دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

# تاثیر تنش اکسیداتیو القاء شده توسط آمینوتریازول (AT) روی خصوصیات بیوشیمیایی و ملکولی گیاهان موتانت *old101* آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.)

از:

**پیمان منبری**

استاد راهنما:

**دکتر رضا شیرزادیان خرم‌آباد**

اسفند ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

**تاثیر تنش اکسیداتیو القاء شده توسط آمینوتریازول (AT) روی خصوصیات بیوشیمیایی و ملکولی گیاهان موتانت *old101* آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.)**

از:

**پیمان منبری**

استاد راهنما:

دکتر رضا شیرزادیان خرم‌آباد

استادان مشاور:

دکتر علی اعلمی، دکتر محمد قدم‌یاری

اسفند ۱۳۹۲

# تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و

برادر و خواهران مهربانم

از استاد راهنمای محترم آقای دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد به پاس زحمات بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

از اساتید مشاور جناب آقای دکتر علی اعلمی و دکتر محمد قدم یاری قدردانی می نمایم.

از مدیر محترم گروه بیوتکنولوژی جناب آقای دکتر حسن حسنی کومله تشکر می کنم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه های بیوتکنولوژی و ژنومیکس، آقایان مهندس محمد حسین رضادوست و مهندس حسام الدین حسینی تشکر می کنم.

از کلیه دوستان و همکلاسی های خوبم

تشکر می کنم و برای همه ی آن ها آرزوی موفقیت دارم.

چکیده فارسی ..... س
چکیده انگلیسی ..... ش

**مقدمه** ..... ش

**کلیات و مرور منابع** ..... ۴

۱-۱- آرابیدوپسیس ..... ۵
۱-۲- تنش ..... ۶
۱-۳- تعریف تنش اکسیداتیو ..... ۶
۱-۳-۱- انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ..... ۷
۱-۳-۲- فاکتورهای القا کننده تنش اکسیداتیو در گیاهان ..... ۷
۱-۳-۲-۱- تنش‌های غیر زیستی ..... ۷
۱-۳-۲-۱-۱- سرما ..... ۷
۱-۳-۲-۱-۲- شوری ..... ۸
۱-۳-۲-۱-۳- خشکی ..... ۹
۱-۳-۲-۲- تنش‌های زیستی ..... ۱۱
۱-۳-۲-۳- عوامل شیمیایی ..... ۱۲
۱-۳-۲-۳- آمینوتریازول (3Amino 1-2,4Triazole) ..... ۱۲
۱-۳-۳- منابع تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول ..... ۱۲
۱-۳-۳-۱- کلروپلاست ..... ۱۲
۱-۳-۳-۲- میتوکندری ..... ۱۳
۱-۳-۳-۳- شبکه آندوپلاسمی صاف ..... ۱۳
۱-۳-۳-۴- پراکسی‌زوم‌ها ..... ۱۳
۱-۳-۳-۵- دیواره سلولی ..... ۱۴
۱-۳-۴- نقش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بعنوان انتقال دهنده پیام در سلول و اهمیت آن‌ها در رشد و نمو گیاهان ۱۴
۱-۳-۵- خسارت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بر بیوملکول‌ها ..... ۱۶
۱-۳-۶- دفاع در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ..... ۱۷
۱-۳-۶-۱- سیستم دفاع آنزیمی ..... ۱۸
۱-۳-۶-۱- ۱- سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) ..... ۱۸

