

Proteome analysis of soybean root facing pod distortion syndrome

Maryam Alyari¹, Mahmoud Toorchi² , Mahdiye Parsaeiyan¹, Naser Farokhi³, Setsuko Komatsu⁴

1. M. Sc. and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahrud University of Technology, Shahrud, Iran.

2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

4. Professor, Institute of Crop Science, NARO (NICS), Tsukuba, Japan.

Correspondence:

Mahmoud Toorchi

Email: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Received: 20, Nov. 2024

Accepted: 28, Feb. 2025

How to cite:

Alyari, M., Toorchi, M., Parsaeiyan, M., Farokhi, N., & Komatsu, N. (2025). Proteome analysis of soybean root facing pod distortion syndrome. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 1 -12. (DOI:[10.30473/cb.2025.72842.1990](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72842.1990))

ABSTRACT

Pod distortion syndrome (PDS) is a particular type of growth in which soybean plants remain green long after pod maturation. Green stems even sometimes leaves and green petiole impose different problems at harvesting and lead to yield reduction. Protein expression profile of PDS soybean cultivar Katul compared with non-PDS soybean to investigate the molecular mechanisms of this syndrome. Therefore, soybean leaf samples were collected at R6 vegetative stage from the field through survey sampling and protein extracted by phosphate buffer method. A total of 124 reproducible protein spots were distinguished by 2-dimensional electrophoresis through isoelectric focusing in the first and sds-PAGE in the second dimensions. Thirty-four spots indicated by induction factor in which 11 protein spots indicated significant expression changes, statistically. Proteins interfering in PDS were classified into metabolism and energy production, protein destination and storage, signal transduction, ROS scavenging and detoxification categories. Glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, methionine synthetase, stem 31 kDa glycoprotein, 14-3-3-like protein, germin like proteins, thioredoxin and one protein with unknown function were identified through mass spectrometry in which all the proteins were shown decrease in expression change. The finding suggests that the key regulators of PDS in soybean plants are 14-3-3 and germin like protein.

KEYWORDS

Proteomics, soybean pod distortion, two-dimensional electrophoresis.



«مقاله پژوهشی»

تجزیه پروتئوم بافت ریشه سویای مبتلا به سندروم غلاف‌بندی

مریم علیاری^۱، محمود تورچی^۲ , مهدیه پارساییان^۱، ناصر فرخی^۳، ستسوکو کوماتسو^۴

چکیده

عارضه ناهنجاری یا سندروم غلاف‌بندی سویا نوع ویژه‌ای از رشد است که گیاهان مدت‌ها پس از رسیدگی غلاف‌ها، همچنان سبز باقی می‌مانند. ساقه‌های سبز و حتی برخی اوقات برگ‌ها و دمبرگ‌های سبز می‌تواند مشکلات متعددی در زمان برداشت ایجاد کنند و منجر به کاهش عملکرد شوند. به منظور بررسی سازوکار مولکولی سندروم غلاف‌بندی سویا در رقم کتول، مقایسه پروفایل بیان پروتئین‌های گیاهان سالم و مبتلا انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌های برگ سویا در مرحله رویشی R6 به روش پیمایشی از مزارع برداشت و پروتئین بافت ریشه آنها به روش بافر فسفات استخراج شدند. الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به روش متمرکزسازی بر اساس نقطه ایزوالتریک و در بعد دوم به روش SDS-PAGE منجر به مشاهده ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرار پذیر شد. فاکتور القا منجر به تشخیص تعداد ۳۴ لکه پروتئینی با تغییرات بیان قابل ملاحظه گردید و با انجام آزمون t، تعداد ۱۱ لکه پروتئینی از نظر آماری تغییر بیان معنی دار داشتند. پروتئین‌های دخیل در ناهنجاری غلاف بندی از نظر کارکرد بیولوژیکی متعلق به گروه پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی، تقسیم و ذخیره‌سازی پروتئین، انتقال سیگنال، مهار گونه های فعال اکسیژن و سم زدایی بودند. در پاسخ به سندروم غلاف بندی، پروتئین های گلو تامات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز، متیونین سنتتاز، گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای، 14-3-3-like protein، پروتئین شبه جرمین، تیوردوکسین و یک پروتئین ناشناخته به روش طیف سنجی جرمی شناسایی و همه آنها کاهش تغییرات بیان نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که کاهش بیان پروتئین‌های 14-3-3-like protein و پروتئین شبه جرمین که از تنظیم کننده های کلیدی به شمار می روند در ریشه گیاهان مبتلا نقش اساسی را در تظاهر سندروم غلاف‌بندی سویا دارند.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی، پروتئومیکس، سندروم غلاف‌بندی.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
۲. استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. استاد، انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی، سوکوبا، ژاپن.

نویسنده مسئول:

محمود تورچی

رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۰

استناد به این مقاله:

علیاری، مریم؛ تورچی، محمود؛ پارساییان، مهدیه؛ فرخی، ناصر و کوماتسو، ستسوکو (۱۴۰۴). تجزیه پروتئوم بافت ریشه سویای مبتلا به سندروم غلاف‌بندی، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۱-۱۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72842.1990](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72842.1990))

مقدمه

جمعیت جهان تا سال ۲۰۲۵ میلادی به حدود هشت میلیارد نفر و در سال ۲۰۵۰ از مرز نه میلیارد نفر خواهد گذشت که بخش عمده‌ای از این افزایش جمعیت در کشورهای فقیر و در حال توسعه اتفاق می‌افتد. پیش‌بینی می‌شود سطوح قابل کشت برای محصولات کشاورزی دنیا از متوسط ۰/۴۵ هکتار در سال ۱۹۶۰ به مساحت ۰/۱۸ هکتار برای هر نفر در سال ۲۰۵۰ کاهش پیدا کند (Alexandratos and Brainsma, 2012). در ایران، مصرف روغن‌های گیاهی با توجه به افزایش جمعیت و نیز تغییر الگوی غذایی مردم در حال افزایش است. همچنین، به دلیل پرهزینه بودن تولید پروتئین‌های حیوانی انتظار می‌رود کمبودها از طریق استفاده از پروتئین‌های گیاهی تامین شود و با توجه به جایگاه ارزشمند سویا، اهمیت تحقیقات روی عوامل موثر بر افزایش تولید سویا در سطح کشور را نشان می‌دهد (احمدی، ۱۳۷۸).

سویا (*Glycine max* L.) گیاهی دولپه، یک ساله از خانواده پروانه آسانان جزو دانه‌های روغنی می‌باشد. جایگاه ارزشمند این محصول به دلیل روغن زیاد و پروتئین فراوان دانه آن است که به ترتیب ۲۰ و ۴۰ درصد از وزن دانه را شامل می‌گردد. عوامل متعدد از جمله سندروم غلاف بندی^۱ منجر به کاهش عملکرد سویا می‌گردند. این سندروم با ظهور حالات مختلفی از جمله رشد علفی، کوتولگی، ریزش شدید گل‌ها و غلاف‌ها، تشکیل و تجمع گل‌ها و غلاف‌های غیر طبیعی، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، عدم تشکیل دانه در غلاف و نظایر آن همراه است (Messina, 2010). فرضیه‌های متفاوتی از جمله فرضیه‌های آگرونومیکی (Leonard et al., 2011)؛ اقلیمی (Richard et al., 2004)؛ زیستی مانند آفات و بیماری‌ها (Giesler et al., 2002)؛ فیزیولوژیکی (Morrison and Bartlet, 2009; Holshouser, 2009) و ژنتیکی (Leonard et al., 2011) در رابطه با تظاهر این سندرم پیشنهاد شده است. به هر حال، سندروم سویای سبز در واکنش گیاه نسبت به عوامل مختلف و

تغییرات بیان پروتئین‌های متفاوت در گیاه تظاهر می‌یابد. بنابراین، تحلیل پروتئومیکس از راهکارهای تعیین علل موثر در پیدایش این سندروم می‌تواند باشد. پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و تعریف فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی است (Xing et al., 2002). در این راستا، هدف از انجام این پژوهش تحلیل تغییرات مولکولی در سطح بیان پروتئین‌ها در بافت ریشه‌ی سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی می‌باشد تا به امکان سنجی تعیین پروتئین‌های کاندیدی دخیل در شکل‌گیری این عارضه پرداخته شود. با شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده و دارای تغییرات بیان در نتیجه این عارضه، نقش مولکولی این پروتئین‌ها در پاسخ با این عارضه ژنتیکی مورد بحث قرار می‌گیرد.

مروری بر پژوهش‌ها

در ایران در سال ۱۳۶۶ پروژه جامعی به مدت سه سال زراعی (۱۳۶۶ تا ۱۳۶۸) به منظور بررسی علل ایجاد این سندروم اجرا شد. بر اساس نتایج، تیمارهای به کار رفته در پروژه نتوانست شرایط مشابه سندروم را در بوته‌های سویا به وجود آورد و فقط در نتایج مربوط به بخش بیماری‌ها، از بوته‌های آلوده سه ویروس استخراج گردید که احتمال می‌رفت عامل آلودگی بوته‌های سویا به این سندروم باشند (چراغعلی، ۱۳۶۷). تحقیقات در سایر کشورها نشان داده است که گیاهان مبتلا به این عارضه به بیماری مرموزی با دلایل ناشناخته مبتلا شده‌اند (Morrison and Bartlet, 2009).

مطالعات نشان داده است که وارپته‌های مختلف سویا در تظاهر سندروم سویای سبز از همدیگر متفاوت هستند و از دلایل تظاهر این عارضه منشأ ژنتیکی است (Jadhav et al., 2013; Leonard et al., 2011). اصلاح ژنتیکی سویا و تولید سویای مقاوم به این عارضه یکی از محورهای اصلی تحقیقات به‌نژادی و مهندسی ژنتیک این گیاه می‌باشد. دلایل ایجاد این سندروم به طور دقیق مشخص نشده است و محققان می‌بایستی دلایل این ناهنجاری را مورد توجه و بررسی قرار دهند (Jadhav et al., 2013).

بعدی، الکتروفورز شدند. آنها گزارش کردند که ریشه حساس‌ترین اندام در پاسخ به تنش خشکی است به طوری که در تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو به ترتیب ۳۲، ۱۳ و ۱۲ نوع پروتئین به طور متمایزی بیان شدند. در این آزمایش سنتز پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم گیاه افزایش یافت و پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی و نیز پروتئین‌های سنتزی کاهش یافت. آلم و همکاران (Alam et al., 2010) تغییرات پروتئوم ریشه سویا که تحت تنش خشکی کوتاه مدت قرار داشت را با استفاده از رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تعداد ۴۵ پروتئین به طور معنی‌داری تغییر بیان داشتند. از بین این پروتئین‌ها مشخصات ۲۸ پروتئین با استفاده از طیف سنجی جرمی تعیین گردید به طوری که از بین این ۲۸ پروتئین، بیان ۵ لکه پروتئینی افزایش و بیان ۲۱ لکه پروتئینی کاهش و ۲ لکه پروتئینی نیز به عنوان لکه پروتئینی جدید شناخته شدند. کوماتسو و همکاران (Komatsu et al., 2013) اثر آبسزیک اسید در سویای تحت تنش غرقابی را با رهیافت پروتئومیک مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. هنگامی که گیاهان سویای دو روزه غرقاب شدند، محتوی آبسزیک اسید در ریشه گیاهان شاهد کاهش یافت. هنگامی که آبسزیک اسید در مدت تیمار غرقاب به گیاه اضافه شد نسبت بقاء در مقایسه با سویاهای غرقاب شده بدون تیمار آبسزیک اسید بهبود یافت. نتایج نشان داد که فراوانی ۳۴ پروتئین هسته‌ای از قبیل هیستون داستیلاز و ریونوکلئوپروتئین هسته‌ای کوچک U2 در تیمار غرقابی همراه با کاربرد آبسزیک اسید افزایش یافت. همچنین فراوانی ۳۵ پروتئین هسته‌ای از جمله ایمپورترین آلفا، فاکتور تغییر حالت کروماتین، پروتئین‌های انگشت روی، ترانسداکتین و ۵ پروتئین تقسیم سلولی کاهش یافت.

صلواتی و همکاران (Salavati et al., 2012) تغییرات پروتئومیک در ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از تنش غرقابی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. تجزیه مقایسه‌ای ژل‌های الکتروفورز دو بعدی تیمار شاهد و ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از سه روز غرقابی،

Maurício et al., 2017; Ghayeb Zamharir et al., 2022). آنچه که مسلم است سندروم سویای سبز، از واکنش گیاه نسبت به عوامل ژنتیکی و محیطی ناشی می‌گردد و به نظر می‌رسد که صرف‌نظر از دلایل مختلف، پروتئین‌های مختلف در گیاه تغییر می‌یابند. بنابراین، بررسی تجزیه و تحلیل پروتئوم گیاه با ابزارهای پروتئومیک یکی از راهکارهای تشخیص پروتئین‌های درگیر در این سندروم در سطح مولکولی می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تا کنون در زمینه سندروم سویای سبز مطالعات مچندانی از طریق تکنولوژی پروتئومیک صورت نگرفته است. این رهیافت با شناسایی پروتئین‌های درگیر در تظاهر سندروم سویای سبز کمک می‌کند تا ساز و کار تحمل به سندروم سویای سبز در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرد و درک بهتری از پاسخ گیاه به این سندروم حاصل شود. در پاسخ به تنش‌های مختلف، بیان برخی ژن‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد. تغییر بیان ژن‌ها در گیاهان به وسیله تنش‌های مختلف، باعث تغییر پروتئین‌های خاص ساختاری، آنزیمی و یا میزان فعالیت آنها در مسیرهای متابولیکی خاص می‌گردد (Seki et al., 2003).

تورچی و همکاران (Toorchi et al., 2009) مکانیسم پاسخ سویا به تنش اسمزی در تیمار با پلی اتیلن گلیکول را مورد بررسی قرار دادند. تجزیه لکه‌های پروتئینی ریشه با الکتروفورز دو بعدی نشان داد، ۳۷ پروتئین از ۴۱۵ پروتئین شناسایی شده که با روش توالی یابی ادمن و انگشت نگاری توده‌ای پپتیدی تغییر می‌یابند، متعلق به گروه پروتئین‌های مرتبط با بیماری/دفاع بودند. بر اساس نتایج آنها در شرایط تنش اسمزی در مراحل اولیه رشد میزان کافنوتیل-کوا-او-متیل ترانسفراز که در چوبی شدن نقش دارد به عنوان یک پاسخ سازگاری کاهش ولی میزان زیر واحد A از آلفا پروتئازوم ۲۰ اس که در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی نقش دارد، افزایش می‌یابد. محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2012) گیاهچه‌های سه روزه سویا را تحت تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو قرار دادند. پس از اعمال تیمار، پروتئین‌های بافت برگ، هیپوکوتیل و ریشه استخراج شد و سپس در ژل‌های دو

بصورت تصادفی نمونه‌گیری گردید. در انتخاب نمونه‌ها سعی شد که نمونه‌های موردنظر تا حد امکان از فاصله دور از یکدیگر قرار نگرفته باشند. همچنین نمونه‌های متعددی از مزارع انتخاب شدند که برای انجام الکتروفورز دو بعدی نمونه تصادفی کافی جهت تکرار دار بودن آزمایش وجود داشته باشد. نمونه‌های ریشه در فلاسک حاوی ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان استخراج پروتئین نگهداری شدند.

استخراج و تعیین غلظت پروتئین

برای استخراج پروتئین از بافت ریشه از روش بافر فسفات استفاده شد (Komatsu et al., 2007). به این ترتیب که یک گرم از بافت ریشه همراه با دو میلی‌لیتر بافر فسفات خنک در هاون خرد گردید و پس از انتقال نمونه به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روشناور به تیوب جدید منتقل و دوباره عمل سانتریفوژ با همان تنظیمات قبلی تکرار و روشناور به تیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید خالص اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد. پس از آن ورتکس انجام و با تنظیمات قبلی سانتریفوژ انجام شد. این بار روشناور دور ریخته شده و رسوب حاصله با ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتانول خنک شست‌شو داده و سپس به مدت ۲ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب پروتئینی در هاون چینی خشک و ۰/۱۲ گرم از نمونه با ۲۳۰ میکرولیتر بافر لیز محلول گردید. بافر لیز شامل ۷ مولار اوره، ۲٪ CHAPS و ۶۰ میلی مولار DDT و ۱٪ آمفولیت با ۱۰-۳ pH بود. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

الکتروفورز دو بعدی

برای تهیه ژل بعد اول از اوره، پلی آکریلامید ۳۰ درصد، APS، آمفولین‌های با pH های ۳-۱۰ و ۵-۸ و NP-40 با مقادیر مشخص استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله با ولتاژهای ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت

تعداد ۷۰ لکه پروتئینی با بیان متفاوت را از کل ۸۰ پروتئین شناسایی شده نشان داد. تعدادی از این پروتئین‌های بازبایی شده در فرآیندهای متابولیکی و ذخیره/تقسیم پروتئین‌ها درگیر هستند. تجزیه کلاستر مبتنی بر پروفایل ۷۰ پروتئین با بیان متمایز نشان داد که سه روز غرقاب و حتی در مدت سه روز پس از غرقابی تغییرات معنی داری در بیان پروتئین‌ها دارد. از طرفی، سه روز غرقاب گیاهچه‌های دو روزه سویا منجر به تنظیم پایین دست پروتئین‌های مرتبط با انتقال یون و تنظیم بالادست پروتئین‌های درگیر در سازماندهی مجدد اسکلت سلولی، توسعه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردد. علاوه بر این، تعداد ۷ لکه پروتئینی درگیر در تغییر دیواره سلولی و سنتز S-آدنوزین متیونین در ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از مدت یک روز غرقاب ردیابی شد.

نانجو و همکاران (Nanjo et al., 2013) با استفاده از روش پروتئومیک، پروتئین‌های مرتبط با تحمل به تنش غرقابی در گیاهچه‌های سویا را مطالعه کردند. برای این منظور، گیاهچه‌های سویا طی سه روز تحت تیمار غرقابی قرار گرفتند و سپس از گیاهان نمونه برداری و استخراج پروتئین انجام شد. در این مطالعه پروتئین‌ها به گروه‌های درگیر در تغییر دیواره سلولی مانند پروتئین‌های شبه بازدارنده پلی گالاکتوروناز و پروتئین شبه B1 بسط دیواره سلولی طبقه بندی شدند که احتمالاً در سیستم دفاعی گیاه درگیر باشند. همچنین تغییرات پروتئینی در ریشه‌ها نیز مشاهده شد که از جمله آن پروتئین‌های شبه زیر واحد 2A پروتئین فسفاتاز بودند که احتمالاً در مرگ سلول‌های نوک ریشه درگیر هستند. از طرفی تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها نشان داد که فراوانی پروتئین‌های درگیر در سنتز دیواره سلولی از جمله سینامیل الکل دهیدروناز در طی سه روز بعد از غرقاب کاهش یافته است.

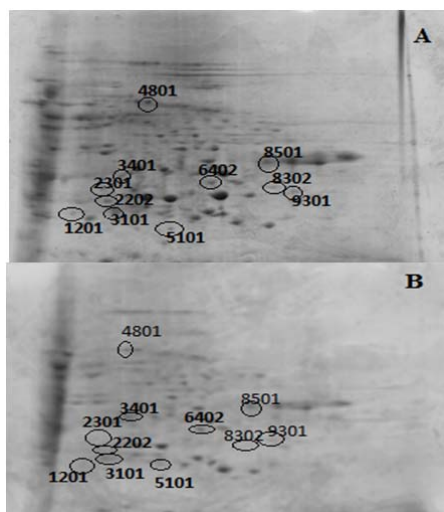
مواد و روش‌ها

نمونه برداری

برای نمونه‌گیری مزارع تحت کشت سویا در استان گلستان مورد بازدید قرار گرفت و از ریشه گیاهان سالم و بوته‌های مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویای سبز رقم کتول

نتایج و بحث

الکتروفورز دوبعدی با ژل‌های لوله‌ای در بعد اول و رنگ آمیزی به روش آبی کوماسی منجر به ظهور ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که از ۱۲۴ این لکه تکرارپذیر، ۳۴ لکه بر اساس شاخص IF دارای تغییرات بیان قابل ملاحظه‌ای می‌باشد که با انجام آزمون t، ۱۱ لکه پروتئینی از نظر آماری معنی دار گردید. تمامی لکه‌های پروتئینی معنی دار، کاهش بیان نشان دادند که این کاهش تغییرات بیان در شکل ۱ و اطلاعات لکه‌های پروتئینی مورد شناسایی در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. موقعیت نسبی و برچسب لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار شناسایی شده با استفاده از 2-DE از ریشه سویا در شرایط A: بیمار و B: شاهد

Figure 1. The relative positions and tags of proteins spots with significant expression changes identified using two-dimensional electrophoresis from soybean root under A: infected and B: control

از بین ۱۱ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار، لکه‌های شماره ۴۸۰۱، ۳۴۰۱ و ۸۵۰۱ در متابولیسم و تولید انرژی، لکه‌های شماره ۹۳۰۱ و ۶۴۰۲ در تقسیم و ذخیره سازی پروتئینی، لکه شماره ۲۳۰۱ در انتقال سیگنال، لکه‌های شماره ۵۱۰۱، ۳۱۰۱، ۲۲۰۳ و ۱۲۰۱ جزء پروتئین‌های مهارکننده ROS و سم زدایی طبقه بندی شده و بالاخره لکه شماره ۸۳۰۲ جزء پروتئین‌های ناشناخته محسوب می‌شود.

اجرا گردید. الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE با استفاده از یک ژل دوقسمتی شامل ژل جداکننده (۱۵٪) و ژل تعیین مسیر (۵٪) انجام شد. قبل از اجرای بعد دوم الکتروفورز، ژل‌های بعد اول طی دو مرحله و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در بافر SDS متعادل سازی شدند و سپس روی ژل آکریل آمید بعد دوم قرار گرفتند. به ازای هر ژل، ۲۰۰ میکرولیتر نشانگر آبی بروموفنول به بافر رانش افزوده شد. سپس عملیات رانش با جریان ثابت ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل و مدت زمان حدود ۳ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید. پس از اتمام الکتروفورز رنگ آمیزی ژل‌ها توسط محلول رنگ‌آمیزی آبی کوماسی انجام شد. رنگ بری طی دو مرحله در مرحله اول در طول شب و در مرحله دوم به مدت حداکثر نیم ساعت انجام گردید تا لکه‌های پروتئینی آشکار شده و برای تصویربرداری آماده شوند.

شناسایی پروتئین‌ها

تصویربرداری از ژل‌ها توسط دانسیومتر GS800 ساخت شرکت بیوراد و با انتخاب نوع ژل و روش رنگ‌آمیزی آبی کوماسی و نرم‌افزار Quantity one انجام شد. توسط نرم‌افزار PDQuest کلیه تصاویر ژل‌ها به همراه تکرارهای آنها فراخوانده شدند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب زده شد. پس از پایان لکه‌یابی درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون t برای درصد حجمی هر لکه پروتئینی بین تیمارها انجام شد. بدین ترتیب که لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار مشخص شدند و روند افزایشی و کاهش‌ی بیان آنها در اثر سندرم غلاف‌بندی بر اساس فاکتور القاء (IF^۱) مشخص شدند. نقاطی که دارای IF بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند (Hajheidari et al., 2005). شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش انگشتنگاری جرم پپتیدی MALDI-TOF در انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی ژاپن صورت گرفت.

جدول ۱. مشخصات لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در پاسخ به سندرم غلاف‌بندی سویا در تطبیق با پروتئین‌های

پایگاه داده‌ای NCBI

Table 1. The characteristics of proteins spots with significant expression changes in response to pod distortion syndrome matching with NCBI protein databank

شماره لکه	pI - جرم مولکولی (آزمایشی)	pI - جرم مولکولی (تئوری)	شماره دسترسی	پروتئین همولوگ
۸۵۰۱	43.93 - 6.91	44.5 - 6.47	Q5F2M9	glutamate dehydrogenase
۸۳۰۲	30.74 - 6.96	36.1 - 6.8	I1MQN7	uncharacterized protein
۶۴۰۲	32.53 - 6.48	29.3 - 6.7	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۹۳۰۱	29.35 - 7.11	29.3 - 6.7	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۳۱۰۱	21.01 - 5.75	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein
۱۲۰۱	22.69 - 5.42	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein
۳۴۰۱	35.28 - 5.79	35.5 - 6.4	O48905	malate dehydrogenase
۲۳۰۱	30.21 - 5.65	29.1 - 4.75	A0A0B2QJ68	14- 3- 3- Like protein
۴۸۰۱	84.92 - 6	84.4 - 5.9	AAQ08403	methionine synthase
۵۱۰۱	18.72 - 6.17	17.4 - 6.1	AF442385	thioredoxin
۲۲۰۱	26.27 - 5.68	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein

اسیدهای آمینه نقش دارد و برای رشد و سلامتی گیاه ضروری است (Zhang *et al.* 2011). پاتوزن‌ها معمولاً فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهند که مهمترین آنها فرآیند متابولیسم می‌باشد (Zhang *et al.*, 2011). بنابراین کاهش پروتئین متیونین سنتتاز در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی نشان‌دهنده ایجاد اختلال در متابولیسم این گیاهان می‌باشد. در گیاه گندم کاهش این پروتئین در پاسخ به تنش غرقابی گزارش شده است (Huang *et al.*, 2006). میزان بیان لکه شماره ۳۴۰۱ که به عنوان آنزیم مالات دهیدروژناز شناسایی شد در گیاهان دارای سندرم غلاف بندی سویا کاهش یافت. این آنزیم یکی از آنزیم‌های چرخه کربس می‌باشد و مالات یکی از فراورده‌های گلیکولیز است. در گلیکولیز، آگزوالوستات توسط مالات دهیدروژناز به مالات احیا می‌شود که در این فرآیند از NADH به عنوان منبع الکترون استفاده می‌شود و به NAD^+ تبدیل می‌گردد. مالات حاصل می‌تواند در واکوئل ذخیره شود و یا وارد چرخه کربس در میتوکندری شود و به وسیله مالات دهیدروژناز به آگزوالوستات شود (Wang *et al.*, 2012). که در این واکنش NADH تولید می‌گردد که برای احیای نیترات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scheibe, 2004). کاهش بیان مالات دهیدروژناز حاکی

از پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی، لکه شماره ۸۵۰۱ مربوط به آنزیم گلوتمات دهیدروژناز می‌باشد. این آنزیم واکنش تبدیل ۲ اکسوجلوتارات و ال- گلوتمات را کاتالیز می‌کند و به عنوان گیرنده و دهنده نیتروژن ایفای نقش می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در فرآیندهای سیگنال‌دهی داشته و عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی در متابولیسم کربن و نیتروژن دارد (Fontaine *et al.*, 2012). این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده وجود دارد (Dubois *et al.*, 2003) زیرا در سنتز اوره و متابولیسم واسطه‌ای اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها ایفای نقش می‌کند (Liu *et al.*, 2008; Forde and Lea, 2007). کاهش بیان این آنزیم منجر به کاهش ترکیبات اسمزی در گیاه می‌گردد و از این طریق منجر به حس تنش می‌گردد (Xu and Zhou, 2006). نقش فیزیولوژیکی اصلی این آنزیم در تامین ۲- اکسوجلوتارات برای چرخه کربس است. بنابراین، کاهش بیان این آنزیم در گیاهان مبتلا به سندرم غلاف‌بندی سویا منجر به کاهش محصول ۲- اکسوجلوتارات برای چرخه کربس و کاهش انرژی خواهد شد (Robinson *et al.* 1992). لکه پروتئینی شماره ۴۸۰۱ که بیان آن در گیاهان مبتلا به سندرم غلاف بندی سویا به طور معنی‌دار کاهش یافت مربوط به متیونین سنتتاز است که در سوخت و ساز

از کاهش تبدیل ملات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- اگسوگلو تارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- اگسوگلو تارات و ملات میزان جریان چرخه کربس را محدود خواهد کرد و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربس کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم سویای کتول است بطوری که در این واکنش NADH تولید می‌گردد و برای احیای نیترات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scheibe, 2004). کاهش بیان ملات دهیدروناز حاکی از کاهش تبدیل ملات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- اگسوگلو تارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- اگسوگلو تارات و ملات میزان جریان چرخه کربس را محدود می‌کند و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربس کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم کتول سویا است. ین و همکاران (Yin et al., 2009) تاثیر دامنه‌های حرارتی مختلف (۴، ۱۰ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد) را بر رشد سویا را با رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تحت تاثیر تیمار سرمایی پروتئین‌های درگیر در متابولیت‌های میتوکندریایی از جمله ملات دهیدروناز کاهش بیان داشتند.

پروتئین‌های دخیل در تقسیم و ذخیره سازی پروتئینی لکه‌های شماره ۹۳۰۱ و ۶۴۰۲ می‌باشند که مربوط به گلیگوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای می‌باشد. پروتئین‌های ذخیره‌ای رویشی یا گلیگوپروتئین‌ها که گلیگوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای یکی از این پروتئین‌ها است، اولین بار به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای برگی در گیاهان سویای غلاف‌زدایی شده مشاهده شد و دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می‌باشد (Mason et al., 1988). بر اساس الگوی تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای، مکان تجمع این پروتئین‌ها واکوئل سلول‌های غلاف آوندی بوده و تجمع آن‌ها در پاسخ به حذف اندام‌های زایشی ناشی از بلوک شدن انتقال آن‌ها از طریق آوندهای

برگ می‌باشد. یافته‌ها نشان می‌دهد (Sözen, 2004) که این پروتئین‌ها نه تنها به عنوان مخزن ذخیره‌سازی موقت کربن و نیتروژن ایفای نقش می‌کنند بلکه نقش مهمی در تغذیه و سازگاری به تنش‌ها در مدت رشد و توسعه گیاه دارند. این پروتئین می‌تواند در ترمیم غشاء آسیب‌دیده در اثر تنش‌های مختلف نقش داشته باشد و در نتیجه این گونه از ارقام سویا نمی‌توانند به طور مناسب پاسخ مناسبی در برابر تنش‌های مختلف نشان دهند (Aghaei et al., 2009). افروز و همکاران (Afroz et al., 2010)، وجود این نوع گلیکوپروتئین در اندام‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ گیاهچه‌های ۷ روزه سویا را گزارش کردند و بیان کردند که وجود و تجمع این پروتئین‌های ذخیره‌ای، نشان دهنده مصرف این پروتئین‌ها به عنوان منبع غذایی و تولید انرژی برای رشد و نمو است. کاهش بیان گلیگوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای در بافت‌های مختلف در اثر تنش شوری (Yin et al., 2014) و تنش غرقاب (Komatsu et al., 2010) توسط محققین گزارش شده است.

لکه پروتئینی شماره ۲۳۰۱ مربوط به 3- 3- 14- Like protein است و در انتقال سیگنال دخیل می‌باشد. این پروتئین در واکنش‌های فیزیولوژیکی و تنظیمی متعدد و در پر شدن دانه ایفای نقش می‌کند (Hajduch et al., 2005) و نقش تنظیمی مهمی در فعالیت H-ATPase غشاء پلاسمایی دارند (Shanko et al., 2003). به طوری که این آنزیم در ایجاد شیب غلظت پروتئین در سرتاسر غشاء نقش دارد و به این وسیله انرژی مورد نیاز برای انتقال ثانویه، تنظیم تورژسانس سلولی و pH درون سلولی را تامین کند (Santos et al., 2016) در مطالعه نوری و کوماتسو (Nouri and Komatsu, 2010) پروتئین 3- 3- 14- Like protein تحت تنش اسمزی ایجاد شده به وسیله پلی اتیلن گلیکول تا ۱۰ درصد کاهش بیان داشته است. در گیاه ذرت نیز کاهش بیان 3- 3- 14- Like protein در گیاهان تحت تنش شوری گزارش شده است (Zörb et al., 2010). از آنجایی که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی دارد و وجود آن‌ها در مدت پر شدن دانه ضروری می‌باشد (Hajduch et al., 2005)، احتمال دارد

مهم برای از بین بردن ROS می‌باشد و در گیاهان سویای تحت تنش اسمزی، افزایش بیان این پروتئین با تحمل بالای سویا به تنش همراه بود (Toorchi et al. 2009). لکه شماره ۸۳۰۲ متعلق به یک پروتئین ناشناخته بود که تحت عنوان پروتئین Methylecgonone reductase شناسایی شد که تحت شرایط ابتلا به عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا در مطالعات فیلوی کاهش بیان داشته است (Payghamzadeh et al., 2017).

بطور خلاصه تجزیه و تحلیل پروتئوم روی بافت ریشه سویای رقم کتول منجر به شناسایی ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر با تکنولوژی الکتروفورز دوبعدی و رنگ آمیزی با آبی کوماسی شد. از بین لکه‌های پروتئینی مشاهده شده روی ژل‌های پلی‌آکریل‌امید تعداد ۱۱ پروتئین به طور معنی‌داری از نظر آماری تغییر بیان داشتند. این پروتئین‌ها بر اساس عملکرد بیولوژیک، در پنج گروه پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی، پروتئین‌های مرتبط با تقسیم و ذخیره‌سازی، پروتئین‌های مرتبط با انتقال سیگنال، پروتئین‌های مرتبط با مهار ROS و پروتئین ناشناخته طبقه‌بندی شدند. تمامی این پروتئین‌ها در سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی کاهش بیان را نشان دادند. به نظر می‌رسد که کاهش بیان پروتئین‌های 14-3-3-like protein و پروتئین شبه جرمین که از تنظیم‌کننده‌های کلیدی به شمار می‌روند در ریشه گیاهان مبتلا نقش اساسی را در تظاهر سندروم غلاف‌بندی سویا دارند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

کاهش بیان این پروتئین به طرز ناشناخته‌ای منجر به عدم توسعه دانه در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد. به طور کلی در این مطالعه، تغییر بیان 14-3-3-Like protein ممکن است به طرق مختلف و ناشناخته فعالیت ATPase غشاء پلاسمایی، محرک‌های سیگنال‌دهی، رشد سلول و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق منجر به ایجاد عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد.

لکه‌های پروتئینی شماره ۳۱۰۱، ۲۲۰۲ و ۱۲۰۱ مربوط به پروتئین مشابه جرمین می‌باشند که جزو پروتئین‌های مهارکننده ROS و سم‌زدایی طبقه‌بندی می‌شوند. این پروتئین در طی جوانه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند. برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبیه اگسالات اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز نشان می‌دهند (Gucciardo et al., 2007). تولید H_2O_2 در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسموتازی حاکی از نقش این پروتئین‌ها در استحکام دیواره سلولی و مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های غیر زیستی است (Lane, 1994). لکه شماره ۵۱۰۱ احتمالاً مربوط به پروتئین Thioredoxin می‌باشد. Thioredoxin، آنزیم آنتی اکسیدان می‌باشد که در بهبود فرآیندهای سلولی نقش دارد و در گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. در فرآیندهای متعدد از جمله متابولیسم چربی، حمل و نقل غشاء، متابولیسم هورمون‌ها و سنتز ATP نقش دارد (Collet and Messens, 2010). این آنزیم یک آنتی اکسیدان

منابع

- احمدی، م. (۱۳۷۸). کیفیت و کاربرد دانه‌های روغنی، ناگراج، اس. (مؤلف). چاپ اول. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، ۱۱۳ ص.
- چراغعلی، ع. (۱۳۶۷). نتایج بررسی‌های طرح علل پیدایش اختلال در غلاف‌بندی سویا- منطقه گرگان و گنبد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گنبد، ص ۵۳.
- Afroz, A., Hashiguchi, A., Khan, M.R., & Komatsu, S. (2010) Analyses of the proteomes of the leaf, hypocotyl, and root of young soybean seedlings. *Protein & Peptide Letters* 17(3): 319-31. doi: 10.2174/092986610790780341.
- احمدی، م. (۱۳۷۸). کیفیت و کاربرد دانه‌های روغنی، ناگراج، اس. (مؤلف). چاپ اول. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، ۱۱۳ ص.
- چراغعلی، ع. (۱۳۶۷). نتایج بررسی‌های طرح علل پیدایش اختلال در غلاف‌بندی سویا- منطقه گرگان و گنبد،

- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Shah, A.H., & Komatsu, S. (2009). Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*, 36(1), 91-8. doi: 10.1007/s00726-008-00367.
- Alam, I., Sharmin, S.A., Kim, K.H. *et al.* (2010). Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant and Soil*, 333, 491-505. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0365-7>.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050, the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Collet, J.F., & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signaling*, 13(8), 1205-16. doi:10.1089/ars.2010.3114.
- Dubois, F., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M-B., Estavillo, J-M., Sangwan, R., André Gallais, A., Bertrand Hirel, B., *et al.* (2003). Glutamate dehydrogenase in plants, is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6), 565-576.
- Fontaine, J.X., Tercé-Laforgue, T., Armengaud, P., Clément, G., Renou, J.P., Pelletier, S., Catterou, M., Azzopardi, M., Gibon, Y., Lea, P.J., Hirel, B., & Dubois, F. (2012). Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. *Plant Cell*, 24(10), 4044-65.
- Forde, B.G., & Lea, P.J. (2007). Glutamate in plants, metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339-58. doi: 10.1093/jxb/erm121. Epub 2007 Jun 19.
- Ghayeb Zamharir, M., Shameli, S., & Bertaccini, A. (2022b). Molecular evidence of seed transmission of soybean bud proliferation and seed pods abortion phytoplasma disease. *Indian Phytopathology*, 75, 889-893. doi: 10.1007/s42360-022-00518-4.
- Giesler, L.J., Ghabrial, S.A., Hunt, T.E., & Hill, J.H. (2002). Bean pod mottle virus, A Threat to U.S. Soybean Production. *Plant Disease*, 86(12), 1280-1289. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.12.1280.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J., Brewin, N., & Bornemann, S. (2007). A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1161-1171. doi: 10.1093/jxb/erl282.
- Hajdudch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W., & Thelen, J.J. (2005). A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, 137(4), 1397-419. doi: 10.1104/pp.104.056614.
- Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I., & Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research*. 6(4), 1451-60. doi: 10.1021/pr060570j.
- Hill, C.B., Bowen, C.R., & Hartman, G.L. (2013). Effect of fungicide application and cultivar on soybean green stem disorder. *Plant Disease*, 97(9), 1212-1220. doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1191-RE.
- Holshouser, D. (2009). Green stem syndrome in soybean. Agricultural and Food Sciences. Available at, <https://pubs.ext.vt.edu/2912/2912-1430/2912-1430.html>
- Huang B., Chu C. H., Chen S. H., Juan H. F., & Chen Y. M. (2006). A proteomics study of the mung bean glyceraldehyde regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(2), 264-78. doi: 10.2478/s11658-006-0021-7.
- Jadhav, P. V., Mane, S.S., Nandanwar, R.S., Kale, P.B., Dudhare, M.S., Moharil, M.P., & Dani, R.G. (2013). Floral bud distortion in soybean and incidence in central India. *Egyptian Journal of Biology*, 15, 59-65. doi.org/10.4314/ejb.v15i1.9
- Keep, N.R., Schapaugh, W.T., Prasad, P.V.V., & Boyer, J.E. (2016). Changes in physiological traits in soybean with breeding advancements. *Crop Science*, 56, 122-131. doi.org/10.2135/cropsci2013.07.0499.
- Komatsu, S., Han, C., Nanjo, Y., Altaf-Un-Nahar, M., Wang, K., He, D., & Yang, P. (2013). Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 4769-84. doi: 10.1021/pr4001898.
- Komatsu, S., Kobayashi, Y., Nishizawa, K., Nanjo, Y., & Furukawa, K. (2010). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids*, 39(5), 1435-49. doi: 10.1007/s00726-010-0608-1
- Komatsu, S., Toorchi, M. and Yukava, K. 2007. Soybean proteomics. *Current Proteomics* 4, 182-186.

