بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی گیاهی

توالی یابی بخشی از ژن APX در گندم هیرمند

اساتید راهنما:
دکتر براتعلی فاخری
دکتر حسین کمال الدینی

اساتید مشاور:
دکتر محمود سلوکی
دکتر مسیح فروتن

تهیه و تدوین:
نرجس محمدی نیا

دی ۱۳۹۲

تقدیم به او که هر چه هست از اوست

تقدیم به او که جهان در انتظار اوست

تقدیم به:

تقدیم به: ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ها، نازم را کشیدی و لبریزم کردی از شوق اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.

مادر صبور و فداکارم: دریای بی کران عشق و فداکاری که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر. او که رنگ شادی هایم شد، غص ها را با تمام وجود از من دور کرد و عمری خستگی ها را به جان خرید تا اکنون توانست طعم خوش پیروزی را به من بچشاند.

همسر عزیزم

و

خواهر عزیزم و برادرانم

که همیشه دلسوز و همراهم بودند.

تقدیر و تشکر

خدای مهربان را خزاران بار شاکرم که در مرحله ای دیگر از تحصیل، لطف خود را چون همیشه به من ارزانی داشت. او که می بالم به حضورش، به حس گرم حمایتش، به محبتهای بی شائبه اش و به قادری حکیمانه اش...

پس از شکر و سپاس به درگاه خداوند بزرگ که همواره نام و یادش، رو مگشر مسیر زندگیم بوده است، عزیزانی را به یادمی آورم که اگر حمایتشان نبود، بی شک رسیدن به این مرحله برایم امکان پذیر نبود.

از استادان ارجمندم جناب آقای دکتر براتعلی فاخری و جناب آقای دکتر حسین کمال الدینی که در تمام مراحل انجام این پایان نامه با صبر، حوصله و دقت نظر بر انجام کار نظارت داشتند و بی شک تنها در سایه دانش و تجارب گرانبهای آن ها توانستم این اثر را به پایان برسانم، خالصانه تشکر می نمایم. همچنین از اساتید فرهیخته ام جناب آقای دکتر محمود سلوکی و دکتر مسیح فروتن به عنوان اساتید مشاور که در این مسیر از لطف بی دریغشان همواره بهره جستم صمیمانه سپاس گزاری می نمایم.

از سرکار خانم دکتر لیلا فهمیده به خاطر داوری این مجموعه و از جناب آقای دکتر محمدرضا اصغری پور نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همکلاسی ها و دوستان عزیزم، سمیه منظری نژاد حمیده زارع، مهناز صادقی، صالحه نادری، سمیرا السادات فاطمی، سوسن حسینی، فرشته لشکری صیاد شیوا توحیدی، سلمه میر، هانیه رهبر، ساحل ابراهیم زاده عمران، فاطمه خسروی مقدم، نسرین پراشیده، سحر مردوخی، نجمه شمس الدین سعید فروش صبوری، فریبا ساعدی، مرجان دریش، مریم محمدی و تمام کسانی که در به اتمام رساندن این مجموعه بنده را یاری نمودند کمال تشکر را دارم. این پروژه در آزمایشگاه **ژنتیک مولکولی دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل** انجام گرفته که بدین وسیله مراتب سپاسگزاری خود را از مسئولین این دانشکده و آزمایشگاه ابراز می دارم. همچنین مراحل کشت گیاه این پروژه در **پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل** انجام گرفته که بر خود لازم می دانم از مسئولین پژوهشکده مخصوصا **سرکار خانم خواجه** سپاسگزاری کنم.