۱-۳-۶-۱-۲- کاتالاز (CAT) ..... ۱۹
۱-۳-۶-۱-۳- آسکوربات پراکسیداز (APX) ..... ۱۹
۱-۳-۶-۲- سیستم دفاعی غیر آنزیمی ..... ۲۰
۱-۳-۶-۲-۱- آسکوربات (AsA) ..... ۲۰
۱-۳-۶-۲-۲- گلوتاتیون (GSH) ..... ۲۱
۱-۳-۶-۲-۳- توکوفرول‌ها ..... ۲۱
۱-۳-۶-۲-۴- ترکیبات فنولی ..... ۲۲
۱-۴- تاثیر تنش بر سلول ..... ۲۳
۱-۴-۱- درک تنش ..... ۲۳
۱-۴-۱-۱- مولکول‌های دریافت کننده پیام ..... ۲۴
۱-۴-۱-۱- دریافت کننده‌های وابسته به G پروتئین‌ها ..... ۲۴
۱-۴-۱-۲- دریافت کننده‌های وابسته به کانال‌های یونی ..... ۲۴
۱-۴-۱-۳- دریافت کننده‌های دو زیرواحدی هیستیدین کیناز ..... ۲۵
۱-۴-۱-۴- انتقال پیام به هسته سلول ..... ۲۵
۱-۵- نقش ROSها در سیگنالینگ ..... ۲۸
۱-۶- بررسی بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش ..... ۲۹
۱-۶- ژن‌های واکنش‌گر به تنش ..... ۲۹
۱-۶-۱- ژن *FIERY1* ..... ۳۰
۱-۶-۱-۱- فعالیت اینوزیتول پلی فسفات ۱- فسفاتازی ..... ۳۰
۱-۶-۱-۲- فعالیت ۳(۲)، ۵ بیس فسفات نوکلئوتیدازی ..... ۳۱
۱-۶-۱-۳- ارتباط ژن *FRY1* با سایر ژن‌ها ..... ۳۳
۱-۶-۱-۴- جهش *old101* ..... ۳۴
۱-۶-۱-۵- جهش *ron1-1* ..... ۳۵
۱-۶- ۲- ژن *GST1* ..... ۳۶
۱-۶-۳- ژن‌های خانواده اگزوریبونوکلئاز (*XRNs*) ..... ۳۶
۱-۶-۴- ژن‌های خانواده آسکوربات پراکسیداز (*APXs*) ..... ۳۸
۱-۷- بیان ژن و روش Quantitative Real Time PCR ..... ۳۸
۱-۷-۱- تعریف Q Real-Time RT-PCR ..... ۳۹
۱-۷-۲- مراحل Q Real Time PCR ..... ۳۹

۱-۷-۲-۱- رنگ متصل شونده به DNA ..... ۴۰
۱-۷-۲-۲- بازدهی Q Real Time PCR ..... ۴۰
۱-۷-۲-۳-پارامتر Ct ..... ۴۱
۱-۷-۲-۴- ژن مرجع ..... ۴۲
۱-۷-۲-۵- نرمال سازی ..... ۴۲
۱-۷-۲-۶- کمی‌سازی نسبی ..... ۴۲
۱-۷-۲-۷- تحلیل اطلاعات کمی Q Real Time PCR ..... ۴۳

**مواد و روش‌ها** ..... ۴۴

۲-۱- بررسی برخی شاخص‌های مورفولوژیکی در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تیمار اکسیداتیو القا شده توسط آمینوتریازول (AT) ..... ۴۵
۲-۱-۱- ضدعفونی بذور و تیمار سرمایی ..... ۴۵
۲-۱-۲- ساخت محیط MS ..... ۴۵
۲-۱-۳- کشت بذور روی محیط MS ..... ۴۶
۲-۱-۴- تهیه محلول پایه آمینوتریازول (AT) ..... ۴۶
۲-۱-۵- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته و مادری ..... ۴۷
۲-۱-۶- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er-o*) در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۴۸
۲-۲-کشت بذر ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old101* و *ron1-1* در محیط MS جهت ایجاد تنش اکسیداتیو ..... ۴۸
۲-۳- بررسی فعالیت‌های بیوشیمیایی ..... ۴۹
۲-۳-۱- سنجش میزان گروه‌های دارای اکسیژن احیا (ROS) در برگ گیاهچه‌ها ..... ۴۹
۲-۳-۲- بررسی فعالیت آنزیم‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ..... ۵۱
۲-۳-۲-۱- آنزیم پراکسیداز (POD) ..... ۵۱
۲-۳-۲-۲- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ..... ۵۲
۲-۳-۲-۳- آسکوربات پراکسیداز (APX) ..... ۵۲
۲-۳-۲-۴- سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۵۳
۲-۳-۲-۵- اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها ..... ۵۳
۲-۴- استخراج RNA ..... ۵۴
۲-۴-۱-حذف آلودگی DNA ژنومی ..... ۵۵
۲-۴-۲- بررسی کمیت RNA با اسپکتوفوتومتر ..... ۵۶

