برگ گیاه کنجد..... ۷۲

شکل ۴-۱۵: روند تغییرات بیان ژن کاتالاز در بافت ریشه گیاه کنجد..... ۷۳

شکل ۴-۱۶: اثرمتقابل بین زمان و سطوح تنش برای فعالیت آنزیم کاتالاز..... ۷۴

شکل ۴-۱۷:مقایسه دو روش بیوشیمیایی و ریل‌تایم‌پی‌سی‌ار جهت بیان ژن کاتالاز..... ۷۵

شکل ۴-۱۸: روند تغییرات بیان ژن پلی‌فنل اکسیداز در بافت برگ گیاه کنجد..... ۷۶

شکل ۴-۱۹: روند تغییرات بیان ژن پلی‌فنل اکسیداز در بافت ریشه گیاه کنجد..... ۷۶

شکل ۴-۲۰: اثر متقابل بین زمان و سطوح تنش برای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز..... ۷۷

فهرست جداول

جدول ۲-۱: طرز تهیه محلول هوگلند برای ۱۰۰ لیتر آب..... ۴۳

جدول ۲-۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در QRT- PCR..... ۴۸

جدول ۲-۳: مواد بکار رفته و مقادیر آن در تیمار با آنزیم DNASE I..... ۵۱

جدول ۲-۴: مواد مورد نیاز برای سنتز CDNA..... ۵۲

جدول ۲-۵: شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های REAL-TIME PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر..... ۵۴

جدول ۲-۶: چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ۵۵

جدول ۳-۱: توالی آغازگرهای ژن‌های هدف مورد استفاده در QRT- PCR..... ۵۸

جدول ۳-۲: توالی آغازگرهای ژن‌های رفرنس مورد استفاده در QRT- PCR..... ۵۸

جدول ۳-۳: میزان نسبی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی تحت تنش شوری در برگ کنجد..... ۶۶

جدول ۳-۴: میزان نسبی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی تحت تنش شوری در ریشه کنجد..... ۶۶

جدول ۳-۵: تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی براساس طرح فاکتوریل..... ۷۸

بررسی آنالیز بیان ژن‌های آنتی اکسیدانتی تحت تنش شوری در *Sesamum indicum* L.

چکیده

کنجد (*Sesamum indicum* L.) به دلیل دارا بودن آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی از قبیل سزامین و سزامول، بطور سنتی برای مصرف مستقیم و بصورت منبعی از روغن با کیفیت عالی، استفاده می‌شود. کشور ما از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه خشک دنیا قرار دارد، بررسی اثرات تنش شوری و الگوی رفتاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، می‌تواند به درک مکانسیم‌های دخیل در القاء مقاومت یا تحمل به گیاه کمک نماید. در این تحقیق اثر تنش شوری بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و بیان ژن بر اندام‌های برگ و ریشه در گیاه کنجد مورد بررسی قرار گرفت. اثر سطوح مختلف شوری (صفر و ۷۵ میلی‌مولار) در شش دوره زمانی (۰ ساعت، ۶ ساعت، ۱ روز، ۴ روز، ۸ روز و ۱۶ روز) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) و بیان ژن‌های EFA-4، UBO5، Alpha- Tubulin، Beta-Actin بعنوان ژن‌های رفرنس و SOD، CAT و PPO بعنوان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که بین دو سطح تنش، زمان و اثر متقابل سطوح تنش و زمان، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح ۱٪ معنی‌دار می باشند. فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش نسبت به شاهد به ترتیب ۳۳/۹۸ و ۴۲/۷۲ کاهش داشتند ولی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش نشان داد. بررسی بیان ژن‌های رفرنس با استفاده از نرم‌افزار geNORM نشان داد که در گیاهان شاهد در بافت برگ، EFA-4 و Beta-Actin و در بافت ریشه دو ژن UBQ5 و EFA-4 و تحت تنش شوری در بافت برگ ژن‌های EFA-4 و Beta-Actin و در بافت ریشه UBQ5 و Alpha- Tubulin با حداقل بیان پایداری، بیان پایدارتری را نسبت به بقیه داشتند. . نتایج Real time- PCR نشان داد که بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و پلی‌فنل اکسیداز در بافت برگ و ریشه تحت تنش شوری روند افزایشی داشته است در حالی‌که بیان ژن کاتالاز در بافت برگ روند کاهشی و در بافت ریشه روند افزایشی داشته است. افزایش فعالیت SOD در مبارزه با استرس اکسیداتیو نقش اساسی در بقای گیاهان تحت تنش محیطی نیز دارند. بطور کلی نتایج بدست آمده تایید می‌کند که افزایش تحمل به شوری با افزایش بیان ژن‌های خاص که کدکننده‌ی آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌باشند، همراه است. بنابراین نتایج همبستگی بین تحمل به تنش و ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانتی را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، ژن رفرنس، تنش شوری، *Sesamum indicum*