نرجس محمدی نیا

دی ۹۲

توالی یابی بخشی از ژن APX در گندم هیرمند

چکیده

تنش‌های محیطی از مهمترین عوامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی در سطح جهان هستند، تنش باعث می‌شود که تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و دفاع ضداکسنده در بخش‌های مختلف گیاه، از بین برود. شرایط نامساعد از قبیل شوری و خشکی باعث افزایش انواع اکسیژن فعال ROS در زمان رشد گیاه می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX) ، کاتالاز (CAT) ، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) تحت شرایط استرس برای مهار ROS فعال می‌شوند . آسکوربات پراکسیداز (APX)، آنزیمی است که نقشی حیاتی در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) دارد. آسکوربات پراکسیداز را می‌توان در کلروپلاست و سیتوزول سلولهای گیاهی و همچنین در موجودات دیگر مانند جلبک‌های یوکاریوتی و برخی سیانوباکتری ها یافت نمود. APXها متعلق به کلاس I از خانواده بزرگ باکتری‌ها، قارچ‌ها، پراکسیدازهای گیاهی است. ۵ ایزوفرم APX در گیاهان شناخته شده است: ایزوفرم‌های سیتوسولی، میتوکندریایی، پراکسیزومال، گلی اکسیمال و کلروپلاستی. APX سیتوسولی و کلروپلاست‌های نقش مهمی در متابولیسم آنتی اکسیدان‌ها در سلول‌های گیاهی دارد. در این مطالعه توالی یابی بخشی از ژن APX در گندم هیرمند مورد مطالعه قرار گرفت. از ۵ جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده ۲ جفت پرایمر در ناحیه پراکسیزوم سلول و ۳ جفت پرایمر در ناحیه تیلاکوئید سلول ژن آسکوربات پراکسیداز استفاده شد. در نهایت یک قطعه‌ی ۷۲۴ جفت بازی با پرایمر تلفیقی F4R5 درمنطقه پراکسیزوم سلول و یک قطعه‌ی ۷۲۰ جفت بازی با پرایمر تلفیقی F1R2 در منطقه تیلاکوئید سلول تکثیر شد. هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *Bgl*II، *Eco*RI و *Pst*I نیز، قطعات حاصل را تایید نمود. قطعات تکثیر شده توالی یابی شده با نرم افزارهای clustalw2 ، clc workbenchو Mega5 مورد آنالیز قرار گرفت. قطعات تکثیری توانستند با توالی‌های مربوط به ژن آسکوربات پراکسیداز در مناطق پراکسیزوم با شماره شناسایی EF555121.1 و تیلاکوئید با شماره شناسایی AY513261.1 به ترتیب ۹۶ و ۸۲ درصد همولوژی را نشان دهند.

واژگان کلیدی: گندم، ژن *APX*، PCR، توالی یابی

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- فرضیات تحقیق ۳

۱-۳- اهداف اصلی تحقیق ۳

۱-۴-ضرورت انجام تحقیق ۳

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- گیاه شناسی گندمیان ۶

۲-۲- مشخصات خانواده آسکوربات پرکسیداز گیاهی ۷

۲-۲-۱- مشخصات آسکوربات پراکسیدازها و تکامل آنها ۸

۲-۳- ایزوفرم‌های APX ۱۴

۲-۳-۱- APX سیتوسولی ۱۴

۲-۳-۲- APX پروکسیمال ۱۵

۲-۳-۴- APX کلروپلاستی ۱۵

۲-۴- مکان زیرسلولی APX ۱۶

۲-۵- ساختار ژن‌های APX ۱۷

۲-۶- نقش APX ۱۹

۲-۶-۱- پاسخ به استرس های متفاوت ۱۹

۲-۶-۲- پاسخ به تغییرات انتقال الکترون فتوسنتزی (PET) و برنامه ریزی مرگ سلولی ۱۹

۲-۷- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۲

۲-۷-۱- کاربردهای PCR ۲۲

۲-۷-۲- مشکلات PCR ۲۳

۲-۸- مروری بر تحقیقات انجام شده ۲۳

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- زمان و مکان اجرای آزمایش ۳۰

۳-۲- مشخصات مواد گیاهی ۳۰

۳-۳- مواد شیمیایی ۳۰
۳-۴- مواد ژنتیکی ۳۰
۳-۵- استخراج DNA از گندم هیرمند ۳۱
۳-۵-۱- محلول های مورد استفاده در روش دلاپورتا ۳۱
۳-۵-۲- روش استخراج DNA ژنومی با روش دلاپورتا ۳۲
۳-۶- محلولهای لازم برای الکتروفورز ۳۳
۳-۶-۱- بافر الکتروفورز TAE 10 X (TRIS-ACETATE-EDTA): ۳۳
۳-۶-۲- محلول اتیدیوم بروماید ۳۴
۳-۷- الکتروفورز ژل آگارز ۳۴
۳-۸- استفاده از دستگاه بیوفتومتر ۳۵
۳-۹- یکسان سازی غلظت DNA ۳۵
۳-۱۰- رقیق کردن پرایمر ۳۶
۳-۱۱-انجام واکنشPCR ۳۶
۳-۱۱-۱- تنظیم شرایط PCR ۳۸
۳-۱۱-۲- PCR با جفت پرایمر F1R1 ..... ۳۹
۳-۱۱-۳- PCR جفت آغازگر F2R2 ..... ۴۰
۳-۱۱-۴- PCR جفت پرایمر F3R3 ..... ۴۱
۳-۱۱-۵- PCR جفت پرایمر F4R4 ..... ۴۲
۳-۱۱-۶- پرایمر تلفیقی F4R2 ..... ۴۳
۳-۱۱-۷- PCR پرایمرتلفیقی F4R3 ..... ۴۴
۳-۱۱-۸- PCR پرایمرتلفیقی F1R2 و F3R2 ..... ۴۴
۳-۱۱-۹- PCR پرایمر تلفیقیF4R1 ..... ۴۵
۳-۱۱-۱۰- PCR پرایمر تلفیقی F5R5 ..... ۴۶
۳-۱۱-۱۱- PCR پرایمرتلفیقیF4R5 ..... ۴۷
۳-۱۲- هضم آنزیمی ۴۷
۳-۱۲-۱- هضم آنزیمی قطعه 720 BPحاصل از PCR پرایمر تلفیقی F1R2 ..... ۴۷
۳-۱۲-۲- هضم آنزیمی قطعه 730 BP حاصل از PCRپرایمر تلفیقی F4R5 با آنزیم PSTI ۴۸
۳-۱۲-۳- هضم آنزیمی قطعه 730 BPحاصل از PCR پرایمر تلفیقی F4R5 با آنزیم ECORI ۴۹
۳-۱۱-۴- الکتروفورز محصولات PCR ۴۹
۳-۱۳- دستگاه UV transilluminator ۵۰
۳-۱۴- استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت GF-1 GEL DNA RECOVERY KIT ۵۰
۳-۱۵- طراحی پرایمر اختصاصی ۵۱