۲-۴-۳-بررسی کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ..... ۵۶
۲-۴-۴- ساخت cDNA ..... ۵۷
۲-۴-۴-۱- بررسی صحت ساخت cDNA ..... ۵۸
۲-۴-۴-۱-۱- واکنش کنترل منفی RT ..... ۵۸
۲-۴-۴-۱-۲- واکنش کنترل منفی (NTC) ..... ۵۸
۲-۴-۴-۱-۳- کنترل ساخت cDNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ ..... ۵۸
۲-۴-۴-۱-۴- بررسی کیفیت cDNA ساخته شده ..... ۵۹
۲-۴-۴-۱-۵- بررسی محصول PCR کنترل ساخت cDNA در فرایند الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ..... ۵۹
۲-۴-۵- طراحی آغازگرها (پرایمرها) با استفاده از نرم افزار طراحی ..... ۶۰

**نتایج و بحث** ..... ۶۲

۳-۱- بررسی شاخص‌های مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های موتانت *old101* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) .. ۶۳
۳-۱-۱- بررسی جوانه‌زنی بذور ژنوتیپ‌های موتانت *old101* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) در کد جوانه‌زنی B=۰/۵ ..... ۶۴
۳-۱-۲- بررسی جوانه‌زنی بذور ژنوتیپ‌های موتانت *old101* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری(L*er-0*) در کد جوانه‌زنی C=۰/۷ ..... ۶۴
۳-۱-۳- بررسی وزن تر گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۶
۳-۱-۳-۱- بررسی وزن تر شاخساره گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۶
۳-۱-۳-۲- بررسی وزن تر ریشه گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۷
۳-۱-۳-۳- بررسی وزن تر کل گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۹
۳-۲- بررسی میزان محتوای کلروفیل کل و محتوای کارتنوئیدها درگیاهان جهش یافته *old101* و *ron1-1* نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۷۲
۳-۳- اندازه‌گیری میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با استفاده از DAB ..... ۷۵
۳-۴- بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ..... ۷۶
۳-۴-۱- آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ..... ۷۶
۳-۴-۲- آنزیم کاتالاز (CAT) ..... ۷۸
۳-۴-۳- آنزیم پراکسیداز (POD) ..... ۸۰
۳-۵- بررسی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو ..... ۸۲
۳-۵-۱- بررسی میزان بیان نسبی ژن *DEFL* ..... ۸۲

۳-۵-۲- بررسی میزان بیان نسبی ژن *FRY1* ..... ۸۴
۳-۵-۳- میزان بیان نسبی ژن *GST1* ..... ۸۶
۳-۵-۴- بررسی میزان بیان نسبی ژن *sAPX*..... ۸۷
۳-۵-۵- بررسی میزان بیان نسبی ژن *XRN3* ..... ۸۹
۳-۵-۶- بررسی میزان بیان نسبی ژن *XRN2* ..... ۹۰
۳-۶- نتیجه‌گیری ..... ۹۱

