بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه گیلان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسي

پایان نامه ی کارشناسي ارشد رشته ی فیزیولوژی گیاهي

اثر افزایش غلظت کلر در آب آبیاری بر میزان بیان ژن APX در گیاه توتون به روش زایموگرام

استاد راهنما:

دکتر اکبر نورسته نیا

استاد مشاور:

دکتر رضا شکسته بند

نگارش:

سعید مهدوی

۱۳۹۰

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

که با عشق مرا پرورانند و با حمایت خود زمینه‌ی تحصیل را برایم مهیا نمودند.

و با سپاس ویژه از:

برادران مهربانم امید و فرید برای تمام حمایت‌هایشان

سرکار خانم شیوا رضایی به خاطر همه کمک‌هایش

تشکر و قدردانی:

ابتدا بر خود واجب دانستم از زحمات بی دریغ اساتید ارجمندم

جناب آقای دکتر نورسته نیا در مقام استاد راهنما و معلم بزرگواری که صبورانه در پیش برد مراحل مختلف پایان نامه مرا یاری نمودند.

سرکار خانم دکتر سرمد که از راهنمایی های دلسوزانه ایشان بهره مند شدم.

جناب آقای دکتر افشار محمدیان ، آقای دکتر سعیدی ، آقای دکتر حسن ساجدی ، آقای دکتر تقدیر و خانم دکتر قناتی که افتخار شاگردی ایشان را داشتم.

سرکار خانم دکتر سریری که داوری پایان نامه را تقبل نمودند.

و سرکار خانم هادوی ، جمال امیدی و مسئولین آزمایشگاه های بیوشیمی و میکروب که دلسوزانه در فراهم نمودن شرایط پژوهش تلاش نمودند کمال قدردانی را بنمایم.

از تمام دوستانم در آزمایشگاه های فیزیولوژی گیاهی، بیوشیمی، تکوین، سیستماتیک گیاهی و ژنتیک به خاطر همه زحمت هایی که برایم کشیدند ممنونم.

چکیده

اثر افزایش غلظت کلر در آب آبیاری بر میزان بیان ژن APX در گیاه توتون به روش زایموگرام

سعید مهدوی

شوری حاصل از کلر یک عامل محدود کننده در رشد گیاه است. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در برابرعوامل اکسید کننده به عنوان یک واکنش تدافعی گیاه درمقابله با تنش محسوب می شود و آنزیم هایی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX) از جمله مهم ترین اجزای این سیستم دفاعی است. در این تحقیق اثرات سه غلظت آب آبیاری (۰/۷، ۲/۱ و ٤/۲۲ میلی مولار کلرید کلسیم) بر روند فعالیت این آنزیم، محتوای مالون دآلدهید (MDA)، پروتئین کل برگ و زایموگرام آنزیم APX در گیاه توتون رقم کوکر ۳٤۷ به ترتیب با روش اسپکتروفتومتری و استفاده از ژل PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش غلظت کلرید کلسیم تا ۲/۱ میلی مولار، با افزایش معنی دار فعالیت آنزیم APX همراه بود؛ اما افزایش غلظت از ۲/۱ به ٤/۲۲ میلی مولار باعث کاهش معنی دار فعالیت این آنزیم شد. نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر MDA نشان داد که افزایش غلظت کلرید کلسیم در هر دو سطح ۲/۱ و ٤/۲۲ میلی مولار باعث افزایش معنی دار آن می شود. مقدار پروتئین کل با افزایش غلظت از ۰/۷ به ۲/۱ و از ۲/۱ به ٤/۲۲ میلی مولار کلرید کلسیم، به ترتیب روندی صعودی و نزولی را نشان داد؛ هر چند این تغییرات معنی دار نبود. بررسی مقایسه ای زایموگرام آنزیم APX وجود حداقل دو ایزوفرم از این آنزیم را نشان داد، همچنین افزایش شدت باندهای ایجاد شده در تیمار ۲/۱ و کاهش شدت این باندها برای تیمار ٤/۲۲ میلی مولار کلرید کلسیم با سایر داده های بدست آمده در این مطالعه هماهنگ بوده و یافته های حاصل از نتایج اسپکتروفتومتری را نیز تایید کرد.

کلمات کلیدی: توتون رقم کوکر ۳٤۷، کلرید کلسیم، آسکوربات پراکسیداز، مالون دآلدهید، پروتئین کل، زایموگرام

