

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده مهندسی کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد

متابولومیکس مقایسه‌ای کنجد در پاسخ به تنش شوری

وجیهه غدیریان

اساتید راهنما

دکتر مهدیه پارسائیان

دکتر ناصر فرخی

بهمن ۱۳۹۴

به پاس تعبیر عظیم و انسانی پدر و مادرم، از کلمه ایثار و از خودگذشتگی و به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگار ان

بهترین پشتیبان است و به پاس قلب های بزرگشان که فریادس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی

دریشان که هرگز فروکش نمی کند والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود نازنین پس از

پروردگار مایه هستی ام بوده اند و دستم را گرفتند و در این وادی زندگی پر فراز و نشیب همواره چون کوه تکیه گاه من بوده اند، این مجموعه را به ستارگان

آسمانی ام، پدر و مادر عزیزم و برادرم با محبتم، تقدیم می کنم و در برابر وجود گرمی شان زانوی ادب بر زمین می نهم و با قلبی مملو از عشق و محبت بردستان

پر مهرشان بوسه می زنم.

شکر و قدردانی

بنام آن علیمی که شعله عشق به تحصیل را در فانوس سینه پر مهر صاحبان و طالبان علم روشن نمود.

خداوند بی همتا را شاکرم که مراد میری قرار داد تا ذره ای از دانش بی کرانش را فراگیرم و توفیق را رفیق را هم ساخت تا این پژوهش را در این مرحله از تحصیل به پایان برسانم.

از پدر و مادر عزیزم که موجب دلگرمی، پیشرفت و مشوق من در تمامی مراحل زندگی ام بوده اند و در طول اجرای این رساله، همواره یار و یاورم بوده و تلاش و حمایت های بی دریغشان همواره شامل حال بنده شده است کمال شکر و قدردانی را دارم. از اساتید برجسته و فرهیخته خانم دکتر مهدیه پارسایان و آقای دکتر ناصر فرخی که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و با تواضع و فروتنی بی نظیر و بار بهمانی های کار ساز و سازنده شان کره گشای مشکلات علمی ام بوده اند، نهایت سپاسگزاری و تشکر را دارم.

از همه کسانی که مراد انجام این پژوهش یاری نمودند از جمله آقای دکتر عبد الرحمن رسول نیا (آزمایشگاه و انشگاه تهران)، کارکنان پژوهشگاه مواد انرژی کرج، آقای دکتر آرمین و سایر اساتید و کارکنان دانشگاه آزاد واحد سبزوار، خانم مهندس آمنه یوسفی کیا، که بایاری ها و راهنمایی های بی- چشمداشت شان بسیاری از سختی ها را بر ایمن آسان تر نمودند، تشکر می کنم.

وجیهه خدیریان

چکیده

پاسخ تحمل به شوری ۴۵ ژنوتیپ کنجد، از طریق تجزیه و تحلیل متابولیت‌های مرتبط با تحمل به تنش، مورد بررسی قرار گرفت. ۵ لاین داخلی (ورامین ۲۸۲۲، یکتا، داراب ۱، TN234 و TN240)، و ۴ ژنوتیپ آسیایی (مدیترانه‌ای، هندی، عراقی و پاکستانی) به همراه ۳۶ هیبرید F_1 به منظور تعیین ژنوتیپ متحمل در برابر ژنوتیپ حساس در نظر گرفته شدند. ارزیابی‌ها در محیط هیدروپونیک در گلخانه و در شرایط غیر شور، ۱۵۰ میلی مولار NaCl و ۲۰۰ میلی مولار NaCl، صورت گرفت. شوری تاثیر معنی‌داری بر تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گذاشت. در طی تنش، کاهش چشمگیری در صفات مورفولوژیک دیده شد، اما با افزایش سطوح شوری، بر میزان پرولین افزوده شد. استخراج متابولیت‌ها نیز از دو ژنوتیپ حساس (عراقی) و متحمل (زودرس × پاکستانی) در شرایط غیر شور و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl صورت پذیرفت و گستره وسیعی از متابولیت‌ها در دو ژنوتیپ به چشم خورد. ژنوتیپ متحمل، میزان بیشتری از متابولیت‌ها، نظیر پرولین، میواینوزیتول، دی‌مانیتول، سوربیتول را به خود اختصاص داد، اما ژنوتیپ حساس با وجود برخورداری از متابولیت‌های موثر در تحمل به تنش، مانند بتا آلانین، آل سرین، اسید سیتریک و آل پرولین، ممکن است به دلیل عدم وجود یا کمبود متابولیت‌های اصلی درگیر در تحمل به تنش مانند پرولین و گلیسین و میواینوزیتول، دی مانیتول نتوانسته باشد بر شرایط تنش فایق آید. پیرو استخراج متابولیت‌ها، الگوهای بیان برخی از ژن‌ها، مانند پیروولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منوفسفاتاز و فنیل آلانین آمونیالاز ۱، که در سنتز پرولین، میو اینوزیتول و اسیدهای فنولیک مانند اسید بنزوئیک دخالت دارند، در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس تحت شرایط تنش و عدم تنش، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصله می‌توان بیان نمود که ژنوتیپ متحمل (زودرس × پاکستانی) از بیان بیشتر از این دسته از ژن‌ها نسبت به ژنوتیپ عراقی برخوردار بود. در بین متابولیت‌ها می‌توان از پرولین و میواینوزیتول به عنوان متابولیت‌های موثر در تحمل تنش شوری در کنجد نام برد.

کلمات کلیدی: متابولیت، حساس، متحمل، شوری، کنجد

مقالات مستخرج شده از پایان نامه

۱- سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران: وجیهه غدیریان، مهدیه پارسائیان، ناصر فرخی. تجزیه ساختار ژنتیکی برخی صفات مرتبط با کیفیت و بنیه بذر در کنجد. ۱۳۹۲. تهران.

۲- دومین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی ایران: وجیهه غدیریان، مهدیه پارسائیان، ناصر فرخی. تاثیر سطوح مختلف شوری (NaCl) بر میزان پرولین و رشد گیاهچه کنجد (*Sesamum indicum L.*). ۱۳۹۴. تهران.

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۱-۲ اهداف مطالعه	۴
۱-۳-۱ کنجد	۴
۱-۳-۱ گیاه شناسی	۴
۱-۳-۲ خاستگاه جغرافیایی	۵
۱-۳-۳ تحقیقات به‌نژادی انجام گرفته بر روی کنجد	۶
۱-۳-۴ کیفیت روغن کنجد	۷
۱-۳-۴-۱ محتوای روغن و ترکیب اسیدهای چرب	۷
۱-۳-۵ اهمیت کنجد در پزشکی	۸
۱-۴-۱ تنش شوری	۹
۱-۴-۱ مکانیسم خسارت شوری	۱۱
۱-۴-۲ مکانیسم تحمل به شوری	۱۲
۱-۴-۲-۱ مکانیسم‌های مورفولوژیکی تحمل به شوری	۱۳
۱-۴-۲-۲ مکانیسم‌های فیزیولوژیکی تحمل به شوری	۱۳
۱-۴-۲-۳ مکانیسم‌های بیولوژیکی پاسخ به تنش شوری	۱۷
۱-۵ متابولیت‌ها	۲۴
۱-۶-۱ متابولومیکس در واکنش گیاه به تنش	۲۶
۱-۶-۳ روش‌های شناسایی و مطالعه‌ی متابولوم و متابولومیکس	۲۸
۱-۶-۳-۱ کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی	۲۸
۱-۷-۱ روش‌های آماری آنالیز متابولوم و داده‌های آن	۲۹
۱-۷-۱ تجزیه به مولفه‌های اصلی	۳۰
۱-۸ مطالعات بیوانفورماتیک متابولومیکس	۳۱

فهرست مطالب

فصل دوم: مرور منابع	۳۳
۱-۲ تنش شوری.....	۳۴
۲-۲ بیان ژن در تنش شوری.....	۳۵
۳-۲ پروتئین در تنش شوری.....	۳۶
۴-۲ متابولومیکس در تنش شوری.....	۳۸
فصل سوم: مواد و روش ها	۴۱
۱-۳ مواد	۴۲
۲-۳ تجهیزات	۴۳
۳-۳ درصد و سرعت جوانه زنی	۴۳
۴-۳ کشت هیدروپونیک کنجد.....	۴۴
۵-۳ شناسایی ژنوتیپ متحمل و حساس به شوری بر اساس اندازه گیری صفات مورفولوژیک	۴۵
۶-۳ پرولین آزاد برگ:	۴۵
۷-۳ استخراج متابولیت ها.....	۴۶
۸-۳ استخراج RNA	۴۶
۹-۳ تعیین کیفیت و کمیت RNA	۴۷
۱۱-۳ سنتز cDNA	۴۸
۱۲-۳ طراحی پرایمر	۴۸
۱۳-۳ واکنش زنجیره ای پلیمرز استاندارد جهت تأیید سنتز cDNA	۴۹
۱۴-۳ تجزیه آماری	۴۹
فصل چهارم: نتیجه گیری	۵۱
۱-۴ اندازه گیری صفات مورفولوژیک	۵۲
۴-۴ استخراج متابولیت	۶۷
۵-۴ مدل رگرسیون مرحله ای Step Wise multiple regression	۸۴

فهرست مطالب

۶-۴ بیان ژن.....	۹۰
۶-۴-۱ ژن بتا اکتین.....	۹۰
۶-۴-۲ ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز.....	۹۱
۶-۴-۳ اینوزیتول منوفسفاتاز (IMP).....	۹۲
۶-۴-۴ فنیل آلانین آمونیا لیاز ۱ (PAL).....	۹۳
فصل پنجم: بحث و پیشنهادات.....	۹۵
۱-۵ قندها.....	۹۷
۱-۱-۵ قندهای الکلی یا پلی ال‌ها.....	۱۰۰
۲-۵ ترکیبات فنولی.....	۱۰۵
۱-۲-۵ اسید بنزوئیک.....	۱۰۵
۳-۵ اسیدهای چرب.....	۱۰۷
۴-۵ ترکیبات نیتروژن دار.....	۱۰۸
۵-۵ اسید گاما آمینوبوتریک (اسید بوتانوئیک).....	۱۱۴
۶-۵ اسید بتا آمینوبوتریک.....	۱۱۶
۷-۵ اسیدهای آلی.....	۱۱۶
۸-۵ ترکیبات فسفر دار.....	۱۱۷
۹-۵ آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS).....	۱۱۷
۱۰-۵ آنزیم اینوزیتول منو فسفاتاز (IMP).....	۱۱۹
۱۱-۵ آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL).....	۱۲۰
۱۲-۵ نتیجه‌گیری کلی.....	۱۲۱
پیشنهادهات.....	۱۲۳
پیوست‌ها.....	۱۲۵
منابع.....	۱۴۷

فهرست جداول

جدول ۱-۱ طبقه بندی کیفی آب، آبیاری	۱۰
جدول ۲-۱ ژنها و عوامل رونویسی موثر در تحمل تنش	۱۸
جدول ۳-۱ ویژگی پرایمرهای ژن همیشه بیان بتا اکتین، پرولین ۵ کروبوکسیلات سنتتاز (FDPCS)، میواینوزیتول منو فسفاتاز (FMIPS)، فنیل آلانین آمونیا لیاز ۱ (FPAL1)	۴۸
جدول ۴-۱: میانگین مربعات برای درصد و سرعت جوانه زنی برای ژنوتیپ های مورد بررسی کنجد	۵۳
جدول ۴-۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای سرعت جوانه زنی و درصد جوانه زنی بذر	۵۳
جدول ۴-۳ میانگین مربعات صفات محتوای پرولین برگ، طول ساقه چه و ریشه چه، قطر ساقه چه، وزن تر و خشک گیاهچه، در ژنوتیپ های کنجد تحت تنش شوری	۵۷
جدول ۴-۴ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات طول ساقه چه، طول ریشه چه، قطر ساقه چه	۵۸
جدول ۴-۵ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ	۶۰
جدول ۴-۶ ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه در شرایط تنش و عدم تنش	۶۴
جدول ۴-۷ میانگین صفات زراعی گروه های حاصل از تجزیه خوش های	۶۶
جدول ۴-۸ فاصله ژنتیکی درون و بین گروه های حاصل از تجزیه خوش های	۶۷
جدول ۴-۹ تجزیه واریانس متابولیت های استخراج شده	۶۹
جدول ۴-۱۰ متابولیت های استخراج شده در تیمار شاهد	۷۱
جدول ۴-۱۱ متابولیت های استخراج شده در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک	۷۲
جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای متابولیت های استخراج شده	۸۱
جدول ۴-۱۳ تفاوت دو ژنوتیپ حساس و متحمل در تولید متابولیت ها	۸۳
جدول ۴-۱۴ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت طول ریشه چه	۸۵
جدول ۴-۱۵ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت وزن خشک گیاهچه	۸۷
جدول ۴-۱۶ نتایج رگرسیون مرحله ای برای میزان پرولین برگ	۸۷
جدول ۴-۱۷ تجزیه واریانس میزان بیان ژن بتا اکتین در برگ کنجد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش	۹۱

فهرست جداول

جدول ۴-۱۸ تجزیه واریانس میزان بیان ژن پیرولین ۵ کریوکسیلاز سنتتاز در برگ کنجد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش شوری	۹۲
جدول ۴-۱۹ تجزیه واریانس میزان بیان ژن اینوزیتول منو فسفاتاز، در برگ کنجد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش	۹۳
جدول ۴-۲۰ تجزیه واریانس میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL1) در برگ کنجد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش	۹۴
جدول ۴-۲۱ اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای ژنهای مورد بررسی.....	۹۴
جدول پیوست ۱ : نام و مشخصات لاینهای والدینی کنجد ارزیابی شده در این پژوهش.....	۱۲۶
جدول پیوست ۲ عناصر ماکرو محلول هوگلند.....	۱۲۶
جدول پیوست ۳:عناصر میکرو محلول هوگلند.....	۱۲۷
جدول پیوست ۴ : هدایت الکتریکی محلول هوگلند (دسی زیمنس بر متر).....	۱۲۷
جدول پیوست ۵ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای درصد و سرعت جوانه زنی بذر	۱۲۸
جدول پیوست ۶: میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات وزن تر و وزن خشک گیاهچه، میزان پرولین.....	۱۲۹
جدول ۷ پیوست میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای متابولیت های استخراج شده.....	۱۳۱
جدول پیوست ۸ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت درصد جوانه زنی.....	۱۳۲
جدول پیوست ۹ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت سرعت جوانه زنی.....	۱۳۲
جدول پیوست ۱۰ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت طول ساقه چه.....	۱۳۳
جدول پیوست ۱۱ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت قطر ساقه چه.....	۱۳۳
جدول پیوست ۱۲ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای بیان ژنهای بتا اکتین، پیرولین ۵ کریوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منو فسفاتاز، فنیل آلانین آمولیاژ ۱	۱۴۵

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱ موقعیت‌های مکانی ژنوتیپ‌های کنگد در ایران با شرایط آب و هوایی ۵
- شکل ۲-۱ تولید کنگد در جهان (تن) و سطح زیر کشت آن ۶
- شکل ۳-۱ مسیر سیگنال‌های مسئول یون سدیم ۱۹
- شکل ۴-۱ نمایش شماتیک پروتئین‌های عمده پاسخ به تنش نمک ۲۰
- شکل ۵-۱ نقشه‌برداری ژنومی از فنوتیپ مولکولی توسط نقشه‌برداری جایگاه صفت کمی و تکنیک‌های مرتبط با آن ۲۳
- شکل ۳-۱ کشت هیدروپونیک کنگد ۴۴
- شکل ۱-۴ نمودار تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مور فلوژیک ۶۵
- شکل ۲-۴: بررسی بیان ژن همیشه بیان بتا اکتین، ۹۰
- شکل ۳-۴: بررسی بیان ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز ۹۱
- شکل ۴-۴: بررسی بیان ژن میواینوزیتول منو فسفاتاز ۹۲
- شکل ۵-۴: بررسی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیز ۱ ۹۳
- مسیرهای سنتز متابولیتها در گیاهان تحت تنش شوری ۱۳۴
- شکل پیوست ۱: مروری شماتیک از متابولیسم نشاسته، فروکتان، قندها و پلی‌ال‌ها در گیاهان ۱۳۴
- شکل پیوست ۲: مدل شماتیک از مسیر بیوسنتز ساکارز، مسیر متابولیکی فروکتوز شامل فروکتوز کیناز ۱ ۱۳۵
- شکل پیوست ۳: مسیر مدل شبکه سگنالینگ هگزوزها در آرابیدوپسیس ۱۳۵
- شکل پیوست ۴: مسیر بیوسنتز میواینوزیتول ۱۳۶
- شکل پیوست ۵: مسیر سنتز مانیتول و سوربیتول ۱۳۷
- شکل پیوست ۶: مسیر بیوسنتز گلیسرول ۱۳۸
- شکل پیوست ۷: مسیر بیوسنتز اسید بنزوئیک ۱۳۹
- شکل پیوست ۸: مروری شماتیک از متابولیسم اسیدهای آمینه، پلی‌آمین‌ها و گلیسین ۱۴۰
- شکل پیوست ۹: مسیر بیوسنتز پرولین ۱۴۱
- شکل پیوست ۱۰: مسیر آرژنین و سنتز پرولین ۱۴۲
- شکل پیوست ۱۱: مسیر سنتز گلیسین و دو مسیر سنتز سرین ۱۴۳
- شکل پیوست ۱۲: مسیرهای منجر به گلیسین در گیاهان ۱۴۳

فهرست شکل‌ها

شکل پیوست ۱۳: مسیر سنتز والین ۱۴۴

شکل پیوست ۱۴: مسیر سنتز اسیدهای آلی و ارتباط آنان با تولید سایر متابولیت‌ها در آرابیدوپسیس ۱۴۵

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه

روند افزایش جمعیت در جهان موجب شده است، که افزایش تولید غذا به یکی از دغدغه‌های انسان تبدیل شود. علم کشاورزی عهده‌دار تولید محصولات مرغوب و با کیفیت بهتر است، به طوری که بتواند جوابگوی افزایش جمعیت باشد (فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰).

تنش به معنای از بین رفتن شرایط طبیعی در سطوح مختلف محیطی، گیاه، سلول و حتی اجزای سلولی است. رطوبت، دما، تشعشع، مواد غذایی و گازها بسته به مقدارشان در محیط می‌توانند رشد گیاهان را افزایش یا کاهش دهند (زادوریان و همکاران، ۱۳۹۰). مقدار یا غلظت نامناسب این عوامل باعث ایجاد تنش در گیاه می‌شود. عوامل تنش‌زا اغلب با تغییر در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه باعث ایجاد صدمه و کاهش عملکرد می‌شوند (کافی و همکاران، ۱۳۸۱ و برودان و همکاران، ۲۰۰۳). گیاه می‌تواند به حالت طبیعی باز گردد (تنش موقت) و چنانچه تنش فراتر از محدوده تحمل گیاه باشد، آسیب و یا حتی مرگ گیاه را به دنبال دارد (تنش دائمی). تنش‌های محیطی در مجموع به دو دسته تنش‌های زنده (آفات و بیماری‌ها) و تنش‌های غیرزنده (کم‌آبی، شوری، گرما، سرما و عناصر سنگین) تقسیم می‌شوند که به صورت طبیعی موجب کاهش عملکرد گیاهان می‌گردند (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷).

تنش شوری در بسیاری از نقاط جهان خطری جدی برای رشد گیاهان و تولید محصولات زراعی به شمار می‌رود. افزایش سطح نمک‌های محلول در آب (نمک طعام، کربنات سدیم، کلرید کلسیم)، منجر به تولید خاک شور می‌گردد و اقلیم‌های خشک و نیمه خشک بیشتر در معرض این تنش قرار دارند. تأثیرات تنش شوری در سطح کل گیاه بیان می‌شود و در طول تمام مراحل رشد مشاهده می‌گردد (چاندنا و همکاران، ۲۰۱۳). خاک‌های شور در ایران بالغ بر ۲۵ میلیون هکتار تخمین زده می‌شود و اهمیت بهره‌گیری از این اراضی در تولید محصول ایجاب می‌کند تا علاوه بر اقداماتی که در زمینه معرفی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری صورت می‌گیرد، فعالیت‌های جهت‌دار و دامنه‌داری در زمینه بهبود ژنوتیپ‌ها برای این قبیل اراضی انجام شود. انتخاب و غربال ژنوتیپ‌های متحمل به تنش به دو روش مستقیم، سنجش عملکرد و غیرمستقیم بر اساس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک که با تحمل تنش همبستگی دارند، انجام می‌شود. یکی از راه‌های مقابله با شوری انتخاب و یافتن ژنوتیپ‌های متحمل به شوری از طریق به کارگیری روش‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی است (چو و همکاران، ۲۰۱۱).

با توجه به اینکه بخش وسیعی از زمین‌های زیرکشت بسیاری از محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک قرار دارد، این گیاهان در معرض شرایط نامطلوب محیطی قرار می‌گیرند. افزایش توان گیاهان از جهت تحمل تنش-های محیطی ناشی از کمبود آب و حضور املاح اضافی در خاک، از نظر تقلیل افت عملکرد اهمیت زیادی دارد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۵). استفاده از بیوتکنولوژی و اصلاح ژنتیکی گیاهان برای افزایش تحمل آن‌ها به تنش‌های غیرزنده، موضوعی است که امروزه مورد مطالعه قرار گرفته است. امروزه استفاده از تکنیک‌های امیکس (ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس) امکان مطالعه هم‌زمان بیان هزاران ژن و صدها پروتئین در شرایط مختلف از جمله تنش‌های غیرزنده و ارتباط آن‌ها با تغییرات متابولومی را فراهم می‌آورد (هیل و کزادرنا، ۲۰۱۵ و دهقان و همکاران، ۱۳۹۱). این تکنیک‌ها، ابزارهای مناسبی جهت شناسایی ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در فرآیند سازگاری و مقاومت به تنش‌های محیطی در گیاهان محسوب می‌شوند (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵). در واقع زیست‌شناسی گیاهی بر روی توسعه نمایه کامل ژن‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌های مسئول مکانیسم‌های مختلف تحمل به تنش شوری در گونه‌های مختلف گیاهی متمرکز شده‌است (گوپتا و همکاران، ۲۰۰۵). حل مشکلات تنش شوری، نیازمند راهکاری منسجم است که آن مدیریت منابع، اصلاح و تولید گیاهانی است که بتوانند در شرایط شوری رشد و نمو کنند، که این کار مهم نیز از بیوتکنولوژی ساخته است. کاربرد بیوتکنولوژی با تولید پایه‌هایی که بتوانند در شرایط شوری رشد و نمو کنند، امکان زیر کشت بردن ده‌ها هزار هکتار از این اراضی شور را فراهم می‌آورد. بنابراین، بهره‌گیری از بیوتکنولوژی برای تولید گیاهان متحمل به خشکی و شوری، از نخستین عوامل موفقیت در امر تحمل در برابر تنش شوری است (جوزانی، ۱۳۸۷). یک راهکار کلیدی و اساسی در این رابطه، شناسایی ژن‌های پاسخ ده به تنش شوری در محیط‌های رشد اصلی گیاه می‌باشد. راه دیگر پروتئومیکس و متابولومیکس می‌باشد که دو تکنیک امیکس مهم هستند، پروتئومیکس یک ابزار قدرتمند برای توصیف پروتئوم کامل در سطوح سلول و بافت است و می‌تواند جهت مقایسه پروتئوم در شرایط مختلف تنش، مانند قرار گرفتن در غلظت بالای نمک استفاده شود (هیل و روسنر، ۲۰۱۳ و کاوار و همکاران، ۲۰۰۷). پاسخ بیوشیمیایی گیاه به شرایط تنش‌زا را می‌توان از طریق تاثیر بر روی میزان متابولیت‌های خاص شناسایی نمود، در نتیجه شناسایی و تشخیص همزمان تکنیک متابولیت‌ها در جهت مطالعه تغییرات پیوسته مسیرهای متابولیک و شناسایی نقش هر متابولیت در پاسخ به تنش یا عوامل مختلف دیگر لازم و ضروری است (اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع خصوصیات متابولیت‌های موجودات می‌تواند در ارائه اطلاعات از وضعیت متابولیکی موجود زنده برای ارزیابی پاسخ‌های بیولوژیکی ناشی از عوامل بیرونی کمک کند (چو و همکاران، ۲۰۱۱). علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجهی در درک تنش در گیاه، هنوز هم شکافی عظیم در دانش ما درباره ژن‌ها و پروتئین-

های پاسخ دهنده به تنش و متابولیت‌های تامین کننده انرژی وجود دارد و همچنان ناقص مانده و کامل نشده است، لذا به طبع آن بسیاری از مکانیسم‌های سلولی-مولکولی و فرآیندهایی که در ایجاد پاسخ و بروز رفتار در شرایط تنش نقش دارند، کشف نشده‌اند یا در ابهام باقی مانده‌اند. تمرکز آینده باید در راستای مطالعات بین سلولی و مولکولی و تعامل داخل سلول در پاسخ به تنش شوری باشد (هیل و کزادرنا، ۲۰۱۵).

۱-۲ اهداف مطالعه

در این مطالعه به بررسی متابولوم گیاه کنجد در تنش شوری پرداخته شد. در قالب این پژوهش اهدافی نظیر شناسایی ژنوتیپ کنجد متحمل به تنش شوری و بررسی متابولیت‌های موجود در آن دنبال گردید.

۱-۳-۱-۳ کنجد

۱-۳-۱-۳ گیاه شناسی

کنجد ($2n = 26$) از دانه‌های روغنی خانواده‌ی *Pedaliaceae* است که گونه زراعی آن با نام علمی *Sesamum indicum* یکساله، خودگشن و رشد نامحدود است. این گیاه به دلیل دارا بودن درصد روغن بالا از جایگاه ممتازی در میان دانه‌های روغنی برخوردار است. دانه کنجد دارای ۵۰-۶۰٪ روغن، ۲۰٪ پروتئین، ۷/۸٪ کربوهیدرات و ۹/۴٪ مواد معدنی مثل فسفر، کلسیم، سدیم، آهن، منگنز، منیزیم، مس و ویتامین‌های B_1 و E_1 از ارزش غذایی بالایی برخوردار است (لائورنتین، ۲۰۰۷). روغن آن حاوی اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک، پالمیتیک و استئاریک است، و علی رغم دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع، در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی با ترکیب اسیدهای چرب تقریباً مشابه، به طرز شگفت‌آوری به دلیل وجود آنتی اکسیدان لیگنان نسبت به اکسیداسیون پایدار است (هیرمس و همکاران، ۲۰۰۷). لیگنان‌های سزامین (۱-۵٪ درصد) و سزامولین (۰/۵-۰/۳ درصد) و مشتقات آن‌ها شامل سزامول و سزامینول، آنتی اکسیدانت‌های فنولی و منحصر به فرد روغن کنجد می‌باشند، که دوام و پایداری بالایی را در روغن کنجد ایجاد می‌کند (لائورنتین، ۲۰۰۷ و یزدی و همکاران، ۱۳۹۳). ضمن اینکه مصرف آن‌ها از غشاهای سلولی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در برابر واکنش‌های اکسیداتیو و وقوع جهش‌ها و سرطان‌ها محافظت می‌کند (شاسمیت‌ها، ۲۰۱۵). به دلیل کیفیت بالا، روغن این گیاه را ملکه دانه‌های روغنی می‌نامند. در ایران به دلیل ارزش غذایی بالایی که برای آن قائل هستند، از آن به عنوان روغن پهلوانی یاد می‌کنند (کیران و همکاران، ۲۰۰۸). کنجد به راحتی می‌تواند رطوبت خاک را به دلیل داشتن ریشه‌های قوی و عمیق ذخیره کند و با حداقل آبیاری و یا بارندگی، عملکرد خوبی در دماهای بالا داشته باشد. این گیاه دانه روغنی در طیف گسترده‌ای از خاک‌ها امکان رشد دارد، اما

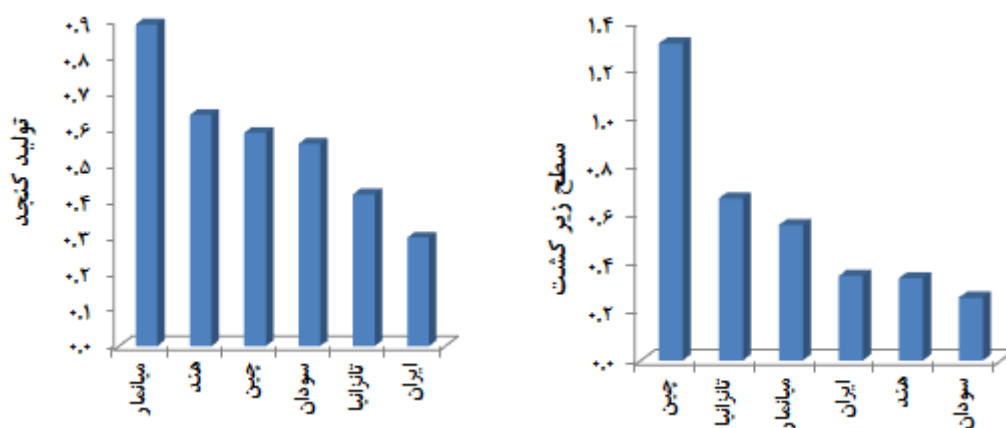
خاک مناسب آن از نوع آبرفتی سست و حاصلخیز و شنی با pH بین ۵/۵-۵/۴ می‌باشد. این گیاه متحمل به خشکی و شوری است (فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰).

۱-۳-۲ خاستگاه جغرافیایی

کنجد در مناطق گرمسیری رشد می‌کند. با وجود اینکه در دما و شدت نور بالا محصول بهتری می‌دهد، اما به شرایط مختلف سازگار است (طباطبائی و همکاران، ۲۰۱۱). دماهای پایین (کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد) باعث کاهش رشد، تأخیر در پرشدن دانه، کاهش عملکرد و میزان روغن می‌شود. دماهای بالاتر از ۴۰ درجه در گرده‌افشانی و تشکیل دانه تأثیرگذار می‌باشد و کاهش عملکرد را به دنبال دارد (محمود و همکاران، ۲۰۰۳). این گیاه در کشورهای مختلفی از قبیل هند، تایلند، مکزیک، گواتمالا، آفریقا، پاکستان، ایران، عربستان سعودی، افغانستان و ترکیه دیده شده است. در ایران در مناطقی مانند ورامین تا گرمسار، سیستان و بلوچستان، کشت می‌گردد (شکل ۱-۱)، اما درمورد خاستگاه اهلی شدن آن اطلاعاتی موجود نیست (بهرامی و همکاران، ۲۰۱۲). به طور کلی تولیدکنندگان عمده این محصول در دنیا چهار کشور میانمار، هند، چین و سودان می‌باشند (شکل ۲-۱).



شکل ۱-۱ موقعیت‌های مکانی ژنوتیپ‌های کنجد در ایران با شرایط آب و هوایی. دشت مغان، ساری، کرج، ورامین تا گرمسار، سیستان و بلوچستان، کراب بیشترین کشت کنجد را به خود اختصاص دادند (طباطبائی و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل ۱-۲ تولید کنجد در جهان (تن) و سطح زیر کشت آن (هکتار) در سال ۲۰۱۳ (فائو، ۲۰۱۳). در این نمودارها مشخص شده است که در ایران نسبت به کشورهای دیگر، توجه کمتری به کشت کنجد شده است.

۱-۳-۳ تحقیقات به‌نژادی انجام‌گرفته بر روی کنجد

تاکنون به دلیل عدم اطلاع کافی از اهمیت کنجد و تنوع ارقام آن و عدم امکانات برای تحقیق در مناطق کشت، کارهای اصلاحی زیادی روی کنجد انجام نپذیرفته است. فقدان ژرم پلاسما دارای تنوع وسیع، عدم پیوستگی و انسجام پروژه‌ها، تبادل محدود اطلاعات و مواد ژنتیکی و فقدان انگیزه کافی جهت سرمایه‌گذاری‌های شرکت‌های تجاری از دلایل دیگر کاستی فعالیت‌های به‌نژادی در این گیاه می‌باشند (لائورنتین، ۲۰۰۷). از محدود کارهای صورت‌گرفته، تولید واریته‌های بدون ریزش با عملکرد بالا و مناسب برای برداشت مکانیزه می‌باشد، به عنوان مثال واریته‌های کنجد بدون ریزش با پتانسیل عملکرد بالاتر از یک تن در هکتار و مناسب برای برداشت مکانیزه توسط اصلاحگران کنجد در آمریکا تولید شده است، البته روش‌های اصلاحی موفقی در برخی از کشورها مانند هند و ونزوئلا و ... انجام پذیرفته - است، که این روش‌ها شامل واردکردن ارقام به منظور انتخاب رقم برتر و تلاقی برای ایجاد تنوع، است (شاسمیت‌ها، ۲۰۱۵). اهداف کلی اصلاحی کنجد شامل دست‌یابی به عملکردهای بالاتر و پایدارتر، اصلاح خصوصیات گیاهچه‌ای-کنجد (مثلا ریشه‌هایی مقاوم برای استقرار بهتر)، رشد بهتر به منظور رشد سریعتر نسبت به علف‌های هرز، امکان برداشت قبل از صدمه دیدن توسط آفات و علف‌های هرز، تحمل به بیماری‌ها و تنش‌های غیر زیستی و همچنین افزایش کیفیت دانه‌ی‌کنجد، افزایش درصد روغن و افزایش لیگنان‌های آن به منظور نگهداری طولانی مدت می‌باشد (هیرمس و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۳-۴ کیفیت روغن کنجد

کنجد به عنوان گیاهی دانه روغنی مطرح می‌شود و از کیفیت و کمیت روغن برتری در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی برخوردار است. امروزه اغلب تولید کنجد جهان به منظور فرآوری و استخراج روغن و در صنایع غذایی و شیرینی پزی مصرف می‌گردد (وانگ، ۲۰۰۵). تجزیه ترکیبات دانه نشان می‌دهد که عمده‌ترین ترکیب دانه کنجد را روغن و پس از آن پروتئین تشکیل می‌دهد. روغن این گیاه از لحاظ کیفیت هم ردیف روغن زیتون قرار دارد و در بسیاری از کشورهای اروپایی به عنوان جایگزین روغن زیتون مصرف می‌شود. این روغن در زمره‌ی روغن‌های گیاهی خوراکی، تقریباً شفاف و به رنگ زرد روشن با طعمی مطبوع قرار دارد که مبرا از هرگونه ترکیبات سمی است (کیران و همکاران، ۲۰۰۸). ویژگی مهم روغن کنجد، پایداری بسیار بالای آن است که مانع از تغییر مزه و باعث ماندگاری بالای غذاهایی می‌شود که با این روغن طبخ می‌گردند، همچنین از روغن آن در صنایع داروسازی، عطر سازی، تهیه انواع صابون‌ها و شوینده‌ها، رنگ‌سازی و ساخت حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود (بهرامی و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۳-۴-۱ محتوای روغن و ترکیب اسیدهای چرب

اسیدهای چرب ضروری، دسته‌ای از اسیدهای چربی هستند که بدن توانایی ساخت آن‌ها را ندارد و برای سلامت بدن ضروری می‌باشند و منجر به ممانعت از رسوب کلسترول در جدار رگ‌ها، محافظت در برابر اشعه ایکس، مبارزه با بیماری‌های قلبی، عروقی و بهبود زخم می‌گردد و کمبود آن‌ها منجر به ضایعات کلیوی، اختلال شدید در رشد، سقط جنین و غیره می‌شود. اسید لینولیک و مشتقات آن با زنجیره کربنی طویل و اسید آراشیدونیک و اسید اولئیک، در گروه این اسیدهای چرب ضروری قرار دارند که از اسیدهای چرب غیر اشباع محسوب می‌شوند و به صورت سیس هستند. بررسی‌های انجام شده بر محتوای روغن کنجد این اسیدهای چرب ضروری را در روغن کنجد به اثبات رساندند (پرویز و همکاران، ۲۰۰۸).

محتوای روغن دانه کنجد در گستره‌ای بین ۳۴/۴ تا ۵۹/۸ درصد و به طور متوسط حدود ۵۰ درصد می‌باشد (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵). در برخی واریته‌ها مقادیر ۶۳/۲ درصد نیز گزارش شده است (گابالا و همکاران، ۲۰۰۷). روغن کنجد به دلیل داشتن اسیدهای چرب اشباع نشده بالا و نیز مقادیر پائینی از اسیدهای چرب اشباع شده از نظر ارزش غذایی و به لحاظ تجاری مطلوب می‌باشد (شاسمیت‌ها، ۲۰۱۵). روغن این گیاه، با برخورداری از ۸۰ تا ۸۵ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع و تنها ۱۵ تا ۲۰ درصد اسیدهای چرب اشباع شده، ترکیب رضایت بخشی از اسیدهای چرب را دارا

می‌باشد که به طور قابل توجهی بین واریته‌های مختلف، متفاوت است و همین تنوع امکان دست ورزی خصوصیات کیفی روغن کنجد را فراهم می‌کند (لائورنتین، ۲۰۰۷). با این حال نحوه کنترل ژنتیکی ترکیب اسیدهای چرب روغن کنجد شناخته نشده است. اولئیک (با دامنه ۵۳/۹٪ تا ۳۲/۷٪)، لینولئیک (۴۵/۶٪ تا ۲۹/۹٪)، پالمیتیک (۱۴/۶٪ تا ۸/۳٪) و استئاریک (۶/۸٪ تا ۳/۴٪) چهار اسید چرب عمده روغن کنجد هستند که علاوه بر آن‌ها، مقادیر کمی از اسیدهای چرب آراشیدونیک، اکاسنوئیک، و اکسینیک نیز در روغن آن وجود دارد (فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰). اسید اولئیک (C18:1) و اسید لینولئیک (C18:2) به عنوان عمده‌ترین اسیدهای چرب غیر اشباع، با مقادیر تقریباً برابر، حدود ۸۵ درصد از کل اسیدهای چرب روغن کنجد را تشکیل می‌دهند، با این حال واریته‌های دارای اسید اولئیک یا لینولئیک بالای ۶۰ درصد نیز ندرتاً گزارش شده‌اند (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷). پالمیتیک (C16:0) و استئاریک (C18:0) عمده‌ترین اسیدهای چرب اشباع شده روغن کنجد به شمار می‌روند (وانگ، ۲۰۰۵). اخیراً تلاش‌هایی در جهت تغییر کیفیت روغن کنجد با استفاده از روش انتقال ژن صورت گرفته است و کاربرد روش‌های نوین غربالگری نظیر اسپکتروسکوپی مادون قرمز (NIR) که روشی ساده، سریع، تکرار پذیر و گاهی غیر مخرب است، راه را برای تغییر خصوصیات کیفی روغن جهت مصارف خاص هموارتر نموده است (هیرمس و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۳-۵ اهمیت کنجد در پزشکی

کنجد منبع مواد مغذی گیاهی مهمی مانند اسیدهای چرب امگا ۶، آنتی اکسیدان‌های فنولیکی فلاونوئید، ویتامین‌ها و فیبر با پتانسیل ضد سرطان و نیز خواص ارتقا دهنده سلامتی است (دینی ترکمانی و همکاران، ۱۳۸۶). مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات کنجد بیانگر حضور اسید کربوکسیلیک و گروه‌های فنولیک در روغن آن و برخی از مهمترین استرهای اسیدهای چرب مختلف، لیگنان‌ها و اسید مریستیک می‌باشد و از آن‌ها به عنوان ضد سرطان، ملین، محافظ کبد یاد شده است (هیرمس و همکاران، ۲۰۰۷). این گیاه دارای فعالیت دارویی مانند ضد تب، ضد التهاب و ضد درد می‌باشد. کنجد قادر به فعالیت‌های آنتی اکسیدانی مانند افزایش بازیافت ویتامین E، کمک به کبد و محافظت از کبد در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از مصرف الکل و کمک به سم زدایی کبد از مواد شیمیایی، کاهش کلسترول، محافظت در برابر تنش اکسیداتیو عامل مسمومیت اندوتوکسین و آسیب به بافت‌ها و سلول‌ها، می‌گردد (وانگ، ۲۰۰۵). طبق مطالعات انجام شده، لینگنان‌های کنجد در رژیم غذایی آثاری مانند کاهش سطح کلسترول خون و افزایش ویتامین E را به دنبال دارند (کوکا و همکاران، ۲۰۰۷). از کنجد علاوه بر مصرف خوراکی، در طب سنتی نیز استفاده می‌شود. از عصاره ریشه‌ی آن جهت بهبود آسم و سرفه و از برگ و دانه‌های آن به عنوان منعقدکننده خون استفاده می‌گردد.

عصاره این گیاه خواص آنتی‌توموری دارد (شاسمیت‌ها، ۲۰۱۵). روغن کنبج باعث افزایش سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز می‌شود که منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌گردد، رادیکال‌های آزاد در محل زخم، به غشای سلولی، نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها و نیز چربی‌ها آسیب می‌رسانند. در این زمینه چند آنتی اکسیدان ذکر شده و نیز دیگر آنتی-اکسیدان‌ها مانند کورکومین همراه ویتامین E گزارش شده است که حفاظت در برابر تنش اکسیداتیو را برعهده دارند و به بافت‌ها کمک می‌کنند. روغن کنبج با برخورداری از سزامین و مشتقات آن، می‌تواند اثرات ضد فشار خون را ایجاد کند (دادخواه و همکاران، ۱۳۸۸). محققین پیشنهاد نمودند که سزامین، به عنوان پیشگیری مفید از فشار خون بالا و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. پپتیدهای دانه‌های روغنی کنبج، برای عوامل بیماری‌زای شایع پوستی مانند اورئوس و استرپتوکوکوس به عنوان ضد باکتری عمل می‌کنند و عمل ضد قارچی در برابر قارچ‌های ایجاد کننده زخم دارند و باعث بهبود زخم می‌گردند، اخیراً ژل حاوی کنبج و ورغن آن برای بهبود زخم و انواع سوختگی‌ها تولید و عرضه شده است (محمود و همکاران، ۲۰۰۳ و فرودل و همکاران، ۱۳۹۰). بیان شده است که روغن کنبج، به مهار رشد تومورهای بدخیم در شرایط آزمایشگاهی موفق بوده است و به مهار گسترش سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسان کمک می‌کند. روغن کنبج گاما توکوفرول پلاسما و نیز فعالیت ویتامین E را افزایش می‌دهد و در نتیجه به جلوگیری از سرطان و بیماری‌های قلبی کمک می‌کند. فیبر کنبج به عنوان ضد تومور، ضد زخم، و ضد سرطان عمل می‌کند. مطالعات اخیر نشان دادند که کنبج برای رفع بیماری‌های مزمنی از قبیل هیپاتیت و دیابت نیز مفید است (شفاهی و همکاران، ۱۳۸۷).

۴-۱ تنش شوری

هر عاملی که مراحل متابولیک طبیعی یک گیاه را به وقفه اندازد یا محدود نماید یا به طور زیان‌آوری تسریع کند و از این طریق آثار سوء بر رشد و نمو گیاهان به جای بگذارد، تنش نامیده می‌شود (حسینی و همکاران، ۱۳۸۵ و داداشی و همکاران، ۱۳۸۶). در واقع تنش، نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیک است که از تاثیر یک یا ترکیبی از عوامل محیطی (زنده و غیر زنده) حاصل می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۱). عوامل محیطی غیر زنده به عنوان منبع اصلی کاهش عملکرد شناخته شده‌اند و پیش بینی شده است که حدود ۷۰٪ از پتانسیل عملکرد محصولات کشاورزی تحت شرایط نامساعد محیطی حتی در کشاورزی‌های پیشرفته از دست می‌رود (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). در بین عوامل محیطی غیر زنده، تنش شوری و خشکی از رایج ترین و مهمترین تنش‌های محیطی هستند که رشد و نمو گیاهان را از طریق تغییر در متابولیسم و بیان ژن‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهند و به این ترتیب مهمترین عوامل کاهنده عملکرد در

اکثر مناطق کشت گیاهان زراعی می‌باشند (قادری و همکاران، ۱۳۸۱ و مصطفوی و همکاران، ۱۳۹۱). براساس تعریف شانون و گریو (۱۹۹۹)، شوری عبارت است از حضور بیش از اندازه نمک‌های قابل حل و عناصر معدنی و محلول در آب و خاک که منجر به تجمع نمک در ناحیه ریشه می‌شود و گیاهان را در جذب آب کافی از محل خاک با مشکل روبه‌رو می‌کند (شانون و گریو، ۱۹۹۹). اصولاً خاک شور، به خاکی گفته می‌شود که غلظت املاح آن به حدی است که عملکرد را کاهش دهد، مشروط بر آنکه سایر عوامل مانعی برای رشد محصول نباشند (مورا و همکاران، ۲۰۱۴). از این تعریف به خوبی استنباط می‌شود که شوری مفهومی وابسته به گیاه است، بنابراین در کشاورزی، شوری در سیستم‌های مرکب از خاک، آب و گیاه تعریف می‌شود. تنش شوری پس از خشکی از محدودیت‌های رشدی گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک است. لذا تولید بسیاری از گیاهان زراعی از جمله کنگد را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (آوالبا و همکاران، ۲۰۰۹). بیش‌تر از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های جهان و ۲۰٪ از زمین‌های کشاورزی و نیمی از اراضی تحت کشت آبی، شور هستند (بهرامی و همکاران، ۲۰۱۲). ایران بعد از چین، هند و پاکستان بیشترین اراضی شور را در سطح جهانی دارد و در نواحی ساحلی ایران دارای خاک‌های شور و قلیایی است. شوری در زمین‌های کشاورزی گسترش بیشتری دارد، به‌گونه‌ای که حدود ۵۵٪ از اراضی کشاورزی کشور، شور است (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹). این آمار به سرعت به دلیل کم و نامرتب بودن نزولات جوی و تبخیر زیاد، همچنین عملیات فشرده‌کاشت، داشت و برداشت محصولات زراعی، مدیریت ضعیف آبیاری و انجام عملیات آبیاری بدون وجود سیستم زهکشی مناسب، در حال افزایش است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۱ و فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰).

جدول ۱-۱ طبقه بندی کیفی آب، آبیاری (بایوردی و همکاران، ۲۰۱۰ و فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰).

دسته بندی	EC ds/m	غلظت نمک
آب‌ها		گرم بر لیتر
غیر شور	<۰/۷	<۰/۵
کم شور	۰/۷-۲/۰	۰/۵-۱/۵
شوری متوسط	۲-۱۰	۱/۵-۷
شوری بالا	۱۰-۲۵	۷-۱۵
فوق العاده شور	۲۵-۴۵	۱۵-۳۵
آب نمک	>۴۵	>۳۵

۱-۴-۱ مکانیسم خسارت شوری

شوری از سه طریق، تنش اسمزی، سمیت عناصر و برهم‌زدن تعادل یونی، موجب اختلال در فعالیت‌های گیاه و در نتیجه کاهش رشد می‌شود. کمبود پتاسیم و کلسیم، کاهش تثبیت CO_2 و ممانعت از سنتز پروتئین از آثار ثانویه شوری محسوب می‌شود (آقایی و همکاران، ۲۰۱۳ و وانگ و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع وجود نمک در محلول خاک، باعث افزایش پتانسیل اسمزی خاک می‌شود و در نتیجه باعث کاهش جذب آب و در صورت شدید بودن، باعث از دست رفتن آب ریشه می‌شود و در گیاه تنش آبی ایجاد می‌گردد، بنابراین بخشی از انرژی مورد نیاز گیاه جهت رشد و نمو، صرف بدست‌آوردن آب می‌شود که نتیجه آن کاهش رشد و وقوع ناهنجاری‌های متابولیسمی از طریق افزایش تولید انواع اکسیژن فعال است. انواع اکسیژن فعال برای سلول‌های گیاهی مضر هستند و نقاط کلیدی آن را نظیر غشاهای بیولوژیک، DNA و پروتئین‌ها، هدف قرار می‌دهند و تجزیه می‌کنند (اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۱). حاصل این آسیب‌ها، وقوع تنش اکسیداتیو و در نهایت، مرگ سلول است. در واقع آثار نامطلوب شوری به دلیل تجمع همین رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. حتی در شرایط شوری کم محیط ریشه، سدیم و کلر وارد سلول-های ریشه می‌شوند. نمک از طریق کاهش پتانسیل آب محیط بیرونی گیاه در جذب عناصر نیز دخالت می‌کند و باعث سمیت یونی و ورود یون‌ها به گیاه می‌شود (المنصور و همکاران، ۲۰۰۱). در واقع سدیم دارای پتانسیل بیشتری جهت آسیب به آنزیم‌ها و نیز سلول‌های گیاهی است و باعث کاهش انرژی و دیگر تغییرات فیزیولوژیکی می‌گردد. یون سدیم گیاهان را از طریق اختلال در سنتز پروتئین و نیز تداخل با فعالیت‌های آنزیمی تحت تاثیر قرار می‌دهد (دشتی و همکاران، ۱۳۸۹). افزایش غلظت سدیم خاک باعث اختلال جذب عناصر توسط گیاه می‌شود در نتیجه کاتیون‌های ضروری مورد نیاز گیاه از دسترس آن خارج می‌گردند (میرمحمدی میبدی و قره یاضی، ۱۳۸۱). یون سدیم به دلیل ماهیت شیمیایی مشابه با یون پتاسیم، اثر مهارکنندگی بر جذب پتاسیم توسط ریشه دارد. سمیت یونی که در گیاهان ایجاد می‌شود موجب برهم‌کنش نمک‌ها با مواد غذایی معدنی جذب شده توسط گیاه می‌شود، که باعث برهم‌خوردن تعادل مواد غذایی گیاه می‌گردد، به این صورت که وجود مقادیر زیاد یون‌های سدیم و کلر و نظیر این‌ها در محلول خاک با برهم‌زدن تعادل عناصر غذایی باعث ایجاد اختلال در جذب و انتقال سایر عناصر غذایی می‌شود (صرافی و همکاران، ۱۳۸۹). در غلظت‌های بالا نیز عناصر مهمی مانند کلسیم، پتاسیم و منیزیم کاهش می‌یابند، که احتمالاً دلیل کاهش رشد گیاهان در تنش شوری خواهد بود (طباطبایی و همکاران، ۱۳۹۰ و محمدی و همکاران، ۱۳۹۱). در واقع افزایش بیش از حد آستانه غلظت یون خاصی در گیاه موجب ایجاد حالت سمیت می‌شود، به عنوان مثال زمانی که

غلظت کلر از ۰/۵ تا ۰/۳ درصد وزن خشک در گیاه زیاده‌تر شود، ایجاد سمیت می‌کند (میرمحمدی میبدی و قره یاضی، ۱۳۸۱). کلریدها، سولفات‌ها، بی‌کربنات‌ها، سدیم، کلسیم و منیزیم یون‌های مهم موجود در آب و خاک شور می‌باشند، این یون‌ها، آسیب جدی به غشای سیتوپلاسمی و پروتوپلاست وارد می‌کنند. در غلظت‌های بالای شوری خاک (بیشتر از ۱۵۰ میلی مولار)، کلسیم کارایی خود را در تاثیر روی نفوذ پذیری غشاء سلولی از دست می‌دهد (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۳). افزایش مقاومت در برابر تنش‌شوری در خاک‌های مناطق خشک جایی که آبیاری ضروری است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شوری بر نیترات پتاسیم و فسفات نیز تاثیر می‌گذارد. هنگامی که سدیم به سیتوپلاسم می‌رود، مانع از فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها می‌گردد که این امر وابسته به مقدار پتاسیم موجود است. اگر مقدار سدیم بیشتر از پتاسیم باشد، اثرات مخرب‌تری را به‌جا خواهد گذاشت (چن و همکاران، ۲۰۰۹). تنش شوری تنها به یک مرحله رشدی گیاه تاثیر سوء نمی‌گذارد بلکه با توجه به شدت تنش، نوع تنش، میزان مقاومت گیاه، مراحل مختلف رشد و نوع بافت و اندام گیاهی متفاوت است. گیاهان مختلف واکنش متفاوتی در مقابل تنش از خود نشان می‌دهند و این تفاوت علاوه بر بین گونه‌ای، در درون گونه نیز مشاهده می‌گردد (کرامر و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۴-۲ مکانیسم تحمل به شوری

تحمل به تنش شوری پیچیده است، مکانیسم‌های متعدد کنترل‌کننده تحمل شوری، چند ژنی بودن تحمل به تنش و اثر متقابل آن با محیط، از دلایل پیچیدگی تحمل تنش می‌باشد (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). سازوکارهای تحمل به شوری در اکثر گیاهان زراعی بطور کامل معلوم نیست و مطالعات در مورد ژن‌ها و پروتئین‌های موثر در ایجاد تحمل ادامه دارد. بطور کلی برای مطالعه مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری، شناسایی عوامل، مسیرها و ترکیبات دخیل در فرآیند تحمل و شناسایی و تعیین مکان، نوع عمل و توالی ژن‌های مربوطه و انتقال این ژن‌ها به ارقام مورد نظر، لازم است که مطالعات مولکولی در دو جهت ژنومیکس ساختاری و عملکردی تحت تنش شوری انجام گیرد (فاروق و همکاران، ۲۰۱۰). تنش شوری روابط و نسبت‌های آبی گیاهان در سطوح سلولی، بافت و اندام را تحت تاثیر قرار می‌دهد که منجر به به بروز صدمات گیاهی، واکنش‌های اختصاصی و در نهایت واکنش‌های سازگاری می‌شود، لذا گیاهان جهت از عهده برآمدن از اثرات تنش شوری مکانیسم‌های دفاعی علیه تنش شوری را آغاز می‌کنند. تحمل به شوری، توانایی گیاهان برای رشد و تکمیل چرخه زندگی خود در بستری حاوی غلظت بالای نمک است و به عنوان تغییر در تولید درصد بیوسنتز نسبت به شرایط غیر شور توسط گیاهان می‌باشد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). گیاهان از طریق القاء

و برقراری انواعی از پاسخ‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تحت تنش شوری سازگار می‌شوند و توانایی ادامه حیات می‌یابند (اسفندیاری و جوادی، ۲۰۱۱).

۱-۲-۴-۱ مکانیسم‌های مورفولوژیکی تحمل به شوری

مکانیسم‌های مورفولوژیکی تحمل به شوری عبارتند از: فرار، اجتناب و تحمل تنش

۱- فرار از تنش: توانایی گیاه در بالغ شدن پیش از آنکه تنش آبی به یک عامل محدود کننده جدی تبدیل شود، این توانایی فرار از شوری از طریق گلدهی زودتر و سریعتر و یا کوتاه شدن دوره رشد، در محیط‌هایی با تنش خشکی آخر فصل و شوری یا دارای موانع شیمیایی و فیزیکی ممانعت کننده رشد ریشه، یک مزیت ویژه محسوب می‌شود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰). ۲- اجتناب از تنش: توانایی گیاه در حفظ مقادیر نسبی بالاتر آب تحت شرایط تنش آبی، خاک یا هوا می‌باشد. در حقیقت شامل مکانیسم‌هایی که منجر به کاهش هدر رفت آب از گیاه می‌شود، مانند کنترل روزنه‌ای، تنفس و نگهداری آب موجود از طریق افزایش پروفایل توسعه‌ای سیستم ریشه‌ها، می‌باشد (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). ۳- تحمل تنش: توانایی گیاهان در تداوم فعالیت متابولیکی و سوخت و ساز در پتانسیل پایین آبی برگ و حفظ رشد و نمو گیاه علی رغم کم آبی بافت‌های گیاهی و یا توانایی بازیافتن رشد و نمو پس از رها شدن از شرایط تنش آبی به عنوان مکانیسم تحمل شوری و کم آبی محسوب می‌شود (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۲-۴-۲ مکانیسم‌های فیزیولوژیکی تحمل به شوری

تنظیم اسمزی، محافظت اسمزی، سم زدایی، و یک سیستم دفاعی (scavenging) از پایه‌ها و اصول مهم مسئول تحمل به شوری می‌باشند. اساس فیزیولوژیکی تنوع ژنتیکی پاسخ به تنش شوری هنوز مشخص نیست (هیگبی و همکاران، ۲۰۱۰). در ذیل به بعضی از مکانیسم‌های تحمل تنش اشاره شده است.

حفاظت آب بافت‌ها و سلول‌های گیاهی

تنظیم اسمزی، امکان کاهش پتانسیل اسمزی و به دنبال آن افزایش شیب غلظت برای جریان آب و نگه داشتن تورژسانس سلولی فراهم می‌کند، بدین ترتیب میزان آب بافت‌ها و سلول‌های گیاهی و در نتیجه تنظیم اسمزی بهبود می‌یابد (دوان و همکاران، ۲۰۱۳ و ادروا و همکاران، ۲۰۰۵). تنظیم اسمزی از خصوصیات مهم در به تعویق انداختن

خسارات ناشی از تنش شوری و خشکی است که از طریق حفظ تورژسانس سلولی و فرایندهای فیزیولوژیکی تحمل به خشکی و از این طریق اجازه انجام فتوسنتز و رشد گیاه را فراهم می‌آورد (مانس، ۲۰۰۲). گیاهان مکانیسم‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را به منظور زنده ماندن در خاک و آب‌های با غلظت بالای نمک در خود دارند. این مکانیسم‌ها اختصاصاً شامل ایجاد تعادل یونی، انتقال یون‌ها و تعادل در جذب، بیوسنتز محافظ‌های اسمزی و املاح سازگار، فعال شدن آنزیم‌ها، و سنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌شوند (چو و همکاران، ۲۰۱۱ و چن و همکاران، ۲۰۰۹).

سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی

سیستم دفاعی آنتی اکسیدان در سلول گیاهی در بردارنده هم اجزای ترکیبات آنزیمی و هم غیر آنزیمی می‌باشد. اجزای آنزیمی شامل سوپراکسیداز، دسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و ترکیبات غیر آنزیمی شامل سیستمین، گلوتاتیون احیاء شده و اسید آسکوربیک می‌باشند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷). ROS های تولیدی تحت شرایط تنش را می‌توان به عنوان مولکول سیگنالی برای افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جهت تطبیق با نمک در نظر گرفت (اپل و همکاران، ۲۰۱۴). در مواقع مواجهه با تنش‌های محیطی از جمله شوری، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بالا بودن میزان ترکیبات غیر آنزیمی بسیار حائز اهمیت می‌باشند و انواع گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه توسط انواعی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان و یا مولکول‌های محلول در آب و چربی حذف می‌شوند (کاتاب و همکاران، ۲۰۰۷). در گیاهان نمک دوست، در شرایط نمک بالا، برخورداری آن‌ها از مکانیسم‌هایی نظیر تجمع انتخابی و یا خروج یون‌ها، کنترل جذب یون‌ها مخصوصاً یون پتاسیم توسط ریشه و انتقال آن به برگ‌ها (یون پتاسیم جهت حفظ تعادل اسمزی، نقش مهمی در بسته شدن روزنه‌ها ایفا می‌کند)، اهمیت زیادی دارد (بوچهولز و همکاران، ۲۰۰۲). گیاهان نمک دوست رشد خود را در شرایط تنش کاهش می‌دهند، این کاهش رشد به گیاه در جهت صرفه-جویی انرژی، کاهش اکسیژن‌های فعال، کاهش تقاضای اسید آمینه برای سنتز پروتئین جهت تامین اسید آمینه‌های آزاد در دسترس را برای تنظیم اسمزی، کمک می‌نماید (کرامر و همکاران، ۲۰۰۷).

انتخاب یونی

رابطه مکانیسم‌های انتخاب نوع یون مخصوصا یون‌های سدیم و پتاسیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مکانیسم‌های مسئول تمایز این دو احتمالا در غشاء بافت‌ها و انواع اندامک‌های گیاه عمل می‌کنند (کرامر و همکاران، ۱۹۸۶). برخی گونه‌ها، ممکن است با تشکیل غده‌های نمکی یا با ذخیره‌سازی نمک در ریشه، برگ‌های مسن، دمبرگ‌ها، ساقه‌ها و غیره خود را در برابر نمک محافظت کنند. در این گونه گیاهان تجمع نمک در بافت‌ها به خوبی تنظیم و از مناطق حساس سلولی دور نگه داشته می‌شوند. تفاوت در انتخاب یونی بین گونه‌ها و واریته‌ها، نتیجه تفاوت در ژن‌های خاص عمل کننده می‌باشد. واکنش نسبی گیاهان به شوری اغلب بستگی به نوع خاک و عوامل محیطی دیگر دارد (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

مکانیسم‌های دفع و یا محصور کردن یون‌ها

دفع یونی و یا محصور کردن آن‌ها در گیاهان به دو صورت خارج کردن از طریق غده‌های نمکی و دیگری از طریق پمپ‌ها و کانال‌های غشایی انجام می‌گیرد. روش اول، بیشتر در گیاهان غیر زراعی مشاهده می‌گردد و نمک از طریق غده‌های موجود در برگ‌ها و دمبرگ‌ها به بیرون تراوش می‌شود (عزیز و همکاران، ۲۰۱۵). روش دوم در گیاهان زراعی دیده می‌شود. موانعی که در گیاه برای عبور و تنظیم یون‌های Na^+ و Cl^- وجود دارند که عبارتند از غشای پلاسمایی ریشه، واکوئل، غشاء واکوئل در ریشه و ساقه و غشاء پلاسمایی، سلول‌های پارانشیمی آوند چوبی که باعث تقسیم و توزیع یون‌ها بین ریشه و ساقه می‌گردد (داونپورد و همکاران، ۲۰۰۵). از عوامل مهم در نبرد بین یون پتاسیم و سدیم، کلسیم می‌باشد (بکس و همکاران، ۲۰۰۰). افزایش مقدار کلسیم اثر محافظتی در گیاهان تحت تنش شوری دارد (محمد و همکاران، ۲۰۱۰). این یون محل و نقش پتاسیم را حفظ می‌کند. این اثر سودمند کلسیم، از طریق مسیرهای پیام‌ده درون سلولی رخ می‌دهد که بیان و فعالیت پتاسیم و انتقال سدیم را تنظیم می‌کند و ممکن است از طریق کانال‌های کاتیونی غیرانتخابی به طور مستقیم مانع از ورود سدیم گردد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). عبور یون‌ها از کانال‌ها به وسیله شیب الکتروشیمیایی یون در غشاء صورت می‌گیرد. این کانال‌ها در غشاء واکوئل نیز هستند و نقش مهمی در تنظیم اسمزی گیاه ایفا می‌کنند. در این مکانیسم یون سدیم به طور فعال و برخلاف شیب الکتروشیمیایی به داخل واکوئل پمپ می‌گردند. آنتی پورتهای Na^+ / H^+ (انتقال از سیتوپلاسم به بیرون) موجب انتقال یون سدیم بر خلاف شیب الکتروشیمیایی Na^+ و جذب H^+ در جهت شیب الکتروشیمیایی H^+ می‌گردد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۹). پمپ $H^+ / ATPase$ پروتون را برخلاف شیب الکتروشیمیایی حرکت می‌دهد و باعث ایجاد پتانسیل غشایی می‌شود.