۱۶-۳- توالی‌یابی ۵۱
۱۷-۳- Alignments ۵۲
۱۸-۳- نرم‌افزار مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها ۵۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

۱-۴-استخراج DNA ژنومی ۵۵
۲-۴- نتایج حاصل ازPCR ۵۴
۱-۲-۴-نتایج PCR حاصل از جفت پرایمر F1R1 ۵۷
۲-۲-۴-نتایج حاصل از جفت پرایمر F2R2 ۵۷
۳-۲-۴- نتایج حاصل از جفت پرایمر F3R3 ۵۸
۴-۲-۴- نتایج حاصل از جفت پرایمر F4R4 ۵۹
۳-۴- نتایج حاصل از PCR با پرایمرتلفیقی ۶۱
۱-۳-۴- پرایمر تلفیقی F4R2 ۶۰
۲-۳-۴- پرایمر تلفیقی F4R3 ۶۰
۳-۳-۴- پرایمر تلفیقی F1R2 و F3R2 ۶۰
۴-۳-۴- پرایمر تلفیقیF4R1 ۶۱
۵-۳-۴- PCR پرایمرتلفیقی F5R5 ۶۲
۶-۳-۴- PCR پرایمرتلفیقی F4R5 ۶۳
۴-۴- نتایج حاصل از هضم آنزیمی ۶۶
۱-۴-۴- هضم آنزیمی قطعه BP 720حاصل از PCR پرایمر تلفیقی F1R2 باآنزیم *BGL* II ۶۵
۲-۴-۴- هضم آنزیمی قطعه BP 730حاصل از PCR پرایمر تلفیقی F4R5 با آنزیم *PST*I ۶۵
۳-۴-۴- هضم آنزیمی قطعه BP720 حاصل از PCR پرایمر تلفیقی F1R2 با آنزیم *ECO*RI ۶۶
۵-۴- نتایج حاصل از Sequncing ۶۸
۱-۵-۴- توالی کامل DNA ژن آسکوربات پراکسیداز پراکسیزوم گندم هیرمند ۶۷
۲-۵-۴- توالی کامل DNA ژن آسکوربات پراکسیدازتیلاکوئید گندم هیرمند ۶۸
۶-۴- نتایج حاصل از ALIGNMENTS ۶۹
۱-۶-۴- همردیفی توالی اگزون ژن APX پراکسیزوم گندم هیرمند با بخشی ازتوالی پراکسیزوم NCBI با شماره شناسایی EF555121.1 ۶۸
۲-۶-۴- همردیفی توالی تیلاکوئید گندم هیرمند با توالی تیلاکوئیدی گندم NCBI با شماره شناسایی AY513261.1 ۶۹
۷-۴- آنالیز و مقایسه توالی حاصل با توالی های موجود در پایگاه NCBI ۷۰
۱-۷-۴- توالی اگزون ژن APX گندم هیرمند در منطقه پراکسیزوم جداسازی شده از گندم هیرمند ۷۱
۲-۷-۴- توالی کامل ژن APX گندم هیرمند در منطقه پراکسیزوم جداسازی شده از گندم هیرمند ۷۲