**منابع**..... ۹۴

جدول ۱-۱- سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی درگیاهان در برابر تنش اکسیداتیو..... ۱۸
جدول ۲-۱- ترکیبات شیمیایی و مقادیر مورد نیاز از آنها برای تهیه استوک‌های محیط MS..... ۴۶
جدول ۲-۲- کد بندی مراحل مختلف رشد ..... ۴۸
جدول-۲-۳ روش تهیه‌ی ml ۵۰۰ تریس استات mM ۵۰، (pH = ۵)..... ۵۰
جدول ۲-۴- روش تهیه‌ی ml ۹۶ محلول بازدارنده ..... ۵۱
جدول ۲- ۵-پروتکل کیت RNX-plus ™ جهت استخراج RNA..... ۵۵
جدول ۲-۶- پروتکل سنتز cDNA..... ۵۷
جدول ۲- ۷- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در مستر PCR..... ۵۹
جدول ۲-۸- برنامه دستگاه ترموسایکلر در تکثیر ژن‌ها..... ۵۹
جدول ۲-۹- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیا ژن‌ها ..... ۶۱
جدول ۳-۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میـزان درصـد جوانـه زنـی در دو کـد رشـدی B=۰/۵ وC=۰/۷ در ژنوتیپ‌های جهش یافته *old101* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*)..... ۶۶
جدول ۳-۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان وزن تر شاخساره، ریشه و کل در ژنوتیـپ‌هـای جهـش یافتـه *old01* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۷۱
جدول ۳-۳- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی میزان محتوای‌کلروفیل a ، کلرفیل b، کلرفیل کل و کاروتنوئید کل در ژنوتیپ‌های جهش یافته *old01* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*)..... ۷۳
جدول ۳-۴- تجزیه واریانس بررسی فعالیـت آنـزیم‌هـای CAT، POD و APX در ژنوتیـپ‌هـای جهـش یافتـه *old01* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۸۲

شکل ۱- ۱- آرابیدوپسیس گیاهی کوچک و دارای سیکل زندگی کوتاه، بذر فراوان ..... ۵
شکل ۱-۲- بهم خوردن توازن میان ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها ..... ۶
شکل ۱-۳- مکان‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان ..... ۱۴
شکل ۱-۴- نقش ROSها بعنوان پیامبر ثانویه با واسطه هورمون‌ها به پاسخ‌های سلولی در گیاهان ..... ۱۶
شکل ۱-۵- آسیب تنش اکسیداتیو بر لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA ..... ۱۷
شکل ۱- ۶- شمای کلی فرایند دریافت پیام و پاسخ سلول به تنش محیطی ..... ۲۳
شکل ۱- ۷- $IP_3$ و DAG دو مولکول پیامبر ثانویه که در واکنش به تنش محیطی تولید می‌گردد ..... ۲۷
شکل ۱- ۸- شماتیک دریافت ROS درون و برون سلولی و مکانیسم‌های سیگنالینک. ..... ۲۹
شکل ۱-۹- فرایند انتقال پیام و تغییر بیان ژنها توسط ROS ..... ۲۹
شکل ۱- ۱۰- تاثیر ژن *FRY1* در واکنش گیاه به تنش‌های محیطی ..... ۳۱
شکل ۱-۱۱- مکانیسم کنترل کنندگی پروتئین SAL1 به وسیله‌ی تجزیه‌ی PAP بر روی ژن‌های واکنش به تنش. .... ۳۲
شکل ۱- ۱۲- ژن *FRY1* با ژن‌های متعدد در ارتباط است. ..... ۳۳
شکل ۱- ۱۳- میزان بیان ژن *FRY1* در بافت‌های مختلف متفاوت است ..... ۳۳
شکل ۱-۱۴- محل قرارگیری جهش *old101* در ژن *FRY1* ..... ۳۵
شکل ۱-۱۵- محل قرارگیری جهش *ron1-1* در ژن *FRY1* ..... ۳۵
شکل ۱-۱۶- نقش ژن *FRY1* در تجزیه PAP و تجمع *XRNs* ..... ۳۷
شکل ۱-۱۷- نمودار نتایج Real Time PCR. ..... ۴۱
شکل ۲- ۱- مراحل مختلف جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس. ..... ۴۷
شکل۲-۲- گیاهان مادری (L*er-0*) و موتانت‌های *old101* و *ron1-1* که به مدت ۴ روز در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول قرار گرفته‌اند. ..... ۴۹
شکل ۲-۳- بررسی کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ..... ۵۷
شکل ۲-۴- بررسی صحت ساخت cDNA ..... ۵۸
شکل ۳-۱- a) درصد جوانه‌زنی (B=۰/۵) و b) درصد جوانه‌زنی (C=۰/۷) ..... ۶۵
شکل ۳-۲- a) درصد جوانه‌زنی(B=۰/۵) و b) درصد جوانه‌زنی (C=۰/۷) ..... ۶۵
شکل ۳-۳- بررسی میزان وزن تر شاخساره در گیاهچه‌های موتانت *old01* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۷
شکل ۳-۴- بررسی میزان وزن تر ریشه در گیاهچه‌های موتانت *old01* و *ron1-1* درمقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۶۹
شکل ۳-۵- بررسی میزان وزن تر کل در گیاهچه‌های موتانت *old01* و *ron1-1* درمقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ۷۱