- Lane, B.G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB Journal*, 8(3), 294-301. doi: 10.1096/fasebj.8.3.8143935.
- Leonard, B. R., Boquet, D., Padgett, B., Davis, J. A., Schneider, R., Griffin, J. L., Valverde, A., & Levy, R. J. J. (2011). Soybean green plant malady contributing factors and mitigation. *Louisiana Agriculture*, 54, 32-24.
- Liu, J. Wu, Y., Yang, J., Liu, Y., & Shen, Fa. (2008). Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *Journal of Plant Biology*, 51, 11-19. doi: 10.1007/BF03030735.
- Martínez-Zaguilán, R., & Sennoune, S. R., (2016). Vacuolar H⁺-ATPase Signaling in Cancer. In Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPase. Springer, pp.371-392.
- Mason, H.S., Guerrero, F.D., Boyer, J.S., & Mullet, J.E. (1988). Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of dark-grown soybean seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. *Plant Molecular Biology*, 11(6), 845-56. doi: 10.1007/BF00019524.
- Maurício, C.M., Favoreto, L., Klepker, D., Francismar, C., & Marcelino, G. (2017). Soybean green stem and foliar retention syndrome caused by *Aphelenchoides besseyi*. *Tropical plant pathology*, 42, 403-409. doi:10.1007/s40858-017-0167-z.
- Messina, M. (2010). Insights gained from 20 years of soy research. *Journal of Nutrition*, 140(12), 2289S-2295S. doi: 10.3945/jn.110.124107.
- Mohammadi, P.P., Moieni, A., Hiraga, S., & Komatsu, S. (2012). Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1906-23. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.041.
- Morrison, J., & Bartlet, R.V. (2009). Green stem still a mystery. Education week. Edweek/go/commentary.
- Nouri, M.-Z., & Komatsu, S. (2010). Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics* 10(10), 1930-1945. doi: 10.1002/pmic.200900632.
- Payghamzadeh, K., Toorchi, M. and Shobbar, Z.S. (2017). Proteome alteration of soybean as a function of pod distortion syndrome. *Legume Research* 40, 1-10. doi: 10.18805/lr.v0i0.7836.
- Radwan, O., Wu, X., Govindarajulu, M., Libault, M., Neece, D.J., Oh, M.H., Berg, R.H., Stacey, G., Taylor, C.G., Huber, S.C., & Clough, S.J. (2012). 14-3-3 proteins SGF14c and SGF14l play critical roles during soybean nodulation. *Plant Physiology*, 160(4), 2125-36. doi: 10.1104/pp.112.207027.
- Richard, M., Shibles, J.E., Harper, R.F., & Wilson, R.C. (2004). Soybeans, Improvement, Production, and Uses. Crop Science Society of America, Inc. Agronomy Monographs. doi:10.2134/agronmonogr16.3ed.
- Robinson, S. A., Stewart, G. R., & Phillips, R. (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 98(3), 1190-1195. doi.org/10.1104/pp.98.3.1190.
- Salavati, A., Khatoona, A., Nanjoa, Y., & Komatsua, S. (2012). Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding. *Journal of Proteomics*, 75, 878-893.
- Santos, J.M., Martínez-Zaguilán, R., Facanha, A.R., Hussain, F., & Sennoune, S.R. (2016). Vacuolar H⁺-ATPase in the nuclear membranes regulates nucleo-cytosolic proton gradients. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311, C547-C558. doi:10.1152/ajpcell.00019.
- Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum*, 120(1), 21-26. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0222.x.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost, common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 194-9. doi: 10.1016/s0958-1669(03)00030-2.
- Shanko, A.V., Mesenko, M.M., Klychnikov, O.I., Nosov, A.V., & Ivanov, V.B. (2003). Proton pumping in growing part of maize root, its correlation with 14-3-3 protein content and changes in response to osmotic stress. *Biochemistry* 68(12), 1320-6. doi: 10.1023/b:biry.0000011653.46422.c3.
- Sözen, E. (2004). Vegetative Storage Proteins in Plants. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 5(1), 1-7.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M-Z., & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, 30(12), 2108-17. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.006.
- Wang, L., Ma, H., Song, L., Shu, Y., Gu, W. (2012). Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2109-27. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.007.

- Xing, T., Ouellet, T., & Miki, B.L. (2002). Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7(5), 224-30. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02255-0.
- Xu, Z.Z., & Zhou, G.S. (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224(5), 1080-90. doi: 10.1007/s00425-006-0281-5.
- Yin, G., Sun, H., Xin, X., Qin, G., Liang, Z., & Jing, X. (2009). Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiology*, 50(7), 1305-18. doi: 10.1093/pcp/pcp074.
- Yin, Y., Yang, R., & Gu, Z. (2014). Organ-specific proteomic analysis of NaCl-stressed germinating soybeans. *J Agric Food Chem*. Jul 23; 62(29), 7233-44. doi: 10.1021/jf500851r.
- Zanzarin, D.M., Hernandez, C.P., Leme, L.M., Silva, E., Porto, C., Martin do Prado, R., Meyer, M.C., Favoreto, L., Nunes, E.de, O., & Pilau, E.J. (2020). Metabolomics of soybean green stem and foliar retention (GSFR) disease using mass spectrometry and molecular networking. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(S3), 1-8.
- Zhang, Y., Zhao, J., Xiang, Y. et al. (2011). Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. *Proteome Science* 9, 52. doi.org/10.1186/1477-5956-9-52.
- Zörb, C., Schmitt, S., & Mühling, K. H. (2010). Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. *Proteomics*, 10(24), 4441-4449. doi: 10.1002/pmic.201000231.

Optimization of androgenesis in cucumber through anther culture by applying electric shock, centrifugation, and magnetic field treatments on anthers and induced calluses

Zahra Shafae¹, Mohammad Reza Abdollahi² , Sayyed Saeed Moosavi³, Hassan Sarikhani⁴

1. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

3. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

4. Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Correspondence:
Mohammad Reza Abdollahi
Email: m.abdollahi@basu.ac.ir

Received: 15, Oct. 2024
Accepted: 5, Apr. 2025

How to cite:

Shafae, Z., Abdollahi, M. R., Moosavi, S.S., & Sarikhani, H. (2025). Optimization of androgenesis in cucumber through anther culture by applying electric shock, centrifugation, and magnetic field treatments on anthers and induced calluses. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 13-30. (DOI: [10.30473/cb.2025.72510.1984](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72510.1984))

ABSTRACT

The induction of androgenesis in cucumber plays a significant role in accelerating breeding programs and improving desirable traits by producing doubled haploid plants. In the present study, the effects of different genotypes, different heat pretreatments, different levels of electric shock, different centrifugation speeds and different magnetic treatments on the androgenesis induction in cucumber anther cultures were investigated in 5 separate experiments based on completely randomized design with three replications. The results showed that the highest percentage of androgenesis induction and embryogenesis was related to the beta-alpha genotype. The effect of applying heat pretreatment in liquid culture medium on embryogenesis and plant regeneration was significant, so that the control treatment in liquid culture medium with an average of 4.36 plants per anther and then the 30°C treatment in liquid culture medium with an average of 1.4 plants per anther were the best treatments. The liquid medium was also very effective for embryogenesis, and a large number of plants were regenerated in this method. 100 V electric shock treatment showed the highest percentage of callus formation with 90% and the highest average number of embryos per anther with 0.16 embryos. Centrifuge treatment (150 g) produced the highest percentage of callus formation (73.33%) and the highest average number of embryos per anther (0.2). Magnetic water passage treatment with an average of 0.2 embryo per anther was more suitable than other magnetic treatments. The results of this research can be used in the production of pure cucumber lines in order to produce hybrid seeds.

KEYWORDS

androgenesis, heat treatment, cucumber, centrifuge, electric shock



«مقاله پژوهشی»

بهینه‌سازی آندروژنز در خیار از طریق کشت بساک با اعمال تیمارهای شوک الکتریکی، دور سانتریفیوژ و میدان مغناطیسی روی بساک‌ها و کالوس‌های حاصل

زهرا شفاپی^۱، محمدرضا عبداللهی^۲ , سید سعید موسوی^۳، حسن ساریخانی^۴

چکیده

القای آندروژنز در گیاه خیار به منظور تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف، نقش مهمی در تسریع برنامه‌های بهینه‌سازی و بهبود صفات مطلوب دارد. در پژوهش حاضر اثر ژنوتیپ‌های مختلف، پیش‌تیمارهای گرمایی مختلف، سطوح مختلف شوک الکتریکی، دورهای مختلف سانتریفیوژ و تیمارهای مختلف مغناطیسی به صورت ۵ آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، بر القاء آندروژنز در کشت بساک خیار بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد القا آندروژنز و رویان‌زایی مربوط به ژنوتیپ بتا آلفا می‌باشد. اثر اعمال پیش‌تیمار گرمایی در محیط کشت مایع بر رویان‌زایی و باززایی گیاه معنی‌دار گردید به طوری که تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میانگین ۴/۳۶ گیاه به ازای هر بساک و پس از آن تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع با میانگین ۱/۴ گیاه به ازای هر بساک مطلوب‌ترین تیمارها بودند. محیط کشت مایع برای رویان‌زایی نیز بسیار موثر بود و در نتیجه تعداد زیادی گیاه از این طریق باززایی شد. تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بیشترین درصد کالوس‌زایی را با میزان ۹۰ درصد و بالاترین میانگین رویان به ازای هر بساک را با میزان ۰/۱۶ رویان نشان داد. دور ۱۵۰g سانتریفیوژ بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۳/۳۳ درصد) و بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک (۰/۲) را ایجاد کرد. تیمار عبور از آب مغناطیسی با میانگین ۰/۲ رویان زایی در هر بساک نسبت به سایر تیمارهای مغناطیسی مناسب‌تر بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در تولید لاین‌های خالص خیار به منظور تولید بذور هیبرید مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آندروژنز، تیمار حرارتی، خیار، سانتریفیوژ، شوک الکتریکی.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۴. استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

نویسنده مسئول:

محمدرضا عبداللهی

رایانامه: m.abdollahi@basu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶

استناد به این مقاله:

شفاپی، زهرا؛ عبداللهی، محمدرضا؛ موسوی، سیدسعید و ساریخانی، حسن (۱۴۰۴). بهینه‌سازی آندروژنز در خیار از طریق کشت بساک با اعمال تیمارهای شوک الکتریکی، دور سانتریفیوژ و میدان مغناطیسی روی بساک‌ها و کالوس‌های حاصل، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۳۰-۱۳.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72510.1984](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72510.1984))

مقدمه

موثرتر و عمومی تر است. میکروسپورها قادر هستند که در شرایط مناسب درون شیشه‌ای از مسیر گامتوفیتیک به سمت مسیر اسپوروفیتیک تغییر مسیر داده و رویان یا کالوس تولید کنند که به این پدیده آندروژنز می‌گویند (چوپو و کابوچ، ۱۹۹۸). در حقیقت به فرآیند القا و باززایی گیاه هاپلوئید با استفاده از سلول های گامتی نر، آندروژنز گفته می‌شود. با توجه به اهمیت بسیار زیاد گیاهان هاپلوئید مضاعف و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، انجام مجموعه‌ای از تحقیقات در راستای دستیابی به گیاه هاپلوئید در گیاه خیار ضروری است. یکی از مشکلات موجود در این مسیر، تعداد رویان و گیاهان باززایی شده ناکافی است که ضروری است تحقیقاتی در زمینه بهینه سازی آن‌ها انجام شود لذا پژوهش حاضر در زمینه بهینه سازی کشت بساک گیاه خیار با اعمال تیمارهای فیزیکی انجام می‌شود.

پیشینه پژوهش

در القای هاپلوئیدی، شاید کلیدی‌ترین عامل موثر بر آندروژنز، استفاده از مرحله مناسب رشد و نموی میکروسپور است. بسیاری از محصولات ژنی ویژه مرحله اسپوروفیتی، قبل از میوز از سیتوپلاسم حذف می‌شوند و این موضوع باعث می‌شود که سلول در مرحله تک هسته‌ای، از لحاظ تمایز آزادانه عمل کند. در حالی که ژن های ویژه مرحله گامتوفیتی، معمولاً بعد از میتوز دانه گرده رونویسی می‌شوند. بعد از تقسیم میتوز، سیتوپلاسم دارای اطلاعات گامتوفیتی شده، تا در نهایت گامتوفیت نر تشکیل شود. بر اساس مطالعات انجام شده، این مرحله طی ۲۴ ساعت بعد از میتوز دانه گرده اتفاق می‌افتد. وجود برخی از عوامل از جمله بعضی از تنش‌ها در این مراحل می‌تواند برنامه گامتوفیتی را متوقف کرده و سبب تظاهر ژن های ویژه اسپوروفیتی شوند که نتیجه آن تغییر مسیر سلول از گامتوفیتی به اسپوروفیتی است (بوجوانی و همکاران، ۲۰۰۳). به طور کلی، برای تغییر مسیر سلول از گامتوفیتیک به اسپوروفیتیک به یک محرک موثر خارجی ضروری نیاز است. از جمله این محرک‌ها می‌توان به پیش تیمارهای مختلف مانند شوک گرمایی یا سرمایی،

خیار با نام علمی (*Cucumis sativus* L.) گیاهی دیپلوئید ($2x=2n=14$)، یکساله، دولپه و از خانواده کدوئیان است. این گیاه، علفی و دارای ساقه خزنده و پوشیده از خارهای نازک و خشن است. خیار گیاهی دگرگشن و گل‌های آن دارای کاسبرگ و گلبرگ می‌باشد و با توجه به نوع ژنوتیپ از نظر جنسیت به صورت تک جنسه، دو جنسه، تکپایه و دوپایه متفاوتند. جنس *Cucumis* حدود ۳۰ گونه دارد که خیار مهمترین گونه می‌باشد (حسن دخت، ۲۰۰۶). خیار با توجه به دارا بودن خواص دارویی از قبیل تنظیم قند خون، رفع اختلالات رماتیسمی، بهبوددهنده‌ی عملکرد دستگاه گوارش و... در میان سبزی‌ها و میوه‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (تونسر و بازتوک، ۱۹۹۱). یکی از مهم‌ترین اهداف برنامه اصلاحی خیار، تولید بذور هیبرید در این گیاه است. برای تسریع تولید بذور هیبرید لازم است از روش هاپلوئیدی استفاده شود تا علاوه بر صرفه جویی در وقت و هزینه تولید لاین خالص، باعث خودکفایی کشور و نیز عدم وابستگی به کشورهای خارجی گردد (سیدهو و همکاران، ۲۰۰۵). هر چند هزینه تولید بذور هیبرید نسبت به بذور غیر هیبرید بیشتر است ولی بذور هیبرید به خاطر قدرت رویشی بیشتر، یکنواختی بالاتر، مقاومت در برابر برخی آفات و بیماری‌ها و نیز داشتن صفات مطلوب از اهمیت و کیفیت بیشتری برخوردار هستند. بذور هیبرید از تلاقی دو لاین خالص به دست می‌آیند و این گیاهان هیبرید به منظور استفاده از هتروزیس یا قدرت دو رگه تولید می‌شوند (پرسا و همکاران، ۱۹۹۸). دستیابی به لاین خالص یکی از اساسی‌ترین مراحل در تولید بذور هیبرید است. جهت تولید لاین خالص، می‌توان از روش کشت بساک و کشت میکروسپور استفاده کرد. در روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات، دستیابی به لاین خالص از طریق خویش آمیزی و تلاقی‌های برگشتی متعدد در حدود شش تا هشت نسل امکان‌پذیر است در حالیکه با استفاده از هاپلوئیدی می‌توان این مدت را به شش ماه تا حداکثر یک سال کاهش داد. چندین روش جهت دستیابی به گیاهان هاپلوئید وجود دارد، ولی استفاده از آندروژنز نسبت به سایر روش‌ها

اشعه گاما، ساترifiوژ، گرسنگی ساکارز و نیتروژن، تنش آب یا pH بالای محیط کشت اشاره کرد. در این بین، تیمار دمایی در اکثر گیاهان عالی، بیش‌ترین تاثیر را در القاء رویان‌زایی داشته است (میشرا و گوسوامی، ۲۰۱۴).

سیستم‌های تولید گیاهان هاپلوئید معمولاً در کشت بساک و گرده به وسیله عوامل ژنتیکی کنترل می‌شوند، تحت تاثیر ژنوتیپ والدین قرار دارد و بنابراین این موضوع اغلب سبب محدودیت سیستم شده و تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها را می‌توان از این طریق اصلاح نمود (برقت و جونز، ۲۰۱۲). در این خصوص عبداللہی و همکاران (۱۴۰۳)، در آزمایشی ۷ ژنوتیپ مختلف خیار از کشورهای مختلف را از نظر پاسخ به آندروژن در کشت بساک با هم مقایسه کردند و گزارش نمودند که تفاوت‌های معنی‌داری از نظر پاسخ به آندروژن و بیان ژنهای مخصوص رویان‌زایی بین این ژنوتیپ‌ها وجود داشت. در تحقیق دیگری، اسدی و همکاران (۲۰۱۸)، پروتکل‌های مختلف کشت بساک در خیار را در دو ژنوتیپ خیار اصفهانی و بتا آلفا مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که اندام‌زایی فقط برای ژنوتیپ بتا آلفا، با ترکیبی از قرار دادن کالوس‌های حاصل از کشت بساک در محیط مایع و تاریکی، و سپس انتقال آنها به محیط جامد و نور القاء گردید. در تحقیق دیگری اثر پیش تیمار دمایی (۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰-۰ روز و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ روز) و هورمون‌ها (IAA، TDZ، ۲،۴-DIBA، NAA، BAP، KN و TDZ با غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱ و ۰/۵ میکرومولار و ترکیب ۲ میکرومولار-D-۲،۴ BAP/KN/TDZ ۰/۵ و ۱ و ۲ میکرومولار) در محیط کشت B5 بر رویان‌زایی و باززایی کشت بساک دو رقم خیار مورد بررسی قرار گرفت و ترکیب ۲ میکرومولار-۲،۴D و ۱ میکرومولار BAP به عنوان بهترین ترکیب هورمونی و پیش تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز بهترین پیش تیمار معرفی گردید (کومار و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهشی عبداللہی و همکاران (۲۰۱۶) غلظت‌های مختلف آگار (صفر، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ گرم در لیتر) و عناصر پرمصرف (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر) را بر کشت بساک و القای کالوس و رویان گامتی ۴ رقم خیار (بتا آلفا، باسمنج، اصفهانی و کرکی) مورد بررسی قرار دادند. نتایج

نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف آگار و نیز عناصر پرمصرف از نظر میزان کالوس‌زایی و رویان‌زایی گامتی در کشت بساک ۴ رقم خیار وجود دارد. دو برابر کردن عناصر پرمصرف در محیط کشت باعث افزایش ۱۰۰ درصدی کالوس‌های رویان‌زا در رقم اصفهانی شد. در حالی که سایر ارقام در مقدار یک برابر، بیشترین درصد کالوس‌های رویان‌زا را نشان دادند. بیش‌ترین درصد کالوس‌های رویان‌زا در محیط حاوی آگار ۷ میلی گرم بر لیتر به‌دست آمد. اشوک کومار و موردی (۲۰۰۴) اثر قندهای (ساکارز، مالتوز، گلوکز و فروکتوز با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵، ۰/۴، ۰/۴۵ و ۰/۵ مولار به‌طور جداگانه) و اسید آمینه‌های (گلوتامین، گلیسین، آرژنین، اسپارژین و سیستئین با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی مولار به‌طور جداگانه و نیز با ترکیب هورمونی ۱ میکرومولار BAP و ۲ میکرومولار-D-۲،۴ بررسی کردند و ارزیابی‌ها نشان داد که بهترین قند از بین قندهای مطالعه شده ساکارز با غلظت ۰/۲۵ مولار و نیز ترکیبی از همه اسیدهای آمینه مورد استفاده با غلظت ۱ میلی مولار از هر کدام برای القای رویان بهترین پاسخ را ایجاد می‌کنند. در فرآیند القای هاپلوئیدی، عوامل مختلفی از جمله شرایط فیزیولوژیک گیاه دهنده و ژنوتیپ آن، مرحله مناسب میکروسپور، اعمال پیش تیمارهای مختلف، ترکیبات موجود در محیط کشت و عوامل فیزیکی در طول مدت کشت بافت (دما و نور) بسیار تاثیرگذار است (فری و کاسول، ۲۰۱۱).

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی

ارقام مورد استفاده در این پژوهش شامل چهار رقم بذور هیبرید (F1) خیار به‌نام‌های بتا آلفا، ارشیا، سوپرسهیل و ماجد می‌باشند که در گل‌دان‌هایی با قطر ۱۵*۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک مناسب (۱ قسمت خاک زراعی، ۱ قسمت ماسه و ۱ قسمت کود دامی پوسیده) کشت شدند و در اتاق رشدی با شدت نور حدود ۱۰۰۰۰ لوکس (تأمین شده توسط پرژکتورهای مخصوص رشد گیاه) با شرایط دمایی روز ۲۲ و شب ۱۶ درجه سلسیوس و دوره نوری

غنچه‌های مناسب برداشت شده ابتدا به مدت ۵ دقیقه توسط آب شهری (غیر استریل) شسته و پس از آن یکبار با آب مقطر شستشو داده شدند، سپس غنچه‌ها درون یک ظرف قرار گرفتند و این ظرف به مدت دو روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد به منظور اعمال پیش تیمار سرمایی یخچال نگهداری شد. پس از گذشت دو روز جهت انجام مراحل استریل، غنچه‌ها زیر هود لامینار قرار داده شدند و به مدت ۱ دقیقه داخل ظرف حاوی اتانول ۷۰ درصد، یک دقیقه در آب مقطر استریل، ۱۰ دقیقه درون ظرف حاوی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و پس از آن غنچه‌ها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بعد از این مراحل جهت جداسازی بساک‌ها، غنچه‌ها از داخل آب مقطر استریل برداشته شدند (شکل ۲. A). بساک‌ها به نحوی که به بافت سوماتیکی دیواره بساک آسیبی نرسد از میله پرچم جداسازی (شکل ۲. B) و به آرامی در محیط کشت MS قرار گرفتند و هر سه هفته یک بار واکشت شدند (شکل ۲. C).

۱۶۰۸ قرار گرفتند. مراقبت‌های زراعی شامل آبیاری، کوددهی، سم‌پاشی با روش مناسب انجام گرفت. این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد.

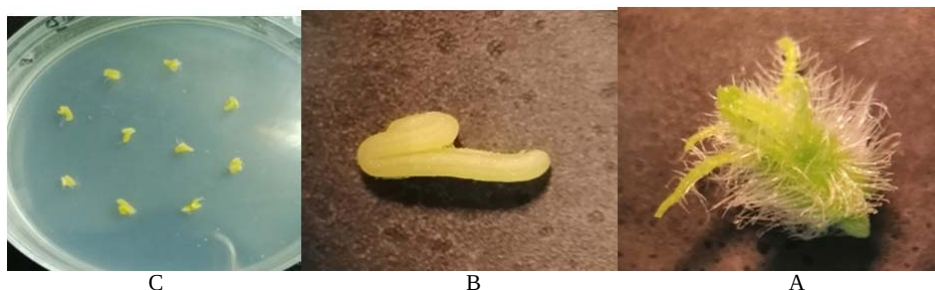
کشت بساک

در تحقیقات پیشین (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶)، بهترین مرحله رشد و نمو برای کشت بساک را اواخر تک هسته‌ای تا اوایل دو هسته‌ای اعلام کردند که غنچه گل خیار در این مرحله اندازه‌ای حدود ۳-۵ میلی متر دارد (سوپرونوا و شمیکوا، ۲۰۰۸). غنچه‌های دارای این مشخصات از گیاهان مادری برداشت شدند. شکل ۱ گل‌های نر با ابعاد مختلف را نشان می‌دهد که از گیاهان مادری خیار برداشت شده اند. گل‌های نر مناسب کشت بساک هنوز باز نشده اند و ابعادی حدود ۵ میلیمتر دارند (شکل ۱).



شکل ۱. گل‌های نر خیار با اندازه‌های مختلف

Figure 1. Male cucumber flowers of various sizes



شکل ۲. کشت بساک خیار. A: غنچه نر مناسب جهت کشت بساک خیار، B: بساک جدا شده از غنچه و C: بساک‌های کشت شده در محیط کشت کالوس‌زایی

Figure 2. Cucumber anther culture. A: Male bud suitable for cucumber anther culture, B: Anther separated from the bud, and C: Anthers cultivated in callogenesis culture medium.

نکته: به دلیل اینکه در گیاه خیار آزمایشات اولیه شامل اندازه مناسب غنچه‌ها، محیط کشت مناسب، نوع و میزان هورمون‌های مناسب جهت کالوس زایی و رویان زایی و پیش تیمار دمایی مناسب غنچه‌ها، از قبل توسط اسدی و همکاران (۲۰۱۸)، حمیدوندو عبداللهی (۱۳۹۴) انجام شده و نتایج آن‌ها گزارش شده است. در پژوهش حاضر از این نتایج بهره برده و در تمامی آزمایشات از بهترین تیمارهای گزارش شده، استفاده گردید. به این صورت که غنچه‌های ۳-۵ میلی متری انتخاب شدند. محیط کشت مورد استفاده محیط MS بود و در تمامی آزمایشات ۰/۹۱ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP و ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر هورمون ۲،۴-D جهت کالوس زایی استفاده گردید (جدول ۱) و محیط مورد استفاده جهت رویان زایی، شامل محیط MS مایع حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر ۲،۴-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۱). همچنین در تمامی آزمایشات ابتدا بساک‌ها در محیط MS کالوس زایی حاوی ۰/۹۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر ۲،۴-D کشت شدند. پس از گذشت ۵-۶ هفته از کشت بساک‌ها، کالوس‌هایی با اندازه‌های مناسب جهت اعمال تیمارها به وجود آمدند. سپس جهت القای رویان، کالوس‌ها در محیط مایع با میزان ۴ میلی گرم بر لیتر هورمون ۲،۴-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP به مدت سه هفته بر روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. در نهایت جهت باززایی رویان‌های حاصل از مرحله قبل، کالوس‌های رویان‌زا به محیط MS حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BAP منتقل شدند (جدول ۱). در تمامی محیط‌های کشت از ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز استفاده گردید. برای محیط‌های کشت جامد ۸

گرم در لیتر آگار استفاده شد و اسیدیته همه محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم گردید. لازم به ذکر است که همه‌ی پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه در اتاق رشد با شرایط نور، دما و رطوبت مناسب نگهداری شدند.

آنالیز سیتولوژیکی گیاهان دیپلوئید مادری و گیاهان هاپلوئید، از طریق روش شمارش کروموزومی

جهت مشاهده‌ی کروموزوم‌ها از روش سهرابی و همکاران (۲۰۲۱) با برخی تغییرات استفاده گردید. بدین منظور از ریشه‌های گیاهان دیپلوئید (۱/۵ تا ۲ سانتی متری حاصل از بذور جوانه زده خیار) و همچنین از رویان‌های القاء شده روی کالوس‌ها یا از مریستم انتهایی ساقه گیاهان باززایی شده هاپلوئیدی استفاده شد. نمونه‌ها درون شیشه‌ای حاوی آب و یخ درون یخچال قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت در محلول کارنوی I حاوی اتانول ۹۶ درصد و استیک اسید گلاسیال با نسبت ۳ به ۱ (v/v) به مدت یک روز در یخچال نگهداری شدند. برای انجام هیدرولیز نمونه‌ها در محلول HCl یک مولار در مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. برای توقف هیدرولیز نمونه‌ها از حمام آب گرم خارج و سه مرتبه با آب سرد (آب صفر درجه سانتی گراد) شستشو داده شدند. پس از خشک کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی، جهت رنگ آمیزی درون محلول استوکارمن ۱ درصد قرار گرفتند و بعد از گذشت یک هفته، این نمونه‌ها برای مشاهده کروموزوم‌ها استفاده شدند و کروموزوم‌ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ قابل رویت شدند.

جدول ۱. محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی مناسب جهت القاء کالوس و رویان و باززایی گیاه در کشت بساک خیار

Table 1. Culture media containing suitable hormonal compounds for callus and embryo induction and plant regeneration in cucumber anther culture

هدف کشت بافت Purpose of tissue culture	نوع محیط کشت Culture medium type	2,4-D (mg l ⁻¹)	BAP (mg l ⁻¹)
القاء کالوس Callus induction	Solid MS	0.25	0.91
القاء رویان Embryo induction	Liquid MS	4	0.1
باززایی گیاه Plant regeneration	Solid MS	-	3

بررسی اثر تیمارهای مختلف شوک الکتریکی بر

کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

در این آزمایش تیمارهای مختلف شوک الکتریکی شامل: ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ولت به همراه شاهد هم بر روی بساک‌ها و هم بر روی کالوس‌های حاصل از کشت بساک رقم بت‌آلفا به صورت پالس در قالب دو آزمایش مجزا اعمال شدند. جهت بررسی این تیمار روی بساک‌ها ابتدا بساک‌های رقم بت‌آلفا از درون غنچه گل خیار جدا شدند و سپس درون میکروتیوب‌های حاوی محیط MS مایع با ساکارز ۱۰۰ گرم بر لیتر (برای زنده ماندن بساک‌ها) قرار داده شدند و توسط دستگاه الکتروپوریشن شوک‌های الکتریکی شامل: ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ولت و هر کدام به صورت سه پالس انجام شد. پس از اعمال شوک‌های الکتریکی، بساک‌ها از درون میکروتیوب‌ها خارج و جهت خشک شدن روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. بساک‌ها به آرامی با استفاده از پنس از روی کاغذ صافی برداشته شدند و درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط MS جامد قرار گرفتند و جهت نگهداری به اتاق رشد منتقل شدند. ۵-۶ هفته در این محیط باقی ماندند و بساک‌ها به کالوس‌هایی بزرگ تبدیل شدند، سپس کالوس‌ها درون ارلن حاوی محیط MS مایع قرار گرفتند و روی شیکر در تاریکی و با دور ۱۰۰ به مدت سه هفته نگهداری شدند و پس از آن به محیط MS جامد با میزان هورمون ذکر شده، به منظور باززایی رویان‌ها انتقال یافتند. این تیمار بر روی کالوس‌ها به همین صورت مورد بررسی قرار گرفت با این تفاوت که به جای بساک از کالوس‌های رویان‌زا استفاده شد.

بررسی اثر تیمار دور سانتریفیوژ بر کالوس‌زایی و

رویان‌زایی در کشت بساک خیار

در این آزمایش دوره‌های مختلف سانتریفیوژ شامل: ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ g به مدت ۳ دقیقه و با دمای ۴ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. به منظور اعمال تیمارها بر روی بساک‌ها از میکروتیوب‌هایی که حاوی محیط MS مایع بدون هورمون و با میزان ساکارز ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بودند، استفاده شد. ابتدا بساک‌ها در داخل این محیط قرار داده شدند و پس از اعمال تیمار دور سانتریفیوژ، بساک‌ها به محیط جامد کالوس‌زایی منتقل و سپس در اتاق

اثر ژنوتیپ در القای کالوس، رویان‌زایی و باززایی

گیاه در کشت بساک خیار

در این آزمایش بساک‌های چهار رقم (ژنوتیپ) خیار بت‌آلفا، ماجد، ارشیا و سوپر سهیل در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی ذکر شده کشت گردیدند. سپس بساک‌های آن‌ها در محیط کشت MS کالوس‌زایی که در بالا شرح داده شد، قرار گرفتند و در اتاق رشد نگهداری شدند. ۵-۴ روز پس از کشت بساک‌ها متورم شدند و پس از ۶-۵ هفته کالوس‌ها به اندازه مناسبی رسیدند و به منظور القای رویان در محیط مایع تکمیل شده با هورمون‌های ۲،۴-D و BAP، به مدت سه هفته روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت سه هفته به جهت باززایی رویان‌های القا شده، کالوس‌های رویان‌زا به مدت سه هفته در محیط MS حاوی سیتوکینین قرار داده شدند. و در نهایت رویان‌های باززا شده برای رشد و نمو در محیط کشت MS فاقد هورمون قرار گرفتند.

بررسی اثر پیش‌تیمارهای گرمایی اعمال شده روی

کالوس‌ها، بر روند رویان‌زایی و باززایی گیاه در

کشت بساک خیار

در این آزمایش تیمارهای مختلف گرمایی شامل: ۳۰ درجه سلسیوس به مدت یک روز، ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت، ۳۸ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت، بدون تیمار حرارتی (شاهد) در محیط کشت مایع و بدون تیمار حرارتی (شاهد) در محیط کشت جامد بر روی کالوس‌های رقم بت‌آلفا خیار اعمال گردیدند. ابتدا بساک‌های رقم بت‌آلفا را درون محیط کشت MS جامد با ترکیبات هورمونی مناسب جهت کالوس‌زایی، قرار داده شدند. پس از گذشت ۶-۵ هفته کالوس‌ها به اندازه مناسب رسیدند و جهت اعمال تیمار حرارتی درون انکوباتور قرار گرفتند. سپس به محیط کشت مایع منتقل شدند و روی شیکر و با شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت سه هفته کالوس‌های رویان‌زا به محیط جامد باززایی انتقال یافتند.

رشد نگهداری شدند. کالوس‌های تشکیل شده به درون ارلن حاوی محیط MS مایع منتقل شدند و به مدت سه هفته بر روی شیکر با شرایط تاریکی و شدت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از گذشت سه هفته کالوس‌های رویان‌زا به منظور باززایی به محیط MS جامد تکمیل شده با میزان ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP قرار داده شدند.

بررسی اثر میدان مغناطیسی بر کالوس زایی و رویان زایی در کشت بساک خیار

بساک‌هایی که در محیط کشت مناسب کشت شدند و پتری دیش‌های حاوی بساک‌ها در اتاق رشد و در معرض میدان مغناطیسی با شدت بالا قرار گرفتند. تیمارهای دیگر با استفاده از دستگاه مخصوص آب مغناطیسی اعمال گردید و برای درست نمودن محیط کشت MS این آب مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور اعمال تیمارهای آب مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت، ۱ ساعت و صفر ساعت (عبور از دستگاه) صورت پذیرفت. بساک‌ها در زیر هود لامینار از غنچه‌ها خارج گردیدند و در محیط کشت MS حاوی آب مغناطیسی کشت شدند. در نهایت پتری دیش‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری و دمایی مناسب انتقال یافتند. پس از ۵-۶ هفته، کالوس‌های تشکیل شده به محیط کشت MS مایع منتقل شدند و روی شیکر گرفتند. پس از گذشت سه هفته به محیط MS جامد جهت باززایی منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شدند. هر تکرار شامل یک پتری دیش بود که در آن ۱۰ بساک خیار کشت گردید. آزمون نرمالیت به استفاده از نرم افزار MINITAB و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

یافته‌های پژوهش

مشاهده و بررسی کالوس‌ها و رویان‌های القاء شده در کشت بساک خیار
در تمامی آزمایش‌های صورت گرفته گیاهان مادری خیار

(شکل ۳. A) شروع به غنچه دهی کردند و غنچه‌های نر با اندازه مناسب (شکل ۳. B) که دارای بساک‌های حاوی میکروسپور‌هایی که در مرحله تک هسته ای میانی و انتهایی بودند به عنوان ریز نمونه استفاده شد. بساک‌های جدا شده از این غنچه‌ها در محیط کشت MS جهت القاء کالوس کشت شدند (شکل ۳. C). ۴ الی ۵ روز پس از کشت، بساک‌ها شروع به متورم شدن نمودند و کالوس‌زایی در آن‌ها اتفاق افتاد و ۵-۶ هفته پس از کشت، بساک‌ها به کالوس‌هایی با اندازه مناسب جهت اعمال تیمارها تبدیل گشتند (شکل ۳. D). تیمارها بر روی کالوس‌ها اعمال شدند و در محیط مناسب جهت رویان‌زایی قرار گرفتند. به تدریج رویان‌ها بر روی کالوس‌های رویان‌زا القاء شدند و تشکیل رویانهای کروی، قلبی و اژدری شکل (شکل ۳. E) و همچنین رویانهای بالغ لپه ای شکل (شکل ۳. F) را دادند. در نهایت کالوسهای حاوی این ساختارهای رویانی به محیط کشت باززایی انتقال یافتند و مراحل اولیه باززایی در آنها مشاهده شد (شکل ۳. G و H) به طوری که گیاهچه‌ها پلویید از آن‌ها به دست آمد (شکل ۳. I).

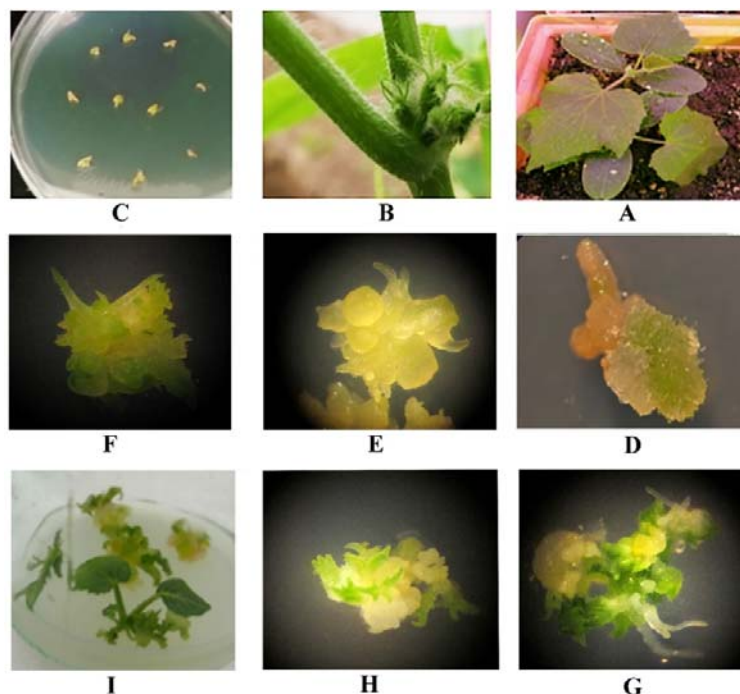
مشاهده و شمارش کروموزوم‌های ریشه گیاه

دیپلوئید (مادری) و رویان‌های القاء شده در خیار
به منظور تعیین سطح پلوئیدی رویان‌های القاء شده از کشت بساک خیار، مطالعات سیتولوژیکی با روش اسکواش بر روی نوک ریشه‌های گیاهان دهنده (مادری) و رویان‌های القاء شده انجام شد و نتایج نشان داد که گیاهان مادری دیپلوئید و دارای $2n=2x=14$ کروموزوم هستند (شکل ۴. A). در حالی که، رویان‌های القاء شده ماهیت هاپلوئیدی داشته و حاوی $n=x=7$ کروموزوم می‌باشند (شکل ۴. B).

اثر ژنوتیپ بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

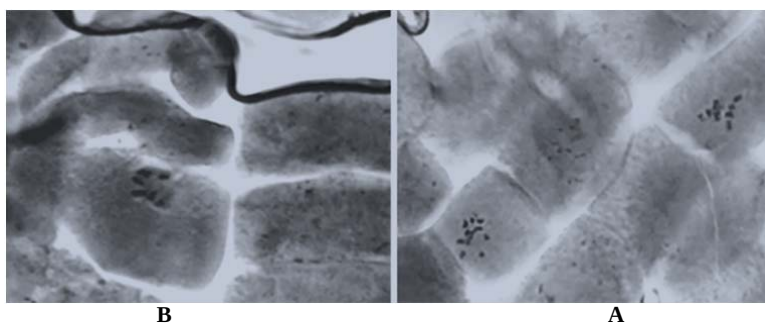
نتایج تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر صفات مختلف مطالعه شده در کشت بساک خیار (جدول ۲) نشان داد بین

ژنوتیپ‌ها از نظر صفت درصد کالوس‌زایی، تفاوت آماری
معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود داشت. بین ژنوتیپ‌ها از نظر
صفت تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری
معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ وجود داشت.



شکل ۳. مراحل باززایی گیاه از طریق کشت بساک در خیار. A: گیاه مادری (دیپلوئید)، B: غنچه‌های مناسب جهت کشت بساک خیار، C: بساک‌های کشت شده در محیط کشت القاء کالوس، D: کالوس القا شده روی بساک، E: رویانهای تشکیل شده روی کالوس در مراحل مختلف کروی شکل، قلبی شکل و اژدری شکل، F: رویانهای بالغ شده در مرحله لپه ای، G و H: مراحل اولیه باززایی رویانها، I: گیاهچه‌های باززایی شده در داخل شیشه مربایی.

Figure 3. Stages of plant regeneration through anther culture in cucumber. A: Mother plant (diploid), B: Buds suitable for cucumber anther culture, C: Anthers cultured in callus induction medium, D: Callus induced on anthers, E: Embryos formed on callus at different stages of globular, heart-shaped and torpedo-shaped, F: Mature embryos at the cotyledon stage, G and H: Early stages of embryo regeneration, I: Regenerated plantlets inside a jar.