انرژی مورد نیاز این فرآیند از طریق ATP فراهم می‌گردد. این پمپ Na^+ و Cl^- را به خارج دفع می‌کند. پمپ‌های ATPase باعث توزیع Na^+ و Cl^- بین ریشه و اندام هوایی گیاه می‌شوند (داونپورت و همکاران، ۲۰۰۵). برخی از گیاهان قادرند به کمک سنتز و افزایش میزان مواد محلول در سلول‌های خود و یا از طریق کاهش میزان آب موجود در سلول‌ها، در واکنش نسبت به کاهش پتانسیل آب محیط خارج از سلول، پتانسیل اسمزی سلول‌ها را کاهش و موجب آماس سلولی شوند. این فرآیند به تنظیم اسمزی معروف است و حساسیت گیاهان زراعی به تنش اسمزی^۱ با تغییر غلظت نمک تغییر می‌کند (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). عدم تنظیم اسمزی یا تنظیم اسمزی ضعیف، منجر به از دست رفتن آماس سلولی، بسته شدن روزنه‌ها و به دنبال آن کاهش تبادلات گازی و فتوسنتز می‌شود. علاوه بر این از دست رفتن آماس سلولی اثر سوئی بر تقسیم سلولی و طولی شدن سلول‌ها دارد (اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۱).

مواد آلی^۲

یکی دیگر از راهکارهای تحمل به شوری، تولید مواد آلی مختلفی مانند پرولین^۳ و گلیسین بتائین^۴، پلی‌ال‌ها، پلی‌آمین‌ها، کربوهیدرات‌ها و غیره است که گیاهان در بافت‌های خود در شرایط تنش جمع می‌کنند (یاسموتو و همکاران، ۲۰۰۳). کلروپلاست‌ها مکان‌های اصلی سنتز پرولین در هنگام تنش می‌باشند (هوآی و همکاران، ۲۰۰۳). پرولین می‌تواند از گلوتامیت^۵ یا اورنتین^۶ ساخته شود (گابالا و همکاران، ۲۰۰۷). براساس مطالعات صورت گرفته، پذیرفته شده است که تجمع پرولین در شرایط تنش شوری یکی از مکانیسم‌های دفاعی در برابر فشار اسمزی است و در بسیاری از گیاهان به عنوان اسمزای آلی مهم، شناخته شده است (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷ و لک و همکاران، ۱۳۹۰). اما با وجود این نقش، درباره نقش آن در تعدیل اسمزی همچنان تردید وجود دارد و به نوع و گونه گیاهی بستگی دارد (کوکا و همکاران، ۲۰۰۷). این اسید آمینه همچنین به عنوان محلولی پروتئینی سازگارکننده و برطرف کننده رادیکال آزاد هیدروکسیل ایفای نقش می‌کند (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵). به طور کلی محققین حدس می‌زنند که نقش اصلی این محلول‌های سازگار در محافظت از پروتئین‌ها، غشاها و ساختمان‌های دیگر سلولی (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۸) و یا

۱ Osmotic stress

۲ Organic Solutes

۳ Proline

۴ Glycine- Betaine

۵ Glutamate

۶ Ornithine

محافظت از وظیفه و عمل سلول در برابر خسارت حاصل از گونه‌های اکسیداتیو فعال (ROS) می‌باشد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۴-۲-۳ مکانسیم‌های بیولوژیکی پاسخ به تنش شوری

گیاهان پس از درک تنش خشکی، در سطح مولکولی و سلولی به مانند سطح فیزیولوژیکی، به تنش پاسخ می‌دهند، لذا ثابت شده است که بیان و تظاهر بسیاری از ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری تحت تأثیر قرار می‌گیرد و کاهش یا افزایش بیان می‌یابند، بعضی از این ژن‌ها در سطح ترنسکریپتومیکس به تنش شوری پاسخ می‌دهند و فراورده حاصل از این ژن‌ها مشخص شده است که در تحمل به شوری نقش دارند (مهرا و همکاران، ۲۰۰۳). پاسخ‌های سلولی و مولکولی به تنش شوری شامل دریافت پیغام کمبود آب، انتقال پیام به سیتوپلاسم و هسته، بیان ژن پاسخ دهنده به تنش و تحمل به تنش شوری است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). تحمل به خشکی و شوری یک صفت بسیار پیچیده است، لذا ژن‌های زیادی در مکانسیم تحمل به شوری دخیل هستند. محصولات یا فراورده‌های ژنی در پاسخ به تنش شوری و تحمل خشکی به دو گروه ۱- پروتئین کارکردی، ۲- پروتئین تنظیمی دسته بندی می‌شوند (سالکده و همکاران، ۲۰۰۷).

پروتئین‌های کارکردی

این گروه شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که احتمالاً در تحمل به خشکی و شوری نقش ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل چپرون‌ها، پروتئین‌های LEA، اسمتین، پروتئین‌های آنتی‌فریز، پروتئین‌های باند شونده mRNA، آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز اسمولیت‌ها، پروتئین‌های کانال آبی، ناقلین، یا انتقال دهنده‌های پرولین و قند، آنزیم‌های سم زدایی و پروتئین‌های مختلف می‌شوند (سایرم و همکاران، ۲۰۰۴). چپرون‌ها، پروتئین‌های LEA، پروتئین‌های باند شونده به mRNA در حفاظت از ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپیدها، آنزیم‌ها و mRNAs در مقابل تنش شوری و کم آبی نقش دارند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵). پرولین، گلیسین بتائین و قندها به عنوان سازگار کننده‌ها، در حفاظت سلول در مقابل آبگیری و کم آبی می‌باشند، پروتئین‌های کانال آبی ناقلین قندها و ناقلین پرولین به نظر می‌رسد، در انتقال آب، قند و پرولین از غشاء تونوپلاست و پلاسمایی جهت تنظیم اسمزی تحت تنش شوری درگیر باشند. آنزیم‌های سم‌زدایی مانند گلوکاتایون-اس - ترانسفراز، سوپراکسید دسموتاز و غیره در محافظت سلول‌ها از اکسیژن فعال شرکت می‌کنند (فاروق و همکاران ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰).

پروتئین‌های تنظیمی

این گروه شامل پروتئین‌هایی می‌باشند که در تنظیم انتقال پیام و بیان ژن درگیر می‌باشند که احتمالاً در پاسخ به تنش، نقش ایفا می‌کنند که می‌توان به پروتئین کینازها، فاکتورهای رونویسی و آنزیم‌های دخیل در متابولیسم فسفولیپید اشاره کرد. ثابت شده است که ژن‌ها می‌توانند با فاکتورهای رونویسی مختلفی که دارای موتیف باند شونده به DNA می‌باشند، تحت تأثیر تنش القا شوند یا به عبارتی تحریک شوند. نقش فاکتورهای رونویسی در تنظیم بعدی انواعی از ژن‌های کارکردی تحت شرایط تنش می‌باشد (چاندنا و همکاران، ۲۰۱۳). پروتئین کینازهای مختلفی از جمله MAP کینازها، CDPK بیانشان در هنگام تنش بیشتر می‌گردد. در تحقیقات اخیر نشان داده شده است که نسخه-برداری عواملی مانند OSNAC5 و ZFPI79 در تنش شوری افزایش می‌یابد که می‌تواند تولید پرولین و قندها و پروتئین LEA، که به نوبه خود نقش اساسی در تحمل به تنش دارند، را تنظیم کنند. برخی از ژن‌های تنظیم اسمزی و کاهش اکسیژن‌های فعال ایجاد شده در برخی گونه‌های گیاهی افزایش بیان دارند و برخی از عوامل رونویسی توسط کینازهای مختلف تنظیم می‌شوند و باعث ایجاد سازگاری قابل توجهی به تنش شوری می‌گردد (جدول ۱-۲)، (یاماگوچی و همکاران، ۲۰۰۲).

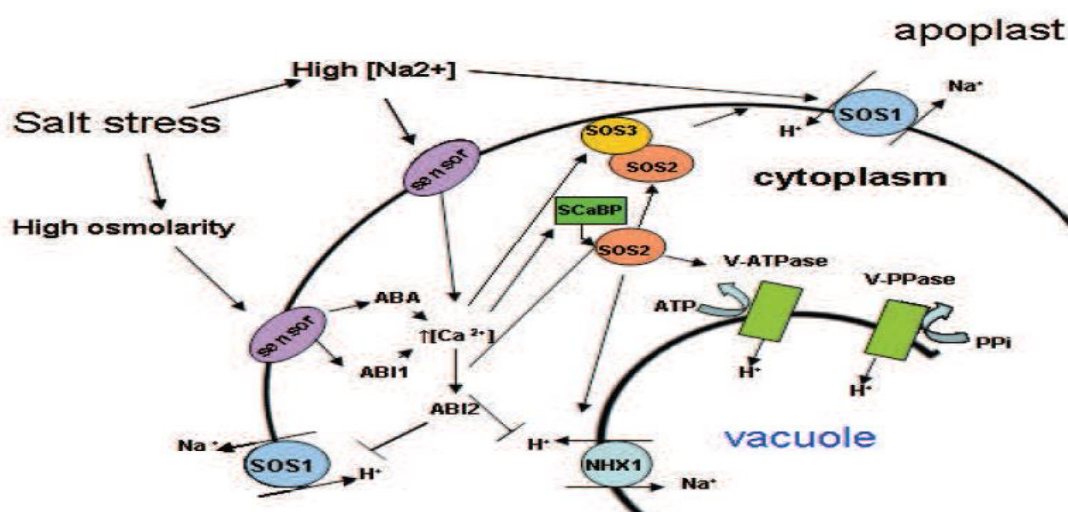
جدول ۱-۲ ژن‌ها و عوامل رونویسی مؤثر در تحمل تنش

کلاس	نام ژن	منبع
Zinc fingers, bZIP,	SOS, ZFPI79, OSNAC5	(یاماگوچی و همکاران، ۲۰۰۲)
DREB, MYC, MYB	HSP, ATNHX1, ATPAH,	(گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴)

پروتئومیکس امکان اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی تعداد زیادی از پروتئین‌ها را می‌دهد که مستقیماً بیوشیمی سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بنابراین آنالیز درست و دقیقی از وضعیت سلولی یا تغییرات سیستم سلولی در طول دوره رشد و نمو و پاسخ به عوامل محیطی فراهم می‌سازد. اهمیت پروتئومیکس ناشی از این است که محصول نهایی ژنوم را بررسی می‌کند در نتیجه کلیه تغییرات پس از ترجمه را در بر می‌گیرد و به فنوتیپ بسیار نزدیک می‌کند، همچنین بصورت دینامیک می‌باشد، یعنی با دسته پروتئین‌هایی که لحظه به لحظه متناسب با مراحل نمو و فیزیولوژیکی سلول بیان می‌شوند، تغییر می‌کند، لذا مراحل مختلف یک سیستم بیولوژیکی را منعکس می‌کند (نصرآبادی و

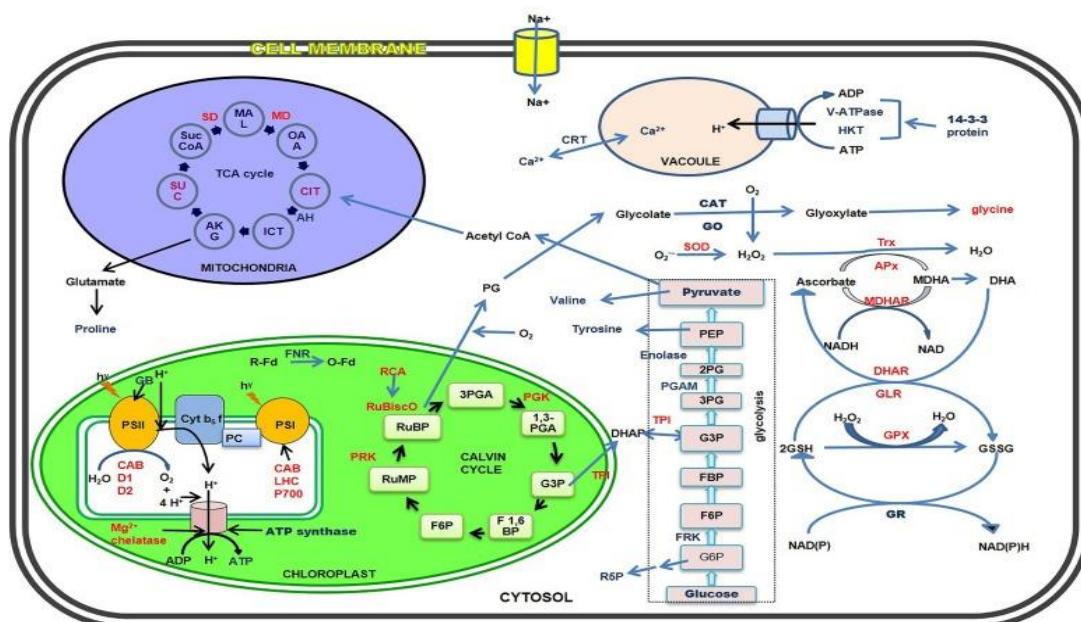
همکاران، ۱۳۸۴). با این وجود تمرکز بر ژن ممکن است با توجه به شرایط سلول و حالت (تحت تاثیر زمان و طول مدت تنش)، ناشی از تنظیمات RNA و سطح پروتئین از جمله تنظیمات پس از ترجمه، دقت کافی را ایجاد نکند. در واقع تجزیه توالی ژنوم و مجموعه نسخ خاص و تغییرات پویای آن‌ها، تصویری کلی از پاسخ به تنش در سلول، بافت و سطح کلی گیاه را فراهم می‌کند (سالکده و همکاران، ۲۰۰۷). از نخستین خطوط دفاعی در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها، تجمع SOD در پاسخ به تنش شوری است، گزارش شده است که H_2O_2 را به O_2 و H_2O تبدیل می‌کند (جوئل و همکاران، ۲۰۱۱).

مسیر سیگنال‌های SOS نیز در تحمل تنش موثر می‌باشند که از سه پروتئین اصلی به نام‌های SOS_1 ، SOS_2 ، SOS_3 تشکیل شده است، SOS_1 آنتی پورت Na^+/H^+ غشای پلاسمایی را کد می‌کند که در جریان تنظیم سدیم در سطح سلول نقش دارد. بیان بالای این پروتئین منجر به تحمل شوری در گیاهان می‌شود و انتقال آن از ریشه به ساقه را تسهیل می‌کند. ژن SOS_2 یک سرین/ترئونین کیناز را کد می‌کند که توسط تنش شوری و سیگنال‌های کلسیم برانگیخته شده فعال می‌شود و نوع سوم پروتئینی است که در مسیر سیگنالینگ تنش درگیر است شکل ۱-۳ مدلی از مسیر SOS برای پاسخ به به تنش شوری را نشان می‌دهد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۱-۳ مسیر سیگنال‌های مسئول یون سدیم در گیاه آراییدوپسیس. یون سدیم بیش از حد توسط حسگرهای غشای پلاسمایی، احساس و سبب افزایش کلسیم سیتوزولی می‌شود. این افزایش توسط SOS_3 که فعال کننده SOS_2 است، صورت می‌گیرد. مجموعه SOS_1 ، SOS_2 ، SOS_3 و آنتی پورت‌های Na^+/H^+ غشای سیتوزولی فعال می‌شوند و در نتیجه یون سدیم به جریان می‌افتد. SOS_2 می‌تواند فعالیت آنتی پورت NHX_1 و $V-H^+-ATPase$ را مستقل از SOS_3 تنظیم کند. تنش شوری نیز می‌تواند موجب تجمع ABA، با استفاده از ABI2 و ABI1 شود و می‌تواند تنظیم منفی SOS_2 یا SOS_1 و NHX_1 را به دنبال داشته باشد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۹).

تحت تنش خشکی و شوری گیاهان طیفی از پاسخ‌ها را در کل گیاه، سطوح سلولی و مولکولی نشان می‌دهند. در شکل ۵-۱ به صورت نمادین نقش پروتئین‌ها در پاسخ به تنش مورد بررسی قرار گرفته است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). در این زمینه بسیاری از محققین تنظیمات مختلف از پروتئین‌ها، متابولیت‌ها و یون‌های مربوط به تنش (NaCl) را در سطح پروتئوم در *Halogeton gomeratus* مورد بررسی قرار دادند و سطح وسیعی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، آهن سوپر اکسید دسموتاز^۱ (FE-SOD)، فسفولیپید هیدروپروکسید گلوکوتایون پیراکسیداز^۲ (pHGPX) تحت شرایط تنش برای تنظیم فعال ROS و حذف آن جهت دفاع در برابر تنش اکسیداتیو و آسیب سلول‌ها را گزارش نموده‌اند (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵).



شکل ۴-۱ نمایش شماتیک پروتئین‌های عمده پاسخ به تنش نمک و متابولیت‌های سیتوزولی، کلروپلاست، میتوکندری و واکوئل. تنظیم مثبت و منفی در شکل با رنگ‌های آبی و قرمز مشخص گردیده است در این شکل نشان داده شده است که سه اندامک کلروپلاست، میتوکندری، و واکوئل در تولید پروتئین‌ها، آنتی اکسیدان‌ها و نیز جمع آوری و دفع سموم و به دنبال آن در تحمل تنش نقش بسزایی دارند (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴).

دیگر پروتئین‌هایی که در مطالعات متعدد مشخص شده‌اند، آن‌هایی هستند که در سنتز پروتئین‌ها، پردازش، تخریب و نیز ثبات اسکلت سلولی درگیرند. برخی از پروتئین‌های مشخص، نشان دهنده یک مسیر پاسخ به تنش در گیاهان

^۱ Fe-Superoxide dismutase

^۲ Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase

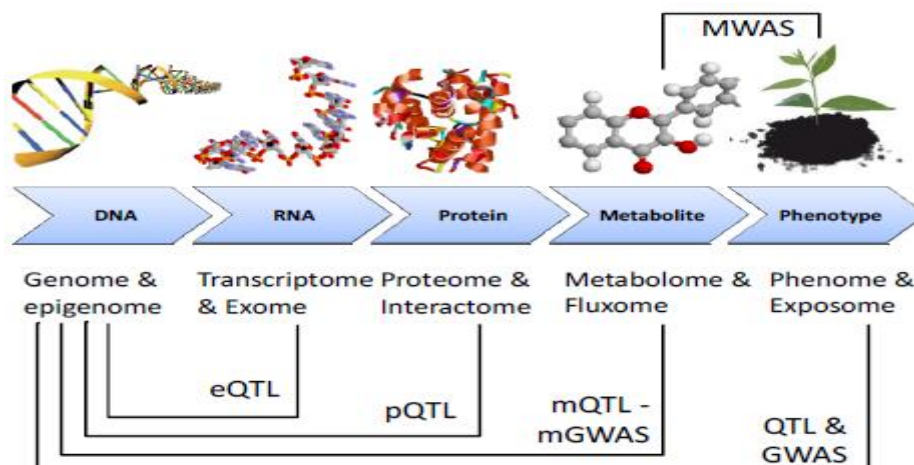
هستند. پروتئین‌های مشخص شده در گروه پیام‌ها، انتقال، ساختار سلولی شایع هستند (تادن و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین روبیسکو که در چرخه کالوین مشاهده می‌گردد و مسئول تثبیت CO_2 است (محتوی روبیسکو در برگ متناسب با نرخ فتوسنتز است و در نتیجه کاهش آن، کاهش در سرعت فتوسنتز را نشان می‌دهد)، نقش مهمی را در پاسخ گیاهان به تنش شوری ایفا می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱). دیگر مطالعات موید آنند که گیاهان جهت پاسخ به تنش و رشد توسعه در شرایط تنش، نیازمند انرژی زیادی هستند که این انرژی عمدتاً از طریق متابولیسم کربوهیدرات در چرخه گلیکولیز و TCA فراهم می‌گردد. آنزیم‌هایی از قبیل ۳و۲ بیس فسفوکلیسرات و فروکتوز کیناز، آنزیم‌های چرخه گلیکولیز هستند و به گیاهان در تحمل تنش یاری می‌رسانند. فروکتوز کیناز انتقال گروه فسفات از ATP به فروکتوز در گلیکولیز را برعهده دارد (میتلر، ۲۰۰۶). افزایش این آنزیم تحت تنش کلرید سدیم به همراه آنزیم‌های دیگر از چرخه TCA و گلیکولیز کمکی برای شکستن گلوکز برای تولید انرژی جهت غلبه بر تنش نمک محسوب می‌شوند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر این‌ها پروتئین‌هایی مانند گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز در هنگام تنش شوری بر بهره‌وری انتقال الکترون و پروتون در سراسر غشا و سنتز ATP و NADPH موثر واقع می‌گردند در نتیجه انرژی مورد نیاز پاسخ به تنش شوری می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد (بک جنسون و همکاران، ۲۰۰۴). امروزه تلاش‌های فراوانی جهت بکارگیری دانش پرتئومیکس، ژنومیکس و متابولومیکس جهت افزایش تحمل به تنش‌های زیستی از جمله تنش شوری و یافتن مکانیسم‌های تحمل در حال انجام می‌باشد (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵).

نقش فیتوهورمون‌ها در تحمل به تنش شوری

فیتوهورمون‌ها پیام‌رسان‌هایی شیمیایی هستند که نقش حیاتی در تنظیم پاسخ گیاه به تنش بازی می‌کنند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸). تغییرات در سطح فیتوهورمون‌ها مانند اسید جاسمونیک، اسید جیبرلین، اتیلن، اسید آبسزیک، آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز، مانند الن اکسید سیکلاز، لیپواکسیژناز (بیوسنتز اسیدجاسمونیک)، NCED (بیوسنتز اسید بنزوئیک) در بسیاری از گونه‌های شورپسند در پاسخ به غلظت‌های بالا گزارش شده است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات درباره فیتوهورمون‌های اصلی نشان‌دهنده افزایش بیان اسیدآبسزیک است. اسید آبسزیک پیام اصلی درطول شرایط نامساعد محیطی مانند تنش شوری برای بقا گیاه می‌باشد (چو و همکاران، ۲۰۱۱). اسید آبسزیک از فیتوهورمون‌های مهم در گیاهان است. افزایش آن می‌تواند اثر سوء شوری بر فتوسنتز، رشد و انتقال مواد فتوسنتزی را کاهش دهد. ارتباط مثبتی بین تجمع اسید آبسزیک و مقاومت به شوری دیده شده است که تاحدی به تجمع Ca^{2+} و K^+ و نیز املاح سازگار مانند پرولین و قندها نسبت داده شده است. در واکوئل ریشه، اسید آبسزیک، باعث بیان ژن

پاسخگو به نمک و آب شور می‌شود (شولر و همکاران، ۲۰۰۸ و ۲۰۰۶). از هورمون‌های مهم دیگر اسید جاسمونیک است که بسیاری از فرآیندهای حیاتی برای مقابله با تنش را فعال می‌کند (سینگ و همکاران، ۲۰۰۲). یک راهکار اساسی و کلیدی در این رابطه، شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به خشکی و شوری می‌باشد و در نهایت استفاده کارآمد از این ژن‌ها برای تسریع برنامه‌هایی جهت مقاوم سازی گیاهان در برابر تنش است، اگرچه انتخاب بر اساس صفات مرفولوژیک و فیزیولوژیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، اما در مورد صفات پیچیده‌ای همچون مقاومت به خشکی و شوری، نیاز به استفاده از مارکرهای مولکولی برای غلبه بر پیچیدگی مکانیسم‌های مربوطه الزامی می‌باشد (جاندر و همکاران، ۲۰۱۰). پیدا کردن و بررسی مکان‌های کنترل کننده تغییرات صفات کمی (QTLs) و انتخاب به کمک مارکرها (MAS) عصری جدید را در بهبود گیاهان گشوده است، علی‌رغم چشم انداز امید بخش برای این روش، هنوز محدودیت‌های متعددی بر سر راه استفاده از MAS و QTLs وجود دارد که می‌بایست رفع شوند تا بتوان از این تکنیک آن گونه که انتظار می‌رود، استفاده نمود. کشف و شناسایی ژن‌ها در میکروارگانیسم‌ها، حیوانات، گیاهان بواسطه پیشرفت‌های اخیر در ژنومیکس کارکردی و ساختاری تسریع شده است. معمولاً، مطالعات نقشه یابی QTL پیش نیاز MAS است (پاندی و مان، ۲۰۰۰) که می‌تواند برای هر می‌کردن QTLs متفاوت مورد استفاده قرار بگیرد. برای برنامه‌های موثر MAS، QTLs باید در پس زمینه‌های ژنتیکی جدید، بیان شوند و کارا باشند و در نقشه برداری جمعیت‌ها و محیط‌های متفاوت، پایدار (بدون تغییر) باشند. محققین اخیراً QTLs را جستجو می‌کنند که در محیط‌های مختلف پایدار و با بهبود عملکرد همراه باشند. آنالیزهای ژنتیکی زیادی در ۲۰ سال گذشته برای شناسایی QTLs مسئول صفات مرتبط با تحمل به شوری و خشکی انجام شده‌اند. ریشه‌ها در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی و نقشه یابی QTL به منظور بهبود تحمل به تنش شوری خشکی، هدف قرار گرفته اند (چن و همکاران، ۲۰۰۹). نقشه یابی QTL علاوه بر اطلاعات بسیار مفیدی که در زمینه جایگاه و تعداد ژن‌های کنترل کننده صفات کمی فراهم می‌کند، می‌تواند به نژادگران را در گزینش به کمک نشانگر یاری نماید (های و همکاران، ۲۰۱۰). گزینش به کمک مارکر می‌تواند در افزایش راندمان موثر باشد، اما، حداقل تاکنون، گزینش برای مارکرهای مرتبط با صفات مرکب با توارث پذیری کم، محصول پیش بینی شده را تولید نکرده است. نقشه برداری دقیق QTLs و کلونینگ آن‌ها بر پایه نقشه ژنی، اجازه می‌دهد که بطور موثرتری از آنها به منظور حذف اثرات ناخواسته مرتبط با آلل‌ها استفاده شود. برای اینکه ترکیبات بسیار ظریف آلل‌ها بتوانند با حداکثر تاثیر ترکیب شوند، لازم است که MAS به دقت تطبیق یابد. روش‌های ترنس ژنیک و ژنومیکس ساختاری این امید را حفظ می‌کند که انتظار کاربرد این روش‌ها در آینده برای ارزیابی دقیق تحمل به تنش، واقع گرایانه است (هیل و کزادرنا، ۲۰۱۵). محققین نباید نقش تفاوت‌های اپی‌ژنیک در بیان ژن را که در طی

رشد ظهور می‌یابند و متعاقباً از طریق میتوز ادامه می‌یابند، نادیده بگیرند، چنین مکانیسم‌هایی به ارگانیزم اجازه می‌دهد که از طریق تغییرات در الگوهای بیان ژن به محیط، واکنش نشان دهد. برنامه‌های اصلاحی آینده که روش بیولوژی سیستم‌ها را برای ادغام مجموعه اطلاعات پروتئین‌ها و ژنوم‌ها (حاصله از پروتئومیکس و ژنومیکس) با نتایج آزمایشگاهی حاصله از مطالعات کنترل شده و مزرعه‌ای دنبال خواهند کرد، بسیار آگاهی بخش خواهند بود (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). شناسایی ژن‌های متحمل به خشکی و شوری نیازمند وجود منابع ژنتیکی و ابزار مولکولی می‌باشد که پروتئومیکس یکی از ابزارهای آن محسوب می‌گردند. علی‌رغم تلاش‌های بسیاری که در جهت انتخاب زراعی برای بهبود تحمل به عوامل تنش انجام شده است، نشانگرهای زیستی نسبت به روش فنوتیپی توسعه یافته است (آقای و همکاران، ۲۰۱۳). این امر توسط متابولیت‌ها نیز امکان پذیر است. نشانگرهای متابولیکی، بستگی به در دسترس بودن توالی ژنوم ندارند. به طور کلی عوامل ژنتیکی فنوتیپ متابولیکی از طریق نقشه برداری جایگاه صفات کمی متابولیت‌ها (mQTL) و شناسایی ژنوم متابولومیکس (mGWAS) در چهارچوب آماری دقیق، استنتاج ارتباط بین تراکم متابولیت و چند شکلی بودن ژن‌ها ساخته شده است، در واقع mQTL شامل محاسبه ارتباط بین مارکرهای ژنومی (SNP، SSR، CNVs) و مارکرهای متابولیکی است (شکل ۵-۱)، (هیل و همکاران، ۲۰۱۳).



شکل ۵-۱ نقشه‌برداری ژنومی از فنوتیپ مولکولی توسط نقشه برداری جایگاه صفت کمی و تکنیک‌های مرتبط با آن (mQTL، mGWAS)، (هیل و همکاران، ۲۰۱۳).

از روش‌های دیگر قابل توجه در زیست شناسی گیاهی، متابولومیکس است که شامل متابولوم‌های قابل مطالعه می‌باشد. گیاهان عالی سطح وسیعی از متابولیت‌هایی که از نظر شیمیایی متفاوت هستند و عملکردهای بیولوژیک آن‌ها در

کاهش تنش نقش دارد، را تولید می‌کنند. نمونه‌هایی از متابولیت‌های گیاهی که در تحمل به تنش شوری نقش دارند، مانند مانیتول، سوربیتول، گلیسین، قندهایی مانند ترهالوز، فروکتوز و اسیدهای آمینه‌ای مانند پرولین می‌باشند، که به عنوان محلول سازگار کننده، عمل می‌کنند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵).

گیاهان توسط تغییرات پایدار و گذرای متابولیت‌های خود به تنش پاسخ می‌دهند. مقایسه متابولوم گونه‌های متحمل به سطوح مختلف شوری نشان می‌دهد که متابولیت‌ها نقش مفید و مهمی را در سازگاری به تنش دارند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، تنظیم متابولیت جهت کسب مقاومت به تنش امری حیاتی است (پرویز و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۵ متابولیت‌ها

متابولیت‌ها مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین هستند که در واکنش متابولیکی حضور دارند و برای حفظ رشد و کارکرد صحیح یک سلول مورد نیاز اند و محصولات واکنش‌های آنزیم‌ها هستند. این واکنش‌ها به طور طبیعی درون سلول‌ها رخ می‌دهند. بسیاری از این ترکیبات نقش تنظیم‌کنندگی دارند و سرعت سوخت و ساز سلول را تنظیم می‌کنند و همچنین قادر می‌باشند تا ترکیب خود را حفظ کنند و به ساختارهای بزرگتر بپیوندند و یا اینکه به ساختارهای کوچکتر احیا شوند (کرامر و همکاران، ۲۰۰۷). جهت تعمیر و نگهداری و بقای سلول‌ها و برای ذخیره انرژی و نیز فراهم نمودن انرژی اهمیت دارند، همچنین آن‌ها به ساخت و نگهداری اجزای ساختاری سلول کمک می‌کنند (دوان و همکاران، ۲۰۱۳). درون سلول دو نوع متابولیت اولیه و ثانویه وجود دارد. متابولیت‌های اولیه مستقیماً در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه، مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای هستند که موجودات از قبیل گیاهان اغلب در طول حیات خود تولید می‌نمایند، ولی در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی آنها نقشی ندارند و عمدتاً به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی، و انواع تنش‌ها در گیاه تولید می‌شوند (فینک میر و همکاران، ۲۰۱۳). متابولیت‌های ثانویه اغلب در طی یک دوره رشد و نمو خاص در گیاه تولید می‌شوند. گاهی فقط در یکی از گونه‌های گیاهی و یا یک گروه تاکسونومی مربوط به گونه‌های مختلف موجود می‌باشند و ممکن است در یک گیاه مقاوم‌تر، غلظت بیشتری از این متابولیت‌ها وجود داشته باشد که عمدتاً در بافت‌های تمایز یافته می‌باشند (امیدی و همکاران، ۱۳۹۱).

به مجموعه متابولیت‌های یک نمونه (از قبیل متابولیت‌های حد واسطه، هورمون‌ها، مولکول‌های انتقال پیام و متابولیت‌های ثانویه) متابولوم می‌گویند که به شکل شبکه‌ای بزرگ حاصل واکنش‌های متابولیک می‌باشد. در واقع این مجموعه متابولیت موجود در یک نمونه بیولوژیک، محصول نهایی تظاهر ژن می‌باشد. به بیانی دیگر متابولوم سیستم

بیولوژیکی، نشان دهنده بیان ژن‌های بسیاری در وضعیتی خاص است و روابط محیط $\times$ ژن را منعکس می‌کند (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵). در مقایسه با رونوشت‌ها یا پروتئین‌ها، متابولیت‌ها، طیفی گسترده از سازه‌های شیمیایی مختلف با مجموعه‌ای از گروه‌های مختلف عملکردی است که تفاوت در خواص فیزیکی و شیمیایی از قبیل حلالیت، ثبات، واکنش‌ها و قطبیت را مشخص می‌کند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵). تغییرات متابولومی (از جمله افزایش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و تجمع محلول‌های سازگارکننده در بافت گیاهی) یکی از راهکارهایی است که گیاهان جهت تحمل بهتر شرایط تنش در پیش می‌گیرند (بوچ و همکاران، ۲۰۰۴). متابولیت‌های ثانویه، معمولاً براساس مسیر متابولیسمی آن‌ها طبقه‌بندی می‌گردند (۸). با توجه با تعاریف فوق متابولومیکس به استفاده از روش‌های تحلیلی برای شناسایی و کمی-کردن تمام متابولیت‌ها در یک سیستم زیستی و جستجوی تغییرات متابولوم در یک سلول، نمونه بافتی بعد از تنش، اشاره دارد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۶ متابولومیکس

متابولومیکس از روش‌های تحلیلی است که درک زیست‌شناسی ما را تکمیل می‌کند (هیل و همکاران، ۲۰۱۳). علمی است که به عنوان ابزاری دقیق و پیچیده تحلیلی برای تشخیص متابولیک و محاسبه آماری مناسب، جهت استخراج و تجزیه داده‌های متابولیکی استفاده می‌گردد. در واقع این علم ابزاری مهم برای بیوتکنولوژی و روش‌های مهندسی متابولیک که هدف آن دستکاری مسیرهای بیوشیمیایی به منظور افزایش و تجمع ترکیبات مورد نظر است، می‌باشد (جوئل و همکاران، ۲۰۱۱). متابولومیکس می‌تواند تصویری کاملی از مسیرهای بیولوژیکی مورد مطالعه را در اختیار محققین قرار دهد و نیز مشخص شده است که می‌تواند برای شناسایی نشانگرهای متابولیکی که فنوتیپ خاص را نشان می‌دهند، جهت اهداف مهندسی ارزیابی گردد (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵). این علم، امکان مطالعه صدها متابولیت و نیز ارزیابی چگونگی حفظ انرژی، کربن، مواد مغذی و منابع آن‌ها را فراهم می‌آورد، به طوریکه اطلاعات آن می‌تواند به سنتز متابولیت‌های مورد نظر برگردد (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۸)، در واقع پاسخ بیوشیمیایی گیاه به شرایط تنش‌زا را می‌توان از طریق تاثیر بر روی میزان متابولیت‌های خاص شناسایی نمود، در نتیجه شناسایی و تشخیص هم‌زمان تکنیک متابولیت‌ها در جهت مطالعه تغییرات پیوسته‌ی مسیرهای متابولیک و شناسایی نقش هر متابولیت در پاسخ به تنش یا عوامل مختلف دیگر لازم و ضروری است (اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۱). خصوصیات متابولیت‌های موجودات می‌تواند در ارائه اطلاعات از وضعیت متابولیکی موجود زنده برای ارزیابی پاسخ‌های زیستی ناشی از عوامل بیرونی کمک کند، لذا می‌توان به دنبال شناسایی پروتئین‌های پاسخ ده به تنش و نقش آن‌ها برای پی بردن به چگونگی فعالیت و

سطح فعالیت آن‌ها، میزان متابولیت‌های درگیر در مسیر بیوشیمیایی این پروتئین‌ها را با استفاده از تکنولوژی متابولومیکس تعیین نمود (چاندنا و همکاران، ۲۰۱۳). توانایی آنالیز mRNA و پروتئین‌ها با روش‌های نظیر ریزآرایه‌ها برای ترانسکریپتومیکس و ژل دو بعدی با اسپکتروسکوپی جرمی برای پروتئومیکس یا امکان آنالیز کاربردی کامل را در این دو سطح می‌دهد. سطح کاربردی دیگر آنالیز خزانه کامل متابولیت یا متابولوم است که در حال حاضر علاقه زیادی را در محققان ایجاد کرده است (درفلر و همکاران، ۲۰۱۳). کاربرد آن برای فهم فرآیندهای سلولی در حال گسترش است و می‌تواند در شناسایی عمل ژن‌های جدید مشارکت نماید. متابولومیکس در درک بهتری از همبستگی ژن و ترکیب بیوشیمیایی یک بافت گیاهی در پاسخ به شرایط محیط زیست خود (فنوتیپ) کمک می‌کند و از این اطلاعات می‌توان بیشتر برای ارزیابی عملکرد ژن (ژنوتیپ) استفاده نمود (گابالا و همکاران، ۲۰۰۷). در مسیر سنتز، تجمع و انتقال متابولیت‌های ذکر شده، برخی از آنزیم‌ها و متابولیت‌های دیگری نیز شرکت دارند که می‌تواند در درک چگونگی روند تغییرات این متابولیت‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی در گیاهان و همگام با تحقیقات پروتئومیکس، کمک شایانی به فهم و درک آنزیم‌های درگیر در مسیر آن‌ها و شناخت بیشتر مکانسیم بیوشیمیایی نمایند. متابولومیکس شامل روش‌های متعددی از جمله تجزیه و تحلیل هدف، پروفایل متابولیتی و انگشتنگاری متابولیکی می‌باشد (آربونا و همکاران، ۲۰۱۳). تهیه پروفایل متابولیکی امکان اندازه‌گیری مجموعه‌ی بزرگی از متابولیت‌های شناخته و ناشناخته را در نمونه فراهم می‌آورد. تفاوت در محتوی متابولیت‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر در تفکیک فنوتیپ‌های تحمل تنش در غربالگری وارسته‌ها در برنامه‌های اصلاحی گیاهان به کارآید (هیل و کزادرنا، ۲۰۱۵). متابولومیکس قبلاً به طور موفقیت‌آمیزی برای مطالعه فنوتیپ مولکولی گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی در جهت یافتن الگوهای خاص مرتبط با تحمل تنش عملی شده است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۶-۲ متابولومیکس در واکنش گیاه به تنش

تنش‌های محیطی را می‌توان به عنوان هر گونه تغییری در شرایط رشدی و در محیط طبیعی گیاه به حساب آورد که باعث تغییر یا اختلاف هم‌ایستایی متابولیک گیاه و عدم تعادل اسمزی، تغییرات مضر در سطح فیزیولوژیک و مولکولی در اجزای سلول می‌شوند (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵). این تغییرات زیستی نیازمند تنظیم مجدد مسیرهای متابولیکی است با این هدف که وضعیت جدیدی از تعادل در گیاه ایجاد می‌شود که این فرآیند را گاهی سازش یا خوگیری می‌نامند. به نظر می‌رسد فازهای مختلفی در فرآیند سازش دخالت داشته باشند. در مراحل ابتدایی تنش، تغییر در شرایط محیطی توسط گیاه درک می‌شود و شبکه‌ای از مسیرهای پیام‌رسان را فعال می‌کند، در فاز بعدی مسیرهای فعال شده

انتقال پیام در فاز ابتدایی، تولید پروتئین‌ها و ترکیبات مختلف را راه‌اندازی می‌کند که حالت جدیدی از تعادل را ایجاد می‌نماید (چن و همکاران، ۲۰۰۹). از دیدگاه متابولومیکس، حداقل سه نوع مختلف از ترکیبات برای این فرآیندها اهمیت دارند که شامل ترکیبات درگیر در فرآیند تنظیم آنتی‌اکسیدان‌ها یا محافظ‌های اسمزی، محصول ثانویه تنش‌ها که در سلول‌ها به دلیل اختلاف در تعادل طبیعی ناشی از شرایط رشد، ظاهر می‌شود، مولکول‌های پیام‌رسان که در واکنش سازش دخالت دارند، می‌شود. مولکول‌های پیام‌رسان می‌توانند ترکیبات تازه سنتز شده باشند، مانند اسیدسالیسیلیک، که می‌توانند محصولات ثانویه مختلفی از متابولیسم تنش باشند (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). دسته دوم مولکول‌های پیام‌رسان، می‌توانند محصولات فرعی تخریب غشاء در اثر فعالیت گونه‌های مختلف واکنش‌دهنده اکسیژن یا ترکیبات اکسید کننده مختلف از قبیل ترکیبات فنولی یا حتی برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها باشند. ترکیبات اسمزی که در شرایط تنش خشکی و شوری در سلول‌های گیاه تجمع پیدا می‌کنند، شامل اسیدهای آمینه مثل پرولین، گلوتامات و قندها می‌باشند (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸)، این ترکیبات نقش محوری در جلوگیری از خسارت به غشاءها و غیر فعال شدن آنزیم‌ها در پتانسیل آبی پایین محیط بر عهده دارند. اسیدهای آمینه از متابولیت‌های مهم گیاهی می‌باشند که سبب تنظیم مسیرهای متابولیسمی بسیاری در گیاه می‌شوند و گاهی نیز به عنوان پیش ماده برای تولید ترکیبات ثانویه به حساب می‌آیند (برومک و همکاران، ۲۰۱۳). مانیتول و سوربیتول و ترکیباتی دی متیل سولفونیوم مانند دی متیل سولوفونیو پروپیونات، قندهایی از قبیل ساکارز ترهالوزها و فروکتان یا اسیدآمینه‌هایی از قبیل پرولین مثال‌هایی از متابولیت‌های درگیر در پاسخ به تنش زنده و غیرزنده هستند که به عنوان محلول سازگار کننده عمل می‌کنند (رحمان و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به مطالب فوق آشکار است که تهیه پروفایل متابولیت‌ها می‌تواند به طور معنی‌داری در مطالعه تنش‌ها در گیاهان و سایر موجودات مشارکت داشته باشد. پروفایل‌های متابولیکی را می‌توان با داده‌های ترانسکریپتوم و پروتئوم مورد بررسی بیشتر قرار داد. چالش مهم در متابولومیکس گیاهی، متابولوم کاملاً شناخته شده برای هر گونه گیاهی است. چالش دیگر ردیابی متابولیت‌هایی است که بعضاً دارای نقش کلیدی در میزان کم در سلول یا بافت مورد مطالعه هستند. تخمین زده می‌شود که گیاهان ۹۰ تا ۲۰۰ هزار متابولیت مختلف تولید می‌کنند، اما تعداد و اصل متابولیت‌های موجود در هر گونه گیاهی هنوز نامشخص است (درفلر و همکاران، ۲۰۱۳).

۱-۶-۳ روش‌های شناسایی و مطالعه‌ی متابولوم و متابولومیکس

با توجه به تعریف متابولوم، می‌توان در یک آزمایش متابولومیکس، تمام متابولیت‌های موجود در یک سلول را اندازه‌گیری نمود که این کار در یک سلول یا بافت و در یک وضعیت مشخص در زمانی خاص انجام می‌شود. با توجه به ماهیت آن‌ها، متابولیت‌ها از نظر شیمیایی بسیار متنوع می‌باشند و اغلب در یک محدوده دینامیکی وسیع حضور دارند که در مقایسه با شناسایی و تشخیص نسخه ژن یا پروتئین، متابولیت‌ها، اختصاصی برای یک موجود نیستند، از این رو وقتی طریقه شناسایی یک متابولیت، برای اولین بار مشخص شد، پروتکل آن برای پروکاریوت‌ها و قارچ‌ها، گیاهان و جانوران استفاده می‌شود (ماجی و همکاران، ۲۰۰۷). متابولومیکس یک تکنولوژی به سرعت در حال توسعه است. روش‌های اصلی که اخیراً در زمینه تحقیق متابولومیکس گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل انگشت‌نگاری متابولیکی، متابولیت پروفایلینگ و آنالیز هدفمند می‌باشند (میرگانی و همکاران، ۲۰۰۳). بسته به هدف هر مطالعه، روش‌های خاص متابولومیکس یا ترکیبی از آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (وان و همکاران، ۲۰۱۱). روش تفکیک متابولیت‌ها بر اساس LC^1 ، GC^2 و یا الکتروفورز کاپیلاری و روش‌های شناسایی بر اساس MS^3 ، NMR^4 ، $FT-IR^5$ ، $FT-LCR^6$ استوار است (سلنکو و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۶-۳-۱ کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی

کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) سهم قابل توجه‌ای در تجزیه‌ی مخلوط‌های مختلف ترکیبات آلی به ویژه اسانس‌ها دارد. GC-MS توانایی تجزیه‌ی کیفی و کمی بسیاری از ترکیبات را دارد، ولی شناسایی کیفی اجزاء، منحصراً از طریق جستجو در کتابخانه‌ی MS متصل به GC دستگاه امکان پذیر می‌باشد (درفلر و همکاران، ۲۰۱۳). دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی یکی از قوی‌ترین فن‌آوری‌ها برای اهداف پروفایل متابولیکی در گیاهان است (هیل و همکاران، ۲۰۱۳). GC-MS می‌تواند به تشخیص همزمان حدود ۲۰۰-۱۵۰ ترکیب و شناسایی نوع ترکیب بپردازد (جوئل و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین این دستگاه می‌تواند اندازه مولکول یونیزه شده را با تعیین وزن جرمی هر یون شناسایی کند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵). خوشبختانه، با توسعه روش‌های کمومتریک، استخراج

^۱ Liquid chromatography

^۲ Gas chromatography

^۳ Mass spectrometry

^۴ Nuclear magnetic resonance

^۵ Fourier transform infrared spectroscopy

^۶ Fourier transform ion cyclotron resonance

داده‌های مورد نیاز اجزای یک مخلوط پیچیده امکان‌پذیر شده است. این روش پیشرفته‌ترین روش تحلیلی و یکی از اولین تکنیک‌های مورد استفاده جهت تشخیص پروفایل متابولیتی گیاهان می‌باشد. دستگاه GC-MS از دو قسمت (GC) کروماتوگرافی گازی و (MS) طیف‌سنجی جرمی تشکیل شده است. در این دستگاه GC و Mass از هم جدا نبوده و وارد کردن نمونه به دستگاه Mass از طریق GC می‌باشد. بنابراین در این دستگاه، فقط از نمونه‌هایی می‌توان طیف جرمی تهیه کرد که بتوان به GC تزریق نمود. در کروماتوگرافی گازی نمونه تبخیر و بر سر ستون کروماتوگرافی تزریق می‌شود (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۵). متفاوت با سایر روش‌های کروماتوگرافی، فاز متحرک در این روش با مولکول‌های آنالیت برهم‌کنش ندارد و فقط به عنوان وسیله‌ای برای گذر مولکول‌ها از داخل ستون عمل می‌کند. در دستگاه GC-MS اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا شده و پس از حذف گاز حاصل، به واسطه تولید میدان‌های الکتریکی پرقدرت، اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آنها می‌گردد (هیل و همکاران، ۲۰۱۳). مزیت این روش این است که می‌توان برای ترکیبات ناشناخته نیز استفاده گردد و دارای قابلیت‌های زیادی جهت تشخیص الگوهای ایزوتوپی هر یون تحت تجزیه و تحلیل است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). با استفاده از آن می‌توان چند صد ترکیب متعلق به کلاس‌های شیمیایی متنوع از جمله قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، آمین‌های معطر و اسیدهای چرب را شناسایی کرد (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). به طور کلی می‌توان از آن، جهت دستیابی به مواردی مانند شناسایی ترکیبات خالص آلی، تعیین وزن مولکولی و فرمول-تجربی ترکیب، حضور یا عدم حضور گروه‌های عاملی در ترکیبات آلی و پایداری انواع مختلف یون‌ها استفاده کرد (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱). مزیت عمده‌ی این روش، در دسترس بودن از نظر تجاری و در اختیار بودن کتابخانه طیفی EI و استفاده از آن به مدت طولانی، هزینه کم، زمان اندک جهت اندازه‌گیری و سهولت در استفاده، قدرت تفکیک بسیار عالی و تکرار پذیری آن می‌باشد. محدودیت GC-MS این است که تنها می‌تواند تجزیه و تحلیل ترکیبات فرار یا ترکیباتی که می‌توانند فرار شوند را انجام دهد. در این روش حساسیت تا حد زیادی تحت تاثیر منبع تولید یون قرار می‌گیرد (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۷ روش‌های آماری آنالیز متابولوم و داده‌های آن

آنالیز خصوصیات شیمیایی و کمی متابولیت‌ها، معمولاً محتاج استفاده از یک رویکرد چند دسته‌ای بر اساس تکنیک-های تحلیلی مختلف است. ابزارهای ریاضی و آماری به منظور کشف الگوهای شباهت و تفاوت در داده‌ها، از طریق مدل‌های چند متغیره استوار است (فینک میر و همکاران، ۲۰۱۳). روش‌های آنالیز متابولومیکس به دو نوع کمومتری (ترکیبات شیمیایی نا معلوم با الگوهای طیفی مشخصی که قابلیت تجزیه و تحلیل به روش‌های آماری برای آنها

مهمیاست) و روش پروفایل هدفمند یا رویکرد جامع (شناسایی بیشتر ترکیبات شیمیایی و انجام روش‌های آماری برای شناسایی نشانگرهای زیستی مربوطه) استوار است (جوئل و همکاران، ۲۰۱۱). در روش‌های آماری چند متغیره، با افزایش تعداد نمونه‌ها روش‌های طبقه‌بندی و تغییرپذیری ژنتیکی به طور معنی‌داری، لحاظ می‌گردد. تجزیه و تحلیل برای رسیدن به جنبه‌هایی از قبیل بررسی اجمالی داده‌ها، طبقه‌بندی در میان گروه‌های مشاهده‌شده و مدل رگرسیون بین دو دسته داده، صورت می‌گیرد. به طور کلی در این نوع آنالیز، امکان آنالیز آماری همزمان چندین متغیر، فراهم می‌گردد. این آنالیز به دلیل برخورداری از خطای کمتر و اعتبار بیشتر و نگاه یکباره به عوامل متغیر نسبت به آنالیز تک متغیره کاربرد بیشتری دارد (کومار و همکاران، ۲۰۰۶). از میان روش‌های آنالیز آماری چند متغیره می‌توان آنالیز خوشه‌ای (cluster) و تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) را نام برد (آربونا و همکاران، ۲۰۱۳).

۱-۷-۱ تجزیه به مولفه‌های اصلی

تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)^۱ در واقع از طریق خلاصه نمودن متغیرهای همبسته اولیه به صورت مولفه‌های مستقل و محدود امکان تقسیم‌بندی نمونه‌ها یا متغیرها را در دیاگرام دو یا سه بعدی فراهم می‌نماید. این روش به عنوان روشی جهت کاهش داده‌ها به منظور وضوح روابط بین دو یا بیشتر از دو صفت به تعداد متغیرهای محدود غیر وابسته ساخته می‌شود. این تجزیه اجازه می‌دهد که تفاوت بین افراد را تصویر و گروه‌های ممکنه را شناسایی نمود (آربونا و همکاران، ۲۰۱۳). معمولاً مولفه اول بیشترین مقدار تغییرات را در بر دارد. اولین مولفه بیشترین تغییرپذیری موجود در داده‌های اصلی را بیان می‌کند و ادامه آن در مولفه‌های بعدی قرار می‌گیرد. بدین ترتیب که دومین مولفه حداکثر تغییرپذیری را که توسط مولفه اول بیان نشده‌است و با آن همبستگی نداشته‌است را بیان و مولفه‌های بعدی نیز بدین شکل قرار می‌گیرند (جوئل و همکاران، ۲۰۱۱). هر مولفه بخش متفاوتی از تغییرات داده‌های اصلی را نشان می‌دهد. بدین صورت کل تغییرات داده‌های اصلی به مولفه‌هایی که حالت تجمعی دارند، تقسیم می‌شوند و سهم هریک از مولفه‌ها در تغییرات از تقسیم آن به مجموع آن‌ها بیان می‌گردد. لازم به ذکر است که از تجزیه به مولفه‌های اصلی می‌توان جهت نشان دادن تعداد خوشه‌های مطلوب در یک مطالعه نیز استفاده کرد. برخی از محققین از این روش جهت سرعت بخشیدن به گزینش ژنوتیپ‌ها از نظر صفاتی همانند عملکرد دانه استفاده نموده‌اند. ضمن اینکه استفاده از این روش موجب کاهش در هزینه‌های انتخابی می‌گردد (غفاری و همکاران، ۱۳۸۲).

^۱ Principal Component Analysis

۸-۱ مطالعات بیوانفورماتیک متابولومیکس

مانند دیگر تحقیقات ژنومیکس کارکردی، متابولومیکس مقادیر زیادی داده تولید می‌کند. رسیدگی، پردازش و تجزیه و تحلیل این داده‌ها، چالشی روشن برای محققان است و نیاز به ابزارهای تخصصی ریاضی، آماری و بیوانفورماتیک دارد. متابولومیکس دارای نیازهای بیوانفورماتیک منحصر به فرد افزون بر ریز آرایه یا داده پروتئومیکس رایج است (آرابونا و همکاران، ۲۰۱۳). حوزه‌ی عمده‌ای که در آن تحولات بیوانفورماتیک برای پیشرفت بیشتر متابولومیکس بسیار مهم می‌باشد، شامل داده‌ها و مدیریت اطلاعات، پردازش داده‌های تحلیلی خام، استانداردهای متابولومیکس و هستی‌شناسی، تجزیه و تحلیل آماری و داده کاوی، ادغام داده‌ها و مدل سازی ریاضی از شبکه‌های متابولیکی در چارچوب سیستم‌های زیست شناسی است. پردازش داده‌های خام متابولومیکس، احتمالاً گام زمانبر و چالش برانگیز در تجزیه و تحلیل داده‌ها است (اکازاکی، ۲۰۱۲). AMDIS نرم افزاری است که با بهره‌گیری از الگوریتم‌های شرح داده شده، ثابت کرده است که در پردازش داده‌های GC-MS بسیار مفید است، اما کاربرد آن برای LC-MS و یا CE-MS تا حدودی محدود می‌باشد (هیل و همکاران، ۲۰۱۵). داده‌های ESI-LC-MS را می‌توان با استفاده از الگوریتم تشخیص جزء CODA و یا WMSM پردازش کرد. اگرچه برخی از ابزار تجاری و عمومی وجود دارند، اما هیچ یک از آن‌ها راه حلی جامع برای پاسخگویی به چالش‌های متابولومیکس را فراهم نمی‌کند. توسعه‌های اخیر در MZmine یک نرم افزار مستقل از سیستم عامل برای پردازش داده LC-MS در متابولومیکس و برنامه‌های کاربردی پروتئومیکس، یک گام مهم در این جهت فراهم می‌کند. این نرم افزار از زیرساخت‌هایی با توانایی ادغام الگوریتم‌های جدید و برنامه‌های کاربردی تشکیل شده است (باروپال و همکاران، ۲۰۱۲). دیگر ویژگی‌های مهم این نرم افزار قابلیت ارتقا به انواع دیگر داده‌های طیفی جرمی مانند GC-MS و CE-MS است. داده‌های متابولومیکس با طیف گسترده‌ای از الگوریتم‌های آماری تجزیه و تحلیل شده است، این را می‌توان در دو طبقه عمده الگوریتم نظارت نشده و نظارت شده طبقه بندی کرد (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۶). نمونه‌هایی از روش بدون نظارت که به طور معمول در تجزیه و تحلیل داده متابولومیکس استفاده می‌شود، خوشه بندی سلسله مراتبی، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) است. روش نظارت شده شامل ANOVA، حداقل مربعات جزئی (PLS)^۱ تجزیه و تحلیل تفکیک عملکرد است. (PLS)^۲ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مهم است که به کاهش تعداد متغیرها در جهت دستیابی ویژگی‌های مجزا در داده‌ها پرداخته شود. این را می‌توان از

^۱ Partial least squares^۲ Discriminant function analysis

طریق روش‌هایی در ANOVA و آزمون t ، یا از طریق ترکیب خطی متغیرها در PCA و یا با استفاده از الگوریتم‌های تکاملی مانند الگوریتم ژنتیک و یا برنامه نویسی ژنتیکی به دست آورد (اکازاکی، ۲۰۱۲). الگوریتم‌های تکاملی معمولاً در ترکیب با یک الگوریتم تجزیه و تحلیل دوم (به عنوان مثال PLS و یا DFA) انجام می‌شود. چالش‌های دیگر این است که بیوانفورماتیک امروزه با مشکل یکپارچه سازی داده‌های سیستم عامل متفاوت 'امیکس روبرو است، در بررسی‌های اخیر در پژوهش امیکس حرکت به سمت مدل سازی شبکه های بیوشیمیایی از طریق سیستم‌های زیست شناسی صورت گرفته است (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۶). یک پایگاه داده توسط گروه مندرس در ویرجینیا موسسه بیوانفورماتیک توسعه یافته، مثالی از یک سیستم مدیریت داده‌های جامع برای متابولومیکس و همچنین برای دیگر داده‌های ژنتیک فراهم می‌کند. DOME برای مدیریت داده های متابولومیکس، پروتئوم و ترنسکریپتومیکس در نظر گرفته شده است (هیگی و همکاران، ۲۰۱۰). این سیستم شامل یک زیر مجموعه، B-خالص است، که به عنوان یک پایگاه داده مرجع عمل می‌کند. طرح B-خالص در نظر گرفته شده، برای گرفتن اطلاعات در مورد زیست شناسی مولکولی از یک گونه خاص است. DOME نیز شامل مجموعه ای از ابزار برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری و تجسم داده‌ها است. بحث بیوانفورماتیک درباره متابولومیکس علمی نو حضور و نوپا و در حال پیشرفت روز افزون می‌باشد و نیازمند مطالعات و بررسی‌های بیشتر است (باروپال و همکاران، ۲۰۱۲).

فصل دوم

مرور منابع

۲-۱ تنش شوری

همان طور که در فصل قبل ذکر شد، تنش شوری اثرات مخربی بر گیاهان می‌گذارد و همواره محصولات کشاورزی را تهدید می‌کند. مطالعات زیادی در زمینه تاثیر تنش شوری و واکنش گیاهان مختلف به تنش و مکانیسم‌های تحمل تنش در آن‌ها صورت پذیرفته است. به عنوان مثال در گوجه فرنگی (*lycopersicum esculentum L.*)، شوری منجر به طولانی شدن زمان کشت تا سبز شدن می‌گردد (اکبری قوژدی و همکاران، ۱۳۸۹). کاهش رشد گیاه در تنش‌های کوتاه مدت، بیشتر به علت تنش اسمزی است، ولی در بلند مدت به علت ورود نمک زیاد به داخل گیاه، تنش‌های دیگری نظیر سمیت و عدم تعادل یونی به تنش اسمزی اضافه می‌گردند (فاضل و همکاران، ۱۳۹۰). تنش شوری باعث کاهش جوانه‌زنی در گیاهان مختلف می‌شوند (برومند و همکاران، ۲۰۰۵). مسرت و همکاران (۱۳۹۲) ادعا نمودند که پرایمینگ بذور، باعث بهبود جوانه‌زنی و سایر صفات تحت شرایط تنش شوری می‌گردد. همچنین آن‌ها بیان کردند که این عمل باعث جذب سریعتر آب مورد نیاز برای جوانه‌زنی می‌گردد و میانگین زمان لازم برای جوانه‌زنی با استفاده از پرایمینگ بذور کاهش می‌یابد، در حالی که شرایط تنش باعث تاخیر قابل ملاحظه‌ای در جوانه‌زنی می‌شود. آن‌ها نیز همچنین ادعا نمودند که پرایمینگ بذور باعث افزایش میزان اسید نوکلئیک، پروتئین و افزایش تحرک مواد ذخیره‌ای در بذور می‌گردد، در نتیجه بذور سریعتر رشد می‌کند و جوانه می‌زند و بذور قبل از رسیدن به شرایط نامساعد رشد، جوانه می‌زنند. به طور کلی پرایمینگ از طریق افزایش میزان آنزیم‌های لازم برای جوانه زنی، نظیر آلفا آمیلاز و افزایش درصد و سرعت جوانه زنی، حفظ تعادل یونی و نیز ایجاد تعادل هورمونی، از گیاه در برابر اثرات نامطلوب تنش شوری محافظت می‌کند و رشد آن را تحت چنین شرایطی بهبود می‌بخشد (اقبال و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج مطالعات محققین نشان داده است که در گیاهان زراعی با افزایش شوری، خصوصیات مورفولوژیک آنها نیز تغییر می‌یابد. برخی از مطالعات افزایش رشد گندم در ۱۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به مدت ۱۸ روز را نشان دادند (فاضل کاخکی و همکاران، ۱۳۹۰). مطالعه بایبوردی (۲۰۱۰)، در کلزا، تفاوت حدود ۲۰ سانتی‌متر کاهش ارتفاع ارقام کلزا نسبت به شاهد در شوری ۲۰ دسی‌زیمنس بر متر را نشان داد. بررسی هیگبی و همکاران (۲۰۱۰) نیز، کاهش ۲۱ تا ۴۶ درصد ارتفاع بوته پنبه (*Gossypium hirsutum L.*) در شرایط تنش ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl نشان داد. یکی از مهمترین صفات کلیدی برای تحمل به شوری در گندم، جذب مقادیر اندک Na^+ و Cl^- (نسبت بالای K^+/Na^+) و انتقال آنها به برگ‌ها است (دفع نمک). اما در برنج، جریان انتقال (دفع) به میزان زیادی وابسته به جذب Na^+ است، که حجم بیشتری را نسبت به گندم تشکیل می‌دهد، بنابراین اهمیت نسبت K^+/Na^+ در برنج کاهش می‌یابد به طور کلی، غلات نسبت به لگوم‌ها متحمل‌تر هستند (باکس و همکاران، ۲۰۰۰ و بهرامی و همکاران، ۲۰۱۲). گزارشات همچنین حاکی

از وجود تنوع بین ارقام کنبج است به عنوان مثال مطالعه کوکا و همکاران (۲۰۰۷)، نشان داد که تا شوری پنج دسی زیمنس بر متر تفاوت چندانی بین خصوصیات مورفولوژیکی واریته‌های کنبج نسبت به شاهد نیست ولی با افزایش شوری به ۱۰ دسی زیمنس، علائم تنش اعم از کاهش ارتفاع، وزن خشک و تر اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه مشاهده شد. گابالا و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که رشد گیاهچه کنبج تا شوری ۲/۳ دسی زیمنس تحت تاثیر قرار نگرفت، اما با افزایش شوری به ۴/۷ دسی زیمنس، ارتفاع و وزن خشک ساقه به ترتیب ۴۳ و ۷۶ درصد نسبت به شوری ۲/۳ دسی زیمنس کاهش یافت. در مطالعه‌ای دیگر اعلام گردید که سطوح پایین شوری تا ۶۰ میلی‌مولار NaCl رشد کنبج افزایش و با افزایش سطوح شوری به بالاتر از آن صفات مورفولوژیک در کنبج کاهش می‌یابد (محمود و همکاران، ۲۰۰۳).

تحقیقات اخیر نشان دهنده حضور محافظ‌های سازگار، هورمون‌های گیاهی، آنتی اکسیدان‌های، مولکول‌های سیگنالی، افزایش و کاهش بیان ژن‌ها در تحمل تنش می‌باشد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴).