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱ مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

بذور کنجد دارای مواد غذایی زیادی است (۵۰٪ روغن و ۲۵٪ پروتئین)، که به سبب وجود آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی از قبیل سزامین و سزامول، بطور سنتی برای مصرف مستقیم و بصورت منبعی از روغن با کیفیت عالی، استفاده می‌شود (برار و آهوجا، ۱۹۷۹). معمولا قابلیت تولید کنجد در مقایسه با سایر محصولات روغنی نسبتا پایین است، زیرا کشت کنجد معمولا در خاک‌های فقیر و در دوره‌های کشت کوتاه انجام می‌شود (گئورگ و همکاران، ۱۹۸۷). اثرات مفید کنجد بر روی سلامتی بشر، اخیرا توجه به سمت این گیاه زراعی باستانی را زیاد کرده است. با وجود ارزش غذایی و تاریخی و اهمیت فرهنگی کنجد، تحقیقات بر روی کنجد اندک و کم بوده است (لائورنتین و کارلووسکی، ۲۰۰۶). مطالعات بیشتر دانشمندان در زمینه اثرات تنش شوری بر روی گیاه کنجد در جهت بهبود اهداف اصلاحی متمرکز شده است. طبق اطلاعات FAO که درسال ۱۹۹۹ توسط مس و گراتان منتشر شد، پارامترهای تحمل به شوری مانند threshold (EC_e–ds/m) و Slope (% per ds/m) برای گیاه کنجد تعیین نشده است. علاوه بر این در میان ارقام کنجد، تنوع قابل توجهی در درجه تحمل به شوری وجود دارد (یحیا، ۱۹۹۸).

در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه تقاضا برای کنجاله غنی از پروتئین و روغن خوراکی گیاهی باعث شده، مقدار تولید غلات کاهش و دانه‌های روغنی افزایش یابد. از سال ۱۹۷۸ تا سال ۱۹۹۹ تولید غلات ۲۱٪ رشد داشته و به سطح تولید ۱/۸۴۹ میلیون تن رسیده است ولی در مدت مشابه تولید دانه‌های روغنی ۹۵ درصد رشد داشته است و به سطح تولید ۲۷۷/۲ میلیون تن رسیده است. ایران سالیانه ۹۶ درصد از روغن مصرفی خود را وارد می‌کند و برای دستیابی به اهداف والای نظام سعی بر این است که میزان این واردات کم شود. دانه‌های روغنی از جمله کنجد پس از غلات دومین ذخیره غذایی جهان را تشکیل

می‌دهند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی اسید چرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشند. یکی از مشکلات اساسی بر سر راه کشاورزی کمبود منابع آب شیرین و با کیفیت جهت آبیاری است. با توجه به توسعه کشاورزی فاریاب و اجتناب ناپذیر بودن استفاده از منابع آبی با کیفیت پائین و شور، تخریب اراضی زراعی مرغوب و گرایش به سمت شور و قلیا شدن خاک مسئله ساز خواهد بود (کافی و همکاران، ۱۳۸۲).

