بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی
(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌های *CBF* و *OLD101 / FRY1* در واکنش به تنش سرما در گیاهان وحشی و جهش‌یافته *old101* در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) با استفاده از RT-PCR نیمه‌مقایسه‌ای.

از:

علی مبارکی

استاد راهنما:

دکتر رضا شیرزادیان خرم‌آباد

استادان مشاور:

دکتر بابک ربیعی، دکتر محمدمهدی سوهانی

اسفند ۱۳۹۱

Pêshkesh be

daykw bawkî xweshewîsim

تقدیم به

مادر و پدر عزیزم

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

از استادان محترم مشاور آقای دکتر بابک ربیعی و آقای دکتر محمد مهدی سوهانی تشکر ویژه دارم.

از اساتید محترم داور آقایان دکتر حبیب الله سمیع زاده و دکتر علی اعلمی که زحمت بازخوانی پایان نامه را بر عهده داشتند تشکر می کنم.

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

از اعضاء محترم هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی، مسئولین و کارکنان محترم دانشکده کشاورزی تشکر می کنم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه های ژنومیکس، بیوتکنولوژی و باغبانی آقایان حسام الدین حسینی، مهندس محمد حسین رضادوست و آقای دکتر محمود قاسم نژاد و خانم مهندس سلیقه دار تشکر می کنم.

از دوستان و همکلاسی های خوبم خانم ها و آقایان:

کیخسرو مؤذن زاده، ژاله حکمتی، طاهره فتحی، هما یزدوست، محسن ایمان زاده، حمیده طاهری، مینا خوشبخت، یعقوب احمدیوسفی، یونس میرزایی، پیمان منبری، مریم اویسی، فاطمه چمنی، انیسه قربانی، خزر ادریسی، محمد محسن زاده، فرهاد معصومی و ابوذر هاشم پور

تشکر می کنم و برای همه ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم.

از خانواده ی عزیزم که من را همواره مورد لطف خودشان قرار داده و در همه حال پشتیبانم هستند کمال تشکر را دارم.

فهرست جدول‌ها ..... چ
فهرست شکل‌ها ..... ح
چکیده فارسی ..... د
چکیده انگلیسی ..... ذ
مقدمه ۱
فصل اول: کلیات و مرور منابع ۳
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۹
فصل سوم: نتایج و بحث ۷۱
۳-۶- نتیجه‌گیری کلی ۱۰۷
۳-۷- پیشنهادها ۱۱۶
منابع: ۱۱۸

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۱

کلیات و مرور منابع

۱-۱-آرابیدوپسیس ٤
۱-۲- غذا : ٦
۱-۳- تنش: ۷
۱-۳-۱- تنش دما: ۸
۱-۳-۱-۱- تنش دمای پایین(سرما): ۸
۱-۳-۱-۱-۱- ژن های *CBF* ۹
۱-۳-۱-۱-۱-۱-تنظیم کنندگی ژن های *CBF* ۱۰
۱-۳-۱-۱-۱-۲- تنظیم شوندگی ژن های CBF ۱۱
۱-۳-۱-۲- تنش دمای بالا (گرما) ۱٦
۱-۳-۲- تنش خشکی ۱۷
۱-۳-۳- تنش شوری ۱۹

۱-۳-۴- تنش اکسیداتیو ۲۱
۱-۳-۴-۱- فرایند انتقال پیام ROS در گیاهان..... ۲۲
۱-۳-۴-۲- دفاع در برابر اکسیژن آزاد ۲۳
۱-۳-۴-۲-۱- سیستم دفاع آنزیمی ۲٤
۱-۳-۴-۲-۲- سیستم دفاعی غیر آنزیمی ۲٥
۱-۳-۴-۲-۲-۱- اسید کلروژنیک..... ۲٦
۱-۳-۴-۲-۲-۲- آنتوسیانین ۲٦
۱-۳-۴-۲-۲-۲-۱- بیوسنتز آنتوسیانین ها ۲۷
۱-۳-۴-۲-۲-۲-۲- واکنش به تنش ها توسط آنتوسیانین ۲۸
۱-۴- ژن *FIERY1*.....۲۹
۱-۴-۱- فعالیت اینوزیتول پلی فسفات ۱- فسفاتازی..... ۲۹
۱-۴-۲- فعالیت ۳(۲)،۵ بیس فسفات نوکلئوتیدازی..... ۳۰
۱-۴-۳- ارتباط ژن *FRY1* با سایر ژن ها..... ۳۲
۱-۴-۴- جهش ***old101*** ۳۴
۱-۵- بیان ژن و روش Q Real Time PCR ۳۵
۱-۵-۱- مراحل Q Real Time PCR ۳۶
۱-۵-۱-۱- رنگ متصل شونده به DNA..... ۳٦
۱-۵-۱-۲- بازدهی Q Real Time PCR ۳۷
۱-۵-۱-۲- ژن مرجع..... ۳۷
۱-۵-۱-۳- نرمال سازی ۳۷
۱-۵-۱-۴- کمی سازی نسبی ۳۸