۲-۲ بیان ژن در تنش شوری

پاسخ‌های پیچیده گیاهان به تنش‌های غیر زیستی با بیان ژن‌های متعدد و مسیرهای مولکولی و بیوشیمیایی گوناگونی همراه است. بسیاری از این ژن‌ها در تنش‌های مختلف به صورت مشترک بیان می‌شوند (داناو و همکاران، ۲۰۱۰). در بررسی ریزآرایه cdna در برنج تحت تنش شوری، مشخص شد که افزایش یا کاهش بیان ژن‌های واکنش دهنده در برابر تنش‌ها، از نظر زمانی در فواصل مختلف روی می‌دهد. به عبارتی دیگر تغییر در بیان ژن‌ها در دوره‌های بلند مدت، میان مدت، کوتاه مدت رخ می‌دهد (کاوار و همکاران، ۲۰۰۷). این تغییرات در بیان ژن‌ها، توسط عوامل رونویسی انجام می‌شود، به عنوان مثال در آرابیدوپسیس، فاکتور رونویسی DREB1/CBF3 تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های هدف القاء شونده با تنش را کنترل می‌کند و موجب افزایش تحمل به تنش شوری و خشکی می‌شود، همچنین AREB1 تنظیم بیان ژن کد کننده یک پروتئین LEA و برخی از ژن‌های تنظیمی دیگر را بر عهده دارد. در این گیاه ژن SnRK2.8 نیز پروتئینی را کد می‌کند که در شرایط تنش اسمزی فعال می‌گردد و افزایش بیان آن نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش شوری و خشکی دارد (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). ژن AtALDH3 در آرابیدوپسیس کد کننده پروتئین‌های جمع‌آوری کننده رادیکال‌های اکسیژن فعال است که افزایش قابل ملاحظه‌ای در تحمل به تنش و حذف اثرات مخرب تنش دارد. در توتون ژن NPK1 که کد کننده یک پروتئین کیناز، کیناز- کیناز است یک سیستم پیام اکسیداتیو را فعال می‌کند که موجب مقاومت به خشکی و شوری در این گیاه می‌گردد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). از

ژن‌های موثر در تحمل تنش، می‌توان به پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز نیز اشاره نمود. مطالعات پژوهشگران نشان داد که آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز در سنتز پرولین نقش عمده و مهمی ایفا می‌کند و با تولید پرولین در تحمل تنش به گیاهان کمک می‌نماید. نتایج مطالعه بهلگردی و همکاران (۱۳۹۳) بر روی گیاهچه زیتون تحت تنش شوری نشان داد ژن کد کننده آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز افزایش بیان داشت و منجر به افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش در این گیاه شد. سیلوا و همکاران (۲۰۰۸) نیز افزایش بیان این ژن را در گندم تحت تنش شوری گزارش کردند. همچنین مطالعات یامچی و همکاران (۱۳۸۳) مبنی بر افزایش ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز در گیاه توتون تراریخته، هنگام مواجهه با تنش محیطی بود. پرسل و همکاران (۲۰۰۴)، سو و همکاران (۲۰۱۱)، ژانگ و همکاران (۲۰۱۳)، ژنگ و همکاران (۲۰۱۴)، افزایش بیان این ژن را در گیاهان مختلف مانند آرابیدوپسیس، برنج، سورگوم، گوجه فرنگی، گزارش نمودند. میواینوزیتول منوفسفاتاز نیز ژن دیگری است که در تحمل تنش در گیاهان موثر است و منجر به تولید میواینوزیتول می‌شود، نتایج مطالعه ماجی (۲۰۰۷) و نیز پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، حاکی از افزایش بیان این ژن در برنج، توتون، تنباکو و نیز سویا بود. همچنین مطالعات سوزوکی و همکاران (۲۰۰۷)، مشخص نمودند که ژن میواینوزیتول منوفسفاتاز در برنج، هنگام مواجهه با شرایط نامساعد محیطی، افزایش بیان داشت. ترابی نژاد و همکاران در سال ۲۰۰۹، افزایش بیان این ژن را در نخود، گزارش نمودند. ساراب و همکاران (۲۰۱۳)، افزایش بیان ژن میواینوزیتول منوفسفاتاز در هنگام تنش‌های محیطی و نقش موثر آن در بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهچه نخود را مطرح کردند. از عوامل موثر دیگر در تحمل تنش، آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز است که منجر به تولید ترکیبات فنولی می‌گردد، براساس مطالعات انجام شده، افزایش بیان ژن کد کننده این آنزیم، باعث افزایش تحمل به تنش در گیاهان می‌شود، حقیقی و همکاران (۱۳۹۲)، اظهار داشتند که این آنزیم تحت تنش شوری در گیاهان افزایش می‌یابد. قلی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز، افزایش بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز و به دنبال آن افزایش میزان فنیل آلانین آمونیا لیاز در ذرت، تحت تنش شوری را گزارش نمود. ولی-فرد و همکاران در سال‌های ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ و نیز ژانگ و همکاران (۲۰۱۲)، افزایش بیان این ژن موثر در تحمل تنش در گیاهان دارویی از جمله گونه‌های مریم گلی *Salvia Species* را مطرح کردند.

۲-۳ پروتئین در تنش شوری

امروزه اطلاعات فراوانی در مورد پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری که به طور اختصاصی القاء می‌شوند گزارش شده است (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵)، همچنین مطالعه پروتئوم در اندامک‌های مختلف سلولی شامل میتوکندری، کلروپلاست، پراکسی‌زوم، دیواره سلولی، جنین و گرده بطور روز افزونی در حال انجام است (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱).

از بین این پروتئین‌ها می‌توان به پروتئین LEA اشاره کرد که نقش سم‌زدایی و کاهش صدمات ناشی از تنش شوری به سلول‌ها و ماکرومولکول‌های سلول را دارد. اولین بار این پروتئین در گندم و پنبه به عنوان پروتئین‌های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند (ناوادی و همکاران، ۱۹۹۵). در تحقیقی که در ارتباط با بیان بیش از حد ژن DHN₅ گندم، در آراییدوپسیس، جهت مقاومت به تنش انجام شد به این نتیجه رسیدند که ژن کد کننده پروتئین LEA در تمامی گیاهان موجود است و در زمان تنش باعث ایجاد مقاومت به تنش می‌شوند و حتی بیان بیش از حد آن منجر به تحمل بیشتر می‌شود (سایرم و همکاران، ۲۰۰۴). از دیگر پروتئین‌ها، پروتئین Hsp است که همبستگی مثبتی با تحمل تنش دارد. مطالعات ژنومیکس و پروتئومیکس در گیاهان مختلف حاکی از افزایش بیان ژن‌های کد کننده این پروتئین در شرایط تنش شوری هستند و در مطالعات اخیر مشخص شده است که انتقال این ژن‌ها از گیاهی به گیاه دیگر سبب افزایش مقاومت به تنش‌ها اعم از خشکی و شوری و گرما می‌گردد به عنوان مثال انتقال ژن Hsp101 از آراییدوپسیس به برنج سبب بهبود تحمل برنج در شرایط تنش گردیده است (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵). تحقیقات یانگ و همکاران (۲۰۰۷) در شناسایی ژن‌های درگیر در پروتئین‌های گروه GRAS در کلزا مبین نقش برجسته‌ی این پروتئین‌ها در تحمل به تنش خشکی و شوری با افزایش راندمان فتوسنتز و تجمع پروتئین‌های محلول بود. بیان ژن-های مزبور در افزایش کلروفیل و ثبات آن نیز تاثیر قابل توجهی داشت. ژن *Vp1* (*Viviparous-1*) در ذرت پاسخ‌های نموی متعددی را در مرحله بلوغ بذر تنظیم می‌کند، *Vp1* موجب عدم خفگی بذر یا زنده‌زایی (*Vivipary*) در ذرت می‌شود. *Vp1* می‌تواند از طریق عنصر *Sph* به طور مستقیم به DNA اتصال یابد و یا از طریق میان کنش با یک پروتئین bZIP (مثل ABI5) روی عناصر *ABRE* عمل کند و از این طریق منجر به تحمل تنش گردد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج بررسی‌های اثر تنش خشکی روی ۵ رقم آفتابگردان نشان داد که عامل خشکی در گیاه آفتابگردان می‌تواند به عنوان یک عامل تنش زه‌ا تولید رادیکال‌های اکسیدانت کننده نماید و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه را تحت تاثیر قرار دهد، لذا دفاع آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در برابر این رادیکال‌ها می‌تواند شاخص یا بیومارکر مهمی از اثرات خشکی بر بافت‌های مختلف گیاه باشد (طباطبائی و همکاران، ۱۳۹۰ و کایا و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعات نشان داد که با افزایش تنش خشکی و شوری پس از ۲۴ ساعت، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در گیاه افزایش می‌یابد و می‌توان از سوپراکسید دسموتاز به عنوان یک معیار جهت گزینش ارقام مقاوم استفاده نمود (طباطبائی و همکاران، ۱۳۹۰)، در این مطالعات مشخص شد که رقم مقاوم تر در گیاه آفتابگردان، SOD بالاتری دارد و می‌توان از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت جهت تعیین گونه‌های متحمل به خشکی در آفتابگردان استفاده کرد. در آزمایشی که بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و محصول تخریبی مالون دی آلدئید روی سورگوم در شرایط تنش

خشکی انجام گردید، سطوح آنزیم‌ها و مالون دی آلدئید در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱). محققین تعیین سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را به عنوان یک پارامتر مهم جهت تعیین گونه‌های مقاوم به خشکی در سورگوم علوفه ایی تشخیص دادند (کینرسلی و همکاران، ۲۰۱۰). احمدی و همکاران (۱۳۹۱)، گزارش نمودند که با بهبود برخی از فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در گیاه *Olea Europaea*، فعالیت فتوسنتزی و رشد گیاه و حفظ وضعیت آب گیاه نیز تحت تنش شوری بهبود می‌یابد. در مطالعه‌ای که گهلوت و همکاران (۲۰۰۵)، بر روی کنجد انجام دادند مشخص شد که ارقام کنجد تحت تنش شوری آنزیم سوپر اکسید دسموتاز بیشتری تولید می‌کنند و این آنزیم تحمل این گیاه به تنش شوری نقش مهمی را ایفا می‌کند.

۲-۴ متابولومیکس در تنش شوری

گیاهانی که در شرایط تنش خشکی و شوری قرار می‌گیرند، با از دست دادن آب درون سلولی خود باعث افزایش تجمع تنظیم کننده‌های اسمزی مانند پرولین، گلیسین می‌شوند. یکی از اولین برنامه‌های کاربردی از تجزیه و تحلیل متابولومیکس در پاسخ گیاهان به تنش شوری در میوه‌های گوجه فرنگی با استفاده از طیف سنجی FT-IR گزارش شد (ملونی و همکاران، ۲۰۰۹). گیاه آرابیدوپسیس سطوح متابولیتی بالایی در شرایط تنش تولید نمود و تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در این گیاه سبب افزایش ساکارز، پرولین و متابولیتی ناشناخته شد. علاوه بر این قندهای الکلی اسیدهای ارگانیک و نیز مشتقات آن در این گیاه تشخیص داده شد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). در برگ‌های گوجه فرنگی محتویات قندهای محلول و ساکاریدها به میزان قابل توجهی افزایش یافت، اما محتوای نشاسته تحت تاثیر قرار نگرفت (اپل و همکاران، ۲۰۱۴). تحقیقات انجام گرفته بر روی پنج گونه آفتابگردان نشان داد که گونه‌های متحمل به شوری قندهای محلول بیشتری تولید کردند (طباطبائی و همکاران، ۱۳۹۰). پیترسون و همکاران (۲۰۰۹) کاهش قندهای گلوکز و فروکتوز را در برخی از تیمارهای شوری در گیاهان گزارش نمودند. در مطالعه‌ای ترکیبی از تغییرات اولیه و تاخیری در پروفایل متابولیتی تفاوت‌هایی را در انگور در پاسخ به تنش شوری و خشکی در سال ۲۰۰۷ توسط کرامر و همکاران انجام شد و تفاوت‌هایی را در پاسخ مولکولی به کمبود آب و تنش شوری را با کمک GC-MS آشکار نمود که غلظت گلوکز، مالات و پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی به نسبت گیاهان در تنش شوری بیشتر دیده شد، این اختلاف در سطح نسخه برداری بسیاری از ژن‌های درگیر در متابولیسم انرژی، بیانگر این موضوع بود که در گیاهان تنش آب دیده تقاضای بالاتری برای تنظیم اسموتیکی و سم‌زدایی ROS نسبت به گیاهان در معرض تنش شوری وجود داشت. در مطالعه‌ای قابل توجه دیگری بروی گیاه *Populus Eupharatica* که گیاهی متحمل به شوری است و از پروفایل متابولیت‌ها و بیان ژن استفاده کردند و به منظور درک مکانیسم سازش به تنش، آزمایش را درون

زیستگاه طبیعی گیاه انجام دادند، متابولیت گیاهان در معرض ترکیبی از تنش‌های محیطی نظیر گرما، خشکی و شوری آشکار نمود که ساکارز و سایر قندها از قبیل مالتوز و گلوکز تجمع می‌یابند در مقابل پرولین در تنش شوری و خشکی از تجمع بیشتری برخوردار بود که در طی تنش گرما تولید نشد. در این مطالعه ساکارز به عنوان سازگارکننده‌ی اصلی در که طی تنش گرما ذکر شد (تودن و همکاران، ۲۰۰۷). قندهای محلول در آب در ساقه گندم عمدتاً از فروکتان، ساکارز، گلوکز و فروکتوز تشکیل شده اند، اما مهمترین و اصلی ترین فرم ذخیره قندها در ساقه گندم فروکتان‌ها و ساکارز می‌باشد (زادوریان و همکاران، ۱۳۹۰). حاجی بلند و همکاران (۱۳۹۰)، بیان نمودند که ترکیبات فنولی و پلی آمین‌ها در تنش‌های محیطی در گیاه توتون افزایش یافت. نتایج مطالعه ماجی (۲۰۰۷) و نیز پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، حاکی از افزایش دیگر پلی‌ال‌ها مانند میواینوزیتول در برنج، توتون، تنباکو و نیز سویا بود. همچنین پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، ماجی و همکاران (۲۰۰۷) و ماجیو و همکاران (۲۰۰۲) کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، اظهار نمودند که مانیتول و سوربیتول نیز در این گیاهان افزایش یافت. چن و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که تحت تنش کلرید سدیم در گیاه *Dunaliella*، پلی‌ال دیگری به نام گلیسرول افزایش یافت و موجب تغییر غلظت درونی سلول شد. کاتینوت (۲۰۰۸) و مورا و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه‌ای، افزایش ترکیبات فنولی از قبیل اسید بنزوئیک را در گیاهانی مانند سویا، گوجه فرنگی، برنج و توتون و انگور تحت تنش‌های محیطی بیان نمودند. عزیز و همکاران (۲۰۱۵)، نیز افزایش اسیدهای چرب در زمان تنش در گیاه برنج را گزارش کردند. نهال‌های برنج نیز با تیمار با پرولین در تنش شوری رشد بهتری نشان دادند. در مطالعات انجام شده بر روی محتوای پرولین در برنج‌های تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، مشخص شد که میزان پرولین برگ ۲۰ برابر شرایط کنترل افزایش یافته است (فاروق و همکاران، ۲۰۱۰). هوآی و همکاران (۲۰۰۳) افزایش میزان پرولین برگ برنج بعد از تنش شوری را مشاهده کردند و ارتباط بالایی بین میزان پرولین و حساسیت به شوری گزارش نمودند. در لاین‌های حاصل از کشت بافت برنج تحمل به تنش شوری، در ارتباط مستقیم با میزان پرولین بود (هیگبی و همکاران، ۲۰۱۰). به طور کلی پذیرفته شده است که تجمع پرولین در شرایط تنش شوری، یکی از مکانیسم‌های تنظیم فشار اسمزی است و در برخی گیاهان مهمترین اسمزای آلی است (بابایی و همکاران، ۱۳۸۹). تحقیقات احمدی (۱۳۹۱)، بر روی پرولین کنبدرپاخنخ تحت تنش نشان داد که با افزایش شدت تنش در مراحل اولیه رشد تا گلدهی گیاه، انباشت اسمولیت‌های سازگار کننده نظیر پرولین، کربوهیدرات‌های محلول در برگ کنبدرپاخنخ افزایش یافت. رحمان و همکاران (۲۰۱۳)، گلیسین را از دیگر متابولیت‌های موثر در تحمل رنج به تنش شوری آن دانستند. در مطالعه‌ای بر روی سورگوم تحت تنش شوری، توسط پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، مشخص شد با افزایش تنش شوری بسیاری از متابولیت‌های این گیاه مانند اسیدهای آمینه

گلیسین، پرولین، لیزین، ال سرین، ال ترئونین، ال آلانین و ترکیباتی مانند اسید سیتریک مشاهده گردید، علاوه بر آن متابولیت‌های دیگری مانند قندها در برگ و ریشه سورگوم مشاهده شد. گهلوت و همکاران (۲۰۰۵)، اظهار نمودند که افزایش پرولین و قندهای مانند ساکارز می‌تواند به تنظیم اسمزی در طول تنش شوری در گیاه کنجد کمک کند. آن‌ها با بررسی متابولیت‌های کنجد در طول تنش شوری ۷۰ میلی‌مولار نشان دادند که ممکن است افزایش ساکارز منجر به تطابق بهتر شوری گردد، اما آن‌ها افزایش در پروتئین‌های محلول را مرتبط با مهار رشد و تحمل تنش شوری ارقام کنجد ندانستند. رونالت و همکاران (۲۰۱۰) و وانگ و همکاران (۲۰۱۱)، افزایش متابولیت‌هایی از قبیل اسید گاما آمینوبوتریک را در تنش شوری در گیاهان تنباکو، آرابیدوپسیس مطرح کردند، همچنین نتایج کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، نشان داد که اسید گاما آمینوبوتریک تحت تنش‌های مختلف در گیاهان افزایش یافت. نتایج سینگ و همکاران (۲۰۱۰) نیز مبنی بر افزایش اسید بتا آمینو بوتریک در تنش‌های محیطی در گیاه آرابیدوپسیس بود. پاولی و همکاران (۲۰۰۵) و ماجی (۲۰۰۷) و کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱) همچنین افزایش اسید مالیک و اسید سیتریک و اسید فسفریک در گیاهان تحت تنش‌های محیطی را نشان دادند.

اکثر مطالعات بر روی متابولیت‌های ثانویه کنجد با تمرکز بر لیگنان‌های سزامین، سزامول، سزامولین و سزامینول در دانه متمرکز شده است، این لیگنان‌ها حاوی خواص آنتی اکسیدانی هستند و ممکن است در ارتقا خواص کنجد و روغن آن نقش مهمی داشته باشند (لائورنتین، ۲۰۰۶)، اما بر روی متابولیت‌های گیاهچه کنجد تاکنون مطالعات ناچیزی انجام گرفته است بر همین اساس انجام مطالعات بیشتر بر روی متابولیت‌های تولیدی گیاهچه کنجد در شرایط رشدی مختلف جهت دستیابی به عملکردی بهتر، امری ضروری به نظر می‌رسد، بدین منظور این مطالعه جهت شناسایی متابولیت‌های گیاهچه کنجد در شرایط تنش شوری و نیز نقش این متابولیت‌ها در تحمل گیاهچه کنجد به تنش، صورت پذیرفت.

فصل سوم

مواد و روش ها

در این فصل روش کشت ۴۵ ژنوتیپ کنگد و نیز اندازه‌گیری میزان پرولین برگ به روش بیتز و همکاران (۱۹۷۳)، با استفاده از ناین هیدرین) و صفات مورفولوژیک موثر در انتخاب ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش شوری آورده شده است. در ابتدا از غلظت‌های پایین نمک (۵۰ و ۲۵ میلی مولار NaCl) جهت یافتن غلظت مناسب و حداکثر غلظتی که ژنوتیپ‌ها قادر به تحمل آن هستند، استفاده شد و با مشاهده تحمل گیاهچه‌های کنگد به تدریج از غلظت‌های بالاتری از کلرید سدیم استفاده گردید و در مقدار ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم علائم تنش ظاهر گردید. نهایتاً حداکثر میزان نمک که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه توانایی تحمل آن را داشتند، ۲۰۰ میلی مولار نمک بود. بنابراین غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl، مورد استفاده قرار گرفتند. در قالب این پژوهش پس از شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری، به بررسی متابولیت‌های موجود در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس با استفاده از حلال‌های متانول، کلروفرم و آب در بخش‌های بعدی دنبال گردید. و پس از شناسایی متابولیت‌ها و تفاوت بین دو ژنوتیپ از نظر تولید برخی متابولیت‌ها که بیشترین تفاوت را بین دو ژنوتیپ نشان دادند، بررسی بیان ژن‌های موثر در سنتز آن‌ها مانند پرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منوفسفاتاز و فنیل آلانین آمونیالاز ۱ انجام شد.

۳-۱ مواد

نیتрат پتاسیم (KNO_3)، نیترات کلسیم ($\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)، آمونیوم دی هیدروژن فسفات ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)، سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)، اسید مولیبدیک ($\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)، اسید بوریک (HBO_3)، کلرومنگنز ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)، سولفات روی ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)، سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، نمک (NaCl)، اسید سولفوسالیسیلیک، اسید استیک، اسیدفسفریک، معرف ناین هیدرین، تولوئن از شرکت Merck (فرانکفورت آلمان) تهیه شد. متوکسی آمین هیدروکلرید و dNTP از شرکت Sigma (آلمان) تهیه گردید. MSTFA N -methyl- N -trimethylsilyl trifluoroacetamide از شرکت (Gene Ruler 100 bp، EDTA، Loading Buffer، DEPC Treated Water، Bioscience (کمبریج، انگلستان) نیز از شرکت Bioscience (کمبریج، انگلستان) خریداری شد. متانول، کلروفرم، اتانول و ایزوپروپانول، کیت سنتز cDNA و محلول RNX-PLUS از شرکت سینا کلون (کرج، ایران) خریداری شد. پرایمرهای Beta Actin، FPAL1، FDPCS و FMIPS از شرکت Bioneer (داجون، کره جنوبی) تهیه گردیدند.

مواد ژنتیکی جمع آوری شده جهت اجرای این تحقیق، شامل ۴۵ ژنوتیپ شامل ۵ لاین داخلی (ورامین ۲۸۲۲، یکتا، داراب ۱، TN234 و TN240)، و ۴ ژنوتیپ آسیایی (مدیترانه‌ای، هندی، عراقی و پاکستانی) به همراه ۳۶ هیبرید F₁ بود. بذور لاین‌های کنبدرگزیده از مناطق اقلیمی مختلف ایران از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و مراکز تحقیقات فارس و دزفول توسط دکتر مهدیه پارسائیان، تامین گردیدند. ژنوتیپ-های دارای Tn از بانک ژن کشور می‌باشند. علاوه بر لاین‌های داخلی، لاین‌های خارجی نیز از کشورهای آسیایی هند، پاکستان، عراق در این پژوهش با توجه به برخورداری از تنوع خصوصیات مورفولوژیک، زراعی و کیفی مورد گزینش واقع شدند (جدول پیوست ۱).

۳-۲ تجهیزات

اتوکلاو Reyhan Teb (تهران، ایران)، ورتکس Ikarh B2 (نورنبرگ، آلمان)، هود میکروبی و شیمیایی Behsan (تهران، ایران)، ترموسایکلر گرادیانت Bio Rad (بریکلی، آمریکا)، سمپلر ۱۰۰، ۱۰، ۱۰۰۰ میکرو لیتر، سانتیفریوژ یخچالدار و میکرو سانتیفریوژ Sigma (هامبورگ، آلمان)، آون و حمام آب گرم Memmert (روتنگن، آلمان)، میکروویو Panasonic (اوساکا، ژاپن)، ژل داک Kimiagene - DigiDoc H101 (تهران، ایران)، هات پلیت Stuart (بریتانیا، انگلستان)، pH متر Lutron (نیوتاپی، تایوان)، ترازو A&D (توکیو، ژاپن)، الکتروفورز BioRad (بریکلی، آمریکا)، درای بس Lab (Dry bath) net (نیوجرسی، آمریکا)، EC متر Jenway (بریتانیا، انگلستان)، اسپکتوفتومتر PD 3000UY (توکیو، ژاپن)، NanoDrop 1000 (روچستر، آمریکا)، یخچال فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران)، آون تحت خلا (وکیوم) Lte Scientiic Ltd (منچستر، انگلستان) و طیف سنجی جرمی - کروماتوگرافی گازی Agilent (GC-MS) (کالیفرنیا، آمریکا) در این پایان نامه استفاده شد.

۳-۳ درصد و سرعت جوانه‌زنی

جهت اندازه‌گیری درصد و سرعت جوانه‌زنی ابتدا ظروف پتريدیش (با قطر ۹ سانتی متر) و کاغذ صافی شماره ۱، با هیپوکلرید ۳ درصد ضد عفونی شدند. بذور نیز در هیپوکلرید یک درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفتند و سپس با آب مقطر ۳ بار شستشو داده شدند. پس از آن ۱۰۰ دانه در هر پتری‌دیش بر روی کاغذ صافی در ۳ تکرار و ۲ سطح شوری (۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌مولار) و تیمار شاهد قرار گرفتند. روزانه ۵ میلی‌لیتر از محلول حاوی کلرید سدیم (۲۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) و نیز آب مقطر (شاهد) به ظروف اضافه می‌شد. این مرحله در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز انجام گرفت. جوانه‌زنی بعد از ۲۴ ساعت صورت پذیرفت و دانه‌های جوانه زده در فواصل معین و منظم (به

صورت روزانه) شمارش شدند. به منظور محاسبه سرعت جوانه‌زنی از رابطه $GR = \sum_{i=1}^n \frac{Si}{Di}$ استفاده شد. که در آن GR: سرعت جوانه زنی (تعداد بذر جوانه زده در روز)، Si تعداد بذرهای جوانه زده در هر شمارش، Di تعداد روز تا شمارش n ام و n تعداد دفعات شمارش می باشد (مصطفوی و همکاران، ۱۳۹۱).

۳-۴ کشت هیدروپونیک کنجد

برای تهیه محلول غذایی جهت کشت ژنوتیپ‌های کنجد، از محلول غذایی هوگلند استفاده گردید. بدین منظور محلول غذایی شامل ۲ میلی‌مولار نیتрат پتاسیم (KNO_3)، ۰/۰۴ میلی‌مولار نیترات کلسیم ($CaN_2O_6.4H_2O$)، ۲/۵ میلی‌مولار آمونیوم دی هیدروژن فسفات ($NH_4 H_2PO_4$)، ۶/۴ میلی‌مولار سولفات آهن ($FeSO_4.6H_2O$)، ۱/۲ میلی‌مولار اسید مولیبدیک ($H_2 MoO_4.4H_2O$)، ۰/۴ میلی‌مولار اسید بوریک (HBO_3)، ۰/۰۹ میلی‌مولار کلرور منگنز ($MnCl_2.4H_2O$)، ۰/۰۷ میلی‌مولار سولفات روی ($ZnSO_4.7H_2O$)، ۰/۰۳ میلی‌مولار سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)، ۶ میلی‌مولار EDTA تهیه شد (جداول پیوست ۳ و ۲). برای هر ظرف (با حجم ۲ لیتر و بدنه مشکی) به میزان نیم لیتر محلول غذایی هوگلند به روش بالا تهیه گردید. سپس محلول‌ها به ظروف کشت منتقل گردید (شکل ۳-۱)، (ثابت تیموری و همکاران، ۱۳۸۸).



شکل ۳-۱ کشت هیدروپونیک کنجد

۳-۵ شناسایی ژنوتیپ متحمل و حساس به شوری بر اساس اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک

به منظور شناسایی ژنوتیپ متحمل و حساس به شوری، از ۴۵ ژنوتیپ (۹ والد و ۳۶ ژنوتیپ F_1) استفاده شد. بذور هر ژنوتیپ ابتدا در ماسه نرم ۲ بار شسته شده و در گلدان در ۳ تکرار کشت گردید. پس از جوانه‌زنی و سبز شدن، این گلدان‌ها به محیط هیدروپونیک حاوی محلول نیم‌هوگلند منتقل شدند، محلول هوگلند به فاصله هر سه روز تعویض و $pH=6$ تنظیم گردید. هدایت الکتریکی محلول نیز در شاهد و تیمارهای تنش اندازه‌گیری شد (جدول پیوست ۴). این محلول غذایی در ابتدا با نسبت ۱ به ۸ به گیاهان داده می‌شد و به تدریج در طول یک هفته محلول نیم هوگلند در اختیار گیاهان قرار گرفت. به منظور ارزیابی میزان تحمل به شوری والدین و نتاج F_1 پس از استقرار گیاه و رسیدن به مرحله چهاربرگی، تنش نمک به تدریج جهت سازگاری گیاه اعمال شد. پس از گذشت یک ماه، صفاتی مانند طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه (توسطه کولیس) و وزن تر گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پس از قراردادن نمونه‌ها در دستگاه آون خشک با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت وزن خشک گیاهچه‌ی آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد. میزان پرولین برگ هم در شرایط تنش و هم شرایط عدم تنش مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس این صفات، ژنوتیپ‌های حساس و متحمل شناسایی گردیدند.

۳-۶ پرولین آزاد برگ:

میزان پرولین با برداشت ۰/۵ گرم از جوانترین برگ‌ها به روش بیتز (۱۹۷۳) صورت پذیرفت. نمونه برگ برداشت شده با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد در هاون سابیده و محلول حاصل از کاغذ صافی شماره ۳ عبور داده شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده با ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص و ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین مخلوط گردید. این معرف با حرارت دادن ۲/۵ گرم ناین هیدرین در ۴۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار و ۶۰ میلی‌لیتر اسید استیک خالص بدست آمد. محلول اخیر به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در دمای اتاق به تدریج سرد گردید. پس از آن ۴ میلی‌لیتر تولوئن به نمونه‌ها اضافه و درب لوله‌ها بسته شد. و چند ثانیه تکان داده شدند و به مدت ۱۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت در هر لوله ۲ فاز تشکیل شد که فاز بالایی فاز تولوئنی حاوی اسید آمینه پرولین بود. ۲ میلی‌لیتر از این فاز به دقت برداشت و در دستگاه اسپکتروفتومتر در ضریب نوری ۵۲۰ نانومتر میزان پرولین هر ژنوتیپ قرائت شد (بیتز و همکاران، ۱۹۷۳).

۳-۷ استخراج متابولیت‌ها

دو ژنوتیپ زودرس $\times$ پاکستانی و عراقی به عنوان ژنوتیپ متحمل و حساس به تنش شوری در ۳ تکرار، در شرایط عدم تنش (شاهد) و تنش ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، جهت استخراج متابولوم و تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفتند. ۱۰۰ میلی گرم از نمونه برگ در ازت مایع ساییده شد و به این مقدار نمونه، ۱ میلی لیتر متانول، کلروفرم و آب مقطر (۸:۱:۱) افزوده شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای صفر درجه قرار گرفت. نمونه‌ها با دستگاه وکیوم (آون تحت خلا) خشک شدند. جهت انجام مشتق سازی از متوکسی آمین هیدروکلرید (جهت حفظ ساختار خطی قندهای کاهنده) به مقدار ۲۰ میلی گرم در پیریدین بی آب استفاده شد که به هر نمونه ۳۰ میکرولیتر متوکسی از آمین هیدروکلرید افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن از ترکیب MSTFA (جهت فرار سازی متابولیت‌ها) به مقدار ۸۰ میکرولیتر به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ماند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵). در نهایت به مقدار یک میکرو لیتر از عصاره حاصل به دستگاه طیف سنجی جرمی- کروماتوگرافی گازی (GC: ۶۸۹۰ N)، (MS: ۵۹۷۳ N)، در پژوهشگاه مواد و انرژی واقع در کرج، تزریق و دمای پورت تزریق (injector) در ۲۷۰ درجه سانتی گراد حفظ گردید. در این دستگاه از ستون کاپیلاری HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با میزان جریان ۱۰ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای شروع کار ۱۰۰ درجه سانتی گراد بود که به مدت ۲ دقیقه در این دما قرار گرفت. کل زمان پردازش توسط دستگاه ۳۷ دقیقه طول کشید.

۳-۸ استخراج RNA

ابتدا هاون چینی، به مدت نیم ساعت داخل هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) قرار داده شد. با آب مقطر آب کشی و با فویل آلومینیومی پوشانیده شد و درون آون با دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد به مدت بیست و چهار ساعت قرار داده شد. ظروف از آون خارج گردید و پس از سرد شدن، جهت کوبیدن نمونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های برگ گیاه منجد و به میزان ۱۲۰ میلی گرم (۰/۱۲ گرم) درون هاون چینی و در حضور ازت مایع به صورت پودر درآمد و ۰/۱ گرم از نمونه داخل تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری استریل قرار گرفت. محلول RNAX_Plus (یک میلی لیتر) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۳-۲ دقیقه ورتکس شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. کلروفرم (۴۰۰ میکرو لیتر) به آن اضافه شد و میکروتیوب‌ها خوب تکان داده شدند تا مخلوط کدري بدست آید. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور $20817 \times g$ قرار داده شدند. فاز رویی به میکروتیوبی تازه منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور $1250 \times g$ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حذف و به میزان یک میلی‌لیتر اتانول سرد (۷۵ درصد) اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۸ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور $8403 \times g$ سانتریفیوژ شدند. نمونه‌ها برای حذف اتانول به مدت ۷-۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس برای حل کردن RNA استخراج شده از آب تیمار شده با DEPC (۵۰ میکرولیتر) استفاده گردید و برای حل شدن بهتر RNA استخراج شده، به مدت ۱۰ دقیقه در Dry bath با دمای ۵۵-۶۰ قرار گرفتند. نمونه‌ها در یخچال فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳-۹ تعیین کیفیت و کمیت RNA

برای بررسی کیفیت RNA، پنج میکرولیتر از نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ Safe Stain صورت گرفت و با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل^۱، باندهای مورد نظر بررسی شدند. برای تعیین کمیت، از دستگاه نانو دراپ^۲ استفاده شد. به این ترتیب که ۳ میکرو لیتر از نمونه‌ی استخراجی استفاده و میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر یادداشت شد. سپس مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر بر اساس معادله زیر محاسبه گردید. از آب تیمار شده با DEPC به عنوان شاهد برای کالیبره کردن دستگاه استفاده شد.

۳-۱۰ تیمار DNaseI

برای از بین بردن DNA ژنومی میزان ده میکروگرم از RNA داخل تیوب ریخته شد و یک واحد آنزیم DNaseI، دو میکرولیتر بافر DNaseI به آن اضافه شد و حجم نهایی با آب تیمار شده با DEPC به ده میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Dry bath قرار گرفت. به هر تیوب یک میکرو لیتر بافر اتیلن

^۱ Gel dak

^۲ NanoDrop

دی آمین تترا استیک اسید^۱ اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه بن ماری قرار داده شد.

۳-۱۱ سنتز cDNA

میزان پنج میکروگرم از هر نمونه RNA بعد از تیمار DNaseI داخل تیوب ریخته شد و به هر تیوب یک میکرولیتر مخلوط dNTP MIX ۱۰ میکرو مولار، یک میکرولیتر آغازگر OligodT (۴۰ میکرو مولار) اضافه گردید. سه میکرولیتر آب دو بار تقطیر افزوده شد تا به حجم ۱۰ برسد و مخلوط را در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه روی یخ سرد شدند و پس از یک اسپین مختصر ۱۰ میکرولیتر مخلوط سنتز cDNA شامل ۲ میکرو لیتر بافر 10X M-MuLV، ۱۰۰ یونیت آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase و آب عاری از اسید نوکلئیک تا به ۱۰ میکرو لیتر برسد، به هر میکرو تیوب اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا واکنش خاتمه یابد. پس از این مرحله نمونه‌ها تا زمان PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳-۱۲ طراحی پرایمر

طراحی پرایمر برای ژن‌های پیرولین ۵ کروبوکسیلات سنتتاز، میواینوزیتول منو فسفاتاز، فنیل آلانین آمونیا لیاز و ژن همیشه بیان بتا اکتین با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و طول محصول پرایمر ژن همیشه بیان و ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۳-۱ ارائه شده است.

جدول ۳-۱ ویژگی پرایمرهای ژن همیشه بیان بتا اکتین، پیرولین ۵ کروبوکسیلات سنتتاز (FDPCS)، میواینوزیتول منو فسفاتاز (FMIPS)، فنیل آلانین آمونیا لیاز ۱ (FPAL1)

اندازه امپلیکون	توالی پرایمر ۵'→۳'	Tm (°C)	شماره دسترسی	نام ژن
۱۱۵	CTCAACCCCAAGGCTAACAG GTACGCCCACTAGCATACAG	۵۸	JQ658353	Beta Actin
۱۰۰	GTCTCTTGCTTGCACTATTG GCTCATACAGATTGCATTGTGACC	۵۴	LG711272072	FDPCS
۱۴۸	GTCATCAAGTATGTACCGTATGTG GGAAAAGTACCATAGTCTGCACA	۵۲	LG134876408	FMIPS
۱۴۷	CTGTATGATGCTTGTGAAGAATCC GGAGGCTTGGGCTTAACCTCAA	۶۰	LG1113333034	FPAL1

^۱Ethylene diamine tetra acetic Acid (EDTA)

۳-۱۳ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد جهت تأیید سنتز cDNA

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مواد مورد نیاز طبق دستور العمل زیر مخلوط گشت (در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر برای هر نمونه) و بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای، محصول آن جهت تأیید بر ژل الکتروفورز بارگذاری گردید. دمای تنظیم شده دستگاه بر اساس نقطه ذوب پرایمرها بود. قابل ذکر است که این مرحله یک بار آغازگر ژن همیشه بیان و یک‌بار هم برای آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت.

مواد مورد نیاز به منظور ساخت مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای یک نمونه (۱X) cDNA شامل؛ ۲ میکرو لیتر بافر (10x)، ۲ میکرو لیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP Mix ده میلی مولار، ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase، ۱۷ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر، یک میکرو لیتر آغازگر پسرو^۱، یک میکرو لیتر آغازگر پیشرو^۲ و یک میکرو لیتر (۰/۲۵ میکرو گرم/میکرو لیتر) نمونه cDNA بودند. پس از تهیه مخلوط واکنش تیوب‌ها در دستگاه PCR و طبق چرخه‌ی حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه ادامه یافت.

با اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ۵ میکرو لیتر از نمونه‌ها به همراه ۲ میکرو لیتر Loading dye برای بررسی بیان ژن درون چاهک‌های ژل الکتروفورز افقی بارگذاری شدند. ژل‌های حاصل برای عکس‌برداری به دستگاه ژل داک منتقل شدند.

۳-۱۴ تجزیه آماری

تجزیه واریانس بر اساس طرح اسپیلیت پلات با پایه کاملاً تصادفی برای والدین و هیبریدهای آن‌ها انجام شد. ابتدا مشاهدات مربوط به درصد جوانه‌زنی مورد آزمون نرمال بودن و سپس مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. تجزیه واریانس صفات دیگر (طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و سرعت جوانه‌زنی) نیز انجام شد. میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. کلیه عملیات آماری برای صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SAS و MSTAT-C انجام شد. پس از ثبت داده‌ها ضرایب همبستگی جهت تعیین ارتباط بین صفات مورفولوژیک با استفاده از نرم‌افزار SAS محاسبه گردید. جهت انجام تجزیه خوشه‌ای میانگین صفات مورفولوژیک، جهت حذف اثر مقیاس اندازه‌گیری، استاندارد شد و سپس ماتریس فاصله

^۱ Reverse

^۲ Forward

اقلیدس محاسبه شد، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS-pc انجام شد. فواصل درون و بین کلاستری به منظور کمی کردن ارتباط بین گروه‌ها ایجاد شده در تجزیه خوشه‌ای به روش کومار و همکاران (۲۰۰۶) محاسبه گردید، از روش رگرسیون مرحله‌ای نیز برای ارتباط بین صفات مستقل با صفات وابسته مختلف بطور جداگانه، توسط نرم افزار SAS 9.1 استفاده شد.

متابولیت‌ها پس از تزریق به دستگاه GC-MS، توسط کتابخانه این دستگاه قرائت و شناسایی گردیدند. برای کمی کردن داده‌های حاصله از دستگاه GC-MS، با استفاده از نرم‌افزار SAS به تجزیه واریانس متابولیت‌های استخراجی بر اساس طرح ذکر شده در بالا پرداخته شد. میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج و یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند (پیترسون و همکاران، ۲۰۰۹).

در این تحقیق برای کمی کردن باندهای حاصل از بیان ژن‌ها، براساس شدت درخشندگی از نرم‌افزار Image J و برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت (داناها و همکاران، ۲۰۱۰).

فصل چہارم

نتیجہ گیری

۴-۱ اندازه گیری صفات مورفولوژیک

تجزیه واریانس داده‌ها در سه محیط عدم تنش (شاهد)، ۱۵۰ میلی مولار NaCl و ۲۰۰ میلی مولار NaCl نشان می‌دهد که بین ژنوتیپ‌های مختلف برای تمامی صفات سرعت و درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه و نیز میزان پرولین برگ، تفاوت معنی داری وجود داشت. اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و پرولین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود، اما اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفاتی چون طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه معنی‌دار نشد. نتایج نشان داد که تنش شوری تاثیر معنی داری در سطح احتمال ۱٪، بر درصد جوانه‌زنی بذرها گذاشت (جدول ۴-۱) و هر ۴۵ ژنوتیپ کنجد، کاهش معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی نشان دادند. بیشترین درصد جوانه زنی در ژنوتیپ‌های کنجد مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۴-۲). اثر متقابل بین تنش و ژنوتیپ برای درصد جوانه زنی معنی‌دار شد و بیشترین درصد را پاکستانی × داراب ۱، با درصد جوانه‌زنی ۱۰۰ در شرایط عدم تنش، داشت که با برخی از ژنوتیپ‌های دارای حروف مشترک مانند ۹ لاین والدینی و نیز ۵ هیبریدی که والد مادری آنان لاین پاکستانی است، ۹ هیبرید حاصل از تلاقی لاین‌های خارجی مانند هندی × پاکستانی، عراقی × پاکستانی، هندی × TN240، TN234 × TN240، هندی × TN234، عراقی × TN234، عراقی × TN240، عراقی × هندی و همچنین برخی از هیبریدهای حاصل از تلاقی والد‌های ایرانی مانند یکتا × داراب ۱، زودرس × داراب ۱، ورامین × داراب ۱، زودرس × یکتا، زودرس × ورامین، در نهایت نتایج حاصل از تلاقی‌های والد ایرانی و خارجی از قبیل عراقی × یکتا، زودرس × TN234، ورامین × TN240، عراقی × ورامین، عراقی × دارب ۱، زودرس × TN240، داراب ۱ × هندی، داراب ۱ × TN240، یکتا × هندی، ورامین × TN234 از لحاظ آماری فاقد اختلاف معنی‌داری بود. کمترین درصد جوانه‌زنی را هیبرید زودرس × هندی با تعداد جوانه‌زنی ۱۸/۶ در تنش ۲۰۰ میلی مولار داشت (جدول ۴-۲). بر اساس نتایج آزمایش، تنش شوری به کاهش معنی‌داری در سطح ۱٪ بر سرعت جوانه زنی همه ژنوتیپ‌های کنجد، منجر شد (جدول ۴-۱). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های کنجد در شرایط عدم تنش و تنش مشخص گردید که سرعت جوانه‌زنی در محدوده ۰/۶۶۹ - ۰/۳۰۸ (تعداد جوانه در روز) قرار گرفت. نتایج آثار متقابل تنش در ژنوتیپ حاکی از آن بود که بیشترین سرعت جوانه‌زنی، متعلق به هیبرید پاکستانی × ورامین با سرعت ۰/۹۸۷ (تعداد جوانه در روز)، در تیمار شاهد بود (جدول ۴-۲) که از لحاظ آماری با ژنوتیپ‌های داراب ۱ × هندی، یکتا × داراب ۱ دارای حروف مشترک و فاقد اختلاف معنی‌داری بود، کمترین آن را پاکستانی × TN240 با سرعت ۰/۲۴۵ (تعداد جوانه در روز) در تنش ۲۰۰ میلی مولار داشت (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۱: میانگین مربعات برای درصد و سرعت جوانه زنی برای ژنوتیپ های مورد بررسی کبجد

منابع تغییرات		میانگین مربعات	
درجه آزادی	درصد جوانه زنی	سرعت جوانه زنی	
تنش	۲	۹۴۹۴۱/۴ **	۷/۸۵ **
خطای اول	۶	۲۱۸/۹ **	۰/۰۴۸ **
(ژنوتیپ)	۴۴	۷۸۸/۷ **	۰/۰۳۴ **
تنش X ژنوتیپ	۸۸	۳۲۵/۳ **	۰/۰۲۱ **
خطای دوم	۲۶۴	۵۶/۷	۰/۰۰۸۳
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۳۹	۱۶/۱

جدول ۴-۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای سرعت جوانه زنی و درصد جوانه زنی بذر

تیمار	ژنوتیپ	درصد جوانه زنی	ژنوتیپ	سرعت جوانه زنی
شاهد	پاکستانی X داراب ۱	۱۰۰/۰	پاکستانی X ورامین	۰/۹۸۷
	هندی X پاکستانی	۹۹/۶	دالاب ۱ X هندی	۰/۹۷۹
	عراقی X یکتا	۹۹/۶	یکتا X داراب ۱	۰/۹۶۵
	زودرس X TN234	۹۹/۳	داراب ۱ X TN240	۰/۹۶۴
	پاکستانی X ورامین	۹۹/۰	ورامین	۰/۹۴۱
	داراب ۱	۹۹/۰	زودرس X TN240	۰/۹۳۶
	ورامین X TN240	۹۸/۶	زودرس X هندی	۰/۹۳۳
	ورامین X پاکستانی	۹۸/۶	TN240	۰/۹۲۵
	زودرس X پاکستانی	۹۸/۶	هندی	۰/۹۱۴
	عراقی X ورامین	۹۸/۶	پاکستانی X داراب ۱	۰/۹۱۱
	عراقی X داراب ۱	۹۸/۶	عراقی X یکتا	۰/۹۰۵
	زودرس X TN240	۹۸/۶	ورامین X پاکستانی	۰/۹۰۲
	TN234	۹۸/۳	عراقی X ورامین	۰/۹۰۱
	زودرس X ورامین	۹۸/۰	عراقی	۰/۸۹۵
	ورامین	۹۷/۶	زودرس X داراب ۱	۰/۸۸۸
	عراقی X پاکستانی	۹۷/۶	هندی X TN240	۰/۸۸۶
	هندی X TN240	۹۷/۶	TN234 X زودرس	۰/۸۸۳
	عراقی	۹۷/۶	عراقی X داراب ۱	۰/۸۸۰
	یکتا X TN234	۹۷/۳	پاکستانی X TN234	۰/۸۷۹
	یکتا X TN240	۹۷/۳	عراقی X هندی	۰/۸۷۹
	TN240	۹۷/۳	زودرس X ورامین	۰/۸۷۷
	زودرس X یکتا	۹۷/۳	پاکستانی	۰/۸۷۵
	داراب ۱ X هندی	۹۷/۳	TN234	۰/۸۶۸
	داراب ۱ X TN240	۹۷/۳	زودرس X پاکستانی	۰/۸۶۶
	TN234 X TN240	۹۶/۶	پاکستانی X یکتا	۰/۸۵۶
	پاکستانی X یکتا	۹۶/۶	هندی X TN234	۰/۸۵۳
	یکتا	۹۶/۳	یکتا	۰/۸۴۸
	هندی X TN234	۹۶/۳	هندی X پاکستانی	۰/۸۴۳
LSD		۱۲/۱	۰/۱۴۷	

ادامه جدول ۴-۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای سرعت جوانه زنی و درصد جوانه زنی بذر

تیمار	ژنوتیپ	درصد جوانه - زنی	ژنوتیپ	سرعت جوانه - زنی (تعداد در روز)
شاهد	عراقی × TN234	۹۶/۰	TN234 × TN240	۰/۸۳۷
	یکتا × هندی	۹۵/۶	ورامین × TN240	۰/۸۳۳
	ورامین × TN234	۹۵/۶	عراقی × TN234	۰/۸۲۹
	ورامین × داراب ۱	۹۵/۶	زودرس	۰/۸۲۹
	عراقی × TN240	۹۵/۳	عراقی × پاکستانی	۰/۸۲۶
	زودرس × داراب ۱	۹۵/۳	ورامین × داراب ۱	۰/۸۱۴
	عراقی × هندی	۹۵/۰	عراقی × TN240	۰/۸۱۴
	هندی	۹۵/۰	یکتا × هندی	۰/۸۰۳
	یکتا × داراب ۱	۹۴/۳	TN234 × یکتا	۰/۸۰۳
	زودرس	۹۴/۰	TN240 × یکتا	۰/۷۸۶
	پاکستانی × TN234	۹۳/۶	زودرس × هندی	۰/۷۶۵
	پاکستانی	۹۳/۶	زودرس × یکتا	۰/۷۶۰
	پاکستانی × TN240	۹۱/۶	داراب ۱ × TN234	۰/۶۹۹
	زودرس × عراقی	۹۱/۶	زودرس × عراقی	۰/۶۹۸
	زودرس × هندی	۸۷/۶	ورامین × یکتا	۰/۵۳۹
	ورامین × یکتا	۸۴/۶	پاکستانی × TN240	۰/۵۱۷
۱۵۰ میلی مولار NaCl	پاکستانی × داراب ۱	۹۹/۰	داراب ۱ × TN234	۰/۶۲۴
	داراب ۱	۹۵/۰	یکتا × TN234	۰/۵۹۲
	عراقی × داراب ۱	۹۴/۶	ورامین	۰/۵۹۰
	TN240 × زودرس	۹۱/۶	پاکستانی × TN234	۰/۵۸۲
	عراقی × یکتا	۹۰/۶	پاکستانی	۰/۵۷۶
	یکتا × TN240	۸۸/۶	عراقی × TN234	۰/۵۶۲
	ورامین × TN234	۸۸/۰	زورس × ورامین	۰/۵۴۹
	هندی	۸۷/۳	داراب ۱	۰/۵۴۲
	عراقی × TN234	۸۶/۳	داراب ۱ × هندی	۰/۵۳۶
	هندی × TN240	۸۶/۳	هندی	۰/۵۲۸
	پاکستانی × یکتا	۸۶/۰	پاکستانی × داراب ۱	۰/۵۲۸
	ورامین × پاکستانی	۸۵/۶	ورامین × TN240	۰/۵۲۴
	TN240	۸۵/۳	پاکستانی × یکتا	۰/۵۲۳
	زودرس × یکتا	۸۴/۳	TN234	۰/۵۱۹
	هندی × پاکستانی	۸۴/۰	TN234 × TN240	۰/۵۱۷
	عراقی × ورامین	۸۴/۰	عراقی × یکتا	۰/۵۱۵
	عراقی × هندی	۸۳/۳	زودرس × TN240	۰/۵۱۵
LSD		۱۲/۱	۰/۱۴۷	

ادامه جدول ۴-۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات سرعت و درصد جوانه زنی

تیمار	ژنوتیپ	درصد جوانه زنی	ژنوتیپ	سرعت جوانه زنی (تعداد در روز)
۱۵۰ میلی مولار NaCl	داراب ۱ × هندی	۸۳/۳	عراقی × هندی	۰/۵۱۵
	ورامین × TN240	۸۳/۰	عراقی × ورامین	۰/۵۱۴
	ورامین × داراب ۱	۸۳/۰	داراب ۱ × TN240	۰/۵۱۳
	داراب ۱ × TN240	۸۲/۶	زودرس × یکتا	۰/۴۹۵
	یکتا × TN234	۸۲/۶	ورامین × داراب ۱	۰/۴۹۱
	داراب ۱ × TN234	۸۲/۶	TN240	۰/۴۸۹
	TN234 × TN240	۸۲/۰	ورامین × TN234	۰/۴۸۶
	TN234 × TN240	۸۰/۳	یکتا × TN240	۰/۴۸۳
	TN234 × زودرس	۷۹/۶	ورامین × پاکستانی	۰/۴۷۹
	زودرس × ورامین	۷۹/۰	زودرس × هندی	۰/۴۷۶
	زودرس × هندی	۷۸/۳	هندی × پاکستانی	۰/۴۷۳
	عراقی × TN240	۷۸/۰	یکتا × داراب ۱	۰/۴۶۸
	ورامین	۷۷/۳	یکتا × هندی	۰/۴۶۴
	یکتا × داراب ۱	۷۴/۳	هندی × TN240	۰/۴۶۳
	TN234	۷۳/۰	زودرس × TN234	۰/۴۶۲
	زودرس × پاکستانی	۷۲/۰	یکتا	۰/۴۶۱
	عراقی	۷۱/۶	پاکستانی × ورامین	۰/۴۵۷
	یکتا	۷۰/۶	هندی × TN234	۰/۴۳۴
	یکتا × هندی	۶۷/۶	زودرس × داراب ۱	۰/۴۲۱
	زودرس	۶۶/۶	عراقی × TN240	۰/۴۲۰
	زودرس × داراب ۱	۶۵/۳	زودرس × پاکستانی	۰/۴۱۷
	پاکستانی × ورامین	۶۴/۶	عراقی × پاکستانی	۰/۴۱۵
	هندی × TN234	۶۲/۶	عراقی	۰/۴۱۳
	پاکستانی	۵۸/۳	ورامین یکتا	۰/۴۰۸
	عراقی × پاکستانی	۵۷/۶	عراقی × داراب ۱	۰/۳۹۰
	زودرس × عراقی	۵۵/۶	زودرس × عراقی	۰/۳۸۷
	ورامین × یکتا	۴۸/۶	زودرس	۰/۳۸۴
	پاکستانی × TN240	۳۷/۰	پاکستانی × TN240	۰/۲۷۷
۲۰۰ میلی مولار NaCl	داراب ۱ × TN240	۹۰/۶	عراقی × پاکستانی	۰/۷۷۷
	TN240	۷۷/۳	پاکستانی	۰/۵۷۶
	عراقی × TN234	۷۳/۶	هندی × TN240	۰/۴۷۸
	ورامین × داراب ۱	۷۲/۳	پاکستانی × یکتا	۰/۴۶۷
	ورامین	۷۱/۳	ورامین × داراب ۱	۰/۴۶۵
	یکتا × داراب ۱	۷۰/۰	داراب ۱ × TN240	۰/۴۶۱
	داراب ۱ × هندی	۶۲/۶	زودرس × عراقی	۰/۴۴۳
	پاکستانی × یکتا	۶۱/۶	پاکستانی × داراب ۱	۰/۴۴۰
LSD		۱۲/۱	۰/۱۴۷	

ادامه جدول ۴-۲ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات سرعت و درصد جوانه زنی

تیمار	ژنوتیپ	درصد جوانه زنی	ژنوتیپ	سرعت جوانه زنی (تعداد در روز)
۲۰۰ میلی مولار NaCl	ورامین × TN240	۵۸/۳	عراقی × TN234	۰/۴۲۸
	ورامین × TN234	۵۸/۳	یکتا × داراب ۱	۰/۴۲۶
	TN234 × زودرس	۵۲/۰	یکتا × TN240	۰/۴۱۱
	زودرس × TN240	۵۱/۶	داراب ۱	۰/۴۱۰
	زودرس × پاکستانی	۵۱/۳	TN240	۰/۴۰۷
	هندی × پاکستانی	۵۰/۶	ورامین	۰/۴۰۷
	عراقی × هندی	۵۰/۶	ورامین × TN240	۰/۴۰۳
	عراقی × ورامین	۴۹/۶	پاکستانی × ورامین	۰/۴۰۱
	پاکستانی × داراب ۱	۴۷/۶	یکتا × TN234	۰/۴۰۰
	زودرس × یکتا	۴۷/۳	پاکستانی ×	۰/۳۹۱
	پاکستانی × TN234	۴۵/۶	TN234	۰/۳۸۹
	عراقی × داراب ۱	۴۵/۶	زودرس × TN240	۰/۳۸۴
	داراب ۱	۴۴/۶	ورامین × یکتا	۰/۳۷۶
	داراب ۱ × TN234	۴۲/۶	ورامین × TN234	۰/۳۷۳
	TN234 × TN240	۴۱/۳	زودرس × یکتا	۰/۳۶۹
	عراقی	۴۱/۰	یکتا × هندی	۰/۳۵۵
	هندی × TN240	۴۰/۳	عراقی × ورامین	۰/۳۵۲
	TN234	۳۷/۰	یکتا	۰/۳۴۴
	عراقی × TN240	۳۶/۶	داراب ۱ × هندی	۰/۳۴۲
	یکتا	۳۵/۳	عراقی	۰/۳۴۱
	زودرس × عراقی	۳۵/۳	داراب ۱ × TN234	۰/۳۳۹
	یکتا × TN240	۳۳/۳	عراقی × TN240	۰/۳۳۸
	یکتا × هندی	۳۳/۳	هندی	۰/۳۳۳
	عراقی × یکتا	۳۲/۰	زودرس × پاکستانی	۰/۳۳۲
	عراقی × پاکستانی	۳۱/۶	عراقی × هندی	۰/۳۲۵
	زودرس × ورامین	۳۱/۰	هندی × پاکستانی	۰/۳۲۲
	زودرس	۲۹/۳	عراقی × یکتا	۰/۳۲۱
	ورامین × پاکستانی	۲۹/۰	زودرس × هندی	۰/۳۲۱
	هندی	۲۸/۶	TN234	۰/۳۱۶
	زودرس × داراب ۱	۲۶/۳	TN234 × TN240	۰/۳۱۳
	پاکستانی	۲۵/۰	زودرس × ورامین	۰/۳۱۳
	یکتا × TN234	۲۳/۳	زودرس × TN234	۰/۳۱۰
	پاکستانی × ورامین	۲۲/۳	ورامین × پاکستانی	۰/۳۰۹
	هندی × TN234	۲۱/۳	عراقی × داراب ۱	۰/۳۰۹
	ورامین × یکتا	۲۰/۶	زودرس	۰/۳۰۱
	پاکستانی × TN240	۱۹/۰	هندی × TN234	۰/۲۹۵
	زودرس × هندی	۱۸/۶	زودرس × داراب ۱	۰/۲۸۳
			پاکستانی × TN240	۰/۲۴۵
LSD		۱۲/۱		۰/۱۴۷

تنش شوری باعث کاهش رشد گیاهچه ژنوتیپ‌های مورد بررسی شد. این تنش تاثیر معنی‌داری بر طول ساقه‌چه گذاشت (جدول ۴-۳) به طوریکه با افزایش سطوح شوری از مقدار آن کاسته شد (جدول ۴-۴) مقایسه میانگین‌های ژنوتیپ‌ها نشان داد که هیبریدهای زودرس × یکتا با میانگین ۱۱۶/۱ میلی‌متر و به دنبال آن هیبریدهای زودرس × پاکستانی با طول ۱۱۴/۳ میلی‌متر و هندی × پاکستانی با ۱۰۹/۹ میلی‌متر، بیشترین طول ساقه‌چه را داشتند (جدول ۴-۴). هیبرید عراقی × TN234 با میانگین ۶۷/۶ میلی‌متر طول، ژنوتیپ زودرس با طول ۷۰/۱ میلی‌متر و نیز ژنوتیپ والدینی داراب ۱ با طول ساقه‌چه ۷۰/۸ میلی‌متر کمترین طول ساقه‌چه را داشتند (جدول ۴-۴). مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴-۴) نشان داد که با افزایش سطوح شوری از صفر به ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار طول ریشه‌چه نیز افت شدیدی نسبت به شرایط عدم تنش داشت که در گستره‌ای از ۸۱/۷ تا ۴۰/۸ میلی‌متر بود، بیشترین طول ریشه‌چه را ژنوتیپ عراقی × هندی با طول ۸۱/۷ میلی‌متر و نیز به دنبال آن هیبریدهای عراقی × داراب ۱ با طول ۷۸/۰ میلی‌متر و نیز زودرس × پاکستانی با طول ۷۷/۴ میلی‌متر داشتند و هیبریدهای عراقی × TN234 با میانگین ۴۰/۸ میلی‌متر، داراب ۱ × هندی با میانگین ۴۴/۳ میلی‌متر و همچنین والد عراقی با میانگین ۴۴/۶ میلی‌متر در گروه کمترین مقدار طول ریشه‌چه قرار گرفتند (جدول ۴-۴). قطر ساقه‌چه نیز همانند سایر صفات مورد مطالعه، از تنش شوری تاثیر معنی‌داری (در سطح ۱٪) پذیرفت (جدول ۴-۳). ژنوتیپ‌های مورد بررسی از این نظر تفاوت معنی‌داری نشان دادند به طوریکه هیبرید پاکستانی × داراب ۱ با ضخامت ۱/۶۹ میلی‌متر بیشترین قطر ساقه‌چه و به دنبال آن هیبریدهای زودرس × پاکستانی با ضخامت ۱/۶۹ میلی‌متر و پاکستانی × TN234 با میانگین ۱/۶۴ میلی‌متر قرار داشتند و لاین داخلی داراب ۱ با ضخامت ۰/۹۶۲ میلی‌متر از کمترین طول ساقه‌چه برخوردار بود. پس از آن ژنوتیپ زودرس با ضخامت ۰/۹۷۵ میلی‌متر و هیبرید عراقی × TN234 با قطر ۰/۹۹۰ میلی‌متر قرار گرفتند (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۳ میانگین مربعات صفات محتوای پرولین برگ، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه، در ژنوتیپ‌های کبجد تحت تنش شوری

میانگین مربعات				منابع تغییرات			
پرولین	وزن خشک گیاهچه	وزن- تر گیاهچه	قطر ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	درجه آزادی	
۰/۱۶۴**	۱/۳۹**	۳۸/۳**	۱/۳۸**	۹۳۵۹۲/۰۱**	۴۸۳۰۳/۰**	۲	تنش
۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۷	۰/۴۲۳	۲/۸۳	۳۱۰۹/۷	۲۱۲۹/۲	۶	خطای اول
۰/۰۰۹**	۰/۰۲۸**	۰/۶۷۴**	۰/۵۵۳**	۸۶۱/۲**	۱۱۹۹/۷**	۴۴	ژنوتیپ
۰/۰۰۳**	۰/۰۱۶**	۰/۲۰۰۴**	۰/۳۵۳ ^{ns}	۳۹۴/۹ ^{ns}	۵۵۰/۳ ^{ns}	۸۸	تنش × ژنوتیپ
۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۳	۰/۰۵۷۵	۰/۱۰۲	۳۱۸/۲	۵۶۷/۹	۲۶۴	خطای دوم
۱۳/۴۷	۱۳/۸۶	۲۳/۷۹	۲۳/۳۳	۲۷/۸	۲۵/۵۰		ضریب تغییرات (درصد)

ns و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۴-۴ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات طول ساقه چه، طول ریشه چه، قطر ساقه چه

ژنوتیپ	طول ساقه - چه (میلی - متر)	ژنوتیپ	طول ریشه چه (میلی متر)	ژنوتیپ	قطر ساقه - چه (میلی متر)
زودرس × یکتا	۱۱۶/۱	عراقی × هندی	۸۱/۷	پاکستانی × داراب ۱	۱/۶۹
زودرس × پاکستانی	۱۱۴/۳	عراقی × داراب ۱	۷۸/۰	زودرس × پاکستانی	۱/۶۹
هندی × پاکستانی	۱۰۹/۹	زودرس × پاکستانی	۷۷/۴	پاکستانی × TN234	۱/۶۴
پاکستانی × TN234	۱۰۹/۰	عراقی × ورامین	۷۵/۸	عراقی × ورامین	۱/۵۸
زودرس × عراقی	۱۰۷/۸	زودرس × یکتا	۷۵/۶	پاکستانی	۱/۵۷
داراب ۱ × TN240	۱۰۶/۲	ورامین × TN240	۷۵/۱	زودرس × ورامین	۱/۵۵
عراقی × TN240	۱۰۵/۱	TN240	۷۴/۷	زودرس × یکتا	۱/۵۱
عراقی × هندی	۱۰۴/۵	هندی × پاکستانی	۷۴/۶	ورامین × پاکستانی	۱/۵۱
ورامین × TN240	۱۰۳/۶	عراقی × پاکستانی	۷۴/۵	زودرس × TN240	۱/۴۷
زودرس × TN240	۱۰۲/۵	TN234	۷۲/۹	زودرس × هندی	۱/۴۶
ورامین × پاکستانی	۱۰۲/۴	ورامین × پاکستانی	۷۲/۳	زودرس × داراب ۱	۱/۴۶
TN234	۱۰۱/۵	ورامین × TN234	۷۱/۹	عراقی × هندی	۱/۴۶
عراقی × پاکستانی	۱۰۱/۲	هندی	۷۰/۶	هندی × TN234	۱/۴۴
زودرس × داراب ۱	۱۰۰/۷	پاکستانی × یکتا	۶۹/۱	عراقی × یکتا	۱/۴۴
یکتا × TN240	۱۰۰/۳	زودرس × عراقی	۶۹/۰	عراقی × پاکستانی	۱/۴۴
ورامین × TN234	۹۷/۵	پاکستانی × TN234	۶۸/۳	هندی × پاکستانی	۱/۴۴
یکتا × هندی	۹۷/۲	زودرس × TN240	۶۷/۷	TN234	۱/۴۳
ورامین	۹۷/۲	داراب ۱ × TN234	۶۶/۵	پاکستانی × یکتا	۱/۴۳
هندی × TN234	۹۶/۷	زودرس × داراب ۱	۶۶/۵	داراب ۱ × هندی	۱/۴۳
پاکستانی × ورامین	۹۵/۲	پاکستانی × داراب ۱	۶۶/۱	داراب ۱ × TN240	۱/۴۱
زودرس × ورامین	۹۵/۰	عراقی × یکتا	۶۵/۴	زودرس × عراقی	۱/۳۹
زودرس × هندی	۹۴/۹	زودرس × هندی	۶۵/۰	داراب ۱ × TN234	۱/۳۹
عراقی × داراب ۱	۹۴/۶	هندی × TN240	۶۵/۰	ورامین × TN240	۱/۳۸
عراقی × ورامین	۹۲/۴	یکتا × TN240	۶۳/۴	عراقی × TN240	۱/۳۸
پاکستانی × داراب ۱	۹۲/۳	یکتا × TN234	۶۳/۳	پاکستانی × ورامین	۱/۳۸
عراقی × یکتا	۹۲/۲	پاکستانی × ورامین	۶۰/۴	یکتا × هندی	۱/۳۸
ورامین × داراب ۱	۹۲/۲	زودرس × ورامین	۶۰/۳	عراقی × داراب ۱	۱/۳۷
TN234 × زودرس	۹۱/۷	پاکستانی × TN240	۶۱/۱	ورامین	۱/۳۶
ورامین × یکتا	۹۱/۸	پاکستانی	۵۹/۸	یکتا	۱/۳۶
TN240	۹۰/۸	ورامین	۵۹/۸	ورامین × TN234	۱/۳۲
داراب ۱ × TN234	۹۰/۱	داراب ۱ × TN240	۵۹/۷	هندی × TN240	۱/۳۲
پاکستانی × یکتا	۸۹/۲	هندی × TN234	۵۹/۲	TN240	۱/۳۱
یکتا × TN234	۸۶/۵	یکتا	۵۷/۹	TN234 × زودرس	۱/۳۰
داراب ۱ × هندی	۸۴/۳	عراقی × TN240	۵۷/۵	یکتا × TN240	۱/۳۰
عراقی					

ادامه جدول ۴-۴ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات طول ساقه چه، طول ریشه چه، قطر ساقه چه

ژنوتیپ	طول ساقه - چه (میلی متر)	ژنوتیپ	طول ریشه - چه (میلی متر)	ژنوتیپ	قطر ساقه - چه (میلی متر)
ورامین × یکتا	۸۳/۸	زودرس	۵۷/۵	ورامین × داراب ۱	۱/۲۸
هندی × TN240	۸۳/۸	TN234 × TN240	۵۶/۸	ورامین × یکتا	۱/۲۱
یکتا × داراب ۱	۸۲/۲	ورامین × داراب ۱	۵۴/۷	هندی	۱/۱۶
پاکستانی	۸۱/۹	داراب ۱	۵۴/۷	TN234 × TN240	۱/۱۵
پاکستانی × TN240	۸۱/۶	ورامین × یکتا	۵۴/۶	عراقی	۱/۱۱
یکتا	۷۹/۳	یکتا × داراب ۱	۵۱/۹	یکتا × داراب ۱	۱/۰۹
هندی	۷۷/۸	یکتا × هندی	۴۹/۳	یکتا × TN234	۱/۰۵
TN234 × TN240	۷۶/۵	TN234 × زودرس	۴۸/۹	پاکستانی × TN240	۱/۰۴
داراب ۱	۷۰/۸	عراقی	۴۴/۶	عراقی × TN234	۰/۹۹۰
زودرس	۷۰/۱	داراب ۱ × هندی	۴۴/۳	زودرس	۰/۹۷۵
عراقی × TN234	۶۷/۶	عراقی × TN234	۴۰/۸	داراب ۱	۰/۹۷۲

تنش شوری تاثیر بسیار معنی داری بر وزن تر و خشک گیاهچه کنگد گذاشت (جدول ۴-۳). در بین ژنوتیپهای مورد بررسی، بیشترین وزن تر گیاهچه را ژنوتیپ عراقی × TN240 با ۲/۶۶ گرم در شرایط شاهد داشت به طوریکه از لحاظ آماری با برخی از ژنوتیپها مانند هندی × ورامین، ورامین × پاکستانی، زودرس × پاکستانی، ورامین × TN240 دارای حروف مشترک بود و اختلاف معنی داری نداشت. هیبرید عراقی × TN234 با ۰ گرم کمترین وزن را در شرایط نمک ۲۰۰ میلی مولار از آن خود کرد (جدول ۴-۵). در شرایط تنش شوری از میزان وزن خشک گیاهچه به شدت کاسته شد و بین ژنوتیپهای کنگد در شرایط تنش در سطوح مختلف با شرایط عدم تنش تفاوت معنی داری به چشم می خورد. اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفت وزن خشک گیاهچه معنی دار شد و طبق آن ژنوتیپ عراقی × ورامین بیشترین میزان وزن خشک گیاهچه را با ۰/۸۲۰ گرم در شرایط شاهد داشت و کمترین وزن خشک گیاهچه متعلق به هیبرید عراقی × TN234 با صفر گرم، کمترین وزن را در شرایط نمک ۲۰۰ میلی مولار است (جدول ۴-۵).