شکل ۴. سلول‌های دیپلوئید و هاپلوئید در خیار. A: سلول دیپلوئید به دست آمده از آزمون سیتولوژیکی نوک ریشه گیاه مادری با ۱۴ کروموزوم. B: سلول‌های هاپلوئید به دست آمده از آزمون سیتولوژیکی نوک ریشه گیاه باززا شده با ۷ کروموزوم

Figure 4. Diploid and haploid cells in cucumber. A: Diploid cell obtained from cytological examination of the root tip of the mother plant with 14 chromosomes. B: Haploid cells obtained from cytological examination of the root tip of the regenerated plant with 7 chromosomes.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 2. Analysis of variance of genotype effect on studied traits in cucumber anther culture

میانگین مربعات (Mean squares)	درصد کالوس‌زایی	درجه آزادی	منابع تغییر
میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک	Callogenesis percentage	Degree of freedom	Source of variation
0.02496**	7.22*	3	ژنوتیپ (Genotype)
0.00257	1.11	8	خطای آزمایشی (Experimental error)
5.95%	14.21%		ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)

* and ** indicate significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

* و ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ را نشان می‌دهند.

برصفات مختلف مطالعه شده در کشت بساک خیار (جدول ۳) نشان داد که بین تیمار حرارتی و نوع کشت با میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۰۱ وجود دارد.

نتایج نشان داد که بیشترین تعداد رویان به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میانگین ۶/۴۶ رویان بود و کمترین میزان تعداد رویان با میانگین ۰/۲۳۳ در تیمار شاهد و در محیط کشت جامد مشاهده شد (شکل ۷).

با توجه به شکل ۸ بیشترین تعداد گیاه به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد در محیط کشت مایع با میانگین ۴/۳۶ و پس از آن در تیمار ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت و در محیط کشت مایع با میانگین ۱/۴ گیاه به ازای هر بساک مشاهده گردید.

تنش‌های گرمایی و سرمایی از جمله تنش‌هایی هستند که عمدتاً به منظور القای مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورها استفاده می‌شوند (شریعت پناهی و همکاران، ۲۰۰۶). تاثیر تیمار گرمایی نیز بر بازآرایی اسکلت سلولی میکروسپورها گزارش شده است. از جمله پیش تیمارهای متداول و مؤثر بر مقدار کالوس‌زایی و رویان‌زایی، پیش تیمار سرمایی و گرمایی می‌باشد (توورایو و همکاران، ۲۰۰۱). تنش گرمایی برای انگیزش رویان‌زایی میکروسپورهای درون بساک در بسیاری از گیاهان از جمله تیره کدویان استفاده شده است (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۱). در آزمایش حاضر اثر تیمارهای مختلف گرمایی شامل: ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت یک روز، ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت و ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت همراه با شاهد

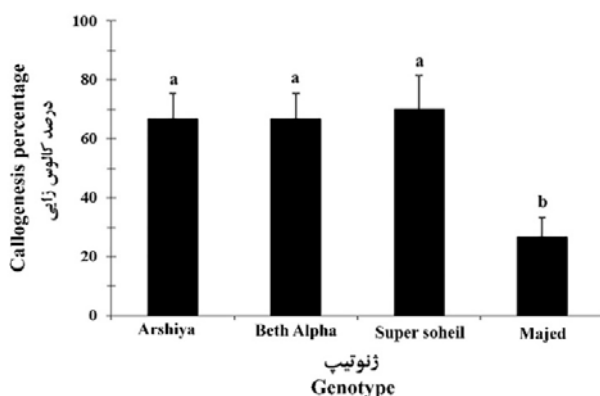
مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر درصد کالوس‌زایی (شکل ۵) نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی در ژنوتیپ‌های سوپرسهیل، ارشیا و بت‌آلفا اتفاق افتاد. کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ژنوتیپ ماجد با میزان ۲۶/۶۶ درصد بود. بهترین ژنوتیپ جهت رویان‌زایی، ژنوتیپ بت‌آلفا (با میانگین ۰/۳۶ رویان به ازای هر بساک) بود و ژنوتیپی که کمترین میزان رویان‌زایی را داشت، ژنوتیپ ماجد با میانگین ۰/۰۳ رویان به ازای هر بساک بود (شکل ۶).

براساس مطالعات صورت گرفته، محققین ژنوتیپ را یک عامل مؤثر در پاسخ به آندروژنز خیار معرفی کرده‌اند (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶). نتایج آزمایشات صورت گرفته نشان داد ژنوتیپ گیاه مادری بر پاسخ به آندروژنز تاثیرگذار است. از نظر آماری مشخص شد که ژنوتیپ‌ها از نظر پاسخ به کالوس‌زایی و رویان‌زایی تفاوت آماری معنی‌داری داشته‌اند. بهترین ژنوتیپ از نظر درصد کالوس‌زایی سوپرسهیل و پس از آن ژنوتیپ‌های بت‌آلفا و ارشیا بود. البته با توجه به اینکه در آندروژنز، رویان‌زایی از اهمیت بیشتری برخوردار است، در نتیجه بت‌آلفا که هم از نظر کالوس‌زایی و هم رویان‌زایی ژنوتیپ مطلوبی بود، به عنوان بهترین ژنوتیپ برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردید. بر اساس مشاهدات محققین، ژنوتیپ بر درصد بساک‌های پاسخ‌دهنده، درصد تشکیل کالوس و تعداد رویان در هر بساک در آندروژنز خیار تاثیر داشته است (عبداللهی و همکاران، ۲۰۱۶؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۳؛ سانگ و همکاران، ۲۰۰۷) که این نتایج با نتایج آزمایش حاضر همخوانی دارد.

اثر پیش‌تیمارهای گرمایی اعمال شده روی کالوس‌ها بر روند رویان‌زایی و باززایی گیاه در کشت بساک خیار نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار حرارتی و نوع کشت

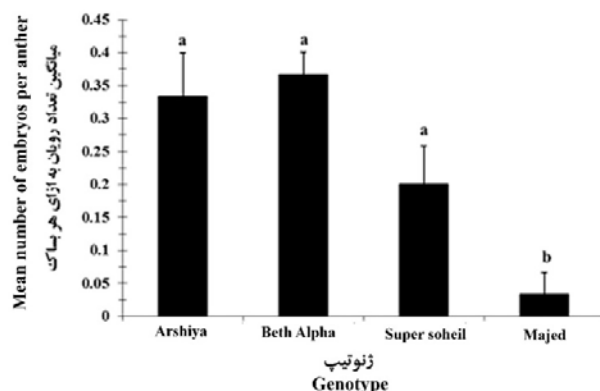
کشت مایع بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و همچنین بیشترین میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک را ایجاد کرد.

(بدون تیمار حرارتی) در محیط کشت مایع و (شاهد در محیط کشت جامد) بر روی کالوس های رقم بتاآلفا خیار بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار شاهد در محیط



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 5. Mean comparison of the effect of genotype on the percentage of callogenesis in cucumber anther culture



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 6. Mean comparison of the effect of genotype on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

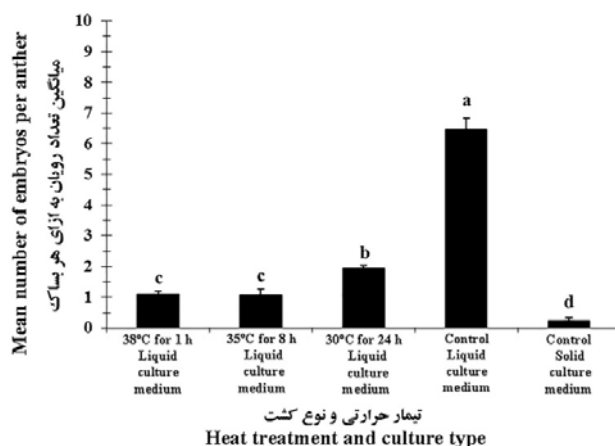
جدول ۳. تجزیه واریانس اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 3. Analysis of variance of the effect of heat treatment and culture type on the studied traits in cucumber anther culture

میانگین مربعات (Mean squares)		درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
میانگین تعداد گیاه باززایی شده به ازای هر بساک Mean number of regenerated plants per anther	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther		
1.3006***	18.472***	4	تیمار گرمایی Heat treatment
0.0161	0.123	10	خطای آزمایشی Experimental error
11.15%	16.24%		ضریب تغییرات (C.V.) Coefficient of variation

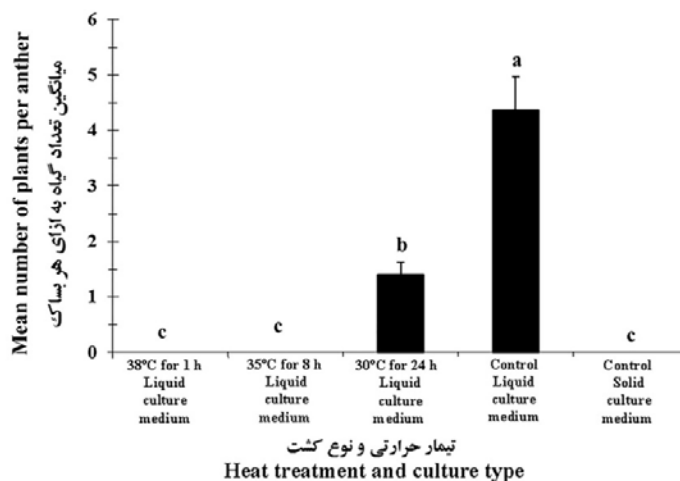
*** indicates a significant difference at the 0.001 level

*** تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ را نشان می‌دهد.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 7. Mean comparison of the effect of heat treatment and culture type on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر تیمار حرارتی و نوع کشت بر میانگین تعداد گیاه باززایی شده به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 8. Mean comparison of the effect of heat treatment and culture type on the mean number of regenerated plants per anther in cucumber anther culture

این آزمایش دو بحث مطرح می‌گردد، اولاً محیط کشت مورد استفاده و ثانیاً دمای انتخاب شده جهت اعمال تیمارها و تأثیری که بر رویان‌زایی می‌گذارند.

به نظر می‌رسد در این آزمایش محیط کشت مایع تأثیر بسزایی در القای رویان داشته است که این نتیجه با انتخاب شدن بهترین تیمار که همان تیمار شاهد و کشت در محیط کشت مایع است به وضوح مشخص گردیده است و همچنین تیمار دمایی با دمای پایین (۳۰ درجه سانتی‌گراد) نسبت به تیمار دمایی با دمای بالا (۳۵ و ۳۸

در این پژوهش مشخص شد بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و بیشترین میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک مربوط به تیمار شاهد در محیط کشت مایع بود و تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع نیز تیمار مطلوبی از نظر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک بود. در سایر تیمارهای دمایی ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت و شاهد در محیط کشت جامد رویانی القا نشد. در

اثر تیمارهای مختلف شوک الکتریکی بر

کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

با توجه به جدول ۴ تیمارهای مختلف شوک الکتریکی برای صفت درصد کالوس‌زایی در سطح ۰/۰۱ و برای صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار آماری را نشان دادند.

مقایسه میانگین اثرات شوک الکتریکی بر درصد کالوس‌زایی نشان داد که تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بیشترین تعداد کالوس‌زایی (۹۰ درصد) را به خود اختصاص داد. کمترین درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد با میزان ۴۶/۶۶ درصد بود (شکل ۹).

با توجه به شکل ۱۰، بیشترین میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک ۰/۱۶ رویان، متعلق به تیمار ۱۰۰ ولت شوک الکتریکی بود.

درجه سانتی‌گراد) برای رویان‌زایی و در نهایت باززایی گیاه مطلوب‌تر بوده است.

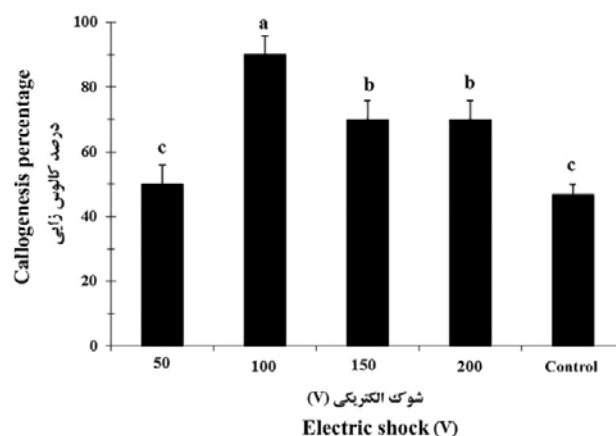
در این آزمایش پس از خارج شدن کالوس‌ها از محیط کشت مایع و قرار گرفتن آن‌ها در محیط جامد جهت القای رویان، کالوس‌های جدیدی روی کالوس‌های قبلی تشکیل شد و سپس در دو تیمار شاهد کشت در محیط کشت مایع و تیمار ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی کالوس‌های جدید رویان القا شد. همچنین در تیمارهای دمایی ۳۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی کالوس‌های قبلی، کالوس‌های جدید شکل گرفت و حتی ساختارهای رویان مانند روی آن‌ها تشکیل شد اما پس از گذشت دو هفته ساختارهای رویان مانند در همان حالت باقی ماندند و به رویان تبدیل نشدند. احتمال داده می‌شود که دمای بسیار بالا به کالوس آسیب وارد کرده و مانع از رویان‌زایی آن‌ها شده است.

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر شوک الکتریکی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 4. Analysis of variance of the effect of electric shock on the studied traits in cucumber anther culture

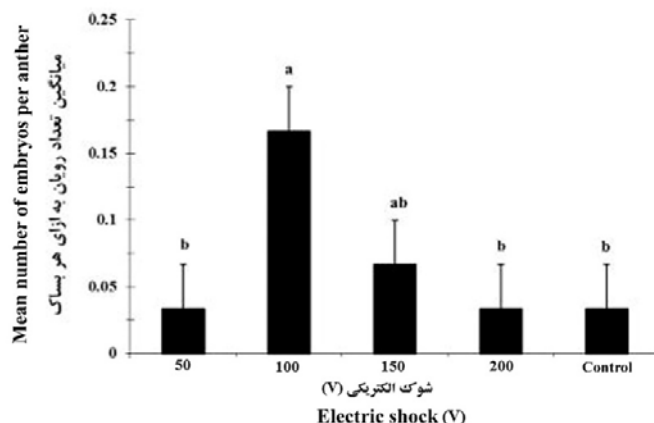
میانگین مربعات (Mean squares)		درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther	درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage		
0.00420*	926.7**	4	شوک الکتریکی (Electric shock)
0.00147	86.7	10	خطای آزمایشی (Experimental error)
5.1%	14.25%		ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)

* و ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ را نشان می‌دهند. * and ** indicate significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر شوک الکتریکی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 9. Mean comparison of the effect of electric shock on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۰. مقایسه میانگین اثر شوک الکتریکی بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار
Figure 10. Mean comparison of the effect of electric shock on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

کالوس‌های آبکی تبدیل شدند و در نهایت در این آزمایش رویانی القا نشد و کالوس‌ها در همین مرحله متوقف شدند و به همین دلیل، نتایج قابل قبولی از این آزمایش بدست نیامد.

اثر تیمار دور سانتریفیوژ بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) حاصل از دور اعمال شده توسط سانتریفیوژ با دورهای مختلف در کشت بساک خیار نشان داد که بین تیمارهای مختلف برای صفت درصد کالوس‌زایی و صفت میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود دارد.

با توجه به نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱۱)، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۳/۳۳ درصد) مربوط به دور ۱۵۰g سانتریفیوژ بود. دور ۶۰۰g سانتریفیوژ با میزان ۴۶/۶۶ درصد کمترین درصد کالوس‌زایی را به خود اختصاص داد.

طبق شکل ۱۲، بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک (۰/۲ رویان) متعلق به دور ۱۵۰g سانتریفیوژ بود. استفاده از پیش تیمارهای فیزیکی مانند دور سانتریفیوژ و الکتروپوریشن القای آندروژنز را در کشت بساک گونه‌های مختلف از قبیل نخود، گل گاوزبان، تاتوره، توتون، و نخودفرنگی افزایش داده است (رشیدی و همکاران، ۱۳۹۸؛ سنایی هویدا و همکاران ۲۰۱۷، گریوال و همکاران، ۲۰۰۹؛ سانگوان، ۱۹۷۷).

شوگ الکتریکی موجب ایجاد منافذی در غشای سلول شده و ورود مواد مورد نیاز جهت رشد سلول را تسهیل می‌کند (ریچ و همکاران، ۱۹۸۷). در این آزمایش اثر شوگ الکتریکی بر کالوس‌زایی و رویان‌زایی در کشت بساک خیار بررسی شد. مقایسه ولتاژهای مختلف شوگ الکتریکی نشان داد که ۱۰۰ ولت بیشترین درصد کالوس‌زایی و بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را ایجاد می‌کند.

با بررسی‌های صورت گرفته در این آزمایش مشخص شد که تیمار ۵۰ و ۲۰۰ ولت از نظر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک با تیمار شاهد (بدون اعمال شوگ الکتریکی) در یک سطح هستند. به نظر می‌رسد که ۵۰ ولت تاثیر چندانی روی میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک نداشت و این می‌تواند به علت پایین بودن ولتاژ باشد. جریان‌های الکتریکی بالاتر، چون منجر به زخمی شدن بساک‌ها و کاهش یا عدم تولید رویان می‌شوند مضر هستند و تیمار ۲۰۰ ولت در این آزمایش رویان‌زایی پایینی را نشان داد. شوگ الکتریکی در تبادل مواد محیط کشت به داخل سلول نقش دارد، همچنین شوگ الکتریکی موجب رشد پرتوپلاست شده و توانایی باززایی گیاه را افزایش می‌دهد (ریچ و همکاران، ۱۹۸۷).

در بخش دیگر این آزمایش، اعمال تیمارهای الکتریکی بر روی کالوس‌های حاصل از کشت بساک انجام گردید، اما این کالوس‌ها به القای آندروژنز پاسخ‌دهی نشان ندادند و کالوس‌ها از حالت عادی که بافتی اسفنجی داشتند به

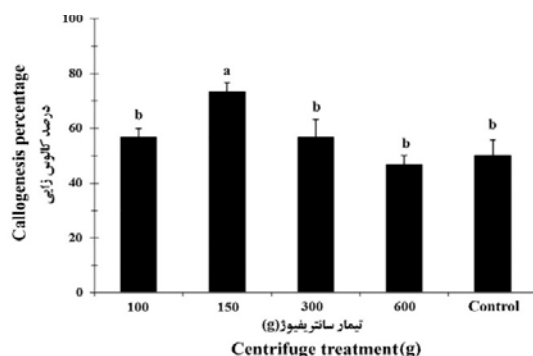
جدول ۵. تجزیه واریانس اثر دور سانتریفیوژ بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 5. Analysis of variance of the effect of centrifuge speed on the studied traits in cucumber anther culture

میانگین مربعات (Mean squares)	درجه آزادی (Degree of freedom)	منابع تغییر (Source of variation)
میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک (Mean number of embryos per anther)	درصد کالوس زایی (Callogenesis percentage)	
0.00745*	316.7*	دور سانتریفیوژ (Centrifuge speed)
0.00163	66.7	خطای آزمایشی (Experimental error)
5.38%	14.41%	ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)

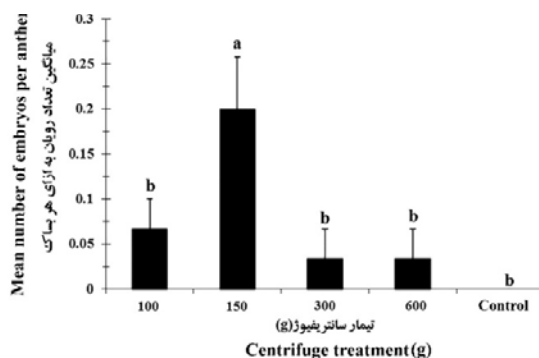
* Indicates a significant difference at the 0.05 level.

* تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد.



شکل ۱۱. مقایسه میانگین اثر دور سانتریفیوژ بر درصد کالوس زایی در کشت بساک خیار

Figure 11. Mean comparison of the effect of centrifugation speed on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۲. مقایسه میانگین اثر دور سانتریفیوژ بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار

Figure 12. Mean comparison of the effect of centrifugation speed on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

سانتریفیوژ و شوک الکتریکی را بر کارایی آندروژنز در کشت بساک نخود بررسی کردند. نتایج نشان داد بیشترین درصد رویان زایی گامتی از بساک های تیمار شده نخود با دور سانتریفیوژ ۱۵۰ g به مدت ۶ دقیقه به دست آمد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

اثر میدان مغناطیسی بر کالوس زایی و رویان زایی در کشت بساک خیار

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۶) حاصل از تیمار

در آزمایش حاضر مقایسه دوره های مختلف سانتریفیوژ نشان داد که دور ۱۵۰g به مدت سه دقیقه بیشترین درصد کالوس زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را به همراه داشت. تیمار دور سانتریفیوژ بر القای رویان در گیاه خیار موثر است اما به نظر می رسد که تیمارهایی با دور متوسط مانند ۱۵۰g نتیجه مطلوب تری را ایجاد می کند. از نظر ظاهری کالوس های این آزمایش قبل از قرار گیری در محیط کشت رویان زایی زنده های ریشه ماندی بر روی خود ایجاد کردند. رشیدی و همکاران (۱۳۹۸) اثر دوره های مختلف

میدان مغناطیسی با شدت بالا هیچ رویانی حاصل نگشت.

این آزمایش به منظور بررسی اثر میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی بر کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس نسبت به سایر تیمارها بالاترین درصد کالوس‌زایی و بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را داشت. میدان مغناطیسی روی آنزیم‌ها و ترکیبات پروتئینی تاثیر می‌گذارد و باعث تغییر شکل پروتئین‌ها می‌شود (واشیت و ناگراجان، ۲۰۱۰). همچنین در آزمایشی آبرو و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از تیمارهای مغناطیسی ضعیف باعث بهبود تکثیر درون شیشه ای و ریشه‌زایی در گونه گیاهی *Genista aetnensis* (Raf. Ex Biv.) Dc می‌گردد.

میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی بر صفات مختلف مورد مطالعه در کشت بساک خیار نشان داد که بین تیمارهای مختلف برای صفات درصد کالوس‌زایی و میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ وجود دارد.

بالاترین درصد کالوس‌زایی (۶۰ درصد) به تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس تعلق گرفت. کمترین درصد کالوس‌زایی (۲۳/۳۳ درصد) مربوط به تیمار قرار گرفتن بساک‌ها به مدت سه هفته در میدان مغناطیسی با شدت بالا بود (شکل ۱۳).

با توجه به شکل ۱۴، بیشترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک (۰/۲ رویان‌زایی) مربوط به تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیس بود ولی از تیمار آب مغناطیس شده به مدت ۲۴ ساعت و تیمار سه هفته در معرض

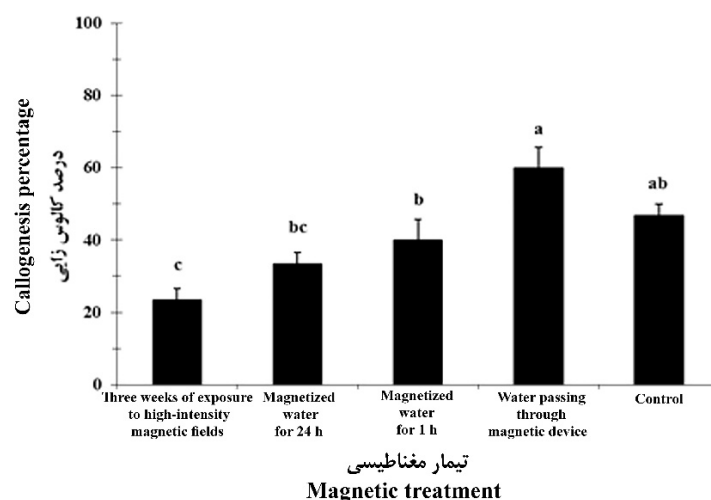
جدول ۶. تجزیه واریانس اثر میدان مغناطیسی و آب مغناطیسی بر صفات مورد مطالعه در کشت بساک خیار

Table 6. Analysis of variance of the effect of magnetic field and magnetized water on the studied traits in cucumber anther culture

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean squares)	میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک Mean number of embryos per anther	درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage
تیمار مغناطیسی (Magnetic treatment)	4	0.00858**		573.3**
خطای آزمایشی (Experimental error)	10	0.00133		60
ضریب تغییرات (C.V.) (Coefficient of variation)		4.92%		19.04%

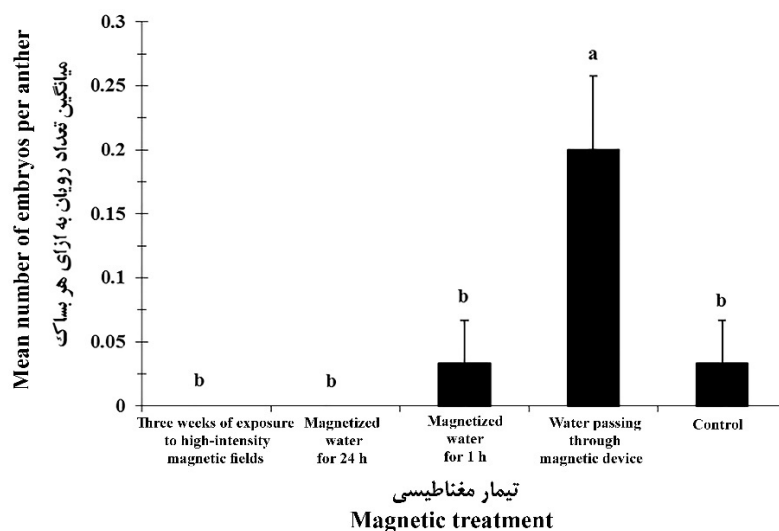
** indicates a significant difference at the 0.01 level.

** به تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ را نشان می‌دهد.



شکل ۱۳. مقایسه میانگین اثر تیمار مغناطیسی بر درصد کالوس‌زایی در کشت بساک خیار

Figure 13. Mean comparison of the effect of magnetic treatment on the callogenesis percentage in cucumber anther culture



شکل ۱۴. مقایسه میانگین اثر تیمار مغناطیسی بر میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک در کشت بساک خیار
Figure 14. Mean comparison of the effect of magnetic treatment on the mean number of embryos per anther in cucumber anther culture

کالوس زایی و بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک را دارد. اعمال شوک های الکتریکی مورد استفاده روی کالوس ها، بر القای رویان تأثیری نشان ندادند. با بررسی دوره های مختلف سانتیفریوژ مشخص شد، دور ۱۵۰g به مدت سه دقیقه اثرات معنی داری را بر پاسخ به آندروژنز در کشت بساک گیاه خیار به وجود آورد. همچنین تیمار عبور آب از دستگاه مغناطیسی نسبت به سایر تیمارهای مغناطیسی بیشترین میزان صفات مذکور را حاصل کرد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که در گیاه خیار بالاترین میزان القای کالوس و رویان از طریق کشت بساک مربوط به ژنوتیپ بتا آلفا بود. همچنین به ترتیب ابتدا تیمار شاهد (عدم استفاده از تیمار حرارتی) در محیط کشت مایع و سپس ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع بالاترین میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک و بیشترین میانگین تعداد گیاه به ازای هر بساک را به خود اختصاص دادند و مطابق آزمایشات محیط کشت مایع اثر بهتری را در مقایسه با محیط کشت جامد به همراه داشت. مقایسه ولتاژهای مختلف شوک الکتریکی نشان داد که تیمار ۱۰۰ ولت بیشترین درصد

منابع

- حمیدوند، ی. عبداللهی، م.ر. (۱۳۹۴). اثر پیش تیمار دمایی بر پینه زایی و رویان زایی گامتی در کشت بساک خیار. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۱۶ (۱)، ۱۴۹-۱۶۰.
- رشیدی، ش. عبداللهی، م. ر.، ساری خانی، ح.، موسوی، س. س. (۱۳۹۸). بررسی اثر پیش تیمارهای سانتیفریوژ و شوک الکتریکی بر کارایی آندروژنز در کشت بساک نخود (*Cicer arietinum* L.). زیست فناوری
- دانشگاه تربیت مدرس، شماره ۲، ۱۷۴-۱۸۱.
- عبداللهی، م. ر.، خاصخیلی، ک. ز.، ناظری، س. (۱۴۰۳). بررسی بیان بر خی از ژن های رویان زایی سوماتیکی در کالوس های حاصل از کشت بساک در ژنوتیپ های مختلف خیار. ششمین کنگره بین المللی و هجدهمین کنگره ملی ژنتیک، ۲ الی ۴ خرداد ۱۴۰۳، G-۱۱۹۷

- Abdollahi, M. R., Najafi, S., Sarikhani, H., & Moosavi, S. S. (2016). Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 571-579.
- Airò, M., Ala, G., Buccheri, P., Caruso, M., Fascella, G., Giovino, A. and Mammano, M.M. (2017). Effect of weak magnetic fields on the in vitro propagation of *Genista aetnensis* (Raf. Ex Biv.) Dc.. *Acta Horticulture*, 1155, 387-392.
- Asadi, A., Zebajadi, A., Abdollahi, M. R., & Seguí-Simarro, J. M. (2018). Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 214, 1-17.
- Bhojwani, S. S., Pande, H., & Raina, A. (2003). Factors affecting androgenesis in indica rice, Universitätsbibliothek.
- Bright, S., & Jones, M. (2012). Cereal tissue and cell culture (Vol. 15), *Springer Science & Business Media*.
- Chupeau, Y., & Caboche, M. (1998). Androgenesis and haploid plants, *Springer Science & Business Media*.
- Ferrie, A., and Caswell, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 104(3), 301-309.
- Grewal, R. K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A., & Warkentin, T. D. (2009). Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.), role of stress treatments. *Plant Cell Reports*, 28(8), 1289-1299.
- Hasandokht, M. R. (2006). Greenhouse managing (greenhouse production technology). Tehran, Marz Danesh. 320. (in Persian)
- Kumar, H. A., & Murthy, H. (2004). Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78(3), 201-208.
- Kumar, H. A., Murthy, H., & Paek, K. (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia horticulturae*, 98(3), 213-222.
- Mishra, V. K., & Goswami, R. (2014). Haploid production in higher plant. *International Journal of Chemical and Biological Sciences*. 1, 26-45.
- Prasath, D., Natarajan, S., & Thamburaj, S. (1998). Studies on heterosis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *South indian horticulture*, 46(3/4), 247-250.
- Rech, E., Ochatt, S., Chand, P., Power, J., & Davey, M. (1987). Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma*, 141(2-3), 169-176.
- Hoveida, Z. S., Abdollahi, M. R., Mirzaie-Asl, A., Moosavi, S. S., & Seguí-Simarro, J. M. (2017). Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130, 369-378.
- Sangwan-Norreel, B.S. (1977). Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. *Journal of Experimental Botany*, 28(4), 842-852.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519-534.
- Sidhu, A., Bal, S., Behera, T., & Rani, M. (2005). An outlook in hybrid eggplant breeding. *Journal of New Seeds*. 6(2-3), 15-29.
- Simmonds, D.H., & Keller, W.A. (1999). Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*, 208(3), 383-391.
- Sohrabi, S.; Abdollahi, M.R.; Mirzaie-Asl, A.; Koulaei, H.E.; Aghaezadeh, M.; and Seguí-Simarro J.M. (2021). A refined method for ovule culture in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 146, 259-267.
- Song, H., Lou, Q.-F., Luo, X.-D., Wolukau, J. N., Diao, W.-P., Qian, C.-T., & Chen, J.-F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 90(3), 245-254.
- Suprunova, T., & Shmykova, N. (2008). In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. Paper presented at the Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae, Avignon. France, 21-24 May 2008.
- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore, a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35, 53-109.
- Tuncer, U.H., & Boztok, K. (1991). The effects of growing greenhouse cucumber seedling in various pot types on the yield. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2, 155- 158.
- Vashisth, A., & Nagarajan, S. (2010). Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 149-156.
- Zhang, X., Wu, Q., Li, X., Zheng, S., Wang, S., Guo, L., & Custers, J. B. (2011). Haploid plant production in *Zantedeschia aethiopica* 'Hong Gan' using anther culture. *Scientia horticulturae*, 129(2), 335-342.

Evaluation of expression changes genes under drought and methanol spraying stress in Rapeseed

Haniyeh Azizi¹, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani² , Ali Reza Tarang³, Habibollah Samizadeh Lahiji⁴, Ramin Seighalani⁵

1. M.Sc., Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

4. Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

5. Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Correspondence:

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani

Email:

mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

Received: 21, Jan. 2025

Accepted: 10, May. 2025

How to cite:

Azizi, H., Mohsenzadeh Golfazani, M., Tarang, A.R., Samizadeh Lahiji, H., & Seighalani, R. (2025). Evaluation of expression changes genes under drought and methanol spraying stress in Rapeseed. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 31–41.

(DOI: [10.30473/cb.2025.73512.2001](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73512.2001))

ABSTRACT

Oil crops are the second largest food reserves in the world after cereals. One of the most important sources of edible oil in the world is rapeseed. Drought stress induces a wide range of molecular disturbances in the physiological processes of plants through the production of reactive oxygen species (ROS). The enzymes antioxidants detoxify stress-induced ROS and modulate signaling responses, playing a crucial role in the tolerance of plants to abiotic stresses. To this end, the expression of glutathione reductase (GR), thioredoxin (TRX), and glutaredoxin (GRX), was assessed in two genotypes of Rapeseed: the sensitive variety (Hyola 308) and the tolerant variety (SLM046) under drought stress (withholding irrigation for 72 hours), a 20% (v/v) methanol spraying treatment, and control conditions (continuous irrigation). This was conducted using the Real-Time PCR technique. Sampling was performed at the 4–6 leaf stage at 0, 8, and 24 hours after the stress was applied. Morphological observations showed that the rapeseed tolerant and sensitive genotypes regained their freshness after spraying methanol under drought stress (interruption of irrigation). The results indicate that the highest increase in glutathione reductase gene expression in the Hyola 308 variety occurred eight hours after the application of stress without methanol treatment. In contrast, the SLM 046 variety exhibited initially low expression levels during the early hours of stress, which increased significantly with methanol treatment, registering almost a fourfold increase. The expression level of the thioredoxin gene in the Hyola 308 variety peaked 8 hours after the drought stress with methanol treatment, indicating that methanol application enhanced gene expression and plant resistance. In the SLM 046 variety, thioredoxin gene expression gradually increased after the application of stress, persisting up to 24 hours post-stress. However, the gene expression initially decreased with methanol treatment but eventually reached its maximum after 24 hours. For glutaredoxin gene expression, the Hyola 308 variety showed lower levels 8 hours after the drought stress without methanol treatment compared to the baseline (0 hours). However, after 24 hours, this expression increased significantly and reached its maximum following methanol treatment at both 8 and 24 hours. Stress-induced ROS production acts as a warning signal that causes the plant to defend and adapt to the stress as the cell attempts to avoid oxidative stress and ROS accumulation. The SLM046 variety, gene expression showed a gradual increase from 0 hours of stress to 24 hours later. The application of methanol initially caused a reduction in glutaredoxin expression, followed by an increase. Methanol produces CO₂, which can partially compensate for the lack of CO₂ resulting from stress in plants and can be used as a carbon source. In general, methanol foliar application increased the gene expression levels in these two genotypes. Therefore, the expression of the desired gene can be affected by investigating and manipulating these main groups, which can undergo further investigations in experimental tests.

KEYWORDS

Glutathione reductase, Relative gene expression, Reactive oxygen species.



«مقاله پژوهشی»

ارزیابی تغییرات بیان برخی از ژن ها تحت تنش خشکی و متانول پاشی در ارقام متحمل و حساس کلزا

حانیه عزیزی^۱، محمد محسن زاده گلفزانی^۲ , علیرضا ترنگ^۳، حبیباله سمیع زاده لاهیجی^۴، رامین صیقلانی^۵

چکیده

تنش خشکی از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال موجب طیف وسیعی از اختلالات مولکولی در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان می شود. آنزیم های آنتی اکسیدان ROS های ناشی از تنش را سم زدایی می کنند و پاسخ های سیگنالینگ را تعدیل می کنند و نقشی مهم در تحمل به تنش های غیرزیستی در گیاهان دارند. بدین منظور بیان ژن های گلوتاتیون ردوکتاز GR، تیوردوکسین TRX، گلوتاردوکسین GRX کلروپلاستی در دو ژنوتیپ گیاه کلزا حساس (Hyola308) و متحمل (SLM046) در شرایط تنش خشکی (قطع آبیاری به مدت ۷۲ ساعت)، محلول پاشی با متانول ۲۰ درصد حجمی و شرایط بدون تنش (آبیاری منظم)، با استفاده از تکنیک Real Time PCR ارزیابی شد. نمونه برداری در مرحله ۴ تا ۶ برگی در ۸، ۰ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش انجام شد. بررسی نتایج نشان داد که بیشترین افزایش بیان ژن گلوتاتیون ردوکتاز در ژنوتیپ Hyola308، ساعت صفر پس از تنش بدون تیمار متانول بوده است ولی در ژنوتیپ SLM046 در ساعات اولیه اعمال تنش میزان بیان کم بوده اما با اعمال تیمار متانول میزان بیان افزایش داشت. میزان بیان ژن تیوردوکسین در Hyola 308 در ۸ ساعت پس از اعمال تنش خشکی با تیمار متانول بیشترین مقدار بوده است و به نظر می رسد متانول پاشی سبب افزایش بیان و تحمل گیاه شده است. در ژنوتیپ SLM046 نیز میزان بیان ژن پس از اعمال تنش به تدریج افزایش داشته و این افزایش تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش ادامه داشت. با اعمال تیمار متانول میزان بیان ابتدا کاهش داشته ولی با گذشت ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود رسیده است، میزان بیان ژن گلوتاردوکسین در ژنوتیپ Hyola308 در ۸ ساعت پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول نسبت به ساعت صفر تنش کم بوده است. اما پس از گذشت ۲۴ ساعت این میزان بیان افزایش داشته و با اعمال تیمار متانول در ساعات ۸ و ۲۴ به حداکثر میزان خود رسیده است. تولید ROS تحت تنش به عنوان یک سیگنال هشدار عمل می کند که باعث دفاع و سازگاری گیاه در برابر تنش می شود که سلول سعی می کند از طریق مسیرهای مختلف از استرس اکسیداتیو و تجمع ROS جلوگیری کند. در SLM046 میزان بیان از ساعت صفر تنش تا ۲۴ ساعت به تدریج روند افزایشی داشته است، اعمال تیمار متانول نیز ابتدا سبب کاهش و سپس افزایش بیان ژن گلوتاردوکسین شده است. به طور کلی محلول پاشی با متانول سبب افزایش میزان بیان ژنهای در این ژنوتیپ شد.

واژه های کلیدی

بیان نسبی ژن، گلوتاتیون ردوکتاز، گونه های اکسیژن فعال.