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	د
چکیده انگلیسی	ذ
فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع	۱
۱-۱-پیش گفتار	۲
۱-۲-اعمال فیزیولوژیک کلر در گیاه	۲
۱-۳-جذب و انتقال کلر در گیاهان	۳
۱-۳-۱-مسیر انتقال کلر از خاک به ریشه و از ریشه به اندام هوایی	۳
۱-۳-۲-بررسی ناقل های انتقال یون کلر موجود در غشاهای سلول گیاهی	٤
۱-٤-سمیت کلر و تقسیم بندی گیاهان براساس تحمل به آن	٦
۱-۵-گیاه شناسی توتون و کاربردهای آن	۷
۱-٦-مفهوم شوری، تنش شوری	۸
۱-۷-مشکلاتی که شوری زیاد بر گیاه تحمیل می کند	۸
۱-۸-استراتژی گیاه در مواجه با شوری	۹
۱-۹-اثر شوری بر بروز آسیب های اکسیداتیو	۱۰
۱-۱۰- انواع **Ros** ها، عملکردشان در سلول، اندامک های سلولی تولید کننده **Ros** و رابطه شوری با تولید آن ها	۱۰
۱-۱۰-۱- نحوه و جایگاه ایجاد **ROS** ها	۱۱
۱-۱۱- بررسی عملکرد **ROS** ها به عنوان عوامل آسیب بیومولکول های مهم	۱۳
۱-۱۱-۱- پراکسیداسیون لیپیدی	۱۳
۱-۱۱-۲- تغییر پروتئین ها	۱٤
۱-۱۱-۳-آسیب به **DNA**	۱۵
۱-۱۲- بررسی مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی سلول گیاه بر ضد **ROS**	۱۵
۱-۱۲-۱- آنتی اکسیدانت های غیر آنزیمی	۱٦
۱-۱۲-۱-۱- آسکوربیک اسید (ویتامین **C**)	۱٦
۱-۱۲-۱-۲- گلوتاتیون	۱۷
۱-۱۲-۱-۳-**α**-توکوفرول (ویتامین **E**)	۱۷
۱-۱۲-۱-٤- کاروتنوئید ها	۱۸
۱-۱۲-۲-آنتی اکسیدان های آنزیمی	۱۸
۱-۱۲-۲-۱- ویژگی ها وعملکرد **SOD**	۱۹
۱-۱۲-۲-۲-ویژگی ها و عملکرد کاتالاز **CAT**	۲۰
۱-۱۲-۲-۳- ویژگی ها و عملکرد گایاکول پراکسیداز (**Gpox**)	۲۱

۱-۱۲-۲-٤- آنزیم های چرخه ASA-GSH	**۲۱**
۱-۱۲-۲-٤-۱-بررسی آنزیم MDHAR	۲۲
۱-۱۲-۲-٤-۲-بررسی آنزیمDHAR	**۲۲**
۱-۱۲-۲-٤-۳-بررسی آنزیم GR	**۲۳**
۱-۱۲-۲-٤-٤-بررسی جزئیات آنزیم APX	**۲۳**
۱-۱۲-۲-٤-٤-۱-خصوصیات ساختار APX و نحوه عمل آن	**۲٤**
۱-۱۲-۲-٤-٤-۲-ایزوفرم های APX ها و موقعیت درون سلولی آن ها	**۲۵**
الف-بررسی ایزوفرم سیتوزولی (cAPX)	**۲٦**
ب-بررسی ایزوفرم پراکسی زومی	**۲٦**
ج-بررسی ایزوفرم های کلروپلاستی (sAPX و tAPX)	**۲٦**
د-بررسی ایزوفرم میتوکندریایی	**۲٦**
۱-۱۳-مروری بر پژوهش های گذشته	**۲۷**
۱-۱٤-اهداف پژوهش	**۲۹**
فصل دوم: مواد و روش ها	**۳۰**
۲-۱-تجهیزات و مواد شیمیایی	**۳۱**
۲-۱-۱- مواد شیمیایی	۳۱
۲-۱-۲-تجهیزات	۳۱
۲-۲-روش نمونه برداری	**۳۱**
۲-۳-روش استخراج آنزیم از گیاه	**۳۲**
۲-۳-۱-ساخت بافر استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)	**۳۲**
۲-۳-۲-روش استخراج	**۳۳**
۲-٤-سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)	**۳۳**
۲-٤-۱- اجزاء مخلوط واکنش	**۳٤**
۲-٤-۲- روش سنجش	**۳٤**
۲-۵-سنجش پروتئین کل به روش برادفورد	**۳٤**
۲-۵-۱-تهیه معرف (۵ x)	**۳۵**
۲-۵-۲-روش انجام آزمایش	**۳۵**
۲-٦-سنجش فعالیت APX به روش PAGE	**۳٦**
۲-٦-۱-بافر ها و معرف های لازم جهت انجام Native - PAGE روی APX	**۳٦**
۲-٦-۲-دستور تهیه ژل پایین و بالا	**۳۷**
۲-٦-۳-روش کار	**۳۹**
۲-٦-٤-شناسایی محل آنزیم APX روی ژل	**۳۹**
۲-۷- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی	**٤۰**

۲-۷-۱- روش اندازه گیری مالون دی آلدهید ٤٠

فصل سوم: نتایج ٤١

۳-۱- اندازه گیری غلظت پروتئین کل ٤٢

۳-۱-۱-نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت پروتئین کل در رقم کوکر۳٤۷ ٤٣

۳-۲-تاثیر غلظت های مختلف کلرید کلسیم در آب آبیاری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ٤٣

۳-۳- بررسی تاثیر غلظت های مختلف کلرید کلسیم آب آبیاری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از الکتروفورز Native-PAGE ٤٤

۳-۳-۱- مشاهده ایزوفرم های آسکوربات پراکسیداز و اثر غلظت های کلر بر شدت باند آن ها ٤٤