افزایش میزان پرولین برگ در شرایط شور نسبت به شرایط غیر شور در همه ژنوتیپهای مشاهده شد (جدول ۴-۵). اثرات متقابل ژنوتیپ در تنش برای میزان پرولین برگ معنی دار شد و طبق آن ژنوتیپ زودرس × پاکستانی بیشترین میزان پرولین را با ۰/۲۷۱ میلی گرم بر گرم در شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار داشت که از لحاظ آماری با هیبریدهای عراقی × ورامین، پاکستانی × TN240، پاکستانی × TN234، و نیز زودرس × عراقی فاقد اختلاف معنی داری بود،

کمترین میزان پرولین را ژنوتیپ والدینی داراب ۱ با ۰/۳۱ میلی گرم بر گرم، در شرایط نمک ۲۰۰ میلی مولار از آن خود نمود (جدول ۴-۵).

جدول ۴-۵ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ

تیمار	ژنوتیپ	وزن تر (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	ژنوتیپ	پرولین (میلی گرم بر گرم)
عراقی × TN240	عراقی × ورامین	۲/۶۶	عراقی × ورامین	۰/۸۲۰	پاکستانی × TN234	۰/۰۹۸
هندی × ورامین	۲/۴۹	ورامین × داراب ۱	۰/۴۵۰	زودرس × TN240	۰/۰۹۰	
ورامین × پاکستانی	۲/۳۴	زودرس × پاکستانی	۰/۴۴۳	زودرس × پاکستانی	۰/۰۸۰	
زودرس × TN240	۲/۳۴	عراقی × TN240	۰/۴۳۶	هندی	۰/۰۷۹	
زودرس × پاکستانی	۲/۳۴	TN234	۰/۳۹۳	پاکستانی × TN240	۰/۰۷۰	
ورامین × TN240	۲/۳۳	عراقی × داراب ۱	۰/۳۳۶	هندی × پاکستانی	۰/۰۶۶	
زودرس × داراب ۱	۲/۲۵	پاکستانی × داراب ۱	۰/۳۲۰	ورامین × یکتا	۰/۰۶۳	
هندی × پاکستانی	۲/۲۳	زودرس × یکتا	۰/۳۱۳	پاکستانی	۰/۰۵۸	
زودرس × ورامین	۲/۰۸	عراقی × هندی	۰/۳۱۳	عراقی × TN234	۰/۰۵۸	
هندی × TN234	۱/۹۰	ورامین	۰/۳۱۰	یکتا × داراب ۱	۰/۰۵۸	
ورامین × یکتا	۱/۸۷	TN234 × TN240	۰/۳۱۰	یکتا × هندی	۰/۰۵۰	
هندی	۱/۸۶	ورامین × پاکستانی	۰/۳۱۰	عراقی × ورامین	۰/۰۵۰	
عراقی	۱/۸۵	ورامین × TN234	۰/۳۰۶	داراب ۱ × TN240	۰/۰۴۸	
زودرس × یکتا	۱/۷۹	زودرس × داراب ۱	۰/۳۰۳	عراقی	۰/۰۴۷	
ورامین × TN234	۱/۷۸	زودرس × ورامین	۰/۳۰۳	زودرس × عراقی	۰/۰۴۲	
هندی × TN240	۱/۷۶	هندی × پاکستانی	۰/۲۹۳	عراقی × یکتا	۰/۰۴۰	
داراب ۱ × TN234	۱/۷۶	زودرس × TN240	۰/۲۸۳	پاکستانی × داراب ۱	۰/۰۴۰	
عراقی × هندی	۱/۷۳	هندی × ورامین	۰/۲۵۰	TN234	۰/۰۳۸	
TN234 × زودرس	۱/۷۱	عراقی × پاکستانی	۰/۲۵۰	زودرس × یکتا	۰/۰۳۸	
پاکستانی × یکتا	۱/۶۹	هندی	۰/۲۴۳	TN240	۰/۰۳۷	
زودرس × هندی	۱/۶۵	ورامین × یکتا	۰/۲۴۳	TN234 × زودرس	۰/۰۳۶	
عراقی × پاکستانی	۱/۶۴	پاکستانی × یکتا	۰/۲۴۰	عراقی × پاکستانی	۰/۰۳۵	
TN234 × TN240	۱/۶۴	TN240	۰/۲۳۶	داراب ۱ × TN234	۰/۰۳۲	
عراقی × TN234	۱/۵۸	پاکستانی × TN240	۰/۲۲۰	زودرس × ورامین	۰/۰۳۲	
زودرس × عراقی	۱/۵۵	داراب ۱ × TN240	۰/۲۱۳	ورامین	۰/۰۳۲	
یکتا	۱/۵۳	TN234 × زودرس	۰/۲۱۰	عراقی × TN240	۰/۰۳۱	
پاکستانی × TN240	۱/۳۸	داراب ۱ × هندی	۰/۲۰۶	هندی × ورامین	۰/۰۳۱	
ورامین × داراب ۱	۱/۳۴	یکتا × TN240	۰/۲۰۳	ورامین × داراب ۱	۰/۰۳۱	
پاکستانی × TN234	۱/۲۷	یکتا × داراب ۱	۰/۲۰۳	زودرس × هندی	۰/۰۳۰	
پاکستانی	۱/۸۷	عراقی	۰/۲۰۰	TN234 × TN240	۰/۰۳۰	
داراب ۱ × هندی	۱/۱۴	داراب ۱	۰/۱۸۶	یکتا × TN240	۰/۰۳۰	
	۱/۱۱	پاکستانی	۰/۱۸۳	پاکستانی × یکتا	۰/۰۳۱	
LSD	۰/۳۸۵	۰/۰۶۶	۰/۰۳۲			

ادامه جدول ۴-۵ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ

تیمار	ژنوتیپ	وزن تر (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	پرولین (میلی گرم بر گرم)
سأهر	داراب ۱	۱/۱۰	زودرس × عراقی	۰/۱۷۳	یکتا × TN234
	یکتا × TN240	۱/۰۶	هندی × TN234	۰/۱۶۳	زودرس × داراب ۱
	عراقی × داراب ۱	۱/۰۵	هندی × TN240	۰/۱۵۰	هندی × TN240
	پاکستانی × داراب ۱	۱/۰۵	زودرس × هندی	۰/۱۵۰	ورامین × TN240
	TN234	۱/۰۴	داراب ۱ × TN234	۰/۱۴۳	هندی × TN234
	ورامین	۱/۰۳	پاکستانی × TN234	۰/۱۴۰	عراقی × داراب ۱
	داراب ۱ × TN240	۱/۰۲	عراقی × TN234	۰/۱۳۶	ورامین × TN234
	یکتا × TN234	۱/۰۲	ورامین × TN240	۰/۱۳۳	داراب ۱ × هندی
	عراقی × یکتا	۱/۰۰	یکتا × هندی	۰/۱۰۳	ورامین × پاکستانی
	یکتا × داراب ۱	۱/۰۰	یکتا	۰/۱۰۰	عراقی × هندی
	یکتا × داراب ۱	۰/۹۹۹	یکتا × TN234	۰/۰۷۷	زودرس
	یکتا × هندی	۰/۹۶۳	عراقی × یکتا	۰/۰۷۶	یکتا
	عراقی × ورامین	۰/۸۰۷	زودرس	۰/۰۷۶	داراب ۱
	زودرس				
۱۵۰ میلی مولار NaCl	ورامین × پاکستانی	۱/۷۳	پاکستانی × داراب ۱	۰/۴۰۰	پاکستانی × TN234
	زودرس × پاکستانی	۱/۳۱	عراقی × داراب ۱	۰/۲۳۰	پاکستانی × TN240
	هندی × پاکستانی	۱/۲۹	زودرس × داراب ۱	۰/۱۸۳	ورامین × یکتا
	ورامین × TN240	۱/۲۸	پاکستانی × یکتا	۰/۱۸۳	هندی × TN234
	هندی × TN234	۱/۲۳	ورامین × TN234	۰/۱۷۶	زودرس × پاکستانی
	زودرس × یکتا	۱/۱۹	عراقی × TN240	۰/۱۷۶	هندی × ورامین
	عراقی × هندی	۱/۱۵	ورامین × پاکستانی	۰/۱۷۳	زودرس × عراقی
	زودرس × هندی	۱/۱۵	زودرس × پاکستانی	۰/۱۷۰	هندی × پاکستانی
	هندی	۱/۱۳	TN234	۰/۱۶۶	هندی
	TN234 × زودرس	۱/۱۰	عراقی × پاکستانی	۰/۱۵۳	ورامین
	هندی × ورامین	۱/۰۹	زودرس × TN240	۰/۱۵۰	TN234 × زودرس
	زودرس × داراب ۱	۱/۰۷	TN234 × TN240	۰/۱۵۰	پاکستانی × داراب ۱
	زودرس × عراقی	۱/۰۵	ورامین × داراب ۱	۰/۱۴۶	یکتا × داراب ۱
	زودرس × ورامین	۱/۰۱	هندی × پاکستانی	۰/۱۴۶	زودرس × TN240
	عراقی	۰/۹۹	عراقی × هندی	۰/۱۴۳	عراقی × TN234
	عراقی × TN240	۰/۹۹۱	داراب ۱ × TN240	۰/۱۳۰	یکتا × هندی
	زودرس × TN240	۰/۹۶۳	زودرس × ورامین	۰/۱۲۶	عراقی
	ورامین	۰/۹۶۱	هندی	۰/۱۲۳	داراب ۱ × TN240
	TN234 × TN240	۰/۹۵۱	زودرس × یکتا	۰/۱۲۰	TN234
	داراب ۱ × TN234	۰/۹۵۰	هندی × ورامین	۰/۱۱۶	ورامین × داراب ۱
LSD		۰/۳۸۵	۰/۰۶۶	۰/۰۳۲	

ادامه جدول ۴-۵ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ

تیمار	ژنوتیپ	وزن تر (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	ژنوتیپ	پرولین (میلی گرم بر گرم)
۱۵۰ میلی مولار NaCl	TN234	۰/۹۲۹	TN240	۰/۱۱۶	TN234 × TN240	۰/۰۷۰
	پاکستانی × داراب ۱	۰/۹۱۱	زودرس × عراقی	۰/۱۱۳	زودرس × داراب ۱	۰/۰۶۸
	TN240	۰/۹۰۳	یکتا × داراب ۱	۰/۱۱۳	عراقی × ورامین	۰/۰۶۸
	TN240 × یکتا	۰/۸۹۴	TN234 × زودرس	۰/۱۱۳	یکتا × TN234	۰/۰۶۶
	ورامین × داراب ۱	۰/۸۵۸	پاکستانی	۰/۱۱۰	پاکستانی	۰/۰۶۴
	عراقی × TN234	۰/۸۵۳	پاکستانی × TN234	۰/۱۱۰	زودرس × یکتا	۰/۰۵۷
	ورامین × TN234	۰/۸۴۰	پاکستانی × TN240	۰/۱۰۳	داراب ۱ × هندی	۰/۰۵۶
	عراقی × پاکستانی	۰/۸۳۰	عراقی	۰/۱۰۳	عراقی × پاکستانی	۰/۰۵۶
	ورامین × یکتا	۰/۷۹۸	عراقی × TN234	۰/۱۰۳	یکتا × TN240	۰/۰۵۴
	پاکستانی × TN234	۰/۷۹۶	داراب ۱ × هندی	۰/۱۰۳	زودرس × هندی	۰/۰۵۲
	عراقی × داراب ۱	۰/۷۶۶	TN234 × داراب ۱	۰/۱۰۰	عراقی × یکتا	۰/۰۵۰
	یکتا × داراب ۱	۰/۷۵۹	ورامین × یکتا	۰/۱۰۰	هندی × TN240	۰/۰۴۸
	پاکستانی	۰/۷۵۶	عراقی × ورامین	۰/۱۰۰	TN240	۰/۰۴۸
	پاکستانی × یکتا	۰/۷۳۴	ورامین × TN240	۰/۱۰۰	عراقی × TN240	۰/۰۴۷
	پاکستانی × TN240	۰/۷۳۴	یکتا × TN240	۰/۰۹۳	پاکستانی × یکتا	۰/۰۴۶
	داراب ۱ × هندی	۰/۶۹۴	TN234 × هندی	۰/۰۹۳	داراب ۱ × TN234	۰/۰۴۶
	داراب ۱ × TN240	۰/۶۷۸	داراب ۱	۰/۰۸۶	زودرس × ورامین	۰/۰۴۰
	TN240 × هندی	۰/۶۴۷	یکتا × هندی	۰/۰۸۶	ورامین × TN234	۰/۰۳۸
	یکتا	۰/۶۴۵	زودرس × هندی	۰/۰۸۳	ورامین × پاکستانی	۰/۰۳۷
	داراب ۱	۰/۶۴۵	ورامین	۰/۰۷۳	عراقی × داراب ۱	۰/۰۳۷
	عراقی × ورامین	۰/۶۱۳	یکتا	۰/۰۶۶	ورامین × TN240	۰/۰۳۷
	یکتا × هندی	۰/۶۰۲	عراقی × یکتا	۰/۰۵۶	یکتا	۰/۰۳۴
	یکتا × TN234	۰/۵۸۴	هندی × TN240	۰/۰۵۳	عراقی × هندی	۰/۰۳۳
	عراقی × یکتا	۰/۴۴۵	یکتا × TN234	۰/۰۴۷	داراب ۱	۰/۰۲۶
	زودرس	۰/۳۶۱	زودرس	۰/۰۴۰	زودرس	۰/۰۲۴
۲۰۰ میلی مولار NaCl	زودرس × پاکستانی	۰/۹۳۵	پاکستانی × داراب ۱	۰/۱۶۶	زودرس × پاکستانی	۰/۲۷۱
	زودرس × هندی	۰/۹۰۱	ورامین × پاکستانی	۰/۱۱۰	عراقی × ورامین	۰/۲۳
	هندی × پاکستانی	۰/۸۹۶	TN234	۰/۱۱۰	پاکستانی × TN240	۰/۱۸۵
	عراقی × هندی	۰/۸۴۳	زودرس × پاکستانی	۰/۱۰۶	پاکستانی × TN234	۰/۱۷۶
	عراقی × TN240	۰/۸۱۴	عراقی × هندی	۰/۱۰۳	زودرس × عراقی	۰/۱۱۷
	ورامین × پاکستانی	۰/۸۱۰	ورامین × TN234	۰/۰۹۶	پاکستانی × داراب ۱	۰/۱۶۳
LSD		۰/۳۸۵		۰/۰۶۶		۰/۰۳۲

ادامه جدول ۴-۵ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ برای صفات وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ

تیمار	ژنوتیپ	وزن تر (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	ژنوتیپ	پروлін میلی گرم بر گرم
۲۰۰ میلی مولار NaCl	زودرس × عراقی	۰/۷۸۹	زودرس × یکتا	۰/۰۹۰	ورامین × یکتا	۰/۱۵۴
	پاکستانی × داراب ۱	۰/۷۱۴	هندی × پاکستانی	۰/۰۹۰	زودرس × TN240	۰/۱۴۳
	TN234	۰/۷۰۵	پاکستانی × یکتا	۰/۰۸۶	هندی	۰/۱۴۲
	پاکستانی × TN234	۰/۶۳۴	عراقی × داراب ۱	۰/۰۶۶	پاکستانی	۰/۱۲۰
	پاکستانی × یکتا	۰/۰۵۹	پاکستانی × TN234	۰/۰۶۶	عراقی × پاکستانی	۰/۱۱۷
	هندی × ورامین	۰/۰۵۹	عراقی	۰/۰۶۶	هندی × پاکستانی	۰/۱۱۴
	ورامین × TN240	۰/۵۸۷	یکتا × TN240	۰/۰۶۵	داراب ۱ × هندی	۰/۱۰۷
	داراب ۱ × TN234	۰/۵۸۰	عراقی × TN240	۰/۰۶۳	ورامین	۰/۱۰۳
	TN234 × زودرس	۰/۵۷۸	ورامین × TN240	۰/۰۶۰	ورامین × داراب ۱	۰/۱۰۲
	عراقی	۰/۵۷۰	زودرس × ورامین	۰/۰۶۰	TN234 × زودرس	۰/۰۸۷
	هندی × TN240	۰/۵۵۹	یکتا × هندی	۰/۰۶۰	یکتا × هندی	۰/۰۸۴
	داراب ۱ × هندی	۰/۵۴۸	عراقی × ورامین	۰/۰۶۰	عراقی	۰/۰۷۹
	هندی × TN234	۰/۵۱۳	ورامین × یکتا	۰/۰۵۶	داراب ۱ × TN240	۰/۰۷۴
	عراقی × ورامین	۰/۴۹۱	هندی × TN234	۰/۰۵۳	زودرس × یکتا	۰/۰۷۴
	زودرس × یکتا	۰/۴۹۱	هندی	۰/۰۵۳	TN234	۰/۰۶۹
	عراقی × داراب ۱	۰/۴۸۱	زودرس × TN240	۰/۰۵۰	زودرس × هندی	۰/۰۶۸
	زودرس × TN240	۰/۴۶۶	هندی × ورامین	۰/۰۵۰	داراب ۱ × TN234	۰/۰۶۶
	ورامین × داراب ۱	۰/۴۶۲	زودرس × هندی	۰/۰۴۸	یکتا × TN234	۰/۰۶۴
	داراب ۱	۰/۴۵۹	یکتا × داراب ۱	۰/۰۴۶	TN240	۰/۰۶۴
	یکتا × هندی	۰/۴۵۵	پاکستانی × TN240	۰/۰۴۶	عراقی × یکتا	۰/۰۶۳
	ورامین × یکتا	۰/۴۲۹	TN234 × زودرس	۰/۰۴۳	هندی × TN240	۰/۰۶۲
	پاکستانی	۰/۴۲۶	ورامین × داراب ۱	۰/۰۴۰	یکتا × داراب ۱	۰/۰۶۱
	ورامین	۰/۴۱۸	ورامین	۰/۰۴۰	TN234 × TN240	۰/۰۶۰
	یکتا × TN234	۰/۴۰۳	پاکستانی	۰/۰۴۰	یکتا × TN240	۰/۰۵۶
	هندی	۰/۴۰۰	هندی × TN240	۰/۰۴۰	عراقی × TN234	۰/۰۵۶
	TN234 × TN240	۰/۳۹۱	ورامین × یکتا	۰/۰۴۰	پاکستانی × یکتا	۰/۰۵۴
	یکتا × داراب ۱	۰/۳۷۰	داراب ۱ × TN240	۰/۰۳۶	عراقی × TN240	۰/۰۵۳
عراقی × یکتا	۰/۳۴۷	عراقی × یکتا	۰/۰۳۶	ورامین × پاکستانی	۰/۰۵۰	
زودرس × ورامین	۰/۳۴۴	داراب ۱	۰/۰۳۶	زودرس × ورامین	۰/۰۴۸	
پاکستانی × TN240	۰/۳۲۵	زودرس	۰/۰۳۰	عراقی × هندی	۰/۰۴۶	
TN240	۰/۲۶۱	TN240	۰/۰۳۰	عراقی × داراب ۱	۰/۰۴۶	
داراب ۱ × TN240	۰/۲۵۸	یکتا	۰/۰۲۶	ورامین × TN234	۰/۰۴۴	
زودرس × داراب ۱	۰/۲۰۰	TN234 × TN240	۰/۰۱۶	ورامین × TN240	۰/۰۴۷	
زودرس	۰/۰۰۰	یکتا × TN234	۰/۰۱۵	زودرس	۰/۰۴۴	
عراقی × TN234	۰/۰۰۰	عراقی × TN234	۰/۰۰۰	داراب ۱	۰/۰۳۱	
LSD		۰/۰۳۸	۰/۰۶۶	۰/۰۳۲		

۲۰۰ میلی مولار NaCl

۴-۲ بررسی روابط بین صفات مورفولوژیک مورد مطالعه

ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در این پایان نامه، در جدول ۴-۶ آورده شده است. نتایج مبین آن است که صفت طول ساقه‌چه با صفات طول ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه و وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال یک درصد و نیز با احتمال پنج درصد با وزن تر همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت، اما بین این صفت با میزان پرولین برگ و نیز درصد و سرعت جوانه‌زنی، همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. همانند صفت قبلی، طول ریشه‌چه نیز با قطر ساقه‌چه، وزن خشک گیاهچه و طول ساقه‌چه همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری داشت و همچنین از همبستگی مثبت و معنی‌داری با اطمینان ۹۵ درصد با وزن تر گیاهچه برخوردار بود، اما با درصد و سرعت جوانه‌زنی و نیز میزان پرولین برگ هیچ گونه همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان نداد. بین قطر ساقه‌چه با طول ساقه‌چه، ریشه‌چه و وزن خشک، همبستگی مثبت و معنی‌داری با احتمال یک درصد، وجود داشت و همبستگی این صفت با وزن تر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید. براساس این نتایج همبستگی بین وزن تر گیاهچه با درصد و سرعت جوانه‌زنی و پرولین معنی‌دار نشد، در صورتی که با طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه و نیز وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال پنج درصد، از همبستگی مثبت و معنی‌داری برخوردار بود. وزن خشک گیاهچه تنها با پرولین و درصد و سرعت جوانه‌زنی همبستگی مثبت نداشت، بین این صفت با سایر صفات مورد مطالعه همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. همبستگی بین میزان پرولین برگ تنها با درصد جوانه‌زنی با احتمال پنج درصد از نوع منفی و معنی‌دار بود، به طوریکه با سایر صفات مذکور همبستگی نشان نداد. سرعت جوانه‌زنی نیز با درصد جوانه‌زنی با اطمینان ۹۹ درصد همبستگی منفی و معنی‌داری را از آن خود نمود و با صفات دیگر دارای همبستگی نبود.

جدول ۴-۶ ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه در شرایط تنش و عدم تنش

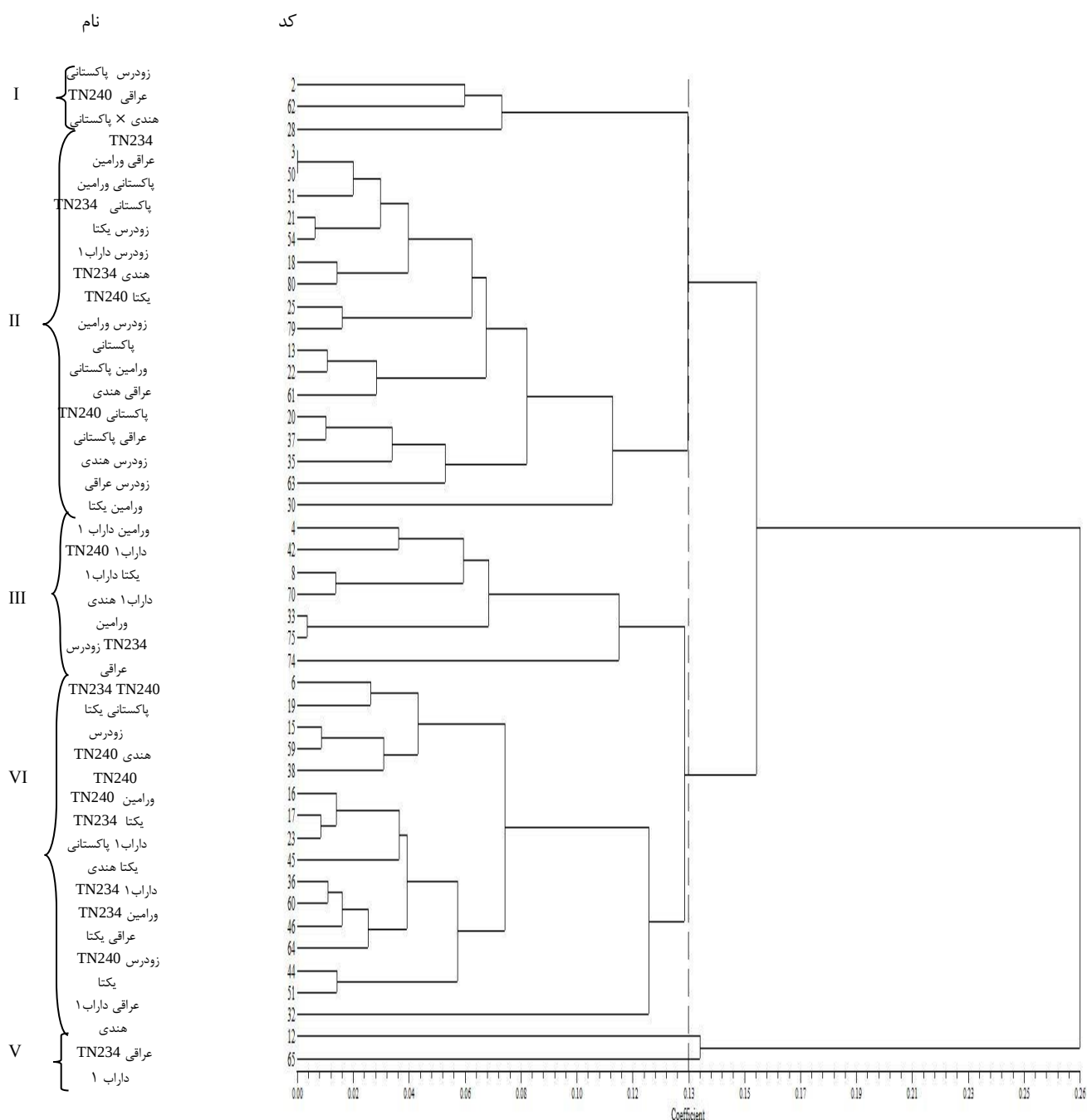
صفت	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	قطر ساقه‌چه	وزن تر گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	پرولین برگ
درصد جوانه‌زنی	۱							
سرعت جوانه‌زنی	** ۰/۵۶۴	۱						
طول ساقه‌چه	ns ۰/۰۸۸	ns ۰/۰۷۱	۱					
طول ریشه‌چه	ns ۰/۰۸۷	ns ۰/۰۷۶	** ۰/۵۶۴	۱				
قطر ساقه‌چه	ns ۰/۰۷۹	ns ۰/۲۳۹	** ۰/۷۳۹	** ۰/۴۹۹	۱			
وزن تر گیاهچه	ns ۰/۰۹۷	ns ۰/۱۱۱	* ۰/۳۶۱	* ۰/۳۴۱	* ۰/۳۷۰	۱		
وزن خشک	ns ۰/۲۲۰	ns ۰/۰۶۵۹	** ۰/۵۴۴	** ۰/۴۰۴	** ۰/۴۶۸	* ۰/۳۱۳	۱	
پرولین برگ	ns ۰/۳۱۴	ns ۰/۲۳۲	ns ۰/۲۳۵	ns ۰/۰۶۰	ns ۰/۲۱۵	ns ۰/۰۲۵	ns ۰/۰۹۶	۱

ns به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

۳-۴ تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس صفات مورفولوژیک

به منظور کمی کردن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گیاه کنبه بر اساس صفات مورفولوژیک، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدس به روش UPGMA صورت پذیرفت.

شکل ۴-۱ نمودار تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیک



براساس تجزیه خوشه‌ای، از نظر صفات مورفولوژی بر اساس بزرگتر بودن فواصل ژنتیکی بین کلاستری نسبت به فواصل ژنتیکی درون کلاستری ژنوتیپ‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند.

ژنوتیپ‌های زودرس × پاکستانی، عراقی × TN240 و هندی × پاکستانی که دارای بیشترین طول ساقه‌چه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و میزان پرولین برگ بودند در گروه نخست قرار گرفتند (جدول ۴-۷). هفده لاین کنجد به نام‌های TN234، عراقی × ورامین، پاکستانی × ورامین، TN234، زودرس × یکتا، زودرس × داراب ۱، هندی × TN234، یکتا × TN240، زودرس × ورامین، پاکستانی، ورامین × پاکستانی، عراقی × هندی، پاکستانی × TN240، عراقی × پاکستانی، زودرس × هندی، زودرس × عراقی و ورامین × یکتا که دارای ارزش‌های میانگین کلاستری متوسطی از نظر خصوصیات زراعی بودند، به گروه دوم اختصاص یافتند. ژنوتیپ‌های ورامین × داراب ۱، داراب ۱ × TN240، یکتا × داراب ۱، داراب ۱ × هندی، ورامین × TN234، زودرس، عراقی در گروه سوم خود را جای دادند. ژنوتیپ‌هایی با نام‌های، TN234 × TN240، پاکستانی × یکتا، زودرس، هندی × TN240، TN240، ورامین × TN240، یکتا × TN234، زودرس × ورامین، ورامین × پاکستانی، داراب ۱ × TN234، ورامین × TN234، عراقی × یکتا، زودرس × TN240، یکتا، عراقی × داراب ۱ × هندی در گروه چهارم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های عراقی × TN234 و داراب ۱ از نظر درصد و سرعت جوانه‌زنی در رتبه نخست بودند، اما از حداقل طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه، وزن تر و وزن خشک و نیز پرولین برخوردار بودند و رتبه آخر را به خود اختصاص دادند و در گروه پنجم از بقیه گروه‌ها متمایز گردیدند (جدول ۴-۷).

جدول ۴-۷ میانگین صفات زراعی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

صفت	I	II	III	VI	V
درصد جوانه‌زنی	۷۲/۵	۶۵/۳۱	۸۰/۴۷	۷۵/۰	۸۲/۳
سرعت جوانه‌زنی	۰/۵۶۴	۰/۵۴۴	۰/۶۰۳	۰/۵۷۱	۰/۶۰۱
طول ریشه‌چه	۵۴/۸	۶۶/۶	۵۴/۳	۶۶/۳	۴۶/۸
قطر ساقه‌چه	۱/۴۰	۱/۴۴	۱/۲۹	۱/۳۲	۹۸/۱
وزن تر گیاهچه	۱/۰۸	۱/۰۴۶	۰/۹۳	۰/۹۱۹	۰/۷۰۱
وزن خشک	۰/۱۸۲	۰/۱۴۳	۰/۱۲	۰/۱۱۹	۰/۱۰۵
پرولین	۰/۰۸۸	۰/۰۸۱	۰/۰۷۳	۰/۰۵	۰/۰۴۶

فواصل ژنتیکی بین کلاستری در همه موارد بزرگتر از فواصل ژنتیکی درون کلاستری بود (جدول ۴-۸). که نشان دهنده بیشتر بودن تنوع بین ژنوتیپ‌های گروه‌های مختلف نسبت به تنوع درون گروه‌ها و نیز تاییدی بر صحت گروه-بندی بود (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). در این مطالعه فواصل درون کلاستری از ۰ تا ۰/۱۳۲ و فواصل بین کلاستری از ۰/۱۳ تا ۰/۱۵۷ متغیر بود. کمترین فاصله درون کلاستری متعلق با کلاستر گروه اول بود در حالی که کمترین و بیشترین فاصله بین کلاستری به ترتیب بین گروه‌های ۲ و ۴ و گروه‌های ۵ و ۸ مشاهده شد (جدول ۴-۸)

جدول ۴-۸ فاصله ژنتیکی درون و بین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

گروه‌ها	I	II	III	VI	V
I	۰/۰۷۵				
II	۰/۱۲۷	۰/۱۱			
III	۰/۱۳	۰/۱۲۶	۰/۱۲		
VI	۰/۱۵۷	۰/۱۵۴	۰/۱۲۷	۰/۱۰	
V	۰/۱۵۰	۰/۲۶	۰/۱۳۳	۰/۱۳۰	۰/۱۳۲

۴-۴ استخراج متابولیت

نتایج استخراج متابولیت‌ها بین دو ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی و حساس عراقی (که براساس صفات مورفولوژیک مانند طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، قطر ساقه‌چه، وزن خشک و تر گیاهچه و میزان پرولین برگ، انتخاب گردیدند)، در این پایان نامه نشان داد که نتایج برای تمامی متابولیت‌های استخراج شده جز، گالاکتوز، والین، اسید ۴ و ۱ بنزن دی کربوکسیلیک، اسید بوتادینوئیک و سیلانامین تفاوت معنی‌داری را نشان داد. اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نیز برای تمامی متابولیت‌ها جز گالاکتوز، والین، اسید ۴ و ۱ بنزن دی کربوکسیلیک، اسید بوتادینوئیک و سیلانامین، معنی‌دار شد (جدول ۴-۹). آنالیز داده‌ها آشکار نمود که پاسخ کوتاه مدت به تنش شوری شامل القا چرخه متیلایسیون جهت تامین گروه‌های متیل، مسیر فنیل پروپانویید برای تولید لیگنین و تولید گلیسین است و اثرات بلند مدت القا همزمان گلیکولیز و متابولیسم ساکارز و کاهش چرخه متیلایسیون می‌باشد. GC-MS آشکار ساخت که بیش از ۶۶۲ قله در عصاره برگ‌های گیاه کنبج وجود داشت، این قله‌ها مربوط به ترکیبات از گروه‌های قندی و مشتقات آن و گروه‌های اسیدهای چرب و فنولیک، اسیدهای آلی، استرها و مشتقات آن‌ها بودند. در میان این ترکیبات ۱۵ ترکیب بین ژنوتیپ-ها در شرایط عدم تنش (شاهد) مشترک و از فراوانی بیشتری برخوردار بودند. از این ترکیبات می‌توان به فروکتوز و گالاکتوز، آلفا گلوکوپیرانوزید، دی‌مانیتول، گلیسرول، اسید هگزا دکانوئیک، اسید اکتادکانوئیک، اسید گاما آمینوبوتریک اسید فسفریک اشاره نمود (جدول ۴-۱۰). ژنوتیپ زودرس X پاکستانی از ترکیباتی مانند سوربیتول، بوتیل آمین دی

متیل، گلیسین و اسید مالیک سیلانول تری متیل فسفات، در شرایط عدم تنش برخوردار بود که این متابولیت‌ها در ژنوتیپ حساس (عراقی) در شاهد مشاهده نگردید (جدول ۴-۱۰). همچنین ژنوتیپ عراقی در شرایط بدون کلرید سدیم ترکیباتی را از قبیل لووگلوکوزان، آلانین، سرین، اسید سیتریک تولید نمود که این ترکیبات در ژنوتیپ متحمل (زودرس×پاکستانی) به چشم نخوردند (جدول ۴-۱۰). ترکیبات مشترک تولید شده توسط ژنوتیپ زودرس×پاکستانی (متحمل) و عراقی (حساس) در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم ۱۷ مورد بود به عنوان مثال می‌توان به گالاکتوز، میواینوزیتول، دی-مانیتول، اسید هگزادکانوئیک، اسید اکتادکانوئیک، ال پرولین، کربازول، اشاره کرد (جدول ۴-۱۱). ژنوتیپ زودرس×پاکستانی ترکیباتی مانند اریتریتول، گلیسرول، اولئیک اسید، گلیسین، ال ترئونین، اسید مالیک در تنش شوری تولید کرد در صورتی که ژنوتیپ حساس عراقی فاقد این ترکیبات بود (۴-۱۱). ژنوتیپ عراقی نیز ترکیباتی همانند اسید بتا آمینو ایزو بوتریک، زایلپیتول ال والین، ۴و۲ پنتادینتریل تولید کرد در حالی که ژنوتیپ متحمل از داشتن این ترکیبات محروم بود (جدول ۴-۱۱).



جدول ۴-۹ تجزیه واریانس متابولیت‌های استخراج شده

منابع تغییرات	درجه	گلوکز	فروکتوز	آلفا دی گلوکوپیرانوزید	لووگلوکوزان	گالاکتوز	میو اینو زیتول	زایلیتون	دی مانیتول	سوربیتول	اریتریتول	گلیسرول
آزادی												
تنش	۱	۰/۲۷۶۶**	۲۳/۴۲**	۲/۹۰۱**	۰/۳۴۴۰**	۱۵/۷۹**	۴۷/۹۷**	۷/۲۵۱**	۹/۷۶۵**	۳۱/۱۶**	۰/۲۰۸۲**	۸۷/۹۹**
خطای اول	۴	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۷۴	۰/۳۷۶۴	۰/۰۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۰۰۵	۰/۰۳۰۴	۰/۰۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۱۸	۰/۳۰۵۰
ژنوتیپ	۱	۰/۲۷۶۶**	۰/۱۰۵۴**	۰/۱۴۳۵**	۰/۳۴۴۰**	۰/۲۰۰۴ ^{ns}	۸/۰۱۱**	۷/۲۵۱**	۴/۷۹۳ ^{ns}	۳۱/۱۶**	۱/۳۲۷**	۳۱/۹۲**
تنش X ژنوتیپ	۱	۰/۲۷۶۶**	۰/۱۰۵۴**	۰/۱۳۲۳**	۰/۳۴۴۰**	۰/۴۸۹۹ ^{ns}	۱۱/۹۱**	۷/۲۵۱**	۴/۴۶۵ ^{ns}	۳۱/۱۶**	۱/۳۲۷**	۲۱/۰۰۰**
خطای دوم	۴	۰/۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۰۰۱۳	۰/۱۲۱۶	۰/۱۵۱۵	۰/۰۲۲۷	۰/۰۰۰۰۰۵۷	۰/۰۲۹۸	۰/۰۰۰۰۰۰۷۲	۰/۰۰۰۰۰۰۵۴	۰/۱۴۳۴
ضریب تغییرات (درصد)		۴/۶۵	۰/۰۳۰	۰/۰۶۵	۱/۶۰	۱۱/۱۴	۰/۰۱۳	۰/۳۰۸	۱۰/۰۵	۰/۱۶	۱۶/۱۴	۶۸/۶

^{ns} و ^{**} به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

ادامه جدول ۴-۹ تجزیه واریانس متابولیت‌های استخراج شده

منابع تغییرات	درجه	اسیدپروپانویک	اسید بنزوئیک	اسید هگزا دکانوئیک	اسید اکتادکانوئیک	اسید اولئیک	بوتیل آمین	سیلاناتمین	بتا آلانین	والین	ال پرولین	گلايسين	ال سرین	ال ترئونین
تنش	۱	۰/۰۴۰۶*	۵/۲۱۲**	۱/۷۰۰**	۱/۵۷۱**	۰/۱۸۲۲**	۰/۰۳۶۵**	۰/۴۰۴۳ ^{ns}	۰/۰۸۹۴**	۰/۲۳۱**	۸۴/۰۳**	۰/۷۲۶۳**	۰/۰۱۱۴**	۰/۰۱۱۴**
خطای اول	۴	۰/۸۱۸۸	۰/۰۰۰۰۰۰۶	۰/۰۶۱۷	۰/۰۰۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۸۵	۰/۰۰۰۰۱۸	۰/۰۹۳۱	۰/۰۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱۲	۰/۰۵۲۱	۰/۰۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۳
ژنوتیپ	۱	۰/۰۳۰۵*	۱/۳۲۷**	۰/۰۶۷**	۰/۰۷۳۱**	۰/۱۸۲۲**	۰/۰۳۶۵**	۳۹۱/۲**	۰/۰۸۹۴**	۰/۰۰۰۰۳۴ ^{ns}	۳۰/۴۰**	۰/۹۷۱۵**	۰/۳۷۶۱**	۰/۳۷۶۱**
تنش X ژنوتیپ	۱	۰/۰۵۶۰**	۱/۳۲۷**	۱/۴۳۰**	۰/۰۵۵**	۰/۱۸۲۲**	۰/۰۳۶۵**	۰/۴۰۴۳ ^{ns}	۰/۰۸۹۴**	۰/۰۰۰۰۳۴ ^{ns}	۰/۴۵۳۸**	۰/۷۲۶۳**	۰/۰۱۱۴**	۰/۰۱۱۴**
خطای دوم	۴	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۰۰۱۸	۰/۱۴۳۴	۱/۵۶۶	۰/۰۲۹۸	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۹۳۲	۰/۰۰۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۱۰
ضریب تغییرات (درصد)		۲۱/۶	۰/۱۱۱	۱۹/۰۶	۰/۰۵	۲۳/۶۹	۲۴/۶۱	۵/۳۴	۰/۱۱	۷/۹۷	۷/۱۱	۰/۴۱	۲۶/۰۶	۰/۰۲۶

^{ns} و ^{**} به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

ادامه جدول ۴-۹ تجزیه واریانس متابولیت های استخراج شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	اسیدگاما آمینو بوتریک	بتا آمینو بوتریک	اسید بوتادنوئیک	اسیددی گلوکونیک	۴ و ۱ بنزن دی کربوکسیلیک	اسید ان بوتریک	کربازول	۴ و ۲ پنتادی نیتریل	اسید فسفریک
تنش	۱	۱۹/۹۱ ^{**}	۰/۲۵۳۱ ^{**}	۰/۰۳۸۰ ^{**}	۰/۲۸۵ ^{**}	۰/۷۰۴۰ ^{**}	۰/۰۶۳۶ ^{**}	۰/۵۷۸۳ ^{**}	۰/۱۴۹۶ ^{**}	۲۴۶/۶ ^{**}
خطای اول	۴	۰/۱۰۳۶	۰/۰۰۰۱۲	۰/۰۰۰۹۲	۰/۰۰۰۰۲۰	۰/۰۹۶۲	۰/۰۰۰۳۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۴۷	۰/۱۴۶۴
ژنوتیپ	۱	۳۱/۴۶ ^{**}	۰/۰۲۵۳ ^{**}	۰/۰۰۰۲۹۶ ^{ns}	۰/۰۷۴۱ ^{**}	۰/۰۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۶۳۶ ^{**}	۰/۲۰۲۵ ^{**}	۰/۱۴۹۹ ^{**}	۵۶/۹۱ ^{**}
تنش X ژنوتیپ	۱	۳۱/۴۶ ^{**}	۰/۰۲۵۳ ^{**}	۰/۰۰۰۳۲۰ ^{ns}	۰/۰۷۴۱ ^{**}	۰/۰۸۹۳ ^{ns}	۰/۰۶۳۶ ^{**}	۰/۳۱۴ ^{**}	۰/۱۴۹۹ ^{**}	۳۷/۴۷ ^{**}
خطای دوم	۴	۰/۱۲۱۶	۰/۰۰۰۱۲	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۲۲۷	۰/۰۰۰۳۷ ^{ns}	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۰۴۷	۱/۵۶۶
ضرایب تغییرات (درصد)		۲۴/۵۴	۱۶/۵۹	۱۷/۶۲	۴/۶۵	۱۴/۶۴	۲۶/۵۵	۵/۸۰	۱۹/۴۵	۲۱/۵

ns و ** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد



جدول ۴-۱۰ متابولیت های استخراج شده در تیمار شاهد

وزن مولکولی	فرمول مولکولی	فراوانی	سطح زیر منحنی	زمان خرج (دقیقه)	نام فارسی ترکیب	نام لاتین ترکیب	ژنوتیپ
۲۷۷/۶	C ₁₁ H ₃₁ NOSi	۹۳	۱۱/۰۵	۹/۴۰۳	سیلامین	Silanamine,1,1,1-trimethyl- N[2-(trimethylsilyl)oxy]	پاکستانی X زودرس
۱۸۲/۱	C ₆ H ₁₄ O ₆	۸۵	۰/۱۵۱	۱۳/۷۲	تری متیل سیلیل اترهای گلوسیتول	Trimethylsilylether of glucitol	
۲۴۳	C ₇ H ₁₂ F ₃ NO ₃ Si	۷۷	۰/۰۷۷	۶/۶۵۱	گلیسین	Glycine, N,N,bis (trimethylsilyl)	
۷۳/۱	C ₄ H ₁₁ N	۷۵	۰/۲۲۰	۸/۶۰۵	ان بوتیل آمین	N-Butylamine ditms	
۳۰۸/۶	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	۹۹	۸/۳۶	۶/۲۶۰	گلیسرول	Glycerol	عراقی X تربیات مشترک بین دو ژنوتیپ زودرس و پاکستانی
۹۷/۹۹	H ₃ PO ₄	۹۹	۱۰/۳۵	۶/۳۰۸	سیلانول تری متیل فسفات – اسید فسفریک	Silanol, trimrthyl- phosphate (3:1). Phosphoric acid	
۱۳۴/۰۹	C ₄ H ₆ O ₅	۹۹	۰/۸۴۷	۹/۰۱۷	اسید بوتادنوئیک – اسید مالیک	Butanedioic Acid- Malic Acid	
۱۶۶/۱	C ₈ H ₆ O ₄	۹۹	۰/۷۸۶	۱۴/۸۱	۴و۱ اسید بنزن دی کربوکسیلیک	1,4 benzene dicarboxylic Acid	
۲۵۶/۴	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	۹۳	۱/۰۴۰	۱۴/۸۷	اسید هگزادکانوئیک	Hexa decanoic Acid	
۷۴/۰۸	C ₃ H ₆ O ₂	۹۲	۰/۲۸۹	۶/۹۹۳	اسید پروپانوئیک	Propanoic Acid	
۱۹۶/۱	C ₆ H ₁₂ O ₇	۹۰	۰/۳۰۸	۱۴/۸۶	اسید دی گلوکونیک	D- Gluconic Acid	
۱۸۲/۱	C ₆ H ₁₄ O ₆	۸۵	۸۱/۶۴	۱۳/۹۸	دی مانیتول	D- Mannitol	
۱۸۰/۱۵	C ₆ H ₁₂ O ₆	۸۵	۲/۳۳۷	۱۳/۹۶	گالاکتوز	Galactose	
۳۴۲/۳	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	۸۳	۲/۷۹۴	۱۳/۳۶	فروکتوز بنزوئیل	Fructose benzoyl	
۹۱۸	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	۸۲	۰/۱۲۶	۱۹/۳۴	آلفا – دی – گلوکوپیرانوزید	α-D-Glucopyranoside	
۲۸۷/۱	C ₁₈ H ₁₄ BNO ₂	۶۷	۰/۷۵۴	۱۳/۴۹	۹ اچ – کربازول – فنیل	9H- Carbazol-9- phenyl	
۲۸۸/۴	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	۶۵	۰/۳۱۷	۱۶/۶۴	اسید اکتادکانوئیک	Octadecanoic Acid	عراقی X تربیات مشترک بین دو ژنوتیپ زودرس و پاکستانی
۱۳۴/۰۹	C ₄ H ₆ O ₅	۶۰	۱/۰۴۱	۱۳/۸۱	اسید گاما آمینو بوتریک	γAmino Butric Acid	
۱۹۲/۱	C ₆ H ₈ O ₇	۹۴	۰/۲۹۳	۰/۲۹۳	اسید سیتریک	Citric Acid	
۳۲۱/۶	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	۸۷	۰/۲۹۲	۰/۲۹۲	ال – سرین	L-serine tri-TMS	
۱۸۴	C ₆ H ₁₆ O ₆	۸۷	۰/۳۵۸	۲/۸۰۹	میو اینوزیتول	Myo- inositol -1,2,3,4,5,6 hexakis o(trimethylsilyl)	
۱۶۲/۱	C ₆ H ₁₀ O ₅	۸۶	۰/۶۷۷	۰/۶۷۷	لوو گلوکوزان	Levogluccosan,tri- TMS	
۸۹/۰۹	C ₃ H ₇ NO ₂	۸۳	۰/۳۴۵	۰/۳۰۱	بتا آلانین	β –Alanine- N,N- bis (trimethylsilyl)	
۱۱۵/۱	C ₅ H ₉ NO ₂	۸۳	۱/۰۷۶	۸/۷۵	ال – پرولین	L- proline -5oxo-1(trimethylsilyl)	



جدول ۴-۱۱ متابولیت‌های استخراج شده در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک							
جرم مولکولی	فرمول مولکولی	فراوانی	سطح زیر منحنی	زمان خروج دقیقه	نام فارسی ترکیب	نام لاتین ترکیب	ژنوتیپ
۲۴۳	C ₇ H ₁₂ F ₃ NO ₃ Si	۹۵	۱/۰۶۱	۶/۶۵۱	گلیسین	Glycine, N,N,bis (trimethylsilyl)	پاکستانی X زودرس
۲۷۷/۶	C ₁₁ H ₃₁ NOSi	۹۳	۱۱/۷۸	۹/۴۰۳	سیلامین	Silanamine,1,1,1-trimethyl-N[2-(trimethylsilyl)oxy]	
۱۸۲/۱	C ₆ H ₁₄ O ₆	۸۱	۲/۰۵۳	۱۰/۳۳	تری متیل سیلیل اترهای گلوسیتول	Trimethylsilylether of glucitol	
۲۸۲/۴	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	۸۰	۰/۴۹۳	۱۶/۴۳	اولئیک اسید	Oleic Acid	
۹۷/۹۹	H ₃ PO ₄	۹۹	۱/۲۸۷	۶/۲۶۶	سیلانول تری متیل فسفات – اسید فسفریک	Silanol, trimrthyl- phosphate (3:1). Phosphoric acid	پاکستانی X زودرس
۱۶۶/۱	C ₈ H ₆ O ₄	۹۹	۱/۲۷۱	۱۱/۳۶	۴ و ۱ اسید بنزن دی کربوکسیلیک	1,4 benzene dicarboxylic Acid	
۲۸۸/۴	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	۹۸	۱/۰۴۱	۱۱/۸۹	اسید اکتادکانوئیک	Octadecanoic Acid	
۲۵۶/۴	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	۹۳	۱/۷۹۳	۱۰/۵۲	اسید هگزادکانوئیک	Hexa decanoic Acid	
۱۲۲/۱۲	C ₄ H ₁₀ O ₄	۹۳	۰/۲۶۳	۰/۲۹۲	اریتریتول	Erythritol per-tms	
۱۱۵/۱	C ₅ H ₉ NO ₂	۹۱	۱/۰۷۶	۵۴/۷۴	ال – پرولین	L- proline -5oxo-1(trimethylsilyl)	
۱۱۷/۱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	۹۰	۰/۲۷۷	۵/۴۴۲	ال والین	L-valine- N –(trimrthyl) ester	
۱۲۲/۱	C ₇ H ₆ O ₂	۹۰	۱/۳۱۸	۲/۰۰۳	اسید بنزوئیک	Benzoic Acid 2 methyl-thrimtyl	
۱۸۰/۱	C ₆ H ₁₂ O ₆	۸۷	۴/۶۴۵	۰/۳۱۴	گالاکتوز	Galactose	
۱۸۰/۱	C ₆ H ₁₂ O ₆	۸۷	۴/۱۷۸	۴/۴۲۰	میواینوزیتول	Myo Inositol -1,2,3,4,4,5,6 hexakis othrimethylsilysl	
۱۸۲/۱	C ₆ H ₁₄ O ₆	۸۱	۲/۶۲۰	۱۳/۹۲	دی مانیتول	D- Mannitol	
۹۱۸	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	۷۹	۰/۱۲۶	۵/۱۱۰	آلفا – دی – گلوکوپیرانوزید	α-D-Glucopyranoside	
۲۸۷/۱	C ₁₈ H ₁₄ BNO ₂	۷۰	۰/۷۵۴	۰/۳۱۵	۹ اچ – کربازول – فنیل	9H- Carbazol-9- phenyl	
۱۳۴/۰۹	C ₄ H ₆ O ₅	۶۰	۱/۰۴۱	۳/۸۱۲	اسیدگاما آمینو بوتریک	γAmino Butyric Acid	

ادامه جدول ۴-۱۱ متابولیت‌های استخراج شده در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک در ژنوتیپ عراقی

وزن مولکولی	فرمول مولکولی	فراوانی	سطح زیر منحنی	زمان خروج (دقیقه)	نام فارسی ترکیب	نام لاتین ترکیب	ژنوتیپ
۲۷۷/۶	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	۹۱	۵/۹۰۸	۵/۳۹۴	گلیسرول	Glyserol	ژنوتیپ عراقی
۳۲۱/۶	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	۸۷	۱/۲۸	۱/۲۹۲	ال – سرین	L-serine tri-TMS	
۱۱۸	C ₆ H ₁₄ O ₂	۸۳	۰/۴۴۶	۳/۳۴	۲و۴ پنتا دی نیتریل	2,4 Pentadienetirile	
۸۸/۱	C ₄ H ₈ O ₂	۸۰	۰/۱۸۳	۴/۴۳۵	اسید بتا آمینو ایزو بوتریک	βAmino isobutyric Acid	
۸۸/۱	C ₄ H ₈ O ₂	۸۰	۰/۲۹۱	۵/۳۴۷	اسید ان بوتریک اسید	N – Butyric Acid	
۱۵۲/۱	C ₅ H ₁₂ O	۷۹	۳/۱۰۹	۲/۲۶۸	زایلیتول	Xylitol	

متابولیت‌های مختلف شناسایی شده در این مطالعه، از نظر نقش آن‌ها در تحمل در برابر تنش و مسیرهای متابولیکی سنتز آن‌ها نیز و کاربرد بالقوه آن‌ها برای غربال‌گری گیاه کنگد در برابر تنش شوری مورد مطالعه و بحث قرار گرفتند.

قندها

با توجه به نتایج حاصله در این پژوهش مشخص شد که بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل از نظر میزان گلوکز و فروکتوز تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴-۹). میزان قندهای تولیدی توسط دو ژنوتیپ در شرایط تنش کلرید سدیم کاهش یافت. ژنوتیپ حساس عراقی از میزان گلوکز بیشتری نسبت به ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی برخوردار بود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نشان داد که بیشترین میزان گلوکز را ژنوتیپ حساس عراقی در تیمار شاهد با میزان $0/607$ میکرو ولت در دقیقه تولید کرد، در حالی که در هنگام مواجهه با تنش، کاهش در مقدار این ماده در هر دو ژنوتیپ کاملاً مشهود بود (جدول ۴-۱۲). همچنین نتایج حاکی از تفاوت بین میزان فروکتوز در شرایط تنش و عدم تنش بود. ژنوتیپ حساس عراقی از میزان فروکتوز بالاتری نسبت به هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی در شرایط بدون تنش برخوردار بود. نتایج نشان داد که بین شرایط تنش و عدم تنش نیز از نظر میزان فروکتوز تفاوت وجود داشت و بیشترین میزان فروکتوز را ژنوتیپ حساس عراقی در تیمار شاهد با میزان $3/38$ میکرو ولت در دقیقه تولید نمود، در صورتی که در شرایط تنش فروکتوز در هر دو ژنوتیپ مشاهده نگردید (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). از بین سایر هیدروکربن‌های مشاهده شده در عصاره برگ کنگد می‌توان به آلفا- دی گلوکوپیرانوزید و لووگلوکوزان اشاره کرد که تنش کلرید سدیم تأثیر بسیار معنی‌داری در سطح یک درصد بر میزان این کربوهیدرات‌ها داشت (جدول ۴-۹). مقایسه میانگین بین دو ژنوتیپ از نظر تولید این کربوهیدرات‌ها نشان داد که هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی دارای آلفا- دی گلوکوپیرانوزید بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی بود، که بیشترین مقدار این ماده را ژنوتیپ متحمل با میزان $1/33$ میکرو ولت در دقیقه در تنش 200 میلی‌مولار و کمترین میزان آن را والد حساس عراقی با $0/122$ میکرو ولت در دقیقه در شاهد از آن خود کردند (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). لوو گلوکوزان نیز کربوهیدرات دیگری است که توسط ژنوتیپ حساس عراقی تولید و بیشترین مقدار آن ($0/677$ میکرو ولت در دقیقه) در تیمار شاهد در عصاره ژنوتیپ ذکر شده رویت شد و در شرایط تنش مقدار آن به شدت کاهش یافت در صورتی که در ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی وجود نداشت (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

تنش شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان گالاکتوز تولیدی دو ژنوتیپ حساس و متحمل مورد بررسی در این پژوهش در سطح احتمال یک درصد گذاشت (۹-۴). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها نشان داد که میزان گالاکتوز ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی با میانگین ۳/۶۲ میکرو ولت در دقیقه بیشتر از والد حساس عراقی بود (جدول پیوست ۷).

قندهای الکلی (پلی‌ال‌ها)

نتایج نشان داد که تنش شوری بر میزان میواینوزیتول تاثیر معنی‌داری داشت (جدول ۹-۴). بررسی مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های حساس عراقی و متحمل زودرس X پاکستانی نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین این دو ژنوتیپ بود و حاکی از آن بود که ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی از میزان میواینوزیتول بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی برخوردار بود (جدول ۱۲-۴ و ۱۳-۴). با توجه به بررسی اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ‌ها (جدول ۱۲-۴) مشخص شد که بیشترین میزان میواینوزیتول را ژنوتیپ متحمل (زودرس X پاکستانی) در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک با میانگین ۵/۹۹ میکرو ولت در دقیقه تولید نموده است. علاوه بر این ترکیبات پلی‌ال‌های دیگری از قبیل زایلیتول در بین متابولیت‌های استخراج شده از برگ گیاهچه کنبدر در این پژوهش مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که تنش شوری اثر معنی‌داری بر مقدار تولید این متابولیت گذاشت (جدول ۹-۴). نتایج نشان داد که بیشترین مقدار زایلیتول متعلق به ژنوتیپ حساس عراقی در شرایط تنش ۲۰۰ میلی مولار کلریدسدیم بود (جدول ۱۲-۴ و ۱۳-۴). تنش شوری تاثیر بسیار معنی‌داری بر میزان دی مانیتول و سوربیتول تولیدی توسط گیاه کنبدر داشت (جدول ۹-۴). نتایج مقایسه میانگین، بر خورداری بیشتر ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی از دی مانیتول و سوربیتول را نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی نشان داد (جدول ۱۲-۴). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ مشخص نمود که بیشترین میزان دی مانیتول (۳/۸۶ میکرو ولت در دقیقه) در تنش از آن ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی بود. بیشترین میزان سوربیتول نیز متعلق به هیبرید متحمل زودرس X پاکستانی (۲/۰۵۴۸ میکرو ولت در دقیقه) در شرایط تنش بود (جدول ۱۲-۴ و ۱۳-۴).