کشور ما از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه خشک دنیا قرار دارد، از این‌رو شوری خاک و آب آبیاری یکی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است. شوری آب و خاک آبیاری، سبب بروز تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در گیاهان می‌شود ضمن اینکه تحمل به شوری در گیاهان نیز خصوصیتی ثابت نبوده و ممکن است در مراحل مختلف رشد هر گونه، متفاوت باشد (سایرام و سریواستاوا، ۲۰۰۱). به طور کلی گیاهان، طیف وسیعی از تنش‌های محیطی را که نهایتا منجر به بروز تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود، درک می‌کنند. مکانیسم مقاومت در برخی از تنش‌ها به صورت یک ارتباط درونی و نتیجه یک برنامه‌ریزی هماهنگ و پیچیده است. در شرایط تنش عدم توازن بین فرآیند جذب انرژی و مصرف آن توسط اندام فتوسنتزی باعث تولید انواع اکسیژن فعال (ROS)[1] و ناتوانی گیاه در مهار آن می‌گردد که در نهایت منجر به بروز تنش در غشاء سلول و بروز علائم ناشی از صدمات اکسیداتیو می‌شود (بلوخینا وهمکاران، ۲۰۰۳).

افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاه باعث می‌شود که برای کاهش اثرات سمی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، مکانیسم‌های متنوعی در گیاه فعال شود. در این شرایط میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش یافته و آنزیم‌های مهار کننده ROSها در جهت کاهش اثرات سمی ناشی از تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری، افزایش پیدا می‌کنند (کافی و همکاران،۱۳۸۲). برای مقابله با تنش

1 Reactive Oxygen Species

اکسیداتیو، گیاهان اقدام به القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپر اکساید دیسموتاز [1](SOD)، کاتالاز [2](CAT)، پراکسیداز [3](POX)، آسکوربات پراکسیداز [4](APX) و پلی‌فنل اکسیداز [5](PPO) می‌نمایند. به طور معمول گیاهانی که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی فعال‌تری دارند، نسبت به تنش‌های محیطی متحمل‌تر می‌باشند. در واقع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال به شمار می‌آیند (دیرک و مونتاگو، ۲۰۰۲). خصوصیات فیزیولوژیک گیاه، از جمله بسته شدن روزنه‌ها، تغییر درالگوی تنظیم کننده‌های رشد و تجمع متابولیت‌ها نیز نمونه‌های بارزی از سازگاری با شرایط تنش می‌باشند (خاوری،۱۳۷۵؛ سینگ وهمکاران، ۲۰۰۴).

لذا بررسی اثرات تنش شوری و الگوی رفتاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، می‌تواند به درک مکانسیم‌های دخیل در القاء مقاومت یا تحمل به گیاه کمک نماید، چرا که همبستگی بالایی در تحمل به تنش‌های محیطی و تغییرات غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد. از سوی دیگر با عنایت به اینکه سنتز هر ماده‌ای در سلول‌ها تحت کنترل ژن‌ها می‌باشد، لذا با شناسائی ژن‌های مسئول سنتز این مواد و انتقال آن به گیاهان دیگر، تولید ارقام متحمل به شوری دور از ذهن نخواهد بود.

اهداف تحقیق حاضر عبارتند از:

۱- بررسی و مقایسه الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در تنش شوری در سطح آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسیداز دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در بافت برگ و ریشه.
۲- بررسی الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در تنش شوری در سطح ترانسکریپتوم.
۳- بررسی ارتباط تغییرات بیان ژن در سطح ترانسکریپتوم و آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی.

1 Superoxide Dismotase
2 Catalase
3 Peroxidase
4 Ascorbate Peroxidase
5 Polyphenol Oxidase

۱-۲ کلیات

۱-۲-۱ مشخصات گیاه‌شناسی

کنجد با نام علمی *Seasamum inducum* L.، شبیه به S. orienale، عضو راسته Tubiflorae از خانواده پدالیاسه که دارای شانزده جنس و در حدود شصت گونه است که تعدادی از آنها را می‌توان با *S.indicum* تلاقی داد و تعداد کمی از آنها نیز برای تولید بذر کاشت می‌شوند. کنجد بطور مشخص، بوته‌ای عمودی، یک‌ساله و گه‌گاه چندساله دارد که عمدتا در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود (ناصری، ۱۳۷۵ و اشری، ۱۹۹۸). تعداد زیادی از این گونه‌ها در آفریقا هستند، ۸ گونه در هندوستان در منطقه سیلان دیده می‌شوند و منحصرا به این منطقه تعلق دارند و بقیه در چند نقطه پراکنده هستند و به آن مناطق تعلق ندارند (ناصری، ۱۳۷۵). ارقام بومی این گیاه در ایران در نواحی اراک، نهاوند، همدان، مراغه و بلوچستان کشت و زرع می‌شود (لاجوردی، ۱۳۵۹).