شکل ۳-۶- a) کلرفیل a، b) کلرفیل c)، کلرفیل کل d) کاروتنوئید کل در گیاهچه‌های موتانت *old01* و *ron1-1* درمقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۷۴

شکل ۳-۷- a ) بررسی میزان کلرفیل کل و b) بررسی میزان کاروتنوئید کل در گیاهچه‌های موتانت *old01* و *ron1-1* درمقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۷۴

شکل۳- ۸- بررسی میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان مادری(L*er-0*) و موتانت‌های *old01* و *ron1-1* آرابیدوپسیس تحت تنش اکسیداتیو القا شده با آمینوتریازول با استفاده از ماده رنگ آمیزی DAB ..... ۷۶

شکل ۳ -۹- میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ..... ۷۸

شکل ۳ -۱۰- a) میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ژنوتیپ موتانت *old101* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) و b) میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ژنوتیپ موتانت *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) ..... ۸۰

شکل ۳-۱۱- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) ..... ۸۱

شکل ۳-۱۲- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *DEFL* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۴

شکل ۳-۱۳- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *DEFL* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۴

شکل ۳-۱۴- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *FRY1* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۶

شکل ۳-۱۵- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *GST1* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۷

شکل ۳-۱۶- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *sAPX* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *ron1-1* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۹

شکل ۳-۱۷- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *sAPX* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۸۹

شکل ۳-۱۸- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *XRN3* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۹۰

شکل ۳-۱۹- مقایسه میزان بیان نسبی *ژن XRN2* در گیاهان مادری (L*er-0*) و گیاهان موتانت *old101* در غلظت‌های مختلف آمینوتریازول ..... ۹۱

## چکیده

**تاثیر تنش اکسیداتیو القاء شده توسط آمینوتریازول (AT) روی خصوصیات بیوشیمیایی و ملکولی گیاهان موتانت *old101* آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.)**