اریتریتول از دیگر قندهای الکلی استخراج شده در این مطالعه بود. نتایج نشان داد که ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی از مقدار بیشتری از اریتریتول نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی در تنش شوری برخوردار بود. بر اساس این نتایج هر دو ژنوتیپ در شرایط عدم تنش فاقد این ماده بودند (جدول ۱۱-۴ و ۱۲-۴).

گلیسرول یکی از متابولیت‌های تولید شده توسط دو ژنوتیپ حساس و متحمل کنگد در این مطالعه بود که نتایج مشخص نمود، تنش شوری تاثیر بسیار معنی‌داری بر میزان گلیسرول داشت (جدول ۴-۹). این ترکیب در شاهد و نیز در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار نمک در دو ژنوتیپ مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل حاکی از آن بود که در شرایط عدم تنش بین دو ژنوتیپ از لحاظ تولید این ماده تفاوت چندانی وجود نداشت، اما در شرایط تنش، ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی (۵/۹۰ میکرو ولت در دقیقه) تولید نمود و ژنوتیپ حساس عراقی از داشتن گلیسرول در هنگام تنش محروم بود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

اسید پروپانویک و اسید بنزوئیک نیز در بین متابولیت‌های استخراجی از برگ گیاهچه کنگد مشاهده شد و تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آن بیانگر تاثیر معنی‌دار تنش شوری بر میزان این متابولیت‌ها با احتمال ۹۵ و ۹۹ درصد بود و بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش، اختلاف معنی‌داری را آشکار کرد (جدول ۴-۹). مقایسه میانگین نشان داد که هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی در تولید این دو اسید موفق‌تر بود. بیشترین مقدار اسید پروپانویک و اسید بنزوئیک توسط ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار، به ترتیب با میانگین ۱/۹۸ میکرو ولت در دقیقه و ۰/۱۹۱ میکرو ولت در دقیقه، تولید شد (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

اسیدهای چرب

اسیدهای چرب هگزادکانوئیک و اکتادکانوئیک در هر دو ژنوتیپ حساس عراقی و متحمل زودرس × پاکستانی و در هر دو شرایط تنش و عدم تنش مشاهده شد. طبق نتایج حاصل، مشخص شد که این اسیدهای چرب از تنش شوری بسیار اثر پذیرفتند و بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴-۹). بیشترین میزان اسید هگزادکانوئیک در هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی با میانگین ۲/۰۶ میکرو ولت در دقیقه در تنش مشاهده شد و کمترین آن نیز توسط همین ژنوتیپ در شرایط عدم تنش با میزان ۰/۶۲۰ میکرو ولت در دقیقه تولید شد (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان اسید اکتادکانوئیک را به ترتیب هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی تحت تنش شوری با میانگین ۱/۱۸ میکرو ولت در دقیقه و ژنوتیپ حساس عراقی با میانگین ۰/۳۰۷ میکرو ولت در دقیقه در شرایط عدم تنش تولید کردند (۴-۱۲). علاوه بر این اسید اولئیک نیز در بین متابولیت‌ها دیده شد. براساس نتایج بدست آمده مشخص شد که هیبرید متحمل زودرس × پاکستانی مقدار بیشتری از این متابولیت را در تنش شوری از آن خود نمود. در صورتی که ژنوتیپ حساس عراقی فاقد این ماده در هر دو محیط شاهد و تنش شوری بود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

پلی آمین‌ها

بوتیل آمین، از پلی آمین‌ها محسوب می‌شود. نتایج نشان داد که این ماده به شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت و ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی در تولید بوتیل آمین موفق‌تر عمل نمود و مقدار بیشتری از آن را در شاهد تولید کرد، در حالی که ژنوتیپ حساس عراقی آن را تولید ننمود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). از ترکیبات دیگری که در زمره متابولیت‌های موجود در کنگد واقع شد، سیلانامین بود که ژنوتیپ متحمل در تولید آن (۱۱/۴۲ میکرو ولت در دقیقه) در شرایط تنش موفق‌تر عمل نمود (جدول پیوست ۷).

اسیدهای آمینه

ژنوتیپ حساس عراقی رتبه نخست در تولید بتا آلانین را به خود اختصاص داد. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ، مشخص کرد که ژنوتیپ حساس عراقی ۰/۳۴۵ میکرو ولت در دقیقه آلانین را در تیمار شاهد تولید کرد، در حالی که در هنگام تنش هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل فاقد این اسیدهای آمینه بودند (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). والین اسید آمینه دیگری بود که ژنوتیپ عراقی با میانگین ۰/۱۴۰ میکرو ولت در دقیقه در تولید آن توانا تر بود (جدول پیوست ۷).

پرولین از فاکتورهایی در این پایان نامه به شمار آمد که به شدت تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت و تولید آن در تنش افزایش چشمگیری داشت و بین ژنوتیپ حساس و متحمل از نظر تولید این اسید آمینه تفاوت بسیار معنی‌داری ملاحظه گردید (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در شرایط بدون تنش فاقد پرولین بود اما با قرار گرفتن در معرض کلرید سدیم به تولید پرولین پرداخت و با توجه به نتایج مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها، این ژنوتیپ از پرولین بیشتر برخوردار بود در حالی که ژنوتیپ حساس عراقی مقدار کمتری پرولین تولید نمود. مطالعه آثار متقابل تنش در ژنوتیپ آشکار ساخت که بیشترین مقدار پرولین متعلق به هیبرید متحمل زودرس X پاکستانی در شرایط تنش با میانگین ۹/۶۱۵ میکرو ولت در دقیقه بود در حالی که والد حساس عراقی از میزان بسیار کمی (۲/۱۷۱ میکرو ولت در دقیقه) نسبت به ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی برخوردار بود. طبق این نتایج کمترین میزان پرولین را نیز ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در شرایط بدون تنش داشت (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

تنش شوری تاثیر زیادی بر میزان گلیسین گذاشت و باعث افزایش این ماده در گیاهچه‌های کنگد شد. در هیبرید متحمل زودرس X پاکستانی گلیسین به میزان بیشتری تجمع یافت، در صورتی که ژنوتیپ حساس عراقی این ماده را

تولید نکرد. نتایج نشان داد که هیبرید متحمل زودرس $\times$ پاکستانی بیشترین میزان گلیسین ($1/06$ میکرو ولت در دقیقه) را در تنش 200 میلی‌مولار نمک، در برگ‌های خود جمع کرد (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

از اسیدهای آمینه‌ای که در ژنوتیپ عراقی مشاهده شد، آل سرین بود که تحت تنش شوری بر مقدارش افزوده شد، ژنوتیپ متحمل زودرس $\times$ پاکستانی مقداری کمتری از آن را تولید کرد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که ژنوتیپ حساس عراقی توانا تر در تولید آل سرین بود و بیشترین میزان آل سرین را در شرایط تنش تولید نمود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). از دیگر اسیدهای آمینه موجود در عصاره برگ کنجد، آل ترئونین را می‌توان نام برد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های حساس و متحمل توانایی متفاوتی از خود جهت تولید این ترکیب نشان دادند، بر اساس این نتایج مشخص شد که ژنوتیپ زودرس $\times$ پاکستانی بیشترین مقدار آن را در شرایط تنش تولید نمود این در حالی بود که ژنوتیپ حساس عراقی از این ترکیب بی بهره بود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

اسیدهای آلی

تجزیه داده‌های حاصل از کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی نشان داد که غلظت‌های کلرید سدیم مورد مطالعه بر میزان اسید گاما آمینو بوتریک در سطح احتمال یک درصد تاثیر معنی‌داری گذاشت (جدول ۴-۹). در تیمار شاهد هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل دارای اسید گاما آمینو بوتریک بودند اما مقدار آن در ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. با افزایش میزان کلرید سدیم مقدار این ماده نیز در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. مقایسه اثرات متقابل بیانگر این بود که در تنش 200 میلی‌مولار ژنوتیپ متحمل زودرس $\times$ پاکستانی میزان بیشتری ($6/07$ میکرو ولت در دقیقه) از این ماده را نسبت به والد عراقی تولید کرد. کمترین میزان این ماده در ژنوتیپ عراقی در تیمار شاهد با میانگین $0/264$ میکرو ولت در دقیقه تولید شد (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). بر اساس نتایج حاصل در این پژوهش مشخص شد که تنش شوری تولید اسید بتا آمینو بوتریک را نیز تحت تاثیر قرار داد و بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۴-۹). مقایسه میانگین بیان نمود که ژنوتیپ حساس عراقی در تولید این ماده از ژنوتیپ متحمل زودرس $\times$ پاکستانی پیشی گرفت و میزان بیشتری ($0/183$ میکروولت در دقیقه) را در تنش شوری تولید نمود و ژنوتیپ متحمل زودرس $\times$ پاکستانی در هیچ کدام از دو تیمار این ماده را تولید نکرد (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). اسید بوتادینوئیک نیز توسط دو ژنوتیپ هم در شرایط تنش و هم عدم تنش تولید شد و نتایج نشان داد که تحت تنش شوری مقدار آن افزایش یافت اما تفاوت چندانی بین دو ژنوتیپ از لحاظ تولید این ماده مشاهده نگردید (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

اسید مالیک و اسید سیتریک تاثیر بسیار معنی داری را از تنش شوری پذیرفتند (جدول ۴-۹). هردو ژنوتیپ در تیمار شوری، اسید مالیک را تولید نمودند، ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی نیز در تولید اسید مالیک میزان بیشتری را تولید نمود، این در حالی بود که ژنوتیپ حساس عراقی مقدار کمتری از این ماده را تولید کرد. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ نیز نشان داد که ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در تیمار ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، میزان اسید مالیک بیشتری با میانگین ۱/۱۵ میکرو ولت در دقیقه تولید نمود و کمترین مقدار آن نیز توسط همین ژنوتیپ (متحمل) در شاهد تولید شد در حالی که ژنوتیپ حساس عراقی فاقد این متابولیت در شرایط تنش و شاهد بود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳). میزان اسید سیتریک نیز در ژنوتیپ حساس عراقی بیشتر مشاهده گردید. نتایج حاکی از آن بود که ژنوتیپ عراقی بیشترین میزان این ماده (۰/۲۹۳ میکرو ولت در دقیقه) را در عدم تنش تولید نمود و ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی اسید سیتریک را در شاهد تولید نکرد و تولید این ماده در شرایط تنش توسط دو ژنوتیپ کاهش یافت (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

نتایج نشان داد که اسید دی گلوکونیک در عصاره برگ کنگد دیده شد. طبق این نتایج تنش شوری توانست از نظر تولید این ترکیب نیز بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل اختلاف معنی داری قائل گردد (جدول ۴-۹). ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی موفق به تولید بیشترین مقدار (۰/۴۶۵ میکرو ولت در دقیقه) این ترکیب در شرایط عدم تنش شد. در صورتی که هردو ژنوتیپ تمایلی به تولید آن در شرایط تنش از خود نشان ندادند (جدول ۴-۱۲). اسید ۴ و بنزن دی کربوکسیلیک نیز در بین متابولیت های استخراجی در این مطالعه ملاحظه شد. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش در ژنوتیپ، بیشترین مقدار این ترکیب را به ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی (۱/۳۹ میکرو ولت در دقیقه) در شرایط تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار NaCl و کمترین آن را به ژنوتیپ حساس عراقی (۱/۰۱۸) در شرایط عدم تنش اختصاص داد (جدول پیوست ۷).

نتایج نشان داد که تنش تاثیر بسیار معنی داری در سطح ۱٪ بر میزان اسید ان بوتریک گذاشت (جدول ۴-۹). ژنوتیپ حساس عراقی در تولید این متابولیت موفق تر بود و توانست بیشترین مقدار آن را (۰/۲۹۱) در شوری ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم به خود اختصاص دهد، اما ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی آن را تولید نکرد. هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه در این پژوهش در شرایط عدم تنش فاقد این ماده بودند (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

کربازول متابولیت دیگری بود که استخراج شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ زودرس X پاکستانی در محیط شاهد بیشترین مقدار آن را تولید نمود و کمترین این متابولیت را نیز همین ژنوتیپ در تنش شوری تولید کرد. ژنوتیپ عراقی در هنگام مواجهه با تنش شوری موفق تر عمل نمود و مقدار آن بیشتر بود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

ترکیبات فسفردار

آخرین متابولیتی که مشاهده گردید، اسیدفسفریک از خانواده ترکیبات فسفات دار بود. نتایج حاکی از آن بود که این متابولیت تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت و بین دو ژنوتیپ از لحاظ تولید این ترکیب اختلاف قابل توجهی ملاحظه شد (۴-۹). اسیدفسفریک از جمله ترکیباتی به شمار آمد که ژنوتیپ حساس عراقی در تولید آن بهتر عمل نمود و بیشترین مقدار آن را در محیط شاهد (۱۴/۲ میکرو ولت در دقیقه) از آن خود نمود. اگرچه میزان تولید این متابولیت توسط ژنوتیپ حساس عراقی در تنش کمتر از شرایط عدم تنش بود اما همچنان این ژنوتیپ توانایی خود را در تولید بیشتر اسید فسفریک در نمک نسبت به هیبرید زودرس X پاکستانی حفظ نمود (جدول ۴-۱۲ و ۴-۱۳).

جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای متابولیت های استخراج شده											
تیمار	ژنوتیپ	گلوکز	فروکتوز	آلفا دی	لوو گلوکوزان	میواینوزیتول	زایلیتون	دی مانیتول	سوربیتول	اریتریتول	گلیسرول
گلو کوپیرانوز											
شاهد	زودرس x پاکستانی	۰	۲/۲۰۱ ^b	۰/۱۳۱ ^c	۰	۰	۰	۰/۸۳۸۵ ^b	۰	۰	۸/۰۶۱ ^a
	عراقی	۰/۶۰۷۳ ^a	۳/۳۸۷ ^a	۰/۱۲۲ ^d	۰/۶۷۷۳ ^a	۰/۳۵۸ ^c	۰	۰/۷۹۴۴ ^b	۰	۰	۸/۶۷۸ ^a
۲۰۰ میلی	زودرس x پاکستانی	۰	۰	۱/۳۲۴ ^a	۰	۵/۹۹ ^a	۰	۳/۸۶۲ ^a	۲/۰۵۴ ^a	۰/۳۲۵ ^a	۵/۹۰۸ ^b
مولار NaCl	عراقی	۰	۰	۰/۸۹۵ ^b	۰	۲/۳۶ ^b	۳/۱۰ ^a	۱/۳۷۸ ^b	۰	۰/۲۰۱ ^b	۰
LSD											
		۱/۱۲	۰/۰۶۸	۰/۰۰۳۹	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰	۰/۰۰۸	۰/۶۸	۰/۱۰۱	۰/۱۶۶	۲/۱۵

ادامه جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای متابولیت‌های استخراج شده

تیمار	ژنوتیپ	اسید پروپانواتیک	اسید بنزوئیک	اسید	اسید اولئیک	بوتیل آمین	بتا آلانین	ال پرولین	گلیسین	ال سرین	ال ترئونین
		هگزادکانوئیک	اکتادکانوئیک								
شاهد	زودرس*پاکستانی	۰/۱۷۱ ^c	۰/۶۲۰ ^b	۰/۳۲۷ ^d	۰	۰/۲۲۰ ^a	۰	۰	۰/۰۷۷ ^b	۰	۰/۲۹۲ ^b
	عراقی	۰/۱۹۱ ^b	۱/۴۶ ^{ab}	۰/۳۰۷ ^c	۰	۰	۰/۳۴۵ ^a	۱/۰۷۶ ^c	۰	۰/۲۹۲ ^b	۰
۲۰۰ میلی مولار NaCl	زودرس*پاکستانی	۰/۴۰۸ ^a	۲/۰۶۴ ^a	۱/۱۸۷ ^a	۰/۴۹۳ ^a	۰	۰	۹/۶۱ ^a	۱/۰۶۱ ^a	۰	۰/۴۱۵ ^a
	عراقی	۰/۱۵۵ ^c	۱/۵۲۳ ^{ab}	۰/۸۹۴ ^b	۰	۰	۰	۲/۱۷ ^b	۰	۰/۴۱۵ ^a	۰
LSD		۰/۱۹۶	۰/۳۲	۱/۰۶	۰/۰۰۹	۳/۵۳۴	۰/۰۵۲	۰/۱۷	۰/۸۹۵	۰/۰۶۸	۰/۰۶۸

ادامه جدول ۴-۱۲ مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای متابولیت‌های استخراج شده

تیمار	ژنوتیپ	اسید گاما آمینو	اسیدبتا آمینو	اسید بوتادنوئیک	اسیدمالیک	اسید سیتریک	اسیددی گلوکونیک	ان	کربازول	۴و۲ پنتادیل نیتریل	اسید
		بوتریک	بوتریک					بوتریک			فسفریک
شاهد	زودرس*پاکستانی	۰/۶۹۹ ^c	۰	۰/۱۱ ^a	۰/۵۴۴ ^b	۰	۰/۴۶۵ ^a	۰	۱/۰۴۶ ^a	۰	۶/۴۰۹ ^a
	عراقی	۰/۲۶۴ ^d	۰	۰/۱۳ ^a	۰	۰/۲۹۳ ^a	۰/۱۵۱ ^b	۰	۰/۴۶۲ ^b	۰	۱۴/۲۹ ^a
۲۰۰	زودرس*پاکستانی	۶/۰۷۹ ^a	۰	۰/۲۵ ^a	۱/۱۵۱ ^a	۰	۰	۰	۰/۲۸۳ ^c	۰	۰/۸۷۷ ^c
میلی مولار NaCl	عراقی	۱/۳۶۱ ^b	۰/۱۸۳۷ ^a	۰/۲۱ ^a	۰	۰	۰	۰/۲۹۱ ^a	۰/۳۴۷ ^{bc}	۰/۴۴۶ ^a	۱/۶۹۸ ^c
LSD		۱/۲۶	۰/۱۷	۰/۲۱	۰/۰۱۱	۰/۰۵۵	۰/۰۱۷	۰/۰۶۸	۰/۱۲۴	۰/۰۷۸	۱/۴۶

جدول ۴-۱۳ تفاوت دو ژنوتیپ حساس و متحمل در تولید متابولیت‌ها

متابولیت	گلوکز	فروکتوز	لفا دی گلوکوپیرانوزید	لوو گلوکوزان	گالاکتوز	میواینوزیتول	زایلیتول	دی مانیتول	سوربیتول	اریتریتول	گلیسرول	اسید پروپانوئیک	اسید بنزوئیک	اسید هگزادکانوئیک	اسید اکتادکانوئیک	اسید اولئیک	بوتیل آمین
حساس	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
متحمل	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
معناداری					—			—									

↑، و ----- به ترتیب نشان دهنده بیشتر ، کمتر بودن میزان متابولیت و عدم معناداری است

ادامه جدول ۴-۱۳ تفاوت دو ژنوتیپ حساس و متحمل در تولید متابولیت‌ها

متابولیت	سیلانامین	بتا آلانین	ال والین	ال پرولین	گلیسین	ال سرین	ال ترئونین	اسید گاما آمینو بوتریک	اسید بتا آمینوبوتریک	اسید ۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	اسید مالیک	اسید سیتریک	اسید دی گلوکونیک	ان بوتریک	کربازول	۲و۴ پنتا دی نیتریل	اسید بوتادنوئیک	اسید فسفریک
حساس	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑
متحمل	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
معناداری	—		—							—							—	

↑، ↓ و ----- به ترتیب نشان دهنده بیشتر ، کمتر بودن میزان متابولیت و عدم معناداری است

۴-۵ مدل رگرسیون مرحله‌ای Step Wise multiple regression

پس از تعیین نوع متابولیت‌های موجود در بین دو ژنوتیپ عراقی و زودرس $\times$ پاکستانی و نقش آن‌ها در تحمل به تنش شوری، از StepWise multiple regression مدل رگرسیونی مرحله‌ای جهت پیشگویی پاسخ به تنش و تاثیر متابولیت‌ها در ایجاد تغییرات در صفات مورفولوژیک مطالعه شده در این پایان نامه، مورد استفاده قرار گرفت. در این روش در هر مرحله، کلیه متغیرهای مستقل وارد شده به مدل از طریق معیارهای خاص (آزمون F) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طوریکه یک متغیر مستقل وارد شده به مدل ممکن است در مرحله بعدی حذف گردد تا در نهایت معادله حاصل در برگیرنده متغیرهایی باشد که بیشترین نقش را در توجیه تغییرات متغیر پاسخ دارند (۵۰) در این پژوهش متابولیت‌های استخراج شده به عنوان متغیر مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند. در نهایت مشخص شد که در شرایط تنش شوری متابولیت‌های استخراج شده در طی چند مرحله وارد مدل شدند و توانستند نقش موثر خود را در ایجاد تغییرات صفات مورفولوژیک مورد بررسی در این پژوهش به اثبات برسانند که به تفکیک در ذیل از آن‌ها یاد شده است.

طول ریشه‌چه

نتایج حاصل رگرسیون مرحله‌ای زمانی که طول ریشه‌چه مورد آنالیز رگرسیون مرحله‌ای قرار گرفت، نشان داد که متغیرهای موثر بر صفت طول ریشه‌چه، در طی مراحل مختلف در این طرح قرار گرفتند. نخستین صفتی که وارد مدل شد طول ساقه‌چه بود. این صفت با همبستگی مثبت و بالایی که با طول ریشه‌چه داشت، توانست ۸۸ درصد از تغییرات طول ریشه‌چه را توجیه نماید. اسید اولئیک پس از طول ساقه‌چه در دومین مرحله وارد مدل شد و توانست ۰/۰۱ درصد از تغییرات طول ریشه‌چه را توجیه نماید. گلوکز نیز سومین متابولیتی بود که در این مدل در مرحله سوم وارد مدل شد و بخشی از تغییرات طول ریشه‌چه را توجیه نمود. اسید پروپانوئیک، قطر ساقه‌چه، گلیسین و دی مانیتول متغیرهایی بودند که در مراحل مجزا (۷، ۶، ۵ و ۴) در این مدل وارد شدند و توانستند به ترتیب ۰/۰۱۰، ۰/۰۱۷، ۰/۰۴۴ و ۰/۰۰۳ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نمایند. نتایج این طرح بیان نمود که وزن تر گیاهچه نیز بر طول ریشه‌چه گیاهچه کنجد در تنش شوری موثر بود و توانست تغییرات موجود در طول ریشه‌چه را توجیه کند. وزن خشک نیز از عوامل موثر دیگری بود که ۰/۰۰۱ درصد از تغییرات طول ریشه‌چه را توجیه کند و در آن موثر باشد. سیلانامین در آخرین مرحله حضور یافت و با تاثیر ۰/۰۰۰۵ درصد در گروه عوامل موثر بر طول ریشه‌چه قرار گرفت (جدول ۴-۱۴).

جدول ۴-۱۴ نتایج رگرسیون مرحله ای برای صفت طول ریشه چه

مرحله	صفات	عرض از مبدا	طول ساقه چه	اسید اولئیک	گلوکز	اسید پروپانویک	قطر ساقه چه	گلیسین	دی مانیتول	وزن تر گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	سیلانامین	جز ² R	مدل ² R
۱	طول ساقه چه	۱/۶۴ ^{ns}	۰/۸۱ ^{**}										۰/۸۸	۰/۸۸
۲	اسید اولئیک	۵/۸۷ ^{ns}	۰/۷۹ ^{**}	-۱۸/۱۲۳ ^{ns}									۰/۰۱۶۰	۰/۹۰
۳	گلوکز	۷/۲۳ ^{ns}	۰/۷۷ ^{**}	-۱۰۸/۵ ^{ns}	۱۶۷/۲ ^{ns}								۰/۰۱۶	۰/۹۱
۴	اسید پروپانویک	۳/۳۷ ^{ns}	۰/۷۲ ^{**}	-۱۱۲/۹ ^{ns}	۱۷۸/۶ ^{ns}	۳۳/۷ ^{ns}							۰/۰۱۰	۰/۹۲
۵	قطر ساقه چه	-۳/۳۱ ^{ns}	۰/۴۹ [*]	-۱۴۴/۲ ^{ns}	۲۱۸/۱ ^{ns}	۵۱/۳ ^{ns}	۱۶/۶ ^{ns}						۰/۰۱۷	۰/۹۴
۶	گلیسین	-۴/۰۹ ^{ns}	۰/۲۳ ^{ns}	۱۲۴/۹ ^{ns}	۷۴۸/۳ ^{**}	۱۸/۰۴ ^{ns}	۴۴/۹ ^{**}	-۲۷۵/۵ ^{**}					۰/۰۴۴	۰/۹۹
۷	دی مانیتول	۱۰/۸ ^{ns}	۰/۱۹ ^{ns}	۱۶۳/۵ [*]	۸۳۱/۷ ^{**}	۹/۰۸ ^{ns}	۴۵/۳ ^{**}	-۲۹۰/۵ ^{**}	-۹/۵۲ ^{ns}				۰/۰۰۳	۰/۹۹
۸	وزن تر گیاهچه	۱۷/۲ ^{ns}	۰/۲۱ [*]	۱۴۷/۸ [*]	۷۷۰/۱ ^{**}	۲/۱۲ ^{ns}	۵۱/۱ ^{**}	-۲۵۷/۴ ^{**}	-۱۴/۹ [*]	-۷/۲۴ ^{ns}			۰/۰۰۳	۰/۹۹
۹	وزن خشک گیاهچه	۱۲/ ۱ ^{ns}	۰/۲۵ [*]	۷۶/۸ ^{ns}	۶۰۶/۲ [*]	۱۹/۰ ^{ns}	۵۴/۳ ^{**}	-۱۹۴/۵ ^{**}	-۱۲/۲ ^{ns}	-۲۷/۰ ^{ns}	۱۰۲/۸ ^{ns}		۰/۰۰۱	۰/۹۹
۱۰	سیلانامین	۲۲/۰ ^{ns}	۰/۲۳ [*]	-۲۷۲/۰ [*]	۶۶/۹ ^{ns}	-۱۷/۱ ^{ns}	۸۶/۸ ^{ns}	۱۶۲/۹ ^{ns}	-۱۶/۷ ^{ns}	-۱۰۵/۷ ^{ns}	۶۵۶/۸ ^{ns}	۵/۸۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۵	۱/۰۰

ns و** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

وزن خشک گیاهچه

متغیرهای موثر بر صفت وزن خشک گیاهچه نیز در طی مراحل مختلف در این طرح قرار گرفتند. کربازول نخستین متابولیتی بود که با همبستگی مثبت و بالایی که با وزن خشک گیاهچه داشت، وارد مدل گردید و توانست ۸۵ درصد از تغییرات وزن خشک گیاهچه را از آن خود نماید و خود را به عنوان مهم‌ترین عامل موثر در تغییرات وزن خشک گیاهچه در این طرح معرفی کند. زایلیتول پس از کربازول در دومین مرحله وارد مدل شد و ۰/۰۵ درصد از تغییرات وزن خشک را توجیه نمود. اسید ۴و۱ بنزن دی کربوکسیلیک، نیز سومین صفتی بود که در این مدل در مرحله سوم وارد شد و ۰/۰۱۹ درصد از تغییرات وزن خشک گیاهچه را توجیه کرد. اسید هگزادکانوئیک، ال ترئونین، گاما آمینوبوتریک و سرعت جوانه‌زنی متغیرهایی بودند که در مراحل مجزا (۷، ۶، ۵ و ۴) در این مدل وارد شدند و توانستند در مجموع ۰/۰۶۴ درصد از تغییرات وزن خشک را توجیه نمایند. نتایج این طرح بیان نمود که اریتریتول نیز بر وزن خشک گیاهچه کنجد در تنش شوری موثر واقع گردید و توانست ۰/۰۰۴ درصد از تغییرات موجود در وزن خشک گیاهچه را توجیه کند. اسید فسفریک نیز از عوامل موثر دیگری بود که توانست در تغییرات وزن خشک گیاهچه ۰/۰۰۱۵ درصد موثر باشد. اسید سیتریک در آخرین مرحله حضور یافت و در گروه عوامل موثر بر طول ریشه‌چه قرار گرفت (جدول ۴-۱۵).

پرولین برگ

میزان پرولین برگ نیز، در این پژوهش به عنوان متغیر وابسته، وارد مدل رگرسیون مرحله‌ای گردید. نتایج بررسی صفات، نشان داد که گلیسین به عنوان نخستین متغیر وارد مدل گردید و به تنهایی توانست ۸۰ درصد از تغییرات پرولین کنجد را در شرایط تنش، توجیه نماید. در دومین مرحله صفت قطر ساقه‌چه وارد مدل شد و ۰/۵ درصد از تغییرات پرولین را توانست توجیه کند. اریتریتول سومین ترکیبی بود که در این طرح وارد شد و همبستگی بالا و مثبتی را با میزان پرولین نشان داد. در مرحله چهارم اسید اولئیک مشاهده شد که ۰/۰۰۵ درصد از تغییرات را توجیه نمود. اسید پروپانوئیک، گالاکتوز و درصد جوانه‌زنی به تفکیک در مراحل بعدی (۷ و ۶ و ۵) وارد شدند و در مجموع این صفات ۰/۰۰۶ درصد از تغییرات میزان پرولین برگ را توجیه نمودند. گلیسرول نیز در مرحله پسین جای گرفت و ۰/۰۰۰۶ از تغییرات این صفت وابسته را توجیه نمود. سپس اسید ۴و۱ بنزن دی کربوکسیلیک در مرحله بعدی وارد مدل گردید. در آخرین مرحله نیز میواینوزیتول خود را نشان داد و در کنار سایر متغیرهای مستقل موثر بر میزان پرولین قرار گرفت (جدول ۴-۱۶).



جدول ۴-۱۵ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای صفت وزن خشک گیاهچه

مرحله	صفات	عرض از مبدا	کربازول	زایلیتول	اسید۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	اسید هگزادکانوئیک	ال ترئونین	اسید گاما آمینوبوتریک	سرعت جوانه‌زنی	اریتریتول	اسید فسفریک	اسید سیتریک	جز ² R ²	مدل ² R
۱	کربازول	*۰/۰۳-	**۰/۱۳										۰/۸۵	۰/۸۵
۲	زایلیتول	*۰/۰۳-	**۰/۱۴	*۰/۰۵-									۰/۰۵۶	۰/۹۲
۳	اسید ۱و۴ بنزن دی- کربوکسیلیک	*۰/۰۴-	**۰/۱۲	*۰/۰۸-	^{ns} ۰/۰۰۶								۰/۰۱۹	۰/۹۷
۴	اسید هگزادکانوئیک	^{ns} ۰/۰۲-	**۰/۱۳	*۰/۱۰-	^{ns} ۰/۰۰۱	^{ns} ۰/۰۴-							۰/۰۴۲	۰/۹۸
۵	ال ترئونین	**۰/۱۲-	**۰/۱۴	**۰/۰۸-	**۰/۰۰۱	**۰/۰۶-	**۰/۰۲						۰/۰۱۳	۰/۹۹
۶	اسید هگزادکانوئیک	**۰/۰۹-	**۰/۱۳	**۰/۱۰-	**۰/۰۰۱	**۰/۰۶-	**۰/۰۲	*۰/۲۴-					۰/۰۰۷	۰/۹۹
۷	سرعت جوانه‌زنی	**۰/۱۳-	**۰/۱۲	*۰/۱۹-	**۰/۰۰۲	**۰/۰۶-	**۰/۰۳	^{ns} ۰/۲۱-	^{ns} ۰/۰۱				۰/۰۰۲	۰/۹۹
۸	اریتریتول	**۰/۱۵-	**۰/۱۲	**۰/۲۴-	**۰/۰۰۲	**۰/۰۵-	**۰/۰۳	**۰/۲۱-	*۰/۰۱	*۰/۰۰۰۲			۰/۰۰۴	۰/۹۹
۹	اسید فسفریک	**۰/۱۴	**۰/۱۱	**۰/۲۳	**۰/۰۰۲	**۰/۰۵-	**۰/۰۳	**۰/۲۷-	**۰/۰۱	**۰/۰۰۰۳	*۰/۰۵-		۰/۰۰۱۵	۱/۰۰
۱۰	اسید سیتریک	**۰/۱۳-	**۰/۱۲	^{ns} ۰/۱۰-	*۰/۰۰۲	**۰/۰۵-	*۰/۰۳	^{ns} ۰/۵۵-	^{ns} ۰/۰۱	*۰/۰۰۰۳	^{ns} ۰/۲۲	^{ns} ۰/۲۲-	۰/۰۰	۱/۰۰

^{ns} و** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول ۴-۱۶ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای میزان پرولین برگ

مرحله	صفات	عرض از مبدا	گلیسین	قطر ساقه‌چه	اریتریتول	اسید اولئیک	اسید پروپانوئیک	گالاکتوز	درصد جوانه‌زنی	گلیسرول	اسید ۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	میواینوزیتول	جز ² R ²	مدل ² R
۱	گلیسین	**۰/۰۴	**۰/۰۸										۰/۸۰	۰/۸۰
۲	قطر ساقه‌چه	^{ns} ۰/۰۱	**۰/۰۸	^{ns} ۰/۰۱									۰/۵	۰/۸۵
۳	اریتریتول	**۰/۰۶-	**۰/۰۵	**۰/۰۶	**۰/۱۹								۰/۱۲	۰/۹۸
۴	اسید اولئیک	**۰/۰۶-	*۰/۱۱	**۰/۰۶	**۰/۲۰	^{ns} ۰/۱۰-							۰/۰۰۴	۰/۹۸
۵	اسید پروپانوئیک	**۰/۰۸-	**۰/۱۴	**۰/۰۶	**۰/۰۲۴	*۰/۱۹-	^{ns} ۰/۰۴						۰/۰۰۵	۰/۹۹
۶	گالاکتوز	*۰/۱۷-	*۰/۳۰	**۰/۰۶	^{ns} ۰/۰۲	^{ns} ۰/۰۶-	^{ns} ۰/۰۳						۰/۰۰۲	۰/۹۹
۷	درصد جوانه‌زنی	**۰/۲۱-	**۰/۴۰	**۰/۰۶	^{ns} ۰/۰۲-	**۰/۹۲	**۰/۰۸	*۰/۰۶	*۰/۰۰۰۴				۰/۰۰۴	۰/۹۹
۸	گلیسرول	**۰/۲۱-	**۰/۴۰	**۰/۰۶	^{ns} ۰/۱۶-	*۰/۸۵	**۰/۰۷	*۰/۰۵	*۰/۰۰۰۴	^{ns} ۰/۰۰۲			۰/۰۰۰۶	۰/۹۹
۹	اسید ۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	*۰/۳۲-	**۰/۵۲	**۰/۰۶	*۰/۳۸-	*۰/۲۲	**۰/۰۸	*۰/۰۹	**۰/۰۰۰۴	^{ns} ۰/۰۰۳	^{ns} ۰/۰۱		۰/۰۰۰۶	۰/۹۹
۱۰	میواینوزیتول	*۰/۳۹-	**۰/۵۷	**۰/۰۶	*۰/۵۷-	*۰/۴۱	*۰/۰۷	*۰/۱۱	*۰/۰۰۰۴	*۰/۰۰۴	*۰/۰۲	^{ns} ۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۱/۰۰

^{ns} و** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

درصد جوانه‌زنی

نتایج حاصل از رگرسیون مرحله‌ای زمانی که صفت درصد جوانه‌زنی بذور کنجد به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد، نشان داد که اریتریتول با همبستگی مثبتی که با این صفت داشت به عنوان اولین متغیر وارد مدل گردید و توانست ۹۲ درصد از تغییرات درصد جوانه‌زنی بذور کنجد را توجیه نماید. به این ترتیب هر گونه تغییر در این متابولیت، تغییرات قابل ملاحظه‌ای را بر درصد جوانه‌زنی خواهد داشت. در مرحله بعدی صفت طول ریشه‌چه وارد مدل گردید و ۰/۰۳ درصد از تغییرات درصد جوانه‌زنی را توجیه نمود. صفت بعدی که در این طرح مشاهده شد وزن خشک گیاهچه بود که توانست ۰/۰۰۷ در تغییرات درصد جوانه‌زنی را توجیه نماید. متابولیت‌های دیگری چون اسید دی گلوکونیک، اسید گاما آمینو بوتریک، اسید بوتادئونیک به طور مجزا در طی مراحل چهار، پنج و شش وارد مدل گردیدند و این صفات در مجموع ۰/۰۰۶ درصد از تغییرات را توجیه نمودند. در مراحل نهایی هفت، هشت و نه صفت قطر ساقه‌چه، کربازول و گلیسین نیز به تفکیک وارد مدل شدند و توانستند به ترتیب ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ درصد از تغییرات درصد جوانه‌زنی را توجیه کنند (جدول پیوست ۸).

سرعت جوانه‌زنی

هنگامی که صفت سرعت جوانه‌زنی بذور کنجد به عنوان متغیر وابسته در این طرح لحاظ گردید، در طی ده مرحله متغیرهای مستقل خود را نمایان کردند. در مرحله نخست والین وارد مدل گردید و ۹۵ درصد از تغییرات سرعت جوانه‌زنی را به خود اختصاص داد. براین اساس می‌توان بیان نمود که هرگونه تغییری در میزان این متابولیت می‌تواند منجر به تغییرات در صفت سرعت جوانه‌زنی گردد. اسید هگزادکانوئیک متابولیت دیگری بود که پس از والین وارد مدل گردید و در مرحله دوم جای گرفت و ۰/۰۲ درصد از تغییرات سرعت جوانه‌زنی را توجیه کرد. صفت طول ساقه‌چه سومین عامل موثر بر سرعت جوانه‌زنی بذور کنجد بود که در طی سومین مرحله در این طرح جای گرفت و ۰/۰۰۸ درصد از تغییرات سرعت جوانه‌زنی را توجیه نمود. در مراحل بعدی گالاکتوز، ال ترئونین و اسید مالیک متابولیت‌های موثر بر این صفت مورفولوژیک بودند که در مجموع توانستند ۰/۰۰۸ درصد از تغییرات سرعت جوانه‌زنی را در طی چهارمین، پنجمین و ششمین مرحله از مدل رگرسیونی توجیه نمایند. صفت قطر ساقه‌چه نیز در مرحله هفت به سایر متغیرهای مستقلی که در مراحل قبل ظاهر شدند پیوست و با همبستگی مثبت با صفت سرعت جوانه‌زنی در بروز تغییرات این صفت موثر واقع گردید و ۰/۰۰۰۸ درصد از تغییرات این صفت را توجیه نمود. اسید گاما آمینوبوتریک، طول ریشه‌چه و

نیز بتا آلانین آخرین متغیرهای مستقلی بودند که در مراحل هشت، نه و ده رونمایی شدند و جز عوامل موثر در تغییرات سرعت جوانه‌زنی قرار گرفتند (جدول پیوست ۹).

طول ساقه‌چه

صفت طول ساقه‌چه نیز همانند سایر صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در این پژوهش به عنوان متغیر وابسته وارد مدل رگرسیون چند مرحله‌ای شد. نتایج حاصل نشان داد که طول ریشه‌چه با همبستگی بالای آن با طول ساقه‌چه به عنوان نخستین متغیر وارد مدل گردید. و به تنهایی توانست ۸۸ درصد از تغییرات طول ساقه‌چه کنجد را در شرایط تنش تعیین نماید. در دومین مرحله اسید آن بوتریک وارد مدل شد و ۰/۰۲ درصد از تغییرات طول ساقه‌چه کنجد توجیه کرد. اسید ۴و۱ بنزن دی کربوکسیلیک سومین ترکیبی بود که در این طرح وارد شد و ۰/۰۱ درصد از تغییرات این صفت مورفولوژیک را توجیه نمود. در مرحله چهارم صفت مورفولوژیک سرعت جوانه‌زنی ۰/۰۵ درصد از تغییرات طول ساقه‌چه را توجیه نمود. پرولین، اسید بوتادینوئیک و گلیسرول به تفکیک در مراحل بعدی (۷و۶و۵) وارد شدند و در مجموع ۰/۰۳۸ درصد از تغییرات ساقه‌چه را توجیه نمودند. اسید بنزوئیک در مرحله پسین جای گرفت. سپس دی مانیتول در مرحله بعدی وارد مدل گردید و در کنار سایر متغیرهای مستقل موثر بر طول ساقه‌چه قرار گرفت و ۰/۰۰۱ درصد از تغییرات طول ساقه‌چه را توجیه کرد (جدول پیوست ۱۰).

قطر ساقه‌چه

قطر ساقه‌چه نیز صفتی دیگر بود که به عنوان متغیر وابسته در این طرح وارد شد، در این هنگام، در طی ده مرحله متغیرهای مستقل خود را نمایان کردند. در مرحله نخست اسید آن بوتریک وارد مدل گردید و ۷۴ درصد از قطر ساقه‌چه را به تنهایی توجیه نمود، بنابراین می‌توان ابراز نمود که هرگونه تغییری در میزان این متابولیت می‌تواند منجر به تغییرات در صفت قطر ساقه‌چه گردد. ۴و۲ پنتادینیتریل متابولیت دیگری بود که پس از اسید آن بوتریک وارد مدل گردید و ۰/۱۲ درصد از تغییرات این صفت وابسته را توجیه نمود. آن بوتیل آمین سومین عامل موثر بر قطر ساقه‌چه کنجد بود که در طی سومین مرحله توانست ۰/۰۱ درصد از تغییرات آن را توجیه نماید. در مراحل بعدی اسید بتا آمینوبوتریک، گالاکتوز و سیلانامین لووگلوکوزان متابولیت‌های موثر بر این صفت مورفولوژیک بودند که توانستند در طی چهارمین، پنجمین، ششمین و هفتمین مرحله، وارد مدل شدند و توانستند در مجموع ۰/۰۱۲ درصد از تغییرات این صفت مورفولوژیک را توجیه نمایند. صفت وزن خشک گیاهچه نیز در مرحله هشت به جمع متغیرهای مستقلی که

در مراحل قبل ظاهر شدند و تغییرات قطر ساقه چه را توجیه نمود. اسید اولئیک، آخرین متغیر مستقلی بود که در آخرین مرحله وارد شد و جز عوامل موثر در تغییرات این صفت مورفولوژیک به حساب آمد (جدول پیوست ۱۱).

۴-۶ بیان ژن

پس از استخراج متابولیت‌های برگ گیاهچه کنگد در مرحله ۴ برگ‌گی و شناسایی نوع متابولیت‌ها، باتوجه به تفاوت دو ژنوتیپ در تولید برخی متابولیت‌ها از قبیل پرولین، میواینوزیتول و اسیدهای فنولیک و نیز نقش مهمی که این متابولیت‌ها در تحمل تنش در گیاهان دارند، بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منو فسفاتاز، فنیل آلانین آمونیالیز ۱ و همچنین ژن همیشه بیان بتا اکتین در دو ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی و حساس عراقی در سه تکرار و نیز در شرایط عدم تنش (شاهد) و تنش ۱۵۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج حاصل از آن‌ها در ذیل به تفکیک آورده شده است.

۴-۶-۱ ژن بتا اکتین

ژن بتا اکتین (به عنوان ژن رفرنس) از گیاه کنگد (شاکری و همکاران، ۱۳۹۳ و وی و همکاران، ۲۰۱۲) پس از انجام ۳۰ سیکل PCR در دمای ۵۸° تکثیر گردید (شکل ۴-۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کمی کردن بیان ژن بتا اکتین با استفاده از نرم افزار Image J در گیاهچه دو ژنوتیپ متحمل و حساس (زودرس × پاکستانی و عراقی) در پاسخ به تنش شوری در جدول ۴-۱۷ آورده شده است. نتایج نشان داد که بین میزان بیان ژن بتا اکتین در دو ژنوتیپ مورد مطالعه در شرایط مختلف عدم تنش و تنش ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.



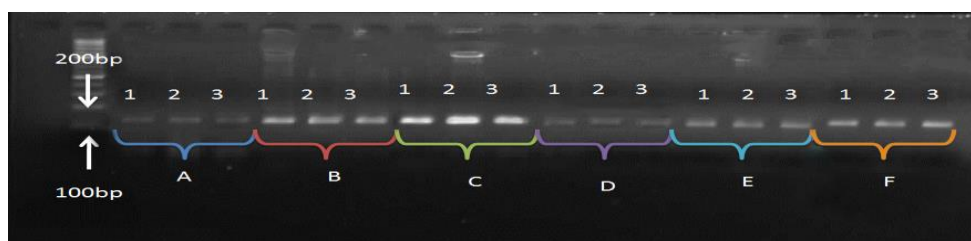
شکل ۴-۲: بررسی بیان ژن همیشه بیان بتا اکتین، الگوی باندی حاصل از محصولات PCR (۳۰ سیکل) با پرایمرهای ژن بتا اکتین بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۱۵ جفت باز می‌باشد. A ژنوتیپ متحمل (شاهد)، B ژنوتیپ حساس (شاهد)، C ژنوتیپ متحمل (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl)، D ژنوتیپ حساس (۱۵۰ میلی‌مولار NaCl)، E ژنوتیپ متحمل (۲۰۰ میلی‌مولار NaCl)، F ژنوتیپ حساس (۲۰۰ میلی‌مولار NaCl).

جدول ۴-۱۷ تجزیه واریانس میزان بیان ژن بتا اکتین در برگ کنبجد دو ژنوتیپ زودرس × پاکستانی و عراقی تحت تنش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تنش	۲	۰/۱۶ ^{ns}
خطای اول	۶	۰/۱۱
ژنوتیپ	۱	۰/۰۵۵ ^{ns}
تنش × ژنوتیپ	۲	۰/۰۵۵ ^{ns}
خطا	۶	۰/۲۲
ضریب تغییرات (درصد)		۰/۶۵۳

۴-۶-۲ ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز

ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز پس از انجام ۳۵ سیکل PCR در دمای ۵۴° تکثیر گردید (شکل ۴-۳). نتایج حاصل نشان می‌دهد که اثر متقابل تنش در ژنوتیپ در سطح ۱ درصد بسیار معنی‌دار شد (جدول ۴-۱۸). نتایج مقایسه میانگین بین دو ژنوتیپ حاکی از آن بود که میزان بیان ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز در تنش ۲۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۴-۲۱) و بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل از نظر بیان این ژن تفاوت چشمگیری مشاهده گردید به طوریکه افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ زودرس × پاکستانی در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار نه تنها بیشتر از ژنوتیپ عراقی در تنش‌های ۲۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار و شرایط عدم تنش بود بلکه نسبت به تنش ۱۵۰ میلی‌مولار بیان بیشتری داشت (شکل ۴-۳). این نتایج نشان می‌دهد که مقدار پرولین در گیاهچه کنبجد تحت شرایط تنش با افزایش سطوح تنش، افزایش می‌یابد (جدول ۴-۲۱).



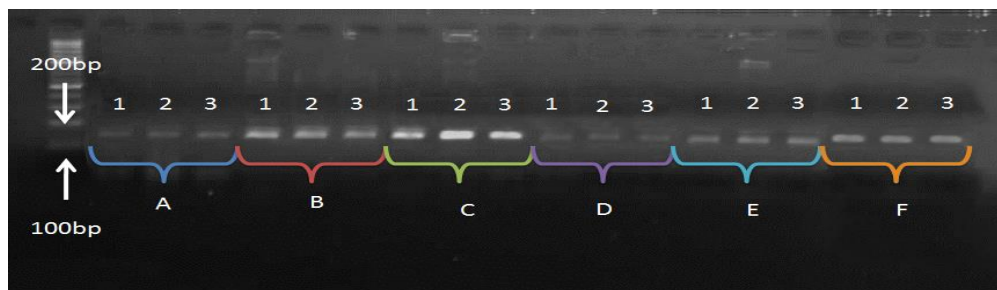
شکل ۴-۳ بررسی بیان ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز. الگوی باندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۰۰ جفت باز می‌باشد. A ژنوتیپ متحمل (شاهد)، B ژنوتیپ متحمل (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، C ژنوتیپ متحمل (۲۰۰ میلی مولار NaCl)، D ژنوتیپ حساس (شاهد)، E ژنوتیپ حساس (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، F ژنوتیپ حساس (۲۰۰ میلی مولار NaCl).

جدول ۴-۱۸ تجزیه واریانس میزان بیان ژن پیرولین ۵ کربوکسیلاز سنتتاز در برگ کنجد دو ژنوتیپ زودرس × پاکستانی و عراقی تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تنش	۲	۴۹۸۶۳/۵**
خطای اول	۶	۰/۱۶
ژنوتیپ	۱	۲۷۹۲۶/۷**
تنش × ژنوتیپ	۲	۸۸۰۱/۷**
خطا	۶	۱/۳۸
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۰۲

۴-۶-۳ اینوزیتول منوفسفاتاز (IMP)

قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FMLPS1, FMLPS2 در این پایان نامه قطعه‌ای به طول ۱۴۸ باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از ۳۵ سیکل PCR در دمای ۵۲° و تکثیر این ژن برای گیاهچه‌های مورد بررسی در شکل ۴-۴ آورده شده است. مقایسه میانگین، ژن اینوزیتول منو فسفاتاز در گیاهان، در شرایط مختلف تنش ۲۰۰ میلی مولار و ۱۵۰ میلی مولار و نیز شرایط عدم تنش ذکر شده است (جدول ۴-۲۱).



شکل ۴-۴: بررسی بیان ژن میواینوزیتول منو فسفاتاز. الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن میواینوزیتول منوفسفات سنتتاز بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۴۸ جفت باز می‌باشد. A ژنوتیپ متحمل (شاهد)، B ژنوتیپ متحمل (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، C ژنوتیپ متحمل (۲۰۰ میلی مولار NaCl)، D ژنوتیپ حساس (شاهد)، E ژنوتیپ حساس (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، F ژنوتیپ حساس (۲۰۰ میلی مولار NaCl).

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در گیاهچه‌های کنجد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴-۱۹). اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نیز بسیار معنی‌دار شد و بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس و نیز شرایط تنش ۱۵۰، ۲۰۰ میلی مولار نمک و شاهد از نظر بیان ژن اینوزیتول منو فسفاتاز، تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن اینوزیتول منو فسفاتاز در ژنوتیپ زودرس × پاکستانی و در تیمار ۲۰۰ میلی-

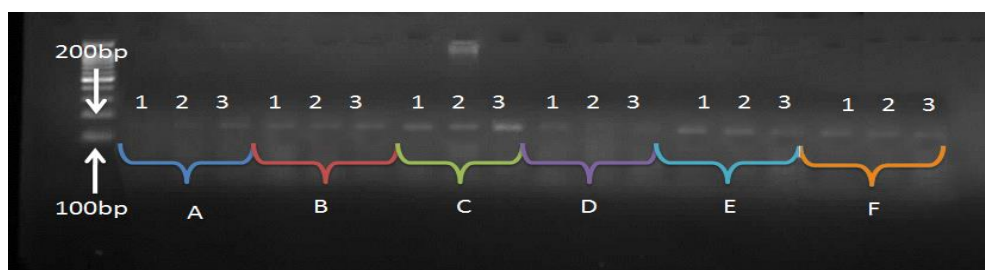
مولار بیشترین مقدار بود. کمترین میزان بیان این ژن نیز در شرایط عدم تنش در هردو ژنوتیپ به چشم خورد. با توجه به این نتایج مشخص شد که ژنوتیپ عراقی در تیمار ۱۵۰ میلی مولار نمک، بیشتر از همین ژنوتیپ در تنش ۲۰۰ میلی مولار نمک این ژن را بیان نمود (جدول ۴-۲۱).

جدول ۴-۱۹ تجزیه واریانس میزان بیان ژن اینوزیتول منو فسفاتاز، در برگ کنگد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تنش	۲	۳۶۹۰۹/۵**
خطای اول	۶	۱/۵۵
ژنوتیپ	۱	۲۷۹۲۶/۷**
تنش X ژنوتیپ	۲	۸۷۶۰/۳**
خطا	۶	۱/۷۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۳۲

۴-۶-۴ ژن فنیل آلانین آمونیا لیازا (PAL)

ژن فنیل آلانین آمونیا لیازا ۱ در گیاهچه کنگد توسط پرایمر FPAL1 با طول ۱۴۷ باز طی ۳۵ سیکل PCR تکثیر گردید. الگوی بانندی این ژن در شکل ۴-۵ آورده شده است.



شکل ۴-۵: بررسی بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیازا ۱. الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن فنیل آلانین آمونیا لیازا ۱، بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۴۷ جفت باز می باشد. A ژنوتیپ متحمل (شاهد)، B ژنوتیپ متحمل (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، C ژنوتیپ متحمل (۲۰۰ میلی مولار NaCl)، D ژنوتیپ حساس (شاهد)، E ژنوتیپ حساس (۱۵۰ میلی مولار NaCl)، F ژنوتیپ حساس (۲۰۰ میلی مولار NaCl).

نتایج حاصل نشان می دهد که میزان بیان این ژن در گیاهچه های کنگد در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۴-۲۰). اثر متقابل تنش در ژنوتیپ نیز بسیار معنی دار شد و بین ژنوتیپ های متحمل و حساس و نیز شرایط

تنش ۱۵۰، ۲۰۰ میلی مولار نمک و شاهد از نظر بیان ژن PAL1 تفاوت قابل ملاحظه‌ای به چشم خورد (شکل ۴-۵). نتایج نشان داد که ژنوتیپ زودرس X پاکستانی در تیمار ۲۰۰ میلی مولار NaCl بیشترین میزان بیان را داشت و هر دو ژنوتیپ در شرایط عدم تنش این ژن را بیان نکردند (جدول ۴-۲۱). این نتایج مشخص کرد که هیبرید زودرس X پاکستانی در تیمار ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم بیشتر از ژنوتیپ عراقی در تنش ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک این ژن را بیان نمود (جدول ۴-۲۱)

جدول ۴-۲۰ تجزیه واریانس میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL1) در برگ کنگد دو ژنوتیپ زودرس X پاکستانی و عراقی تحت تنش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تنش	۲	۱۳۲۳۲/۸**
خطای اول	۶	۱/۸۸
ژنوتیپ	۱	۶۹۶۲/۰**
تنش * ژنوتیپ	۲	۲۴۰۲/۰**
خطا	۶	۰/۶۶
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۵۰

جدول ۴-۲۱ اثر متقابل تنش در ژنوتیپ برای ژن‌های مورد بررسی

تیمار	ژنوتیپ	پیرولین ۵	اینوزیتول منوفسفات	فنیل آلانین آمولیاژ ۱
کربوکسیلات سنتتاز				
شاهد	زودرس پاکستانی	۱۰ ^e	۱۰ ^e	۰ ^e
	عراقی	۱۰ ^e	۱۰ ^e	۰ ^e
۱۵۰ میلی	زودرس پاکستانی	۲۰۰/۶ ^b	۱۸۶/۰ ^b	۱۰۱/۳ ^b
مولار NaCl	عراقی	۹۹/۰ ^d	۷۰/۶۶ ^d	۶۳/۰ ^c
۲۰۰ میلی	زودرس پاکستانی	۲۵۲/۲ ^a	۲۲۳/۳ ^a	۱۲۰/۶ ^a
مولار NaCl	عراقی	۱۱۷/۳ ^c	۱۰۳/۳ ^c	۴۰/۶ ^d
LSD		۴/۰۶	۴/۶۴	۲/۸۱۱

فصل پنجم

بحث و پیشهادات

تنش‌های محیطی می‌توانند باعث تغییر در ساختار سلولی و اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه گردند. پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی (زنده و غیر زنده) از جمله شوری پیچیده می‌باشد و می‌تواند در سه گروه هم‌ایستایی (هموستازی)^۱، سمیت زدایی، کنترل ریشه خلاصه گردد. پاسخ هم‌ایستایی شامل فعالیت‌هایی است که به بازگشت تعادل یونی و اسمزی در سلول‌های گیاهی کمک می‌کند. سمیت زدایی شامل القا متابولیت‌ها و پروتئین‌های مرتبط با تنش است که تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند و همچنین افزایش میزان بیان پروتئین‌هایی است که به بازیابی و حذف ساختارهای پروتئین‌های تغییر ماهیت داده^۲ کمک می‌کند. کنترل ریشه به هماهنگی نرخ تقسیم، گسترش سلول جهت سازش‌پذیری به تنش اشاره دارد. درک شبکه‌های پیچیده و اساسی تحمل به تنش شوری و خشکی محصولات کشاورزی و همچنین تلاش در جهت اصلاح پس از شناخت مکانیسم‌های تحمل با هدف بهبود گیاهان با ماهیت صفات پلی‌ژنیک و تنوع گسترده زیست محیطی مرتبط با آن‌ها کاری بسیار دشوار است. یکی از روش‌های درک بهتر این پیچیدگی‌ها، جستجو در پروفایل متابولیکی سلول‌ها و بافت‌ها است. در این مطالعه پایه‌های تحمل به تنش از طریق رویکرد پروفایل متابولیکی گیاهچه کنجد و شناسایی محصولات و نیز توانایی آن‌ها جهت حفظ رشد و تولید رضایت‌بخش تحت تنش، مورد بررسی قرار گرفتند (هیل و همکاران، ۲۰۱۵).

همان‌طور که در فصل قبل ذکر شد، تنش شوری موج کاهش رشد گیاهچه‌های مورد بررسی شد و صفات مورفولوژیک مورد مطالعه کاهش چشمگیری نشان دادند که با توجه به مطالعات انجام شده مشخص شده است که صفاتی چون جوانه‌زنی بذور، پدیده پیچیده مشتمل بر تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی است که حاصل فعال شدن جنین است. در واقع جوانه‌زنی شامل انتقال مواد ذخیره‌ای به محور جنین و شروع فعالیت‌های متابولیکی و رشد آن است. برای شروع فعالیت‌های متابولیکی بذور برای جوانه‌زنی ضروری است که ابتدا میزان معینی آب توسط آن‌ها جذب گردد. پس از آب‌گیری هورمون‌هایی که بافت‌های هدف را تحت تاثیر قرار می‌دهند، ترشح می‌شوند، و در بافت ذخیره‌ای فعالیت‌های آنزیمی، موجب انتقال مولکول‌های هیدرولیز شده به محور جنین، افزایش تنفس و ساخت مواد اولیه می‌گردند. پس از آن شروع تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول‌ها، پاره شدن پوسته بذر و در نهایت حضور ریشه‌چه رخ می‌دهد. از دیدگاه فیزیولوژیکی اثرات منفی شوری بر جوانه‌زنی و سبز شدن بذور ممکن است در ابتدا به علت کاهش پتانسیل اسمزی در اثر شوری باشد و بذور قادر به جذب آب کمتری باشند (مسرت و همکاران، ۱۳۹۲). به طور کلی درصد و سرعت جوانه زنی بذر رابطه خطی مستقیم با فراهمی آب دارد، لذا در صورت وقوع تنش شوری و خشکی جوانه زنی و متعاقب با آن

^۱Homoestasis^۲Denatoatuvd protien

رشد گیاهچه به شدت کاهش می‌یابد (دادخواه، ۱۳۸۸). کاهش جوانه زنی و رشد گیاهچه در شرایط شوری ممکن است علاوه بر پتانسیل اسمزی پایین و به مخاطره افتادن جذب آب، به دلیل سمیت یون‌های Na^+ و Cl^- یا عدم تعادل عناصر غذایی باشد. پاسخ گیاهان به تنش شوری شباهت زیادی به پاسخ آنها به تنش خشکی دارد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۵). به نظر می‌رسد که علت تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف کنبه در افزایش طول ریشه‌چه به توانایی ژنتیکی آنها در تغییر این صفت، جهت افزایش تحمل به شوری بوده‌است. در همین راستا ژنوتیپ‌هایی که توانایی تولید ریشه طویل و گسترده‌تر را دارند، نسبت به ژنوتیپ‌های فاقد این توانایی در تحمل تنش موفق‌ترند (بیجه کشاورزی و همکاران، ۱۳۸۹).

پس از بررسی صفات مورفولوژیک در مرحله ۴ برگگی و مشخص نمودن ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، جهت استخراج متابولیت‌ها از برگ‌های آنان و نیز مطالعه مقایسه‌ای متابولیت‌های تولیدی توسط گیاهچه‌های کنبه در مرحله ۴ برگگی، دو ژنوتیپ عراقی (حساس) و زودرس $\times$ پاکستانی (متحمل) در ۳ تکرار انتخاب گردیدند و توسط دستگاه GC-MS مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور کنبه، معیار مناسبی جهت شناسایی ژنوتیپ متحمل و حساس به تنش شوری نبودند، به طوریکه برخی از ژنوتیپ‌ها در مرحله جوانه‌زنی حساس به تنش بودند، اما در مرحله گیاهچه‌ای در زمره گیاهان متحمل به تنش شوری قرار گرفتند. لذا در این مطالعه از این دو صفت مورفولوژیک جهت شناسایی ژنوتیپ حساس و متحمل مورد استفاده قرار نگرفت. پس از شناسایی ژنوتیپ متحمل و حساس از طریق سایر صفات مورفولوژیک مورد مطالعه و استخراج متابولیت‌ها، نتایج استخراج متابولیت‌ها مشخص کرد که متابولیت‌ها مربوط به ترکیباتی از گروه‌های کربوهیدرات‌ها، گروه‌های قندهای الکلی و مشتقات آن، گروه‌های اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب و فنولیک، اسیدهای آلی، استرها و مشتقات آنها بودند که در ذیل به تفکیک این گروه‌ها شرح داده شده است.

۵-۱ قندها

کربوهیدرات مشاهده شده در این پژوهش شامل گلوکز، فروکتوز، لوگلوکوزان، آلفا گلوکوپیرانوزید و نیز گالاکتوز بود. نتایج حاصله نشان داد، تحت تنش شوری این کربوهیدرات‌ها کاهش یافتند، تنها آلفا گلوکوپیرانوزید و گالاکتوز در هنگام تنش شوری، افزایش یافتند. مطالعات انجام شده بر روی میزان قندهای محلول در هنگام تنش متفاوت است. برخی از مطالعات افزایش و برخی کاهش مقدار گلوکز و فروکتوز را نشان می‌دهند، کاهش این ترکیبات در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل کنبه مورد بررسی، می‌تواند در جهت افزایش ساکارز رخ داده باشد. پیترسون و همکاران (۲۰۰۹) و

گهلوت (۲۰۰۵) نیز کاهش این متابولیت‌ها را در گیاهان مختلف و کنگد، هنگام مواجهه با تنش شوری، گزارش نمودند. مطالعات متعددی از جمله پژوهش ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۳۸۴) و تادن و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر افزایش گالاکتوز در گیاهان در معرض تنش، وجود دارد. نتایج این پژوهش نیز مطالعات گذشته را تایید نمود و در راستای آنان قرار گرفت.

کربوهیدرات‌ها در گیاهان نقش‌های زیادی را ایفا می‌کنند، در ذیل به بررسی این متابولیت‌ها و نقش آن‌ها در گیاهان در شرایط تنش و عدم تنش پرداخته شده است.

بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داده است که در گیاهان تحت تنش شوری، مواد محلول با وزن مولکولی کم، که مواد محلول سازگار نامیده شده و به عنوان سازگار کننده عمل می‌کنند و در گیاهان تجمع پیدا می‌کنند. از این بین، قندهای محلول به عنوان گروهی از محلول‌های سازگار در تنش شوری تجمع می‌یابند و به عنوان عامل یا محافظ اسمزی عمل می‌کنند. این قندها با افزایش در اسمولاریته سلولی منجر به نفوذ آب به داخل سلول و در نتیجه حفظ تورژسانس لازم برای گسترش سلول می‌شوند که در این بین می‌توان به گلوکز، فروکتوز و ساکارز اشاره کرد (پرویز و همکاران، ۲۰۰۸). در برخی از مطالعات نشان داده شده است که افزایش قند محلول ممکن است به دلیل شکستن و تبدیل قندهای بزرگتر (نشاسته) به قندهای کوچکتر (گلوکز) باشد. افزون بر این، کاهش مصرف قند به دلیل کاهش فتوسنتز در طی تنش شوری نیز می‌تواند عامل دیگری برای افزایش غلظت قندهای محلول در سلول باشد (پرویز و همکاران، ۲۰۰۸). نوسانات مقدار قند محلول تحت تنش غیر زنده نیز شامل تغییرات در جذب CO_2 ، ذخیره سازی کربن، تغییر در فعالیت آنزیم‌های مرتبط و نیز بیان ژن خاص می‌باشد. کربوهیدرات‌ها منبع اصلی انرژی محسوب می‌شوند و به وفور در گیاهان وجود دارند و نقش ساختمانی و همچنین متابولیسمی را بر عهده دارند. قندها نقش مهمی در انتقال مولکول کربن ایفا می‌کنند. در میان کربوهیدرات‌های گوناگون، قند گلوکز، با توجه به اعمال فیزیولوژیکی بسیاری که دارد، از اهمیت به سزایی برخوردار است (اپل و همکاران، ۲۰۱۴). در گیاهان گلوکز از راه واکنش‌های فتوسنتز از CO_2 و H_2O ساخته شده و بصورت نشاسته ذخیره می‌گردد و یا اینکه به شکل سلولز در ساختمان چارچوب پیکره‌های گیاهی شرکت می‌نماید. همچنین گلوکز در ساختمان برخی چربی‌های مرکب (گلیکولیپیدها)، همراه با پروتئین‌ها در ترکیب گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها شرکت می‌نماید. تجمع کربوهیدرات محلول در گیاهان به طور گسترده‌ای به عنوان پاسخ به شوری و خشکی به رغم کاهش قابل توجهی در سرعت جذب خالص CO_2 در برخی گیاهان گزارش شده است. کربوهیدرات‌ها نظیر قندهای گلوکز، فروکتوز، ساکارز، و نشاسته تحت

تنش شوری، نقش پیش ماده ترکیبات موثر در تنظیم اسمزی، ذخیره‌سازی کربن و مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (چو و همکاران، ۲۰۱۱). گلوکز به عنوان منبع انرژی، تنظیم کننده اسمزی و نیز به عنوان مولکول پیام رسان قوی می‌باشد که بیان ژن و کنترل رشد و توسعه موجودات را تنظیم می‌کند (چاندنا و همکاران، ۲۰۱۳). در گیاهان گلوکز، ساکارز و ترهالوز ۶ فسفات، عملکردی به عنوان مولکول‌های سیگنالی سلولی در مسیرهای تنظیم‌کنندگی خاص موثر بر رشد و توسعه گیاه دارند. در میان بسیاری از متابولیت‌های قندی گیاهان، پیام رسانی گلوکز، بیشترین توجه را به خود جلب کرده است. اگرچه فروکتوز نیز یک هگزوز با وفور نسبی بالایی است اما نقش پیام رسانی آن در رشد و توسعه گیاهان هنوز به طور کامل و سیستماتیک مورد توجه قرار نگرفته است (چن و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعاتی مشخص شد که فروکتوز به عنوان تنظیم کننده متابولیت‌های قندی عمل می‌کند و با سیگنالینگ هورمون‌های گیاهی مانند اسید آسزیک و اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس در تعامل است. همچنین فروکتوز به عنوان پیش ماده سنتز لیگنین‌ها و ترکیبات فنولی عمل می‌کند. این قندها در برخی از فعل و انفعالات انتقال پیام تنش‌های گیاهی و هورمون‌های دفاعی و هماهنگی و استقرار اولیه گیاهان به صورت مشترک عمل می‌کنند (شولر و همکاران، ۲۰۰۸). فسفاتاز تریوز ساخته شده توسط فعالیت‌های فتوسنتزی در کلروپلاست ذخیره می‌شوند و یا از طریق برخی از واکنش‌های آنزیمی توسط فروکتوز ۶۱ بیس فسفاتاز، UDP گلوکز پیروفسفریلاز، ساکارز فسفات سنتتاز و ساکارز فسفاتاز به ساکارز در سیتوپلاسم تبدیل می‌گردد (شکل پیوست ۳-۱)، (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴) ساکارز در واکوئل ذخیره می‌شود و در اثر شکستن به گلوکز و فروکتوز توسط اینورتاز یا UDP گلوکز یا فروکتوز سنتتاز تبدیل می‌شود (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸).

گالاکتوز نیز از دیگر قندها محسوب می‌شود که می‌تواند بطور مستقیم (در ترکیبات رافینوزی) یا غیر مستقیم (به عنوان پیش‌ماده بعضی ترکیبات) در شرایط تنش، در مکانیسم‌های تحمل گیاه نقش دارد (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴). این ترکیب می‌تواند به عنوان پیش ماده (پیشرو) مؤثر آل-آسکورات که به فراوانی در گیاهان در غلظت ۱ تا ۵ میلی مولار در برگ‌ها و ۲۵ میلی مولار در کلروپلاست‌ها وجود دارد، استفاده شود. وجود آسکورات بالا در گیاه می‌تواند نقش افزایش تحمل گیاه به شرایط تنش را ایفا می‌نماید. آسکورات به طور مستقیم رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپر اکسید را حذف و H_2O_2 را به کمک آنزیم آسکورات پراکسیداز به آب احیا می‌کند ($2H_2O_2 + H_2R \rightarrow 2H_2O$). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه *Ajuga reptans*، از خانواده نعنائیان، انجام شده است، مشخص شد که گالاکتوز به (+ R) در مقدار بالای الیگوساکاریدهای خانواده رافینوزی (RFO) در برگ‌های این گیاه، نقش دارد. در صورتی که نشاسته و ساکارز مقدار جزئی را در برگ‌ها تشکیل می‌دهند (پرویز و همکاران، ۲۰۰۸). بیوسنتز رافینوز با تشکیل

گالاکتینول از میواینوزیتول و UDP گالاکتوز توسط گالاکتینول سنتتاز انجام می‌گردد (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵). در تیمار سرما، گیاهان مقدار قندهای غیرساختاری را تا ۱۰ برابر (بخاطر افزایش RFO)، افزایش می‌دهند. گیاه حسن یوسف (*Coleus blumei* Benth) در ده روز اول تیمار تنش شوری، کاهش شدیدی در میزان رشد و فتوسنتز نشان می‌دهد که بعد از چند روز بهبود می‌یابد. چنین الگوئی از کاهش زودگذر برای نشاسته در بافت برگ سبز هم مشاهده می‌شود (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴ و اپل و همکاران، ۲۰۱۴). کاهش سطح نشاسته با ظهور چندین قند تازه از جمله الیگوساکاریدهای خانواده رافینوزی و اینوزیتول متیله شده در گیاه همراه تنش می‌شود. فعالیت آنزیم‌های ترانسفرازی مربوطه با تنش شوری القا می‌گردد. آنالیز شیریه سلولی نشان داد که در شرایط تنشی مقدار بیشتری از ساکارز و اینوزیتول متیله نسبت به RFO منتقل می‌شوند. مسیر اصلی متابولیسم گالاکتوز از ۲ مرحله تشکیل شده است که طی آن بتا گالاکتوز به UDP گلوکز تبدیل می‌شود. مرحله اول واکنش، تبدیل بتا گالاکتوز به آلفا گالاکتوز است. پس از آن آلفا گالاکتوز در سه مرحله و توسط سه آنزیم اصلی گالاکتوزیناز، گالاکتوز-۱ فسفات، اوریدیل ترانسفراز، به UDP گلوکز تبدیل می‌شود (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴).

در اثر استخلاف قندها با سایر ترکیبات بیولوژیکی برخی از مشتقات قندها که دارای اهمیت زیستی بالایی هستند، حاصل می‌شود که می‌توان به قندهای آمین‌دار، استرهای فسفریک قند، دزاکسی قندها، قندهای اسیدی، قندهای الکلی، گلایکوسایدها اشاره کرد.

۵-۱-۱ قندهای الکلی یا پلی‌ال‌ها

پلی‌ال‌هایی از قبیل میواینوزیتول، دی‌مانیتول، سوربیتول و گلیسرول در بین متابولیت‌های دو ژنوتیپ مشاهده شد. نتایج موجود در این پژوهش بیان نمود که میواینوزیتول در هنگام مواجهه با تنش شوری در بین دو ژنوتیپ متحمل و حساس افزایش یافت و ژنوتیپ متحمل قادر به تولید میزان بیشتری بود. این نتایج با نتایج مطالعه ماجی (۲۰۰۷) و نیز پاولی و همکاران (۲۰۰۵) و ماجیو (۲۰۰۲) که افزایش میواینوزیتول را در برنج، توتون، تنباکو و نیز سورگوم بیان نمودند، همسو بود و آن‌ها را تایید نمود. ژنوتیپ متحمل در این مطالعه از دی‌مانیتول و سوربیتول بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس در برخورد با تنش شوری برخوردار بود، پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، ماجی و همکاران (۲۰۰۴) و کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، همانند نتایج این پژوهش، افزایش دی‌مانیتول و سوربیتول را در گیاهان گزارش نمودند. همچنین نتایج این مطالعه با نتایج چن و همکاران (۲۰۰۹)، مبنی بر افزایش متابولیت‌هایی مانند گلیسرول در

هنگام بروز تنش شوری در گیاهان و نقش آن‌ها در تحمل تنش در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش، در یک راستا قرار گرفت.

پلی‌ال‌ها که از قندهای کتوز یا آلدوز تولید می‌شوند، نقش بسزایی در انتقال کربن در گیاهان دارند. قندهای الکلی یا پلی‌ال‌ها ترکیباتی حاوی گروه عاملی هیدروکسیل متعدد برای واکنش‌های آلی هستند. آن‌ها را می‌توان به گروه‌های چرخه‌ای (پنیتول) و بدون چرخه‌ای مانند مانیتول تقسیم کرد (شن و همکاران، ۱۹۹۹). در شرایط تنش پلی‌ال‌هایی مانند پنیتول، میواینوزیتول، مانیتول برای بقا گیاهان تجمع می‌یابند. پلی‌ال‌ها، عمدتاً به عنوان املاح سازگار، چپرون-هایی با وزن مولکولی کم و به عنوان رفتگران ROS های تولیدی عمل می‌کنند. علاوه بر این پلی‌ال‌ها با پروتئین‌ها و آنزیم‌های غشاء‌ها برای حفاظت ساختارهای سلولی در پیام‌رسانی در تعامل هستند. این ترکیبات در برقراری ثبات در مولکول‌ها و مهار رادیکال‌های آزاد نقش دارند، در نتیجه منجر به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو غشاء و آنزیم‌ها می‌گردند (چن و همکاران، ۲۰۰۹).

اینوزیتول‌ها

اینوزیتول‌ها پلی‌ال‌هایی از سیکلو هگزان‌ها می‌باشند که از ایزومرهای فضایی آن می‌توان به میواینوزیتول، پدیکوراینوزیتول، سیکلو اینوزیتول، موکواینوزیتول، نئواینوزیتول اشاره کرد. میو اینوزیتول مقدمه ساخت چهار ایزومر دیگر است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). اینوزیتول‌ها در رشد عمومی گیاه، ذخیره سازی دانه، تثبیت نیتروژن و حفاظت از گیاهان در طول تنش اهمیت زیادی دارند. متابولیسم و نقش آن‌ها در فتوسنتز، سلامت گیاه و در افزایش پتانسیل در عملکرد پیچیده است، اما اکتشافات جدید می‌تواند به بهبود عملکرد در آینده منجر شود. نقش اینوزیتول در تثبیت نیتروژن پیچیده است و در حال حاضر کاملاً درک نشده است (دوناهو و همکاران، ۲۰۱۰). این ماده متابولیت مهم سلولی است که اساس ساختاری تعدادی از مولکول‌های سیگنالی لیپیدی است که در مسیرهای گوناگون عمل می‌کند و شامل پاسخ تنظیم مرگ سلولی، بیوسنتز دیواره سلولی و سنتز اسید آسبیزیک است (سکسنا و همکاران، ۲۰۱۳). در بررسی متابولیسم اینوزیتول‌ها، مشخص شد که با تنظیم اسمزی در تنش شوری در گونه‌های مختلف مرتبط است و به عنوان مسیر عمده برای متابولیسم کربن در مراحل اولیه تطابق با تنش در نظر گرفته شده است (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵). اثرات بهبود بخش کلسیم در حفظ رشد در شرایط قلیایی و تمایز کانال‌های یونی القا شده توسط کلسیم نسبت به سدیم مدت‌های زیادی است که شناخته شده است (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). علاوه بر اثر آن در جلوگیری از ورود سدیم به سلول، کلسیم به عنوان عنصری پیام‌رسان، در پیام‌رسانی تنش شوری عمل می‌کند. نوسانات کلسیم

سیتوزولی در طول تنش نمک از طریق فعالیت‌های حساس به نیروهای مکانیکی و کانال‌های لیگاندی کلسیم در غشاء پلاسمایی شبکه آندوپلاسمی و واکوئلی تنظیم می‌شود. مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که کانال‌های باز شونده توسط اینوزیتول تری فسفات در تنظیم اثرات در طول تنش نمک نقش دارند (ماجی و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، اینوزیتول تری فسفات نقشی حیاتی در نوسانات کلسیم سیتوزولی در طول پیام‌رسانی تنش سرما و نمک بازی می‌کند. همچنین تنش قلیائیت به ساخت هورمون تنش گیاهی یعنی اسید آبسزیک و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر می‌شود. کلسیم و یا پراکسید هیدروژن به عنوان پیامبران ثانویه بسته شدن روزنه‌ای ناشی از اسید آبسزیک و بیان ژن تحت تنش‌های غیر زیستی عمل می‌کنند (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱).

ژن درگیر در آرابیدوپسیس وجود دارد که پروتئین میواینوزیتول فسفاتاز را کد می‌کند (MIPS1-3) و ژن کد کننده اینوزیتول منو فسفاتاز در مسیر سنتز میواینوزیتول دارای نقش مهمی است. ژن‌های مشابه اینوزیتول منو فسفاتاز در گیاهان گزارش شده است. در آرابیدوپسیس دو ژن IMPL1, IMPL2 (Inositol monophosphate lik) مشابه اینوزیتول منو فسفات عمل می‌کند. در واقع میواینوزیتول محصول آنزیمی MIPS است که توسط ژن INEL یا INPS1 کد می‌شود و نقش کلیدی در انتقال یون سدیم بازی می‌کند و بستری برای تولید پنیلیل است. در مطالعاتی مشخص شد که آنزیم میواینوزیتول فسفاتاز توسط دو ژن cam_{1ps1} , cam_{1ps2} کد گذاری شده است (ماجی و همکاران، ۲۰۰۷). اینوزیتول در مسیرهای اسید گلوکورونیک و پنتوز فسفات درگیر است. اولین گام در بیوسنتز میواینوزیتول تبدیل دی-گلوکز ۶ فسفات به ۱ ال-میواینوزیتول ۱ فسفات می‌باشد. پس از آن آنزیم‌های میواینوزیتول فسفات سنتتاز و میواینوزیتول کیناز وارد عمل می‌شوند و ۱ ال-میواینوزیتول ۱-فسفات را به میواینوزیتول تبدیل می‌کنند. در مسیر اکسیداسیون میواینوزیتول تولید شده در مسیر بیوسنتز به دی-گلوکورونیک اسید تبدیل می‌شود که در سیر تکامل از واحدهای ارونوزیل و پنتوزیل از پکتین، همی سلولز و سازه‌های مرتبط در دیواره سلول‌های گیاهی نقش دارد و چگونگی انجام آن به این شکل است که دی-گلوکز ۶-فسفات به اینوزیتول تری فسفات تبدیل می‌شود و سپس آنزیم میواینوزیتول منو فسفات سنتتاز وارد عمل می‌شود و میواینوزیتول تولید می‌شود (نوربخش و همکاران، ۲۰۱۴). طی عمل اکسیداسیون به دی-گلوکورونیک اسید تبدیل می‌شود و سپس فسفریلاسیون در کربن شماره ۱ رخ می‌دهد و توسط آنزیم اوریدیل لیل ترانسفراز به UDP-d-galactose تبدیل می‌شود (داناو و همکاران، ۲۰۱۰). پس از آن میواینوزیتول با UDP-d-galactos جهت تشکیل گالاکتینول و دهنده‌های گالاکتوزیل برای بیوسنتز رافینوز و مجموعه گالاکتوپنیلیل از الیگوساکاریدها ترکیب می‌شود. مرحله بعدی ایزومریزاسیون و متیلاسیون میواینوزیتول و ایزومرهای دیگر آن

(سیکلو، چپرو، موکو و نئو) جهت تشکیل O-متیل اینوزیتول‌ها (پنیتیل و انیتول و ...) است که در پاسخ به تنش و ذخیره کردن تولیدات دانه و نیز تولیدات اینوزیتول‌ها، گلیکوزیدازها از قبیل پنیتیل گالاکتوزیدازها شرکت دارند. مسیر اکسیداسیون در متابولیسم پنتوزها، پکتین دیواره سلولی، شکل‌گیری همی سلولز و سنتز نشاسته نقش عمده دارد (شکل پیوست ۴). (سایرم و همکاران، ۲۰۰۴). در مسیر سنتز میواینوزیتول ژن کد کننده میواینوزیتول منو فسفاتاز (MIPS) به شکل میواینوزیتول ۱ فسفات فسفات سنتتاز در می‌آید. اینوزیتول O متیل ترانسفراز (IMT) اینوزیتول را به شکل انیتول تبدیل می‌کند در هنگام تنش به طور کلی MIPS و IMT در گیاهان متحمل به تنش نمک با افزایش چرخه سطوح پلی‌ال‌ها منجر به تحمل تنش می‌گردد (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱).

دی-مانیتول و سوربیتول

دی مانیتول و سوربیتول از قندهای الکلی محسوب می‌شوند. در واقع پلی‌ال‌های موجود در گیاهان آلی هستند و به عنوان منبع انرژی و محلول سازگار کننده، عمل می‌کنند. در تحقیقات پیشین، گزارش شد که دی مانیتول و سوربیتول با تحمل به تنش در چندگونه گیاهی مرتبط هستند (کرامر و همکاران، ۲۰۰۷). دی مانیتول در واکوئل گیاهان از مانوز-۶- فسفات از طریق عملکرد NADPH مانوز-۶- فسفات ردوکتاز سنتز می‌شود. این آنزیم تبدیل مانوز-۶- فسفات به مانیتول ۱ فسفات را کاتالیز می‌کند که این ماده توسط یک فسفاتاز دفسفریله می‌شود و آنزیم مانیتول ۱ فسفات دهیدروژناز آن را به مانیتول تبدیل می‌کند (شکل پیوست ۵)، (بوچهولز و همکاران، ۲۰۰۲). بیان ژن کدکنندهی مانیتول ۱ فسفات دهیدروژناز (MTLD) فروکتوز ۶ فسفات را به مانیتول ۱ فسفات در آرابیدوپسیس، تنباکو، صنوبر تبدیل می‌کند که افزایش مانیتول و نیز تحمل ناشی از آن به شوری و یا کمبود آب دیده شده است (رحمان و همکاران، ۲۰۱۳). آنزیم مسئول سنتز مانیتول بیشتر در برگ و در سیتوزول بافت پارانشیم اسفنجی و در سلول غلاف وجود دارد. براساس مطالعات انجام شده در کرفس مشخص شد که مقدار این آنزیم در غلظت‌های نمک (NaCl) بدون تغییر می‌ماند یا به مقدار کمی تغییر می‌کند. این مطالعات مشخص نمود که توانایی بیوسنتز مانیتول کاملاً حفظ می‌گردد. طبق بررسی انجام شده شباهت زیادی بین این آنزیم با آنزیم کلیدی آلدوز-۶- فسفات ردوکتاز مسئول سنتز سوربیتول در سیب، وجود دارد. مانیتول سنتز شده در برگ توسط آوند آبکش به سایر بافت‌ها منتقل می‌شود. ظاهراً مانیتول در آوند آبکش توسط یک مکانیسم انتقال پروتون به واسطه یک ناقل مخصوص مانیتول (ترانسفورتر مانیتول ۱) بارگیری می‌شود. نقش مانیتول و سوربیتول در شرایط تنش بخوبی مشخص نگردیده است، اما ظاهراً در شرایط تنش، قندهای الکلی نظیر مانیتول، سوربیتول، پنتیتول افزایش یافته و موجب تصفیه رادیکال‌های آزاد شده می‌گردند و

پروتئین‌ها را حفظ می‌کنند (آربونا و همکاران، ۲۰۱۳). در سوربیتول نیز بیان ژن کد کننده سوربیتول ۶ فسفات دهیدروژناز (S6PHDH) در سیب منجر به افزایش میزان سوربیتول و نیز تحمل به تنش شوری و خشکی می‌گردد (شن و همکاران، ۱۹۹۹).

گلیسرول

گلیسرول متابولیتی شایع در میکروارگانیسم‌ها و بی مهره‌گان است که باعث محافظت در برابر تنش‌ها به ویژه تنش بی-هواری و تنش اسمزی می‌گردد (شن و همکاران، ۱۹۹۹). گلیسرول را بیشتر می‌توان در گیاهان عالی یافت که این ماده می‌تواند اثرات چشمگیری بر رشد گیاه داشته باشد، به عنوان مثال استفاده از گلیسرول در جو و برگ اسفناج در جذب کربن فتوسنتزی اثر می‌گذارد و علاوه بر این گلیسرول بر باز زایی اسکلت سلولی در طول القای جنین‌زایی سوماتیکی تاثیر می‌گذارد. این ماده نقش‌های مختلفی را از طرق مختلف اعمال می‌کند. گلیسرول پیش ماده G3P می‌باشد که یک متابولیت کلیدی است و به عنوان پروتئین حامل G3P برای فسفریلاسیون اکسیداتیو و نیز ستون فقرات گلیسرول لیپیدها است. در واقع گلیسرول ۳ فسفات جزئی الزامی از واکنش‌های تولید انرژی از جمله گلیکولیز و بیوسنتز گلیسرول لیپید مربوط به بیماری‌های بسیاری از موجودات زنده است. گلیسرول و متابولیسم G3P شامل چند آنزیم کلیدی، گلیسرول کیناز (FAD G3P) و گلیسرول کیناز دهیدروژناز (FAD GPDH) که هم در سیتوزول و هم کلروپلاست دیده شده است، می‌باشد (ولادمیر و همکاران، ۲۰۰۸). به طور خاص گلیسرول کیناز فسفاتاز، گلیسرول را به گلیسرول ۳ فسفات تبدیل می‌کند و همزمان هم ATP مصرف می‌نماید. گلیسرول ۳ فسفات (G3P) به دی هیدروکسی استون فسفات با FAD GPDH اکسید می‌گردد و به FADH GP تبدیل می‌شود (شکل پیوست ۶). اختلال در ژن GPDH در آرابیدوپسیس منجر به اختلال در متابولیسم گلیسرول و افزایش ROS می‌گردد. هترولوگ ژن مرتبط با متابولیسم گلیسرول در مخمر *Escharichian Coli* یافت شده است و برای افزایش G3P، افزایش محتوای چربی در کلزا و برای تغییر جریان گلیسرول در برگ آرابیدوپسیس به کار گرفته شده است (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱). اما بیان بیش از حد GPDH سطح G3P را افزایش نخواهد داد. در مطالعاتی گزارش شده است که سطح G3P برای مقاومت در برابر قارچ *Colletotrichu Higginsianum* در گیاه آرابیدوپسیس بسیار حائز اهمیت است. اخیرا نشان داده شده است که G3P برای ثبات پروتئین‌های دفاعی مورد نیاز است. G3P نیز نقش مهمی در تعدیل نسبت $NADH^+/NAD$ و وضعیت اکسیداتیو سلولی در سلول‌های گیاهی ایفا می‌کند (شن و همکاران، ۱۹۹۹).

۵-۲ ترکیبات فنولی

نتایج این مطالعه حاکی از افزایش ترکیبات فنولی از قبیل اسید بنزوئیک و اسید پروپانوئیک در هنگام مواجهه با تنش شوری در بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل بود و بر اساس این نتایج، ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در تولید آن‌ها موفق‌تر عمل نمود و این نتایج با یافته‌های کاتینوت (۲۰۰۸)، و مورا و همکاران (۲۰۱۴) که افزایش اسید بنزوئیک را در گیاهانی مانند سویا، گوجه فرنگی، برنج و توتون و انگور تحت تنش‌های محیطی بیان نمودند، مطابقت داشت.

ترکیبات فنولی مانند اسید سینامیک، اسید بنزوئیک، اسید پروپانوئیک، جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند. در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، اما تنش‌های محیطی مختلف، مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهند (پیترسون و همکاران، ۲۰۰۹). این ترکیبات از شواهد فیزیولوژیکی ارزشمند در تعیین اختلاف وارته‌های مختلف به شمار می‌روند و استفاده از روش‌های بیوشیمیایی در تشخیص تفاوت ژنتیکی ارقام، نقش کلیدی این ترکیبات را در اثر متقابل گیاه و محیط نشان می‌دهد. آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (PAL)^۱ آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که L فنیل آلانین را با دامیناسیون به ترانس اسید سینامیک تبدیل می‌کند. این مسیر، مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌باشد (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۳). این آنزیم کلیدی در تشکیل ترکیبات فنولی (یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان) نقش اساسی داشته و به عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌شود (شولر و همکاران، ۲۰۰۸). ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند که با جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون متابولیت‌های حیاتی سلول پیشگیری کرده و مانع از بروز تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاه می‌شوند (ولی فرد و همکاران، ۲۰۱۵).

۵-۲-۱ اسید بنزوئیک

نقش حفاظتی اسید سالیسیلیک و اسید بنزوئیک در برابر آسیب‌های سرمای در گیاهان مختلف مانند برنج، ذرت و خیار، گوجه فرنگی، لیمو، پسته و گردو گزارش شده است (های و همکاران، ۲۰۱۰). پژوهشگران بیان کردند که اسید بنزوئیک و اسید سالیسیلیک یک مولکول علامتی مهم برای ایجاد پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های محیطی هستند

^۱ phenylalanine ammonia lyase

(سناراتا و همکاران ۲۰۰۲). بررسی ایشان نشان داد که اسیدسالیسیلیک و اسید بنزوئیک موجب جلوگیری از صدمه به اسیدهای چرب غیراشباع، کاهش نفوذپذیری غشاء و حفاظت از غشای تیلاکوئیدی در زمان تنش شوری در گیاه لوبیا و گوجه‌فرنگی می‌شود. اسیدبنزوئیک باعث افزایش طول ریشه و ساقه و ارتفاع گیاه می‌شود. کاربرد اسید بنزوئیک در گونه‌هایی از گیاهان زراعی اثرات مطلوبی را روی عملکرد و اجزای عملکرد نشان داد (کوالی و همکاران، ۲۰۱۲).

اسید بنزوئیک (BA) و مشتقات آن نقش عناصر ساختاری مهم در تعداد زیادی از محصولات طبیعی و بسیاری از نقش‌های ارزشمند در متابولیسم گیاه را ایفا می‌کنند و به عنوان یک پیش ماده برای متابولیت‌های اولیه و ثانویه است. این ترکیبات نه تنها به انجام عملکردهای مهمی در گیاهان (به عنوان مثال، به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ترکیبات دفاعی) منجر می‌شود، بلکه به طور گسترده نیز به عنوان مواد نگهدارنده و افزایش دهنده طعم، ضد عفونی کننده، شیمی درمانی استفاده می‌شود (کوالی و همکاران، ۲۰۱۲). با وجود ساختار ساده آن و توزیع گسترده، درک کامل از مسیرهای بیوشیمیایی منجر به شکل گیری BA ناقص مانده است. در گیاهان، بیوسنتز BA از طریق مسیرهای متعددی که از مسیر فنیل پروپانوئید بوجود می‌آیند، رخ می‌دهد و با دامیناسیون L- فنیل آلانین (فنیل آلانین) به اسید ترانس سینامیک (CA) توسط فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) آغاز می‌شود. پس از آن تبدیل اسید سینامیک به اسید بنزوئیک نیازمند کوتاه شدن زنجیره جانبی کربن توسط دو کربن است که این کار از طریق هر یک از مسیرهای بتا-اکسیداتیو وابسته به کوآنزیم A و مسیر غیر بتا-اکسیداتیو مستقل از کوآنزیم A و یا ترکیبی از این مسیرها پیشنهاد شده است. در گل اطلسی در حال حاضر نشان داده شده است که هر دو مسیر بتا-اکسیداتیو و غیر بتا-اکسیداتیو به تشکیل ترکیبات بنزوئیک در گیاهان کمک می‌کند (شکل پیوست ۷)، (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). ژن مسئول مراحل اصلی بیوسنتز β -اکسیداتیو بیوسنتز اسید بنزوئیک و تشکیل $3H_3PP$ -COA و $3O_3PP$ -COA هنوز ناشناخته باقی مانده است. بیوسنتز از این واسطه نیاز متوالی به فعالیت انوئیل کو آنزیم A هیدراتاز^۱ و ۳- هیدروکسی اسیل کوآنزیم A دهیدروژناز^۲ دارد که هر دو را می‌توان با یک پروتئین چند منظوره (MFP)^۳ شبیه به آن در β -اکسیداسیون پراکسی زومی اسیدهای چرب استفاده کرد (مورا و همکاران، ۲۰۱۴).

^۱enoyl-CoA hydratase

^۲3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

^۳multifunctional protein

اسید بنزوئیک به عنوان یک پیش ماده برای سنتز اسید سالیسیلیک عمل می‌کند (کاتینوت و همکاران، ۲۰۰۸). اسید سالیسیلیک در فعال شدن واکنش‌های متعددی نقش دارد و جزئی کلیدی از تحمل در برابر بیماری‌های موضعی و سیستمیک در گیاهان است. در مطالعات انجام شده مشخص شده است که اسید سالیسیلیک به طور چشمگیری تحت تنش‌های مختلف محیطی از جمله تنش شوری افزایش می‌یابد، همچنین این ترکیبات جزء آنتی‌اکسیدانت‌ها محسوب شده و در شرایط تنش‌های محیطی ممکن است در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن نقش ایفا کنند (ویلاس و همکاران، ۲۰۰۵). این ترکیب به عنوان یک پیام آندوژن (داخلی) گیاهی باعث افزایش تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی، سرما و گرما می‌شود (های و همکاران، ۲۰۱۰). اسید سالیسیلیک در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان مانند رشد و نمو، فتوسنتز، جذب و انتقال یون و نفوذپذیری غشاء تأثیرگذار است (کوالی و همکاران، ۲۰۱۲). بسیاری از بررسی‌های انجام شده، نشان داده است که کاربرد اسید سالیسیلیک (SA) به صورت خارجی در گیاهان تحت تنش شوری می‌تواند اثرات تخریبی ناشی از این تنش را کاهش دهد و فرآیندهای رشد را سریعاً به حالت اول برگرداند (اپل و همکاران، ۲۰۱۴).

۵-۳ اسیدهای چرب

نتایج حاصله در این پژوهش نشان داد بر خلاف گیاهان دانه‌روغنی مانند کلزا، در کنبه اسیدهای چرب تحت تنش شوری افزایش یافتند و ژنوتیپ متحمل زودرس × پاکستانی در تولید اسیدهای چرب در تنش ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی موفق‌تر بود و این نتایج با نتایج عزیز و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. یکی از مکانیسم‌های مقاومت در برابر تنش‌های محیطی همانند شوری و تنش کم آبی وابسته به دو لایه لیپیدی و اسیدهای چرب غیر اشباع آن است که در طی تنش پایداری غشاء را تضمین می‌کنند. در طی تنش شوری میزان H_2O_2 گیاه افزایش می‌یابد که موجب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب غشایی می‌شود (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷). اسیدهای چرب از استیل کوآنزیم A توسط مجموعه‌ای از واکنش‌ها در پلاستیدها رخ می‌دهد. استیل کوآنزیم A از پیرووات توسط مسیر β -اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری پدید می‌آید. استیل کوآنزیم A با اگزالواستات واکنش می‌دهد و سیترات پدید می‌آید. در سیتوزول سیترات به اگزالواستات تجزیه می‌شود و استیل کوآنزیم A تبدیل می‌شود. این واکنش توسط ATP سیترات لیاز کاتالیز می‌شود که این واکنش جهت تامین انرژی، نیازمند هیدرولیز یک مولکول ATP است (هیرمس و همکاران، ۲۰۰۷).

مسیر انتقالی سیگنالی اسید اکتادکانوئیک نقش مهمی در بروز پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده ایفا می‌کند. براساس مطالعه‌ای که بر روی ارقام کلزا انجام گرفت مشاهده شد که در شرایط تنش شوری میزان اسیدهای چرب موجود در

کلزا نسبت به شاهد کاهش می‌یابد که این احتمالاً مربوط به مشارکت برخی اسیدهای چرب لینولئیک است که در تنظیم درجه سفتی دیواره سلولی دخیل‌اند. این اسیدهای چرب در شرایط شوری تولید برخی آنزیم‌هایی نظیر لیپوآکسیژناز را جهت افزایش تحمل به شوری بالا می‌برند و در تحمل به تنش نقش بسزایی دارند. اختلاف در ترکیب اسیدهای چرب نقش زیادی در انتقال ترکیبات محافظ اسمزی، نظیر گلیسین بتائین ایفا می‌کند (عزیز و همکاران، ۲۰۱۵).

۵-۴ ترکیبات نیتروژن دار

ژنوتیپ‌های کنگد مورد مطالعه قادر به تولید ترکیبات نیتروژن دار از قبیل بتا آلانین و والین، پرولین، گلیسین و سرین بودند. گزارش شده است که در آفتابگردان اسیدهای آمینه‌ای از این قبیل در برگ گیاهان متحمل بیشتر از حساس بوده است. ژنوتیپ‌های کنگد در این مطالعه توانست این نتایج را در شرایط تنش تایید نمایند. نتایج افزایش پرولین در بین دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش شوری و برتری ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در تولید این متابولیت با نتایج احمدی همکاران (۱۳۹۱)، های و همکاران (۲۰۰۳)، پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، گهلوگ و همکاران (۲۰۰۵) در یک راستا قرار داشت. نتایج پژوهش حاضر، مبنی بر افزایش سرین و گلیسین در هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس، تحت تنش نیز با نتایج رحمان و همکاران (۲۰۱۳) پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، پرویز (۲۰۰۸) همسو بود. طبق نتایج این پژوهش، ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی با وجود افزایش تولید سرین در شرایط تنش، توسط این ژنوتیپ، نسبت به ژنوتیپ حساس عراقی توانایی کمتری داشت.

ترکیبات حاوی نیتروژن شامل پرولین، اسیدهای آمینه و پلی آمین‌ها می‌باشند (ادروا، ۲۰۰۵). پلی آمین‌ها ترکیبات چند ظرفیتی هستند که شامل دو یا چند گروه آمینه اند و به عنوان عوامل مختلف از جمله کمبود پتاسیم، تنش شوری، pH پایین، کمبود مواد مغذی و یا نور در گیاهان تحریک می‌شوند. بنابر گزارش‌ها، پلی آمین‌ها در رشد و توسعه، پیام رسانی، بیان ژن و تحمل تنش نقش دارند (چو و همکاران، ۲۰۱۱).

پلی آمین‌ها، نقش مهمی در هموستازی ROS ایفا می‌کنند، که این هموستازی توسط تجمع پلی آمین‌ها و آنزیم‌ها، آنتی اکسیدان‌های فعال، کاهش تولید ROS صورت می‌پذیرد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). اثرات مثبت پلی آمین‌ها علاوه بر کاهش ROS ها، حفاظت از سلامت غشاء، تنظیم بیان ژن برای سنتز مواد محلول اسمزی فعال و کنترل تجمع یون‌های سدیم و کلر در اندام‌های مختلف گیاه می‌باشد (چن و همکاران، ۲۰۰۹). مسیر سنتز پلی آمین‌ها مانند

بوتیل آمین و سیلانامین از اورنیتین یا آرژنین است که توسط عمل آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC)^۱ و آرژنین دهیدروژناز (ADC)^۲ سنتز می‌شوند. مسیر ODC مسیر رایج سنتز پلی آمین‌ها در گیاهان است. بسیاری از ژن‌های دخیل در مسیر سنتز ODC شناسایی و کلون شدند. پلی آمین‌ها از طریق اکسیداسیون توسط آمین اکسیداز کاتالیز می‌گردند در حالی که شامل اتصالات دی آمین اکسیداز و پلی آمین اکسیداز هستند. بیان ژن‌های درگیر در سنتز این آنزیم‌ها از جمله آرژنین دکربوکسیلاز و فعالیت آنها افزایش می‌یابد که موجب افزایش مقدار پلی آمین‌ها شده و به افزایش مقاومت به تنش شوری منجر می‌گردد (شکل پیوست ۸). از سوی دیگر، کاهش سنتز پلی آمین‌ها به دلیل کاهش فعالیت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز باعث کاهش تحمل به شوری می‌شود. این آمیدهای فنولیک در اتصال کووالانسی به ماتریکس دیواره سلولی در ساختارهایی مانند لیگنین دیده شده اند (حاجی بلند و ابراهیمی، ۱۳۹۰).

انباشت برخی اسیدهای آمینه به عنوان محلول‌های سازگار کننده در طی تنش شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی گیاه ایفا می‌کند و بین میزان تحمل گیاه به شوری و انباشت اسیدهای آمینه همبستگی مثبت وجود دارد (برومک و همکاران، ۲۰۱۳). قابل ذکر است که افزایش در اسیدهای آمینه احتمالاً ناشی از کاهش رشد است که این کاهش رشد به دلیل تنش می‌باشد، از این رو تغییرات در میزان اسیدهای آمینه لزوماً به عنوان یک پاسخ تطابقی به شوری نیست، بلکه در حقیقت نتیجه کاهش رشد است. تنش شوری همانند سایر تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش خشکی، متابولیسم اسیدهای آمینه را تحت تاثیر قرار می‌دهد و عمدتاً باعث افزایش اسیدهای آمینه آزاد و تجمع آن‌ها در برگ-ها می‌شود (جاندر و جوشی، ۲۰۱۰). نکته قابل توجه در افزایش میزان پرولین تحت تنش شوری شدید است. تجمع پرولین تحت تنش شوری در مقالات متعددی گزارش شده است که نشان دهنده اهمیت این اسیدآمینه در تنظیم اسمزی در شرایط تنش می‌باشد (هیگبی و همکاران، ۲۰۱۰). در بین اسیدهای آمینه، آلانین و والین در گیاهان طی تنش شوری تولید می‌شوند.

پرولین و تنش شوری

پرولین و گلاپسین دو ماده آلی هستند که در برخی غلات نقش تنظیم اسمزی را ایفا می‌کنند. به طور کلی پذیرفته شده است که تجمع پرولین در شرایط تنش شوری یکی از مکانیسم‌های تنظیم فشار اسمزی است و در برخی گیاهان مهمترین اسمزای آلی است (هوآی و همکاران، ۲۰۰۳). پرولین چپرونی با وزن مولکولی کم می‌باشد و به عنوان

^۱ Ornithine decarboxylase

^۲ Arginine decarboxylase

محلولی سازگار کننده و پاک کننده ROS عمل می‌نماید (هیگبی و همکاران، ۲۰۱۰). عملکرد پرولین با کاهش اثرات یون سدیم و فعالیت‌های آنزیم‌های مختلف می‌باشد (چو و همکاران، ۲۰۱۱). پرولین از اسیدهای آمینه گروه گلوتامات است و از متابولیت‌های ثانویه و نیز از رایج‌ترین محلول‌های سازگار به شمار می‌آید. این ماده از طریق دو سیستم مختلف مسیر گلوتامات یا اورنتین در کلروپلاست یا سیتوزول سنتز می‌شود (کوکا و همکاران، ۲۰۰۷). در صورت کمبود ازت در گیاه، مسیر گلوتامات و در شرایط وجود ازت کافی مسیر اورنتین برای سنتز پرولین فعال می‌شود (شکل ۹ و ۱۰ پیوست). این ماده در طی تنش در قسمت‌های مختلف گیاه تجمع می‌یابد، اما بیشترین مقدار آن در برگ‌ها به وجود می‌آید. پرولین عمل حفاظتی و کاهش پتانسیل اسمزی، حفاظت ماکرو مولکول و غشاء، ثبات pH، منبع ازت و واکنش اکسیداسیون و احیا را بر عهده دارد. همچنین پرولین با غیر فعال کردن آنیون هیدروکسیل‌ها (OH) خاصیت ضد اکسیدانی دارد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۳). در هنگام تنش با کاهش پتانسیل آب، میزان تجمع پرولین به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. همچنین اسید آبسیزیک در هنگام تنش، موجب انباشت پرولین می‌شود، اما جیبرلین و کینتین مانع تجمع آن می‌گردند (ماجیو و همکاران، ۲۰۰۲). پرولین به عنوان محلولی مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش‌هایی مانند دمای پایین، کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نقش اساسی دارد. افزایش این ماده در شرایط تنش اسمزی، علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتری‌ها، مخمرها، بی مهرگان دریایی و جلبک‌ها مشاهده شده است (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع پرولین چپرونی شیمیایی (chemical chaperone) است که باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها می‌شود و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌کند (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرایند طبیعی سلولی ممانعت به عمل می‌آورد (بابایی و جمشیدی، ۱۳۸۹). این افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش، تا مدتی حدود یک ماه باقی می‌ماند. در واقع افزایش غلظت پرولین در شرایط تنش شوری ممکن است به دلیل بیوسنتز یا کاهش اکسیداسیون پرولین به گلوتامات و یا تبدیل پروتئین به پرولین باشد (پرسل و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین پرولین انرژی مورد نیاز برای جایگذاری یون‌ها در واکوئل را تأمین می‌کند. در بسیاری از گیاهان شور زیست، پرولین یا گلیسین بتائین به اندازه کافی و به مقدار زیادی در برگ‌ها وجود دارد (بیش از ۴۰ میلی‌مولار در یک بافت آبدار) که در ایجاد فشار اسمزی در سلول نقش دارند. نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت یونجه و آرابیدوپسیس گزارش شده است (گهلوت و همکاران، ۲۰۰۵). پرولین درحفظ نسبت $NADPH/NADP^+$ مورد نیاز برای متابولیسم طبیعی درگیر است. غلظت بالای

NADP⁺ برای بازسازی NADPH و سنتز پورین‌ها لازم است (سو و همکاران، ۲۰۱۱). پرولین نه تنها در شرایط تنش شوری انباشته می‌شود، بلکه به عنوان ذخیره نیتروژن آلی در طول مدت بهبود تنش عمل می‌کند. در برخی از مطالعات با بهبود برخی از فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، فعالیت فتوسنتزی در ریشه گیاه و حفظ آب گیاه تحت شرایط شور مشاهده شد که در گیاهان متحمل به شوری میزان پرولین افزایش یافت (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). گزارش شده است که پرولین در بهبود تحمل به تنش شوری در تنباکو با افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در سیستم آنتی اکسیدانی نقش داشت. در شرایط غیر تنش، پرولین از مسیر اورنتین در گیاه تولید می‌شود (کرامر و لاجی، ۱۹۸۶)، ولی در گیاهان تحت شرایط خشکی و شوری پرولین از اسید ال گلوتامیک توسط آنزیم دلتا - ۱ - پرولین ۵ - کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و با مصرف یک ATP و احیا شدن NADPH به گلوتامیک - ۵ - سمی آلدئید تبدیل می‌گردد که بدون واسطه و به صورت خود به خود تبدیل به دلتا - ۱ - پرولین ۵ - کربوکسیلات می‌شود. در ادامه فرایند، ماده اخیر به کمک آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات ردوکتاز و احیا شدن NADPH به ال پرولین تبدیل شود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان P5CS است. در واقع P5CS یک آنزیم دو عملکردی است که دو واکنش ابتدایی را در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان کاتالیز می‌کند (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۴). در میتوکندری پرولین توسط پرولین دهیدروژناز و پیرولین ۵ کربوکسیلات دهیدروژناز به گلوتامات تجزیه می‌گردد (شکل ۱۰ و ۹ پیوست)، (هیگی و همکاران، ۲۰۱۰). علاوه بر این، در میتوکندری پیرولین ۵ کربوکسیلات می‌تواند با S اورنتین آمینوترانسفراز از اورنتین تولید شود. بیان ژن S اورنتین آمینوترانسفراز به منظور افزایش پرولین و افزایش تحمل به تنش در برنج، توتون و تنباکو را باعث می‌شود (اقبال و همکاران، ۲۰۰۶). در باکتری‌ها این واکنش‌ها توسط دو آنزیم مختلف یعنی گاماگلوتامیل کیناز و گلوتامیک - سمی - آلدئید دهیدروژناز کاتالیز می‌گردند. جالب توجه است که توالی اسیدهای آمینه آنزیم P5CS جدا شده از *Vigna aconitifolia* با توالی اسید آمینه‌های بخش انتهایی آمینی آنزیم گاماگلوتامیل کیناز و نیز بخش انتهایی کربوکسیلیک گلوتامیک - سمی - آلدئید دهیدروژناز در *E. coli* مشابهت دارد (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵). کلونینگ ژن P5CS در گیاهان ثابت کرد که مسیر بیوسنتز پرولین از اسید آمینه گلوتامیک در گیاهان مشابه باکتری‌هاست. ژن کد کننده پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز و پیرولین ۵ کربوکسیلات ردوکتاز P5CR که تجمع پرولین را تنظیم می‌کند به سرعت در حال القا توسط تنش شوری و در نتیجه افزایش میزان پرولین و تحمل به تنش شوری است. نسخه برداری عواملی مانند OSNACD و ZFP179 در تنش شوری افزایش می‌یابد که می‌تواند تولید پرولین و قندها و پروتئین LEA را که به نوبه خود نقش اساسی در تحمل به تنش را دارند، تنظیم کند (ماجیو و همکاران، ۲۰۰۲). بر اساس مطالعات پیشین

مشخص شده است که پروتئین کینازهایی هستند که در جهت تجمع پرولین در هنگام تنش شوری، خشکی و سرما عمل می‌کنند. کیناز پروتئین ۲ (SnRK2s)^۱ که توسط تنش اسمزی فعال می‌گردد. یکی از این پروتئین‌ها محسوب می‌شود (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱). در برنج، به ترتیب بیان بیش از حد OsCIPK03 و OsCIPK12 افزایش سطح پرولین در شرایط تنش و افزایش تحمل به سرما، خشکی و شوری، را ایجاد می‌کند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷). علاوه بر پروتئین کینازهای ذکر شده، CDPK6^۲ و کالمودولین سویا تحمل به تنش و تجمع پرولین را افزایش می‌دهد و نشان داده شده است که نقش محوری را برای سیگنال‌های کلسیم داخل سلولی در متابولیسم پرولین ایفا می‌نماید (سرینواز و همکاران، ۱۹۹۵). MAPK^۳ فرآیندهای متعددی را در تنش‌های غیر زنده تنظیم می‌کند. تحقیقات اخیر نقش مثبتی برای پیام‌رسانی مبتنی بر MAPK در تجمع پرولین ناشی از تنش نشان می‌دهد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷).

گلیسین

. گلیسین یک محلول آلی بسیار مهم است که در تعدادی از گروه‌های مختلف گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد. از گلیسین به عنوان متابولیت ثانویه مهم جهت حفاظت در برابر تنش اسمزی یاد می‌شود (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). گلیسین علاوه بر نقش محافظتی مستقیم، به عنوان محافظ اسمزی، تاثیر مثبتی بر آنزیم‌ها و سلامت غشاء دارد و می‌تواند غشاء و دستگاه‌های فتوسنتزی را در طول تنش محافظت کند (چو و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع گلیسین در کلروپلاست‌ها، تنظیم اسمزی و حفاظت از غشاء و فرآیندهای غشایی تیلاکوئید و فتوسنتز را به صورت فعال حفظ می‌کند (هیل و کزادرنا، ۲۰۱۵). یکی از مهمترین و گسترده‌ترین مطالعات درباره‌ی گلیسین و ارتباط آن با تحمل به شوری در گیاهان است. نقش اصلی گلیسین ایجاد ثبات در ساختار چهارتایی پروتئین و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در طول و بعد از تنش می‌باشد (چاندنا و همکاران، ۲۰۱۳). طبق مطالعات انجام شده بر روی درختان از جنس کهور مشاهده شد که گلیسین نقش مهمی در پاسخ سلول‌های گیاهی به انواع تنش ایفا می‌کند (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵). در این درختان به این نتیجه رسیدند که افزایش سطح گلیسین ممکن است برای تنظیم اسمزی در تنش شوری دارای اهمیت باشد و در تنش کلرید سدیم، مقدار آن چند برابر می‌شود. گلیسین ممکن است تعداد روزنه‌های باز را کاهش دهد و به دنبال آن از مقدار تعرق نیز بکاهد و منجر به کاهش تجمع یون سدیم در شاخه‌ها شود. درواقع عملکرد گلیسین، کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه کاهش اثرات مخرب شوری بر

^۱SNF-related protein kinases

^۲calcium-dependent protein kinase

^۳Mitogen Activated Protein Kinase

روی لیپیدهای غشایی است. پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در گیاهان منعکس کننده‌ی آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال آزاد در سطح سلولی و در شرایط تنش شوری هستند (ملونی و همکاران، ۲۰۰۹). سنتز گلیسین از کولین نیز در ۲ مرحله شامل چند آنزیم رخ می‌دهد. طی این واکنش‌ها کولین اکسید شده و به بتائین آلدهید تبدیل و این ماده نیز اکسید می‌گردد و به گلیسین تبدیل می‌شود. در گیاهان آلی مرحله اول توسط آنزیم کولین مونواکسیژناز انجام می‌شود و در مرحله بعد بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) وارد عمل می‌شود. گلیسین در سه مرحله متیلاسیون سنتز می‌گردد. واکنش‌ها توسط آدنوزین متیونین اس ترانسفراز وابسته به متیل ترانسفراز، گلیسین ساکروزین ان متیل ترانسفراز و ساکروزین دی متیل گلیسین متیل ترانسفراز صورت می‌گیرد (رحمان و همکاران، ۲۰۱۳). در گیاهان عالی این مسیر در برگ‌ها انجام می‌شود. ژن کد کننده بتا آلدهید (BADH) در سنتز گلیسین، نقش فراوانی دارد. گیاهان تاریخت توتون، آرابیدوپسیس و برنج با انتقال این ژن مقاومت به شوری را نشان دادند (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵).

سرین

سرین اسید آمینه غیر ضروری مشتق شده از اسید آمینه گلیسین است و دارای اهمیت ویژه‌ای است. این متابولیت از ۳ فسفوکلیسرات طی سه واکنش اکسیداسیون، ترانس آمیناسیون و فسفاتازی به وجود می‌آید در یک واکنش دوطرفه و توسط هیدروکسی متیل ترانسفراز به گلیسین تبدیل می‌شود. این واکنش‌ها نیازمند متیلن- پریدوکسال فسفات (PLP) به عنوان کوآنزیم است. سرین دهیدراتاز با دآمیناسیون وابسته به (PLP)، ایجاد پیروات می‌کند (ملونی و همکاران، ۲۰۰۳).

بیوسنتز ال سرین از مسیر گلیکولات و انتقال متعاقب آن از طریق آوند آبکش آن قدر کافی نیست که نیازهای تمام یاخته‌ها را برآورده کند. مسیر فسفریله شده بیوسنتز ال سرین برای متابولیسم و نمو گیاه ضروری است. احتمالاً به این دلیل که این مسیر ال سرین را برای انواع ویژه‌ای از یاخته‌ها (مانند یاخته‌های بساک یا یاخته‌های مریستمی) فراهم می‌سازد (جاندر و همکاران، ۲۰۱۰). مسیر فسفریله شده بیوسنتز ال سرین یک مسیر مرکزی بوده که در متابولیسم کربن و نیتروژن شرکت می‌کند. گلیسین و ال سرین در بیوسنتز پروتئین‌ها درگیر هستند و به عنوان پیش‌ماده انواعی از مسیرهای بیوسنتز مهم شامل بیوسنتز فسفولیپیدها و انواعی از پورین‌ها عمل می‌کنند. در مطالعات انجام شده در برگ اسفناج، گلیسین و ال سرین را در کلروپلاست و سیتوزول مشاهده کردند. سرین و گلیسین توسط آنزیم سرین

هیدروکسی متیل ترانسفراز (SHNT)^۱ سنتز می‌شوند. آنزیمی که در سه قسمت عمده سلولی (سیتوزول، کلروپلاست، میتوکندری) وجود دارد (شولر و همکاران، ۲۰۰۶). در هرکدام از این قسمت‌ها یکی از این دو اسید آمینه بسته به نیاز متابولیکی می‌تواند منجر به سنتز دیگری شود. دو مسیر اصلی برای سنتز سرین و گلیسین وجود دارد که به مسیر گلیکولیت یا مسیر فسفریلاسیون اشاره می‌کند و با گلیکولیز مرتبط است و سرین از طریق آنزیم سرین هیدروکسی متیل ترانسفراز کاتالیز می‌گردد. مسیر دوم در ترانس آمیناسیون، گلی اکسالات^۲ به گلیسین تبدیل می‌گردد که می‌تواند به نوبه خود به سرین تبدیل شود. در سلول‌های جانوری، گلیسین می‌تواند از ترئونین توسط ترئونین آلدوز کاتالیز شود. اغلب مسیر سومی نیز به عنوان مسیر جایگزین مطرح می‌گردد که از طریق واسطه‌های غیرفسفریلاسیون گلیسرات و هیدروکسی پیروات رخ می‌دهد. در گیاهان عالی این مسیر در برگ‌ها انجام می‌شود (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵).

مسیر گلیکولیت یا فسفریلاسیون، شامل تبدیل ۳- فسفوگلیسرات به سرین از طریق ۳- فسفو گلیسرات دهیدروکسی پیروات و ۳- فسفوسرین می‌باشد. این واکنش‌ها توسط ۳- فسفوگلیسرات دهیدروژناز، گلوتمات، فسفو هیدروکسی پیروات، آمینوترانسفراز و فسفو سرین فسفاتاز انجام می‌شود. سرانجام توسط سرین هیدروکسی متیل ترانسفراز به گلیسین تبدیل می‌شود (شکل پیوست ۱۲ و ۱۱)، (طباطبایی و همکاران، ۱۳۹۰). در گیاهان عالی این، مسیری اصلی جهت بیوسنتز سرین محسوب می‌شود. در بافت‌های فتوسنتزی گلیسین و سرین تا حد زیادی از فسفو گلیسرات پیروات فعال بدست می‌آیند (شولر و همکاران، ۲۰۰۶).

۵-۵ اسید گاما آمینوبوتریک (اسید بوتانوئیک)

نتایج بدست آمده در این مطالعه، افزایش اسید گاما آمینو بوتریک در دو ژنوتیپ حساس عراقی و متحمل زودرس^۳ پاکستانی تحت تنش شوری و نیز موفقیت ژنوتیپ متحمل زودرس^۳ پاکستانی در تولید این اسید را نشان داد که با نتایج رونالت و همکاران (۲۰۱۰)، وانگ و همکاران (۲۰۱۱) و نتایج کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، مطابقت داشت.

اسید گاما آمینوبوتریک، اسید آمینه‌ای غیر پروتئینی^۴ کربنه برای حفاظت از باکتری‌ها و گیاهان و مهره‌داران است. آن در حیوانات نقش مهمی در انتقالات عصبی دارد و در مهره‌داران به عنوان مولکول پیام‌رسان به ویژه در انتقال عصبی

^۱hydroxymethyltransferase

^۲Glyoxalat

نقش دارد. پژوهش‌های مختلف نشان داد که میزان آن می‌تواند به اندازه ۵۰٪ از اسیدآمینه‌های آزاد در گوجه‌فرنگی و میوه‌گیلاس باشد و غلظت‌های بالای آن می‌تواند باعث افزایش شدت در پاسخ به تنش‌های مختلف گردد. اسید گاما آمینوبوتریک به عنوان یک منبع نیتروژن عمل می‌کند و با بررسی‌هایی که روی آراییدوپسیس انجام شد، مشخص شد که این گیاه در محیط کشت حاوی اسید گاما آمینوبوتریک به عنوان تنها منبع نیتروژن به خوبی رشد می‌کند، بنابراین اسیدگاما آمینوبوتریک در متابولیسم عمومی و ذخیره‌سازی و یا انتقال نیتروژن دخالت دارد (بوچ و همکاران، ۲۰۰۴). در گیاهان و حیوانات اسیدگاما آمینو بوتریک عمدتاً از طریق مسیر کوتاه متشکل از سه آنزیم به نام مسیر شانت^۱ ایجاد می‌شود. این مسیر از آنزیم سیتوزولی گلوتمات دکربوکسیلاز و آنزیم میتوکندریایی ترانس آمیناسیون و اسید سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز^۲ تشکیل شده است. آنزیم اسید گاما آمینوبوتریک ترانسفراز سوکسینات که درون چرخه TCA تغذیه می‌شود، نیز در سنتز اسیدگاما آمینوبوتریک نقش دارد (رونالت و همکاران، ۲۰۱۰) به نظر می‌رسد تنظیم مسیر متابولیکی شانت از ویژگی‌های خاص در گیاهان باشد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۹). در واقع مسیر شانت اسید گاما آمینو بوتریک در گیاهان به طور عمده در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشد. مسیر شانت تا کنون در ارتباط با پاسخ‌های فیزیولوژیکی مختلف از جمله تنظیم pH، فراهم کردن کربن برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید، متابولیسم نیتروژن، عامل بازدارنده در برابر حشرات، محافظت در برابر تنش اکسیداتیو و مهار اکسیژن فعال، تنظیم اسمزی و پیام رسان می‌باشد (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات انجام گرفته بر روی گلوتمات دکربوکسیلاز و عملکرد آن و نیز تنظیم آن در گیاهان که توسط همسانه‌سازی ژن مسئول بیان گلوتمات دکربوکسیلاز در گل اطلسی و خصوصیات آنزیم کدگذاری شده به عنوان یک پروتئین متصل به کالمودولین وابسته Ca^{++} مشخص کرده فعالیت گلوتمات دکربوکسیلاز در عصاره گونه‌های مختلف توسط کالمودولین وابسته Ca^{++} انجام می‌شود (کینرسلی و همکاران، ۲۰۱۰). اسید گاما آمینوبوتریک توسط آلفا کتوگلوتمات و یا پیرووات به عنوان پذیرنده اسیدآمینه به سوکسینیک سمی آلدئید تبدیل می‌شود. مقدار اسیدگاما آمینوبوتریک می‌تواند در برخی بافت‌ها افزایش یابد، همچنین این اسید در تنظیم نسبت کربن : نیتروژن نیز دخیل است. آخرین مرحله از مسیر شانت سوکسینیک و NADH را برای تنفس فراهم می‌کند (رونالت و همکاران، ۲۰۱۰).

^۱ Shunt^۲ Semialdehyde dehydrogenase succinit acid

۵-۶ اسید بتا آمینوبوتریک

نتایج افزایش این اسید در این پایان نامه افزایش این متابولیت در تنش شوری را نشان داد و نتایج سینگ و همکاران (۲۰۱۰) را تایید نمود. اما ژنوتیپ متحمل فاقد این ماده بود که می‌توان نتیجه گرفت که این ماده باعث ایجاد مقاومت در این ژنوتیپ نگردیده است.

اسید بتا آمینوبوتریک، اسید آمینه غیر پروتئینی است که عامل آغازگر افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای میکروبی و تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری، از طریق تقویت پاسخ‌های دفاعی می‌باشد. این ترکیب باعث واکنشی مورفوزن ناشی از تنش، کاهش رشد رویشی و باعث تجمع آنتو سیانین‌ها است (سینگ و همکاران، ۲۰۱۰). طبق بررسی‌های صورت پذیرفته بر روی آرابیدوپسیس مشخص شد که این ترکیب باعث افزایش و تسریع در پاسخ به تنش می‌گردد. اخیراً مشخص شد که اسید بتا آمینوبوتریک با کاهش فعالیت سلولی در کریستال ریشه و کاهش بیوسنتز در ریشه باعث ایجاد پاسخ مورفولوژیک می‌شود و تراکم ریشه‌های فرعی را افزایش می‌دهد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱).

۵-۷ اسیدهای آلی

اسید مالیک و اسید سیتریک

افزایش اسید مالیک و اسید سیتریک نیز مانند سایر متابولیت‌های تولیدی دو ژنوتیپ متحمل و حساس مورد مطالعه در تنش، در این پژوهش همانند سایر مطالعات انجام شده توسط پاولی (۲۰۰۵) و ماجی (۲۰۰۷) و کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت و تحت تنش شوری مقدار آن‌ها افزایش یافت.

اسید مالیک و اسید سیتریک از اسیدهای آلی موجود در چرخه کربس هستند که طی فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری، تولید انرژی برای سلول‌ها می‌کنند. اسید مالیک نقش‌های متنوعی نظیر تعادل اسمزی واکوئل، نقش اصلی در تنظیم pH دارد و به عنوان یک منبع انرژی برای میتوکندری گیاه عمل می‌کند (پاولی و همکاران، ۲۰۰۵). طی پژوهش‌های انجام شده، آشکار شد که اسید مالیک منجر به تجمع سوکسینات می‌شود که می‌تواند باعث تسریع در سایر فرآیندهای متابولیسمی شود. این ترکیب اندوخته‌ای رایج در گیاه است و باعث جذب فسفر و آهن توسط ریشه از خاک می‌شود. آهن قبل از ورود به سلول توسط ردوکتازهای کلات آهن (FCR)^۱ مانند اسید سیتریک و اسید مالیک

^۱Ferric chelate reductas

تحت واکنش احیا قرار می‌گیرند. به طور کلی اسید سیتریک به عنوان پیش ماده جهت تولید اسید مالیک عمل می‌کند و نقش مهمی در انتقال آهن در داخل گیاه دارد (آهن جهت کنترل pH و اسیدهای آلی، در آپوپلاست بافت مزوفیل برگ موجود است). اسید سیتریک از گلیسرول حاصل می‌شود و می‌تواند در چرخه کربس به آسانی به اسید مالیک تبدیل شود (شکل پیوست ۱۴). در طی تنش شوری چرخه کربس افزایش می‌یابد (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱). تجمع قندها توسط افزایش در تعدادی از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسید دی گلوکونیک در برگ امکان پذیر است (ماجی و همکاران، ۲۰۰۷).

۵-۸ ترکیبات فسفر دار

نتایج افزایش اسید فسفریک توسط دو ژنوتیپ تحت تنش شوری با نتایج پاولی و همکاران (۲۰۰۵)، ماجی و همکاران (۲۰۰۷) و کراسنسکی و همکاران (۲۰۱۱)، مطابقت داشت.