۱-۲-۱-۱ ترکیبات شیمیایی و داروئی

دانه کنجد به خاطر کمیت و کیفیت بالای پروتئین و روغن خوراکی آن (۶۳-۳۷ درصد)، از ارزش غذایی بالایی برخوردار است. روغن کنجد به دلیل داشتن دو ترکیب سزامین و سزامول دارای دوام فوق العاده زیادی است و از نظر میزان اسید لینولئیک غنی است. پروتئین کنجد سرشار از اسیدهای آمینه گوگرددار است. کنجاله کنجد حاوی ۴۵-۴۰ درصد پروتئین است. دانه کنجد همچنین سرشار از هیدرات‌های کربن مفید و ویتامین‌ها بوده و مستقیما قابل مصرف است (برار و آهوجا، ۱۹۷۹). پتانسیل عملکرد کنجد به ۳۰۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌رسد. عملکردهای بیش از ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار در زراعت سنتی و بیش از ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار در زراعت مکانیزه و تحت شرایط آبیاری مطلوب بشمار می‌روند.

۱-۲-۲ گیاهان و تنش‌های محیطی

گیاهان در دوره حیاتشان با انواع تنش‌های محیطی مواجه می‌شوند، این تنش‌ها شانس نمو و بقای گیاهان را محدود می‌کنند. در بسیاری از نقاط کره خاکی شرایط مناسب رشد فقط برای مدت کوتاهی دوام دارد و گیاهان مجبورند که در همین زمان کم، مراحل اساسی رشد خود را انجام دهند در برخی نقاط هم که شرایط برای رشد مناسب است، افزایش تراکم و تعداد گیاهان عامل ایجاد رقابت برای گیاهان در به دست آوردن مواد غذایی، آب و نور است (لارچر و همکاران، ۲۰۰۱).

در مجموع تنش یعنی شرایط نامناسبی که لزوما مرگ آنی در پی نداشته و به طور دائم یا موقت در یک ناحیه خاص گیاه روی می‌دهد ولی بر عملکردهای حیاتی موجودات تاثیر داشته باشد (والتر و همکاران، ۱۹۸۵). از قوانین حرکت نیوتن چنین استنباط شده است که اگر هر موجودی تحت تاثیرعملی (تنش) قرار گیرد عکس العملی (کرنش) از خود نشان می‌دهد. کرنش می‌تواند برگشت‌پذیر یا برگشت ناپذیر باشد. اگر کرنش از شدت کافی برخوردار باشد موجود زنده دچار یک تغییر پایدار یعنی صدمه یا مرگ می‌شود. به هر حال دانشمندان علوم گیاهی تنش را با دو تعریف بوم‌شناختی و بیوشیمیایی مورد توجه قرار می‌دهند. تنش در مفهوم بوم شناختی: فشارهای زیست محیطی است که نسبت تولید ماده خشک را در قسمتی از گیاه یا تمامی آن محدود می‌کند اما تنش از نظر بیوشیمیایی به معنی اختلال در تولید طبیعی ترکیبات مختلف گیاهی است.

امروزه تنش را به دو گروه طبقه‌بندی می‌کنند اول تنش‌های زیستی[1]: تنش‌هایی که حاصل حمله یک موجود زنده به موجود زنده دیگر است مانند آفت‌ها، پاتوژن‌ها و آللوپاتی؛ دوم تنش‌های غیر زیستی[2] شامل:

۱- باد، فشار، صدا، نیروهای مغناطیسی و الکتریکی

1 Biotic Stress
2 Abiotic Stress

۲- شیمیایی مثل شوری، یونی، علف کش‌ها و...