**پیمان منبری**

میزان رشد و نمو گیاهان و واکنش آن‌ها به تنش‌های زیستی و غیرزیستی همواره با تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) همراه است. تجمع این رادیکال‌ها در غلظت‌های بالا می‌تواند برای سلول زیان‌آور بوده و با ایجاد تنش اکسیداتیو موجب مرگ سلولی شوند. علاوه بر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، مواد شیمیایی مانند آمینوتریازول با مهار کردن فعالیت آنزیم کاتالاز سبب القاء تنش اکسیداتیو می‌شود. در این تحقیق به منظور مطالعه عملکرد ژن *FRY1*، خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* در واکنش به تنش اکسیداتیو القاء شده توسط غلظت‌های مختلف آمینوتریازول بررسی گردید. نتایج نشان داد میزان درصد جوانه‌زنی، وزن تر شاخساره، ریشه و کل گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* در مقایسه با گیاهان مادری (L*er-0*) به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما اختلاف معنی‌داری بین گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* مشاهده نشد. کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل کل و گونه‌های فعال اکسیژن خصوصا $H_2O_2$ در گیاهان موتانت نسبت به گیاهان مادری مشاهده گردید. همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز خصوصا در گیاهان مادری نسبت به گیاهان موتانت کاهش یافت، اما فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در گیاهان تحت تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن‌های واکنش‌گر شامل *DEFL*، *GST1*، *FRY1*، *sAPX*، *APX1*، *XRN2* و *XRN3* نشان داد که بیان این زن‌ها در گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) کاهش یافت. بطور کلی، نتایج بدست آمده نشان دهنده افزایش حساسیت و مرگ سلولی القا شده توسط تنش اکسیداتیو در گیاهان موتانت *old101* و *ron1-1* نسبت به گیاهان مادری (L*er-0*) است.

**کلمات کلیدی:** آرابیدوپسیس، آمینوتریازول، تنش اکسیداتیو، Q Real Time PCR

**Abstract**

Effect of oxiditive stress induced by Aminoteriazole (AT) on biochemical and molecular chrachtrisatics of *old101* mutant in *Arabidopsis* plants

Peyman manbari

The growth and development of plants under biotic and abiotic stresses is always accompanied with accumulation of various reactive oxygen species (ROS) molecules. Higher levels of ROS can be harmful leading to oxidative stress-induced leaf death. In addition, chemical materials such as Aminoteriazole also can cause oxidative stress by suppression of catalase activity. In this research, several molecular, physiological and biochemical characterizations of *old101* and *ron1-1* mutant plants, which has a point mutation in *FRY1*, in response to oxidative stress induced by different concentrations of Aminoteiazole (AT) has been assayed and compared with wild type plants (L*er-0*). The results showed that the germination rate, fresh weight of shoots, roots and total plants old101 and ron1-1 mutant compared with wild type plants (Ler-0) was significantly decreased, but, no significant difference between mutant plants *old101and ron1-1* was observed. A significant decrease in total chlorophyll content and reactive oxygen species, especially $H_2O_2$ in mutant plants than wild type plants was observed. Also, specifically catalase activity in mutant plants was reduced compared to wild type plants, but ascorbate peroxidase and peroxidase enzyme activity was significantly increased in stressed plants. Relative gene expression analysis of reactive results include *DEFL*, *GST1*, *FRY1*, *sAPX*, *APX1*, *XRN2* and *XRN3* showed that the expression of genes in plants and *ron1-1* mutant *old101* than wild type plants (L*er-0*) was reduced. Overall, the results indicate an increased susceptibility to cell death induced by oxidative stress in plants and *ron1-1* mutant *old101* than native plants (L*er-0*).