گروه‌های فسفر دار مانند اسید فسفریک در مسیر سنتز اجزای سلولی مانند اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و نیز سنتز ATP نقش دارند، علاوه بر این در فرآیندهای متابولیکی کربن و اسیدهای آمینه نیز دخالت دارند (ماجی و همکاران، ۲۰۰۷). مقادیر زیادی از فسفات برای بقای سلول مورد نیاز است. در گیاهان وجود آن‌ها برای رشد و توسعه ضروری است. فسفات‌ها در آنزیم‌های کیناز و پروتئین فسفاتاز برای ذخیره‌سازی و حفظ متابولیسم سلول مورد نیاز است. فعالیت این آنزیم‌ها ذاتاً به هموستازی برمی‌گردد که به سطوح مختلف تحمل به تنش‌ها مرتبط می‌باشد. برای رونویسی PHO که توسط ژن PHO کد می‌شود (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). وجود تنظیم کننده‌های مثبت PHO_4P ضروری به نظر می‌رسند و در مسیرهای وابسته به کیناز متشکل از PHO_{85P} ، PHO_{80P} زمانی که فسفات زیاد است، توسط هیپر فسفریلاسیون از سنتز PHO ممانعت می‌گردد. هیپر فسفریلاسیون قادر به فعال نمودن رونویسی از ژن‌های PHO زمانی که مقدار فسفات اندک باشد، است. در این هنگام PHO_{81P} مانع از عملکرد PHO_{85P} و PHO_{80P} می‌شود و اجازه رونویسی از ژن PHO، فعال می‌گردد. آنزیم PAP در گیاهان می‌تواند به اسید فسفریک هیدرولیز گردد (کراسنسکی و همکاران، ۲۰۱۱).

۵-۹ آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS)

نتایج حاصله در این بخش با یافته‌های یامچی (۱۳۸۳)، هولسی و همکاران (۲۰۰۷)، کوکا و همکاران (۲۰۰۷)، ماجی (۲۰۰۲)، سیلویا (۲۰۰۸) و بهلگر (۱۳۹۳)، سو و همکاران (۲۰۱۱)، پرسل و همکاران (۲۰۰۴)، ژانگ و همکاران

(۲۰۱۳) و نیز ژنگ و همکاران (۲۰۱۴)، مبنی بر افزایش بیان این ژن در تنش کلرید سدیم و نیز در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس، مطابقت داشت.

در گیاهان تحت تنش، نتیجه تنظیم متقابل در دو مسیر روی هم رفته چرخه پرولین را تشکیل می دهد: ۱- افزایش بیان آنزیم های مسیر سنتز پرولین (P5CS، P5CR) ۲- کاهش فعالیت تجزیه ای پرولین. آنزیم P5CS کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان می باشد و یک آنزیم دو عملکردی است که دو گام ابتدایی در مسیر بیوسنتز پرولین را کاتالیز می کند (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۴). در باکتری ها این واکنش ها توسط دو آنزیم مختلف یعنی گاماگلوتامیل کیناز (GK)^۱ و گلوتامیل-سمی-آلدئید دهیدروژناز (GSA)^۲ کاتالیز می گردند (اکبری قوژدی و همکاران، ۱۳۸۹). جالب توجه است که توالی اسیدهای آمینه آنزیم P5CS جدا شده از *aconitifolia Vigna* با توالی اسید آمینه های بخش انتهای آمینی آنزیم GK و نیز بخش انتهایی کربوکسیلیک GSA در *E. coli* مشابهت دارد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۵). کلونینگ ژن p5cs در گیاهان ثابت کرد که مسیر بیوسنتز پرولین از اسید آمینه گلوتامیک در گیاهان مشابه باکتری هاست (اکبری قوژدی و همکاران، ۱۳۸۹). تهیه کتابخانه cDNA گیاه *V. aconitifolia* منجر به شناسایی آنزیم P5CS شد که فعالیت هر دو آنزیم GK و GSA را انجام می دهد (دادخواه و همکاران، ۱۳۸۸). ژن p5cs در گیاه *Arabidopsis thaliana* و به روش cDNA شناسایی شد که ۸/۲ کیلو باز طول داشت (بهلگر و همکاران، ۱۳۹۳). این ژن از گیاهچه های ۱۴ روزه برنج نیز جداسازی شده است (ثابت تیموری و همکاران، ۱۳۸۸). به دلیل اهمیت شوری و خشکی در رشد گیاهان و توجه به تولید گیاهان تراریخته ای که در شرایط چنین تنش هایی به رشد مناسب خود ادامه می دهند، باعث شده است که مسئله انتقال ژن p5cs به گیاهان مورد توجه قرار گیرد. پژوهشگران به وسیله تراریختی گیاه آرابیدوپسیس با آنتی سنس cDNA ژن p5cs نشان دادند که نقش این آنزیم در بیوسنتز پرولین کلیدی است، زیرا در این روش با ممانعت از تولید آنزیم P5CS مقدار پرولین در این گیاهان در سطح معنی داری کاهش یافت (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین پژوهشگران با تراریخت کردن گیاه توتون به وسیله ژن p5cs نشان دادند که میزان پرولین در گیاه تراریخته افزایش می یابد (یامچی و همکاران، ۱۳۸۳). با توجه به اهمیت تنش های شوری و خشکی در اقلیم های زراعی ایران، ضروری است امکان انتقال ژن p5cs به گیاهان زراعی مهم ایران مورد توجه قرار گیرد. (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۳) در انتقال ژن P5CS در گیاه توتون، اظهار داشتند که ژن P5CS در توتون مشابه با عمل ژن های سنتز کننده بتائین گلیسین مثل CodA، ژن سنتز کننده

^۱ Gamma-glutamyl kinas

^۲ Glutamtl semi aldehyde dehydrogenase

قندهای تری هالوز مثل ostB و otsA، ژن‌های دخیل در هموستازی یون‌ها مانند، $ArNHX_1$ و $AtHKT_1$ و $ArSOS_1$ و ژن‌های سنتز کننده پلی‌ال‌ها مانند $StPD_1$ در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس، کلزا، توتون و سیب زمینی مقاومت به تنش را افزایش می‌دهند، این ژن نیز برای تولید گیاهان مقاوم به خشکی و شوری از پتانسیل بالایی برخوردار می‌باشد (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷).

۵-۱۰ آنزیم اینوزیتول منو فسفاتاز (IMP)

نتایج مشخص نمود که افزایش بیان ژن اینوزیتول منو فسفاتاز در تنش شوری و نیز توانایی ژنوتیپ متحمل در بیان آن نسبت به ژنوتیپ حساس، با نتایج مطالعات داناها و همکاران (۲۰۱۰) و ماجی (۲۰۰۷) سکسانا و سالوی (۲۰۱۳) مطابقت داشت.

دریوکاریوت‌های پرسلولی میواینوزیتول با فسفاتیدیل فسفات، میواینوزیتول فسفات و اسفنگولیپیدها و برخی از مولکول‌هایی که بسیاری از فرآیندهایی مانند تنظیم بیان ژن‌ها، ذخیره سازی فسفر، گروه‌های گیرنده اکسین، اتصال غشاء و فرآیندهای غشایی، تحمل تنش و سنتز الیگوساکاریدها و تنظیم مرگ سولی فعالیت می‌کند. اکسیداسیون محصولات میواینوزیتول (مانند اسید دی گلوکونیک) برای ترکیباتی پکتیکی غیر سلولزی دیواره سلولی استفاده می‌شود و در برخی از موجودات برای سنتز اسید آسکوربیک استفاده می‌گردد، بنابراین میواینوزیتول بسیار حائز اهمیت است (نوربخش و همکاران، ۲۰۱۴). در مرحله اول میواینوزیتول توسط میواینوزیتول منو فسفاتاز، سنتز می‌شود. آنزیم میواینوزیتول منو فسفاتاز نقش حیاتی در سلول دارد. اینوزیتول منو فسفاتاز، آنزیمی مهم در سنتز اینوزیتول‌ها و تجزیه D اینوزیتول (۵و۴) تری فسفات می‌باشد و پیام رسانی ثانویه درگیر در واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه است. ژن کد کننده اینوزیتول منو فسفاتاز در مسیر سنتز میواینوزیتول دارای نقش ویژه است (رحمان و همکاران، ۲۰۱۳). جایگاه فعال IMP اشاره به این دارد که IMP در گیاهان می‌تواند ال گالاکتوز ۱ فسفات را که پیش ماده ای برای سنتز اسید آسکوربیک را کاتالیز کند. مطالعات نشان دادند که جهش در IMP در آرابیدوپسیس تولید اسید آسکوربیک و اینوزیتول کاهش ایجاد می‌کند. گیاهان ژن‌های چند گانه MIP1 دارند که کد گذاری آنزیم‌های مشابه را بر عهده دارند. در آرابیدوپسیس ۳ ژن وجود دارد که پروتئین میواینوزیتول فسفاتاز را کد می‌کند. (MIPS1-3) در مطالعاتی مشخص شد که آنزیم میواینوزیتول فسفاتاز توسط دو ژن cam_1ps_1 و cam_1ps_2 کد گذاری شده است (سکسانا و همکاران، ۲۰۱۳).

۵-۱۱ آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

در این پژوهش مشخص شد که ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در تنش ۲۰۰ میلی مولار در بیان این ژن نسبت به والد عراقی موفق تر بود و این نتایج با مطالعات اپل و همکاران (۲۰۱۴) و حقیقی و همکاران (۱۳۹۲)، ولی فرد و همکاران (۲۰۱۴)، مبنی بر افزایش بیان این ژن تحت تنش های محیطی جهت تولید متابولیت های فنولی همسو بود.

فنیل آلانین آمونیا لیاز PAL آنزیم اصلی در اتصال مسیر سنتزی اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت های ثانویه، شامل گروه وسیعی از ترکیبات فنولی است و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانوییدی ایفا می کند. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر مرحله رشد، تمایز یابی سلول و همچنین تنش های زنده و غیر زنده تغییر می کند، به طوری که بیان شده است، آلودگی به عوامل بیماریزا، زخم های مکانیکی، تابش UV، خشکی، شوری، اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت PAL می شوند (ولی فرد و همکاران، ۲۰۱۴). مسیر فنیل پروپانوییدی، مسیر اولیه تولید بسیاری از ترکیبات طبیعی مانند اسیدهای هیدروکسی سینامیک و سپس فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، لیگنین، کومارین، استیلبن و طیف وسیعی از سایر مواد فنولی است. این ترکیبات در گیاه نقش های مهمی چون حفاظت در برابر تنش های زنده و غیر زنده، سیگنال های بین سلولی، محافظت در برابر نور و به ویژه UV و همچنین حفاظت های مکانیکی را به عهده دارند (قلی زاده و همکاران، ۲۰۱۰). در واقع PAL امکان تبدیل فنیل آلانین به ترانس اسید سینامیک را فراهم ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنولی می شود. ترانس اسید سینامیک پیش ماده اصلی تولید فلاونوئیدها و لیگنین هاست و بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوییدی می گردد (اپل و همکاران، ۲۰۱۴). در ساخت بیشتر ترکیبات فنولی در گیاه مسیر شیکمیک اهمیت دارد (گوپتا و همکاران، ۲۰۱۴). در واقع فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیم حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. آنزیم PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوییدها است و عمل اصلی آن دآمیننه کردن غیراکسیداتیو آمینواسید L- فنیل آلانین و تبدیل آن به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید می باشد. سینامیک اسید به عنوان ماده اولیه، در مسیرهای بیوسنتزی متفاوتی مصرف می شود در ادامه مسیر با فعالیت آنزیم های سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H)، ۴- کومارات- کوآ لیگاز (4CL)، و سینامول کوآ ردوکتاز (CCR)، متابولیت های دیگری از جمله P- کومارآلدئید، کونیفرآلدئید و سیناپآلدئید تولید می شود که این ترکیبات توسط سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) به فرم الکی خود تبدیل می شوند. این ترکیبات زیرواحدهای سازنده انواع فلاونوئیدها و لیگنان ها و لیگنین هستند (ولی فرد، ۲۰۱۵).

۵-۱۲ نتیجه‌گیری کلی

وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات مهم مرتبط با تحمل به شوری در این بررسی نوید بخش بکارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی است. بررسی میزان پرولین و سایر صفات موفولوژیک در این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های زودرس $\times$ پاکستانی، هندی $\times$ پاکستانی، زودرس $\times$ عراقی مقاوم‌ترین و ژنوتیپ‌های زودرس، یکتا $\times$ TN234 و عراقی حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش شوری هستند. طبق این نتایج، مشخص شد که برخی از ژنوتیپ‌های کنبه از قبیل زودرس $\times$ پاکستانی، هندی $\times$ پاکستانی در مرحله جوانه‌زنی به شدت تحت تاثیر تنش قرار گرفتند و کاهش چشمگیری نشان دادند در حالی که همین ژنوتیپ‌ها در مرحله گیاهچه‌ای در برابر تنش مقاوم شده و رشد خوبی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. این بیانگر آن است که کنبه در مرحله جوانه‌زنی حساس به تنش شوری است اما در مرحله گیاهچه‌ای مقاومت مطلوبی نسبت به تنش شوری از خود نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از استخراج متابولیت‌ها، تفاوت در حضور یا عدم حضور برخی متابولیت‌ها و نیز تفاوت در مقادیر متابولیت‌های تولید شده توسط دو ژنوتیپ حساس و متحمل را نشان داد. طبق این نتایج، کربوهیدرات‌هایی از قبیل گلوکز و فروکتوز در طی تنش شوری در هر دو ژنوتیپ به شدت کاهش یافتند و اما هردو ژنوتیپ تحت شرایط تنش همچنان به تولید گالاکتوز ادامه دادند. پلی‌ال‌ها یا قندهای الکلی از دیگر متابولیت‌های تولیدی توسط دو ژنوتیپ بودند که اینوزیتول‌ها یکی از این پلی‌ال‌ها بشمار می‌آیند و نقش بسزایی در تحمل تنش دارد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ زودرس $\times$ پاکستانی به تولید مقدار بیشتری از آن موفق بود. ژنوتیپ‌های کنبه ترکیبات فنولی را نیز از جمله اسید بنزوئیک تولید کردند که مجدداً ژنوتیپ متحمل زودرس $\times$ پاکستانی مقدار بیشتری از آن را به خود اختصاص داد. در بین دو ژنوتیپ تفاوت چشمگیری در میزان پرولین به چشم خورد که می‌تواند از عوامل اصلی تحمل به تنش در ژنوتیپ متحمل باشد. ژنوتیپ حساس با وجود برخورداری از برخی ترکیباتی نظیر اسیدآمینوهای والین و آلانین، اسید بتا آمینو بوتریک که موثر در تحمل به تنش هستند، احتمالاً به دلیل تولید مقدار بسیار کمتری پرولین نسبت به ژنوتیپ متحمل و نیز داشتن مقدار کمتری میواینوزیتول، گلیسین، اسید بنزوئیک، اسیدهای چرب هگزادکانوئیک و اکتادکانوئیک و اسید گاما آمینوبوتریک، از تحمل کمتری نسبت به تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نسبت به هیبرید متحمل زودرس $\times$ پاکستانی برخوردار بود. طبق این نتایج می‌توان پرولین را، اسمزای مهم در تحمل به تنش شوری در گیاهچه کنبه دانست که ژنوتیپ زودرس $\times$ پاکستانی به دلیل برخورداری از مقدار بیشتری پرولین به همراه سایر ترکیبات از تحمل بیشتری برخوردار بود و رشد مطلوب تری داشت و از برگ‌های شاداب تر و طول ریشه‌چه و

ساقه‌چه بیشتر و قطور تر و نیز با وزن خشک و تر بیشتری برخوردار بود. نتایج حاصل از رگرسیون مرحله‌ای برای توجه تغییرات صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در این مطالعه، نشان داد در شرایط شور از بین متابولیت‌های شناسایی شده اریتریتول، والین، اسید هگزادکانوئیک، اسید آن بوتریک، ۲ و ۴ پنتا دی نیتریل، بوتیل آمین، اسید بتا آمینوبوتریک، کربازول، اسید بنزن دی کربوکسیلیک، زایلیتول و گلیسین بیشترین تاثیر را در تغییرات صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در کنجد داشتند. نتایج بیان ژن‌های پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منوفسفاتاز، فنیل آلانین آمولیز ۱ نتایج استخراج متابولیت‌ها را تایید نمود و همسو با آن‌ها بود. براساس این نتایج مشخص شد که هردو ژنوتیپ قادر به بیان این سه ژن در شرایط تنش بودند، این درحالی بود که ژنوتیپ متحمل زودرس X پاکستانی در بیان این ژن‌ها در شرایط تنش شوری (۲۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) نسبت به والد عراقی موفق‌تر عمل نمود. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژن‌های پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منوفسفاتاز را نسبت به ژن فنیل آلانین آمونیا لیا ۱ بیشتر بیان نمودند.

پیشنهادهات

- با وجود تنوع ژنتیکی از نظر صفات مرتبط با تحمل به شوری و برتری برخی ژنوتیپ‌ها، ژرم پلاسما گسترده تری از کنجد برای بررسی تحمل به شوری، به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد.
- جهت تایید بیشتر، پیشنهاد می شود که نتایج با دستگاه پیشرفته دیگری نظیر NMR تکرار گردد.
- بیان ژن‌های مربوط در مسیر بیوسنتز سایر متابولیت‌های استخراجی در ژنوتیپ متحمل در شرایط عدم تنش و تنش شوری، جهت یافتن ژن‌های کلیدی و موثر دیگری در شرایط تنش شوری مورد بررسی قرار گیرد.
- در قسمت بیان ژن از دستگاه های Real Time PCR استفاده شود.
- نتایج این مطالعه ژنوتیپ‌هایی مانند زودرس X پاکستانی، هندی X پاکستانی و نیز عراقی، زودرس، داراب ۱، یکتا X TN234 را به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به شوری معرفی نمود. پیشنهاد می‌گردد که در خصوص مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات و متابولیت‌های مرتبط با تحمل به شوری در این ژنوتیپ‌ها اقدام گردد.
- مطالعه بیان خانواده‌های ژنی و تعیین چگونگی تغییرات آن‌ها و تعیین اینکه کدام یک به طور اختصاصی در پاسخ به تنش شوری موثر هستند.

پوست

جدول پیوست ۱: نام و مشخصات لاین‌های والدینی کنجد ارزیابی شده در این پژوهش

ژنوتیپ	کد شناسایی	خاستگاه
TN234	۳	ایران - خوزستان
پاکستانی	۱۳	پاکستان
زودرس	۱۵	حاشیه مدیترانه
پاکستانی	۱۳	پاکستان
زودرس	۱۵	حاشیه مدیترانه
هندی	۳۲	هند
ورامین ۲۸۲۲	۳۳	ایران - اصفهان
TN240	۳۸	ایران - خوزستان
یکتا	۴۴	ایران - ناشناخته
داراب ۱	۶۵	ایران - فارس
عراقی	۷۴	عراق

جدول پیوست ۲: عناصر ماکرو محلول هوگلند

عناصر ماکرو مورد استفاده در محلول هوگلند

وزن نمک مورد نیاز در ۱۰۰۰ میلی لیتر	فرمول ماده شیمیایی	نام ماده شیمیایی
۰/۲	KNO_3	نترات پتاسیم
۰/۰۰۹	$CaN_2O_6 \cdot 4H_2O$	نترات کلسیم
۰/۶	$NH_4H_2PO_4$	آمونیم دی هیدروژن فسفات

جدول پیوست ۳: عناصر میکرو محلول هوگلند

عناصر میکرو مورد استفاده در محلول هوگلند

نام ماده شیمیایی	فرمول ماده شیمیایی	وزن نمک مورد نیاز (گرم در لیتر)	حجم مورد نیاز از محلول‌های میکرو (میلی لیتر)
سولفات آهن	$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	۰/۳۶۴	۱۰۰
اتیلن دی آمین تترا استیک اسید	EDTA	۰/۸۹	۱۰۰
اسید مولیبدیک	$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۲۰۱	۱۰۰
اسید بوریک	H_3BO_3	۰/۰۳	۱۰۰
کلرو منگنز	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۱۸	۱۰۰
سولفات روی	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۱	۱۰
سولفات مس	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۰۹	۱۰

جدول پیوست ۴: هدایت الکتریکی محلول هوگلند (دسی زیمنس بر متر)

محلول	مقدار و EC محلول			
محلول هوگلند بدون نمک	۱/۸	۱/۴	۱/۲	هوگلند کامل
EC محلول هوگلند	۰/۳۵	۱/۰۴	۱/۶	۱/۸۶
محلول هوگلند + NaCl	NaCl ۱/۲۰	NaCl ۱/۱۵	NaCl ۱/۱۰	NaCl کامل
EC ۱۵۰ میلی مولار NaCl	۱/۶۴	۲/۰	۲/۱۰	۱۰
EC ۲۰۰ میلی مولار NaCl	۲/۰	۲/۱۱	۲/۹۱	۱۶

جدول پیوست ۵ میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر

ژنوتیپ	درصد جوانه‌زنی	ژنوتیپ	سرعت
داراب ۱ × TN240	۹۰/۰۰	عراقی × پاکستانی	۰/۶۶۹
TN240	۸۶/۶	داراب ۱ × TN240	۰/۶۴۷
عراقی × TN234	۸۵/۲	ورامین	۰/۶۴۶
ورامین × داراب ۱	۸۳/۵	پاکستانی × داراب ۱	۰/۶۲۶
پاکستانی × داراب ۱	۸۲/۲	پاکستانی	۰/۶۲۳
ورامین	۸۲/۱	یکتا × داراب ۱	۰/۶۲۰
پاکستانی × یکتا	۸۱/۳	داراب ۱ × هندی	۰/۶۲۰
داراب ۱ × هندی	۸۱/۱	پاکستانی × TN234	۰/۶۱۷
زودرس × TN240	۸۰/۶	پاکستانی × یکتا	۰/۶۱۶
ورامین × TN234	۸۰/۶	پاکستانی × ورامین	۰/۶۱۵
ورامین × TN240	۸۰/۰	زودرس × TN240	۰/۶۱۴
داراب ۱	۷۹/۵	هندی × TN240	۰/۶۰۹
یکتا × داراب ۱	۷۹/۴	TN240	۰/۶۰۷
هندی × پاکستانی	۷۸/۱	عراقی × TN234	۰/۶۰۶
عراقی × ورامین	۷۷/۴	ورامین × TN234	۰/۵۹۸
TN234 × زودرس	۷۷/۰	داراب ۱	۰/۵۹۶
عراقی × هندی	۷۶/۳	هندی	۰/۵۹۴
عراقی × داراب ۱	۷۶/۳	یکتا × TN234	۰/۵۹۳
زودرس × یکتا	۷۵/۶	ورامین × داراب ۱	۰/۵۹۰
هندی × TN240	۷۴/۷	عراقی × ورامین	۰/۵۹۰
عراقی × یکتا	۷۴/۱	ورامین × TN240	۰/۵۸۶
زودرس × پاکستانی	۷۴/۰	عراقی × یکتا	۰/۵۸۱
داراب ۱ × TN234	۷۳/۷	زودرس × ورامین	۰/۵۸۰
TN234 × TN240	۷۳/۳	عراقی × هندی	۰/۵۷۶
پاکستانی × TN234	۷۳/۲	TN234	۰/۵۶۸
یکتا × TN240	۷۳/۱	ورامین × پاکستانی	۰/۵۶۸
ورامین × پاکستانی	۷۱/۱	TN234 × TN240	۰/۵۵۳
عراقی	۷۰/۱	داراب ۱ × TN234	۰/۵۵۴
هندی	۷۰/۱	یکتا	۰/۵۵۴
عراقی × TN240	۷۰/۰	یکتا × TN240	۰/۵۵۳
TN234	۶۹/۴	TN234 × زودرس	۰/۵۵۳
زودرس × ورامین	۶۹/۳	عراقی	۰/۵۵۱
یکتا × TN234	۶۷/۷	هندی × پاکستانی	۰/۵۵۰
یکتا	۶۷/۴	یکتا × هندی	۰/۵۴۷
یکتا × هندی	۶۵/۵	زودرس × پاکستانی	۰/۵۴۵
زودرس		زودرس × داراب ۱	۰/۵۵۳

ادامه جدول پیوست ۵: میانگین اثرات اصلی ژنوتیپ برای درصد و سرعت جوانه زنی بذر

ژنوتیپ	درصد	ژنوتیپ	سرعت جوانه زنی (تعداد در روز)
عراقی × پاکستانی	۶۲/۲	هندی × TN234	۰/۵۳۹
زودرس × داراب ۱	۶۳/۳	ورامین × یکتا	۰/۵۲۷
پاکستانی × ورامین	۶۲/۲	پاکستانی × TN240	۰/۵۲۶
زودرس × هندی	۶۲/۰	عراقی × داراب ۱	۰/۵۲۲
هندی × TN234	۶۰/۵	زودرس × یکتا	۰/۵۲۱
زودرس × عراقی	۶۰/۱	عراقی × TN240	۰/۵۱۹
پاکستانی	۵۹/۵	زودرس × هندی	۰/۵۰۴
ورامین × یکتا	۵۸/۳	زودرس	۰/۴۵۶
پاکستانی × TN240	۴۹/۶	زودرس × عراقی	۰/۴۳۶
	۴۹/۲		۰/۳۰۸

جدول پیوست ۶: میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات وزن تر و وزن خشک گیاهچه، میزان پروتئین

ژنوتیپ	وزن تر گیاهچه (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	ژنوتیپ	پروتئین (میلی گرم بر گرم)
ورامین × پاکستانی	۱/۶۳	عراقی × ورامین	۰/۳۲۶	زودرس × پاکستانی	۱/۳۸
عراقی × TN240	۱/۴۹	زودرس × پاکستانی	۰/۲۴۲	پاکستانی × TN240	۱/۳۴
زودرس × پاکستانی	۱/۴۷	عراقی × TN240	۰/۲۴۰	یکتا × هندی	۰/۱۳۳
هندی × پاکستانی	۱/۴۴	TN234	۰/۲۲۳	عراقی × ورامین	۰/۱۱۷
ورامین × TN240	۱/۴۴	ورامین × داراب ۱	۰/۲۱۲	زودرس × TN240	۰/۱۱۳
پاکستانی × ورامین	۱/۳۹	زودرس × داراب ۱	۰/۲۱۱	ورامین × یکتا	۰/۱۱۱
زودرس × یکتا	۱/۳۰	عراقی × داراب ۱	۰/۲۱۱	هندی	۰/۱۰۴
زودرس × TN240	۱/۲۷	ورامین × پاکستانی	۰/۱۹۷	زودرس × عراقی	۰/۱۰۴
عراقی × هندی	۱/۲۴	ورامین × TN234	۰/۱۹۳	پاکستانی × داراب ۱	۰/۰۹۶
زودرس × هندی	۱/۲۳	عراقی × هندی	۰/۱۸۷	پاکستانی × TN234	۰/۰۹۳
هندی × TN234	۱/۲۱	زودرس × داراب ۱	۰/۱۸۷	هندی × پاکستانی	۰/۰۹۱
زودرس × داراب ۱	۱/۱۹	پاکستانی × داراب ۱	۰/۱۷۸	هندی × TN234	۰/۰۸۵

ادامه جدول پیوست ۶: میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای صفات وزن تر گیاهچه، وزن خشک گیاهچه، میزان پرولین

ژنوتیپ	وزن تر گیاهچه (گرم)	ژنوتیپ	وزن خشک (گرم)	ژنوتیپ	پرولین (میلی-گرم برگرم)
زودرس × ورامین	۱/۱۵	هندی × پاکستانی	۰/۱۷۶	پاکستانی × ورامین	۰/۰۸۴
عراقی	۱/۱۴	زودرس × یکتا	۰/۱۷۵	پاکستانی	۰/۰۸۱
هندی	۱/۱۳	پاکستانی × یکتا	۰/۱۷۰	ورامین	۰/۰۷۶
زودرس × عراقی	۱/۱۳	زودرس × TN240	۰/۱۶۱	زودرس × داراب ۱	۰/۰۷۳
TN234 × زودرس	۱/۱۳	TN234 × TN240	۰/۱۵۸	TN234 × زودرس	۰/۰۷۱
داراب ۱ × TN234	۱/۰۹	عراقی × پاکستانی	۰/۱۵۷	عراقی × پاکستانی	۰/۰۶۹
ورامین × TN234	۱/۰۹	ورامین	۰/۱۴۱	عراقی	۰/۰۶۸
ورامین × یکتا	۱/۰۵	هندی	۰/۱۴۱	ورامین × داراب ۱	۰/۰۶۸
عراقی × پاکستانی	۱/۰۴	پاکستانی × ورامین	۰/۱۴۰	یکتا × داراب ۱	۰/۰۶۷
پاکستانی × یکتا	۱/۰۱۷	ورامین × TN240	۰/۱۳۱	داراب ۱ × TN240	۰/۰۶۶
هندی × TN240	۱/۰۰۱	TN240	۰/۱۲۷	عراقی × TN234	۰/۰۶۵
TN234 × TN240	۱/۰۰	ورامین × یکتا	۰/۱۲۷	داراب ۱ × هندی	۰/۰۶۲
TN240	۰/۹۲۵	داراب ۱ × هندی	۰/۱۲۶	TN234	۰/۰۶۱
TN234	۰/۸۹۹	پاکستانی × TN240	۰/۱۲۵	زودرس × یکتا	۰/۰۵۶
پاکستانی × داراب ۱	۰/۸۹۸	عراقی	۰/۱۲۳	یکتا × TN234	۰/۰۵۴
ورامین × داراب ۱	۰/۸۷۷	زودرس × عراقی	۰/۱۲۲	TN234 × TN240	۰/۰۵۳
پاکستانی × TN234	۰/۸۷۳	داراب ۱ × هندی	۰/۱۲۲	عراقی × یکتا	۰/۰۵۰
یکتا × TN240	۰/۸۶۸	یکتا × داراب ۱	۰/۱۲۱	زودرس × هندی	۰/۰۵۰
عراقی × TN234	۰/۸۱۴	یکتا × TN240	۰/۱۲۰	TN240	۰/۰۴۹
پاکستانی × TN240	۰/۸۰۸	پاکستانی	۰/۱۱۲	داراب ۱ × TN234	۰/۰۴۸
ورامین	۰/۸۰۷	پاکستانی × TN234	۰/۱۰۵	یکتا × TN240	۰/۰۴۸
داراب ۱ × هندی	۰/۸۷۰	داراب ۱	۰/۱۰۳	هندی × TN240	۰/۰۴۶
پاکستانی	۰/۸۰۰	هندی × TN234	۰/۱۰۳	عراقی × TN240	۰/۰۴۴
داراب ۱	۰/۷۷۷	داراب ۱ × TN234	۰/۱۰۱	پاکستانی × یکتا	۰/۰۴۴
عراقی × داراب ۱	۰/۷۳۱	ورامین × TN240	۰/۰۹۷۷	زودرس × ورامین	۰/۰۴۰
یکتا	۰/۷۲۷	زودرس × هندی	۰/۰۹۲۸	ورامین × پاکستانی	۰/۰۳۶
یکتا × داراب ۱	۰/۷۲۰	یکتا × هندی	۰/۰۸۳۲	ورامین × TN240	۰/۰۳۶
عراقی × ورامین	۰/۶۸۹	هندی × TN240	۰/۰۸۱	عراقی × داراب ۱	۰/۰۳۶
یکتا × هندی	۰/۶۸۷	عراقی × TN234	۰/۰۸۰	یکتا	۰/۰۳۵
یکتا × TN234	۰/۶۷۵	یکتا	۰/۰۶۴	ورامین × TN234	۰/۰۳۵
داراب ۱ × TN240	۰/۶۵۹	عراقی × یکتا	۰/۰۵۶۶	عراقی × هندی	۰/۰۳۴
عراقی × یکتا	۰/۶۰۸	زودرس	۰/۰۴۸	زودرس	۰/۰۲۹
زودرس	۰/۴۵۶	یکتا × TN234	۰/۰۴۶	داراب ۱	۰/۰۲۵

جدول ۷ پیوست میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای متابولیت‌های استخراج شده

ژنوتیپ	گلوکز	فروکتوز	آلفا دی	لووگلوکوزان	گالاکتوز	میواینوزیتول	زایلپیتون	دی مانیتول	سوربیتول	اریتریتول	گلیسرول	اسید پروپانوئیک
گلوکو پیرانوزید												
زودرس×پاکستانی	۰	۱/۶۹۳	۰/۷۲۷۹	۰	۳/۶۲۰	۲/۹۹۵	۰	۲/۳۵۰	۱/۰۲۷	۰/۱۶۲۸	۴/۳۰۸	۰/۱۸۱۴
عراقی	۰/۳۰۳۶	۱/۱۰۰	۰/۵۰۹۲	۰/۳۳۸۶	۳/۳۶۲	۱/۳۶۱	۱/۵۵۴	۱/۰۸۶	۰	۰/۱۰۰۰	۷/۲۹۳	۰/۲۸۲۲

ادامه جدول ۷ پیوست میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای متابولیت‌های استخراج شده

ژنوتیپ	اسید	اسید	اسید	اسید	بوتیل	سیلانامین	بتا آلانین	والین	ال	گلیسین	ال سرین	ال	اسید گاما	اسید بتا
	بنزوئیک	هگزادکانوئیک	اکتادکانوئیک	اولئیک	آمین			پرولین			ترئونین		آمینوبوتریک	آمینو
بوتریک														
زودرس×پاکستانی	۰/۹۹۱۶	۱/۳۴۲	۰/۷۵۷۱	۰/۲۴۶۵	۰/۱۱۰۳	۱۱/۴۲	۰	۰/۱۳۷۰	۴/۸۰۷	۰/۵۶۹	۰	۰/۳۵۴۱	۰/۴۸۱۸	۰
عراقی	۰/۳۲۶۴	۱/۴۹۲	۰/۰۶۰۱	۰	۰	۰	۱/۱۷۲	۰/۱۴۰۴	۱/۶۲۴	۰	۰/۳۵۴۱	۰	۳/۷۲۰	۰/۰۹۱۸

ادامه جدول ۷ پیوست میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای متابولیت‌های استخراج شده

ژنوتیپ	اسید	اسید	اسید	اسید دی	اسید او۴	اسید ان	کربازول	۲و۴	اسید فسفریک
	بوتادنوئیک	مالیک	سیتریک	گلوکونیک	بنزن دی	بوتریک		پنتادی	
کربوکسیلیک									
نیتریل									
زودرس×پاکستانی	۰/۱۸۵	۱۱/۴۲	۰	۰/۰۷۵۷	۱/۰۳۹۴	۰/۱۴۵۶	۰/۶۶۵۰	۰	۳/۶۴۳
عراقی	۰/۱۷۵	۰	۰/۱۴۶۵	۰/۲۳۲۸	۱/۰۱۸۵	۰	۰/۴۰۵۲	۰/۲۲۳۳	۷/۹۹۹

جدول پیوست ۸ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای صفت درصد جوانه‌زنی

مرحله	صفات	عرض از مبدا	اریتریتول	طول ریشه‌چه	وزن خشک گیاهچه	وزن تر گیاهچه	اسید دی گلوکونیک	اسید گاما آمینوبوتریک	اسید بوتادنوئیک	قطر ساقه‌چه	کربازول	گلیسین	جز ² R ²	مدل ² R ²
۱	اریتریتول	۹۶/۸**	-۲۲۱/۶**										۰/۹۲	۰/۹۲
۲	طول ریشه‌چه	۶۷/۲**	-۱۶۶/۷**	۰/۳۲*									۰/۰۳	۰/۹۶
۳	وزن خشک گیاهچه	۶۰/۷**	-۱۴۷/۳**	۰/۳۱*	۳۵/۴ ^{ns}								۰/۰۰۷	۰/۹۷
۵	اسید دی گلوکونیک	۷۲/۸**	-۱۶۰/۳**	۰/۳۱**	۲۴۷/۶**	-۳۴/۱**	۱۹/۱ ^{ns}						۰/۰۰۲	۰/۹۹
۶	اسید گاما آمینوبوتریک	۶۸/۳**	-۱۳۲/۸**	۰/۳۰**	۲۱۷/۸**	-۳۰/۳**	۷۷/۵ ^{ns}	-۳/۸۱ ^{ns}					۰/۰۰۲	۰/۹۹
۷	اسید بوتادنوئیک	۴۸/۴**	-۱۱۹/۴**	۰/۳۰**	۲۱۴/۶**	-۲۵/۰**	۸۵/۰*	-۳/۴۷ ^{ns}	۵۷/۲ ^{ns}				۰/۰۰۲	۰/۹۹
۸	قطر ساقه‌چه	۴۸/۰*	-۱۲۳/۲**	۰/۳۴**	۱۹۵/۱*	-۲۱/۲ ^{ns}	۸۴/۸*	-۳/۷۷ ^{ns}	-۶۸/۳ ^{ns}	-۳/۴۰ ^{ns}			۰/۰۰۲	۰/۹۹
۹	کربازول	۶۹/ ۸**	-۱۲۹/۵**	۰/۳۹**	۱۶۷/۳**	-۱۲/۵ ^{ns}	۱۰۹/۰**	-۷/۱۷*	۳۲/۱ ^{ns}	-۱۰/۴*	-۲۱/۵*		۰/۰۰۱	۰/۹۹
۱۰	گلیسین	۱۰۰/ ۴**	-۱۵۶/۸**	۰/۳۴**	۲۲۷/۸**	-۱۹/۲**	۱۳۱/۶**	-۱۱/۳**	۱۱/۱*	-۳/۴۵*	-۵۹/۲**	-۱۴/۳**	۰/۰۰۰۱	۱/۰۰

^{ns} و^{***} به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول پیوست ۹ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای صفت سرعت جوانه‌زنی

مرحله	صفات	عرض از مبدا	والین	اسید هگزادکانوئیک	طول ساقه‌چه	گالاکتوز	ال ترئونین	اسیدمالیک ۵	قطر ساقه‌چه	اسید گاما آمینو بوتریک	طول ریشه‌چه	بتا آلانین	جز ² R ²	مدل ² R ²
۱	والین	۰/۸۲**	-۱/۶۵**										۰/۹۵	۰/۹۵
۲	اسید هگزادکانوئیک	۰/۹۲**	-۱/۳۹**	-۰/۰۹**									۰/۰۲	۰/۹۸
۳	طول ساقه‌چه	۱/۰۳**	-۱/۶۱**	۰/۰۸**	۰/۰۰۱*								۰/۰۰۸	۰/۹۸
۴	گالاکتوز	۰/۹۹**	-۱/۹۲**	-۰/۱۰ ^{ns}	-۰/۰۰۱**	۰/۰۳ ^{ns}							۰/۰۰۴	۰/۹۹
۵	ال ترئونین	۱/۰۳**	-۲/۰۰**	۰/۱۴**	-۰/۰۰۱**	۰/۰۴*	-۰/۰۵ ^{ns}						۰/۰۰۱	۰/۹۹
۶	اسید مالیک	۱/۳۶**	-۳/۰۹**	-۰/۱۲**	-۰/۰۰۱**	۰/۰۳*	-۰/۲۴*	-۰/۲۷*					۰/۰۰۳	۰/۹۹
۷	قطر ساقه‌چه	۱/۵۲**	-۳/۶۷**	-۰/۱۰**	-۰/۰۰۱*	۰/۰۳*	-۰/۳۱**	-۰/۴۱*	-۰/۰۳ ^{ns}				۰/۰۰۰۸	۰/۹۹
۸	اسید گاما آمینو بوتریک	۱/۵۲**	-۳/۴۸**	-۰/۱۲**	-۰/۰۰۰۹**	۰/۰۳**	-۰/۳۵**	-۰/۲۹*	-۰/۰۵*	-۰/۰۱*			۰/۰۰۰۸	۰/۹۹
۹	طول ریشه‌چه	۱/ ۶۰**	-۳/۵۷۰**	-۰/۱۱**	-۰/۰۰۰۶*	۰/۰۲*	-۰/۳۹**	-۰/۳۴*	-۰/۰۵*	-۰/۰۱*	-۰/۰۰۰۳ ^{ns}		۰/۰۰۰۱	۱/۰۰
۱۰	بتا آلانین	۱/ ۶۶**	-۳/۸۹**	-۰/۱۱**	-۰/۰۰۰۷**	۰/۰۲**	-۰/۳۶**	-۰/۴۷**	-۰/۰۵**	-۰/۰۲**	-۰/۰۰۰۳**	۰/۳۰**	۰/۰۰	۱/۰۰

^{ns} و^{***} به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد



جدول پیوست ۱۰ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای صفت طول ساقه‌چه													
مرحله	صفات	عرض از مبدا	طول ریشه‌چه	اسیدان بوتریک	اسید ۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	سرعت جوانه‌زنی	پرولین	اسید بوتادنوئیک	اسید اولئیک	گلیسرول	اسید بنزوئیک	دی مانیتول	جز ² R ² مدل
۱	طول ریشه‌چه	۷/۵۴ ^{ns}	۱/۰۸**										۰/۸۸
۲	اسیدان بوتریک	۲۱/۸ ^{ns}	۰/۹۳**	-۵۶/۷ ^{ns}									۰/۹۱
۳	اسید ۱و۴ بنزن دی کربوکسیلیک	۵۲/۰۶ ^{ns}	۰/۷۷**	-۶۷/۶ ^{ns}	-۱۸/۰۲ ^{ns}								۰/۹۲
۴	سرعت جوانه‌زنی	۷۳/۳ ^{ns}	۰/۸۰**	-۷۴/۹ ^{ns}	-۲۷/۷ ^{ns}	-۲۱/۴ ^{ns}							۰/۹۳
۵	پرولین	۲۶۰/۰ ^{ns}	۰/۶۴*	-۳۰۸/۰ ^{ns}	-۴۰/۶ ^{ns}	-۲۰۹/۳ ^{ns}	-۱۰/۳ ^{ns}						۰/۹۵
۶	اسید بوتادنوئیک	۲۹۶/۹ ^{ns}	۰/۶۵*	-۴۲۰/۸ ^{ns}	-۴۰/۹ ^{ns}	-۲۷۵/۱ ^{ns}	-۱۶/۲ ^{ns}	۱۶۲/۷ ^{ns}					۰/۹۶
۷	اسید اولئیک	۳۱۶/۰ ^{ns}	۰/۸۷*	-۴۲۶/۶ ^{ns}	-۳۲/۰۰ ^{ns}	-۳۳۵/۳ ^{ns}	-۳۰/۵۷ ^{ns}	۲۵۱/۷ ^{ns}	۱۸۷/۳ ^{ns}				۰/۹۷
۸	گلیسرول	۲۹۰/۷ ^{ns}	۰/۹۱*	-۴۴۲/۱ ^{ns}	-۲۵/۱ ^{ns}	-۳۹۴/۴ ^{ns}	-۳۶/۴ ^{ns}	۳۱۶/۱ ^{ns}	۳۳۴/۷ ^{ns}	۷/۲۰ ^{ns}			۰/۹۸
۹	اسید بنزوئیک	۲۳۲/۱*	۱/۰۶**	-۶۰۹/۵*	-۱۰/۶ ^{ns}	-۴۹۲/۶*	-۶۱/۰*	۴۶۹/۰*	-۱۲/۲ ^{ns}	۲۰/۱۳*	۱۰۵/۰*		۰/۹۹
۱۰	دی مانیتول	۲۱۳/۱*	۱/۰۴*	-۵۹۵/۶*	-۹/۳۴ ^{ns}	-۴۸۴/۵*	-۶۰/۲*	۴۷۴/۸*	۴۲۹/۴*	۲۰/۵*	۹۱/۳ ^{ns}	۱۰/۲ ^{ns}	۰/۹۹

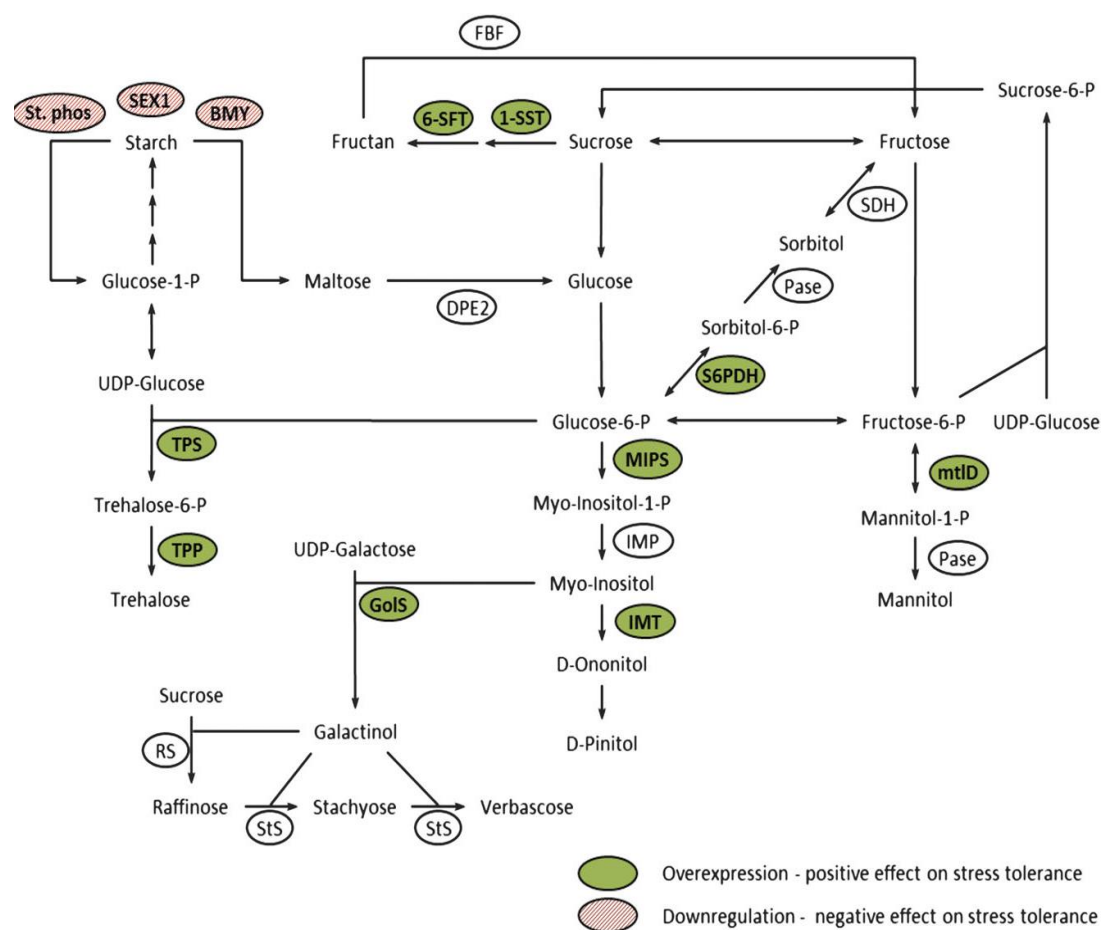
ns و** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول پیوست ۱۱ نتایج رگرسیون مرحله‌ای برای صفت قطر ساقه‌چه												
مرحله	صفات	عرض از مبدا	اسیدان بوتریک	۴و۲ پنتا دی تینریل	ان بوتیل آمین	اسید بتا آمینوبوتریک	گالاکتوز	سیلانامین	لووگلوکوزان	وزن خشک گیاهچه	اسید اولئیک	جز ^۲ R ^۲ مدل
۱	اسیدان بوتریک	۱/۶۲**	-۳/۴**									۰/۷۴
۲	۴و۲ پنتا دی تینریل	۱/۶۱**	-۴۳/۰**	۲۵/۹*								۰/۸۷
۳	ان بوتیل آمین	۱/۴۸**	-۴۴/۰**	۲۶/۹**	۱/۷۹**							۰/۹۷
۴	اسید بتا آمینوبوتریک	۱/۴۸**	-۶۱/۱**	۱۶/۴**	۱/۷۸**	۵۲/۴**						۰/۹۹
۵	گالاکتوز	۱/۵۵**	-۶۰/۸**	۱۶/۹**	۱/۶۷**	۵۰/۸**	ns -۰/۰۱					۰/۹۹
۶	سیلانامین	۱/۶۲**	-۶۰/۱۴**	۱۸/۴**	۱/۲۳**	۴۶/۹**	* -۰/۰۵	ns ۰/۰۰۹				۰/۹۹
۷	لووگلوکوزان	۰/۷۸**	-۶۳/۲*	۲۶/۶**	۱/۵۳**	۳۶/۱**	** -۰/۰۴	** ۰/۰۷	** ۱/۲۲			۱/۰۰
۸	وزن خشک	۰/۷۸**	-۶۳/۱**	۲۶/۵**	۱/۴۳**	۳۶/۰**	** -۰/۰۴	** ۰/۰۷	** ۱/۲۱	** ۰/۰۷		۱/۰۰
	گیاهچه											
۹	اسیداولئیک	۰/۷۹**	-۶۳/۱**	۲۶/۵**	۱/۴۴**	۳۶/۰**	** -۰/۰۴	** ۰/۰۷	** ۱/۲۴	** ۰/۰۶	** ۰/۰۰۶	۱/۰۰

ns و** به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

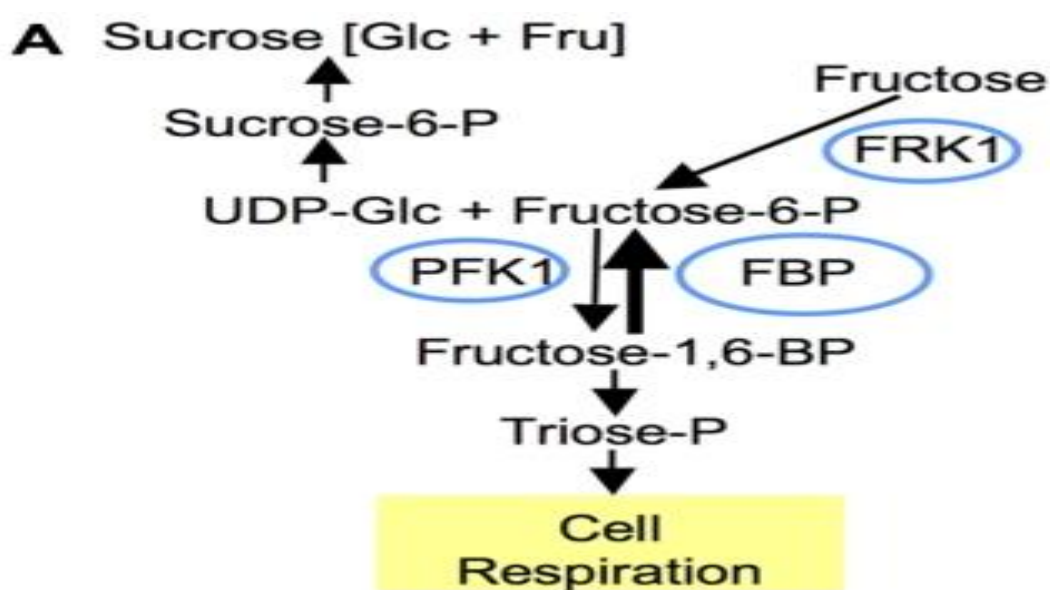
مسیرهای سنتز متابولیت‌ها در گیاهان تحت تنش شوری

شکل پیوست ۱: مروری شماتیک از متابولیسم نشاسته، فروکتان، قندها و پلی‌ال‌ها در گیاهان. گیاهان با افزایش یا کاهش برخی آنزیم‌های مشخص شده در شکل، نسبت به تنش‌های غیر زنده تحمل نشان می‌دهند.

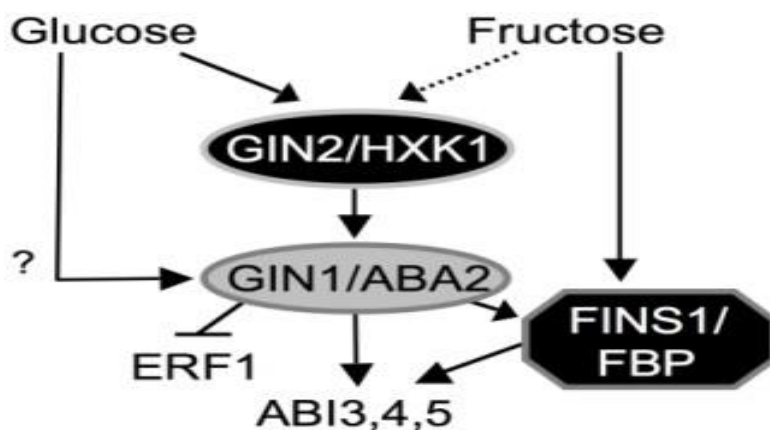


SEX1: α گلوکان دی کیناز. St. phos: فسفوریلاز نشاسته. BMY: بتا آمیلاز. DPE2: گلوکانو ترانسفراز. 1-SST, sucrose: ساکارز-۱ فروکتوزیل ترانسفراز. 6-SFT: ساکارز: فروکتان ۶ فروکتوزیل ترانسفراز. FBF: فروکتان بتا فروکتوزیداز. mtID: مانیتول ۱ فسفات دهیدروژناز. S6PDH: سوربیتول ۶ فسفات دهیدروژناز. SDH: سوربیتول دهیدروژناز. Pase: فسفات‌های غیر اختصاصی. MIPS: اینوزیتول ۱ فسفات سنتتاز. IMP: اینوزیتول ۱ فسفات سنتتاز. IMT: اینوزیتول متیل ترانسفراز. GoS: گالاکتینول سنتتاز. RS: رافینوز سنتتاز. StS: استاکیوز سنتتاز. TPS: ترهالوز ۶ فسفات سنتتاز. TPP: ترهالوز ۶ فسفات سنتتاز. (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

شکل پیوست ۲: مدل شماتیک از مسیر بیوسنتز ساکارز، مسیر متابولیکی فروکتوز شامل فروکتوز کیناز ۱ (FRK1)، فسفو فروکتوز کیناز ۱ (PFK1) و فروکتوز ۱,۶ بیس فسفات (FBP)، (تادن و همکاران، ۲۰۰۷).

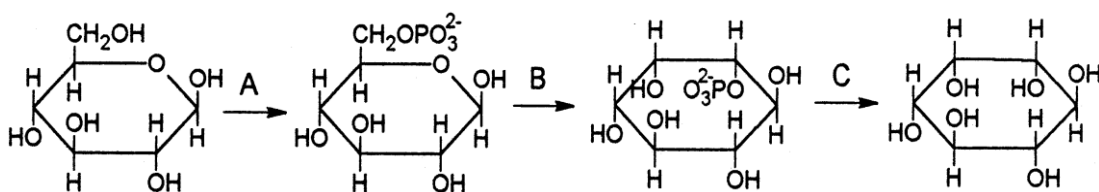


شکل پیوست ۳: مسیر مدل شبکه سیگنالینگ هگزوزها در آرابیدوپسیس

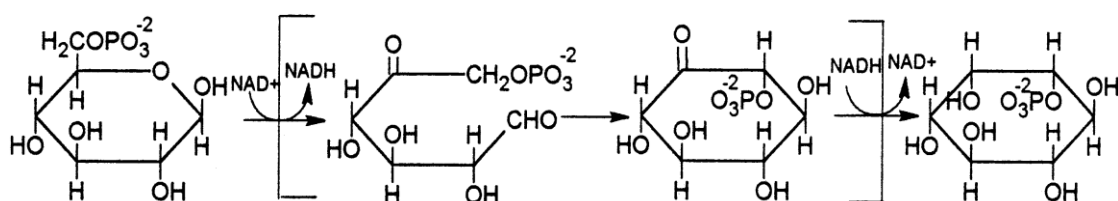


HXK1/GIN2 وابسته به عمل سیگنال‌های گلوکز در بالا دست ژن HXK1/GIN2 در حالی که FINS1/FBP وابسته به عمل سیگنال‌های گلوکز در پایین دست ژن FINS1/FBP هستند. سیگنالینگ گلوکز نیز ممکن است به طور مستقیم به GIN1 / ABA2 ادغام شود. تنها بخش کوچکی از سیگنالینگ فروکتوز ممکن است از طریق GIN2 / HXK1 رخ می‌دهد. هر دو سیگنال، هگزوز مثبت و منفی به ترتیب تعدیل‌کننده پاسخ اسید آسبیزیک و اتیلن می‌باشد (بوچهولز و همکاران، ۲۰۰۲).

شکل پیوست ۴: مسیر بیوسنتز میواینوزیتول

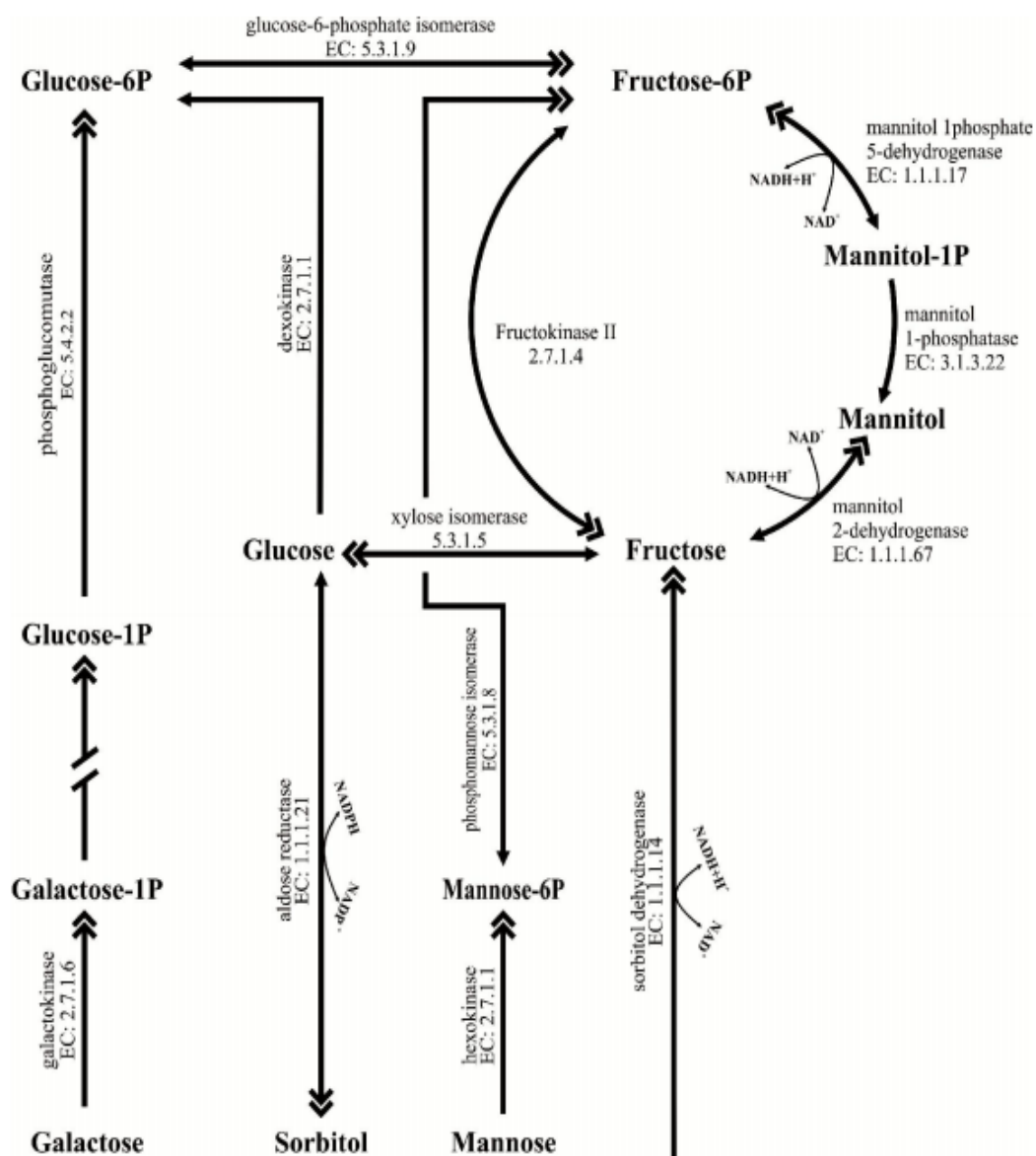


الف: آنزیم‌های مسیر تبدیل آلفا دی گلوکوز به میواینوزیتول: آنزیم هگزاکیناز (A)، اینوزیتول تری فسفات سنتتاز (B)، میواینوزیتول منو فسفات سنتتاز (C).



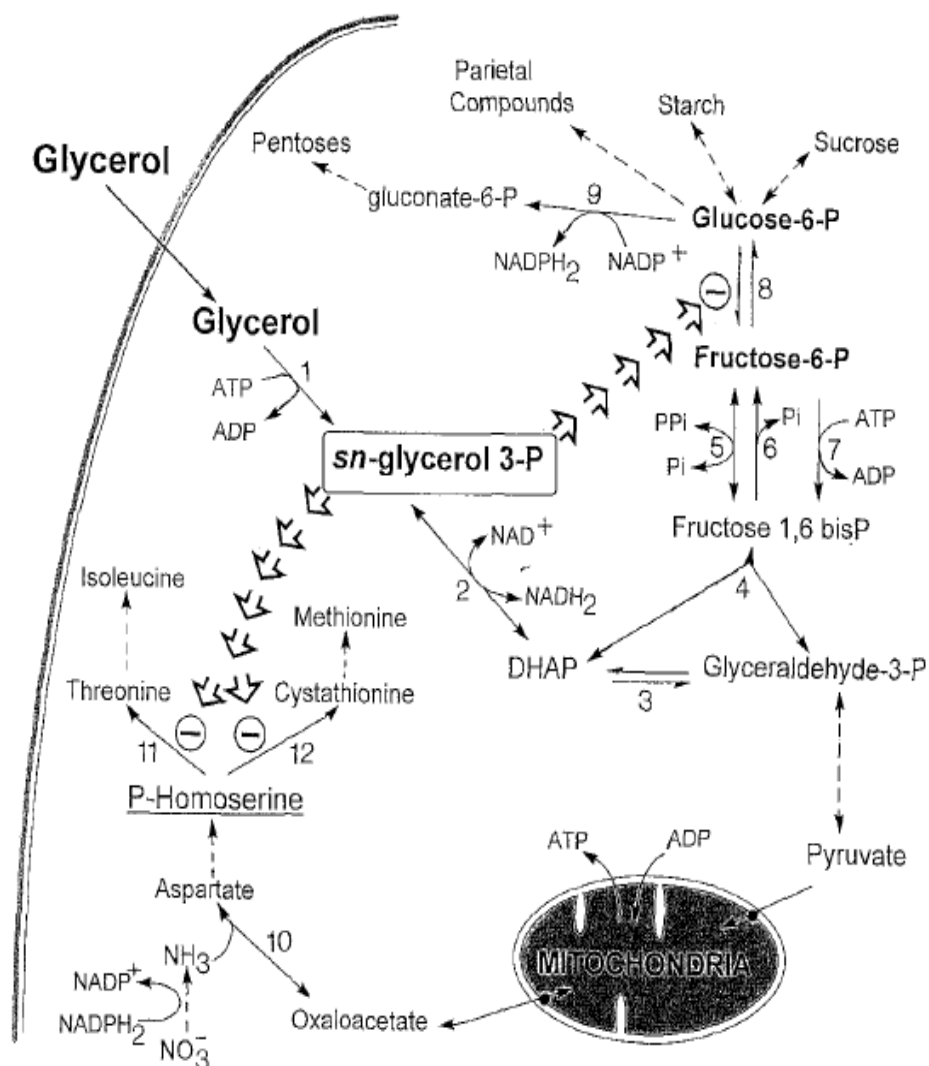
ب: مکانیزیم عمل آنزیم میواینوزیتول منوفسفات سنتتاز در مرحله اکسیداسیون (لیو و همکاران، ۲۰۱۱).