۳-۷-۴- توالی کامل ژن APX گندم هیرمند در منطقه تیلاکوئید جداسازی شده از گیاه گندم هیرمند ۷۴
۸-۴- درخت فیلوژنی ۷۷
۱-۸-۴- درخت فیلوژنی توالی ژن APX پراکسیزوم با توالی های موجود در بانک ژن ۷۷
۲-۸-۴- درخت فیلوژنی توالی ژن کامل APX در منطقه تیلاکوئید با توالی‌های گندم موجود در بانک ژن ۷۷
۹-۴- پروتیین ۷۸
۱-۹-۴- همردیفی پروتئین اگزون پراکسیزوم گندم هیرمند با توالی پروتئینی F4R5 ..... ۷۹
۱۰-۴- همردیفی توالی اگزون ژن آسکوربات پراکسیداز در پراکسیزوم گندم هیرمند با سایر توالی‌های موجود نزدیک در سطح نوکلئوتید ۸۰
۱۱-۴- همردیفی توالی کامل پراکسیزوم گندم هیرمند ۷۲۴ جفت بازی با سایر توالی‌ها ۸۲
۱۲-۴- همردیفی توالی کامل ژن آسکوربات پراکسیداز تیلاکوئید گندم هیرمند ۷۲۰ جفت بازی با سایر توالی‌ها ۸۴
۱۳-۴- نتیجه گیری کلی ۸۵
۱۴-۴- پیشنهادات ۸۸
منابع ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل۱-۲- ساختار جایگاه فعال APX باسوبسترا (آسکوربات)	۱۰
شکل ۲-۲- درخت فیلوژنیک آسکوربات پراکسیدازهای گیاهی	۱۱
شکل ۳-۲- ساختار ژن CmAPX	۱۸
شکل ۱-۳- ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf	۳۶
شکل ۲-۳- برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCRبرای آغازگرF1R1	۴۰
شکل ۳-۳- برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR برای آغازگر F2R2	۴۱
شکل ۴-۳- برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR برای آغازگر F3R3	۴۲
شکل ۵-۳- برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR برای آغازگرF4R4	۴۳
شکل ۶-۳- برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR برای پرایمرهای تلفیقی F1R2 و F3R2	۴۵
شکل ۷-۳: برنامه سیکل دمایی برای انجام واکنش PCR برای آغازگرF4R5	۴۷
شکل ۱-۴- نتایج کیفیت DNA استخراج شده به روش دلاپورتا تغییر شکل یافته با الکتروفورز ژل آگارز	۵۴۵۴
شکل ۲-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعه 477 bp برای پرایمر F1R1	۵۷
شکل ۳-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعه 263bp برای آغازگر F2R2	۵۸
شکل ۴-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعه 443bp برای آغازگر F3R3	۵۹
شکل ۵-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعه 200bp برای آغازگر F4R4	۵۹
شکل ۶-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعات 720bp برای آغازگر F1R2 و قطعه 685bp برای پرایمر F3R2،	۶۱
شکل ۷-۴: ژل الکتروفورز حاصل از PCR تلفیقی قطعات 1000bp برای پرایمر F4R1	۶۲
شکل ۸-۴- نمای شماتیک پرایمرهای طراحی شده از توالی گندم رقم C 306	۶۲
شکل ۹-۴- پرایمرهای طراحی شده F5 و R5	۶۳
شکل ۱۰-۴- پرایمرهای طراحی شده (پرایمر تلفیقی) F4 وR5	۶۴
شکل ۱۱-۴- ژل الکتروفورز حاصل از PCR تکثیر قطعات 730bp برای آغازگر F4R5	۶۴
شکل۱۲-۴- نتایج حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم *Bgl*II	۶۵
شکل۱۳-۴- نتایج حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم *Pst*I	۶۶
شکل ۱۴-۴- توالی کامل DNA قطعه توالی یابی شده ژن APX در منطقه پراکسیزوم گندم هیرمند	۶۷

شکل ۱۵-۴- توالی نوکلئوتیدی اگزون ژن آسکوربات پراکسیداز در منطقه پراکسیزوم گندم هیرمند ۶۸
شکل ۱۶-۴- توالی کامل ژن آسکوربات پراکسیداز در منطقه تیلاکوئیدگندم هیرمند ۶۸
شکل ۱۷-۴- همردیفی اگزون پراکسیزوم گندم هیرمند با Triticum aestivum peroxisomal(APX) mRNA حاصل از NCBI ۶۹
شکل ۱۸-۴ همردیفی تیلاکوئید گندم هیرمند با تیلاکوئید گندم رقم C 306 حاصل از NCBI ۷۰
شکل ۱۹-۴- بلاست بین توالی APX) mRNA)پروکسیزومال آسکوربات گندم موجود در NCBI و توالی اگزون ۴۶۷جفت بازی از پراکسیزوم گندم هیرمند ۷۲
شکل ۲۰-۴- بلاست بین توالی ژنومی کلون UCDTA01093 گندم از NCBI و توالی کامل ۷۲۴ جفت بازی ژن آسکوربات پرکسیدازدر منطقه پراکسیزوم گندم هیرمند ۷۴
شکل ۲۱-۴- بلاست بین توالی ژنومی گندم رقم C306 موجود در NCBI و توالی کامل ۷۲۰ جفت بازی از تیلاکوئیدگندم هیرمند ۷۶
شکل ۲۲-۴- درخت فیلوژنی توالی کامل پراکسیزوم گندم هیرمند ۷۲۴ جفت بازی با توالی های موجود در NCBI ۷۷
شکل ۲۳-۴- درخت فیلوژنی توالی ژن آسکوربات پراکسیداز گندم هیرمند در مناطق (پراکسیزوم و تیلاکویید) با توالی های گندم موجود در NCBI ۷۸
شکل ۲۴-۴- توالی اسید آمینه اگزون ژن آسکوربات پراکسیداز در پراکسیزوم گندم هیرمند ۷۹
شکل ۲۵-۴- توالی اسید آمینه ژن آسکوربات پراکسیداز تیلاکوئید گندم هیرمند ۷۹
شکل۲۶-۴- همردیفی پروتئین اگزون پراکسیزوم گندم هیرمند با توالی پروتئینی F4R5 ۸۰
شکل ۲۷-۴- همردیفی ناحیه اگزونی پراکسیزوم گندم هیرمند با توالی های موجود در NCBI ۸۲
شکل ۲۸-۴- همردیفی توالی کامل پراکسیزوم گندم هیرمند با توالی های موجود در NCBI ۸۳
شکل ۲۹-۴- همردیفی توالی کامل تیلاکوئید گندم هیرمند با توالی های موجود در NCBI ۸۵
شکل ۳۰-۴- نمای شماتیک پرایمرهای طراحی شده از Triticum Aestivum Cultivar C 306 DNA ۸۶