۳-۳-۲-نتایج حاصل از بررسی شدت باندهای آسکوربات پراکسیداز در روی ژل، با استفاده از نرم افزار total lab ٤٥

۳-٤-اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی ٤٧

۳-٤-۱- نتایج حاصل از سنجش پراکسیداسیون لیپیدی در رقم کوکر ۳٤۷ ٤٧

فصل چهارم: بحث ٤٨

٤-۱-اثر غلظت های مختلف $CaCl_2$ برمحتوای مالون دی آلدهید (MDA) ٤٩

٤-۲-اثر غلظت های مختلف$CaCl_2$ بر محتوای پروتئین کل ٤٩

٤-۳-اثر غلظت های مختلف $CaCl_2$ بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ٥٠

٤-٤-اثر غلظت های مختلف $CaCl_2$ بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و بیان ایزوزایم های آن با بررسی ژل PAGE ٥١

فصل پنجم: ضمیمه ٥٣

فصل ششم: منابع ٥٨

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول۱-۱-تقسیم بندی جنس Nicotiana در بخش های مختلف	۷
جدول ۱-۲-ROS های مهم گیاهی و ویژگی های آن ها	۱۱
جدول۱-۳-آنتی اکسیدان های آنزیمی و واکنش های کاتالیز شده توسط آن ها	۱۹
جدول۱-٤-ایزوفرم های مختلف SOD و خصوصیت آن ها	۱۹
جدول۱-۵-خانواده ژنی APX در *Arabidopsis thaliana*	۲۵
جدول ۲-۱- اجزاء تشکیل دهنده ml ۱۲ ژل پایین، به ترتیب اضافه کردن (برای ژل کوچک)	۳۷
جدول ۲-۲- اجزاء تشکیل دهنده ml ۵ ژل بالا، به ترتیب اضافه کردن (برای ژل کوچک)	۳۸
جدول ۲-۳- اجزاء تشکیل دهنده ml ۱۸ ژل پایین، به ترتیب اضافه کردن (برای ژل بزرگ)	۳۸
جدول ۲-٤- اجزاء تشکیل دهنده ml ۸ ژل بالا، به ترتیب اضافه کردن (برای ژل بزرگ)	۳۸

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار۳-۱–منحنی استاندارد به روش برادفورد ٤٢

نمودار ۳-۲- تغییرات غلظت پروتئین کل در برگ های یازدهم یا دوازدهم توتون رقم کوکر ۳٤۷، تحت غلظت های مختلف کلرید کلسیم آبیاری ٤۳

نمودار ۳-۳–اثر غلظت های مختلف کلرید کلسیم در آب آبیاری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه توتون رقم کوکر ۳٤۷ ٤٤

نمودار ۳-٤–تغییرات سطح زیر منحنی ایزوفرم ۱ آسکوربات پراکسیداز در رقم کوکر ۳٤۷، تحت اثر غلظت های مختلف کلرید کلسیم آب آبیاری ٤٦

نمودار ۳-۵–تغییرات سطح زیر منحنی ایزوفرم ۲ آسکوربات پراکسیداز در رقم کوکر ۳٤۷، تحت اثر غلظت های مختلف کلر آب آبیاری ٤٦

نمودار ۳-٦- تغییرات غلظت MDA برگ رقم کوکر ۳٤۷ در پاسخ به غلظت های مختلف کلر آب آبیاری در مرحله رسیدگی برگ های میانی ٤۷

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱-سه کانال ناقل با قابلیت انتقال یون کلر به آوند چوبی، در غشای پلاسمایی سلول های ریشه جو ۵

شکل۱-۲-جایگاه های تولید Ros در سلول های گیاهی ۱۲

شکل۱-۳-مکانیسم پیشنهادی، جهت ایجاد MDA؛ که شامل سه مرحله ی ۱- تشکیل هیدروپراکسید ۲- تشکیل هیدروپراکسی آلدهید و ۳- تشکیل MDA است ۱٤

شکل۱-٤-طرحی از چرخه ASA-GSH ۲۲

شکل۱-۵-a) طرح شماتیک آسکوربات پراکسیداز. b) نمای بسته از جایگاه فعال آنزیم ۲٤

شکل۱-٦-ساختار پروتئینی ایزوفرم های APX ۲۵

شکل۳-۱-Native-PAGE ۱۰٪ آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بافت برگ توتون رقم کوکر ۳٤۷ که تحت تیمارهای ۰/۷، ۲/۱ و ٤/۲۲ میلی مولار کلرید کلسیم آب آبیاری قرار داشت. ٤۵

شکل۳-۲-Native-PAGE ۱۲/۵٪ آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بافت برگ توتون رقم کوکر ۳٤۷ که تحت تیمارهای ۰/۷، ۲/۱ و ٤/۲۲ میلی مولار کلرید کلسیم آب آبیاری قرار داشت. ٤۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱-پیش گفتار

کلر ریزمغذی ضروری برای گیاهان عالی است (Marschner, 1995). این ماده توسط کود، باران، استفاده از آب آبیاری، گرد و غبار وآلودگی هوا در خاک تجمع می یابد (Hewitt and Smith, 1974). مقادیر کلر به طور طبیعی در خاک های مجاور دریاها ودریاچه ها، زیاد است. منابع آنتروپوژنیک[1] مانند علف کش ها، حشره کش ها، مواد دارویی وشیرین کننده های مصنوعی نیز باعث افزایش غلظت کلر در خاک می شوند. در این شرایط به ندرت کمبود کلر برای گیاه پیش می آید ومشکل اساسی گیاه در مواجه با کلر، زیاد بود آن است. سمیت کلر عامل محدود کننده کشاورزی در مناطق شور می باشد (Xu *et al.*, 2000).