شکل پیوست ۵: مسیر سنتز مانیتول و سوربیتول



مسیر بیوسنتز قندها با واکنش ناشی از mtLD. فلش‌های دوسر بیان بیشتر ژن mtLD را نشان می‌دهد (رحمان و همکاران، ۲۰۱۳)

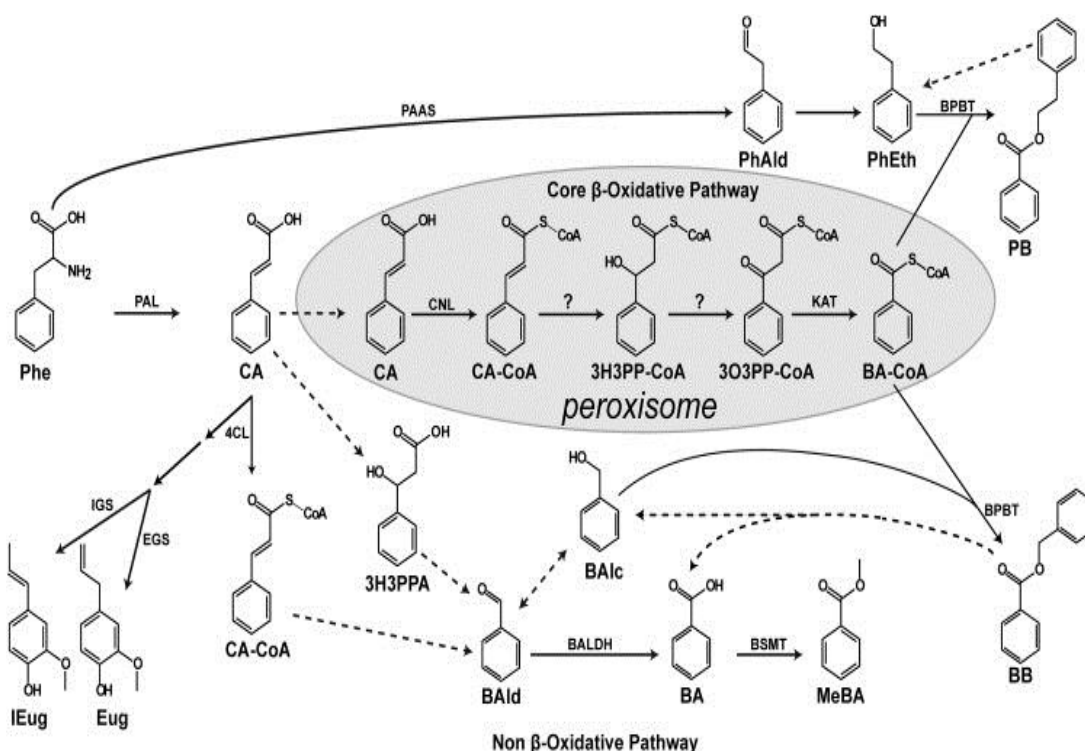
شکل پیوست ۶: مسیر بیوسنتز گلیسرول



شماره‌های روی فلش‌ها آنزیم‌های دخیل در این مسیر را نشان می‌دهند. ۱: گلیسرول کیناز. ۲: sn گلیسرول ۳ فسفات: NAD⁺ اسیدو ردوکتاز. ۳: تریوز فسفات ایزومراز. ۴: فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات آلدولاز. ۵: پیروفسفات: فروکتوز ۶ فسفات فسفوترانسفراز. ۶: فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفاتاز. ۷: فروکتوز ۶ فسفات کیناز. ۸: گلوکز ۶ فسفات ایزومراز. ۹: گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز. ۱۰: گلوتمات اگزوالواستات ترانس آمیناز. ۱۱: ترئونین سنتتاز. ۱۲: سیستاتیونین سنتتاز.

P هموسرین ، O فسفو هموسرین. DHAP: دی هیدروکسی استون فسفات (شن و همکاران، ۱۹۹۹).

شکل پیوست ۷: مسیر بیوسنتز اسید بنزوئیک.



مسیر β -اکسیداتیو ارائه شده به عمل کاتابولیسم اسیدهای چرب و برخی از شاخه‌های زنجیره‌ای اسیدهای آمینه در پراکسی زوم گیاه مشابه است. در این مسیر، اولین گام تبدیل اسید سینامیک به تیواستر کوآنزیم A^1 سینامول کوآنزیم A^2 ، توسط لیگاز پراکسیزومی سینامات کوآنزیم A (PHCNL) کاتالیز می‌شود. متعاقباً تشکیل بنزوئیل-CoA نیاز به سه واکنش متوالی (اسید سینامیک کوآنزیم A $\rightarrow$ A^3 - هیدروکسی- A^3 - فنیل پروپانوئیل کوآنزیم A^4 $\rightarrow$ A^5 - فنیل پروپانوئیل کوآنزیم A^6 $\rightarrow$ اسید بنزوئیک کوآنزیم A) است. آخرین گام در این مرحله توسط A^3 کتوزیل کوآنزیم A تیولاز پروکسی زومی A^6 صورت می‌گیرد (کوالی و همکاران، ۲۰۱۲).

γ CoA thioester

ν peroxisomal cinnamate-CoA ligase

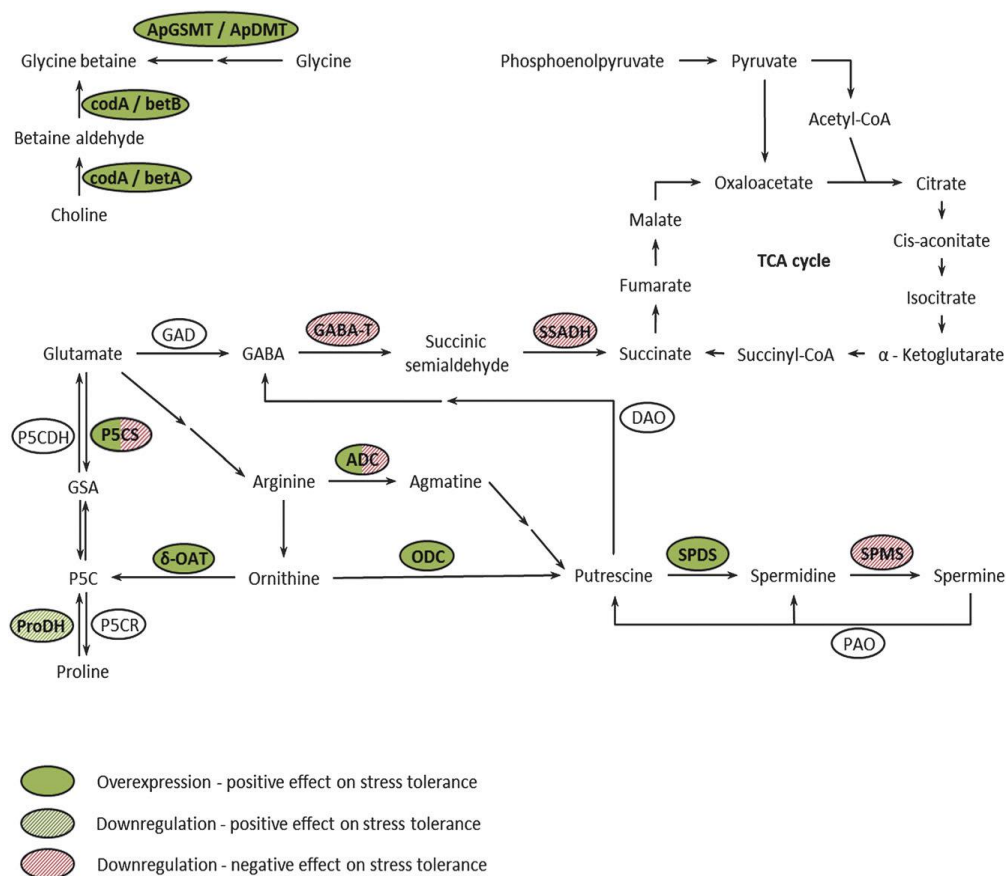
τ 3-hydroxy-3-phenylpropanoyl-CoA (3H3PP-CoA)

ϵ 3-oxo-3-phenylpropanoyl-CoA (3O3PP-CoA)

δ 3-oxo-3-phenylpropanoyl-CoA (3O3PP-CoA)

ρ peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase (PhKAT1)

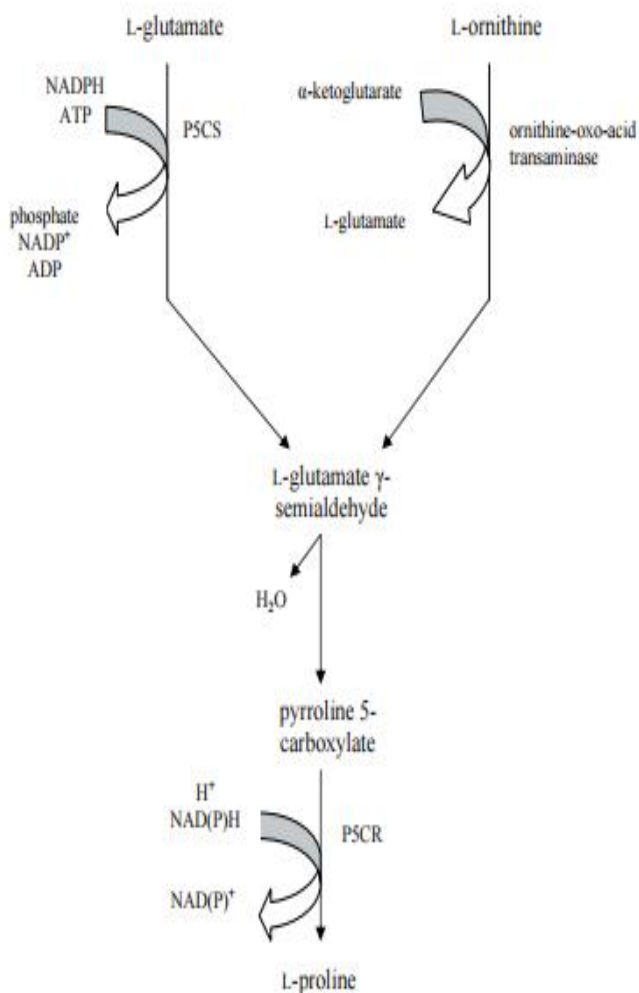
شکل پیوست ۸: مروری شماتیک از متابولیسم اسیدهای آمینه، پلی آمین ها و گلیسین . گیاهان با افزایش یا کاهش برخی آنزیم- های مشخص شده در شکل، نسبت به تنش های غیر زنده تحمل نشان می دهند.



APGSMT: *Aphanothece halophytica* glycine sarcosine methyl transferase, ApDMT, *Aphanothece halophytica* dimethylglycine methyltransferase,

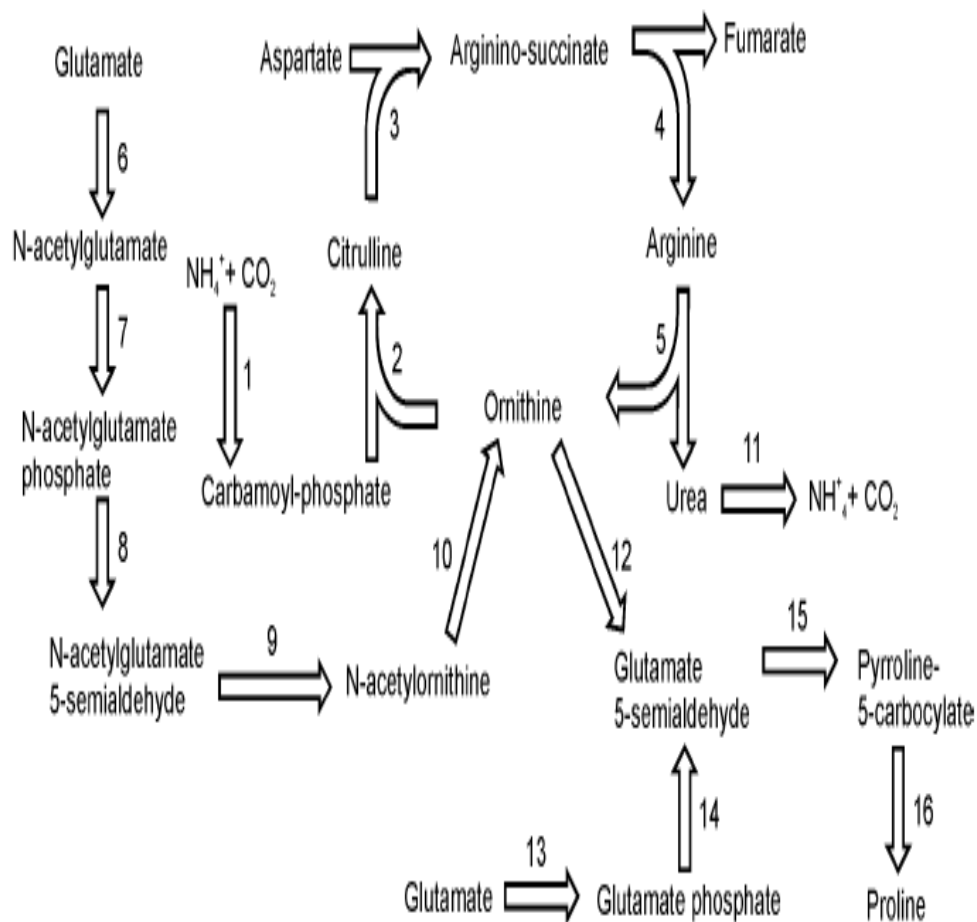
codA: کولین اکسیداز. betA: کولین دهیدروژناز. betB: بتائین آلدهید دهیدروژناز. GAD: گلوتامات دکربوکسیلاز. ۴ آمینوبوتیرات آمینوترانسفراز. SSADH: سوکسینیک سمی آلدهید دهیدروژناز. P5CS: ۱- پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز. P5CR: پیرولین ۵ کربوکسیلات ردوکتاز. ProDH: پیرولین دهیدروژناز. P5CDH: ۱- پیرولین ۵ کربوکسیلات دهیدروژناز. δ-OAT: اورنیتین ۵ آمینو ترانسفراز. ADC: آرژینین دکربوکسیلاز. ODC: اورنیتین دکربوکسیلاز. SPDS: اسپرمیدین سنتتاز. SPMS: اسپرمین سنتتاز. PAO: پلی آمین اکسیداز. DAO: دی آمین اکسیداز (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

شکل پیوست ۹: مسیر بیوسنتز پرولین



دو مسیرهای جایگزین در بیوسنتز پرولین وجود دارد در گیاهان عالی: L-اورنیتین و مسیر L-گلوتامات. هر دو اورنیتین و گلوتامات پیش سازهای بیوسنتز پرولین هستند دو آنزیم: پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (بنام P5CS فعالیت آنزیم) و پیرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR)، نقش عمده‌ای در مسیر بیوسنتز پرولین دارند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸).

شکل پیوست ۱۰: مسیر آرژنین و سنتز پرولین.



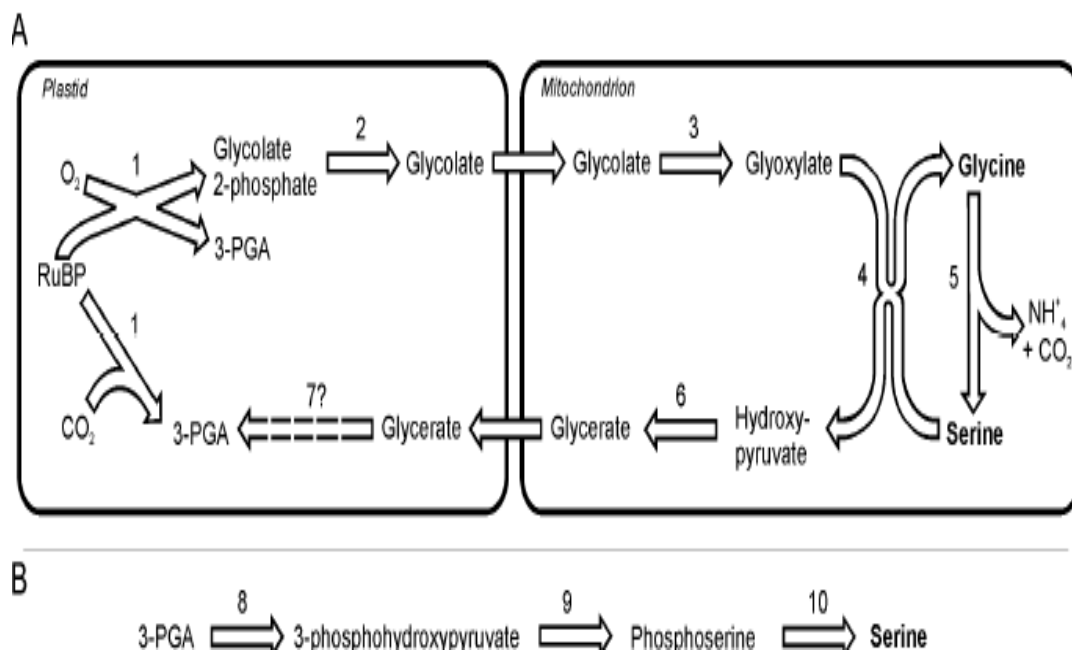
۱: کربامویل فسفات سنتتاز^۱ ۲: اورنیتین کربامویل ترانسفراز^۲ ۳: آرژنین سوکسینات سنتتاز. ۴: آرژنین سوکسینات لیاز. ۵: آرژیناز. ۶: N استیل گلوتمات سنتتاز. ۷: N استیل گلوتمات کیناز. ۸: N استیل گلوتمات ردوکتاز. ۹: استیل اورنیتین ترانسفراز. ۱۰: آمیدو اسلاز^۳ ۱۱: اوه آز. ۱۲: اورنیتین دلتا ترانس آمیناز. ۱۳+۱۴: پیروлін ۵ کربوکسیلات سنتتاز. ۱۵: spontaneous. ۱۶: پیروлін ۵ کربوکسیاز ردوکتاز (سرنیواز و همکاران، ۱۹۹۵).

p carbamoyl-phosphate synthase

p-ornithine carbamoyltransferase

3 amidoacylase

شکل پیوست ۱۱: مسیر سنتز گلیسین و دو مسیر سنتز سرین



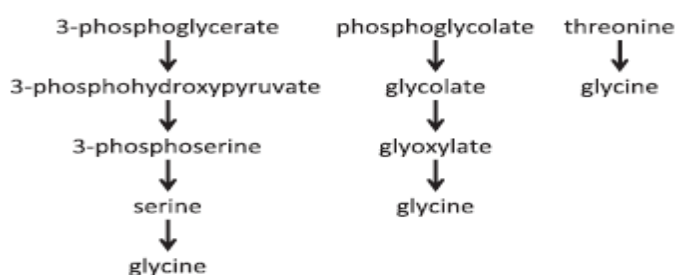
A: گلیسین و سرین به عنوان بخشی از تنفس نوری ، B: گلیسین و سرین مسیری غیر از تنفس نوری.

واکنش‌های صورت پذیرفته توسط آنزیم‌ها با اعداد نشان داده شده است:

۱: ریبولوز ۱۵ بی فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز. ۲: فسفوگلیسرات فسفاتاز. ۳: گلی اکسلات سنتتاز. ۴: آلانین: گلی اکسلات آمینو ترانسفراز / سرین: گلی اکسلات آمینو ترانسفراز. ۵: گلیسین دکربوکسیلاز + سرین هیدروکسی متیل ترانسفراز. ۶: هیدروکسی پیرووات ردوکتاز. ۷: گلیسرات کیناز. ۸: ۳ فسفوگلیسرات دهیدروژناز. ۹: فسفوسرین ترنس آمیناز. ۱۰: فسفو سرین فسفاتاز.

3-PGA: ۳ فسفوگلیسرات. RuBP: ریبولوز ۱۵ بی فسفات (سرنیوز و همکاران، ۱۹۹۵).

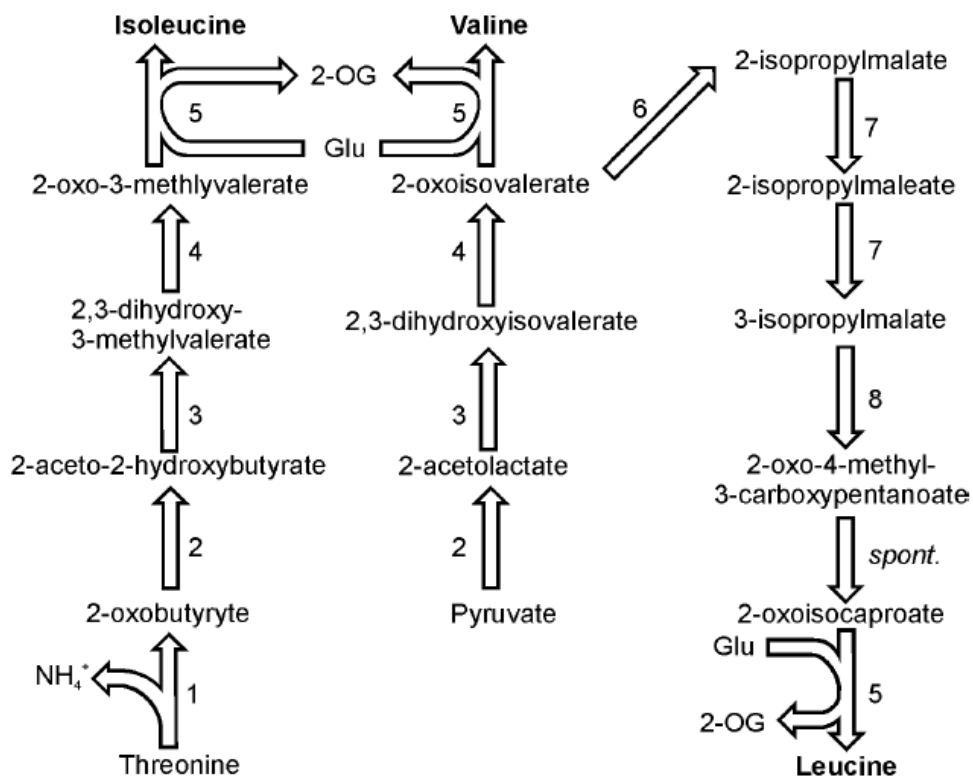
شکل پیوست ۱۲: مسیرهای منجر به گلیسین در گیاهان



از ۳-فسفوگلیسرات به عنوان یک شاخه گلیکولیز، از گلی اکسلات در طول تنفس نوری، و از ترئونین از طریق ترئونین آلدولاز به عنوان شاخه-

ای از مسیرهای سنتز اسیدهای آمینه مشتق شده از آسپاراتات (هولسی و همکاران، ۲۰۰۷).

شکل پیوست ۱۳: مسیر سنتز والین

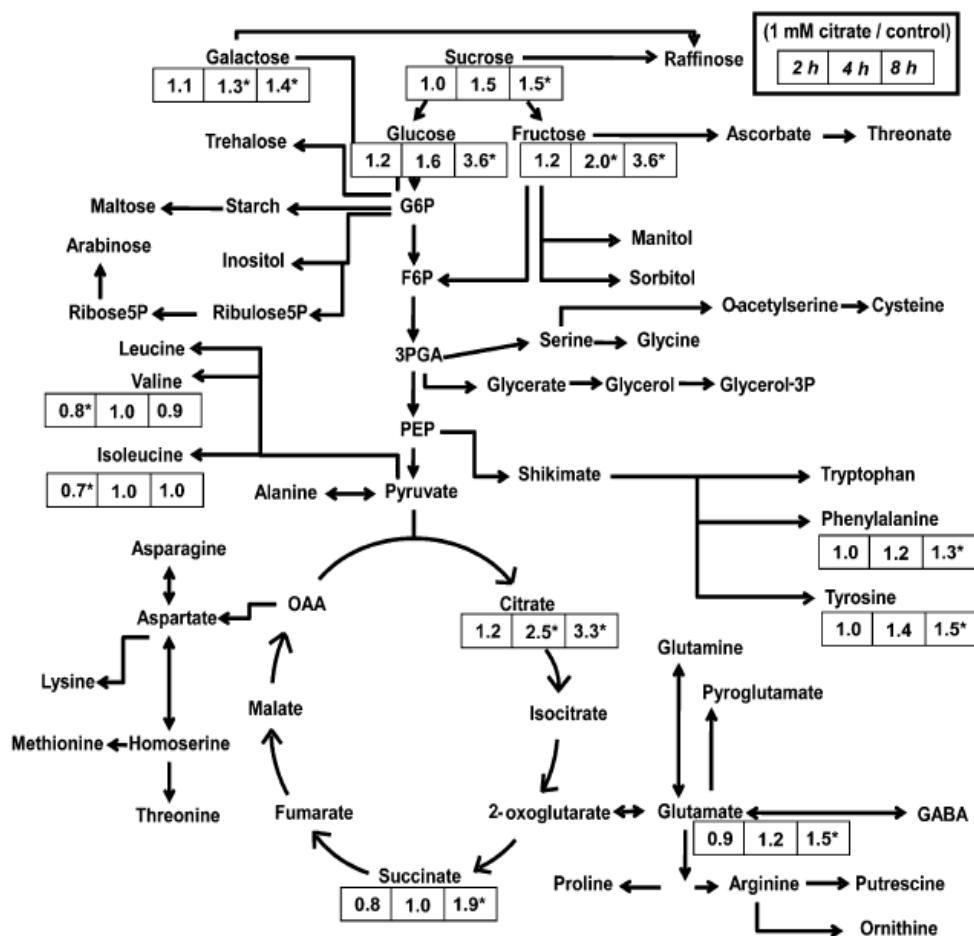


۱: ترئونین دامیناز. ۲- استو-۲- هیدروکسی بوتیرات سنتاز. ۳: کتول اسید ردوکتوایزومراز. ۴: دهیدروکسی اسید دهیدراتاز. ۵: شاخه‌ای از اسیدهای آمینه ترانس آمیناز. ۶: ایزوپروپیل مالات سنتاز. ۷: ایزوپروپیل مالات ایزومراز. ۸: ایزوپروپیل مالات دهیدروژناز (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸).

OG- 2: ۲ اگزوگلو تارات

شکل پیوست ۱۴: مسیر سنتز اسیدهای آلی و ارتباط آنان با تولید سایر متابولیت‌ها در آرابیدوپسیس

(اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۱).



GABA, g-Aminobutyrate; PEP, phosphoenolpyruvate; G6P, Glu-6-P; F6P, Fru-6-P; 3PGA, 3-phosphoglycerate; OAA, oxaloacetate.

جدول پیوست ۱۲: میانگین اثر اصلی ژنوتیپ برای بیان ژن‌های بتا اکتین، پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز، اینوزیتول منو فسفاتاز، فنیل

آلانین آمولیز ۱

ژنوتیپ	بتا اکتین	پیرولین ۵ کربوکسیلاز سنتتاز	اینوزیتول منو فسفات	فنیل آلانین آمولیز ۱
زودرس X پاکستانی	۷۲/۱۲	۱۵۴/۲۲	۱۳۹/۷۷	۷۳/۸۸
عراقی	۷۲/۱۱	۷۵/۴۴	۶۱/۳۳	۳۴/۵۵

منابع

- ابراهیم زاده ح، عباسی م، فخر طباطبایی س. م، (۱۳۸۴) "بررسی وضعیت گالاکتوز در قندهای محلول قطعات جدا کشت سه گونه اکالیپتوس به عنوان یک نشانگر شرایط رشد بافت‌ها" *مجله زیست شناسی ایران* جلد ۱۸. شماره ۲.
- احمدی آ، (۱۳۹۱) "تغییرات میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول و جذب عناصر پتاسیم، روی و کلسیم در ژنوتیپ‌های کنجد (*Sesamum indicum* L.) تحت تنش خشکی" *مجله تولید گیاهان زراعی در شرایط تنش‌های محیطی*، سال ۴، شماره ۳.
- اکبری قوژدی ا، ایزدی دربندی ع، برزوئی ا، مجدآبادی ع، (۱۳۸۹) "بررسی تغییرات مورفولوژیک ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش شوری". *مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای*. سال ۱. شماره ۴.
- امیدی م، فرزین ن، (۱۳۹۱) "راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارایی گیاهان دارویی. *مجله ژنتیک نوین*، شماره ۳، دوره ۷: ۲۰۹-۲۲۰.
- بابایی ب، جمشیدی پ، (۱۳۸۹) "اثر تنش شوری بر میزان پرولین و ریشه گیاهچه کنجد (*Sesamus indicum*). *همایش ملی ایده‌های نوین در کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)*. شماره ۵: ص ۱-۴.
- بیجه کشاورزی م. ح، موسوسی نیک س. م، غلامی تیله‌بنی ح، (۱۳۸۹) "بررسی اثر آللوپاتی درمنه خزری بر خصوصیات جوانه زنی و رشد گیاهچه‌ی کنجد (*Sesamus indicu*)" *همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)*. شماره ۵، ص ۴-۱.
- بهلگردی ف، معتمد ن، رستگار جزی ف، ابراهیم‌زاده ح، (۱۳۹۳) "افزایش بیان ژن P5CS در گیاهچه زیتون تحت تنش شوری" *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)*. جلد ۲۷. شماره ۱.
- ثابت تیموری م، خزائی ح. ر، نصیری محلاتی م، نظامی ا، (۱۳۸۸) "تأثیر سطوح مختلف شوری بر عملکرد و اجزای عملکرد تک بوته، خصوصیات مورفولوژیک و میزان کلروفیل برگ گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.). *مجله تنش های محیطی در علوم کشاورزی*. جلد ۲. شماره ۲: ص ۱۳۰-۱۱۹.
- طباطبائی ع. شمس‌ی ح، کریمخانی م. ر، (۱۳۹۰) "بررسی اثر تنش شوری و خشکی بر ارقام آفتابگردان در مرحله جوانه‌زنی" *اولین همایش علمی مباحث نوین در کشاورزی. دانشگاه آزاد واحد ساوه*.

- جوزانی غ. ر، (۱۳۸۷) "بیوتکنولوژی (فناوری زیستی) اهمیت آن در کشاورزی" کمیته ترویج و ارتباطات ستاد زیست فناوری کشور: ص ۳۵-۱.
- حاجی بلند ر، ابراهیمی ن، (۱۳۹۰) "تأثیر پلی آمین‌های اگزوژن بر رشد، فتوسنتز و متابولیسم فنل‌ها در گیاه توتون تحت تنش شوری" مجله زیست شناسی گیاهی، سال ۳، شماره ۸: ص ۲۶-۱۳.
- حبیبی ق، باقرزاده ل، سروری س، (۱۳۹۳) "تخفیف تنش شوری توسط ید در دو رقم انگور. فیزیولوژی تنش گیاهان. شماره ۷۰: ص ۲۴-۱۱.
- حسینی ح. و، رضوانی مقدم پ، (۱۳۸۵) "اثر تنش خشکی و شوری بر جوانه‌زنی اسفرزه" مجله پژوهش‌های زراعی ایران. شماره ۲۲: ص ۱۵۰-۱۵۴.
- حقیقی ل، مجد ا، نعمت‌زاده ق.ع، آبریان س، (۱۳۹۲) "بررسی محتوای فنولی، فعالیت و بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در برگ‌های گیاه آلوروپوس لیتورالیس تحت تیمار کلرید سدیم" اولین کنفرانس ملی تنش شوری در گیاهان و راهکارهای توسعه کشاورزی در شرایط شور.
- داداشی، م.ر، مجیدی هروان ا، سلطانی ا، نوری‌نیا ع، (۱۳۸۶) "ارزیابی واکنش لاین‌های مختلف جو به تنش شوری". مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی. سال ۱۳. شماره ۱.
- دادخواه ع. ر، (۱۳۸۸) "مطالعه اثر تنش شوری و نوع نمک بر جوانه زنی و رشد گیاهچه چهار گیاه دارویی شنبلیله، کنگد، شاهدانه و زنیان" فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۶. شماره: ص ۳۶۹-۳۵۸.
- دشتی ح، تاج آبادیپور ا، شیرانی ح، نقوی م ر، (۱۳۸۹) "ارزیابی ژرم پلاسما گندم در مقابل تنش شوری" مجله علوم گیاهان زراعی ایران. دوره ۴، شماره ۴۱: ص ۶۵۵-۶۶۴.
- دهقان ا، عبادی م، (۱۳۹۱) "مهندسی متابولیک، روشی نوین به منظور ایجاد مقاومت به تنش محیطی در گیاهان" مجله زیتون. شماره ۲۲۹: ص ۱۲-۲.
- دینی ترکمانی م، کاراپیتان ژ، (۱۳۸۶) "بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مهم دانه در ده رقم کنگد (*Sesamum indicum* L.)" مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۰. شماره: ۴.

- رحیمی ز، کافی م، نظامی ا، خزائی ح. ر، (۱۳۸۹) "بررسی تأثیر سطوح شوری و سیلیسیم بر عملکرد و اجزای عملکرد دانه گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)" نشریه پژوهش‌های زراعی/ایران. جلد ۸. شماره ۳: ص ۳۸۸-۳۸۱.
- زادوریان گ، خدا رحمی م، امینی ا، مصطفوی خ، (۱۳۹۰) "بررسی تأثیر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم بر بیومس ارقام تجارتنی گندم نان در مرحله گیاهچه‌ای" مجله زراعت و اصلاح نباتات. جلد ۷. شماره ۱: ص ۶۹-۸۳.
- شاکری س، کاظمی تبار ک، هاشمی ح. ر، (۱۳۹۳) "بررسی ژن های رفرنس موجود در برگ کنجد تحت تنش شوری به روش Real Time PCR" مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. شماره ۸: ص ۱۰-۱.
- شفاهی م، معاضدی ا، (۱۳۸۷) "اثر رژیم غذایی حاوی روغن کنجد بر یادگیری فضایی موش های صحرایی نر پیر" مجله علوم پایه دانشگاه آزاد/سلامی. جلد ۱۸. شماره ۲: ص ۸-۱.
- صراف نوبر م، نیکنام و، مرادی ب، (۱۳۸۹) "اثر تنش شوری بر محتوای پروتئین، رنگیزه ها، قندها و ترکیبات فنولی در کشت بافت چند گونه از شنبلیله‌های ایران" مجله علوم دانشگاه تهران. جلد ۳۸. شماره ۲: ص ۵۳-۵۹.
- غفاری م، (۱۳۸۲) "بکارگیری تجزیه به مولفه های اصلی برای انتخاب برترین هیبرید سه‌جانبه در آفتابگردان" نشریه نهال و بذر. جلد ۱۹. شماره ۴: ص ۵۲۷-۵۱۳.
- فاضلی کاخگی ف، نظامی ا، پارسا م، کافی م، (۱۳۹۰) "به‌گزینی برای تحمل به شوری در کنجد (*Sesamum indicum* L.) تحت شرایط مزرعه: خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی. جلد ۳. شماره ۱: ص ۲۳-۲۰.
- فرودل س، صدرآبادی حقیقی ر، نبوی کلات م، (۱۳۹۰) "تأثیر پرایمینگ بذر بر رشد گیاهچه‌های کنجد (*Sesamum indicum* L.) تحت تنش شوری" نشریه پژوهش‌های زراعی/ایران. شماره ۳: ص ۵۴۳-۵۳۵.
- قادری ا، گالشیس. فرزانه س، زینلی الف، (۱۳۸۱) "اثر شوری بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه چهار رقم شبدر زیرزمینی (*Trifolium subterraneum*)" مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۵۷-۵۶: ص ۱۰۳-۹۸.
- کافی م، مهدوی‌دامغانی ع، (۱۳۸۴) "مکانیسم‌های مقاومت به تنش شوری". (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد: ص ۴۶۷.

۳۱) لک ر، (۱۳۹۰) "بررسی آثار جیبرلین و آسکوربات خارجی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و تجمع پرولین، در ریشه و اندام هوایی دانه رست های دو رقم کلزا تحت شرایط شوری" همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی. شماره ۱.

- محمدی م، میرفخرایی ر. ق، عباسی ع. ر، (۱۳۹۱) "مطالعه واکنش و تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان ایرانی تحت تأثیر تنش سرمای بهاره با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره" مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. جلد ۶، شماره ۲: ص ۱۶۶-۱۶۹.

- مسرت ن، سیادت ع، شرفی زاده م، حبیبی خانیانی ب، (۱۳۹۲) "تأثیر پرایمینگ بر جوانه زنی و رشد گیاهچه ذرت هیبرید SC704 در شرایط تنش شوری و خشکی" مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. شماره ۱۵.

- مصطفوی خ، حیدریان ع. ر، (۱۳۹۱) "بررسی تأثیر تنش شوری بر جوانه‌زنی و شاخص‌های آن در چهار رقم گیاه آفتابگردان" مجله زراعت و اصلاح نباتات. جلد ۸، شماره ۴: ص ۱۲۱-۱۳۱.

- میرمحمدی میبدی ع، قره یاضی ب، (۱۳۸۱) "جنبه‌های فیزیولوژیک و به نژادی تنش شوری گیاهان" انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان ص ۲۷۴.

- نصرآبادی د، حسینی سالکده ق، (۱۳۸۴) "آنالیز پروتئوم ریشه و برگ برنج تحت تنش شوری" پایان نامه ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

- یامچی ا، رستگار جزی ف، قبادی س، موسوی ا، کارخانه ای ع. ا، (۱۳۸۳) "بیان فراوان ژن پرولین -۵- کربوکسیلات سنتتاز (p5cs) با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون (Nicotiana tabacum cv. Xanthi)" مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. شماره ۴.

- یزدی ا، زرقانی ه، محمدیان م، یائق ع، (۱۳۹۳) "ارزیابی ویژگی‌های جوانه‌زنی و رشد نهال بذر سه رقم کنبه (Sesamum indicum) در شرایط شوری و خشک" مجله نشریه زراعت. شماره ۱۰۲.

-Aghaei K, Setsuko K.. (2013) "Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. "Front Plant Science. VOL.4.

-Almansou M, Kine J.M, Lutts S. (2001) "Effect of salt and osmotic stress on germination in durum wheat (Triticum aestivum Desf.)" Plant and Soil. NO 231:pp 243-254.

- Ammam A, Sanders D. (1999) "Mechanisms of Na^+ uptake by plant cells" *Advances in Botanical Research*. NO.29 :pp 76-112.
- Avalbaev A. M. M.V, Bezhorkov A.R, Kildibekova R.A. (2009) "Fatkutdinova. Wheat Germagglutinin Restores Cell Division and Growth Of Wheat Seedlings Under SalinityBulb" *Journal of Plant Physiology*. pp257-263.
- Appel H. M. (2014) "Phenolics in ecological interactions : The importance of oxidation" *Journal of chemistry and Ecology*. NO19: pp 1521-15523.
- Arbona V, Manzi M, Ollas C, Cadenas G. (2013) "Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants" *International journal*. NO 14: pp 4885-4911.
- Aziz A, Fairuz M, Abdullah M.Z. MA. N.L, Marziah M. (2015) "Fatty acid profile of salinity tolerant rice genotype grown on saline soil. Malays". *Applied Biological Chemistry*. NO 44(1): pp 119-124 .
- Bahrami H, Razmjoo J. (2012) "Effect of salinity stress (NaCl) on germination and early seedling growth of ten sesame cultivars (Sesamum indicum L.)" *International Journal of AgriScience*. NO 26: pp 529-537.
- Bak-Jensen Ks, Svensson B, Roepstorff P, Laugesen S. (2004) "Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6-11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry". *Proteomics*. NO 4(3). pp:42-728.
- Bates L. S, Waldren R.P, Teare I.D. (1973) "Rapid determination of free proline for water stress studies" *Plant soil*, NO 39 :pp 205-207.
- Barupal D, Haldiya P, Wohlgemuth G, Kind T, Kothari S, Pinkerton K, Fiehn, O. (2012) "MetaMapp: mapping and visualizing metabolomic data by integrating information from biochemical pathways and chemical and mass spectral similarity" *Bio Med Central*. NO 10.1: pp 13-99.
- Berevedan R.E, Egli D.B. (2003) "Short periods of water stress during seedfilling, leaf senescence and yield of soybean Crop" *Science*. NO 43 :pp 2083-2088.
- Box S, Schachtman. D.P. (2000) "The effect of low concentrations of sodium on potassium uptake and growth of wheat". *Plant.Physiol*. NO 27: pp 175-182.
- Bouche N, Fromm H.(2004) "GABA in plants: just a metabolite?" *TRENDS in Plant Science*. VOL.9.NO3.
- Broomand-Rezazadeh G, Kucheki A, (2005) "Germination response of Ajowan, Fennel and Dill to osmotic potential of sodium chloride and polyethylene glycol 6000 in different temperature regimes" *Iranian Journal of Agricultural Sciences*. VOL. 3, NO 2: pp: 207-21.
- Bromke M. A. (2013) "Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms" *Metabolites*. NO 3: pp294-311.
- Bybordi A, (2010) "Effect of salinity on yield and component characters in canola (Brassica napus L)" *Notulae Scientia Biologicae*. NO 2 (1): pp 81-83.
- Buchholz A, Hurlebaus J, Wandrey C, Takors R. (2002) "Metabolomic:quantification of intracellular metabolite dynamics" *Biomolecular engineering*. NO. 19(2): pp 5-15.



- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Metraux J. P. (2008) "Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*" *FEBS Letters*. pp 473-582.
- Chandna R, Azooz M.M, Ahmad P. (2013) "Recent Advances of Metabolomics to Reveal Plant Response During Salt Stress. Salt Stress in Plants" Signalling, *Omics and Adaptations*. 10.1007/978: pp 4614-6108.
- Cho Y.H, Yoo S.D. (2011) "Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*" *PLOS Genetics*. NO 6.
- Chen H, Jiang J.G. (2009) "Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity" *Cell Physiol*. NO 219(2) : pp 8-251.
- Cramer C.R, Ergul A, Grimplet J, Tillett R.L, Tattersall E,A, Bohlman M.C, Vincent D, SondereggerJ, Evans J, Osborne C. (2007)"Water and salinity stress in graperines early and late changes in transcript and metabolite profiles functional and intergrative" *Genomics*. NO 7(2): pp 111-134.
- Cramer GR, Lauchi A, (1986)"Ion activities in solution in relation to Na^+ , Cl^- intractions at the plasmalema" *Journal of Experimental Botany*. VOL37: pp 321-330.
- Davenport R, James R, Zakrisson A, Tester M, Munns R . (2005) "Control of sodium transport in durum wheat" *Plant Physiology*. NO 137 (3): pp 807-818.
- Delauney A.J, Verma D.P.S .(1993) "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants" *The Plant jurnal*. NO 4: pp 215-223.
- Doerfler H, Lyon D, Nagele T.(2013)"Granger causality in integrated GC-MS and LC-MS metabolomics data reveals the interface of primary and secondary metabolism" *Metabolomics* . NO 9: pp 564-574.
- Donahue J.L, Alford S.R, Torabinejad J, Kerwin R.E, Nourbakhsh A, RAY W.K, Herinck M, Lyonc B, M. Hein P.P, Gillaspy G.E. (2010) "The *Arabidopsis thaliana* Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase1 Gene is Required for Myo-inositol Synthesis and Suppression of Cell Death" *Plant cell*. NO 22(3)" pp 888-903.
- Duan G, Christian N, Schwachtje J, Walther D, Ebenhöh O. (2013) "The Metabolic Interplay between Plants and Phytopathogens" *Metabolites*.NO10.3390: pp 1-23.
- Edreva A, (2005) "reactive oxygen species in chloroplasts : A submolecular approach" *Agriculture, Generation and scavenging of Ecosystems and Environment*. NO 106(2-3): pp 119-133.
- Esfandiari E, Enayati V, Abbasi A. (2011)"Biochemical and Physiological Changes in Response to Salinity in Two Durum Wheat (*Triticum turgidum* L.) Genotypes" *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. NO 39 (1): pp. 165-170.
- Esfandiari E, Javadi A, Shokrpour M, Shekari F.(2011)"The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms on wheat seedling" *Fresenius Environmental Bulletin*.NO 20(8): pp 2021-2036.
- FAO. FAO Statistical Databases.(2013). Available online at: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl>.
- FAO. FAO Stat-Agriculture, Food & Agriculture Organization of the United Nations. (2013). Available online at: <http://www.fao.org/site/408/DesktopDefault.aspx?pageID=408>

- Finkemeier I, König A.C, Heard W, Nesi A.N, Anh Pham PH, Leister D, Fernie A.R, Sweetlove L. J, (2013) "Transcriptomic Analysis of the Role of Carboxylic Acids in Metabolite Signaling in Arabidopsis Leaves" *Plant Physiology*. NO 162: pp 239–253.
- Farooq M. A. Wahid N, Ahmad S.A. (2010) "Comparative efficacy of surface drying and re-drying seed priming in rice: changes in emergence, seedling growth and associated metabolic events Paddy" *Water environment research journal*. NO 8: pp 15-22.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujta D, Basra S. M. A . (2009)" Plant drought stress: effectes, mechanisms and management "*Agronomy for Sustainable Development* . NO 29: pp 185- 212.
- Gaballah M.S Abou L . B, El-Zeiny H.A, Khalil S .(2007) "Estimating the performance of salt-stressed-sesame plant treated with antitranspirants" *Journal of Applied Sciences Research* .VOL 3(9).pp: 811-817.
- Gehlot H, Purohit A, Narpat S. Shekhawat S (2005) "Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in Sesamum indicum cultivars" *Cell and Molecular Biology* . NO 4: pp31-39.
- Gholizadeh A, Kohnhrouz B. (2010) "Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves" *Brazilian Journal of Plant Physiology*.VOL 22. NO 4.
- Gupta B, Hung b .(2014) " Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization" *International Journal of Genomics*. NO: 701596,PP. 18.
- Hay Q, Haya SH, Irfan M, Ahmad A . (2010) " Effects of exogenous salicylic acid under changing environment" : *Environmental and Experimental Botany*.NO 68: pp 14-25.
- Higbie S, Wang F, Stewart J.M, Sterling T.M, Lindemann W.C, Hughs E, Zhang J. (2010)"Physiological response to salt (NaCl) stress in selected cultivated tetraploid cottons Hindawi Publishing Corporation" . *International Journal of Agronomy*. pp 1-12.
- Hill C. B Taylor J. D, Edwards J, Mather D, Bacic A, Langridge P, et al. (2013) " Whole-genome mapping of agronomic and metabolic traits to identify novel quantitative trait loci in bread wheat grown in a water-limited environ-ment" *Plant Physiol* .NO 162: pp 1266–1281.
- Hill C. B, Roessner U. (2013) "Metabolic profiling of plants by GC–MS " in The Handbook of Plant Metabolomics, *Front Bioeng Biotechnol*: pp 1–23.
- Hill C. B, Roessner U. (2015) "Advances in high-throughput LC-MS analysis for plant metabolomics, in Advanced LC-MS Applications for *Metabolomics*". *Future Science* : pp 58–71.
- Hill C. B, Taylor J. D, Edwards J, Mather D, Langridge P, Bacic A, et al. (2015)" Detection of QTL for metabolic and agronomic traits in wheat with adjustments for variation at genetic loci that effect plant phenology" *Plant Science*. NO 233:pp 143–154.
- Hill C.B, Czauderna T. Klapperstück M, Roessner U, Schreiber S.(2015)" Metabolomics, standards, and metabolic modeling for synthetic biology in plants" *Bioengineering and biotecnolgy*: pp 2015.00167.
- Hiremath S. C. C. G, Patil K. B, Patil M. H . (2007)" Genetic diversity of seed lipid content and fatty acid composition in some species of Sesamum L. (Pedaliaceae)" *African Journal of Biotechnology*. NO 6: pp 539 -543.
- Hoai N.T.T, Shim I.S, Kenji U. (2003) "Accumulation of some nitrogen compouneds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice(*Oryza sativa* L) "*seedling Plant Growth Regul*.VOL 41: pp.159-164.

- Hulusi k, Melike B, Fizil O, Ismail T, (2007) "The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame" *Environmental and Experimental Botany*. NO 60: pp 344-351.
- Hwang L, S.(2005)" Sesame Oil". In: Shahidi, F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, VOL. 2: pp. 537-576.
- Iqbal M. M, Ashraf A, Jamil S. Ur, Rehman, (2006). Dose seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plants under salt stress? *Journal of Integrative Plant Biology*. NO 48: pp 181-189.
- Jander G, Joshi V. (2010) "Recent Progress in Deciphering the Biosynthesis of Aspartate-Derived Amino Acids in Plants" *Molecular Plant*. NO 3: pp 54-65.
- Joel L, Shuman F, Jenny M, Armenta R, Evonda M, Pokrzywa P. (2011) " Plant Metabolomics by GC-MS and Differential Analysis Andy Pereira (ed.)" *Plant Reverse Genetics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. VOL 678: pp:229-246.
- Kafi M, Borzoei A, Salehi M, Kamandi A, Masomi A, Nabati J. (2009) "Environmental stress on plant physiology" *Jihad Daneshgahi Publication, Iran (In Persian)*. NO 4.
- Kaya M.D, Okcu G, Atak M, Cikili Y, Kolsarici O. (2006) " Seed treatments to overcome salt and drought stress) .during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.)" *Europ. Journal of Agronomy*. No 24: pp 291-295.
- Kattab H. (2007)" Role of glutathione and polyadenylic acid on the oxidative defense systems of two different cultivars of canola seedlings grown under saline condition" *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. NO 1 : pp 323-334.
- Kavar T, Maras M , Kidric M, Sustar-Vozlic J , Meglic V. (2007)"Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress Mol " *Breed*. NO 21: pp159-172.
- Kinnersley A, Turano F. (2010) " Gamma amino butyric Acid and plant responses to stress" *Critical Reviews in plant Sciences*. pp 479-509.
- Kiran K, Asad M. (2008) "Wound healing activity of *Sesamum indicum* L seed and oil in rats" *Indian Journal of Experimental Biology* . NO 46(11): pp777-82.
- Koca H, Bor M, Turkan I . (2007) " The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars" *Environmental and Experimental Botany*. NO 60: pp 344-351.
- Krasensky J, Claudia J, (2011)" Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks" *Oxford Journals Science & Mathematics*. NO.10.1093.
- Kumari A. Das P, Parida A, Agarwal A, (2015) "Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes" *Front Plant*. NO 6: pp 537.
- Kumar S, Ramesh R, Singh S. P. (2006) "Multivariate analysis and clustering of *Cuphea procumbens* inbred lines" *Genetika*. NO 38: pp 23-30.
- Kwan A, Mobli M, Gooley P, King G, Mackay J. (2011) " Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist" *Federation of European Biochemical Societies journal*. NO.10: pp 1742-4658.

- Laurentin H. E. Karlovsky P. (2006) "Genetic relationship diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP)" *BMC Genetics*. NO.7: pp 1-10.
- Liu H.W, Zang B.S, Deng X.W, Wang X.P. (2011) "Over expression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice" *Planta* .NO 234:pp 1007-1018.
- Mahmood S, Iram S, Athar H.(2003) "Intra-specific variability in sesame (*Sesamum indicum* L.) for various quantitative and qualitative attributes under differential salt regimes" *Journal of Research Science*. NO 14(2): pp . 177-186.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas J.I, Damsz B, Narasimhan. M.L, Hasegwa P.M, JolyP.J, Bressan R. A. (2002) "Does proline accumulation play an active role in stress – induced growth reduction?" *The plant Journal*. NO 31: pp 699-712.
- Majee M, Maitra S, Dastidar KG, Pattnaik S, Chatterjee A, Hait NC, Das KP, Majumder AL. (2007) "A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salttolerance phenotype" *Journal of Biological Chemistry*. NO 279: pp 28539-28552.
- Mehra V, Tripathi J, Powell A. A, (2003) "Aerated hydration treatment improves the response of *Brassica juncea* and *Brassica campestris* seeds to stress during germination" *Seed Science and Technology*. NO 14: pp 57-70
- Meloni D.A, Martinez C.A. (2009) "Glycine betaine improves salt tolerance in vinal (*Prosopis rufifolia*) seedlings" *Plant physiol*. VOL 21. NO 3.
- Mirghani M. E. S, Che Man S, Jinap B. S. Baharina, Bakar J.(2003), "Application of FTIR spectroscopy in determining sesamol in sesame seed oil". *oil chemical society*. NO 80: pp 1–4.
- Mittler R. (2006) "Abiotic stress the field environment and stress" *Combination trends in plant science*. NO 11(1): pp 15-19.
- Miura K, Tada y, (2014) "Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid" *Front Plant*. doi: 10.3389/fpls.2014.00004.
- Muhammad. Z .Hussain F. (2010) "Vegetative growth performance of five medical plants under NaCl salt stress". *Pakistan Journal of Botany*. NO 42:pp 303-316.
- Munns R. (2002) "Comparative physiology of salt and water stress" *Plant, Cell and Environment* .VOL 25(2): pp.239-250
- Namiki M. (1995) "The chemistry and physiological functions of sesame" *food review international*. NO 11: pp 281–329.
- Navadiya L. J. P. R. Godhani and R. S. (1995) "Heterosis studies in sesame (*Sesamum indicum* L.)" *Gujarat Agricultural University Journal*. NO 20 :pp 73-77.
- Nourbakhsh A, Collakova E, Gillaspay E. (2014) "Characterization of the inositol monophosphatase gene family in *Arabidopsis*" *Plant science*. NO 10.33.
- Obiajunwa E. I F. M, Adebisi A. (2005) "Determination of Essential Minerals and Trace Elements in Nigerian Sesame Seeds, Using TXRF Technique" *Pakistan Journal of Nutrition*.NO 4: pp 393-395.



- Okazaki Y, (2012) "Recent advances of metabolomics in plant biotechnology" *Plant Biotechnology Reports*. VOL 6: pp 1-15.
- Pandey A, M. Mann. (2000) "Proteomics to study genes and genomes." *Nature plant*. NO 405 pp: 837-846.
- Parida A. K, Das A .(2005) " B Salt tolerance and salinity effects on plants" *a review Ecotoxicology and Environmental Safety*.VOL 60: pp.324-349.
- Parviz A, Satywati S.(2008) "Salt stress and phyto biochemical responses of plant" *Plant soil and Envirment* . VOL 54: pp 89-99.
- Patterson J H, Newbigin E, Testers M, Bacie A, Roessner U. (2009) " Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L) cultivars" *Sahara and clipper , which differ in salinity tolerance journal of experimental botany*. NO 90(14) :pp: 4089-4103.
- Pavli O.I, Vlachos C. E, Kalloniati C, Flemetakis E, Skaracis I G.N. (2005) " Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) metabolism " *Omice journal*. NO 6(6): pp 371-376.
- Porcel R, Azcón R, Ruiz-Lozano J. M. (2004) "Evaluation of the role of genes encoding for $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* " *Plants physiology*. NO 65: 211-221.
- Qualley A.V, Widhalm J.N, Adobesin F, Kish C.D, udareva N. (2012) "Completion of the core β – Oxidative pathway of benzoic Acid biosynthesis " *Plant Biology* .VOL 109(40): pp16383-16388.
- Qureshi A.S, Qadir M, Heydari N, Turrall H, Javadi A. (2007) " A review of management strategies for saltprone land and water resources in Iran Colombo" *International Water Management Institute*. NO 30.
- Rahman A.M, Eissa H.F, Hassanein S.E, Abdel Azeiz A.Z, Saleh O.M, Mahfouzi H.T. El, Domyati F.M, Madkour M.A, Bahieldin A. (2013) " Increased salt stress tolerance and modified sugar content of bread wheat stably expressing the mtID gene Life" *Science Journal*. NO 10 (2).
- Renault H, Roussel V. El, Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C. (2010) "The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance" *BMC Plant Biology*. NO10 : pp 20.
- Sairam R, K.Tyagi A, (2004) " Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants" *Current Science*. NO 86: p p 407- 421.
- Salekdeh G. H, Komatsu S. (2007) " Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow" *Proteomics*. NO 7: pp 2976-2996.
- Saurabh C, Saxena S, Salvi P, Kaur H, Verma P, Prakash Petla B, Rao V, Kamble N, Majee M. (2013) "Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (*CaIMP*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses" *Journal of Experimental Botany*. NO 10.1: pp 336-341.
- Saxena S, Salvi P, Kaur H, Verma P, Petla P.B, Rao V, Kamble N. Majee M. (2013) " Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (*CaIMP*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses" *Experimental Botany*. doi:10.1093.

- Senaranta T, Touchell D, Bumm E, Dixon K. (2002) "Acetylsalicylic (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants" *Plant Growth Regulation*. NO 30:pp 157-161.
- Shasmitha R. (2015) "health benefits of *Sesamum indicum*" *a short review*. NO 8. pp: 1974-2441.
- Shannon M. C. C, Grieve M. (1999) "Tolerance of vegetable crops to salinity" *Scientia Horticulture*. NO 78: pp 5-8.
- Shen B, Hohmann S, Jensen R, Bohnert H.(1999) "Roles of sugar Alcohols in osmotic stress Adaptation, Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast" *Plant physiologists*. NO 121 :pp 45-52
- Shirato-Yasumoto S. M, Komeichi Y, Okuyama and A.(2003) " HoriganeA simplified HPLC quantification of sesamin and sesamol in sesame seed" *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*. NO 35: pp 27-34
- Shulaer V.(2006)"Metabolomics technology and bioinformatics" *Briefings in Bioinformatics* VOL7(2): pp128-139.
- Shulaer V, Cortes D, Mittler R. (2008) "Metabolomics for plant stress response" *Phytophysiology plantarum*. NO 132(2):pp199-208.
- Silva P , Geros H. (2009) "Regulation by salt of vacuolar H⁺ATPase and H⁺ pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange" *Plant Signaling Behavior*, NO 4(8) : pp 718-726.
- Silva O, Ochoa A, Reyes A, Aguado S. (2008) "Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear" *Plant Physiology and Biochemistry* . NO 46: pp:82-92.
- Singh P, Chen W, Zimmerli L. (2011) " Beta-aminobutyric acid priming by stress imprinting" *Plant Signal Behav*. NO 5(7): pp 878-880.
- Singh P, Chiwu C, Zimmerli L, (2010) "Beta aminobutyric acid priming by stress imprinting" *Plant Signal Behav*. NO 5(7): pp 878-880.
- Srinivas V, Balasubramanian D .(1995) " Proline is a protein compatible hydrotrop" *Langmuir*. NO 11:pp 2830-2833.
- Su M, Li X.F, Ma X.Y, Peng X.J, Zhao A.G,Cheng L.Q, Liu G.S. (2011) " Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment" *Plant Science*. NO 181 pp:652-659.
- Suzuki M, Tanaka K, Kuwano M, Yoshida KT.(2007) " Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathways" *Gene*. NO 405: pp 55-64.
- Tabatabaei I, Pazouki L, Bihanta M. R, Mansoori S, Jala Javaran M, Niinemets U, (2011) "Genetic variation among Iranian sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions vis-à-vis exotic genotypes on the basis of morpho-physiological traits and RAPD markers " *Australian Journal of Crop Science*. NO 5(11): pp1396-1407.
- Thoden J.B, Holden H. (2007) "The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase" *Protein Science*. NO 16(3): pp 432-440.



- Valifard M, Mohsenzadeh S, Niazi A, Moghadam A. (2015) "Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in *Salvia* species" *Australian Journal of Crop Science*. NO 9(7): pp 656-665.
- Valifard M, Mohsenzadeh S, Kholdebarin B, Rowshan V. (2014) "Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*" *South African Journal of Botany*. 93: 92-97.
- Villas – Boosos G, Hojer- Pedresen, Aksson M, Smedsgaard J, Nielsen J. (2005) Global metabolites analysis o yeats eevaluation of sample preparation methods" *Yeast*. NO 22: PP 115-1169.
- Vladimir S, Diego C, Gad M, Ron M. (2008) "Metabolomics for plant stress response" *Physiologia Plantarum*. NO 132: pp 199-208.
- Vladimir S. (2006) "Metabolomics technology and bioinformatics" *Briefings in bioinformatics*. VOL 7. NO 2 :pp 128 -139.
- Wang Y, Kim S, Agrawal G, Rakwal R, Kang K. . (2011) "Biotic stress-responsive rice proteome An overview" *Plant Biology*. NO 54: pp 219–226.
- Wei L, Miao H, Zhao R. Han x, Zhang H. (2012) "Identification and testing of refrence genes for Sesame genes expersion analysis by quantitative real- time PCR" *Planta*. NO 237(3) : pp 873- 889.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L.(2007) "Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement" *Plant Physiology*. NO 144: pp 1416-1428.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M, Liu Q, Nakashima K, Sakuma Y, Abe H, Shinwari Z. K, Seki M, Shinozaki K.(2002) "Biological mechanisms of drought stress response" *Japan International Research Center*: pp1-8.
- Yasumoto S. M, Katsuta M, Sugiura Y, Okuyama Y, Honda M, Komeichi .(2003) " New high lignan content sesame " *Crop Science*. NO 4 : pp 45–58.
- Zhang C.Y, Wang N.N, Zhang Y.H, Feng Q.Z, Yang C.W, Liu B. (2013) "DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*) " *Journal of Genetics*. NO 12: pp1269-1277.
- Zheng L, Dang Z, Li H, Zhang, H, Wu S, Wang Y. (2014) " Isolation and characterization of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (NtP5CS) from *Nitraria tangutorum* Bobr. and functional comparison with its *Arabidopsis* homologue" *Plants biology*. NO 41: pp 563-572.
- Zhang L, Zhao H, Fan X, Wang M, Ding C, Yang R, Yin Z, Xie X, Zhou Y, Wan D. (2012) " Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species inferred from nrDNA ITS sequences" *Turkish Journal of Biology*. NO 36 pp: 319-326.

Abstract

Response to salinity of 45 genotypes of sesame was investigated through analysis of morphological traits. Asian associated metabolites Iranian breeding lines (Varamin2822, Yekta, Darab1, TN234 and TN240), genotypes (EM, Indian, Iraqi and Pakistani) and their 36 F₁s were considered to determine the tolerant versus susceptible genotype. Tests were carried out in hydroponic culture; the control medium was and the saline media contained 150 mM NaCl and 200 mM NaCl. Significant differences ($p < 0.01$) were observed between salinity and control conditions for all the traits under scrutiny. Morphological traits showed a drastic reduction under stress. As expected, leaf proline and proline content increased with salinity. Metabolite isolation was performed on sensitive (Iraqi) and tolerant genotype (Precocious × Pakistani) in both non-saline and saline (200 mM NaCl) conditions. The tolerant genotype more proline, *myo*-inositol, D-manitol, and sorbitol. Although genotype had some stress responsive metabolites such as proline, its different behavior in response to salinity may be due to the β alanine, L-serine, citric acid, an absence/ shortage of the main stress-responsive metabolites. Following metabolite analysis, the expression patterns of some genes, namely *pyrroline 5-carboxylate synthetase*, *inositol monophosphate synthetase* and *Phenylalanine ammonia 1*, that are involved in proline, *myo*-inositol and benzoic acid were analyzed in both tolerant and susceptible genotypes under the two conditions. According to the results, proline and *myo*-inositol can be considered as metabolites involved in stress tolerance in Sesame.

Key word: Metabolite, susceptible, Tolerant, Salinity, Sesame.



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture

Sesame comparative metabolomics in response to salt stress

Vajihe.Ghadirian

Supervisors

Dr.M. Parsaeyan

Dr.N.Farrokhi

February 2016