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول ۱-۱- شماره شناسایی توالی‌های گندم ژن APX موجود در بانک ژن ۴

جدول ۱-۲- خصوصیات آسکوربات پراکسیدازهای گیاهی..... ۹

جدول ۲-۲- طبقه بندی توالی آمینواسیدهای استفاده شده برای فیلوگرام. *sAPX*-استرومایی از؛ *pAPX*-پراکسیمال از؛ *tAPX*- تیلاکوئید باند شده از؛ NCBI..... ۱۳

جدول ۱-۳- اجزای تشکیل دهنده بافر استخراج همراه با غلظت و مقادیر استفاده شده در روش دلاپورتا..... ۳۱

جدول ۲-۳- مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر الکتروفورز 10X ۳۳

جدول ۳-۳- انواع مواد و مقادیر مورد نیاز در PCR با پرایمراختصاصی..... ۳۷

جدول ۴-۳- نام پرایمرها، توالی، دمای اتصال..... ۳۷

جدول ۵-۳- برنامه حرارتی لازم برای انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ۳۹

جدول۶-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمرF1R1..... ۳۹

جدول۷-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمر F2R2..... ۴۰

جدول۸-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمرF3R3..... ۴۱

جدول۹-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمرF4R4..... ۴۲

جدول۱۰-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمرF1R2، F3R2 و F4R2..... ۴۴

جدول۱۱-۳- مقادیر مورد استفاده برای پرایمرF4R1..... ۴۶

جدول۱۲-۳- هضم آنزیمی محصولاتPCR توسط آنزیم محدود کننده *Bgl* II..... ۴۸

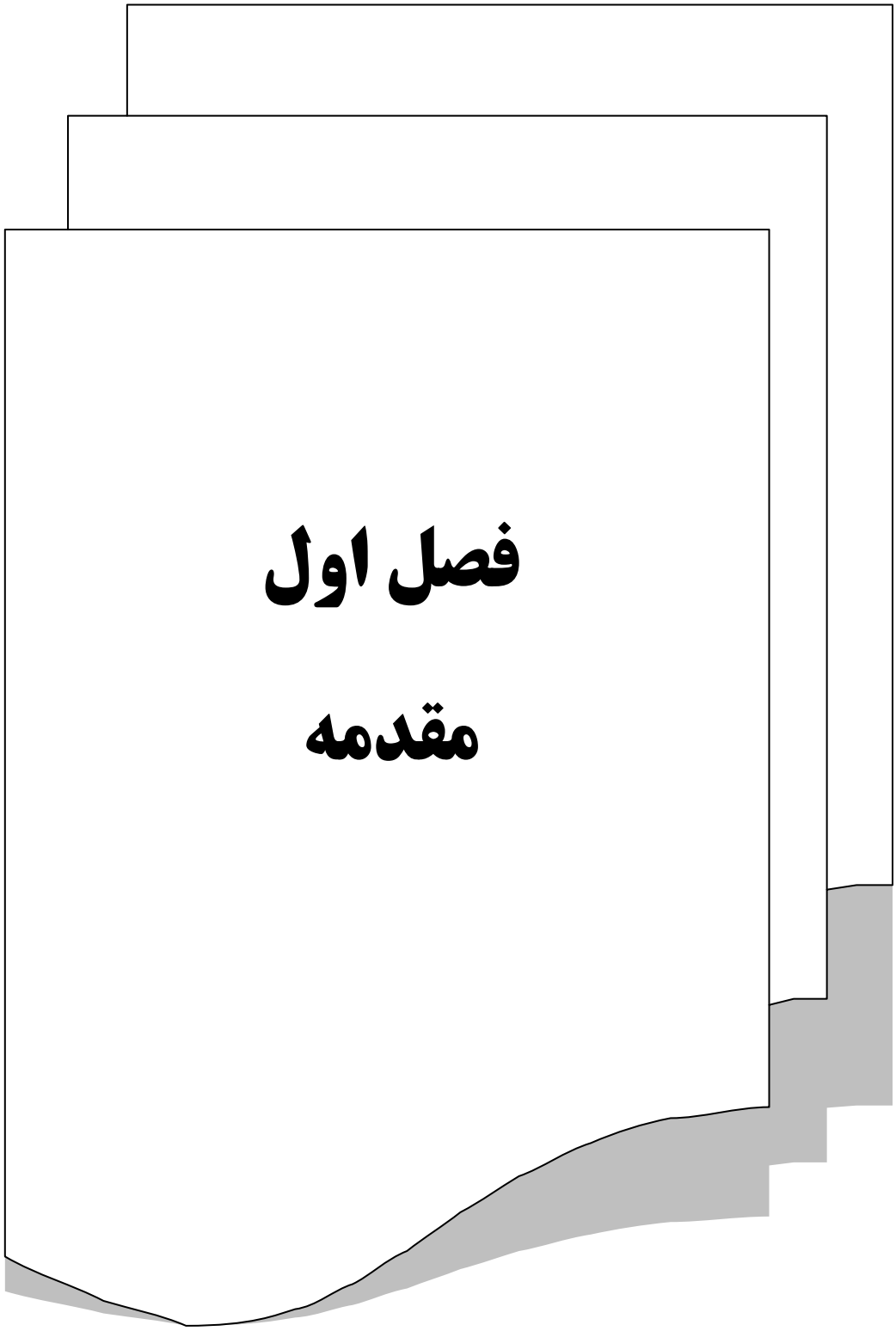
جدول۱۳-۳- هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم محدود کننده *Pst*I..... ۴۸