**Key words**: Arabidopsis, Aminoteriazole, Oxidative stress,

# مقدمه

تنش اکسیداتیو به عنوان عامل برهم زننده تعادل میان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و دفاع آنتی‌اکسیدانتی در سلول‌های زنده تعریف می‌شود. برهم زدن حالت تعادل بین تولید و تخریب ROS که منجر به تجاوز از میزان غلظت ثابت ($10^{-8}M >$ ) در سلول می‌شود، سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سبب آسیب به سلول شده، و سرانجام مرگ سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاهان را به همراه خواهد داشت [Wang et al., 2005]. شناخت مکانیزم‌هایی که گیاهان پیام تنش‌ها را به سیستم سلولی جهت فعال‌سازی واکنش‌های انطباق با تنش ارسال می‌کنند از جمله ملزومات بنیادی برای توسعه‌ی بیشتر مقاومت گیاهان زراعی به تنش در راستای افزایش بهره وری در تولید غذا برای جمیعت رو به رشد جهان به‌شمار می‌رود. گیاهان می‌توانند با درک تنش اکسیداتیو و سپس فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی و سازگاری خود باعث افزایش مقاومت در برابر آن شوند. بطور عمومی یک فرایند انتقال پیام با درک پیام شروع شده و پس از آن به وسیله پیامبرهای ثانویه شامل القای کلسیم، انواع احیاکننده‌های‌اکسیژن (ROS)[1] و اینوزیتول فسفاتازها ادامه می‌یابد. پیامبرهای ثانویه بالا در جهت تعدیل سطح کلسیم داخل سلولی فعالیت می‌کنند [Huang et al., 2012]. گیاهان در طی تکامل استراتژی‌های برای حمایت سلول‌های خود در برابر تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ارتقا داده‌اند [Mittler, 2002]. مکانیسم‌های اتلاف انرژی از قبیل تنفس نوری و چرخه گزانتوفیل مانع از شارژ الکترون به اکسیژن در کلروپلاست شده، بدین ترتیب تولید ROSها در کلروپلاست کاهش می‌دهند [Ort and Baker, 2002]. بطور مشابه زنجیره تنفسی انتقال الکترون (RETC)[2] در میتوکندری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را بوسیله حفظ تعادل میان سوبسترای موجود و ATP مورد نیاز، فعال کردن مسیر آلترناتیو اکسیداز (AOX) و فعال کردن NAD(P)H دی-هیدروژناز غیر حساس به رتنون کنترل می‌کنند [Moller, 2002].بطور کلی ROSها در سلول به وسیله‌ی شبکه‌ی گسترده‌ای از ژن‌ها به شدت کنترل می‌شود که اصطلاحاً آن را شبکه‌ی ژنیROS[3]می‌نامند. ژن *FRY1* (At5g63980) بطول ۲۱۲۱ جفت‌باز شامل ۷ اگزون بوده و درانتهای بازوی کوچک کروموزم شماره ۵ آرابیدوپسیس قرار دارد [ François et al., 2008]. این ژن ازجمله ژن‌هایی است که بیان آن در واکنش به تنش‌های محیطی و ABA تغییر کرده و با تنظیم مقدار $IP_3$[4] در واکنش گیاه به تنش محیطی مؤثر است [Xiong et al., 2004]. بررسی‌های ژنتیکی نشان داد که موتاسیون های ایجاد شده در ژن *FIERY1 (FRY1)* باعث کاهش اثر آنزیمی اینوزیتول پلی‌فسفات ۱ فسفاتازی پروتیین FRY1 شده، که این امر منجر به افزایش قابل توجه $IP_3$ و پایدار ماندن سطوح آن ، در گیاهان موتانت گردید.

1 - Reactive oxygen species
2- Respiratory Electron Transport Chin (RETC)
3- ROS gene network
4- Inositol 1,4,5-trisphosphate ($IP_3$)