۳- تشعشع مثل پرتوهای UV-UV , UV-A , UV-B[1]

۴- آب مثل غرقابی[2] و خشکی[3]

۵- دما شامل دمای بالا[4] و دمای پایین[5] ، که دمای پایین خود دو دسته است: سرمازدگی [6] و یخ زدگی[7] هر نوع از تنش‌ها در وهله اول تنش اولیه[8] محسوب شده و منجر به تغییراتی در سیستم زیستی می‌شود. اگر مدت زمان تنش اولیه کوتاه باشد اثرات آن در حد چند ثانیه یا دقیقه مشاهده می‌شوند. اما اگر مدت زمان بروز تنش طولانی باشد تنش ثانویه[9] پدید آمده و آسیب حاصل از آن غیر مستقیم خواهد بود. گیاهان نیز مانند جانوران برای مقابله با این شرایط ناسازگار و سخت با استفاده از مکانیسم‌های متفاوت با تنش مقابله می‌نمایند که این مکانیزم‌ها شامل سازش[10]و مقاومت [11] بوده که مقاومت خود شامل تحمل کردن[12]، اجتناب[13]و فرار[14]می‌باشد (پراساد، ۱۹۹۶).

همه این تنش‌ها، عموما پاسخ‌های مشترکی را در گیاهان القا می‌کنند ولی در شروع سیگنال با هم تفاوت داشته و همچنین گیرنده‌های آنها متفاوت می‌باشند. این تنش‌ها با بیان یکسری از ژن‌ها گیاه را قادر به ترمیم آسیب ناشی از تنش کرده یا گیاه را در برابر تنش‌های محیطی که آینده پیش خواهد آمد محافظت می‌کنند (بج‌گز و همکاران، ۲۰۰۸). یعنی در واقع گیاه را با محیط سازگار کرده و بقای آن را بیشتر تضمین می‌کنند

1 Radiation
2 Floading
3Drought
4High Temperature
5 Low Temperature
6 Chilling
7 Freezing
8Primary Stress
9Secondary Stress
10Adaptation
11Resistance
12Tolerance
13Avoidance
14Escape

و از این طریق به نوعی با محیط خود سازش یافته یا تطابق می‌یابند. سازش‌ها اعم از مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به نحوی انجام می‌گیرد که گیاه بتواند بهتر با محیط تطابق پیدا کند و از امکانات مادی محیط خود به گونه شایسته‌ای استفاده کند. بطور مثال سازش بیوشیمیایی در گیاهان شامل انواع تغییرات بیوشیمیایی در سلول است. این تغییرات شامل تکامل راه‌های متابولیکی جدید، تجمع متابولیت‌های با وزن مولکولی کم، سنتز پروتئین‌های خاص، مکانیسم‌های سم‌زدایی و تغییر در میزان فیتوهورمون‌ها می‌باشند (بج‌گز و همکاران، ۲۰۰۸). در اغلب تنش‌های محیطی این تغییرات ایجاد شده و گیاهانی را که با تنش مواجه شده‌اند، در مقابله با آن تنش و سایر تنش‌ها کمک می‌کنند یکی از عمده‌ترین تنش‌های محیطی که اغلب گیاهان با آن مواجه‌اند تنش شوری می‌باشد.

۱-۲-۲-۱ تنش شوری

شوری یکی از تنش‌های مهم محیطی است، که منجر به کاهش تولیدات گیاهی شده و با ایجاد تنش اکسیداتیو می‌تواند به ماکرومولکول‌های سلولی مثل پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای هسته‌ای و سایر ترکیبات سلولی حمله کند. شوری به معنی اضافه شدن نمک‌هایی مثل سدیم کلرید، سدیم سولفات و ... به خاک یا آب است. براساس تعریف ارائه شده توسط آزمایشگاه مطالعات شوری ایالات متحده، خاک‌های شور به خاک‌هایی گفته می‌شود که هدایت الکتریکی(EC 18) در آن‌ها بیشتر از ۴ میلی موس بر سانتی‌متر بوده و درصد سدیم قابل تبادل (ESP۱) آن‌ها کمتر از ۱۵٪ باشد.

۱-۲-۲-۲ شوری در ایران و جهان

$$1\ \text{Esp} \frac{\text{یونهای سدیم قابل تبادل}}{\text{ظرفیت تبادل کاتیونی}} \times 100\ \text{Exchangable Sodium Precent}$$