جدول۱۴-۳- هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم محدود کننده*Eco*RI ۴۹

جدول ۱-۴- بلاست بین توالی های موجود در NCBI با توالی اگزونی ژن APX پراکسیزوم هیرمند..... ۷۱

جدول ۲-۴- بلاست بین توالی‌های موجود درNCBI با توالی کامل ژن APX پراکسیزوم هیرمند ۷۲۴ جفت بازی ۷۳

جدول ۳-۴- بلاست و میزان شباهت توالی های موجود درNCBI با ژن آسکوربات پراکسیداز تیلاکوئید گندم هیرمند..... ۷۵



فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

تنش‌های محیطی از مهمترین عوامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی در سطح جهان هستند، تنش باعث می‌شود که تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و دفاع ضداکسنده در بخش‌های مختلف گیاه از بین برود (Bai and Sui, 2006).گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ،رادیکال هیدروکسیل (HO)، رادیکال آلکاکسیل (RO)، رادیکال پروکسیل (ROO)، هیدروپراکسیل‌های آلی (ROOH)، اکسیژن منفرد (O_2) و رادیکال پرهیدروکسیل (O_2^-) می‌باشد، می‌شود (Arora *et al*., 2002). شرایط نامساعد از قبیل شوری و خشکی باعث افزایش انواع اکسیژن فعال ROS در زمان رشد گیاه می‌شود. ROS ممکن است با درشت مولکول‌هایی از قبیل پروتئین ، لیپید و دئوکسی ریبونوکلئیک اسید واکنش دهد و باعث آسیب به غشا و فعالیت غیر عادی سلول‌ها گردد بنابراین نتیجه این واکنش‌های پیچیده فعال کردن سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX) ، کاتالاز (CAT) ، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) تحت شرایط استرس برای مهار ROS فعال می‌شوند . اغلب گزارش شده است که بیان برخی از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت شرایط استرس افزایش می‌یابد .(Liu *et al*,. 2011). گیاهان برای کاستن از آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال دارای سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی هستند که شامل اجزای غیرآنزیمی مانند آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرولها، کاروتنوئیدها و فلاوونوئیدها و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز(SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیونردوکتاز (GR)، و پلی فنل اکسیداز (PPO) هستند (Agarwal and Pandey, 2004) . همکاری این اجزا با همدیگر سبب تشکیل چرخه‌های بسیار مهمی نظیر آسکوربات گلوتاتیون، مهلر و گزانتوفیل می‌گردد. اجرای این