تحقیقات نشان داده است که یون کلر عامل سمیت نمک های کلرداری مانند NaCl و $CaCl_2$ می باشد. آب آبیاری نیز مقادیر متغییری نمک دارد (Flowers, 1999). تحت آبیاری مداوم نمک خاک افزایش خواهد یافت. شوری خاک فرایندهای متابولیکی وغیرمتابولیکی گیاه را تحت تاثیر قرار داده واثرات منفی بر رشد گیاهان، به ویژه گیاهان گلیکوفیت می گذارد (Greenway and Munns, 1980). اغلب گیاهان، به ویژه گیاهان زراعی، به شوری حساس بوده وقادر به تحمل آن در دوره های طولانی نیستند (Kramer *et al.*, 1978).

با افزایش جمعیت آدمی، تقاضا برای غذا افزایش می یابد (Flowers, 1999)، در حالی که ورود نمک به مزارع باعث کاهش تولید گشته (Rus *et al.*, 2001)، وبقاء آدمی را با خطر مواجه خواهد نمود. از آنجایی که یافتن گیاهانی با توان تحمل بالا به شوری و دادن محصول بیشتر، در شرایط تنش، امری ضروری است؛ بنابراین درک مولکولی مقاومت به شوری، جهت انتخاب استراتژی برای اصلاح تحمل به شوری مفید خواهد بود. به علاوه دانستن ژن ها یا پروتئین هایی که به شوری پاسخ می دهند، برای ایجاد گیاهان مقاوم، توسط تکنیک های مهندسی ژنتیک به نظر حیاتی میرسد (Sairam and Tyagi, 2004).

۱-۲-اعمال فیزیولوژیک کلر در گیاه

کلر در شکل باردارش، به نام کلرید، توسط گیاهان جذب می شود. کلر درون گیاه به دو حالت وجود خواهد داشت:

۱-ترکیبات آلی کلردار (Engvild, 1986).

۲-کلرید، که بخش اعظم کلر در گیاه به این صورت است.

[1] Anthropogenic

این ماده اعمال متعددی را در گیاهان انجام می دهد. یون کلر قادر است آنزیم هایی مانند آسپاراژین سنتتاز (Rognes, 1980)، آمیلاز (Metzler, 1979) و ATPase (Churchill *et al*., 1984) را به حداکثر فعالیت شان برساند. در فتوسنتز به عنوان کوفاکتور ضروری برای فعال سازی آنزیم آزادکننده اکسیژن، که با PSII[۲] در ارتباط است، عمل می نماید (Izawa *et al*., 1969). در تنظیم اسمزی نقش بسیار مشهودی دارد، به طوری که تجمع آن در سلول های گیاهی، آب بافت را افزایش داده (Heckman, 1989)، و تاثیر بسزایی در افزایش فشار تورگر دارد (Christensen *et al*., 1981). یون کلر همراه با پتاسیم نقش مهمی در باز و بسته نمودن روزنه داشته (Lee *et al*., 1991) و با عمل به عنوان تنظیم کننده اسمزی[۳]، رشد سلول های ریشه و ساقه را بهبود می بخشد (Hager *et al*., 1981). یون کلر با عمل به عنوان بار متقابل[٤]، جذب کاتیون های ضروری مانند پتاسیم، منیزیم، کلسیم و آنیون هایی مانند نیترات و سولفات را تحت تاثیر قرار می دهد (Heckman *et al*., 1996).

۱-۳-جذب و انتقال کلر در گیاهان

جذب وانتقال کلر را در گیاه طی دو بخش بررسی می کنیم.

۱-۳-۱-مسیر انتقال کلر از خاک به ریشه و از ریشه به اندام هوایی

گیاه اکثر کلر خود را از خاک، به صورت یون کلر جذب می کند. برای رشد، یون کلر به درون آوند چوبی[۵] بارگذاری شده و از طریق آن به اندام هوایی فرستاده می شود. دو مسیر برای ورود کلر به درون آوند چوبی وجود دارد:

۱-مسیر سیمپلاستی[٦]: طی این مسیر، کلر از غشای پلاسمایی و پلاسمودسماتاها[۷] عبور کرده و سپس صادر می گردد. مسیر فوق حداقل دارای۲ انتقال دهنده ی یون کلر در غشای پلاسمایی است.

۲-مسیر آپوپلاستی[۸]: طی این مسیر، آنیون توسط جریان آب، از فضای بین سلولی و دیواره سلولی عبور می کند. این مسیر نسبتا غیر انتخابی است. نوار کاسپاری[۹] موجود بر دیواره سلول های اپیدرمی و آندودرمی این نوع حرکت را محدود می کند (White et al., 2001).