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران. (ABRII) و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۴. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۵. مربی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد محسن زاده گلفزانی

رایانامه: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

استناد به این مقاله:

عزیزی، حانیه؛ محسن زاده گلفزانی، محمد؛ ترنگ، علیرضا؛ سمیع زاده لاهیجی، حبیباله و صیقلانی، رامین (۱۴۰۴). ارزیابی تغییرات بیان برخی از ژن ها تحت تنش خشکی و متانول پاشی در ارقام متحمل و حساس کلزا، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۳۱-۴۱. (DOI: [10.30473/cb.2025.73512.2001](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73512.2001))

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. گیاهی یکساله، آلوتتراپلوئید با ۱۹ جفت کروموزوم ($2n=38$) و مهم‌ترین گونه زراعی خانواده براسیکاسه است که تلاقی دو گونه دیپلوئید *Brassica oleracea* و *Brassica rapa* و برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید آن‌ها به وجود آمده است. این گیاه سومین گیاه روغنی در جهان به حساب می‌آید که برای مصارف خوراکی کشت می‌شود. روغن کلزا در مقایسه با سایر روغن‌های خوراکی به دلیل وجود اسیدهای چرب اشباع نشده و فقدان کلسترول از کیفیت بالایی برخوردار است (Tan et al., 2017). کنجاله کلزا نیز که محصول جانبی استخراج روغن است، به دلیل محتوای پروتئین بالا (۵۰ درصد) برای خوراک دام استفاده می‌شود و در تولید جهانی بعد از کنجاله سویا در رتبه دوم قرار دارد (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018). گرفتن در معرض یک تنش خاص توسط گونه‌های گیاهی متحمل به تنش منجر به ایجاد مقاومت با گذشت زمان در برابر یک تنش خاص می‌شود (Fahad et al., 2017). تنش غیر زیستی یک عامل محیطی است که در نتیجه تغییرات تنش فیزیکی یا شیمیایی بر گیاهان وارد می‌شود (Fich et al., 2016). بنابراین برای بقا در شرایط تنش‌زا، مکانیسم‌های پیچیده‌ای در گیاهان تکامل یافته‌است تا محرک‌های محیطی را درک کرده و از طریق مسیرهای انتقال سیگنال، پیام‌ها را مخابره و به تنش‌های گوناگون پاسخ دهد که در هر یک از این مسیرها پروتئین‌های متعددی درگیر می‌باشند (Sami and Alemzadeh, 2016). کلزا به تنش‌های غیرزیستی متعدد حساس است (Elferjani and Soolanayakanahally, 2018). خشکی، شوری، دماهای شدید و سمیت کادمیوم شایع‌ترین تنش‌های غیرزیستی هستند که بر رشد و نمو *B. napus* تأثیر می‌گذارند. شرایط خشکی باعث تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که منجر به اختلال غشاء، اختلال عملکرد آنزیم و اکسیداسیون و تخریب پروتئین‌ها می‌شود (Tsugane et al., 1999). نشان داده شده است که خشکی در کلزا منجر به کاهش فتوسنتز، کاهش زیست توده گیاهی، کاهش محتوای

کلروفیل، آسیب غشاهای تیلاکوئید، کاهش روغن و پروتئین دانه شده است (Ahmar et al., 2019). تیوردوکسین^۱ (TRX) یکی از عوامل تنظیم‌کننده اصلی برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید است (Daloso et al., 2015) که نقشی اساسی در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند که گیاهان را در مقابله با تنش اکسیداتیو موفق‌تر می‌کند، برای احیا خود از فردوکسین (FTR) یا NADPH استفاده می‌کند و با انتقال الکترون موجب احیای ردوکتازها جهت سم‌زدایی هیدروکسی پراکسیدازها چربی و ترمیم پروتئین اکسید شونده می‌شوند (Meyer et al., 2009). افزایش بیان^۲ *NTR* در آرابیدوپسیس افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو را سبب شد براین اساس افزایش بیان *NTR* حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim et al., 2017). مطالعه ژنومی برنج نشان داد که تحت شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *TRX* وجود دارد (Mignolet-Spruyt et al., 2016). گلوآردوکسین‌ها (*Grxs*) پایدار در برابر حرارت، غنی از سیستمین و مولکولی پروتئین‌هایی با جرم کم (۱۰-۱۵ کیلو دالتون) هستند که ردوکس سلولی و سیگنالینگ تنظیم شده ردوکس را تنظیم می‌کنند. *Grx*‌ها وابسته به گلوآتیون هستند، که ممکن است فعالیت پروتئین را با glutathionylation برگشت پذیر در حضور NADPH و گلوآتیون ردوکتاز تعدیل کنند (Meyer et al., 2012). گلوآتیون ردوکتاز (*GR*)، آخرین آنزیم چرخه آسکوربات/گلوآتیون نیز نقش مهمی در سازگاری با تنش اکسیداتیو بازی می‌کند. در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات و در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفای نقش می‌کند لذا افزایش در میزان فعالیت این ژن در احیا مجدد گلوآتیون اکسید شده دارای اهمیت است (Sairam et al., 2002). حفظ مخزن گلوآتیون درون سلولی در حالت کاهش یافته برجسته‌ترین نقش این آنزیم است که می‌تواند با حذف اکسیژن منفرد، سوپراکسید

1. Thioredoxin

2. NADPH-dependent thioredoxin reductase

2022; Ramezanzadeh Bishegahi *et al.*, 2021; Taghvimi *et al.*, 2024). با توجه به اثرات اثبات شده محلول‌پاشی متانول و اهمیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در جلوگیری از استرس اکسیداتیو، مطالعه فوق به منظور بررسی برخی ژنهای مسیر پیروروکسین در گیاه کلزا انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و پژوهشگاه بیوتکنولوژی شمال کشور در سال ۱۴۰۲ انجام شد. در پژوهش حاضر از دو ژنوتیپ کلزا SLM046 و Hyola308 به ترتیب به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی استفاده شد (Mirzai *et al.*, 2013; Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018; Pasandideh *et al.*, 2016). پس از تهیه بذور ژنوتیپ‌های از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج، ضد عفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد انجام شد. پروسه جوانه زنی در اتاقک کشت با دمای 23 ± 2 درجه انجام و بعد از گذشت شش روز، بذور جوانه زده در گلدان کشت شدند و به اتاقک کشت تحت شرایط کنترل شده (23 ± 2) درجه سانتیگراد (نسبت طول دوره روشنائی به تاریکی ۱۶:۸) منتقل و مراقبت شدند. حساس و متحمل بودن، تنش خشکی و متانول پاشی و زمان به عنوان عوامل آزمایش در نظر گرفته شدند، آزمایش در قالب طرح فاکتوریل به صورت کاملاً تصادفی و در سه تکرار و سه سطح شاهد (آبیاری منظم با آب مقطر)، تنش خشکی (قطع آبیاری) و محلول پاشی با متانول ۲۰ درصد حجمی صورت گرفت. نمونه برداری از برگ‌های کاملاً توسعه یافته گیاه کلزا در مرحله رویشی (در مرحله ۴ تا ۶ برگی)، در زمان‌های ۰، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار متانول (۲۰ درصد حجمی) از گیاهان شاهد و حساس که به طور مرتب آبیاری شده است و گیاهانی تحت تیمار تنش خشکی بودند و گیاهانی که ابتدا تحت تنش خشکی بودند و گیاهانی که ابتدا تحت تنش خشکی قرار گرفته و سپس با متانول ۲۰٪ محلول پاشی شده بودند صورت گرفت (Mohammad Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2022). سپس نمونه‌های برگ‌ی در فویل آلومینیومی با ضخامت متوسط قرار داده شدند، برای قطع فعالیت‌های متابولیکی درون گیاه،

یا حتی رادیکال‌های هیدروکسیل، یا به طور غیرمستقیم به عنوان یک عامل احیا کننده که اسید اسکوربیک را از شکل اکسید شده به شکل احیا شده آن، توسط آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز بازیافت کند (Noctor and Foyer, 1998). با توجه به دو آنزیم اصلی مسیر مهار آسکوربات/گلوتاتیون، نشان داده شد که فعالیت GR در طول تنش خشکی در پنبه، گیاهچه گندم، لوبیا، خزه *Tortula ruralis*، برنج، یونجه و لوبیا چشم بلبلی افزایش می‌یابد (Cruz de Carvalho, 2008).

مقاومت به خشکی صفت پیچیده‌ای است که بروز آن بستگی به برهمکنش میان صفات مختلف مورفولوژیکی و بیوشیمیایی دارد. مکانیزم‌های ژنتیکی کنترل کننده این صفات چندان شناخته شده نیستند، دستیابی به درکی درست از نحوه پاسخ گیاهان در سطح ژن به تنش خشکی برای نگهداری محصول و بهبود تولید از ضروریات است. تنش خشکی عامل مختل کننده فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیک در گیاه است (Ober, 2001). اثر خشکی اختلال فتوشیمیایی در فتوسینتسم II را سبب شده و بازدارندگی در انتقال الکترون را سبب می‌شود (Lu *et al.*, 2002)، بعلاوه مضاف بر محدودیت فرآیندهای نوری ورود دی اکسید کربن کاهش یافته و انتقال الکترون در اثر محدودیت CO_2 کاهش می‌یابد و قدرت تثبیت کربن محدود می‌شود (Bryk *et al.*, 2000). افزایش در میزان دی اکسید کربن اثر تنش خشکی را خنثی می‌کند (Zbieć *et al.*, 2003). محلول‌پاشی متانول و ترکیباتی از این قبیل همراه با کاربرد آمینواسیدهای گلايسین گلوتامات و اسپاراتات از جمله راهکارهایی است که منجر به افزایش در میزان غلظت دی اکسید کربن می‌شود (Nonomura and Benson, 1992). متانول افزایش در میزان هدایت روزنه‌ای، کاهش دمای برگ، کاهش در میزان تعرق و افزایش شاخص دوام برگ را سبب می‌شود (Makhdom *et al.*, 2002). به این دلیل که متانول در گیاه جذب می‌شود و به دلیل اندازه کوچکتر متانول به جای CO_2 به سرعت به CO_2 در بافت گیاه متابولیزه می‌شود (Gout *et al.*, 2000). استفاده از متانول در کلزا و اثرات آن روی تغییر میزان بیان ژن در مطالعات قبلی گزارش شده است (Mohammad Mohammad Mohsenzadeh Golfazani *et al.*,)

برای اطمینان از عملکرد اختصاصی آغازگرها و همچنین بهترین دمای اتصال به cDNA سنتز شده، واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (ساخت آمریکا) و به صورت شیب دمایی انجام شد. برای واکنش qRT-PCR از دستگاه Real-Time PCR (BIORAD-IQ5) و کیت (Real Q Plus 2x Master Mix Green without Rox) (ساخت شرکت Ampliqon) استفاده شد که برای هر ژن، سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد. همچنین، میکروتیوب‌های مخصوص واکنش Real time PCR نیز از شرکت سیناکلون تهیه شدند. واکنش PCR-Real-time در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت و ۴/۹ میکرولیتر ddH₂O سپس با اضافه کردن ۲ میکرولیتر از cDNA مورد نظر با هم مخلوط شدند. برای واکنش کنترل منفی (NTC) همه مواد ذکر شده بدون cDNA به کار رفت. چرخه حرارتی مورد استفاده شامل سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ °C، سپس ۴۰ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای (Tm بسته به آغازگر متفاوت بود، جدول ۱) و ۳۰ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲ °C بود. آنالیز داده‌های به دست آمده از روش کمیت سنجی با استفاده از مدل ریاضی $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال‌سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از روش لیواک و همکاران (Livak and Schmittgen, 2001) و نرم‌افزار Excell 2016 محاسبه شد.

نمونه‌ها ابتدا در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس سریعاً به فریزر ۸۰ - منتقل شدند تا جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه مورد استفاده قرار گیرند.

برای استخراج RNA از کیت ستونی استخراج RNA شرکت دنا زیست و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای حذف DNA از RNA استخراج شده از DNase استفاده شد. جهت بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C USA (ساخت آمریکا) استفاده شد. برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز ۱ درصد استفاده شد. از آنجایی که نمونه‌های استخراج شده هر کدام دارای غلظت‌های متفاوتی بودند، جهت جلوگیری از خطا، غلظت همه نمونه‌ها به ۵۰ نانوگرم رسانیده شد. سنتز cDNA مطابق با دستورالعمل کیت سنتز The Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit و به کمک آنزیم RevertAid Reverse Transcriptase (RT) انجام شد. ارزیابی صحت سنتز با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. تشکیل باندها در محدوده‌ی 157 bp نشان دهنده‌ی تکثیر توالی مورد نظر توسط آغازگرهای ژن اکتین است. جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با Real-time PCR، توالی ژن‌های *GR*، *TRX* و *GRX* و ژن رفرنس اکتین از پایگاه NCBI تهیه شد و طراحی آغازگرهای مناسب هر ژن با استفاده از برنامه Primer 3 صورت گرفت (<http://Primer3.ut.ee>). توالی آغازگرها و اندازه قطعه تکثیری حاصل از واکنش هر ژن در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. لیست توالی و خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The sequence and characteristics of the primers used in this study

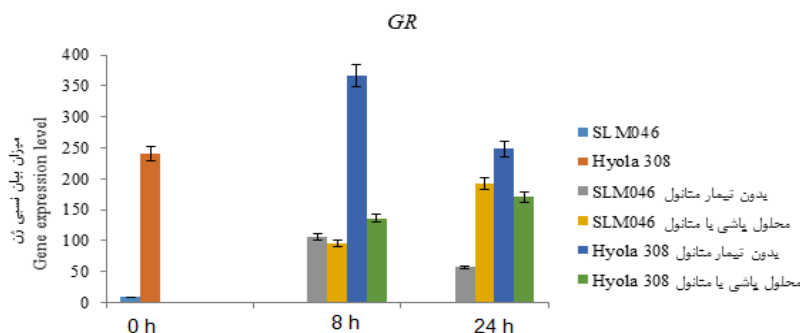
ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال	اندازه تکثیر	شماره دسترسی
Gens	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	PCR production length	NCBI accession number
Actin(F)	TCCCGAGTATTGTTGGTCGT	54	157	AF111812
Actin(R)	TCCATGTCATCCCAGTTGCT			
TRX(F)	CTTGCCGTTTCATTGCACCT	61	159	U59379
TRX(R)	CGAGCTTCTCTTCGCCTTTC			
GR(F)	GGTGGTGAACCTGAGGATGC	61	153	XM_013892271
GR(R)	CAACTTCACAGCAGCATTCG			
GRX(F)	CTGCCAGTCCACTCAGATA	60	160	XM_013805747
GRX(R)	TTCTGTATCCGTCCACCAC			

نتایج و بحث

نتایج بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز در دو ژنوتیپ Hyola308 و SLM046 که تحت تنش خشکی و تحت تیمار متانول قرار گرفته در شکل ۱ نشان داده شد. میزان بیان در ساعت اولیه اعمال تنش (صفر تنش) در ژنوتیپ SLM046 به شدت کم بوده است، اما با گذشت زمان و پس از گذشت ۸ ساعت اعمال تنش بدون محلول پاشی متانول، میزان بیان نسبت به ساعت صفر افزایش داشته است (۱۰۵ برابر) ولی به تدریج روند نزولی در پیش گرفته و با گذشت ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بدون متانول پاشی میزان بیان نسبت به ساعت ۸ کاهش یافته (۵۶ برابر) اما هم چنان نسبت به ساعت صفر بیشتر می‌باشد. متانول پاشی نیز باعث افزایش بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز شده، بطوریکه پس از گذشت هشت ساعت از تیمار متانول (۹۵ برابر) میزان بیان نسبت به حالت تنش بدون متانول افزایش داشته و با گذشت زمان در ۲۴ ساعت پس از تیمار متانول به بیشترین مقدار خود (۱۹۱ برابر) رسیده است. بطور کلی می‌توان گفت در ژنوتیپ متحمل (SLM046) در ساعات اولیه میزان بیان کم بوده اما با اعمال تیمار متانول میزان بیان افزایش داشته است. بنظر می‌رسد متانول سبب بهبود عملکرد این ژنوتیپ با افزایش بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز شده است. میزان بیان ژن GR در ژنوتیپ حساس (Hyola,308) در ساعات اولیه اعمال تنش (ساعت صفر تنش) افزایش داشته (۲۴۰ برابر) و با گذشت زمان در ۸ ساعت پس از تیمار بدون متانول پاشی این میزان بیان به بیشترین حد خود رسیده است (۳۶۶ برابر) و با گذشت ۲۴

ساعت پس از اعمال تنش روند نزولی (۲۴۸ برابر) در پیش گرفته است، و این روند نزولی با اعمال تنش متانول نیز همچنان ادامه داشته است. بطور کلی می‌توان گفت بیشترین میزان بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز مربوط به ژنوتیپ Hyola308 پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول است که با گذشت زمان و همچنین اعمال تیمار متانول کاهش (۷۰ برابر) یافته است. تغییر میزان بیان ژن گلوکاتایون ردوکتاز در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Mohammad Mohammad et al., 2022).

گلوکاتایون ردوکتاز یکی از آنزیم‌های بالقوه سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی است که وضعیت کاهش یافته GSH را از طریق مسیر آسکوربات-گلوکاتایون حفظ می‌کند و نقش حیاتی در حفظ گروه سولفیدریل (SH^-) دارد و به عنوان بستری برای گلوکاتایون عمل می‌کند. S-ترانسفرازها GR مشخص شده است و در تراریخته‌ها برای ایجاد تحمل گیاهان در برابر استرس اکسیداتیو استفاده شده است. در شرایط خشکی، گیاهان می‌توانند روزنه‌های خود را برای حفظ تعادل آب ببندند که در این حالت کاهش در میزان تثبیت CO_2 رخ می‌دهد که ناشی از کاهش و کاهش بیش از میزان در زنجیره انتقال الکترون سیکل کالوین است (Hernandez et al., 2000). لذا بعد از این امر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست تحت این شرایط تولید می‌شود. همچنین مسیر نوری تنفسی هنگامی که اکسیژن‌رسانی RuBP به حداکثر می‌رسد به دلیل محدودیت در تثبیت CO_2 افزایش می‌یابد (Noctor and Foyer, 1998).



شکل ۱. الگوی بیان ژن GR با روش Real time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308

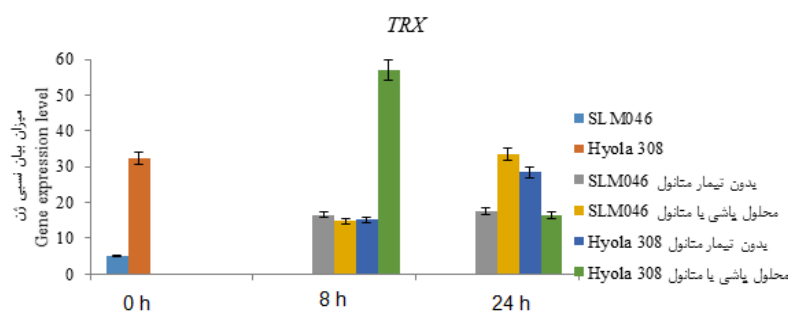
Figure 1. Expression pattern GR gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308

متانول‌پاشی سبب افزایش بیان و مقاومت در این ساعت شده است. تغییر میزان بیان ژن تیوردوکسین در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Vahedi *et al.*, 2019). مطالعه ژنومی برنج نشان داد که تحت شرایط تنش زیستی و غیرزیستی، تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *TRX* وجود دارد (Nuruzzaman *et al.*, 2012).

تیوردوکسین یکی از عوامل تنظیم‌کننده اصلی برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید است (Daloso *et al.*, 2015) که نقشی اساسی در تحمل گیاهان به تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند که گیاهان را در مقابله با تنش اکسیداتیو موفق تر می‌کند، برای احیا خود از فردوکسین (*FTR*) یا *NADPH* استفاده می‌کند و با انتقال الکترون موجب احیای ردوکتازها جهت سم زدایی هیدروکسی پراکسیدازها چربی و ترمیم پروتئین اکسید شونده می‌شوند (Meyer *et al.*, 2012). افزایش بیان *NTR* در آرکیدوپسیس افزایش تحمل به تنش‌های خشکی و فتواکسیداتیو را سبب شد در این مطالعه این نتیجه حاصل شد که افزایش بیان *NTR* به حفظ هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kim *et al.*, 2017).

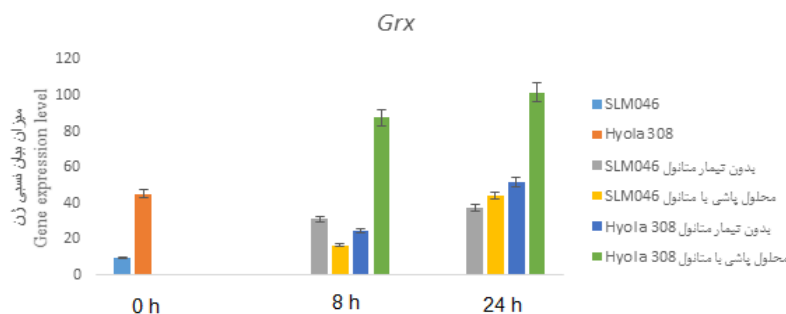
میزان بیان ژن گلو‌تاردوکسین در ژنوتیپ متحمل SLM046 در ساعات اولیه اعمال تنش خشکی کم بوده است (۹ برابر) اما پس از گذشت ۸ ساعت از اعمال تنش خشکی بدون تیمار متانول این میزان بیان افزایش داشته (۳۱ برابر) و تا ساعت ۲۴ نیز به روند افزایشی خود (۳۷ برابر) ادامه داده است (شکل ۳).

طبق شکل ۲ میزان بیان ژن تیوردوکسین در ژنوتیپ متحمل SLM046 در ساعات اولیه تنش (صفر تنش) پایین بوده است (۵ برابر)، با گذشت زمان در ۸ ساعت بدون تیمار متانول به تدریج میزان بیان افزایش یافته (۱۶ برابر) و این افزایش تا ساعت در ۲۴ ساعت بدون تیمار متانول همچنان ادامه داشته است (۱۷ برابر). سپس ۸ ساعت پس از تیمار متانول میزان بیان ابتدا اندکی کاهش داشته (۱۴ برابر) و با گذشت زمان در ۲۴ ساعت پس از متانول‌پاشی به حداکثر میزان خود (۳۳ برابر) رسیده است. بطور کلی می‌توان گفت در ژنوتیپ متحمل در ابتدای تنش میزان بیان ژن تیوردوکسین کم بوده و به تدریج با تیمار متانول‌پاشی میزان بیان به حداکثر میزان خود رسیده است و می‌توان گفت متانول سبب افزایش مقاومت این ژنوتیپ کلزا در برابر خشکی شده است. در ژنوتیپ حساس Hyola308 میزان بیان در ساعات اولیه اعمال تنش (صفر تنش) نسبت به ژنوتیپ متحمل بیشتر بوده است (۳۲ برابر)، با گذشت ۸ ساعت پس از تنش بدون متانول میزان بیان نسبت به ساعتهای اولیه کاهش داشته (۱۵ برابر) و پس از گذشت ۸ ساعت پس از تنش با تیمار متانول به بیشترین میزان خود رسیده است (۵۶ برابر) و پس از گذشت ۲۴ ساعت از تنش با تیمار متانول میزان بیان کاهش یافته (۱۶ برابر) و حتی از ساعت صفر تنش نیز کمتر می‌شود. بطور کلی می‌توان گفت بیشترین میزان بیان ژن *TRX* در ژنوتیپ حساس مربوط به تیمار ۸ ساعت پس از اعمال تنش با متانول می‌باشد و



شکل ۲. الگوی بیان ژن *TRX* با روش Real Time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه‌های SLM046 و Hyola308

Figure 2. Expression pattern *TRX* gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308.



شکل ۳. الگوی بیان ژن *GRX* با روش Real Time PCR تحت تنش خشکی و تیمار متانول در گیاهچه های SLM046 و Hyola308
Figure 3. Expression pattern *GRX* gene using real-time qPCR under drought stress and methanol foliar application in seedling SLM046 and Hyola308.

به تنش ایفا می‌کند (Belin *et al.*, 2015). در آزمایش دیگری انتقال ژن *GRX* به آراییدوپسیس سبب افزایش مقاومت گیاه به سرما شد (Hu *et al.*, 2015). در پژوهش حاضر در ساعت ۲۴ پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول میزان بیان در ژنوتیپ Hyola308 مجدداً افزایش داشته (۵۱ برابر) و با اعمال تیمار متانول نیز به بیشترین میزان خود رسیده است (۱۰۱ برابر). بیشترین میزان بیان ژن گلوئاردوکسین در ژنوتیپ حساس و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش با تیمار متانول و کمترین مقدار بیان مربوط به ساعت صفر تنش در ژنوتیپ متحمل بوده است. تغییر میزان بیان ژن گلوئاردوکسین در پژوهش قبلی نیز گزارش شده بود (Vahedi *et al.*, 2019).

نتیجه گیری نهایی

مشاهدات مورفولوژیکی در این پژوهش نشان داد که هر دو ژنوتیپ متحمل و حساس گیاهان کلزا، طراوت خود را پس از محلول‌پاشی متانول تحت تنش قطع آبیاری به دست آوردند. تنش خشکی طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی را از سطوح فیزیولوژیکی تا مولکولی تحریک می‌کند و سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بخش‌های مختلف سلولی مانند کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها می‌شود. تولید ROS تحت تنش به‌عنوان یک سیگنال هشدار عمل می‌کند که باعث دفاع و سازگاری گیاه در برابر تنش می‌شود که سلول سعی می‌کند از استرس اکسیداتیو و تجمع ROS جلوگیری کند. میزان بیان ژن گلوئاتیون ردوکتاز در ساعت ۸ تنش بدون

محلول‌پاشی با متانول ابتدا سبب کاهش (۱۶ برابر) و سپس افزایش بیان ژن گلوئاردوکسین شده است (۴۴ برابر). بطور کلی می‌توان گفت اعمال تنش متانول سبب افزایش بیان ژن گلوئاردوکسین در ژنوتیپ متحمل کلزا شده است. میزان بیان ژن *GRX* در ژنوتیپ حساس Hyola308 در ساعت صفر تنش نسبت به ژنوتیپ متحمل بیشتر بوده است (۴۵ برابر) اما پس از گذشت ۸ ساعت پس از اعمال تنش بدون تیمار متانول میزان بیان کاهش داشته و کمتر از ساعات صفر تنش است (۲۴ برابر) و پس از تیمار متانول در همین ساعت به میزان ۸۷ برابر رسید.

گلوئاردوکسین‌ها (GRXs) آنزیم‌های کلیدی تیول (thiol) هستند. آن‌ها به عنوان آنزیم‌های احیاکننده متابولیکی و سیستم‌های جاروب ROS عمل می‌کنند. همچنین تغییرات احیا پس از رونویسی در پروتئین‌ها را بر پایه تیول تنظیم می‌کنند. گلوئاردوکسین و تیوردوکسین گروه‌های اصلی ردوکتازهای تیول هستند (Meyer *et al.*, 2012). گلوئاردوکسین‌ها با استفاده از NADPH، گلوئاتیون ردوکتاز (GR) و گلوئاتیون (GSH) احیا می‌یابد (Holmgren and Aslund, 1995). گلوئاردوکسین در بسیاری از عملکردهای متابولیکی از جمله کنترل برنامه‌های رشد گیاهان و نقش مولکول‌های علامت دهی کلیدی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Rouhier *et al.*, 2004; Nicolas Rouhier and Jacquot, 2005). بررسی پروفایل بیان ژنی در آراییدوپسیس با اعمال تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف نشان داد که ژن *GRX* نقش مهمی را در مقاومت

متانول مشهود بود، به طوری که بیان ژن *GRX* در ساعت‌های مختلف به‌ویژه پس از ۲۴ ساعت، افزایش یافت (۴۴ برابر). این افزایش می‌تواند بهبود مقاومت به تنش را در این ژنوتیپ تقویت کند. در ژنوتیپ حساس، اگرچه بیان ژن *TRX* نیز تحت تأثیر تیمار متانول قرار گرفت، اما این ژنوتیپ نتوانست به مدت زمان طولانی‌تر این بیان را حفظ کند که نشان‌دهنده ضعف‌های موجود در سیستم‌های دفاعی این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ متحمل بود. به طور کلی، یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که تیمار متانول می‌تواند به‌عنوان یک محرک مؤثر در بهبود بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان عمل کند، به خصوص در ژنوتیپ‌های متحمل که می‌توانند از این افزایش بیان برای مقابله با تنش‌های محیطی بهره‌برداری کنند. این مطالعه می‌تواند راهنمایی برای برنامه‌های به‌نژادی در زمینه تلاش برای افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی با استفاده از ترکیبات شیمیایی باشد. در نهایت، این نتایج بر اهمیت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل در کشت گیاهان تأکید می‌کند تا در شرایط متغیر و نامطلوب محیطی، عملکرد و پایداری تولیدات کشاورزی افزایش یابد. به طور کلی به نظر می‌رسد متانول سبب تولید CO_2 می‌شود که تا حدی می‌تواند کمبود CO_2 حاصل از تنش را در گیاهان جبران کند و به عنوان منبع کربن استفاده شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

متانول پاشی (۳۶۶ برابر)، ژن تیوردوکسین در ۸ ساعت پس از محلول‌پاشی متانول (۵۶ برابر) و ژن گلو تاردوکسین در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی متانول (۱۰۱ برابر) در ژنوتیپ Hyola308 دارای بیشترین میزان بیان بود. در ژنوتیپ SLM046 میزان بیان هر سه ژن گلو تاتیون ردوکتاز، تیوردوکسین، گلو تاردوکسین در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی نسبت به ساعات ابتدای افزایش پیدا کرد و به طور کلی محلول‌پاشی با متانول سبب افزایش میزان بیان ژن‌های در این ژنوتیپ شد. نتایج نشان‌دهنده بیان بالای ژن‌های *GRX* و *TRX* در ژنوتیپ حساس Hyola308 در ساعت صفر تنش بود (به ترتیب ۴۵ و ۳۲ برابر). این بیان در ابتدا ممکن است به دلیل پاسخ سریع به تنش باشد، اما پس از گذشت ۸ ساعت تحت تنش بدون تیمار متانول، میزان بیان به طور قابل توجهی کاهش یافت (ژن‌های *GRX* و *TRX* به ترتیب ۲۴ و ۱۵ برابر)، که نمایانگر عدم توانایی این ژنوتیپ در حفظ سطح بیان ژن در شرایط طولانی‌مدت است. در مقابل، ژنوتیپ متحمل SLM046 بیان ژن *GR* را در شرایط مشابه به میزان پایینی نشان داد (۸ برابر)، اما پس از محلول‌پاشی متانول در ساعت ۸، بیان این ژن به طور قابل توجهی افزایش یافت (۹۵ برابر) و در ساعت ۲۴ (۱۹۱ برابر) به اوج خود رسید. این نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل قادر به تطبیق با تنش و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی مؤثر در مقایسه با ژنوتیپ حساس است. با توجه به تأثیرات مثبت تیمار متانول، مشخص شد که این ترکیب می‌تواند به طور قابل توجهی موجب افزایش بیان ژن گلو تاردوکسین در هر دو ژنوتیپ گردد. در ژنوتیپ متحمل، پاسخ به تنش و تیمار

References

- Ahmar, S., Liaqat, N., Hussain, M., Salim, M. A., Shabbir, M. A., Ali, M. Y., ... Rizwan, M. (2019). Effect of abiotic stresses on Brassica species and role of transgenic breeding for adaptation. *Asian J. Res Crop Sci*, 3(1), 1-10.
- Belin, C., Bashandy, T., Cela, J., Delorme, Hinoux, V., Riondet, C., & Reichheld, J. (2015). A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *A. thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 38(2), 299-314.
- Bryk, R., Griffin, P., & Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, 407(6801), 211-215.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
- Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., Bottcher, A., ... Nunes-Nesi, A. (2015). Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E-1392-E1400.
- Elferjani, R., & Soolanayakanahally, R. (2018). Canola responses to drought, heat, and combined stress: shared and specific effects on carbon assimilation, seed yield, and oil composition. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1224.

- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., ... Saud, S. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1147.
- Fich, E. A., Segerson, N. A., & Rose, J. K. (2016). The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 207-233.
- Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rébeillé, F., Nonomura, A. R., Benson, A. A., & Douce, R. (2000). Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant physiology*, 123(1), 287-296.
- Hernandez, L., Pellegrini, C., & Malla, L. (2000). Effect of foliar applications of methanol on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Int. J Exp Bot*, 66(2000), 1-8.
- Holmgren, A., & Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Methods in enzymology*, 252, 283-292. Elsevier.
- Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S. A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C., ... Hirschi, K. D. (2015). Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Horticulture Research*, 2.
- Kim, M. R., Khaleda, L., Jung, I. J., Kim, J. Y., Lee, S. Y., Cha, J.-Y., & Kim, W.-Y. (2017). Overexpression of chloroplast-localized NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC) enhances tolerance to photo-oxidative and drought stresses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Biology*, 60, 175-180.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, Q., Lu, C., Zhang, J., & Kuang, T. (2002). Photosynthesis and chlorophyllafluorescence during flag leaf senescence of field-grown wheat plants. *Journal of plant physiology*, 159(11), 1173-1178.
- Makhadm, I., Nawaz, A., & Shabab, M. (2002). Physiological response of cotton to methanol foliar application.
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., & Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 17(8), 1124-1160.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics*, 43(1), 335-367.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., ... Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of experimental botany*, 67(13), 3831-3844.
- Mirzai, M., Moeini, A., & Ghanati, F. (2013). Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, S. H., & Lahiji, H. S. (2016). Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination stages based on multivariate statistical methods.
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Taghvaei, M. M., Samizadeh Lahiji, H., Ashery, S., & Raza, A. (2022). Investigation of proteins' interaction network and the expression pattern of genes involved in the ABA biogenesis and antioxidant system under methanol spray in drought-stressed rapeseed. *3 Biotech*, 12(9), 217.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Nonomura, A., & Benson, A. (1992). The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9794-9798.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., Satoh, K., Al-Shammari, T., Shimizu, T., Sasaya, T., ... Kikuchi, S. (2012). The thioredoxin gene family in rice: Genome-wide identification and expression profiling under different biotic and abiotic treatments. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(2), 417-423.
- Ober, E. (2001). The search for drought tolerance in sugar beet. *British sugar beet review*, 69, 40-43.
- Pasandideh, M., Samizadeh, H.-A., & Mohsenzadeh, M. (2018). The effect of drought stress on some morphological and physiological characters in canola seedling (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 5(2), 95-108.
- Ramezanzadeh Bishegahi, S., Mohsenzadeh, M., & Samizadeh, H. (2021). Effect of methanol foliar application on expression changes of some mitochondrial genes in canola under drought stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(3), 113-128.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., & Jacquot, J.-P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 1266-1277.
- Rouhier, N., & Jacquot, J.-P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(11), 1413-1421.

- Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 16(5), 1037-1046.
- Sami, Z., & Alemzadeh, A. (2016). Isolation and molecular characterization of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene, AINHX2, from 'Aeluropus littoralis' and comparison of AINHX1 and AINHX2. *Plant Omics*, 9(3), 205-212.
- Taghvimi, P., Golfazani, M. M., Taghvaei, M. M., & Lahiji, H. S. (2024). Investigating the effect of drought stress and methanol spraying on the influential genes in the Calvin cycle and photorespiration of rapeseed (*Brassica napus*). *Functional Plant Biology*, 51(3).
- Tan, M., Liao, F., Hou, L., Wang, J., Wei, L., Jian, H., ... Liu, L. (2017). Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. *Euphytica*, 213(2), 1-15.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., & Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11(7), 1195-1206.
- Vahedi, R., Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., & Samizadeh Lahiji, H. (2019). Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*). *Crop Biotechnology*, 9(27), 15-28.
- Zbieć, I., Karczmarczyk, S., & Podsiadło, C. (2003). Response of some cultivated plants to methanol as compared to supplemental irrigation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6(1), 1-7.

In silico analysis of chalcone synthetase (CHS) in *Cannabis sativa*

Narges Nemati¹, Masoumeh Fallah Ziarani² 

1. M.Sc. Biotechnology and Molecular Genetic, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Ph.D. in Plant Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Correspondence:
Masoumeh Fallah Ziarani
Email: masoumeh_fallah@yahoo.com

Received: 3, Jan. 2025
Accepted: 14, Mar. 2025

How to cite:

Nemati, N., & Fallah Ziarani, M. (2025). *In silico* analysis of chalcone synthetase (CHS) in *Cannabis sativa*. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 43-52. (DOI: [10.30473/cb.2025.73286.1997](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73286.1997))

ABSTRACT

The chalcone synthetase (CHS) gene is a key gene in the flavonoid biosynthesis pathway in plants. This gene encodes the enzyme chalcone synthase, which plays a crucial role in the early stages of the flavonoid biosynthesis pathway. In addition to its primary role in flavonoid biosynthesis, the CHS gene may also be involved in other metabolic pathways, such as the production of compounds that are precursors to cannabinoids (like THC and CBD). Due to the importance of this gene in *Cannabis sativa*, it was studied using various bioinformatics databases and software tools. A search of the nucleotide sequence of accession NM_001397940 from *Cannabis sativa* in the NCBI database revealed 100 matches. The highest Max Score (805) belonged to the alignment with NP_001384869.1 from the *Cannabis* plant itself, with 100% coverage and 100% similarity. The lowest Max Score (746) corresponded to the alignment with QRV61377.1 from the species *Litchi Chinensis* with 99% coverage and 92.01% similarity. The E-Value in this section was also used to determine the significance of the matches. Protein sequence alignment with accession number NP_001384869.1 from *Cannabis sativa* in the NCBI database also showed 100 matches. Phylogenetic analysis of the top 20 species that showed homology with the CHS gene in the BLAST n analysis created a dendrogram, classifying the species into six distinct groups. Genetic diversity analysis using MEGA 6 software indicated that approximately 31% of the CHS gene sequence has undergone substitution mutations and only 8% of these regions contain informative polymorphisms. Analysis of the protein's primary structure revealed that its isoelectric point (PI) is 6.04, and instability index is 37.13, indicating high stability of the protein under cellular conditions. Stable proteins are capable of withstanding environmental changes such as temperature, pH, and pressure, allowing them to maintain their function under stressful or harsh conditions. The amino acid composition analysis revealed that leucine (11%) had the highest abundance, while Pyrrolysine and Selenocystein (0%) were the least abundant. The GRAVY index was -0.09, indicating the hydrophilic nature of the protein. Secondary structure analysis of the protein, using Phyre2 software, identified six similar structures in the NCBI database. Furthermore, GORIV software analysis showed that the CHS protein contains approximately 40.8% alpha-helical structures which it helps the protein's stability. The 3D modeling of this protein in *Cannabis sativa* was performed using the PDB database which had a high similarity to the Chalcone Synthase protein from *Medicago sativa*. Studying the protein's structure can help in understanding its function, and examining its structural details may be useful in studies related to the active site of the protein and docking.

KEYWORDS

Chalcone synthase gene, Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol, Cannabis Sativa, Flavonoid biosynthesis pathway.



مقاله پژوهشی

آنالیز *in silico* ژن چالکون سنتاز (CHS) در گیاه *Cannabis sativa*نرگس نعمتی^۱، معصومه فلاح زيارانی^۲ 

۱. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دکترای بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

معصومه فلاح زيارانی

ایمانامه: masoumeh_fallah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴

استناد به این مقاله:

فلاح زيارانی، معصومه و نعمتی، نرگس (۱۴۰۴). آنالیز *in silico* ژن چالکون سنتاز (CHS) در گیاه شاهدانه، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۴۳-۵۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.73286.1997](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73286.1997))

چکیده

ژن چالکون سنتاز (CHS) یکی از ژن های کلیدی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در گیاهان است. این ژن کد کننده آنزیم چالکون سنتاز می باشد که در مرحله ابتدایی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها نقش مهمی دارد. ژن CHS علاوه بر نقش اصلی خود در بیوسنتز فلاونوئیدها ممکن است در مسیرهای متابولیکی دیگری مانند تولید ترکیباتی که پیش ساز کاناบินوئیدها (مانند THC و CBD) هستند نیز دخالت داشته باشند. به دلیل اهمیت این ژن در گیاه شاهدانه این ژن به کمک پایگاه های مختلف اطلاعاتی و نرم افزارهای گوناگون بیوانفورماتیک مطالعه گردید. جست و جوی توالی نوکلئوتید شماره دسترسی NM_001397940 گیاه شاهدانه در پایگاه اطلاعاتی NCBI توانست ۱۰۰ تطابق را نشان دهد. همردیفی توالی پروتیینی با شماره دسترسی NP_001384869.1 در گیاه شاهدانه مقابل پایگاه اطلاعاتی NCBI توانست ۱۰۰ تطابق را نشان دهد. بیشترین امتیاز (805) Max Score متعلق به همردیفی با NP_001384869.1 از خود گیاه شاهدانه با ۱۰۰٪ پوشش و ۱۰۰٪ شباهت بود. کمترین (746) Max Score مربوط به همردیفی با QRV61377.1 از گونه *Litchi chinensis* با ۹۹٪ پوشش و ۹۲،۰۱٪ شباهت بود. مقدار E-Value در این بخش نیز برای تشخیص معناداری تطابق ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز فیلوژنتیکی ۲۰ گونه اول که در آنالیز BLAST n با ژن CHS همولوژی نشان داده بود دندرومی ایجاد کرد که گونه های مورد مطالعه را در ۶ گروه مجزا دسته بندی کرد. آنالیز تنوع ژنتیکی توسط نرم افزار MEGA 6 نشان داد که در حدود ۳۱ درصد از طول توالی ژن CHS جهش های نوع جایگزینی رخ داده است و تنها ۸ درصد از این نواحی حاوی چند شکلی های آگاهی بخش هستند. با بررسی خصوصیات ساختار اولیه پروتیین مشخص شد که نقطه ایزوالکتریک (Pi) آن ۶،۰۴ و شاخص ناپایداری ۳۷،۱۳ که حاکی از پایداری بالای پروتیین در شرایط سلول است. پروتیین های پایدار قادرند در برابر تغییرات محیطی مانند دما PH و فشار مقاومت کنند. این ویژگی به آن ها امکان می دهد که عملکرد خود را در شرایط سخت یا تنش را حفظ کنند. ترکیب اسید آمینه های نشان داد لوسین (۱۱٪) بیشترین و پیرولیزین و سلسوسیتین (۰٪) کمترین فراوانی را دارند. شاخص GRAVY مقدار ۰،۰۹- را نشان داد که بیانگر ماهیت هیدروفیلیک پروتیین است. بررسی ساختار ثانویه پروتیین با استفاده از نرم افزار 6Phyre2 ساختار مشابه در دیتابیس NCBI برای این پروتیین پیدا شد. همچنین با نرم افزار GORIV مشخص شد که پروتیین CHS حاوی حدود ۴۰،۸٪ ماریچ آلفا هلیکس می باشد که به پایداری آن کمک می کند. مدل سازی سه بعدی این پروتیین در شاهدانه با استفاده از پایگاه PDB انجام گرفت که شباهت بالایی با پروتیین Chalcone synthase از *Medicago Sativa* داشت. مطالعه ساختار پروتیین می تواند به درک عملکرد پروتیین کمک کند و بررسی جزئیات ساختار آن می تواند در مطالعات جایگاه فعال پروتیین و داکینگ سودمند باشد.