در ژن *FRY1* جهش‌های متعددی گزارش شده است از جمله این جهش‌ها می‌توان به جهش *fry1-1* که باعث کاهش آستانه تحریک و افزایش بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش از جمله KIN1, ADH, HSP70 تحت تنش اسمزی و تیمار ABA [Xiong and Karen, 2001]، جهش *hos2* سبب افزایش بیش از حد بیان ژن‌های واکنش‌گر به سرما [Kim and Armim, 2009]، موتاسیون *fry1-6* باعث کوتولگی و تاخیردرگلدهی‌گیاهان [Xiong and Karen, 2002]، جهش *hal2* باعث‌کاهش مقاومت سویه‌های مخمر جهش یافته به‌کمبود گوگرد، و افزایش حساسیت آنها به لیتیم و سدیم [Quintero et al., 1996]، جهش *alx8* باعث افزایش مقاومت گیاهان جهش یافته به‌خشکی [Wilson et al., 2008] و جهش *fry1-7* باعث افزایش بیان ژن‌های واکنش‌گر به کاهش فسفر می‌شود [Judith et al., 2011]، اشاره کرد. جهش نقطه‌ای *old101*[1] دراگزون شماره ۲ ژن *FRY1* رخ داده و باعث جایگزینی نوکلئوتید G با نوکلئوتید A شده است. جهش *old101* موجب جایگزینی اسیدآمینه آسپارتیک اسید (Asp) با اسیدآمینه آسپاراژین (Asn) شده [Shirzadian-Khoramabad et al., 2008]، همچنین جهش نقطه‌ای *ron1-1*[2] باعث جایگزینی نوکلئوتید G با نوکلئوتید A، در ابتدای اگزون شماره پنج در ژن FRY1 شده است [Robles et al., 2010]. در این پژوهش تأثیر جهش *old101* و *ron1-1* بر صفات فیزیولوژیکی( از قبیل میزان جوانه‌زنی، بررسی وزن تر قسمت هوایی، وزن تر ریشه و وزن تر کل) و صفات بیوشیمیایی (شامل بررسی میزان کلروفیل کل، کارتنوئید کل، اندازه‌گیری میزان حضور گونه‌های فعال اکسیژن خصوصا $H_2O_2$ و سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت) در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* و *ron1-1* در مقایسه با ژنوتیپ مادری (L*er*-0) تحت تنش اکسیداتیو القا شده توسط غلظت‌های مختلف آمینوتریازول مورد بررسی قرار خواهد گرفت. همچنین میزان نسبی بیان برخی از ژن‌های واکنش‌گر به تنش در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تنش فوق با روش Q Real Time PCR مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

1 - Onset of leaf death 101 (*old101*)
2 - rotunda1-1(*ron1-1*)

فصل اول

# کلیات

# و

# مرور منابع

## ۱-۱- آرابیدوپسیس

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) یک گیاه کوچک، یکساله، روز بلند از خانواده خردل (Brassicacea) می‌باشد [Francois et al., 2008] (شکل ۱-۱). این گیاه بومی مناطق اورآسیا شناخته شده [Al-Shehbaz and O'Kane Jr, 2002] و در حال حاضر به عنوان یک علف هرز درآمریکای شمالی، اروپا و استرالیا یافت می‌شود [Jørgensen and Mauricio, 2004; Alonso-Blanco and. Koornneef, 2000]. خاک مناسب رشد این گیاه خاک لومی و ماسه‌ای بوده و محل رشد آن در مناطقی شامل ساحل رودخانه، کنار جاده‌ها، شیب‌های سنگلاخ، مناطق بایر و اراضی کشاورزی است. ارتفاع خاستگاه این گیاه از سطح دریا بطور متوسط ۴۲۵۰ متر می‌باشد [Hoffmann, 2002]. دوره زندگی این گیاه طی ۵۰ روز کامل شده و تولید بذر می کند. طول دوره زندگی کوتاه ، تولید بذر فراوان، خودگشن بودن، اندازه کوچک ژنوم آن (۲۵۴۹۸ ژن)، قابلیت ترانسفورماسیون و امکان ایجاد جهش‌های متعدد باعث انتخاب آرابیدوپسیس به عنوان یک موجود ایده‌آل برای مطالعات آزمایشگاهی شده است [Francois et al., 2008]. این گیاه از تنوع گسترده برخوردار است و موتانت‌های زیادی از آن تهیه شده است. این گیاه به عنوان یک موجود مدل، نقش مهمی در مطالعات زیست شناسی گیاهی داشته و بطور گسترده در مطالعات فیزیولوژی گیاهی، زیست شناسی مولکولی و ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد [Munnik et al., 1998].

**http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Arabidopsis.html**
**شکل۱- ۱- آرابیدوپسیس گیاهی کوچک و دارای سیکل زندگی کوتاه، بذر فراوان**