[2] Photosystem II
[3] Osmoregulatory
[4] Opposite charge
[5] Xylem
[6] Symplastic pathway
[7] Plasmodesmata
[8] Apoplastic pathway
[9] Casparian strip

از بین دو مسیر فوق الذکر، مسیر سیمپلاستی مسیر غالب است (Pitman, 1982). آوند چوبی یون کلر را از ریشه به ساقه منتقل می کند. سپس توسط آوند آبکش[10]، باز توزیع[11] کلر در گیاه انجام می گردد.

۱-۳-۲-بررسی ناقل های انتقال یون کلر موجود در غشاهای سلول گیاهی

انتقال آنیون ها از عرض غشای پلاسمایی، معمولا فرایندی فعال است، که با انتقال پروتون همراه می باشد. یون کلر و نیترات، بر خلاف شیب الکتروشیمیایی خود جذب ریشه گیاه می شوند (Runge, 1983). بنابراین در شرایط معمول که غلظت یون کلر درون سیتوپلاسم حدود ۲۰ میلی مولار است، ورود و تجمع یون کلر به طریق فعال انجام شده، که احتمالا این کار را سیمپورتر[12] پروتونی انجام می دهد.

Felle نشان داد (1994)، در غشاء پلاسمایی سلول های تار کشنده *Sinapis alba* ، سیمپورتر الکتروژنیک Cl^- /$2H^+$ وجود دارد.

غلظت بالای یون کلر در محیط خارج سلول (مثلا در شوری زیاد) باعث ورود سدیم به درون سلول شده و پتانسیل غشاء پلاسمایی را دپولاریزه کرده و بدین ترتیب ورود یون کلر به صورت غیر فعال از طریق کانال های آنیونی ممکن می گردد (Skerrett *et al.*, 1994).

غشاءپلاسمایی در سلول های نگهبان روزنه گیاه *Vicia faba* دارای سه کانال نفوذ پذیر به یون کلر می باشد:

۱-کانال های آنیونی سریع فعال شونده[13] (R-type)

۲-کانال های آنیونی کند فعال شونده[14] (S-type)

۳-کانال های آنیونی فعال شونده بوسیله افزایش حجم[15]

غشاء پلاسمایی سلول های لپه ی *Amaranthus tricolor*، دارای نوع دیگری کانال یون کلر نیز هستند که کانال آنیونی فعال شده توسط هیپرپولاریزاسیون نامیده می شود (Terry *et al.*, 1992).

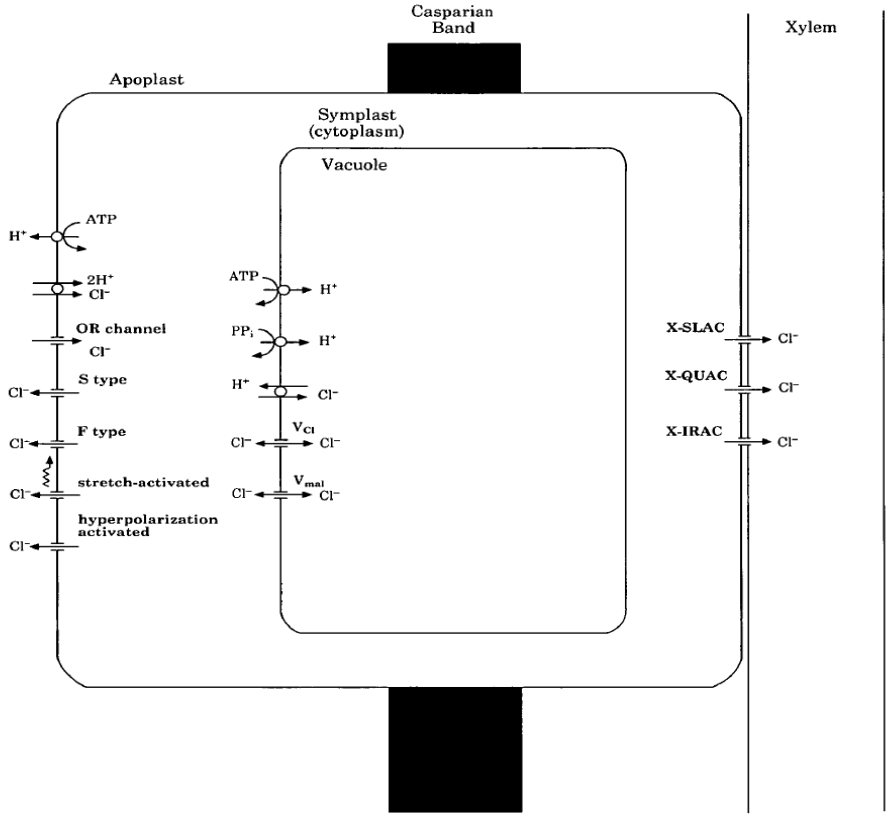
با بررسی غشاء پلاسمایی در سلول های پارانشیم آوند چوبی ریشه جو، سه کانال ناقل با قابلیت انتقال یون کلر به آوند چوبی، شناسایی شده است (Kohler *et al.*, 2000). این کانال ها به قرار زیرند (شکل۱-۱):

۱-x-SLAC[16] (مترادف S-type)