واژه های کلیدی

ژن چالکون سنتاز (CHS)، تترا هیدروکانابینول (THC)، کانابیندیول (CBD)، گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*)، مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها.

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa*) گونه‌ای از گیاهان است که تاریخچه‌ای غنی و پیچیده از استفاده انسانی، هم به صورت تفریحی و هم به صورت دارویی دارد. هزاران سال است که انسان‌ها این گیاه را به خاطر ویژگی‌های منحصر به فردش پرورش داده و استفاده کرده‌اند از الیاف مقاوم آن گرفته تا ترکیبات روان گردان قوی این گیاه (دهنوی و همکاران، ۲۰۲۲). در سال‌های اخیر علاقه زیادی به درک پایه ژنتیکی بیوشیمی شاهدانه به ویژه تولید کannabinoidهایی مانند THC و CBD به وجود آمده است. این ترکیبات دارای طیف گسترده‌ای از خواص درمانی از تسکین درد تا ضد التهاب هستند و توجه زیادی از سوی جوامع پزشکی و داروسازی به خود جلب کرده‌اند (دهنوی و همکاران، ۲۰۲۲).

اما چگونه گیاه شاهدانه این ترکیبات منحصر به فرد را تولید می‌کند؟ و چه ژن‌هایی در این فرایند دخیل هستند؟ یکی از ژن‌های کلیدی که در بیوسنتز کannabinoidها نقش دارد ژن چالکون سنتاز (CHS) است. چالکون سنتاز یک آنزیم است که نقش حیاتی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در گیاهان ایفا می‌کند. این مسیر مسئول تولید طیف وسیعی از ترکیبات است که به گیاهان رنگ می‌بخشد، آن‌ها را از نور فرابنفش محافظت می‌کنند، و دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (دائو و همکاران، ۲۰۱۱). بر اساس تحقیقات گزارش شده ژن CHS متعلق به ابر خانواده سنتاز پلی کتید (PKS) در گیاهان می‌باشد. همچنین، بیان ژن CHS تحت تاثیر عوامل محیطی مختلف مانند شدت نور، دما، تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار دارد و در مراحل مختلف رشد گیاه، بیان آن در بافت‌های مختلف متغیر است. تنوع و چند شکلی این ژن در گونه‌های مختلف، نشان دهنده‌ی تطبیق پذیری آن با شرایط محیطی متنوع است (وانگ و یو، ۲۰۱۸).

ژن CHS نه تنها در سنتز آنتوسیانین‌ها نقش دارد، بلکه به عنوان یک تنظیم کننده منفی درونی در انتقال اکسین عمل می‌کند و بر رشد اندام‌های گل تاثیر می‌گذارد. علاوه بر این، بیان اعضای خانواده ژنی CHS

به صورت بافتی-ویژه است و سطح بیان آن‌ها در مراحل مختلف رشد گیاه متفاوت می‌باشد (لیو و همکاران، ۲۰۲۵). اکثر گیاهان حداقل یک ژن CHS را در ژنوم خود دارند. در برنج (*Oryza sativa*) ۲۷ عضو، در ذرت (*Zea mays*) ۱۴ عضو و در توت سیاه (*Morus atropurpurea* Roxb.) ۵ عضو از این ژن شناسایی شده است (سو و همکاران، ۲۰۲۵).

در گیاه شاهدانه آنزیم CHS در تولید اسید اولیووتولیک که پیش ساز THC و CBD است نقش دارد. با کاتالیز واکنش ترکیبی malonyl-CoA و coumaroyl-CoA زنجیره‌ای از واکنش‌ها را به حرکت در می‌آورد که در نهایت منجر به تولید این کannabinoidهای شناخته شده می‌شود (حسین و همکاران، ۲۰۲۳). با این حال درک عملکرد و تنظیم ژن CHS در گیاه شاهدانه نیازمند بیش از تنها توالی‌یابی ژن است. یکی از روش‌های موثر تحلیل به کمک رایانه (In Silico) است که از ابزارهای محاسباتی و تکنیک‌های بیوانفورماتیک برای تفسیر داده‌های بیولوژیکی از جمله توالی‌های DNA و پروتیین استفاده می‌کند. ویژگی‌های ساختاری نقش‌های عملکردی و تاریخچه تکاملی آن را بررسی می‌کند. این تحلیل می‌تواند شامل تکنیک‌های مختلفی از جمله هم ردیفی توالی‌ها و آنالیز عملکردی تا مدل‌سازی ساختاری پیشرفته و مطالعات فیلوژنتیک باشد.

در این مقاله به تحلیل به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی (In Silico) ژن CHS در گیاه شاهدانه خواهیم پرداخت و به بررسی ابزارها و تکنیک‌های پیشرفته محاسباتی که برای کشف پیچیدگی‌های بیوسنتز کannabinoidها استفاده می‌شوند خواهیم پرداخت. ما به بررسی توالی ژن CHS تاریخچه تکاملی آن ساختار عملکرد پیش بینی شده‌اش و نحوه تنظیم آن خواهیم پرداخت. با انجام این کار درک عمیق‌تری از نحوه مشارکت این ژن کلیدی در تولید کannabinoidها در شاهدانه و چگونگی بهره‌برداری از آن در آینده به دست خواهیم آورد.

روش‌شناسی پژوهش

BLAST P و BLAST n

BLAST p و BLAST n در جهت جستجوی توالی مشابه با توالی ژنی و پروتئینی ژن چالکون سنتاز (CHS) گیاه شاهدانه به عنوان query انجام شد.

یافته‌های پژوهش و نتیجه‌گیری

نتایج BLAST n

جستجوی توالی نوکلوتیدی شماره دسترسی NM_001397940 گیاه شاهدانه در پایگاه اطلاعاتی NCBI توانست ۱۰۰ تطابق را نشان دهد که بالاترین امتیاز شاخص Max Score (2911) مربوط به تطابق با شماره دسترسی NM_001397940.1 از گونه ی گیاهی *Cannabis Sativa* با ۱۰۰٪ پوشش و با ۱۰۰٪ شباهت بود در حالی که کمترین امتیاز شاخص Max Score (۷۲۳) مربوط به تطابق با اکسشن CP039336.1 در گونه *Cicer arietinum* با ۶۲٪ پوشش و ۷۹,۹۸٪ شباهت بود. رای تعیین بهترین تطابق، از مقدار E-Value نیز استفاده شد که مقدار کمتر آن نشان‌دهنده انطباق با احتمال بالاتر و معناداری بیشتر است. مقدار E-Value کمتر از ۰,۰۱ نشان‌دهنده معنی‌داری تطابق است.

نتایج BLAST p

همردیفی توالی پروتئینی با شماره دسترسی NP_001384869.1 در گیاه شاهدانه مقابل پایگاه اطلاعاتی NCBI توانست ۱۰۰ تطابق را نشان دهد که بالاترین امتیاز شاخص Max score (۸۰۵) مربوط به همردیفی با شماره دسترسی NP_001384869.1 گیاه شاهدانه با ۱۰۰ درصد پوشش و ۱۰۰ درصد شباهت بود؛ در حالی که کمترین شاخص Max score (۷۴۶) مربوط به همردیفی با شماره دسترسی QRV61377.1 گونه گیاهی *Litchi chinensis* با ۹۹ درصد پوشش و ۹۲,۰۱ درصد شباهت بود. برای تشخیص انطباق از مقدار E-value هم می‌توان استفاده کرد. مقدار E-Value نشان‌دهنده تعداد تطابق‌های مورد انتظار در یک جایگاه داده تصادفی با همان اندازه است. مقدار E-Value کوچکتر نشان‌دهنده امتیاز بالاتر و معتبر بودن انطباق با احتمال بالاتر است، در حالی که مقادیر بسیار کوچک، به ویژه کمتر از ۰,۰۱، نشان‌دهنده

آنالیزهای فیلوژنتیکی

جهت هم‌ردیفی توالی ژن مورد مطالعه از نرم افزار T-Coffee استفاده شد. همچنین برای رسم درخت فیلوژنتیک از نرم افزار MEGA6 استفاده گردید (فلاح زیارانی و همکاران، ۲۰۱۷؛ فلاح زیارانی و همکاران، ۲۰۱۳؛ فلاح زیارانی و توحیدفر، ۲۰۱۸).

بررسی خصوصیات ساختار اولیه پروتئین

به منظور بررسی خصوصیات ساختار اولیه پروتئین از برنامه PROTPARM استفاده شد. برای تعیین محل استقرار و نقش مولکولی پروتئین در سلول از پایگاه داده UNIPROT بهره گرفته شد.

بررسی ساختار دوم پروتئین

ساختار ثانویه پروتئین و تعیین موقعیت صفحات آلفا و بتا با استفاده از ابزار آنالیز Phyre2 شناسایی گردید (فلاح زیارانی و همکاران، ۲۰۱۷؛ فلاح زیارانی و همکاران، ۲۰۲۱؛ فلاح زیارانی و همکاران، ۲۰۲۲).

بررسی ساختار سه بعدی پروتئین

مدل‌سازی سه‌بعدی پروتئین با استفاده از روش همولوژی مدلینگ و پایگاه داده Swiss-Model انجام شد. الگوی مناسب برای مدل‌سازی، با دقت از پایگاه داده PDB و بر اساس بالاترین میزان شباهت ساختاری انتخاب گردید. به منظور اعتبارسنجی ساختار سه‌بعدی مدل ترسیم‌شده، نمودار رامچاندوران مورد استفاده قرار گرفت و زوایای دی‌هدرال برای بررسی صحت استریوشیمیایی محاسبه شد. تحلیل دقیق ساختار پروتئین به درک عملکرد مولکولی آن کمک شایانی می‌کند. همچنین مطالعه جزئیات ساختاری پروتئین، به‌ویژه

الگوریتم‌های دیگر کاربرد دارد. تاجیما D یکی از معروف‌ترین آزمون‌های فرضیه خنثی می‌باشد که با مقایسه دو نوع تنوع ژنتیکی در یک جمعیت (تفاوت‌های جفتی و تعداد جایگاه‌های چندشکلی) انجام می‌شود. این آزمون براساس مقایسه تنوع نوکلئوتیدی حاصل از فراوانی آللی جایگاه‌های چند شکلی است (فرر، ۲۰۰۵). به طور کلی مقادیر مختلف تاجیما D می‌تواند نشان دهنده فرآیندهای مختلفی باشد به این صورت که تاجیما D مثبت نشان دهنده تعادل انتخابی است و ممکن است بیانگر انتخاب متعادل یا گزینش در جمعیت باشد. تاجیما منفی نشان دهنده یک گزینش مثبت یا فشار انتخابی است که باعث شده یک آلل سودمند به سرعت در جمعیت گسترش یابد و تاجیما D نزدیک به صفر بیانگر این است که تغییرات ژنتیکی در جمعیت به صورت تصادفی و مطابق با فرضیه خنثی رخ داده‌اند. آزمون تاجیمای مثبت در ژن مورد مطالعه نشان داد که ژن‌هایی که تنوع فراوانی آللی آن‌ها بالا است تاجیما D مثبت (بزرگتر از صفر) دارند و با انتخاب متعادل در جمعیت همراه هستند (جدول ۱).

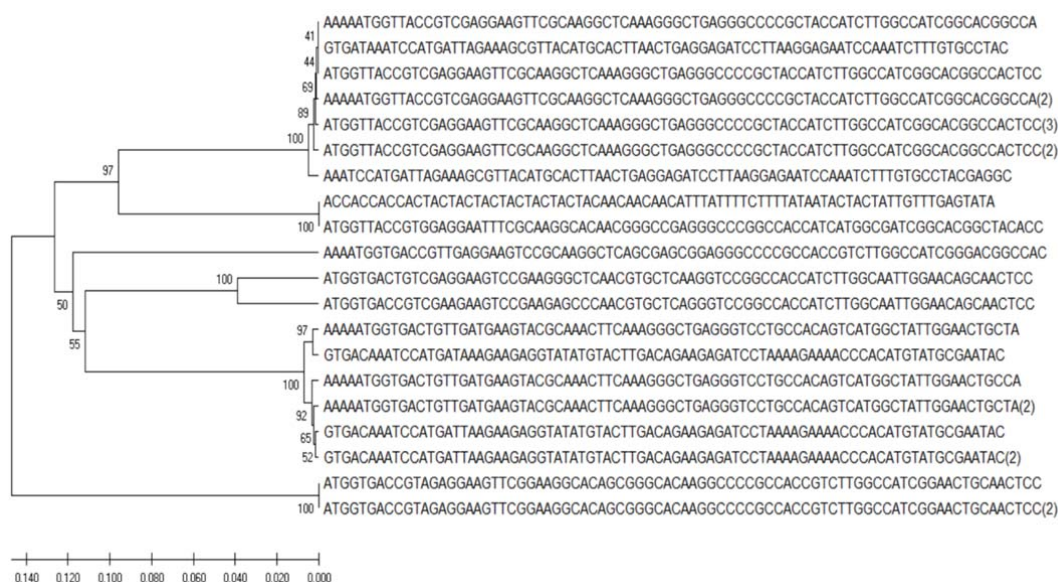
خصوصیات ساختار اولیه پروتئین و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی

برای بررسی خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین مورد بررسی از ساختار اولیه پروتئین و از برنامه پروتئین مورد نظر ۶,۰۴ و بار خالص آن ۴- تعیین شد (زیرا تعداد اسیدآمینه‌های بار مثبت ۴۴ و تعداد اسیدآمینه‌های بار منفی ۴۹ می‌باشد). از نظر ترکیب اسیدآمینه بالاترین فراوانی (۱۱ درصد) متعلق به لوسین و کمترین فراوانی (صفر درصد) متعلق به دو اسید آمینه پیرولیزین و سلنوسیتئین می‌باشد. در نقطه ایزوالکتریک، یک اسید آمینه یا پروتئین به دلیل از دست دادن بار الکتریکی خالص خود، در یک میدان الکتریکی با جریان مستقیم، قادر به حرکت نیست. آگاهی از نقطه ایزوالکتریک پروتئین می‌تواند در انتخاب و بهینه‌سازی روش‌های خالص‌سازی مانند کروماتوگرافی تبادل یونی و ایزوالکترافورز فوکوسینگ بسیار مفید باشد.

انطباق‌های معنادار از نظر آماری هستند. به طور کلی هر چه E-Value به صفر نزدیک‌تر باشد، میزان اطمینان به ارتباط بیولوژیکی بین توالی‌های بیشتر خواهد بود.

آنالیزهای فیلوژنتیکی

برای این منظور ۲۰ گونه اول که در آنالیز BLAST n با ژن CHS همولوژی نشان دادند انتخاب شدند. در گام اول این گونه‌ها با نرم افزار T_Coffee هم‌ردیف‌سازی شده و سپس برای انجام آنالیزهای فیلوژنتیکی از نرم افزار MEGA6 استفاده شد. آزمون شاخص نابرابری که با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد نشان داد که ژن CHS همولوژی بالایی با هم گونه‌های مورد بررسی دارد. آنالیز فیلوژنتیکی با روش UPGMA و انتخاب مدل جایگزینی WAG+G دندروگرامی ایجاد کرد که گونه‌های مورد مطالعه را در ۶ گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی کرد (شکل ۱). مدل جایگزینی توسط نرم افزار MEGA6 بدست آمد و با مقایسه تفاوت توالی‌ها و انتخاب بهترین مدل جایگزینی بهترین درخت فیلوژنتیکی رسم شد. در ماتریس تشابه در مقایسه بین ۲۰ گونه مورد بررسی کمترین تشابه مربوط به عدد ۳۱/۰ می‌باشد. آنالیز تنوع ژنتیکی توسط نرم افزار MEGA6 نشان داد که در حدود ۳۱ درصد از طول توالی ژن CHS جهش‌های نوع جایگزینی رخ داده که در این میان تنها حدود ۸ درصد از طول توالی ژن دارای چندشکلی‌های آگاهی بخش می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت مورد مطالعه پایین و در حدود ۹ درصد می‌باشد (جدول ۱). آزمون تاجیما نشان داد که جمعیت مورد (۲۰ گونه مورد بررسی) مطالعه در تعادل قرار دارند. تست فرضیه خنثی به بررسی اختلافات مشاهده شده بین جفت‌های توالی ژنتیکی که با الگوی جایگزینی مشابه تکامل یافته‌اند می‌پردازد. اساس این تست مقایسه فرکانس نوکلئوتید یا آمینواسید در توالی‌های جفتی و تعداد تفاوت‌های مشاهده شده بین این توالی‌ها است. در زیست‌شناسی مدل جایگزینی فرایندی را توصیف می‌کند که در آن تغییرات یک صفت در طی زمان تحت تاثیر فشارهای انتخابی یا فرایندهای تصادفی (مانند جهش یا رانش ژنتیکی) رخ می‌دهد. این مدل در تفسیر درخت تکاملی در فیلوژنتیک و شاخه بندی و شبیه‌سازی توالی با تست روش‌ها و



شکل ۱. دندروگرام بدست آمده از گونه‌های مورد مطالعه با روش UPGMA با استفاده از داده‌های توالی NM_001397940.

اعداد روی شاخه‌ها مقادیر بوت استرپ (%) را نشان می‌دهند. مقیاس افقی فاصله ژنتیکی را نمایش می‌دهد.

Figure 1. The dendrogram of the studied species was constructed using the UPGMA method based on the NM_001397940 sequence data. The numbers on the branches represent bootstrap values(%). The horizontal scale indicates genetic distance.

جدول ۱. نتیجه تست تاجیما برای ژن CHS در موجودات مورد بررسی. آزمون تاجیما مثبت نشان داد که ژن‌هایی با تنوع آلی بالا دارای مقدار D مثبت بوده و تحت انتخاب متعادل در جمعیت قرار دارند.

Table 1. Tajima test result for the CHS gene in the studied organisms. The positive Tajima test indicates that genes with high allelic diversity have a positive D value, and are subject to balancing selection in the population.

شخص D تاجیما	شخص Π	شخص Θ	Ps تنوع آلی	تعداد جایگاه های متغیر S	تعداد نمونه M
0.437801	0.098479	0.089140	0.316245	475	20

لوله آزمایش در برابر حرارت می‌باشد؛ و این به نوع اسیدآمینه های موجود بستگی دارد. پروتئین‌هایی که شاخص ناپایداری آنها کوچک‌تر از ۴۰ می‌باشد با ثبات و در غیر این صورت بی ثبات خواهند بود. بنابراین پروتئین CHS جز پروتئین‌های پایدار می‌باشد. پروتئین‌های پایدار در شرایط تنش مثل تنش حرارتی می‌تواند ساختار سوم خود و در نتیجه عملکردشان را در شرایط تنش حفظ کنند (کرسی و همکاران، ۲۰۲۰).

با برنامه PROTSKALE نیز مشخص شد که پروتئین مورد مطالعه طبق روش کیت و دولیتل در انتهای N و همچنین نزدیک به انتهای C خود دارای آب گریزی معنی داری می‌باشد (با توجه به خط برش ۱ در شکل ۲).

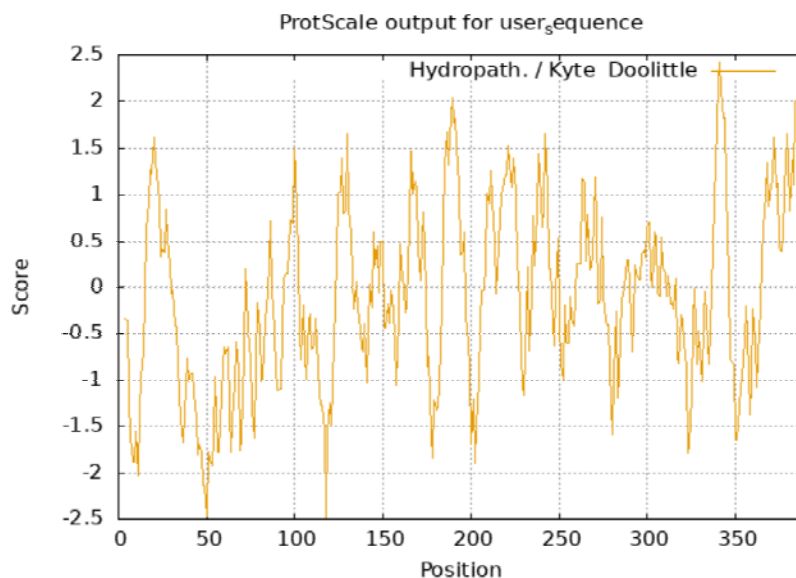
علاوه بر این، پروتئین‌هایی که در محدوده pH نقطه ایزوالکتریک خود قرار دارند، به دلیل تعادل بارهای مثبت و منفی، قابلیت نگهداری آب را از دست داده و به ناچار رسوب می‌کنند. از طرفی میانگین آب گریزی کل پروتئین مورد مطالعه (GRAVY) ۰/۰۹- می‌باشد. بررسی شاخص ناپایداری (Instability index) نشان می‌دهد که این پروتئین عمر بالایی دارد زیرا شاخص ناپایداری آن ۳۷،۱۳ است (جدول ۲)؛ این موضوع حاکی از آن است که این پروتئین در شرایط سلولی پایدار بوده و به راحتی تجزیه نمی‌شود.

شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیانگر میزان پایداری آنها در

جدول ۲. بررسی شاخص ناپایداری پروتئین CHS. مقدار شاخص ناپایداری ۳۷,۱۳ نشان دهنده پایداری نسبی پروتئین CHS در شرایط سلولی است. مقدار میانگین کلی آب گریزی منفی (-۰,۰۹۰) بیانگر ماهیت آب دوست بودن این پروتئین می باشد.

Table 2. CHS protein instability index review, the instability index of 37.13 indicates the relative stability of the CHS protein under cellular conditions. The negative GRAY value (-0.090) suggests the hydrophilic nature of this protein

شاخص ناپایداری Instability Index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic Index	میانگین کل آبگریزی GRAVY
37.13	93.50	-۰,۰۹۰



شکل ۲. آنالیز آبگریزی پروتئین CHS با برنامه PROTSCALE. محور افقی موقعیت اسیدهای آمینه و محور عمودی میزان آبگریزی را نشان می دهد. به طوری که مقادیر مثبت نشان دهنده نواحی آبگریز هستند.

Figure 2. Hydropobicity analysis of CHS protein with PROTSCALE program. The X-axis shows amino acid positions, and the Y-axis represents the hydropobicity score, with positive values indicating hydrophobic regions

ساختار دوم پروتئین

با استفاده از نرم افزار آنالیز 2 Phyre، ساختار دوم پروتئین CHS پیش بینی شد. نتایج حاصل حاکی از آن است که ۶ ساختار مشابه در دیتابیس NCBI برای این پروتئین پیدا شد، یکی از این ساختارها مربوط به ساختار پروتئین Chalcone synthase از alfalfa است که دارای شباهت ۱۰۰ با پروتئین CHS گیاه شاهدانه می باشد (شکل ۳). همچنین با نرم افزار GORIV مشخص شد که پروتئین CHS حاوی حدود ۴۰,۸۷٪ مارپیچ آلفا هلیکس است و این اطلاعات به منظور بررسی پایداری پروتئین دارای اهمیت می باشد (شکل ۴).

مارپیچ آلفا معمولاً در سطح هسته های پروتئینی قرار دارد و به عنوان یک رابط برای تعامل با محیط آبی خارجی عمل می کند. قسمت داخلی مارپیچ آلفا تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب گریز و قسمت بیرونی آن تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب دوست دارد. به همین دلیل، در طول مارپیچ، از هر چهار آمینواسید، سه تای آنها آب گریز هستند. آمینواسیدهای موجود در هسته پروتئین یا داخل غشای سلولی نیز معمولاً خاصیت آب گریزی دارند. به طور کلی، مارپیچ های آلفایی که در سطح قرار دارند، تعداد کمتری آمینواسید آب گریز دارند. این ویژگی می تواند در پیش بینی ساختار پروتئین ها مفید باشد. به

می‌شود صفحات بتا سختی بیشتری داشته و انعطاف‌پذیری کمتری داشته باشند. پیوندهای هیدروژنی بین رشته‌ای که بین گروه‌های CO یک رشته بتا و گروه NH رشته بتای مجاور ایجاد می‌شوند، پایداری بیشتری به صفحات بتا می‌بخشند و ظاهری زیگزاگ به آن‌ها می‌دهند. هرچه میزان مارپیچ‌های آلفا و بتا در پروتئین بیشتر باشد، انعطاف‌پذیری پروتئین کمتر و پایداری آن بیشتر خواهد بود. نتایج نشان داد که پایداری پروتئین CHS نسبتاً زیاد است.

عنوان مثال، نواحی‌ای که حاوی مقادیر بالایی از آلانین، گلوتامیک اسید، لوسین و متیونین هستند و مقادیر کمتری از پرولین، گلیسین، تیروزین و سرین دارند، تمایل به تشکیل مارپیچ آلفا دارند. از سوی دیگر، ساختار صفحات بتا بسیار کشیده و چین‌دار است. یکی از تفاوت‌های مهم بین صفحات بتا و مارپیچ آلفا این است که آمینواسیدهایی که در ساختار اولیه پروتئین با فاصله زیادی از هم قرار دارند، در تشکیل صفحات بتا در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند. این ویژگی باعث



شکل ۳. ساختار پیشنهادی برای پروتئین CHS با برنامه Phyre2

Figure 3. Proposed structure for the CHS protein with the Phyre2 program

7/25/24, 9:55 AM

NPS@ : GOR4 SECONDARY STRUCTURE PREDICTION RESULTS

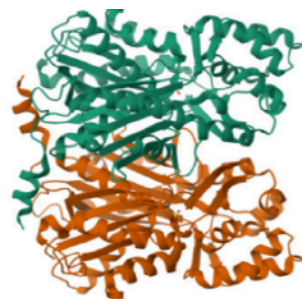
```
GOR4 :
Alpha helix (Hh) : 159 is 40.87%
310 helix (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 59 is 15.17%
Beta turn (Tt) : 0 is 0.00%
Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
Random coil (Cc) : 171 is 43.96%
Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
Other states : 0 is 0.00%
```

شکل ۴. آنالیز ساختار دو بعدی پروتئین CHS با نرم افزار GORIV

Figure 4. Analysis of the two-dimensional structure of CHS protein with GORIV software

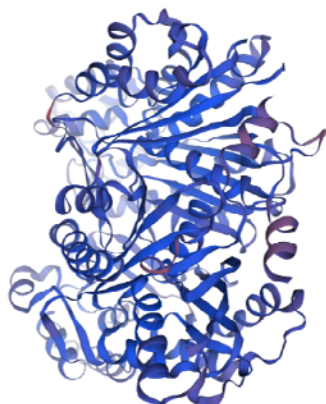
ساختار سوم پروتئین

مدل سازی ساختار سه بعدی براساس انتخاب یک الگوی با شباهت بالا به پروتئین هدف، با استفاده از پایگاه داده PDB انجام گرفت (شکل ۵). الگوی منتخب برای مدل سازی پروتئین CHS در گیاه شاهدانه (1JWX)، دارای ۳۸۹ آمینواسید است و در سال ۲۰۰۲ با قدرت تفکیک ۱٫۶۳ آنگستروم از گیاه *Medicago sativa* با استفاده از روش کریستالوگرافی اشعه ایکس (X-ray) کشف شده است. این الگو وزن مولکولی ۴۲٫۷۸۷ کیلو دالتون دارد و شامل دو جهش است. مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین CHS گیاه شاهدانه با استفاده از سرور Swiss-Model پیش بینی شد. ساختار براساس نزدیک ترین الگو ایجاد و با تحلیل های مختلف اعتبار سنجی شد (شکل ۶). نمودار رامچاندرا نشان داد که ۹۷٫۱۴٪ از اسیدهای آمینه در نواحی مطلوب قرار دارند و تنها ۰٫۳۹٪ به عنوان خارج از محدوده طبقه بندی شدند. امتیاز MolProbity برابر با ۰٫۹۷ بود که کیفیت بالای مدل را تایید می کند همچنین هیچ پیوند نامناسبی مشاهده نشد (شکل ۷). این مدل برای مطالعات بیشتر روی عملکرد پروتئین CHS و تجزیه و تحلیل های اتصال لیگاند مناسب است.



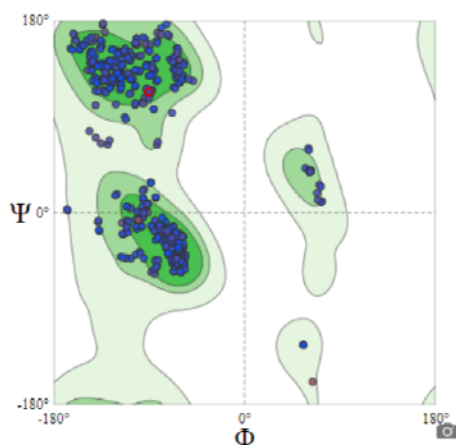
شکل ۵. مدل سه بعدی ساختار پروتئین CHS که با استفاده از روش همولوژی مدلینگ پیش بینی شده است. در این مدل، نواحی مختلف پروتئین با رنگ های متفاوت مشخص شده اند و ساختار کلی در قالب PBD نمایش داده شده است.

Figure 5. Three-dimensional modeled structure of CHS. predicted using homology modeling. Different regions of the protein are highlighted in distinct colors, and the overall structure is presented in PBD format.



شکل ۶. مدل سه بعدی پروتئین هدف با استفاده از Swiss Model براساس مدل سازی همولوژی ایجاد شده است. این مدل ساختار کلی، عناصر ثانویه و محل های احتمالی عملکردی پروتئین را نشان می دهد.

Figure 6. 3D structural model of the target protein was generated using Swiss-Model based on homology modeling. This model illustrates the overall structure, secondary elements, and potential functional sites of the protein.



شکل ۷. نمودار رامچاندرا کیفیت مدل پیش بینی شده در Swiss Model را ارزیابی می کند و توزیع زوایای دی هیدرال (Phi و Psi) را در ساختار پروتئین نشان می دهد. حضور بیشتر اسیدهای آمینه در نواحی مجاز نشان دهنده پایداری ساختاری مدل است.

Figure 7. The Ramachandran plot evaluates the quality of the predicted model and illustrates the distribution of dihedral angles (Psi and Phi) in the protein structure. A higher concentration of amino acids in the allowed regions indicates structural stability of the model.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Dao, T.T.H., Linthorst, H.J.M., & Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10, 397-412. DOI: 10.1007/s11101-011-9211-7.
- Fallah Ziarani, M., Masoud, T., Mirjalili, M. H. (2021b). Optimizing Culture Condition for High Frequency Regeneration *In Vitro* Tissue Culture in *Daucus carota* L. and Genetic Stability Assessment. *Journal of Plant Bioinformatics and Biotechnology*, 1, 84-96
- Fallah Ziarani, M., Tohidfar, M., & Mirjalili, M. H. (2022) Optimization of Nisin Gene Transfer by *Agrobacterium* in Carrot Plant. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 35 (1), 13-21.
- Fallah Ziarani, M., & Tohidfar, M. (2028) Genome editing for Change the color of the flower using crispr technology. *Crop Biotech*, 21, 71-79.
- Fallah Ziarani, M., Raheem, H., Ghasemali, G., & Mokhtar, J. (2013). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary leaf of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the GCHI gene. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2(2): 47-55.
- Fallah Ziarani, M., Tohidfar, M., & Aminfar, Z. (2017). Bioinformatic analysis of Acyl Carrier Protein (ACP) in eukaryotes and prokaryotes. *Crop Biotechnology*, 7(17) 15-29.
- Ferrer, J.L. et al. (1999). Three-dimensional structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology*, 6, 775-784.
- Hussain, S., Hussain, A., Ahmad, I., Wahid, F., & Sajid, M. (2023). Bioinformatics-based characterization of the Chalcone synthase (CHS) family genes in flowering plants. *SABRAO J. Breed. Genet*, 55(6), 1950-1962.
- Kearsey, L.J., Prandi, N., Karuppiiah, V., Yan, C., Leys, D., Toogood, H., & Scrutton, N.S. (2020). structure of the *Cannabis sativa* olivetol-producing enzyme reveals cyclization plasticity in type III polyketide synthases. *The FEBS Journal*, 287(8), 1511-1524.
- Mostafaei Dehnavi, M., Ebadi, A., Peirovi, A., Taylor, G., & Salami, S. A. (2022). THC and CBD fingerprinting of an elite cannabis collection from Iran: Quantifying diversity to underpin future cannabis breeding. *Plants*, 11(1), 129.
- Su, S., Xuan, X., Tan, J., Yu, Z., Jiao, Y., Zhang, Z., & Ramakrishnan, M. (2025). Analysis of the CHS Gene Family Reveals Its Functional Responses to Hormones, Salinity, and Drought Stress in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plants*, 14(2), 161.
- Wang, Z., Yu, Q., Shen, W., El Mohtar, C. A., Zhao, X., & Gmitter, F. G. (2018). Functional study of CHS gene family members in citrus revealed a novel CHS gene affecting the production of flavonoids. *BMC Plant Biology*, 18, 1-13.
- Xie, Z., Yang, L., Fan, M., Xuan, S., Jia, X., Zhang, Z., ... & Li, J. (2025). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase gene family in Chinese cabbage. *BMC genomics*, 26, 168.

ORIGINAL ARTICLE

The impact of drought on the yield and yield components of some potato genotypes

Ahmad Mousapour Gorji¹, Abbas Saidi², Marjan Samaee³, Davoud Hassanpanah⁴, Zahra Hajibarat²

1. Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Vegetable Department, Karaj, Iran.

2. Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

3. Rural Cooperative Organization, Tehran, Iran.

4. Horticulture Crops Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources, Research Centre, AREEO, Ardabil, Iran.

Correspondences:

Ahmad Mousapour Gorji
Email: abbas.saidi@gmail.com
mousapour.gorji@gmail.com

Received: 13, Nov. 2024

Accepted: 5, Apr. 2025

How to cite:

Mousapour Gorji, A., Saidi, A., Samaee, M., Hassanpanah, D., & Hajibarat, Z. (2025). The impact of drought on the yield and yield components of some potato genotypes. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 53-68.
(DOI: [10.30473/cb.2025.72772.1988](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72772.1988))

ABSTRACT

To investigate the effect of water stress on some essential traits of potato, an experiment was conducted in 2019 in Karaj using a factorial design within a completely randomized block design with three replications. The first factor included two irrigation treatments (water stress and control), and the second factor consisted of 11 potato genotypes (Agria, Caesar, Savalan, Santé, Marfona, Milva, Picasso, Hermes, Jelly, 397081-1 (1-81), 397069-2 (2-69)). Drip irrigation was applied under normal conditions, while irrigation was stopped for 25 days during the tuberization stage to create water stress, with the stress level being 50% of the field's soil water holding capacity during this period. Irrigation treatments and genotypes showed significant differences ($p < 0.01$) for biological yield, total tuber yield, specific gravity, dry matter, biological yield, tuber number, tuber yield, and number of tubers smaller than 35 mm, number of tubers larger than 55 mm, and tubers between 35 to 55 mm in size. The number of tubers larger than 55 mm was higher under both water stress and normal conditions, indicating the market preference for the Hermes variety and clone 397069-2 (2-69). Based on the results, the Hermes variety and clone 397069-2 were identified as the most drought-tolerant varieties, showing higher total and biological yields under water stress conditions. The findings of this study can recommend suitable varieties for economic potato production and contribute to improving income and food security in Iran.

KEYWORDS

Biological function, factorial, genotype, specific weight, tuber size



«مقاله پژوهشی»

تأثیر خشکی بر عملکرد و اجزای عملکرد برخی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی

احمد موسی‌پور گرجی^۱، عباس سعیدی^۲، مرجان سمعی^۳، داود حسن‌پناه^۴، زهرا حاجی‌برات^۵

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تنش آبی بر برخی ویژگی‌های ضروری سیب‌زمینی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۹ در کرج اجرا شد. عامل اول شامل تیمار آبیاری در دو سطح (تنش و شاهد) و عامل دوم شامل ۱۱ ژنوتیپ سیب‌زمینی (آگریا، سزار، ساوالان، سانه، مارفونا، می‌لوا، پیکاسو، هرمس، جلی، ۱-۳۹۷۰۸۱، ۱-۸۱)، ۲-۳۹۷۰۶۹، ۲-۶۹)) در نظر گرفته شدند. آبیاری قطره‌ای برای شرایط نرمال به‌طور معمول انجام شد و برای تیمار خشکی در مرحله غده‌زایی برای ایجاد تنش آبی به‌مدت ۲۵ روز متوقف شد. تنش خشکی معادل ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه در این مدت بود. مراحل آبیاری و ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($p < 0.01$) بر عملکرد بیولوژیکی و عملکرد کل غده، وزن مخصوص، ماده خشک، عملکرد بیولوژیک، تعداد غده، عملکرد غده، اندازه غده کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر، اندازه غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر و اندازه غده بین ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر داشتند. نتایج نشان داد که همبستگی بالا و معنی‌داری بین عملکرد بیولوژیکی و تعداد کل غده و عملکرد کل با عملکرد بذری و اندازه غده بین ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر وجود دارد. تعداد غده‌هایی که بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر بودند نیز در شرایط تنش خشکی و شرایط نرمال بیشتر بود، که نشان‌دهنده بازارپسندی رقم هرمس و کلون ۲-۶۹ است. براساس نتایج مطالعه حاضر رقم هرمس و کلون ۲-۳۹۷۰۶۹ متحمل‌ترین رقم شناسایی شدند که تحت تنش خشکی عملکرد کل و بیولوژیکی بالاتری داشتند. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند ارقام مطلوب برای تولید اقتصادی سیب‌زمینی و بهبود درآمد و امنیت غذایی در ایران توصیه کرد.

واژه‌های کلیدی

اندازه غده، ژنوتیپ، فاکتوریل، عملکرد بیولوژیک، وزن مخصوص.

۱. مؤسسه اصلاح و تهیه نهال بذر (SPII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، گروه سبزی و صیفی، کرج، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. سازمان تعاون روستایی، تهران، ایران.
۴. گروه تحقیقات محصولات باغی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل، AREEO، اردبیل، ایران.