چرخه‌ها به عنوان مکانیسم‌های دفاعی، سلول را قادر می‌سازد تا از تولید فرم‌های فعال اکسیژن پیشگیری نمایند و یا اینکه آنها را جمع‌آوری نموده و اثرات مضر آنها را کاهش دهند. بعلاوه اجرای این چرخه‌ها سبب افزایش پتانسیل ردوکس سلول شده و با کاهش آسیب به بیومولکول‌های حیاتی، سلول درشرایط تنش محیطی در وضعیت مطلوبتری به سر می‌برد (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸). بیان ژن‌های *APX* به وسیله‌ی فاکتورهای متعددی از قبیل شوری، خشکی، فشار مکانیکی، زخمی شدن، حمله پاتوژن، تشعشع UVB، افزایش و کاهش دما، افزایش اکسیژن پس از یک دوره کاهش آن، آلودگی اتمسفری (مانند دی اکسید سولفور، اکسید نیتروژن، دی اکسید یا اوزون) ، افزایش یون‌های فلزی، کمبود بعضی نمک‌های معدنی (از قبیل فسفات‌ها) و علف‌کش‌ها فعال می‌شود. آسکوربات پراکسیدازها یکی از مهمترین گروه‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی هستند که تعداد ۵ ایزوفرم آنها درگیاهان شناسایی شده است که شامل ایزوفرم‌های سیتوسولی، میتوکندریایی، پراکسیسومال، گلی اکسیمال و کلروپلاستی می‌باشد به عنوان مثال ۸ نوع از ژن APX در آرابیدوپسیس شناسایی شده است که شامل ۳ نوع سیتوزولی (APX1 ، APX2 ، APX6)، ۲ نوع کلروپلاستی (استرومایی sAPX ، تیلاکوئیدی tAPX) و ۳ نوع میکروسومال (APX3 ، APX4 ، APX5) می‌باشد(Dabrowska *et al*., 2007)

آسکوربات پراکسیدازها به صورت عمده در گیاهان عالی، جلبک‌ها و برخی سیانوباکتری‌ها (Sharma and Dubey, 2004) و همچنین در حشرات ، *Trypanosoma cruzi* مخاط عنبیه چشم گاوی و بافت‌های غنی از آسکوربات نیز یافت شده است (Dabrowska *et al*., 2007).

در حقیقت APX با قدرت چسبندگی زیادی که با H_2O_2 دارد می‌تواند در رفع مسمومیت به گیاه کمک کند. در حالی که CAT می‌تواند سرعت این واکنش را بالا ببرد اما قدرت چسبندگی کمی با H_2O_2 دارد و نمی‌تواند به خوبی آن را مهار کند. آنزیم‌های APX مانند یک سیگنال مولکولی می-توانند پراکسید هیدروژن را تنظیم کند (Panchuk *et al*., 2005).

۱-۲- فرضیات تحقیق

۱- توالی ژن APX در گندم هیرمند وجود دارد.

۲- توالی ژن APX در گندم هیرمند مشابه ژن‌های نظیر در سایر ارقام است.

۱-۳- اهداف اصلی تحقیق

۱- به دست آوردن بخشی از توالی نوکلئوتیدی ژن *APX* در رقم گندم هیرمند

۲- مقایسه توالی احتمالی به دست آمده با توالی‌های موجود در سایر ارقام

۱-۴-ضرورت انجام تحقیق

تاکنون تعدادی توالی (CDS) برای گندم در بانک ژن (Gen Bank:www.ncbi.nlm.nih.gov) به ثبت رسیده است به عنوان مثال (جدول ۱-۱) CDS کامل mRNA . (*APX*) پروکسیوسومال آسکوربات پراکسیداز در گندم شناسایی شده است (Chen *et al*., 2006). با این وجود تاکنون توالی ژن *APX* در رقم گندم هیرمند شناسایی و گزارش نشده است. لذا هدف تحقیق بررسی وجود بخشی از توالی نوکلئوتیدی ژن *APX* در گندم رقم هیرمند می‌باشد.

جدول ۱-۱- شماره شناسایی توالی‌های گندم ژن APX موجود در بانک ژن

CDSکامل/ناقص	شماره شناسایی (Accession number)
CDS کامل ژن (APX) تیلاکوئید آسکوربات پراکسیداز در گندم *Triticum aestivum*رقم C 306	AY513261.1
CDS ناقص mRNA آسکوربات پراکسیداز کروموزوم 6BL گندم	AF53297201
CDS. کامل mRNA (APX) تیلاکوئید آسکوربات پراکسیداز گندم رقم C306	AY513262.1
CDS ناقصmRNA آسکوربات پراکسیداز، ژن هسته‌ای برای تولید پلاستید در گندم رقم HD 2009	JQ230567.1
CDSناقص mRNA آسکوربات پراکسیداز، ژن هسته‌ای برای تولیدپلاستید گندم رقمHD 2687	JQ230568.1
CDS ناقص،APX) mRNA) تیلاکوئید آسکوربات پراکسیداز گندم رقمHD2687	AY513263.1
CDS ناقصmRNA آسکوربات پراکسیداز، ژن هسته‌ای برای تولید پلاستید در گندم رقمKharachia65	JQ230566.1
CDS ناقص mRNA آسکوربات پراکسیداز، ژن هسته‌ای برای تولید پلاستید در گندم رقمWL 711	JQ230569.1
CDSکامل mRNA (APX) پروکسیوسومال آسکوربات پراکسیداز در گندم	EF555121.1