۲-x-QUAC[17] (مترادف R-type)

[10] Phloem
[11] Redistribution
[12] Symporter
[13] Rapidly activating anion channel
[14] Slowly activating anion channels
[15] Stretch –activating anion channels
[16] Slowly activating anion conductance
[17] Quickly activating anion conductance

۳-x-IRAC[۱۸]



شکل۱-۱-سه کانال ناقل با قابلیت انتقال یون کلر به آوند چوبی، در غشای پلاسمایی سلول های ریشه جو (White *et al*., 2001)

سلول های گیاهی قادر به تحمل غلظت بالای یون کلر در سیتوپلاسم خود نمی باشند. بنابراین باید غلظت آن را در سطح پایین حفظ نمایند. سطح معمول یون کلر درون سیتوپلاسم سلول ۱۰-۲۰ میلی مولار می باشد (Felle, 1994). یک راهکار برای حفظ این غلظت، ورود یون کلر به واکوئل است. عوامل دخیل در انتقال یون کلر از سیتوپلاسم به واکوئل عبارتند از:

۱-سیستم آنتی پورتری H^+/CL^-[۱۹] (Pantoja *et al*., 1989)

۲-کانال های یونی (Martinoia *et al*., 1986)

[18] Inwardly rectifying anion channel
[19] H^+/CL^- antiporter

کانال های یون کلر واقع در تونوپلاست سلول های گیاهی شامل V_{cl}[20] و V_{mal}[21] می باشند. دو کانال ذکر شده از جمله کانال هایی هستند که توسط هیپرپولاریزاسیون فعال می شوند(White *et al.*, 2001).

۱-٤-سمیت کلر و تقسیم بندی گیاهان براساس تحمل به آن

اغلب گیاهان برای انجام رشد مناسب به مقدار ۰/۳ الی ۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک از یون کلر نیاز دارند (Marschner, 1986). کمبود کلر در شرایط محیطی بندرت رخ میدهد، زیرا میزان نیاز گیاه به آن بسیار کم بوده و توسط املاح موجود در باران تامین می گردد (Marschner, 1995). در عوض احتمال سمیت آن، به دلیل شور بودن اغلب خاک های زراعی بیش تر است. بر خلاف ریز مغذی های[22] دیگر، افزایش غلظت آن در گیاهان، سمیت ایجاد نمی کند. علائم مشاهده شده در رابطه با سمیت کلر مربوط به اثر اسمزی خاک های شور است. به عبارت دیگر سمیت کلر مربوط به شرایط شوری است (Mengel *et al.*, 1987). علاوه برآن به دلیل این که ویژگی های مشابه بین یون کلر و نیترات وجود دارد، این عنصر بر فعالیت نیترات ردوکتاز اثر می گذارد. به طور کلی تشخیص سمیت کلر به دلایل زیر مشکل است:

۱-تفکیک اثرات یون کلر از کاتیون همراه (معمولا سدیم) با آن دشوار است.

۲-تشخیص بین اثر سمی یون و دهیدراته شدن سلول (به علت غلظت خارجی آن)، دشوار خواهد بود.

گیاهان از نظر مقاومت به نمک های کلردار بسیار متنوع اند. این تنوع در گونه های زراعی و گیاهان موجود در یک گونه مشاهده می شود. گیاهان را براساس پاسخی که به غلظت یون کلر خارجی می دهند به ٤ دسته تقسیم می نمایند (Greenway and Munns, 1980):

۱-هالوفیت ها[23]: که خودشان به دو دسته تقسیم می شوند.

الف-گونه هایی که رشد آن ها با غلظت زیاد یون کلر تحریک می شود مثل *Sueda maritima*

ب-گونه هایی که رشد آن ها توسط غلظت ۲۰۰ میلی مولار یون کلرخارجی چندان تحت تاثیر قرار نمی گیرد (مانند چغندر قند).

۲-هالوفیت ها و گلیکوفیت هایی[24] که رشد آن ها توسط غلظت ۱۰۰ میلی مولار یون کلر کاهش می یابد. این گروه را می توان به ۳ زیر دسته تقسیم کرد:

الف-گونه های متحمل[25] مثل کتان

[20] Vacuole
[21] Malate
[22] Micronutrient
[23] Halophytes
[24] Glycophytes

ب-گونه های حدواسط[۲۶] مثل گوجه فرنگی

ج-گونه های حساس مثل نخود

۳-گلیکوفیت های بسیار حساس مثل *Citrus*

۱-۵-گیاه شناسی توتون و کاربردهای آن

Solanaceae خانواده ای بزرگ از گیاهان نهاندانه است. این خانواده شامل تعداد زیادی گیاه اقتصادی است. Nicotiana یکی از جنس های مهم این خانواده است (Goodspeed, 1954)، که پنجمین جنس این خانواده از نظر بزرگی، بعد از جنس های Solanum، Cestrum، Physalis و Lycium می باشد. نامگذاری جنس Nicotiana به افتخار دیپلمات فرانسوی به نام Jean nicot انجام گرفت. گونه های موجود در این جنس از نظر مورفولوژی، تنوع گل و ارتفاع در هنگام بلوغ بسیار متغییرند. خلاصه ای از تقسیم بندی جدید بخش ها[۲۷] در جنس Nicotiana در جدول ۱ آمده است. این جنس دارای ۷۵ گونه می باشد (Clarkson et al., 2004).