نویسنده مسئول:

احمد موسی‌پور گرجی

رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

رایانامه: mousapour.gorji@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶

استناد به این مقاله:

موسی‌پور گرجی، احمد؛ سعیدی، عباس؛ سمعی، مرجان؛ حسن‌پناه، داود و حاجی‌برات، زهرا (۱۴۰۴). تأثیر خشکی بر عملکرد و اجزای عملکرد برخی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۵۳-۶۸.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72772.1988](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72772.1988))

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از نظر عملکرد و پوتنسیل با کیفیت در واحد سطح و واحد زمان یکی از پرمحصول‌ترین محصولات غذایی است. این محصول به دلیل تولید عملکرد بالا و با کیفیت نقش به سزایی در امنیت غذایی ایفا می‌کند (Devaux et al., 2021). تولید جهانی سیب‌زمینی سالانه حدود ۳۶۰ میلیون تن می‌باشد که در ۱۶٫۵ میلیون هکتار زمین زراعی تولید می‌شود (FAOSTAT, 2020). به‌رغم مقادیر بالای سیب‌زمینی تولید شده در سراسر جهان، شکاف‌های عملکردی به دلیل چالش‌هایی از جمله تنش‌های غیر زیستی، آفات، تغییرات آب و هوایی و شیوه‌های تولید ضعیف وجود دارد (Eid et al., 2020). مجموع سطح زیر کشت سیب‌زمینی در استان‌های سردسیر، گرمسیر و معتدل در ایران ۱۵۰ تا ۱۶۰ هزار هکتار بود. براساس آمار طی ۵ تا ۶ سال اخیر بالای ۵ میلیون تن سیب‌زمینی تولید شده‌است. سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ پنج میلیون و ۳۰۰ هزار تن محصول تولید شد (https://amarfact.com/statistics). تغییرات آب و هوایی جهانی به‌شکل گرمای شدید و خشکسالی با تأثیر منفی بر عملکرد گیاه و عملکرد محصول، چالش بزرگی را برای تولید پایدار محصولات کشاورزی ایجاد می‌کند (Tang et al., 2018, Saidi and Hajibarat, 2020). چنین تأثیر منفی بر عملکرد محصول احتمالاً در آینده تشدید خواهد شد زیرا ادامه انتشار گازهای گلخانه‌ای باعث افزایش بیشتر دما می‌شود که منجر به افزایش تبخیر-تعرق و شدت خشکسالی می‌شود (Zarzynska et al., 2017). این امر چالش بزرگی را برای دانشمندان گیاهی در تأمین تقاضای جهانی غذا ایجاد کرده است که نیاز فوری به افزایش دو برابر عملکرد فعلی محصولات غذایی عمده برای تغذیه جمعیت رو به افزایش را ضروری می‌کند. به‌عنوان چهارمین محصول عمده غذایی، افزایش بهره‌وری سیب‌زمینی برای امنیت غذایی جمعیت در حال افزایش مهم است. سیب‌زمینی به‌دلیل سیستم ریشه کم عمق که دارد، حساس‌ترین گونه زراعی به خشکی محسوب می‌شود. تنش خشکی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی

درگیر در تشکیل و رشد غده تأثیر منفی می‌گذارد (Minhas, 2012).

پیشینه پژوهش

رشد سیب‌زمینی و عملکرد غده تا حد زیادی به بارندگی بستگی دارد، در نتیجه، حتی یک دوره کوتاه کمبود آب می‌تواند باعث از دست دادن قابل توجه عملکرد غده و کاهش کیفیت غده شود (Deblonde and Ledent, 2001). با این حال، میزان کاهش عملکرد غده ناشی از خشکسالی تا حد زیادی به‌مدت، شدت و مرحله رشد گیاه بستگی دارد (Evers et al., 2010). تنش اولیه به‌دلیل کاهش سطح برگ، کاهش نرخ فتوسنتز و کاهش تقسیم مواد جذب شده به غده‌ها، بیشترین ضرر را برای غده سازی، حجیم شدن و عملکرد غده دارد (Obidiegwu et al., 2015). اگر خشکسالی در مراحل اولیه رشد رخ دهد، به‌طور قابل توجهی شروع، حجیم شدن و عملکرد غده را کاهش می‌دهد. تنش خشکی در زمان غده‌دهی باعث کاهش تعداد استولون در ساقه و کاهش تعداد غده و عملکرد آن می‌شود. اگر سیب‌زمینی در مرحله حجیم شدن غده دچار خشکی شوند، غده کوچک‌تر تولید خواهند کرد. با این وجود، پیشنهاد شده‌است که شروع استولون و تشکیل غده بحرانی‌ترین مراحل برای تنش خشکی هستند.

خشکی ممکن است با تأثیر بر رشد رویشی مانند ارتفاع بوته، تعداد و اندازه برگ‌ها یا با تأثیر بر فتوسنتز برگ با کاهش کلروفیل، شاخص سطح برگ یا کاهش طول مدت سطح برگ بر عملکرد سیب‌زمینی تأثیر بگذارد. علاوه بر رشد رویشی، خشکی ممکن است با کوتاه کردن چرخه رشد یا با کاهش اندازه و تعداد غده‌ها تولید شده توسط گیاهان، بر مرحله زایشی سیب‌زمینی تأثیر بگذارد. علاوه بر این، خشکسالی ممکن است بر کیفیت غده‌های تولید شده نیز تأثیر بگذارد. بنابراین تنش خشکی روی سیب‌زمینی را می‌توان در اثر تنش خشکی بر قسمت‌های سطح زمین و عملکرد دسته‌بندی کرد. علاوه بر کاهش میزان تولید اقتصادی سیب‌زمینی تحت تنش خشکی، سایر صفات نیز تحت این تنش در سیب‌زمینی قرار می‌گیرند.

صفات مرتبط با عملکرد و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل با عملکرد پایدار در شرایط تنش خشکی است.

روش‌شناسی پژوهش

این تحقیق به صورت آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۹ در کرج (طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۷۵ دقیقه شرقی، طول جغرافیایی ۳۵ درجه و ۵۹ دقیقه شمالی با میانگین بارندگی طولانی مدت ۲۴۳ میلی‌متر) انجام شد. عامل اول شامل تیمار آبیاری در دو سطح (تنش و شاهد)، عامل دوم شامل ۱۱ ژنوتیپ سیب‌زمینی (آگریا، سزار، ساوالان، سانته، مارفونا، می‌لوا، پیکاسو، هرمس، جلی، (۱-۸۱ و ۲-۶۹) بود. هر کرت شامل چهار خط به طول چهار متر بود که فاصله بین خطوط و روی خطوط به ترتیب ۷۵ و ۲۵ سانتی‌متر (۱۶ غده (گیاه) در هر خط) بود. آبیاری به صورت قطره‌ای در شرایط معمول و در دوره رشدی سیب‌زمینی به مدت ۱۲۰ روز در شرایط نرمال انجام شد و برای تیمار تنش آبیاری، در مراحل غده‌زایی بین زمان ۵۰ تا ۷۵ روز بعد از کشت برای القای تنش آبی متوقف شد، در حالی که تیمار شاهد معمولاً آبیاری می‌شد. این زمان متناسب با ۲۵ روز بعد از غده‌زایی بوده‌است که قطع آبیاری تا این زمان انجام شده‌است و آبیاری مجدد تا ۴۵ روز بعد از تنش خشکی ادامه یافت. تنش آبیاری، با رسیدن به رطوبت خاک به ظرفیت زراعی ۵۰ درصد از آغاز شد. ردیف‌های مجاور و اولین و آخرین بوته‌های خطوط مرکزی در هر کرت حاشیه‌ای در نظر گرفته و برای اندازه‌گیری رطوبت خاک در طول دوره رشد، بررسی شد. همچنین ۲۵۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص به صورت اوره، ۳۹۵ کیلوگرم در هکتار پتاسیم اکسید^۱ و ۸۸ کیلوگرم در هکتار پتاسیم اکسید فسفر^۲ استفاده شد.

ژنوتیپ‌ها

آگریا (متوسط دیررس)، سزار (متوسط زودرس)، پیکاسو (متوسط دیررس)، جلی (متوسط دیررس)، هرمس (متوسط

وزن مخصوص عامل مهمی برای حفظ کیفیت غده است و به طور مستقیم با محتوای ماده خشک مرتبط است. سیب‌زمینی با وزن مخصوص بالا برای پخت، سرخ کردن و خرد کردن مناسب‌تر است (Haase, 2003; Pedreschi and Moyano, 2005). تولیدکنندگان محصولات سیب‌زمینی غده‌هایی با وزن مخصوص پایین‌تر را نسبت به سیب زمینی‌هایی با وزن مخصوص پایین‌تر برای به دست آوردن چپس بیشتر ترجیح می‌دهند (Haase, 2003). براساس مطالعه‌ای که Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۴ انجام داد، خشکی باعث کاهش ماده خشک سیب‌زمینی می‌شود. همچنین وزن مخصوص عامل مهمی برای حفظ کیفیت غده است و به طور مستقیم با محتوای ماده خشک مرتبط است. با وجود ارتباط مستقیم بین وزن مخصوص و محتوای ماده خشک متعاقباً تحت تنش خشکی هر دو صفت کاهش پیدا می‌کند (Nasir and Toth, 2022).

به منظور حفظ تولید پایدار سیب‌زمینی، لازم است ارقام سیب‌زمینی مقاوم به تنش را که به طور مناسب برای تغییر محیط مهندسی شده‌اند، توسعه داد. با این حال، فقدان داده‌ها در مورد مسیرهای اساسی تحمل گیاه سیب‌زمینی به تنش‌های غیر زیستی و زیستی و توانایی پیش‌بینی پیامدهای آینده، شکاف دانشی بزرگی را تشکیل می‌دهد. این یک چالش برای دانشمندان گیاه‌شناس است که ابزارهای بهبود عملکرد غده تحت افزایش کربن دی‌اکسید، دمای بالا و تنش خشکی را مشخص کنند (Dahal et al., 2014). درک فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مرتبط با تنش برای توسعه روش‌های غربالگری برای انتخاب ارقام زراعی که بهتر می‌توانند با شرایط تغییر رشد سازگار شوند، بسیار مهم است. توضیح چنین سازوکاری ممکن است بینش‌های جدیدی در شناسایی ویژگی‌های خاص ارائه دهد که ممکن است در اصلاح ارقام جدید با هدف حفظ یا حتی افزایش عملکرد سیب‌زمینی تحت شرایط آب و هوایی در حال تغییر مفید باشد. هدف این مطالعه بررسی صفات مربوط به عملکرد تحت شرایط نرمال و خشکی، بررسی همبستگی بین

1. K₂O

2. P₂O₅

رابطه ۲) = وزن مخصوص
(وزن غده در آب - وزن غده در هوا) / وزن غده در هوا

تجزیه و تحلیل داده‌ها

عملکرد غده، اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیکی هر دو تیمار آبیاری معمول و تحت تنش رطوبتی با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab ۱۷ آنالیز شدند. داده‌های پارامترهای تنش خشکی و همبستگی بین صفات مختلف تجزیه و تحلیل PCA با استفاده از بسته نرم‌افزاری R Factoextra انجام شد. برای بررسی رابطه بین متغیرها با کمک نرم‌افزار ggbiplot از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. مقایسه میانگین براساس دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ بود.

یافته‌های پژوهش

نتایج جدول تجزیه واریانس برای ۱۱ ژنوتیپ سیب‌زمینی در محیط مورد آزمایش در کرج انجام شد. تغییرات آماری معنی‌داری در عملکرد کل، عملکرد خوراکی، عملکرد بذری، تعداد غده بین ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر، تعداد غده کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر، تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیکی، درصد ماده خشک، تعداد کل غده و وزن مخصوص مشاهده شد (جدول ۱). مطابق جدول تجزیه واریانس، اثرات اصلی ژنوتیپ، خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ × خشکی بر روی تمامی صفات فوق‌الذکر تفاوت معنی‌داری ($p < 0/01$) نشان داد.

نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌ها از نظر عملکرد کل، عملکرد خوراکی، عملکرد بذری، تعداد غده بین ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر، تعداد غده کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر، تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیکی، درصد ماده خشک، تعداد کل غده به‌غیر از وزن مخصوص در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. اثر اصلی تیمار آبیاری بر عملکرد در سطح یک درصد بر صفات مرتبط با عملکرد و عملکرد بیولوژیکی و وزن مخصوص بسیار معنی‌دار بود. اما در درصد ماده خشک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین اثر متقابل آبیاری و ژنوتیپ از نظر صفات مرتبط با عملکرد، عملکرد بیولوژیکی، درصد ماده خشک به‌جز وزن مخصوص در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

زودرس) سانت (متوسط دیررس)، مارفونا (متوسط زودرس)، می‌لوا (متوسط دیررس) (Europlant and Potato Varieties Database and Canadian Food Inspection Agency, 2007)، ساوالان (متوسط زودرس) و دو کلون پیشرفته به نام‌های ۸۱-۱ و ۶۹-۲ (متوسط دیررس) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران تهیه شدند.

ارزیابی صفات

شش گیاه از ژنوتیپ یکسان در هر شرایط و هر تیمار با سه تکرار وجود داشت. در ۱۲۰ روز بعد از کشت و اتمام دوره رشدی، زمانی که همه اندام هوایی خشک نشده‌اند، عملکرد بیولوژیکی و بررسی قطر غده‌ها انجام شد. وزن غده تازه برای هر شرایط اندازه‌گیری شد و تعداد کل غده‌ها شمارش شد. غده‌های خوراکی (قطر بیش از ۵۵ میلی‌متر) شمارش و وزن شدند. میانگین عملکرد غده همه گیاهان در هر متر مربع از ردیف‌های میانی هر کرت (غده‌های که بیش از ۳۰ میلی‌متر قطر داشتند) به‌صورت کیلوگرم در هکتار گزارش شد. غده بذری در حدود ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر و غده خوراکی بالاتر از ۵۵ میلی‌متر می‌باشد. به‌منظور تعیین درصد ماده خشک غده، از غده‌های برداشت‌شده از هر کرت مقدار ۳۰۰ گرم غده به‌صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از کارد به قطعات مکعب شکلی به‌اندازه تقریبی یک سانتی‌متر مکعب بریده شده و به‌مدت ۴۸ ساعت در داخل آون تنظیم شده در دمای ۷۵ درجه سلسیوس تا تثبیت وزن آن‌ها خشکانده شد مجدداً توزین گردید. از طریق تقسیم کردن وزن خشک به وزن تر غده‌ها، درصد ماده خشک غده محاسبه گردید. عملکرد بیولوژیکی از رابطه (۱) تعیین می‌شود.

رابطه ۱) = عملکرد بیولوژیکی
عملکرد کل غده + عملکرد کل شاخساره

برای اندازه‌گیری وزن مخصوص ابتدا حدود ۳ تا ۵ کیلوگرم سیب‌زمینی از هر کلون در داخل بسته‌های توری پلاستیکی دقیقاً توزین کرده و سپس همان بسته با استفاده از تراوی خاص در داخل آب توزین می‌شود و وزن مخصوص آن از طریق رابطه ۲ محاسبه می‌شود:

جدول ۱. آنالیز تجزیه واریانس صفات عملکرد کل، عملکرد خوراکی، عملکرد بذری، تعداد غده با ۳۵-۵۵ میلی‌متر، تعداد غده کوچک تر از ۳۵ میلی‌متر، تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیکی، درصد ماده خشک، تعداد کل غده و وزن مخصوص در سیب زمینی تحت تنش خشکی.

Table 1. Analysis of variance for traits including total yield, edible yield, seed yield, number of tubers between 35-55 mm, number of tubers smaller than 35 mm, number of tubers larger than 55 mm, biological yield, dry matter percentage, total tuber number, and specific gravity in potato under water stress conditions.

S.O.V منابع تغییرات	df	Tuber with 35 mm diameter	Tuber with 35-55 mm diameter- mm	Tuber with 55 mm diameter	Seed yield (kg ha ⁻¹)	Ware yield (kg ha ⁻¹)	TN (unit)	Total yield (kg ha ⁻¹)	BY (%)	Dry matter (g/kg)	SG (g/cm ³)
G ژنوتیپ	10	32272**	160.06**	20.26**	0.401**	0.114**	67041**	135.85**	456.20**	24.430**	0.0008 ^{ns}
T تیمار	1	108122**	2815.72**	475.60**	7.04**	2.675**	826414**	6840.55**	165.34**	6.124 ^{ns}	0.092**
R تکرار	2	929	18.59	0.106	0.046	0.0006	857	1.28	0.47	2.149	0.0004
G×T ژنوتیپ × خشکی	10	37783**	455.06**	41.72**	1.137**	0.235**	140986**	190.96**	1017.32**	16.378**	0.0008 ^{ns}
Error خطا	41	954	31.63	0.525	0.079	0.003	2653	1.78	31.10	2.127	0.0006
CV%		10.2	9.1	6.08	27.87	8.89	6.42	18.90	32.21	19.91	2.06

ns, * and **: respectively, non-significant and significant at the 0.05 and 0.01 levels. ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد.

کیلوگرم در متر مربع) برای ژنوتیپ مافونا بود. بر اساس شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ هرمس با (۳۴۷/۳۳) کیلوگرم در مترمربع، (۱/۷) کیلوگرم در مترمربع، (۵۶۵/۳) کیلوگرم در مترمربع، (۱۱/۸۸) کیلوگرم در مترمربع و (۶۲/۸۲) کیلوگرم در مترمربع) به ترتیب بیشترین تعداد غده بین ۳۵-۵۵ میلی‌متر، وزن بذری، تعداد کل غده، عملکرد کل و عملکرد بیولوژیک را داشت. بیشترین عملکرد خوراکی و تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر به ترتیب مربوط به ژنوتیپ ۲-۶۹ (۰/۷۷) کیلوگرم در مترمربع و (۱۰/۳۹) کیلوگرم در مترمربع) بود. میزان تعداد غده، عملکرد کل، عملکرد بیولوژیک و وزن مخصوص در شرایط تنش به ترتیب به میزان ۲۳ درصد، ۵۴ درصد، ۴ و ۳ درصد کاهش میزان مشاهده شد. در حالی که تفاوت معنی‌داری در میزان ماده خشک در شرایط نرمال و تنش مشاهده نشد.

ارقام هرمس و ۲-۶۹ برای تعداد کل غده، وزن بذری و خوراکی، تعداد غده بین ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر، و تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ بیشترین نسبت به سایر ارقام نشان دادند. غده بسیار کوچک زمانی به دست آمد که از غده‌های بذری با اندازه کوچک‌تر به عنوان مواد کاشت استفاده شد. استفاده از غده‌های کوچک به عنوان ماده کاشت، عملکرد

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش، اثر متقابل ژنوتیپ و شرایط نرمال نشان داد که در شرایط نرمال ژنوتیپ سزار به ترتیب بیشترین عملکرد کل، عملکرد خوراکی، عملکرد بذری، تعداد غده بین ۳۵-۵۵ میلی‌متر، تعداد غده کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر، تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیکی، تعداد کل غده به ترتیب با (۵۴/۳۴) کیلوگرم در مترمربع، (۱/۶۷) کیلوگرم در مترمربع و (۲/۹۶) کیلوگرم در مترمربع، (۵۹/۲۶) کیلوگرم در مترمربع، (۵۸۳) کیلوگرم در مترمربع، (۲۳/۳۳) کیلوگرم در مترمربع، (۸۲/۵) کیلوگرم در مترمربع، (۱۲۱۵/۴۳) کیلوگرم در مترمربع) را داشت. همچنین مافونا بالاترین درصد ماده خشک را با میزان ۲۱/۸۸ سانتی‌متر نشان داد. کمترین تعداد غده بین ۳۵-۵۵ میلی‌متر، عملکرد بذری و تعداد کل غده مربوط به ژنوتیپ هرمس به ترتیب (۱۷/۰۲) کیلوگرم در مترمربع، (۰/۸۵) کیلوگرم در مترمربع و (۳۸۱/۶۲) کیلوگرم در مترمربع و کمترین غده کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر (۷۵/۰۱) کیلوگرم در مترمربع) مربوط به ژنوتیپ جلی بود (جدول ۲). همچنین کمترین عملکرد خوراکی، تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر و عملکرد کل به ترتیب (۱۶/۸۳) کیلوگرم، (۶/۸۳) کیلوگرم و (۲۰/۱۵)

در هرمس و ۶۹-۲ در مقایسه با سایر ارقام دیگر آن است که به دلیل حداکثر شاخص سطح برگ را دارا می‌باشند. نتایج مطالعه‌ای بر روی حداکثر شاخص سطح برگ در رقم مانیتو، کاروسو و فالوکا در مقایسه با آگریا و با نبا به طور معنی‌داری بیشتر بود (Zaki and Radwan, 2022). براساس مطالعه‌ای، در ارقام دیررس تأخیر در غده‌زایی، با افزایش میزان تولید غده‌های بذری همراه بود و در گروه ارقام زودرس با تسریع در غده‌زایی بر عملکرد سایز بذری افزوده می‌شود (Parvizi, 2008). در گروه آزمایشی زودرس، زمان پوشش کامل با زمان غده‌زایی همبستگی مثبت و معنی‌دار داشته است. اما در ارقام دیررس بین این دو صفت همبستگی معنی‌دار وجود نداشته‌است. بدین مفهوم که در ارقام زودرس تسریع در غده‌زایی، دوره رسیدن به پوشش کامل را کوتاه می‌کند. زمان رسیدن به غده‌زایی با میزان عملکرد کل در ارقام دیررس رابطه مثبت و معنی‌دار داشت. با این وصف در گروه آزمایشی دیررس تأخیر در غده‌زایی، پتانسیل عملکرد کل را افزایش می‌دهد (Parvizi, 2008).

وزن مخصوص و درصد ماده خشک و تعداد غده کمتر از ۳۵ میلی‌متر به ترتیب به ژنوتیپ سانته (۱/۰۷)، ۸۱-۱ (۲۸/۹۳) و آگریا (۲۸۲/۶۶) متعلق بود. ژنوتیپ پیکاسو در شرایط نرمال کمترین درصد ماده خشک (۱۶) و وزن مخصوص (۱/۰۶۶) را داشت. همچنین پایین‌ترین میزان عملکرد بیولوژیک مربوط به ژنوتیپ ۸۱/۱ بود.

غده‌های بسیار کوچک را به ترتیب ۳۹/۳۶ و ۵۶/۳۸ درصد نسبت به غده‌های بذری با اندازه متوسط و بزرگ افزایش داد (Asnake et al., 2023). این واقعیت که غده‌های کوچک دارای تعداد چشم کمتر و حداقل مواد غذایی ذخیره شده هستند. از رشد رویشی کمتری برخوردارند و در نتیجه غده‌های سیب‌زمینی با اندازه بسیار کوچک تولید می‌کند. نتایج مشابه همچنین نشان داد که گیاهانی که از غده‌های بذری با اندازه کوچک به دست می‌آیند تعداد چشم‌های کمی تولید می‌کنند و رشد رویشی را کاهش می‌دهند. انواع سیب‌زمینی از نظر ظرفیت تولید متفاوت هستند که با ترکیب ژنتیکی آنها مرتبط است (Saidi and Hajibarat, 2018, Tessema et al., 2020). برای به دست آوردن اطلاعات کامل، ارزیابی تحمل به خشکی در شرایط مزرعه ضروری است. چندین مطالعه اثرات تنش خشکی بر غده‌زایی را مستند کرده‌اند (Hirut et al., 2017; Hajibarat and Saidi, 2023). تفاوت در عملکرد غده با اندازه بسیار کوچک می‌تواند با ویژگی‌های ذاتی گونه‌های سیب‌زمینی مرتبط باشد. با توجه به گزارش Binalfew et al. (2015) اندازه غده سیب‌زمینی یک ویژگی کمی است. غده‌های بسیار کوچک معمولاً ارزش بازار پسندی پایینی دارند. استفاده از اندازه‌های مختلف غده بذری به عنوان ماده کاشت تأثیر قابل توجهی بر عملکرد غده با اندازه بسیار کوچک داشت. با توجه به نتایج سایر محققان این احتمال وجود دارد که افزایش عملکرد

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی در بررسی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی در شرایط نرمال.

Table 2. Comparison of the mean traits evaluated in the study of potato genotypes under normal conditions.

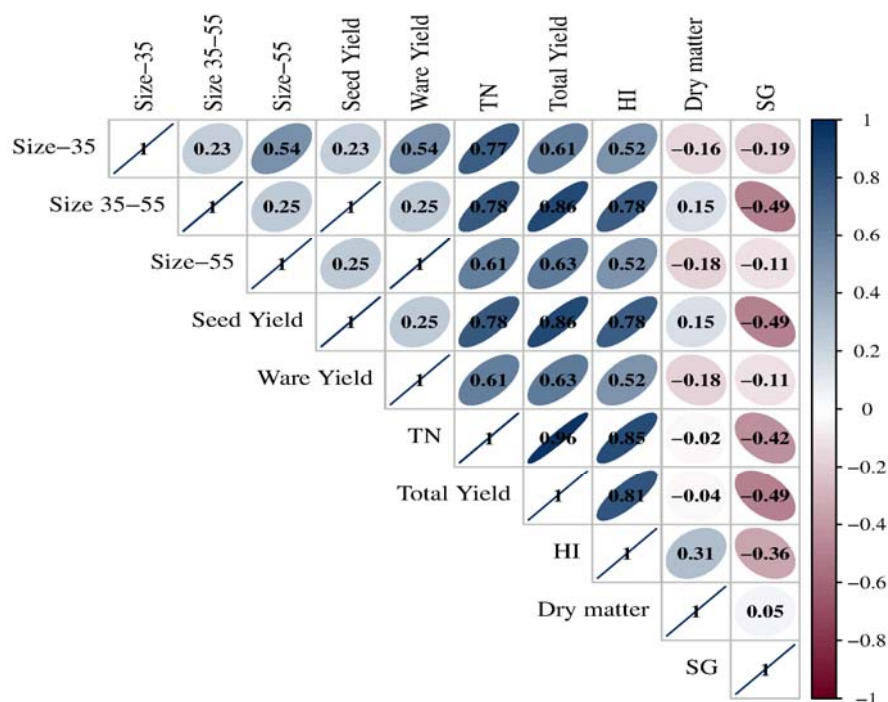
Irrigation treatment	Genotype	Tuber with 35 mm diameter	Tuber with 35-55 mm diameter	Tuber with 55 mm diameter	Seed yield (kg ha ⁻¹)	Ware yield (kg ha ⁻¹)	TN (unit)	Total yield (kg ha ⁻¹)	BY (%)	Dry matter (g/kg)	SG (g/cm ³)
نرمال Control	Milva	176.98 ^{ef}	38.47 ^{cd}	8.54 ^e	1.92 ^{cd}	0.64 ^e	541.43 ^{c-c}	28.05 ^d	31.08 ^{fi}	19.75 ^{b-h}	1.082 ^a
	Hermes	167.9 ^g	17.02 ^{hi}	10.54 ^{cd}	0.85 ^{hi}	0.79 ^{cd}	381.62 ^{ij}	20.65 ^g	26.49 ^{h-k}	21.16 ^{b-d}	1.089 ^a
	81-1	163.4 ^g	23.93 ^{fh}	10.87 ^{cd}	1.19 ^{fh}	0.815 ^b	433.20 ^{g-i}	21.17 ^{fg}	25.39 ^{h-k}	20.67 ^{b-f}	1.087 ^a
	Jelly	75.08 ^l	33.24 ^{c-e}	14.62 ^b	1.66 ^{c-e}	1.096 ^b	446.06 ^{e-i}	37.49 ^b	30.81 ^{fi}	16.64 ^{jk}	1.067 ^a
	Agria	257.05 ^c	35.56 ^{c-e}	10.66 ^{cd}	1.77 ^{ode}	0.80 ^{cd}	615.32 ^c	31.46 ^c	37.38 ^{e-g}	18.45 ^{fj}	1.075 ^a
	Casare	583.0 ^a	59.26 ^a	22.33 ^a	2.96 ^a	1.67 ^a	1215.43 ^a	54.34 ^a	82.5 ^a	18.13 ^{gk}	1.073 ^a
	Santé	240.2 ^{cd}	30.29 ^{c-f}	10.42 ^d	1.51 ^{c-f}	0.78 ^d	555.76 ^{c-c}	24.96 ^e	32.126 ^{fh}	20.399 ^{b-g}	1.083 ^a
	Savalan	174.01 ^g	27.24 ^{e-g}	11.69 ^c	1.36 ^{e-g}	0.87 ^c	475.79 ^{e-h}	24.56 ^c	29.43 ^{g-i}	20.94 ^{b-e}	1.088 ^a
	69-2	204.58 ^{de}	27.43 ^{e-g}	10.59 ^{cd}	1.37 ^{e-g}	0.79 ^{cd}	499.28 ^{d-g}	22.97 ^{ef}	27.52 ^{h-j}	21.53 ^{bc}	1.09 ^a
	Picasso	413.10 ^b	47.80 ^b	10.50 ^{cd}	2.39 ^b	0.787 ^{cd}	865.00 ^b	35.39 ^b	50.58 ^{cd}	16.00 ^k	1.066 ^a
	Marfona	164.3 ^g	38.98 ^{bc}	6.83 ^f	1.94 ^{bc}	0.51 ^f	519.40 ^{d-f}	20.15 ^g	31.62 ^{fh}	21.88 ^b	1.096 ^a

ارقام سیب‌زمینی تقریباً یکسان است در حالی که در برخی از ارقام تفاوت معنی‌داری مشاهده شده است (Fozouni and Aboutalebian, 2020).

همبستگی صفات عملکرد و صفات مورفولوژیکی

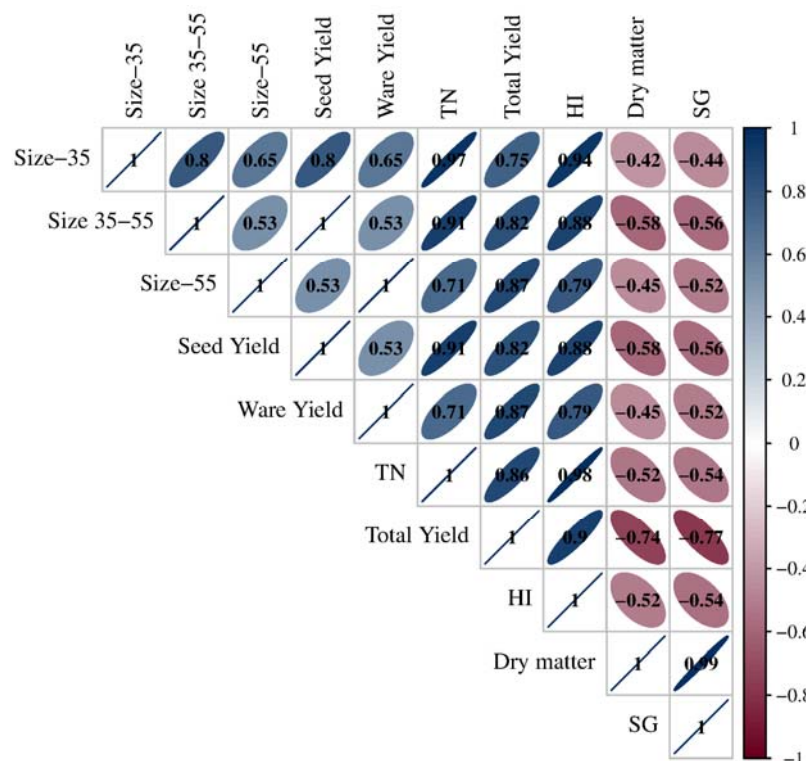
آنالیز همبستگی بین صفات عملکردی و مورفولوژیکی در شرایط نرمال و تنش خشکی می‌تواند معیار خوبی برای غربالگری بهترین ارقام و صفات مورد استفاده باشد. همچنین بررسی ضرایب همبستگی بین صفات باعث می‌شود تا بتوان در مورد شاخص‌های انتخاب غیر مستقیم و حذف صفات غیر مؤثر تصمیم‌گیری بهتری داشت. همبستگی بالای بین صفات می‌تواند حاکی از وجود پیوستگی ژنی یا ژن‌هایی با آثار چندگانه (پلیوتروپی) باشد. وجود این همبستگی‌ها این امکان را می‌دهند تا بتوان به‌طور غیر مستقیم و با دقت بیشتری عمل انتخاب را انجام داد (Rabiei et al., 2004). همبستگی بین عملکرد غده و صفات فنوتیپ در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است.

در این تحقیق وزن مخصوص به‌طور قابل توجهی در بسیاری از ارقام مورد ارزیابی کاهش یافت. رقم‌های سانه، جلی، ۸۱-۱، می‌لوا، پیکاسو و مارفونا درصد ماده خشک بیشتر از شرایط نرمال نشان دادند و تحت تنش خشکی، عملکرد بیولوژیک در هرمس، ۸۱-۱ و مارفونا بیشترین مقدار را داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که ارقام هرمس و ۶۹-۲ دارای شاخص تحمل به تنش بالاتر در مزرعه در مقایسه با شرایط نرمال دارند. کلون هرمس به‌لحاظ عملکرد کل، عملکرد بذری، تعداد غده بالاتر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش خشکی برتر از سایر ارقام بودند و کلون ۶۹-۲ براساس عملکرد کل، عملکرد خوراکی و تعداد غده بالاتر از ۵۵ میلی‌متر به‌عنوان ارقام متحمل‌تر شناسایی شدند. بر اساس وزن مخصوص، ژنوتیپ مارفونا در شرایط نرمال بیشترین میزان (۱/۰۹۶) را به خود اختصاص داد. میزان ماده خشک غده‌ها در ارقام مختلف سیب‌زمینی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت غده‌ها به‌ویژه در صنایع فرآوری و تهیه چیپس، خلال و پوره می‌باشد (Parvizi, 2008). مطالعه دیگر نشان داد که درصد ماده خشک بین



شکل ۱. آنالیز همبستگی بین صفات رشدی و عملکرد تحت شرایط نرمال.

Figure 1. Correlation analysis between growth and performance traits under normal conditions.



شکل ۲. آنالیز همبستگی بین صفات رشدی و عملکرد تحت شرایط خشکی.

Figure 2. Correlation analysis between growth and performance traits under drought conditions.

شد. بین عملکرد بذری و اندازه کمتر از ۳۵ میلی‌متر نیز همبستگی وجود داشت. تحت تنش نرمال همبستگی پایین یا عدم همبستگی بین وزن مخصوص و درصد ماده خشک در ارقام وجود دارد درحالی‌که در شرایط تنش خشکی همبستگی ۰/۹۹ بین درصد ماده خشک و وزن مخصوص مشاهده شد. گزارش شده‌است که وزن مخصوص تحت‌تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار دارد (Soboka et al., 2017). در شرایط تنش و نرمال وزن مخصوص با ابعاد غده و میزان غده همبستگی منفی دارد. ارتباط ابعاد غده با سایر صفات به میزان زیادی تحت‌تأثیر شرایط زراعی محل انجام آزمایش است. به‌نحوی که به عنوان نمونه در شرایطی که ازت بیش از اندازه در تولید سیب‌زمینی استفاده گردد این امر می‌تواند موجب بزرگ شدن و پوکی غده‌ها و به‌نوعی کاهش وزن مخصوص آنها گردد (Laurence et al., 1985) که در آن صورت روابط

همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد کل و تعداد کل غده، اندازه بذر بین ۳۵-۵۵، عملکرد بذری و عملکرد بیولوژیک در شرایط نرمال وجود دارد و پارامترها می‌توانند نقش مشابهی در انتخاب ژنوتیپ‌ها در این شرایط داشته باشند. در شرایط تنش خشکی، عملکرد کل با وزن خوراکی، وزن بذری، عملکرد بیولوژیک، تعداد کل غده، اندازه بذر ۳۵-۵۵، اندازه بذر کمتر از ۳۵ همبسته بودند. همچنین درصد ماده خشک و وزن مخصوص همبستگی داشتند. تحت شرایط نرمال بین وزن بذری و اندازه غده بین ۵۳-۵۵ میلی‌متر همبستگی کامل (۱) وجود داشت و همچنین بین عملکرد خوراکی و اندازه غده بیش از ۵۵ میلی‌متر نیز همبستگی کامل (۱) وجود داشت.

تحت تنش خشکی بین عملکرد بیولوژیکی و تعداد کل غده و عملکرد کل با عملکرد بذری و اندازه غده بین ۵۵ تا ۳۵ میلی‌متر همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده

بین صفات وابسته به عملکرد سیب‌زمینی و مخصوصاً اندازه غده‌های بزرگ نیز تغییر خواهد کرد. درصد ماده خشک با تمام صفات مرتبط با عملکرد در شرایط تنش نرمال و خشکی همبستگی منفی داشته‌است. یکی از عوامل دیگر در تعیین نوع مصرف سیب‌زمینی درصد ماده خشک می‌باشد که در فرآوری سیب‌زمینی اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا با افزایش ماده خشک فرآوری با کیفیت‌تر، زمان پخت کوتاه‌تر، بافت سیب‌زمینی بهتر و همچنین روغن کمتری در صورت استفاده برای چیپس و فرنچ فرایز مصرف می‌شود (Fathi et al., 2010). میزان ماده خشک غده در ارقام مختلف سیب‌زمینی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت غده‌ها به‌ویژه در صنایع فرآوری، چیپس و فرنچ فرایز دارد (Fathi et al., 2010). اگر یک عامل معینی مقدار کل ماده خشک را بیشتر از وزن کل غده افزایش دهد، درصد ماده خشک افزایش خواهد یافت. عموماً عواملی که رشد شاخ و برگ را تحریک می‌کنند، درصد ماده خشک را کاهش می‌دهند و عواملی که رشد غده را تحریک می‌کنند، درصد ماده خشک را افزایش می‌دهند (Rezaie and Soltani, 2004).

نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه دیگر بر روی اجزای عملکرد سیب‌زمینی مطابقت داشت (Boguszewska- Mankowska et al., 2022). همچنین بین صفات عملکرد بذری و تعداد کل غده و اندازه غده در گندم، ذرت و برنج همبستگی داشت که می‌تواند به‌عنوان پارامتر انتخابی برای گزینش استفاده شود (Beiragi et al., 2011; Hassan et al., 2023; Xu et al., 2023). مبتنی بر نتایج آزمایشی بر روی سیب‌زمینی نشان داد که افزایش عملکرد با میزان عملکرد بیولوژیکی همبستگی بالایی در سیب‌زمینی شیرین دارد (Indriani et al., 2021). همبستگی مثبت و معنی داری بین عملکرد غده و شاخص بیولوژیکی وجود داشت. براساس مطالعه‌ای که بر روی سیب‌زمینی انجام شد این همبستگی در مطالعه حاضر مشاهده شد (Zabihi-e- Mahmoodabad et al., 2011). وزن مخصوص غده‌های سیب‌زمینی یک معیار کیفیت مهم برای فرآوری سیب‌زمینی است. از آن به‌عنوان تخمینی از محتوای جامد یا ماده خشک غده‌ها استفاده می‌شود. هر چه مقدار ماده خشک بیشتر باشد،

محتوای آب کمتر و وزن مخصوص بالاتر است (Ndungutse et al., 2019). در شرایط تنش خشکی، در این پژوهش وزن مخصوص و ماده خشک ارتباط معنی‌داری ۰/۹۹ مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)

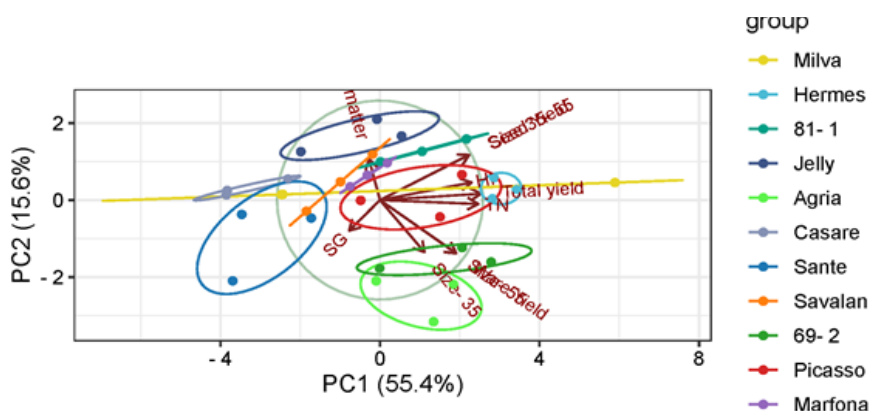
اگرچه آنالیز همبستگی به تعیین صفات مؤثر به‌ترتیب انتخاب غیرمستقیم ژنوتیپ‌های برتر کمک می‌کند، اما از سوی دیگر، تجزیه مؤلفه‌های اصلی تکنیک چند متغیره مناسبی در شناسایی و تعیین مؤلفه‌های اصلی مستقلی است که به‌طور جداگانه بر صفات گیاهی مؤثر هستند. بنابراین، تجزیه مؤلفه‌های اصلی همچنین به اصلاح‌کنندگان برای بهبود ژنتیکی صفاتی مانند عملکرد که وراثت‌پذیری کمی دارند، به‌ویژه در نسل‌های اولیه از طریق انتخاب غیرمستقیم برای صفات مؤثر بر عملکرد کمک می‌کند. با توجه به اینکه تجزیه مؤلفه‌های اصلی، مؤلفه‌ها مستقل و غیرهم‌بسته هستند، بنابراین نقش مهمی در شناسایی جنبه‌های مختلف صفات گزینش ارقام در برنامه‌های اصلاح نباتات ایفا می‌کنند (Rahimi et al., 2009). به‌منظور تعیین پراکنش ارقام و انتخاب ارقام برتر به‌همراه صفات مورد مطالعه از تجزیه مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی بر روی صفات عملکردی و مورفولوژیکی برای بررسی کامل عوامل مختلفی که در شاخص‌های خشکی نقش اساسی داشته، انجام گرفت. میزان نرخ سهم تجمعی از تغییرات کلی ۷۱٪ بود. باتوجه به آنالیز PCA توسط ماتریس همبستگی و روش تجزیه و تحلیل بای پلات، مشخص شد که از این پارامترها می‌توان برای ارزیابی پاسخ ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی به تنش خشکی در محیط‌های مختلف استفاده کرد. براساس تجزیه و تحلیل PCA، عملکرد کل با عملکرد بیولوژیکی؛ اندازه غده ۳۵-۵۵ میلی‌متر و تعداد کل غده مرتبط هستند و عملکرد خوراکی و اندازه غده بیشتر از ۵۵ میلی‌متر و کمتر از ۳۵ میلی‌متر با هم مرتبط هستند. همچنین براساس نتایج حاصل، هرمس و ۲-۶۹ نیز به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل شناسایی شدند (شکل ۳). پارامترهای مورفولوژیکی و عملکردی تجزیه و تحلیل شده ۷۱ درصد از تنوع کل را در دو مؤلفه اول توضیح دادند، که در آن ۵۵/۴ درصد تنها با

تجزیه کلاستر

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward برای ارقام سیب‌زمینی براساس صفات عملکردی و مورفولوژیک در شکل ۴ آورده شده است. بر اساس آنالیز تجزیه کلاس تر ۱۱ رقم به چهار گروه تقسیم شدند که گروه اول شامل هرمس، ۶۹-۲، ۸۱-۱، سانت و ساوالان در یک خوشه قرار گرفتند. گروه ۲ شامل مارفونا و می‌لوا بوده و گروه سوم شامل پیکاسو، آگریا و جلی می‌باشد و سزار نیز در گروه جداگانه قرار گرفت که گروه چهارم محسوب شد (شکل ۴). نتایج حاصل از تجزیه مولفه اصلی و تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ارقام متحمل و حساس در تنش خشکی با الگوی مشابهی در یک گروه قرار گرفتند. در گروه اول هرمس، ۶۹-۲ که با ژنوتیپ سانت که متحمل خشکی است در یک گروه قرار گرفته‌اند. براساس نتایج مطالعه‌ای که بر روی تنش خشکی سیب‌زمینی در ارقام سانت و آگریا به عنوان رقم متحمل و حساس به خشکی به ترتیب انجام شد، مشاهده شد که بیان ژن‌های افزایش یافته در مسیرهای سیگنالینگ تحمل به خشکی در رقم سانت بیش از رقم حساس در آگریا بوده است (Aksoy et al., 2024). مطالعه دیگر نشان داد که آگریا ژنوتیپی حساس به خشکی می‌باشد. در عین حال این رقم دارای عملکرد بالا در شرایط نرمال می‌باشد (Hassanpanah, 2010). این نتایج به انتخاب غیر مستقیم ارقام در محیط‌های مختلف کمک می‌کند.