فصل دوم

مروری بر منابع

۱-۲- گیاه شناسی گندمیان

تیره گندم از بزرگترین تیره‌های گیاهان گلدار و مرکب از ۶۰۰۰ گونه است که در ۴۵۰جنس جای داده شده‌اند لذا اختصاصات آن‌ها این است که در غالب محیط‌ها به صورت اجتماعات خاص پراکندگی دارند. شکل ظاهر آن‌ها به صورتی است که به مجرد مشاهده هر یک از گونه‌های آن می‌توان تعلق گیاه را به تیره گندم اظهار نمود. گیاهان عموما یکساله یا پایا (بندرت با اعضای چوبی) و از نظر کلی دارای ظاهری شبیه هستند انواع یکساله آنها معمولاً ریشه افشان، انواع چند ساله آن‌ها غالباً ریزوم‌دار هستند. ساقه هوایی گیاهان تیره گندم دارای ساختمان خاصی است که ماشوره نامیده می‌شود از اختصاصات این‌گونه ساقه آن است که شکل استوانه‌ای و جدار نازک دارند، ساقه توخالی می‌باشد مگر در محل گره‌ها که از به هم پیوستن آوندهایی که به برگ می‌روند، فضای خالی ساقه در قسمت گره‌ها پر می‌شود. بعضی نیز مثل ذرت و نیشکر ساقه توپر دارند. برگ گیاهان این تیره معمولا از پهنک برگ نواری شکل و دارای رگبرگ‌های موازی و غلافی شکاف‌دار تشکیل شده است. در گیاهان تیره گندم گل‌ها به شکل خاصی مجتمع می‌باشند که مجموعا سنبلک (Epillet) نامیده می‌شوند. هر سنبلک دارای براکته‌هایی کوچک و غیر زایائی به نام پوشینه (Glume) در خارج است در داخل این پوشینه‌ها براکته‌های کوچک دیگری بر روی محور سنبلک دیده می‌شود که پوشینک (Glumelle) نام دارد. گیاهان تیره گندم به استثنای معدودی از آن‌ها مانند ذرت گل‌هایی با پرچم و مادگی دارند پرچم‌های آن‌ها به تعداد ۳ و واقع در یک ردیف است (بندرت ممکن است تعداد پرچم‌ها زیادتر یا کمتر باشند) چون در گیاهان تیره گندم رسیدن دانه گرده معمولاً قبل از مادگی صورت می‌گیرد از این جهت گرده‌افشانی از طریق گرده‌افشانی غیرمستقیم صورت می‌گیرد، مگر در انواعی از آن‌ها که گل‌ها پس از رسیدن کامل پرچم و مادگی نیز ناشکفته باقی می‌مانند. میوه این گیاهان به صورت گندمه (Cariops) است و

آن فندقه‌ای است که جدارهای میوه آن به صورت لایه نازکی به غشای دانه چسبیده باقی می‌ماند (طاهرنژاد، ۱۳۸۵).

۲-۲- مشخصات خانواده آسکوربات پرکسیداز گیاهی

یک قسمت مهم از سیستم آنتی اکسیداتیو، نگهداری تعادل و فعالیت پیوسته در سلول‌های گیاهی است. نقش مهم APXها کنترل پراکسید هیدورژن محبوس شده در سلول هاست. در واکنش آنزیم‌ها از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌شود و جایگاه فعال نیز با هر تعدادی از خانواده APX بسیار محافظت شده است. APXها متعلق به کلاس I از خانواده بزرگ باکتری‌ها، قارچ‌ها، پراکسیدازهای گیاهی است. همه ایزوفرم‌ها با هم از لحاظ وزن مولکولی، PH اپتیمم، پایداری، خصوصیات سوبسترایی، محل و سطح پاسخ به شرایط تنشی خاص با هم تفاوت دارند. اما، این ژن‌های مسئول پیرو چندین رویداد نسخه برداری در جریان انتخاب طبیعی ایجاد شده اند (Dabrowska *et al.*, 2007).

تغییر شرایط محیطی اغلب منبع استرس برای گیاهان محسوب می‌شود که گیاهان با تولید مفرط رادیکال‌های آزاد هیدروژن به آن پاسخ می‌دهند. انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) به اجزای سلولی از قبیل DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب می‌زنند. تولید بسیار زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن منجر به مرگ سلولی می‌شود (Pellinen *et al*.,2002;Vranova *et al*.,2002).

ROS ها اغلب در پروسه‌های گوناگون متابولیکی از قبیل ساختمان لیگنین در دیواره سلولی(Inzed and Montagu, 1995)، ریزش برگ و گل ، پیری، رسیدن میوه و گلدهی به کار می‌روند (Mehlhorn *et al.*, 1996).

در مسیر تکامل، ارگانیسم‌ها سیستم‌های آنتی اکسیدانی پیچیده‌ای را برای حفظ تعادل و عملکرد مؤثر سلول توسعه می‌دهند. دو نوع سیستم آنتی‌اکسیدانی، آنزیمی و غیرآنزیمی وجود دارد. در سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، گلوتاتیون، فلاونوئید، توکوفورل، کارتنوئید، آسکوربیک