Nicotiana section	Included species (with authorities)
Alatae	*Nicotiana alata* Link and Otto; *Nicotiana azambujae* L.B. Smith and Downs; *Nicotiana bonariensis* Lehm.; *Nicotiana forgetiana* Hemsl.; *Nicotiana langsdorffii* Weinm.; *Nicotiana longiflora* Cav.; *Nicotiana mutabilis* Stehmann and Samir; *Nicotiana plumbaginifolia* L.
Nicotiana	*Nicotiana tabacum* L.
Noctiflorae	*Nicotiana acaulis* Speg.; *Nicotiana ameghinoi* Speg.; *Nicotiana glauca* Graham; *Nicotiana noctiflora* Hook; *Nicotiana paa* Mart. Crov.; *Nicotiana petuniodes* (Griseb.) Millán
Paniculatae	*Nicotiana benavidesii* Goodsp.; *Nicotiana cordifolia* Phil.; *Nicotiana cutleri* D'Arcy; *Nicotiana knightiana* Goodsp.; *Nicotiana paniculata* L.; *Nicotiana raimondii* J.F. Macbr.; *Nicotiana solanifolia* Walp.
Petunioides	*Nicotiana acuminata* (Graham) Hook.; *Nicotiana attenuata* Torrey ex S. Watson (Fig. 1F); *Nicotiana corymbosa* J. Rémy; *Nicotiana linearis* Phil; *Nicotiana longibracteata* Phil.; *Nicotiana miersii* J. Rémy; *Nicotiana pauciflora* J. Rémy; *Nicotiana spegazzinii* Millán
Polydicliae	*Nicotiana clevelandii* A. Gray; *Nicotiana quadrivalvis* Pursh
Repandae	*Nicotiana nesophila* I.M. Johnston; *Nicotiana nudicaulis* S. Watson; *Nicotiana repanda* Willd.; *Nicotiana stocktonii* Brandegee
Rusticae	*Nicotiana rustica* L.
Suaveolentes	*Nicotiana africana* Merxm.; *Nicotiana amplexicaulis* N.T.Burb.; *Nicotiana benthamiana* Domin; *Nicotiana burbidgeae* Symon; *Nicotiana cavicola* N.T.Burb.; *Nicotiana debneyi* Domin; *Nicotiana excelsior* (J.M.Black) J.M.Black; *Nicotiana exigua* H.-M.Wheeler; *Nicotiana fragrans* Hooker; *Nicotiana goodspeedii* H.-M.Wheeler; *Nicotiana gossei* Domin; *Nicotiana hesperis* N.T.Burb.; *Nicotiana heterantha* Kenneally and Symon; *Nicotiana ingulba* J.M.Black; *Nicotiana maritima* H.-M.Wheeler; *Nicotiana megalosiphon* Van Huerck and Müll.Arg.; *Nicotiana occidentalis* H.-M.Wheeler; *Nicotiana rosulata* (S. Moore) Domin; *Nicotiana rotundifolia* Lindl.; *Nicotiana simulans* N.T.Burb.; *Nicotiana stenocarpa* H.-M.Wheeler; *Nicotiana suaveolens* Lehm; *Nicotiana truncata* D.E. Symon; *Nicotiana umbratica* N.T.Burb.; *Nicotiana velutina* H.-M.Wheeler; *Nicotiana wuttkei* Clarkson and Symon
Sylvestres	*Nicotiana sylvestris* Speg. and Comes
Tomentosae	*Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi; *Nicotiana otophora* Griseb.; *Nicotiana setchellii* Goodsp.; *Nicotiana tomentosa* Ruiz and Pav.; *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp.
Trigonophyllae	*Nicotiana obtusifolia* M. Martens and Galeotti; *Nicotiana palmeri* A. Gray
Undulatae	*Nicotiana arentsii* Goodsp.; *Nicotiana glutinosa* L.; *Nicotiana thrysiflora* Bitter ex Goodsp.; *Nicotiana undulata* Ruiz and Pav.; *Nicotiana wigandioides* Koch and Fintelm.

[25] Tolerant
[26] Intermediate
[27] Section

جدول۱-۱-تقسیم بندی جنس Nicotiana در بخش های مختلف، مطابق نظر Knapp و همکاران(2004)

گونه *Nicotiana tabacum* دارای 2n=4x=48 است. این گونه تقریبا ٦ میلیون سال پیش، از هیبریداسیون دو والد دیپلوئید به نام های *N.sylvestris* (2n=24) و *N.tometosiformis* (2n=24) تشکیل یافت. این گیاه یکساله بوده، دارای ده ها برگ بیضوی و بزرگ می باشد (Wagner, 1991).