PC1 توضیح داده می‌شود که دلیل آن مشارکت همه پارامترهای عملکرد و مورفولوژیکی است، به جز ماده خشک و وزن مخصوص.

شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین تأثیر و تغییر مربوط به صفات عملکرد و مورفولوژیکی می‌باشد و میزان تأثیر ماده خشک و وزن مخصوص در میزان تغییرات به مراتب کمتر بوده است. در نتیجه برای انتخاب ارقام برای برنامه اصلاحی باید به صفات عملکردی توجه ویژه‌ای در مقایسه با صفات کیفی مانند وزن مخصوص ماده خشک شود. همچنین محققان گزارش کردند که که درصد ماده خشک یک ژنوتیپ تحت شرایط محیطی مختلف تغییر می‌نماید، بنابراین درصد ماده خشک برای یک رقم خاص در شرایط اقلیمی متفاوت ثابت نمی‌ماند (Mousapour, 2005). از این نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که متغیرهای مهم در نظر گرفته شده در تحقیق حاضر با توجه به صفات زراعی عبارتند از: عملکرد غده، عملکرد بذری، عملکرد بیولوژیکی. این متغیرهای فوق ممکن است برای انتخاب مؤثر والدین در طول برنامه هیبریداسیون برای گسترش پایه ژنتیکی در جمعیت و همچنین برای ایجاد لاین‌های برتر در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، انتخاب ژنوتیپ‌های دارای بیشترین میزان عملکرد غده و آن اجزا باید به عنوان یکی از بهترین استراتژی‌های اصلاحی برای بهبود ژنتیکی عملکرد غده در سیب‌زمینی توصیه شود. این نتایج توسط بسیاری از محققان تأکید شده است (Sattar et al., 2011; Ahmadzadeh and Felenji, 2011; Lohani et al., 2012; Xu et al., 2023).



شکل ۳. آنالیز تجزیه مولفه‌های اصلی برای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی و صفات رشدی و عملکردی.

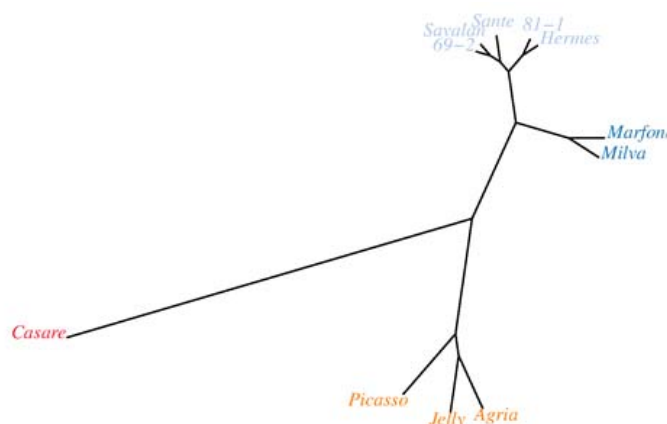
Figure 3. Principal component analysis for potato genotypes and growth and performance traits.

تغییرات آب و هوایی در طول سال‌های اخیر قابل مشاهده است. پیش بینی می‌شود در طول تنش خشکی کیفیت غده به شدت تحت خشکسالی قرار گیرد، بدین دلیل درک مسیرهای دقیق تحمل به خشکی در سطوح مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برای بهبود عملکرد غده ضروری به نظر می‌رسد. PCA تکنیکی است که صفات گیاهی را شناسایی می‌کند که بیشترین نقش را در تنوع مشاهده شده در یک گروه از ژنوتیپ‌ها داشته و کاربرد عملی آن در انتخاب لاین‌های والدینی برای اهداف اصلاحی دارد (Ahmadizadeh and Felenji, 2011). واریانس جمعی بیش از بیش از ۸۴ درصد توسط دو محور اول با مقادیر ویژه بیش از ۱,۰ نشان داد که صفات شناسایی شده در این محورها تأثیر زیادی بر فنوتیپ ارقام از خود نشان می‌دهند و می‌توان به‌طور مؤثر برای انتخاب بین آنها استفاده کرد. Cardi و همکاران (۲۰۰۲) با تجزیه و تحلیل ارقام سیب‌زمینی تتراپلوئید به مؤلفه‌های اصلی، ۱۰ مؤلفه اصلی را با مقدار توجیهی ۹۸,۹ درصد شناسایی کردند.

Tairo و همکاران (۲۰۰۸) همچنین از PCA برای مطالعه تنوع در میان توده‌های بومی تانزانیا استفاده کردند و تنوع ژنتیکی پایینی را در میان آنها یافتند. Lahoni و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که ۱۱ مؤلفه اول ۹۶/۲۵ درصد تغییرات را توضیح دادند. حداکثر تغییرات ۱۸/۷۸ درصد با اولین بردار نهفته و سپس ۱۶/۳۴ درصد (بردار دوم) و ۱۳/۳۰ درصد (بردار سوم) توضیح داده شد.

براساس آنالیز تجزیه خوشه‌ای ارقامی که به لحاظ قرابت ژنتیکی مشابه هستند در یک گروه قرار می‌گیرند و آنهایی در گروه‌های دورتر و جداگانه قرار می‌گیرند. بیشترین تفاوت به لحاظ ژنتیکی را دارا هستند. در نتیجه از ارقام دورتر برای برنامه دو رگ‌گیری نیز استفاده می‌شود. در این پژوهش ارقام هرمس و ۶۹-۲، ۸۱-۱، ساوالان و سائته در یک گروه قرار گرفته که سائته و ساوالان در مطالعات مختلف به عنوان ارقام متحمل به خشکی معرفی شدند با ارقام پیکاسو، جلی و آگریا فاصله ژنتیکی زیادی دارند. در نتیجه از این گروه‌های در برنامه تلاقی و هتروزیس می‌توان استفاده کرد. همچنین در بین صفات عملکردی در شرایط تنش خشکی رقم هرمس و ۶۹-۲ بالاترین مقدار در میزان عملکرد غده و بذری به خود اختصاص دادند در حالی که رقم جلی پایین‌ترین میزان تعداد غده را دارا بود. این نتایج حاکی از آن است که آنالیز فیلوژنتیکی و تجزیه مؤلفه‌های اصلی به‌خوبی توانسته تفاوت بین ارقام را شناسایی کند.

براساس نتایج مطالعه حاضر رقم هرمس و ۶۹-۲ متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند که تحت تنش خشکی عملکرد کل و بیولوژیکی بالاتری داشتند. همچنین از تعداد غده بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر بیشتری نیز برخوردار بودند که بازار پسندی این دو رقم تحت تنش خشکی نیز بیشتر خواهد بود. از آنجایی که کشت سیب زمینی به مناطق محدود آب در حال گسترش است و



شکل ۴. تجزیه کلاس‌تر ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی تحت تنش خشکی براساس صفات رشدی و عملکردی.

Figure 4. Cluster analysis of potato genotypes under drought stress based on growth and performance traits.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

خشکسالی، عملکرد کل و قابل فروش تمامی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی آزمایش شده را کاهش داد. کلون هرمس به لحاظ عملکرد کل، عملکرد بذری، تعداد غده بالاتر از ۵۵ میلی‌متر، عملکرد بیولوژیک در شرایط تنش خشکی برتر از سایر ارقام بودند و کلون ۶۹-۲ براساس عملکرد کل، عملکرد خوراکی و تعداد غده بالاتر از ۵۵ میلی‌متر به‌عنوان ارقام متحمل‌تر شناسایی شدند (جدول ۳). کلون‌های هرمس و ۶۹-۲ کاهش عملکرد کمتر و شاخص حساسیت به خشکی کمتری را در شرایط خشکی نشان دادند، اما برای تأیید این نتیجه آزمایش‌های بیشتری برای ارزیابی پاسخ فیزیولوژیکی این ژنوتیپ‌ها به شرایط مختلف آب، خاک و اقلیمی مورد نیاز است. براساس مطالعه حاضر، آنالیز PCA و کلاس‌تر تحت تنش خشکی انجام شد و ارقام هرمس و ۶۹-۲ به‌عنوان متحمل‌ترین براساس عملکرد بالاتر و صفات مورفولوژیکی بهتر در شرایط تنش خشکی انتخاب شدند. انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل بر اساس ترکیبی از شاخص‌های مورفولوژیکی و عملکردی می‌تواند معیارهای مفیدی برای اصلاح ژنتیکی انواع ارقام سیب‌زمینی متحمل به خشکی فراهم کند. نتایج تجزیه

کلاس‌تر و تجزیه و تحلیل PCA تقریباً مشابه بوده و ژنوتیپ‌های هرمس و ۶۹-۲ در یک گروه قرار گرفتند و می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل معرفی شوند. نتایج این دو برای تأیید ساختار جمعیت و همچنین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، از بررسی فوق می‌توان نتیجه گرفت که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در ارقام سیب‌زمینی، شناسایی صفات مطلوب و ارتباط آنها با عملکرد و طبقه‌بندی مطمئن ژنوتیپ‌ها را تسهیل می‌کند. تغییرات نسبتاً بیشتری در صفاتی که روی مؤلفه اول قرار داشتند مشهود بود. متغیرهای فوق ممکن است برای انتخاب مؤثر والدین در طول برنامه هیبریداسیون در نظر گرفته شوند. یک برنامه هیبریداسیون خوب را می‌توان با انتخاب رقم هرمس و ۶۹-۲ از شکل‌های بای پلات آغاز کرد. که با استفاده از این اطلاعات می‌توان ژنوتیپ‌های اصلی و ارتباط با صفات مورفولوژیکی را با کاربرد احتمالی برای اهداف اصلاحی خاص شناسایی شود. بنابراین، یک برنامه بهبود شامل هرمس و ۶۹-۲ ممکن است جداسازهای متجاوز و هتروژیک ایجاد کند، به‌طوری که تاریخ انتخاب قبلی سازگاری متقابل را می‌توان برای انتخاب ژنوتیپ‌ها برای صفات مختلف در این ارقام نادیده گرفت.

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی در بررسی بر ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی در شرایط خشکی

Table 3. Comparison of the mean traits evaluated in the study of potato genotypes under drought conditions.

Irrigation treatment	Genotype	Tuber with 35 mm diameter	Tuber with 35-55 mm diameter	Tuber with 55 mm diameter	Seed (yield kg ha ⁻¹)	Ware (yield kg ha ⁻¹)	TN (Unit)	Total (yield kg ha ⁻¹)	HI (%)	Dry matter (g/kg)	SG (g/cm ³)
Drought	Milva	102.2 ^{h-j}	13.89 ^{hi}	4.82 ^{gh}	0.69 ^{hi}	0.36 ^{gh}	247.25 ^{kl}	6.11 ^k	17.58 ^{jk}	20.13 ^{a-h}	0.99 ^b
	Hermes	247.33 ^{cd}	34.19 ^{c-e}	6.83 ^f	1.70 ^{e-e}	0.51 ^f	565.33 ^{cd}	11.88 ^h	62.82 ^b	19.93 ^{b-h}	1.0002 ^b
	81-1	159.0 ^{e-h}	27.35 ^{e-g}	6.83 ^f	1.36 ^{e-g}	0.51 ^f	424.00 ^{g-i}	9.75 ^{hi}	52.89 ^c	28.938 ^a	1.0002 ^b
	Jelly	106.0 ^{ij}	29.63 ^{d-g}	3.89 ^{hi}	1.48 ^{d-g}	0.29 ^{hi}	365.83 ^{ij}	9.47 ^{ij}	22.32 ^{jk}	19.40 ^{e-i}	1.0004 ^b
	Agria	282.66 ^c	15.95 ^{hi}	8.72 ^e	0.79 ^{hi}	0.65 ^e	473.9 ^{e-h}	9.99 ^{hi}	30.37 ^{g-i}	17.21 ^{i-k}	1.0008 ^b
	Casare	123.66 ^{g-j}	9.11 ⁱ	3.42 ⁱ	0.45 ⁱ	0.25 ⁱ	220.83 ^l	5.43 ^k	18.46 ^{jk}	20.47 ^{b-g}	1.0006 ^b
	Santé	123.66 ^{gi}	9.11 ⁱ	5.50 ^g	0.45 ⁱ	0.41 ^g	236.98 ^l	5.41 ^k	18.09 ^k	20.67 ^{b-f}	1.070 ^a
	Savalan	132.5 ^{fi}	20.51 ^{gh}	4.83 ^{gh}	1.025 ^{gh}	0.36 ^{gh}	328.98 ^{jk}	7.43 ^{jk}	33.156 ^{e-h}	18.88 ^{d-j}	1.0009 ^b
	69-2	159.0 ^{e-h}	22.79 ^{f-h}	10.39 ^d	1.13 ^{f-h}	0.77 ^d	416.24 ^{g-i}	10.44 ^{hi}	39.80 ^{ef}	17.79 ^{b-k}	1.0003 ^b
	Picasso	123.6 ^{gi}	27.35 ^{e-g}	7.78 ^{ef}	1.36 ^{e-g}	0.58 ^{ef}	395.98 ^{b-j}	9.80 ^{hi}	41.93 ^{de}	18.74 ^{e-j}	1.0002 ^b
	Marfona	159.0 ^{e-h}	23.93 ^{f-h}	4.83 ^{gh}	1.19 ^{f-h}	0.36 ^{gh}	381.98 ^{ij}	8.88 ^{ij}	32.268 ^{e-h}	20.163 ^{b-h}	1.0004 ^b

ns, * and **: respectively, non-significant and significant at the 0.05 and 0.01 levels. ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Ahmadizadeh, M., & Felenji, H. (2011). Evaluating diversity among potato cultivars using agromorphological and yield components in fall cultivation of Jiroft area. *American Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 11(5), 655-662.
- Aksoy, E., Yavuz, C., Yagiz, A. K., Unel, N. M., & Baloglu, M. C. (2024). Genome-wide characterization and expression analysis of GATA transcription factors under combination of light wavelengths and drought stress in potato. *Plant Direct*, 8(4), e569. <https://doi.org/10.1002/pld3.569>.
- Asnake, D., Alemayehu, M., & Asredie, S. (2023). Growth and tuber yield responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties to seed tuber size in northwest highlands of Ethiopia. *Heliyon*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14586>
- Beiragi, M. A., Ebrahimi, M., Mostafavi, K., Golbashy, M., & Khorasani, S. K. (2011). A study of morphological basis of corn (*Zea mays* L.) yield under drought stress condition using correlation and path coefficient analysis. *Journal of Cereals and Oilseeds*, 2(2), 32-37.
- Binalfew, T., Dechassa, N., & Tana, T. (2015). Influence of plant spacing on seed and ware tuber production of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars grown in Eastern Ethiopia. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 4(3), 11-17. <http://dx.doi.org/10.4314/star.v4i3.2>
- Boguszewska-Mańkowska, D., Zarzyńska, K., & Wasilewska-Nascimento, B. (2022). Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant Shoot and Root Changes under Abiotic Stresses—Yield Response. *Plants*, 11(24), 3568. <https://doi.org/10.3390/plants11243568>
- Cardi, T., Mazzei, M., & Frusciante, L. (2002). Field variation in a tetraploid progeny derived by selfing a *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid: a multivariate analysis. *Euphytica*, 124, 111-119. <https://doi.org/10.3390/plants11243568>
- Dahal, K., Wang, J., Martyn, G. D., Rahimy, F., & Vanlerberghe, G. C. (2014). Mitochondrial alternative oxidase maintains respiration and preserves photosynthetic capacity during moderate drought in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*, 166(3), 1560-1574. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247866>
- Deblonde, P. M. K., & Ledent, J. F. (2001). Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *European Journal of Agronomy*, 14(1), 31-41. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00081-2)
- Devaux, A., Goffart, J. P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V., & Hareau, G. (2021). The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable agri-food systems. *Potato Research*, 64(4), 681-720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>
- Eid, M. A., Abdel-Salam, A. A., Salem, H. M., Mahrous, S. E., Seleiman, M. F., Alsadon, A. A., ... & Ibrahim, A. A. (2020). Interaction effects of nitrogen source and irrigation regime on tuber quality, yield, and water Use efficiency of *Solanum tuberosum* L. *Plants*, 9(1), 110. <https://doi.org/10.3390/plants9010110>
- Evers, D., Lefevre, I., Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J. F., Rosales, R. O. G., ... & Schafleitner, R. (2010). Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of experimental botany*, 61(9), 2327-2343. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq060>
- FAOSTAT, F. (2020). Statistical Database: Food and Agriculture Organization of the United Nations, (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>)
- Fathi, M., Asghari, R., Valizadeh, M., Aharizad, S., & Hassanpanah, D. (2010). Evaluation of advanced clones from true potato seed. *Journal of Agricultural Science*, 2(19), 207-214.
- Fozouni, A. A., & Aboutalebian, M. A. (2020). Comparison of Leaf Area Index, Quantitative and Qualitative Characteristics of 13 New Potato Cultivars under semi-arid and cold Climatic Conditions of Razan. *Journal of Crops Improvement*, 22(4), 645-656.
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R., & Watt, F. M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1-and EGF-dependent signalling pathways. *Journal of cell science*, 116(15), 3227-3238. <https://doi.org/10.1242/jcs.00610>
- Hajibarat, Z., & Saidi, A. (2023). Filamentation temperature-sensitive (FtsH); key player in response to multiple environmental stress conditions and developmental stages in potato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(7), 4223-4239. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10885-x>

- Hassan, M. A., Dahu, N., Hongning, T., Qian, Z., Yueming, Y., Yiru, L., & Shimei, W. (2023). Drought stress in rice: morpho-physiological and molecular responses and marker-assisted breeding. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1215371. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1215371>
- Hassanpanah, D. (2010). Evaluation of potato advanced cultivars against water deficit stress under in vitro and in vivo condition. *Biotechnology*, 9(2), 164-169.
- Hirut, B., Shimelis, H., Fentahun, M., Bonierbale, M., Gastelo, M., & Asfaw, A. (2017). Combining ability of highland tropic adapted potato for tuber yield and yield components under drought. *PLoS one*, 12(7), e0181541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181541>
- Indriani, F. C., Restuono, J., Rahajeng, W., Patriyawaty, N. R., Ashari, S., Sundari, T., & Mejaya, M. J. (2021, November). Identification of the genetic diversity of sweet potato germplasm based on quantitative morphological characters. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 911, No. 1, p. 012006). IOP Publishing.
- Laurence, R. C. N., Armour, J. D., Shepherd, R. K., Loader, L. R., & Dwyer, M. J. (1985). Nitrogen fertilizer requirements of irrigated potatoes on the Atherton Tableland, North Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 25(4), 954-958.
- Lohani, M., Singh, D., & Singh, J. P. (2012). Genetic diversity assessment through principal component analysis in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Vegetable Science*, 39(02), 207-209.
- Minhas, J. S. (2012). Potato: production strategies under abiotic stress. *Improving crop resistance to abiotic stress*, 1155-1167. <https://doi.org/10.1002/9783527632930.ch45>
- Mousapour, Y. (2005). Evaluation of quantitative and qualitative characteristics of potato new cultivars in spring cultivation. Project final report, Seed and plant Improvement Institute.
- Nasir, M. W., & Toth, Z. (2022). Effect of drought stress on potato production: A review. *Agronomy*, 12(3), 635. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030635>
- Ndungutse, V., Ngoda, P. M. N., Vasanthakalam, H., Shakala, E. K., & Faraj, A. K. (2019). Processing quality of selected potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars grown in Rwanda. <http://41.89.96.81:8080/xmlui/handle/123456789/2650>
- Obidiegwu, J. E., Bryan, G. J., Jones, H. G., & Prashar, A. (2015). Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in plant science*, 6, 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00542>
- Parvizi, Kh. (2008). Study of quantitative and qualitative traits of new early and late potato cultivars in spring cultivation. *Agriculture and Horticulture*. 79, 1-11.
- Pedreschi, F., & Moyano, P. (2005). Effect of pre-drying on texture and oil uptake of potato chips. *LWT-Food Science and technology*, 38(6), 599-604. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.008>
- Rahimi, M., Ramezani, M., & Rabiee, B. (2009). Identification of elite lines and hybrids of rice using factor analysis.
- Rezaie, A., & Soltani, A. (2004). Introduction to potato production. Jahad Daneshgahi of Tehran University Press. <https://doi.org/10.22034/saps.2021.44371.2629>
- Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2018). In silico analysis of floral MADS-BOX gene in *Brachypodium distachyon*. *Bionature*, 366-375.
- Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2020). Computational study of environmental stress-related transcription factor binding sites in the promoter regions of maize auxin response factor (ARF) gene family. *Notulae Scientiae Biologicae*, 12(3), 646-657. <https://doi.org/10.15835/nsb12310823>
- Sattar, M. A., Uddin, M. Z., Islam, M. R., Bhuiyan, M. K. R., & Rahman, M. S. (2011). Genetic divergence in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36(1), 165-172.
- Soboka, S., Asefa, G., & Beriso, M. (2017). Effect of varieties and growing environments on tuber yield, nutritional and process quality of potato grown in bale highlands, south eastern Ethiopia. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology (IJARIT)*, 7(2), 18-21. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.305434>
- Tairo, F., Mneney, E., & Kullaya, A. (2008). Morphological and agronomical characterization of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] germplasm collection from Tanzania. *African Journal of Plant Science*, 2(8), 077-085.
- Tang, R., Niu, S., Zhang, G., Chen, G., Haroon, M., Yang, Q., ... & Li, X. Q. (2018). Physiological and growth responses of potato cultivars to heat stress. *Botany*, 96(12), 897-912. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0125>
- Tessema, L., Mohammed, W., & Abebe, T. (2020). Evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties for yield and some agronomic traits. *Open Agriculture*, 5(1), 63-74. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0006>

- Xu, Z., Lai, X., Ren, Y., Yang, H., Wang, H., Wang, C., ... & Zhang, Y. (2023). Impact of drought stress on yield-related agronomic traits of different genotypes in spring wheat. *Agronomy*, 13(12), 2968. <https://doi.org/10.3390/agronomy13122968>
- Zabihi-e-Mahmoodabad, R., Jamaati-e-Somarin, S., Khayatnezhad, M., & Gholamin, R. (2011). Correlation of tuber yield whit yield components of potato affected by nitrogen application rate in different plant density. *Advances in Environmental Biology*, 131-136.
- Zaki, H. E., & Radwan, K. S. (2022). Response of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to drought stress under in vitro and field conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00266-z>
- Zarzyńska, K., & Pietraszko, M. (2017). Possibility to predict the yield of potatoes grown under two crop production systems on the basis of selected morphological and physiological plant indicators. <https://doi.org/10.17221/101/2017-PSE>
- Zhang, H., Chen, X., Xue, D., Zhang, W., Li, F., Teng, A., ... & Ba, Y. (2024). Dry matter accumulation, water productivity and quality of potato in response to regulated deficit irrigation in a desert oasis region. *Plants*, 13(14), 1927. <https://doi.org/10.3390/plants13141927>

Investigation of the expression changes of some genes involved in the biosynthesis of thymoquinone upon methyl jasmonate treatment in black cumin (*Nigella sativa* L.)

Masoomeh Karami Hoomani¹, Mohammad Majdi¹(ORCID: 0000-0001-6959-4845), Ghader Mirzaghaderi¹

1. Department of Plant Production and Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Correspondence:
Mohammad Majdi
Email: majdi60@gmail.com

Received: 14, Dec. 2024
Accepted: 19, Jan. 2025

How to cite:

Karami Hoomani, M., Majdi, M., & Mirzaghaderi, Gh. (2025). Investigation of the expression changes of some genes involved in the biosynthesis of thymoquinone upon methyl jasmonate treatment in black cumin (*Nigella sativa* L.). *Crop Biotechnology*, 14 (3), 69-82. (DOI: [10.30473/cb.2025.72958.1993](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72958.1993))

ABSTRACT

Thymoquinone, the main compound of black cumin(*Nigella sativa*) oil, has numerous therapeutic effects. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductase (*DXR*) and geranylgeranyl diphosphate synthase (*GTS*) are two key genes in the biosynthetic pathway of thymoquinone. In this study, the expression changes of genes *DXR* and *GTS* were investigated in two ecotypes of Iranian black cumin with the highest and lowest levels of thymoquinone, including ecotype H (Semirum) and ecotype K (Eqolid), as well as the effect of methyl jasmonate treatment on the expression of these genes. Sampling was conducted at 12, 24, and 48 hours after the application of methyl jasmonate at a concentration of 100 µM during the immature seed stage. Gene expression was analyzed using RT-qPCR. The results at a 5% significance level showed that the expression of both genes in ecotype H is significantly higher than in ecotype K. The expression level of the *GTS* gene in both ecotypes was influenced by methyl jasmonate, initially decreasing in the first 12 hours, then gradually increasing and reaching a maximum at 48 hours, which was significantly different from the control. However, the expression of the *DXR* gene varied between the two ecotypes: in ecotype H, the expression of this gene significantly decreased, reaching its minimum at 48 hours, while in ecotype K, it initially increased at 12 hours and then decreased to a minimum at 48 hours. Overall, these findings indicate that the gene expression of *GTS* and *DXR* genes involved in the thymoquinone biosynthetic pathway in *N. sativa* is genotype-dependent, and methyl jasmonate treatment can effectively induce the expression of these genes, depending on the genotype and time which consequently can increase the thymoquinone content.

KEYWORDS

Nigella sativa , thymoquinone, methyl jasmonate, gene expression



«مقاله پژوهشی»

بررسی تغییرات بیان برخی ژن های دخیل در ییوستتر تیمو کینون تحت اثر متیل
حاسمونات در سا هدا نه (*Nigella sativa*)

معصومه کریم، ہومانی،^۱ محمد محمدی (الزکید: ۴۸۴۵-۶۹۵۹-۱-۰۰۰-۰۰۰)، قادر میرزا قادری^۱

۱. گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

تویسنده مسئول:

محمد مجدی

ایمانامہ: majdi60@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۴

تاریخ مذکور: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰

استناد به این مقاله:

کرمی هومانی؛ معصومه، مجدی، محمد و میرزاقادری،
 قادر (۱۴۰۳). بررسی تغییرات بیان برخی ژن‌های دخیل
 در بیوسنتز تیموکینون تحت اثر متیل‌جاسمونات در
 سیاه‌دانه (*Nigella sativa*). فصلنامه علمی
 رست فناوری گیاهان، ۱۴ (۳)، ۸۲-۶۹.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72958.1993](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72958.1993))

چکیده

تیموکینون، ترکیب اصلی روغن بذر سیاهدانه، اثرات درمانی متعددی دارد. ۱- دی‌اکسی زایلوز-۵- فسفات ردونکاز (DXR) و گاما‌ترپین سنتاز (GTS) دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی تیموکینون هستند. در این پژوهش تغییرات بیان ژن‌های DXR و GTS در دو اکوتیپ سیاهدانه ایرانی با بیشترین و کمترین میزان تیموکینون شامل اکوتیپ H (سمیرم) و اکوتیپ K (اقلید) و نیز تأثیر تیمار متیل‌جاسمونات بر بیان این ژن‌ها بررسی شد. نمونه‌برداری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و در مرحله‌ی بذر نارس انجام شد. بیان ژن‌ها با استفاده از RT-qPCR بررسی گردید. نتایج در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد بیان هر دو ژن در اکوتیپ H به صورت معناداری بالاتر از اکوتیپ K است. همچنین میزان بیان ژن GTS در هر دو اکوتیپ تحت تیمار متیل‌جاسمونات پس از کاهش بیان در ۱۲ ساعت اول به تدریج افزایش و در ۴۸ ساعت به حداکثر رسید، که نسبت به شاهد بسیار معنا دار بود. میزان بیان ژن DXR تحت اثر متیل‌جاسمونات در دو اکوتیپ متفاوت بود. در اکوتیپ H، بیان ژن DXR به طور معناداری نسبت به شاهد کاهش یافت و حداقل میزان بیان آن در ۴۸ ساعت مشاهده شد. در اکوتیپ K، بیان ژن DXR ابتدا در ۱۲ ساعت به طور معناداری افزایش پیدا کرد و سپس طی یک روند کاهشی در ۴۸ ساعت به حداقل رسید. این نتایج نشان داد که بیان ژن‌های GTS و DXR مسیر بیوسنتزی تیموکینون سیاهدانه تحت تأثیر ژنوتیپ قرار دارد، همچنین متیل‌جاسمونات می‌تواند در القای بیان این ژن‌ها مؤثر باشد و این تأثیر تحت اثر ژنوتیپ و زمان قرار دارد.

واژه‌های کلیدی

سیاہدانہ، تیمو کینون، متیل جاسمونات، بیان ژن.

مقدمه

گیاهان دارویی به دلیل کاربردهای درمانی خود از زمان‌های قدیم مورد توجه قرار گرفته‌اند و امروزه نقش قابل توجهی در سیستم‌های درمان ایفا می‌کنند، به‌طوری‌که بسیاری از کشورهای جهان، که تقریباً دو سوم جمعیت را شامل می‌شوند، به دلیل مقبولیت فرهنگی بیشتر، سازگاری بهتر با بدن و عوارض جانبی کمتر به داروهای گیاهی وابسته‌اند (Sandberg, 2001; Oladeji., 2016; Mbuni et al., 2020).

گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از خانواده‌ی آلاله^۱ است. سیاهدانه گیاهی علفی، یک‌ساله، دیپلوئید و دولپه می‌باشد، که در خاورمیانه، افریقای شرقی و هند به منظور درمان سردرد، آسم، تب، برونشیت، روماتیسم، آنفولازا، دفع کرم‌های روده و اگرما مورد استفاده قرار گرفته است. دانه‌های سیاهدانه حاوی روغن، پروتئین، آلکالوئید، ساپونین و اسانس هستند که هر کدام اثرات زیستی خاصی را سبب می‌شوند (Burits et al., 2000; Ali et al., 2003; Yar et al., 2008). ترکیب اصلی روغن فرار در دانه‌های سیاهدانه را مونوترپن‌ها^۲ تشکیل می‌دهند. مونوترپن‌ها در گیاهان از طریق مسیر متیل-ارتریترول-فسفات^۳ (MEP) که در پلاستیدها قرار دارد بیوسنتز می‌شوند. ابتدا پیروات^۴ و دی‌گلیسرآلدئید-۳-فسفات^۵ با یکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات^۶ توسط آنزیم ۱-دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات سنتاز^۷ تولید می‌شود، که تحت اثر آنزیم ۱-دی‌اکسی زایلوز^۵-فسفات ردوکتاز^۸ (DXR) به سی‌متیل اریترول^۹ فوسفات^۹ تبدیل می‌گردد. این ماده به وسیله‌ی یک سری واکنش‌ها، دی‌متیل آلیل‌دی‌فسفات^{۱۰} (DMAPP) و ایزوپنتیل فوسفات^{۱۱} (IPP) که قابل تبدیل به

یکدیگر هستند را ایجاد می‌کند. با اتصال این دو ماده توسط آنزیم ژرانیل دی‌فسفات سنتاز^{۱۲}، ژرانیل دی‌فسفات^{۱۳} پیش‌ساز عمومی مونوترپن‌ها سنتز می‌شود، که این ماده توسط آنزیم‌های مونوترپن سنتازی، به مونوترپن‌های مختلف تبدیل می‌گردد (Burke et al., 1999; Lichtenthaler, 2009; Mir et al., 2008; Sallaud et al., 2009). از جمله مونوترپن‌های موجود در دانه‌های بالغ سیاهدانه می‌توان به پی‌سیمن^{۱۴}، گاماترپین^{۱۵}، تیموکینون^{۱۶}، آلفاتوجن^{۱۷}، تیموهیدروکینون^{۱۸} و کارواکرول^{۱۹} اشاره کرد (Botnick et al., 2012; Liu et al., 2013).

بخش عمده‌ی ارزش دارویی سیاهدانه به دلیل وجود ترکیب دارویی تیموکینون است. تیموکینون موجود در روغن سیاهدانه جزء ترکیبات اصلی بذر است و در مطالعات زیادی اثرات درمانی آن از قبیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Hosseinzadeh et al., 2012)، ضد التهابی (Gazzar et al., 2006)، ضد سرطانی (Gali et al., 2008) (Muhtasib et al., 2008) ضد باکتری (Halawani, 2009)، ضد قارچی (Saad et al., 2013) و ضد تشنج (Hosseinzadeh et al., 2004) گزارش شده است. هر چند تیموکینون در گیاهان معطر غنی از مونوترپن‌ها مانند آویشن، مرزه و پونه‌ی کوهی نیز موجود است، اما این میزان در مقایسه با سیاهدانه به مقدار کمتری در این گیاهان وجود دارد (Skoula et al., 1999; Crocoll et al., 2010; Grosso et al., 2010; Botnick et al., 2012). آنزیم DXR و گاماترپین سنتاز^{۲۰} (GTS) از آنزیم‌های محدود کننده سرعت واکنش در ابتدا و انتهای مسیر بیوسنتزی تیموکینون هستند و مطالعات مختلفی نقش ژن‌های DXR و GTS را در مسیر بیوسنتزی MEP تأیید کرده‌اند، این بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش بیان ژن‌های DXR و GTS میزان مونوترپن‌ها افزایش

12. Geranyl diphosphate synthase (GPPS)

13. Geranyl diphosphate (GDP)

14. P-Cymene

15. γ -Terpinene

16. Thymoquinone

17. α -thujene

18. Thymohydroquinone

19. Carvacrol

20. Gamma terpinene synthase

1. Ranunculaceae

2. Monoterpenes

3. Methyl erythritol phosphate

4. Pyruvate

5. D-glyceraldehyde-3-phosphate

6. Deoxyxylulose-5-phosphate

7. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS)

8. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

9. 2-C-methylerythritol-4-phosphate

10. Dimethylallyldiphosphate

11. Isopentenylidiphosphate

تیمو کینون است، بدیهی است نتایج این بررسی می‌تواند راه را برای درک بهتر مسیرهای افزایش میزان تیمو کینون از طریق انتخاب ژنوتیپ مناسب، افزایش بیان ژن‌های کلیدی و یا استفاده از سایر سیستم‌های تولیدی و نیز پی بردن به ارتباط بین میزان رونوشت این ژن‌ها و متابولیت‌های تولید شده در گیاه هموار کند.

پیشینه پژوهش

شبکه‌ی متابولیکی گیاهان نسبت به سایر موجودات بسیار گسترده‌تر است. متابولیت‌ها در گیاهان به دو گروه عمده‌ی متابولیت‌های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه عمدتاً شامل قندها، اسیدهای آمینه، لیپیدها و منابع انرژی هستند. به غیر از متابولیت‌های اولیه گیاهان دامنه‌ی گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که در حفاظت گیاهان در برابر عوامل میکروبی، قارچی، ویروسی و حشرات، آلوپاتی و سیگنالینگ نقش دارند (Dixon, 1999; Schwab, 2003). ارتباط بین جریان متابولیت‌های اولیه و انباشت متابولیت‌های ثانویه بسیار پیچیده است، زیرا نیاز به در نظر گرفتن کل شبکه‌ی متابولیتی دارد تا منابع متابولیت‌های اولیه را بدون اختلال در گیاه به متابولیت‌های ثانویه هدایت کند. امروزه توسعه‌ی دانش در درک متابولیسم‌های گیاه، به‌منظور شناسایی ظرفیت متابولیکی گیاهان و نحوه‌ی تنظیم فعالیت متابولیکی آن‌ها در جهت بهره‌وری بهتر از ترکیبات ارزشمند گیاهی محور اصلی در تحقیقات گیاهی است (Ghisla et al., 2012).

آنزیم‌های کلیدی مسیرهای بیوستنری از عوامل بسیار تأثیرگذار بر میزان تولید متابولیت‌ها هستند. مطالعات مختلفی نقش آنزیم‌های کلیدی بر میزان تولید متابولیت‌های هدف را تأیید کردند. در یک بررسی روی آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) مشخص شد که مسیر بیوستنری فلاونوئیدها مستقیماً توسط چندین آنزیم کلیدی تنظیم می‌شود (Zhao et al., 2013; Afrin et al., 2014). در مطالعه‌ای دیگر بیش بیان ژن ترین‌ستاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر متابولیکی تولید تیمول، باعث افزایش میزان این ماده در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) گردید (Nomani et al.,

2000; Mahmoud et al., 2001; Carretero-Paulet et al., 2002; Crocoll et al., 2010; Krause et al., 2021; Kianersi et al., 2021).

در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی در زمینه‌ی تأثیر اثرات القاکننده‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل اشعه‌ی UV، ترانس سینامیک اسید^۱، متیل جاسمونات^۲، سالیسیک اسید^۳ و نانوذرات^۴ در بیوستنر متابولیت‌های ثانویه انجام گرفته است (Hatami et al., 2014; Kianersi et al., 2021). استفاده از القاکننده‌ها با تغییر در الگوهای بیانی ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوستنری مورد مطالعه در درک بهتر مسیرهای بیوستنری بسیار کمک کننده خواهند بود. طبق بررسی‌های گذشته نقش متیل جاسمونات در تحریک متابولیت‌های ثانویه از جمله ترپن‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی تأیید شده است. در این گیاهان، متیل جاسمونات به‌عنوان یک القاکننده‌ی فیتوهورمونی باعث ایجاد جریانی از واکنش‌های فیزیولوژیکی می‌شود که مورفولوژی گیاه را تغییر داده و منجر به تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (De Geyter et al., 2012; Moreira-Rodríguez et al., 2017).

مطالعات گذشته در گیاهانی از قبیل آویشن و پونه‌ی کوهی منجر به جداسازی و تعیین خصوصیت برخی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوستنری تیمو کینون شده است (Krause et al., 2021). علاوه بر این مطالعات گذشته روی گیاه سیاهدانه منجر به شناسایی و معرفی ژن‌های DXR (داده‌ها انتشار نیافته) و GTS (Elyasi et al., 2022) در این گیاه شده است، ولی کنون گزارشی در مورد میزان بیان این دو ژن ارائه نشده است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان بیان ژن‌های ابتدا (ژن DXR) و انتهای (ژن GTS) مسیر بیوستنری تیمو کینون در دو اکوتیپ مختلف سیاهدانه به منظور روشن‌سازی بهتر مسیر بیوستنری تیمو کینون و نیز بررسی اثر القاکننده‌ی متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوستنر

1. Trans-cinnamic acid

2. Methyl jasmonate

3. Salicylic acid

4. Nanoparticles

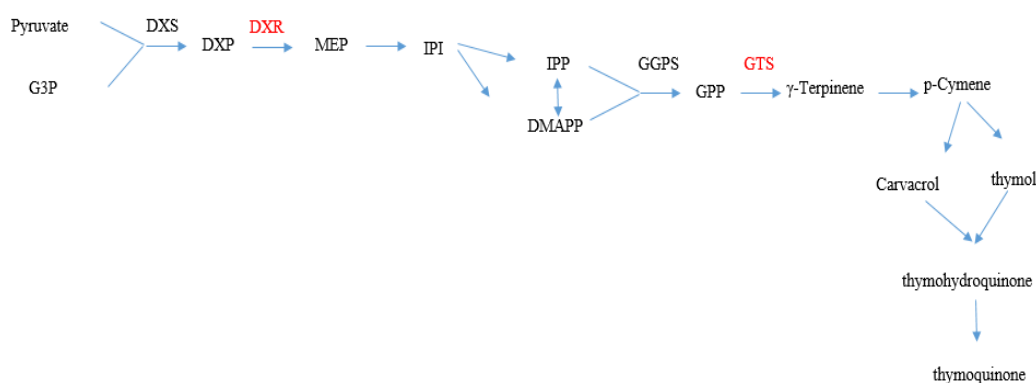
ایجاد گاماترپنین از ژرانیل دی سولفات می گردد، از آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تیموکینون است (Carretero-Paulet et al., 2002; Botnick et al., 2012; Huang et al., 2021; Azimzadeh et al., 2023). طی بررسی که روی بذر گیاه سیاهدانه با استفاده از توالی یابی RNA انجام شده است ژن گاماترپنین سنتاز به عنوان یکی از آنزیم های کلیدی در مسیر بیوسنتزی مونوترپن ها جداسازی و تعیین خصوصیت شد (Elyasi et al., 2022). علاوه بر این طی تحقیقی دیگر روی بذر گیاه سیاهدانه با استفاده از توالی یابی RNA، توالی نوکلئوتیدی ژن *DXR* معرفی شد (داده ها انتشار نیافته).

نقش متیل جاسمونات به عنوان القاکننده ی زیستی به منظور بیوسنتز متابولیت های ثانویه به ویژه القای متابولیسم ترپن ها در گونه های مختلف گیاهی از قبیل سیاهدانه (Elyasi et al., 2016)، آویشن (Kianersi et al., 2021) و بابونه کبیر^۲ (Majdi et al., 2015) اثبات شده است. طی بررسی که روی میزان تیمول و کارواکرول روی تعدادی از گونه های آویشن ایرانی تحت اثر غلظت های مختلف متیل جاسمونات انجام شد، افزایش میزان این دو ماده اثبات گردید و بالاترین میزان تولید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد (Krause et al., 2021).

همچنین در گزارشی دیگری که روی گیاه پونه (*Origanum vulgare* L.) انجام شد نقش مستقیم میزان بیان آنزیم کلیدی مونوترپن سنتاز در کنترل ترکیب اسانس اثبات گردید (Crocchi et al., 2010).

مطالعات گذشته روی مسیر بیوسنتزی ترپن ها حاکی از آن است که، شناسایی ژن های مرتبط با بیوسنتز اسکلت ترپن ها می تواند در دستوری این مسیرها به منظور افزایش ترپن های ویژه مؤثر باشد. طبق مطالعاتی که در گیاه نعنای فلفلی^۱ (Wildung et al., 2005)، آرابیدوپسیس تراریخت (Carretero-Paulet et al., 2006) و گوجه فرنگی (Enfissi et al., 2005) انجام شده است بیش بیان ژن *DXR* باعث افزایش معنادار تولید و تجمع ترپن در این گیاهان شده است. علی رغم مطالعاتی که انجام گرفته تا کنون مسیر بیوسنتزی تیموکینون در گیاه سیاهدانه به صورت کامل مشخص نشده است، اما با توجه به بررسی هایی که در گیاهانی از قبیل آویشن و پونه ی کوهی صورت گرفته است مسیر بیوسنتزی تیموکینون به صورت زیر پیش بینی می گردد (شکل ۱).

بر طبق بررسی های گذشته ژن *DXR* به علت نقش تعیین کننده در هدایت میان واسطه ها به سمت مسیر IPP و DMAPP به عنوان عامل کنترلی مهمی در مسیر MEP عمل می کند. همچنین گاماترپنین سنتاز که باعث



شکل ۱. مسیر پیشنهادی بیوسنتزی تیموکینون در سیاهدانه (رنگ قرمز بیانگر ژن های مورد مطالعه در این پژوهش است).

Figure 1. Proposed biosynthetic pathway of thymoquinone in *N. sativa* (The red color indicates the genes studied in this research).

1. *Mentha piperita*

2. *Tanacetum parthenium*

روش‌شناسی پژوهش

کشت گیاه و تیمار متیل جاسمونات

با استفاده از داده‌های حاصل از آنالیز GC-MS که توسط الیاسی و همکاران (داده‌ها انتشار نیافته) روی محتوی تیموکینون در بذر اکوتیپ‌های مختلف گیاه سیاهدانه انجام شده است، اکوتیپ H (سمیروم) با میزان تیموکینون بیشتر و اکوتیپ K (اقلید) با میزان تیموکینون کمتر انتخاب شدند. هر دو اکوتیپ در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. مطالعات گذشته نشان داده است که میزان تیموکینون در سیاهدانه همراه با رسیدگی دانه به حداکثر می‌رسد و پس از بلوغ کامل، مقدار آن دوباره کمی کاهش می‌یابد (Botnick *et al.*, 2012)، به همین دلیل در این پژوهش گیاهان در مرحله قبل از بلوغ کامل بذر به منظور انجام آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری و در فریزر ۸۰- نگه‌داری شدند. علاوه بر این به دلیل بررسی اثر متیل جاسمونات، گیاهان با استفاده از محلول متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در ۳ زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در سه تکرار محلول‌پاشی شدند (نمونه‌های شاهد به وسیله آب محلول پاشی شد) و پس از گذشت زمان مورد نظر بذرهای جمع‌آوری و در فریزر ۸۰- نگه‌داری شدند.

طراحی آغازگر به‌منظور جداسازی ژن‌های

موردبررسی

توالی نوکلئیدی ژن *DXR* در سیاهدانه با شماره دسترسی MN561851.1، ژن گاما ترپنین سنتاز از گیاه سیاهدانه با شماره دسترسی OM856342.1، ژن دی گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) در سیاهدانه با شماره دسترسی LC719288.1 و ژن یوبیکویتین (*Ubiquitin*) در گیاه آرابیدوسیس با شماره دسترسی NM_116090.3 از پایگاه داده در NCBI دانلود شد و طراحی آغازگرها با استفاده از برنامه‌های oligoanalyzer و Primer3 انجام شد (جدول ۱).

بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از RT-qPCR^۱

به‌منظور بررسی تفاوت در الگوی بیان ژن‌های کلیدی *GTS* و *DXR* مسیر بیوسنتزی تیموکینون دو اکوتیپ، از روش ریل تایم پی‌سی‌آر استفاده شد. همچنین، تأثیر متیل جاسمونات بر بیان این ژن‌ها در ساعات مختلف پس از تیمار نیز مورد بررسی قرار گرفت. RNA از بذرهای جمع‌آوری شده با استفاده از کیت ترايزول شرکت روزه ساخت کشور ایران استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA ی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانو دراپ تعیین گردید و با استفاده از آنزیم DNase1 شرکت سیناکلون آلودگی احتمالی به DNA ژنومی، حذف گردید. پس از تیمار RNA با آنزیم DNase1، یک میکروگرم RNA به منظور سنتز cDNA و بر اساس دستورالعمل موجود در کیت سنتز cDNA شرکت Addbio ساخت کشور کره جنوبی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تأیید صحت سنتز cDNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی cDNA های سنتز شده با استفاده از آغازگرهای یوبیکویتین با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مستر میکس Amplicon انجام شد. همچنین به منظور بررسی آلودگی احتمالی در واکنش PCR، از RNA استخراجی به عنوان الگو نیز در واکنش استفاده گردید.

پس از تأیید سنتز cDNA از RNA های استخراج شده، آزمایش ریل تایم پی‌سی‌آر با استفاده از مخلوط واکنش امپلیکون حاوی سایبر گرین انجام شد. به منظور تأیید صحت انجام واکنش رونویسی معکوس و نیز به منظور مطالعه‌ی میزان بیان ژن‌های هدف در این بررسی از ژن‌های *GAPDH* و یوبیکویتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد (Mazrooei *et al.*, 2017).

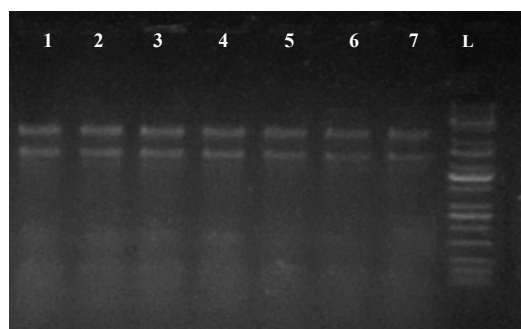
واکنش Real time PCR با استفاده از سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی و با استفاده از دستگاه micPCR مدل 48 چاهکی انجام شد. این دستگاه با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR کارایی آغازگرها را برای هر چاهک به صورت جداگانه محاسبه می‌کند.

جدول ۱. مشخصات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن.

Table 1. Specifications related to the primers used for gene expression analysis.

ژن Gene	توالی (۵'-۳') Sequences (5'-3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing Temperature (°C)	طول قطعه تکثیر شده (جفت‌باز) Amplicon Size (bp)
GAPDH-F	TGCTGCTCATTGAAGGGTG	۶۳	۱۵۶
GAPDH-R	AGTGGAGCAAGGCAGTTTGT		
Ubiquitin-F	GATGCAGATCTTCGTGAAAACC	۶۳	۱۱۲
Ubiquitin-R	TGGGATTCCTTCCTTGCTCTTG		
GTS-F	AGTTCCCAAGTCATCAGCAAG	۶۳	۱۲۵
GTS-R	AAGGATACAAGCCAACCTTGA		
DXR-F	AGGCACCATGACTGGAGTTC	۶۳	۱۵۰
DXR-R	TCGAGGCTTGTTTGGTTAC		

۲۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ در محدوده ۱/۷ تا ۱/۹ قرار داشت. به منظور حذف آلودگی DNA، از آنزیم DNase I استفاده شد و سپس نمونه‌ها بر روی ژل یک درصد آگارز بارگذاری گردیدند که کیفیت RNA استخراج شده را تأیید کرد (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج استخراج RNA از بذر سیاهدانه. چاهک ۱-۷:

استخراج RNA: L؛ مارکر مولکولی ۱kb.

Figure 2. RNA extraction results from *N. sativa* seeds. Well 1-7: RNA extraction, L: molecular marker 1kb.

در مرحله بعد، سنتز cDNA انجام شد. به منظور تأیید cDNA سنتز شده، آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های یوبیکوتین به منظور تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۱۲ جفت‌باز انجام شد (شکل ۳). سپس برای تأیید شناسایی و تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد بررسی، آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

همچنین از الگویابی منحنی ذوب جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش استفاده گردید. علاوه بر این به منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر بعد از انجام آزمایش ریل تایم پی‌سی‌آر محصولات حاصل روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری شدند و از نظر مشاهده یک باند اختصاصی با سایز مورد پیش‌بینی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین انجام توالی‌یابی روی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد بررسی انجام گرفت.

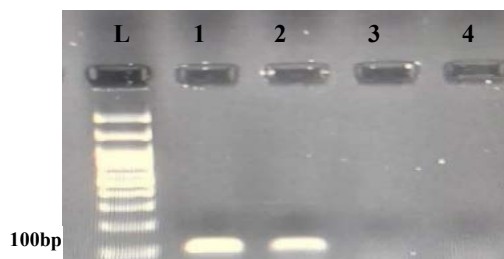
محاسبه میزان نسبی بیان ژن و آنالیز آماری

مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش با استفاده از پکیج mirzaghaderi/rtqcr (Mirzaghaderi, 2024) نرم‌افزار R انجام شد. این پکیج که می‌تواند بیان نسبی را بر اساس دو یا تعداد بیشتری از ژن رفرنس به همراه کارایی تکثیر محاسبه کند، خطای استاندارد را بر اساس روش Taylor و آنالیزهای آماری با استفاده از روش Ganger انجام می‌دهد (Ganger et al, 2017; Taylor et al, 2019). مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از این پکیج در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از روش LSD انجام شد.

نتایج و بحث

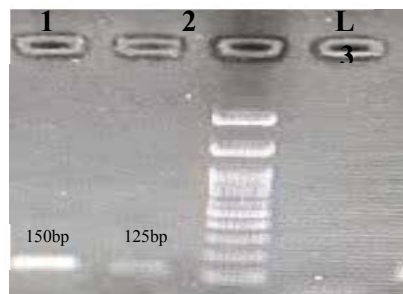
پس از استخراج RNA، غلظت آن با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها بین ۱۰۰۰ تا

هر ژن انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان دهنده حضور یک باند اختصاصی با اندازه مورد نظر بود (شکل ۴).



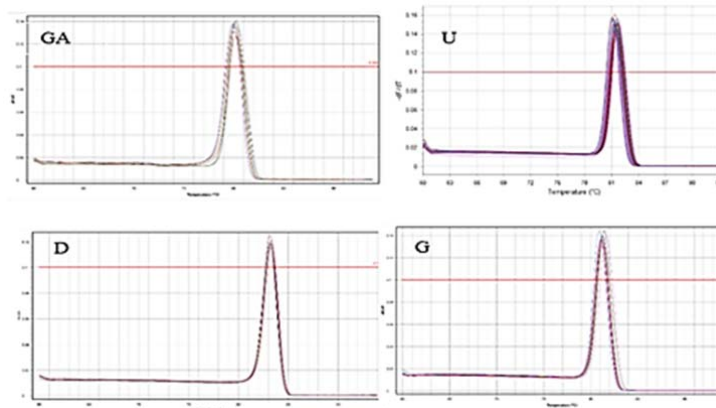
شکل ۳. تأیید سنتز cDNA. L: مارکر مولکولی ۱kb، چاهک ۱ و ۲: cDNA سنتز شده، چاهک ۳: کنترل منفی با استفاده از آب، چاهک ۴: کنترل منفی با استفاده از RNA

Figure 3. Confirmation of cDNA synthesis. L: molecular marker 1kb, wells 1 and 2: synthesized cDNA, well 3: negative control using water, well 4: negative control using RNA.



شکل ۴. نتیجه تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر با استفاده از PCR. چاهک ۱: ژن DXR، چاهک ۲: ژن GTS، چاهک ۳: کنترل منفی PCR. چاهک ۴: کنترل منفی PCR.

Figure 4. Results of specific amplification of target genes using PCR. Well 1: DXR gene, well 2: GTS gene, L: molecular marker 1kb, well 3: PCR negative control.



شکل ۵. منحنی ذوب. GA: ژن GAPDH، U: ژن یوبیکوئین، D: ژن DXR، G: ژن GTS.

cDNAهای تأیید شده برای بررسی تفاوت بیان با استفاده از واکنش Real time PCR استفاده شد و پس از انجام واکنش، Ct مربوط به هر نمونه توسط دستگاه با توجه به نمودار تکثیر تعیین شد و مورد بررسی و کمی سازی قرار گرفت. سپس در مرحله بعد واکنش منحنی ذوب Melt Curve برای تأیید تکثیر اختصاصی انجام شد (شکل ۵). علاوه بر این، نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با توالی‌های شناسایی شده در پایگاه NCBI مقایسه شد و همولوژی ۱۰۰ درصد و ۹۱ درصد به ترتیب برای ژن‌های DXR و GTS مشاهده گردید.

مقایسه میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در دواکوئپ

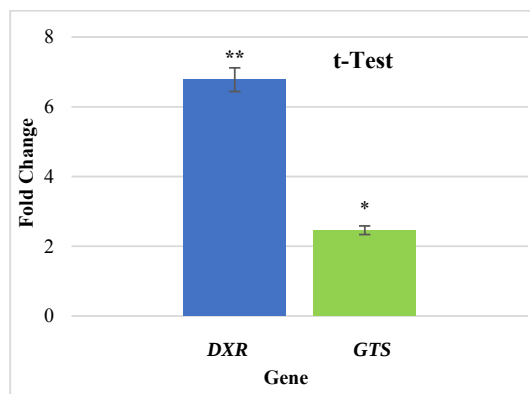
مقایسه بیان ژن‌های مورد مطالعه در دواکوئپ H و K با استفاده از آزمون t-test پکیج [mirzaghaderi/rttPCR](#) نرم افزار R نشان داد که میزان بیان ژن‌های DXR و GTS در اکوتیپ H بالاتر می‌باشد و این اختلاف بیان در سطح ۵ درصد به صورت معنادار است (شکل ۶). تفاوت میزان بیان ژن‌های مذکور در دو اکوتیپ نشان دهنده نقش ژنوتیپ در میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیموکینون می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط مجدی و همکاران (Majdi et al., 2014) روی گیاه بابونه کبیر انجام گرفت مشخص شد که میزان بیان ژن‌های ترپنوپیدستاز می‌تواند تحت تأثیر ژنوتیپ متغیر باشد.

Figure 5. Melting curve. GA: *GAPDH*, U: Ubiquitin gene, D: *DXR* gene, G: *GTS* gene.

میکرومولار متیل جاسمونات نشان داد که میزان بیان ژن در ۱۲ ساعت بعد از تیمار به صورت معناداری نسبت به شاهد افزایش داشته است و بعد از آن میزان بیان روند کاهشی را نسبت به تیمار ۱۲ ساعت طی می‌کند تا اینکه در ۴۸ ساعت بعد از تیمار میزان بیان به حداقل می‌رسد (شکل ۷). طی تحقیقی که روی گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) انجام شد مشخص شد که بیان ژن *DXR* در ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار متیل جاسمونات به بالاترین سطح خود می‌رسد و پس از آن میزان بیان به تدریج کاهش یافته و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار به سطح گیاه شاهد نزدیک می‌شود (Ghobadi et al., 2016). مطالعه دیگر روی نقش متیل جاسمونات در میزان بیان ژن *DXR* در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) نشان داد در ۲۴ ساعت اول اعمال تیمار بیان ژن *DXR* افزایش می‌یابد و بعد از آن بیان ژن *DXR* روند کاهشی را طی می‌کند (Jamshidi et al., 2019).

آنالیز بیان ژن *GTS* در دو اکوتیپ تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در سطح ۵ درصد انجام شد. آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ H نشان داد که میزان بیان این ژن در ۱۲ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی معناداری را نسبت به شاهد دارد. و بعد از آن روند تغییر میزان بیان به صورت افزایشی است به طوری که میزان بیان در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداکثر می‌رسد. این افزایش بیان نسبت به گیاه شاهد در ۲۴ ساعت بعد از تیمار غیرمعنادار و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار بسیار معنادار بوده است. آنالیز بیان ژن *GTS* در اکوتیپ K تحت تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نشان داد که میزان بیان این ژن نسبت به گیاه شاهد در ۱۲ ساعت بعد از تیمار تغییر قابل توجهی را نشان نمی‌دهد و بعد از آن در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار روند افزایشی معناداری را نشان می‌دهد به طوری که در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداکثر می‌رسد (شکل ۸). این مشاهدات با نتایج بررسی بیان ژن گاماترپنین سنتاز در گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) تحت تیمار متیل جاسمونات مطابقت دارد. نتایج این بررسی در گیاه زنیان

همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط موریرا و همکاران (Moreira et al., 2019) روی گیاه *Baccharis salicifolia* انجام گرفت مشخص شد که میزان مونوترپن در این گیاه تحت تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است. میزان بیان بالای این دو ژن در اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K و نیز بالا بودن میزان تیموکینون در اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K (میزان تیموکینون توسط الیاسی و همکاران بررسی شده است) نشان دهنده اهمیت بیان این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی تیموکینون و احتمالاً میزان تیموکینون تولید شده در بذر گیاه سیاهدانه است.



شکل ۶. مقایسه تغییرات بیان ژن *DXR* و *GTS* اکوتیپ H نسبت به اکوتیپ K با استفاده از آزمون t جفت نشده نرم افزار R. *: سطح معناداری.

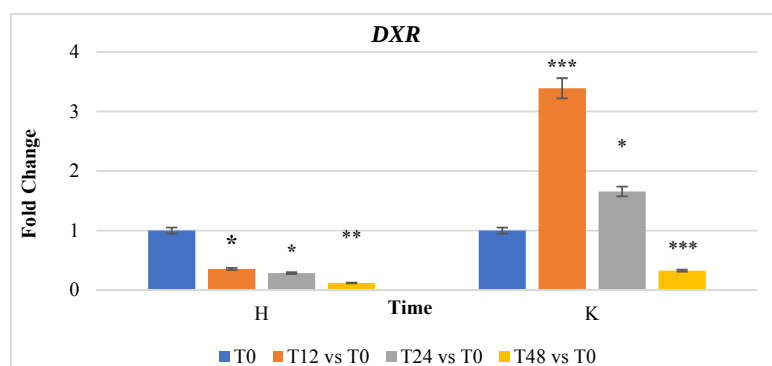
Figure 6. Comparison of *DXR* and *GTS* gene expression changes in ecotype H compared to ecotype K using an unpaired t-test in R software. *: Significance level.

مقایسه میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در دو اکوتیپ تحت اثر متیل جاسمونات

آنالیز بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ تحت تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در سطح ۵ درصد انجام شد. آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ H نشان داد که میزان بیان این ژن در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار روند کاهشی معناداری را نسبت به نمونه شاهد طی کرده است، و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار به حداقل رسیده است. همچنین نتایج آنالیز بیان این ژن در اکوتیپ K تحت تیمار ۱۰۰

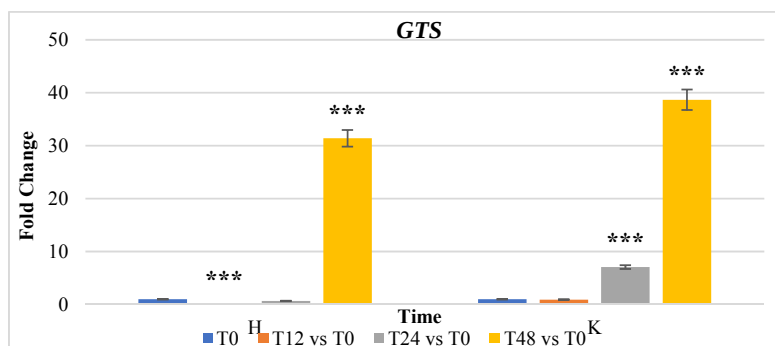
کارواکرول در سه ژنوتیپ آویشن تحت اعمال تیمار ۲۴ ساعت متیل جاسمونات انجام گرفت، نقش متیل جاسمونات به عنوان افزایش دهنده میزان بیان این ژن تأیید شد، با این حال این بررسی نشان داد تأثیر متیل جاسمونات بر روی سطوح بیان ژن *TPS2* در بین گونه‌های مختلف آویشن وابسته به ژنوتیپ است و تحت تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است، که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. با توجه به نقش این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی تیموکینون، استفاده از تیمار متیل جاسمونات با افزایش بیان این ژن‌ها احتمالاً می‌تواند منجر به افزایش میزان تیموکینون در بذر سیاهدانه گردد.

نشان داد در ۲۴ ساعت اول اعمال تیمار بیان ژن گاماترپنین‌سنتاز افزایش می‌یابد (Jamshidi *et al.*, 2019). با توجه به پیچیدگی مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها و نیز با توجه به اثرات چند وجهی الیستورها نوسانات بیان در ساعات مختلف اعمال دور از انتظار نمی‌باشد، اما آنچه اهمیت دارد، تأیید نقش متیل جاسمونات در افزایش بیان ژن‌های *DXR* و *GTS* است. این اطلاعات نشان می‌دهد که زمان اعمال تیمار و ژنوتیپ نقش مهمی در افزایش میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تیموکینون دارد. در مطالعه‌ای که توسط کیان ارثی و همکاران (Kianersi *et al.*, 2021) بر روی بیان ژن *TPS2* از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تیمول و



شکل ۷. میزان بیان ژن *DXR* نسبت به شاهد در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات. H: اکوتیپ H، K: اکوتیپ K، T0: زمان کنترل، T12: ۱۲ ساعت بعد از تیمار، T24: ۲۴ ساعت بعد از تیمار، T48: ۴۸ ساعت بعد از تیمار، * معناداری در سطح ۵ درصد.

Figure 7. The expression level of the *DXR* gene is relative to the control in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment. H: ecotype H, K: ecotype K, T0: control time, T12: 12 hours after treatment, T24: 24 hours after treatment, T48: 48 hours after treatment, * significance at the 5% level.



شکل ۸. میزان بیان ژن *GTS* نسبت به شاهد در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات. H: اکوتیپ H، K: اکوتیپ K، T0: زمان کنترل، T12: ۱۲ ساعت بعد از تیمار، T24: ۲۴ ساعت بعد از تیمار، T48: ۴۸ ساعت بعد از تیمار، * معناداری در سطح ۵ درصد.

Figure 8. The expression level of the *GTS* gene is relative to the control in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment. H: ecotype H, K: ecotype K, T0: control time, T12: 12 hours after treatment, T24: 24 hours after treatment, T48: 48 hours after treatment, * significance at the 5% level.

نسبت به ۲۴ ساعت ۵/۴۷ برابر افزایش بیان را نشان داده است (جدول ۲). مقایسه میانگین میزان بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف نشان داد که اعمال تیمار در اکوتیپ H باعث کاهش میزان بیان این ژن می‌گردد و بیشترین میزان کاهش بیان در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است. نتایج مقایسه میانگین‌ها در اکوتیپ K نشان داد که اعمال تیمار متیل جاسمونات در ۱۲ ساعت پس از تیمار باعث افزایش ۳/۳۸ برابری میزان بیان در این اکوتیپ نسبت به شاهد می‌گردد. همچنین اعمال تیمار در ۲۴ ساعت پس از تیمار هر چند باعث افزایش بیان ۱/۶۵ برابری نسبت به گیاه شاهد می‌شود اما نسبت به ۱۲ ساعت کاهش بیان معناداری را نشان داده است. علاوه بر این نتایج نشان داد که بیشترین کاهش میزان بیان ژن *DXR* در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار اتفاق می‌افتد (جدول ۳). به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که اعمال تیمار متیل جاسمونات می‌تواند بر میزان بیان هر دو ژن در هردو اکوتیپ سیاهدانه مؤثر باشد اما این تأثیر وابسته به زمان اعمال و ژنوتیپ متفاوت است. علاوه بر این می‌توان با اعمال تیمار ۲۴ ساعت متیل جاسمونات بیان این دو ژن را و احتمالاً میزان تیموکینون را در بذر گیاه سیاهدانه افزایش داد.

مقایسه میانگین میزان بیان ژن *GTS* و *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با استفاده از آزمون LSD نرم‌افزار R در سطح ۵ درصد انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در هر دو اکوتیپ بیشترین میزان بیان ژن *GTS* در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بوده است، به طوری که در اکوتیپ H میزان بیان نسبت به شاهد ۳۱/۳۹ برابر و در اکوتیپ K این میزان ۳۸/۶۷ نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که اگرچه اعمال تیمار متیل جاسمونات در اکوتیپ H در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به ۱۲ ساعت افزایش بیان ۱۰/۵۳ برابری را داشته است، اما میزان بیان در این اکوتیپ در شرایط ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار نسبت به شاهد کاهش داشته است، که این کاهش بیان در ۱۲ ساعت معنادار و در ۲۴ ساعت غیرمعنادار بوده است. این در حالی است که در اکوتیپ K میزان بیان این ژن در ۱۲ ساعت بعد از اعمال تیمار کاهش غیر معناداری را نسبت به شاهد داشته است و سطح بیان تقریباً برابر با گیاه شاهد بوده است و بعد از آن میزان بیان روند صعودی را طی کرده است، به صورتی که در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار نسبت به ۱۲ ساعت ۷/۶۹ برابر و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار

جدول ۲. مقایسه میانگین میزان بیان ژن *GTS* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف.

Table 2. Comparison of the mean expression level of *GTS* gene in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment at different times.

مقایسه Contrast	تغییر بیان ژن Fold Change		خطای استاندارد Standard Error		p. value		معناداری Significance	
	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H
T12 vs T0	۰/۹۱۹۰۸	۰/۰۶۳۲	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	۰/۶۶۴۱	<۰/۰۰۰۱	ns	***
T24 vs T0	۷/۰۶۷۸۳	۰/۶۶۶۱	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۷۳۱	***	ns
T48 vs T0	۳۸/۶۷۳۱۹	۳۱/۳۹۰۸	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T24 vs T12	۷/۶۹۰۱۲	۱۰/۵۳۰۸	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T48 vs T12	۴۲/۰۷۷۱۰	۴۹۶/۳۰۰۹	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***
T48 vs T24	۵/۴۷۱۵۸	۴۷/۱۲۸۵	۰/۲۷۰۰۱۶	۰/۲۷۰۲۵۳۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	***	***

ns و ***: به ترتیب غیر معناداری و معناداری در سطح احتمال ۵ درصد.

ns and ***: indicate non-significance and significance at the 5% probability level, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین میزان بیان ژن *DXR* در دو اکوتیپ سیاهدانه تحت تیمار متیل جاسمونات در زمان‌های مختلف.

Table 3. Comparison of the mean expression level of *DXR* gene in two ecotypes of *N. sativa* under methyl jasmonate treatment at different times.

مقایسه Contrast	تغییر بیان ژن Fold Change		خطای استاندارد Standard Error		p. value		معناداری Significance	
	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H	اکوتیپ K Ecotype K	اکوتیپ H Ecotype H
T12 vs T0	۳/۳۸۸۳۱۳	-۰/۳۵۶۶۲	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۰۳	-۰/۰۲۸۸	***	*
T24 vs T0	۱/۶۵۷۱۶۹	-۰/۲۸۵۴۱۶	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۳۸۸	-۰/۰۱۳۲	*	*
T48 vs T0	-۰/۳۲۶۳۶۹	-۰/۱۱۹۴۲۶	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۰۶	-۰/۰۰۱۱	***	**
T24 vs T12	-۰/۴۸۹۰۸۴	-۰/۸۰۰۲۴۳	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	-۰/۰۰۸۱	-۰/۵۵۹۱	**	ns
T48 vs T12	-۰/۰۹۶۳۳۲	-۰/۳۳۴۸۴۴	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	<-۰/۰۰۰۱	-۰/۰۲۲۹	***	*
T48 vs T24	-۰/۱۹۶۹۴۴	-۰/۴۱۸۴۲۸	-۰/۳۹۵۱۹۷	-۰/۵۲۰۰۰۸	<-۰/۰۰۰۱	-۰/۰۵۲۱	***	ns

ns, *, ** و ***: به ترتیب غیر معناداری و معناداری در سطح احتمال ۵ درصد.

ns and ***: indicate non-significance and significance at the 5% probability level, respectively.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

علی‌رغم اهمیت گیاه سیاهدانه به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند تا کنون مطالعات بسیار اندکی در خصوص شناسایی ژن‌ها و مسیرهای متابولیسمی موجود در آن صورت گرفته است. تحقیق حاضر به بررسی تفاوت میزان بیان ژن‌های کلیدی (*DXR* و *GTS*) مسیر بیوسنتزی تیموکینون در دو اکوتیپ گیاه سیاهدانه با میزان متفاوت تیموکینون پرداخته است. این بررسی نشان داد که سطوح بیان ژن‌های *DXR* و *GTS* در دو اکوتیپ متفاوت است و میزان بیان این ژن‌ها در اکوتیپ با میزان بیشتر تیموکینون به‌طور معناداری بالاتر است. با توجه به اینکه طبق مطالعات مختلف میزان رونوشت ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی با میزان تولید ترکیبات ترپنی ارتباط مستقیم دارد (Nagegowda *et al.*, 2010)، و نیز با توجه به نقش کلیدی ژن‌های *DXR* و *GTS* در مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها، افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند

نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در افزایش میزان تولید تیموکینون در بذر سیاهدانه باشد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که استفاده از تیمار متیل جاسمونات می‌تواند به‌طور مؤثری بیان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی تیموکینون را بسته به زمان اعمال و نوع ژنوتیپ افزایش دهد. به‌طور کلی یافته‌های این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتری در جهت شناسایی بهتر مسیر بیوسنتزی تیموکینون و نیز افزایش تولید آن در سیاهدانه باشد. در همین راستا به‌نظر می‌رسد به تحقیقات بیشتری پیرامون مطالعه بیان سایر ژن‌های مهم مرتبط با مسیر بیوسنتزی تیموکینون و همچنین ارتباط آن‌ها با تجمع تیموکینون تحت تأثیر متیل جاسمونات و یا تیمار با سایر محرک‌های شیمیایی لازم باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14 (5), 323-328. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q)
- Burke, C. C., Wildung, M. R., & Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (23), 13062-13067. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13062>
- Botnick, I., Xue, W., & Bar, E. *et al.* (2012). Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. *Molecules*, 17 (9), 10159-10177. <https://doi.org/10.3390/molecules170910159>
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., & Cunillera, N. *et al.* (2002). Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129 (4), 1581-1591. <https://doi.org/10.1104/pp.003798>

- Carretero-Paulet, L., Cairo, A., & Botella-Pavia, P. *et al.* (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, 62 (4), 683-695. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9051-9>
- Crocoll, C., Asbach, J., & Novak, J. *et al.* (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73 (6), 587-603. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1>
- Nagegowda, D. A. (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters*, 584 (14), 2965-2973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.045>
- De Geyter, N., Gholami, A., & Goormachtig, S. *et al.* (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17 (6), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
- Dixon, R. A. (1999). Plant natural products: The molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (2), 192-197. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80034-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80034-2)
- El Gazzar, M., El Mezayen, R., & Marecki, J.C. *et al.* (2006). Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*, 6 (7), 1135-1142. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.02.004>
- Elyasi, R., Majdi, M., & Bahramnejad, B. *et al.* (2016). Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*). *Industrial Crops and Products*, 79, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.005>
- Elyasi, R., Majdi, M., & Krause, S. *et al.* (2022). Identification and functional characterization of a γ -terpinene synthase in *Nigella sativa* L (black cumin). *Phytochemistry*, 202: Article 112466. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113290>
- Enfissi, E.M., Fraser, P.D., & Lois, L.M. *et al.* (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate forming pathways for the production of health promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3 (1), 17-27. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x>
- Estevez, J.M., Cantero, A., & Romero, C. *et al.* (2000). Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124 (1), 95-104. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.95>
- Ganger, M.T., Dietz, G.D., & Ewing, S.J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18: Article 1949. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Ghisla, S., Bouwmeester, H., & Beyer, P., *et al.* (2012). The path from β -carotene to carlactone: a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335 (6074), 1348-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1218094>
- Ghobadi, S., Maroufi, A., & Majd, M. (2016). Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in summer savory (*Satureja hortensis*). *Journal of Cell Tissue*, 7 (3), 275-291. (in Persian)
- Halawani, E. (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of **Nigella sativa* L.*, and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research*, 3 (5), 148-152.
- Hatami, M., & Ghorbanpour, M. (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*, 38 (1), 130-139. <https://doi.org/10.3906/biy-1304-64>
- Hosseinzadeh, H., & Parvardeh, S. (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*, 11 (1), 56-64. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00376>
- Hosseinzadeh, H., Taiari, S., & Nassiri-Asl, M. (2012). Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385 (5), 503-508. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0726-2>
- Huang, Y., Xie, F. J., & Cao, X. *et al.* (2021). Research progress in biosynthesis and regulation of plant terpenoids. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 35 (1), 1799-1808. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.2020162>
- Jamshidi, M., Sadat-Noori, S.A., & Mortazavian, S.M.M. (2019). Study the quantitative expression pattern of some involved genes on monoterpenoid biosynthesis pathway and identification of essential compounds affected by methyl jasmonate in Ajowan plant. *Agricultural Biotechnology Journal*, 11 (3), 133-152. (in Persian)

- Kianersi, F., Pour-Aboughadareh, A., & Majdi, M. *et al.* (2021). Effect of methyl jasmonate on thymol, carvacrol, phytochemical accumulation, and expression of key genes involved in thymol/carvacrol biosynthetic pathway in some Iranian Thyme species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (20), 11124. <https://doi.org/10.3390/ijms222011124>
- Krause, S. T., Liao, P., & Crocoll, C. *et al.* (2021). The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (52), e2110092118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110092118>
- Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 50 (1), 47-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47>
- Liu, X., Park, J.H., & Abd El-Aty, *et al.* (2013). Isolation of volatiles from *Nigella sativa* seeds using microwave-assisted extraction: effect of whole extracts on canine and murine cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (34), 8107-8113. <https://doi.org/10.1002/bmc.2887>
- Mahmoud, S.S., & Croteau, R.B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (15), 8915-8920. <https://doi.org/10.1073/pnas.141237298>
- Majdi, M., Karimzadeh, G., & Malboobi, M.A. (2014). The study of relative gene expression of key genes of terpene biosynthesis in tissues and different developmental stages of feverfew (*Tanacetum parthenium*) genotypes using real-time PCR. *Plant Genetic Researches*, 1 (2), 25-32. (in persian)
- Majdi, M., Abdollahi, M.R., & Maroufi, A. (2015). Parthenolide accumulation and expression of genes related to parthenolide biosynthesis affected by exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid in *Tanacetum parthenium*. *Plant Cell Reports*, 34 (11), <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1837-2>
- Mazrooei, S.S.A., & Ghazala, W.S. (2018). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Nigella sativa*. *Molecular Biology Reports*.
- Mirzaghaderi, G. (2024). rtPCR: A package for statistical analysis of real-time PCR data in R. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4193266/v1>
- Mbuni, M., Wang, S., & Mwangi, B. N. *et al.* (2020). Medicinal plants and their traditional uses in local communities around Cherangani Hills, Western Kenya. *Plants* (Basel), 9 (3), 331. <https://doi.org/10.3390/plants9030331>
- Nomani, M., Noori, S. A. S., & Tohidfar, M. *et al.* (2019). Overexpression of TPS2 gene to increase thymol content using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Trachyspermum ammi* (Qom ecotype). *Industrial Crops and Products*, 130: 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.076>
- Oladeji, O. (2016). The characteristics and roles of medicinal plants: Some important medicinal plants in Nigeria. *Natural Product Industry Journal*, 12 (3), 102.
- Saad, A. H., & Darweesh, M. F. (2013). Efficacy of thymoquinone against vaginal candidiasis in prednisolone-induced conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*. <https://doi.org/10.5555/20133188818>
- Sallaud, C., Rontein, D., & Onillon, S. *et al.* (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, 21: 301-317. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885>
- Sandberg, F., & Corrigan, D. (2001). Natural remedies: Their origins and uses. Abingdon: Taylor Francis. <https://doi.org/10.1201/9781420024692>
- Sapir-Mir, M., Mett, A., & Belausov, E. *et al.* (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology*, 148 (3), 1219-1228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127951>
- Schwab, W. (2003). Metabolome diversity: Too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 62 (6), 837-849. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00723-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00723-9)
- Taylor, S.C., Nadeau, K., & Abbasi, M. *et al.* (2019). The ultimate qPCR experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in Biotechnology*, 37 (7), 761-774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Wildung, M.R., & Croteau, R.B. (2005). Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. *Transgenic Research*, 14 (4), 365-372. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-5475-2>
- Yar, T., El-Hariri, M., & El-Bahai, M. *et al.* (2008). Effects of *Nigella sativa* supplementation for one month on cardiac reserve in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 52 (2), 141-148.
- Zhao, L., Gao, L., & Wang, H. *et al.* (2013). The R2R3-MYB, bHLH, WD40 and related transcription factors in flavonoid biosynthesis. *Functional and Integrative Genomics*, 13 (1), 75-98. <https://doi.org/10.1007/s10142-012-0301-4>