توتون، گیاهی اقتصادی است که در تولید سیگار و حشره کش ها مورد استفاده صنعتی قرار می گیرد. بیشتر اکتشافات در زمینه های کشت سلول گیاهی، کشت بافت گیاهی و بیولوژی مولکولی، از تحقیقات روی توتون بدست آمده است. علاوه بر آن توتون به عنوان یک گیاه مدل بوده و به سیندرلای بیوتکنولوژی گیاهی معروف است. این گیاه به عنوان یک مدل سازگار به تمام جنبه های تحقیقات کشت سلول و بافت مطرح است. به علاوه آزمایش های مربوط به ترانسفورماسیون[۲۸]، بیان[۲۹] و تثبیت ژن روی این گیاه انجام می گیرد. اغلب دستاورد های اولیه مهندسی ژنتیک گیاهی با کار روی توتون بدست آمده است. اخیرا از این گیاه به منظور مطالعه تولید پروتئین های نوترکیب[۳۰]، آنتی بادی ها و مواد شیمیایی خاصی که مورد استفاده صنعت قرار می گیرد، (طی فرآیندی به نام Molecular farming)، استفاده می شود (Ganapathi *et al*., 2004).

۱-٦-مفهوم شوری[۳۱]، تنش شوری[۳۲]

اثر سمیت کلر در گیاهان مشابه اثر شوری خاک بوده و اغلب سمیت کلر در خاک های شور رخ می دهد. مهمترین ترکیب کلردار موجود در خاک Nacl است. بنابراین درادامه به بررسی اثرات شوری بر گیاهان می پردازیم.

منظور از شوری خاک حالتی است که غلظت نمک های محلول در آن بالا باشد. خاک هایی که هدایت الکتریکی (EC_e[۳۳]) آن ها ٤ ds/m و یا بیشتر باشد، به عنوان خاک شور دسته بندی می شوند که این مقدار از EC_e هم ارز٤٠ میلی مولار است. اصطلاح تنش شوری زمانی اطلاق می شود که غلظت بالای نمک، با عث کاهش رشد گیاهان شود (Munns *et al*., 2008).

۱-۷-مشکلاتی که شوری زیاد بر گیاه تحمیل می کند

[28] Transformation
[29] Expression
[30] Recombinant protein
[31] Salinity
[32] Salt stress
[33] Electrical conductivity

غلظت بالای نمک در خاک، تنش اسمزی را به گیاه تحمیل کرده و بدین ترتیب موجب محدودیت جذب آب در گیاه می شود. شوری، سمیت یون را نیز بدنبال خواهد داشت. غلظت بالای Na^+، باعث جایگزینی آن با K^+ شده، آن دسته از واکنش های بیوشیمیایی را که در آن K^+ دخیل است، مختل می نماید. همچنین Na^+ و Cl^- باعث تغییر پیکر بندی[۳۴] پروتئین شده و فعالیت طبیعی آنها مختل می نماید (Tester *et al.*, 2003).

غلظت بالای Na^+ در محلول های خارجی، سبب کاهش K^+ و Ca^{2+} در بافت های تعداد زیادی از گیاهان می شود. این کاهش می تواند به دلیل آنتاگونیسم K^+–Na^+ و یا آنتاگونیسم Ca^{2+}–Na^+ باشد؛ به طوریکه افزایش غلظت Na^+ سبب تاثیر بر جایگاه های جذب Ca^{2+} و K^+ در ریشه، ویا اثر بر انتقال K^+ و Ca^{2+} به آوند چوب می شود. به این ترتیب شوری می تواند سبب کمبود مواد مغذی گردد (Greenway *et al.*, 1980). همچنین، سمیت یونی[۳۵] ناشی از شوری، باعث بر هم خوردن تعادل متابولیکی شده و این عدم تعادل به تنش اکسیداتیو[۳۶] ختم ختم می گردد. شوری با اثر بر زنجیره انتقال الکترون سبب تولید ROS[۳۷] و در نتیجه سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می شود. بدین ترتیب می توان گفت شوری، گیاه را با چهار چالش اساسی مواجه خواهد کرد:

۱–سمیت یونی ۲–تنش اسمزی ۳–کمبود مواد غذایی ٤–تنش اکسیداتیو.

۱–۸–استراتژی گیاه در مواجه با شوری

زمانی که گیاه با شوری مواجه می شود، دو استراتژی اصلی را برای مقابله با آن اتخاذ می نماید:

۱–اجتناب از تنش[۳۸]: که به سد های فیزیکی، فیزیولوژیکی و یا متابولیکی گیاه مربوط است.

۲–تحمل تنش[۳۹]: مربوط به مکانیسم های سازگاری است که باعث می شود گیاه علی رغم وجود تنش درونی، بقاء خود را حفظ نماید.

جهت اعمال دو استراتژی فوق، مکانیسم هایی در گیاه وجود دارد که به قرار زیرند (Levitt, 1972; Munns *et al.*, 1983; Fitter and Hay, 1989; Niu *et al.*, 1995):

I. اجتناب براساس تغییر شکل ظاهری گیاه

II. اجتناب از شوری توسط جلوگیری از ورود نمک: توسط نفوذ پذیری پایین ریشه به یون ها اعمال می گردد.

III. اجتناب از شوری توسط ترشح نمک: وابسته به حضور غدد نمکی[٤٠] است.

---

[34] Conformation
[35] Ion toxicity
[36] Oxidative stress
[37] Reactive oxidative species
[38] Stress avoidance
[39] Stress Tolerance
[40] Salt gland