مواد و روشها

۲-۱- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته و مادری.....٤۰
۲-۱-۱- کشت بذر در پتریدیش ٤۱
۲-۱-۲- بررسی جوانه زنی بذرها ٤۱
۲-۱-۳- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) در دماهای مختلف.....۴۲
۲-۲-کشت در خاک.....٤۳
۲-۲-۱- بررسی ترکیبات مختلف خاک جهت رشد و نمو آرابیدوپسیس..... ٤۳
۲-۲-۲-کشت بذر ژنوتیپ های L*er*-0 و *old101* در خاک جهت انجام تیمار سرمایی ۴۶

۲-۳- بررسی و مطالعه ی گیاه های L*er*-0 و *old101* در شرایط تنش سرمایی ۴° C ۴۶
۲-۳-۱-مطالعه ی مولکولی گیاهچه های L*er*-0 و *old101* در شرایط تنش سرمایی ۴° C ٤٧
۲-۳-۱-۱-نمونه گیری از گیاهچه ها جهت سنجش میزان بیان ژنی ٤٧
۲-۳-۱-۲-استخراج RNA ٤٧
۲-۳-۱-۳-حذف آلودگی DNA ژنومی ٤٩
۲-۳-۱-۴-بررسی کمیت RNA با اسپکتوفوتومتر ٥٠
۲-۳-۱-۵-بررسی کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ٥٠
۲-۳-۱-۶-ساخت cDNA ٥١
۲-۳-۱-۷-بررسی صحت ساختcDNA ٥٢
۲-۳-۱-۸- طراحی آغازگر با استفاده از نرم افزار طراحی ٥٥
۲-۳-۱-۹-Q Real Time PCR ٥٧
۲-۳-۲-مطالعه ی فنوتیپی گیاهچه های ٥٧
۲-۳-۲-۱-بررسی طول ساقه ی اصلی ژنوتیپ ها در تنش سرمایی ۴° C ٥٩
۲-۳-۲-۲-بررسی وزن تر شاخساره و ریشه ی ژنوتیپ ها در تنش سرمایی ۴° C ٥٩
۲-۳-۲-۳-مقاومت در برابر دمای یخ زدگی ٥٩
۲-۳-۳- مطالعات فیزیولوژیکی ٦٠
۲-۳-۳-۱-بررسی میزان آنتوسیانین با استفاده از دستگاه HPLC ٦٠
۲-۳-۳-۱-۱-استخراج ترکیبات فنلی ٦٠
۲-۳-۳-۱-۲-تعیین میزان ترکیبات فنلی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی عملی بالا (HPLC) ٦١
۲-۳-۳-۲-اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها ٦٢
۲-۳-۳-۳-سنجش میزان گروه های دارای اکسیژن احیا (ROS) در برگ گیاه چه ها ٦٣
۲-۳-۳-۴-بررسی فعالیت آنزیم های دارای فعالیت آنتی اکسیدانی ٦٤
۲-۳-۳-۴-۱- استخراج پروتئین کل ٦٥
۲-۳-۳-۴-۲-اندازه گیری غلظت پروتئین به روش براد فورد ٦٥
۲-۳-۳-۴-۳-سوپراکسیددیسموتاز SOD ٦٦
۲-۳-۳-۴-۴-آنزیم پراکسیداز POD ٦٧
۲-۳-۳-۴-۵-سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز CAT ٦٨
۲-۳-۳-۴-۶- سنجش فعالیت آنزیم CAT ٦٨
۲-۳-۳-۴-۷-سنجش میزان فعالیت آنزیم PAL ٦٩
۲-۳-۳-۴-۸- آسکوربات پراکسیداز (APX) ٧٠

نتایج و بحث

۳-۱- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0**) تحت تیمار دمایی مختلف..... ۷۲**
۳-۲- بررسی رشد گیاهچه ها در دمای ۴° *C*.....۷۷
۳-۳- مقایسه ی گیاهچه ها از لحاظ فنوتیپی و فیزیولوژیکی.....۸۰
۳-۳-۱- بررسی طول ساقه ی اصلی گیاهچه ها ۸۰
۳-۳-۲- بررسی وزن تر کل گیاهچه ها..... ۸۲
۳-۳-۳- بررسی میزان کلروفیل a و b در گیاهچه ها مادری و موتانت *old101* در شرایط تنش سرمایی ۸۵
۳-۳-۴- مقایسه ی گیاهچه ها از لحاظ طول عمر و سرعت رشد ۸۷
۳-۳-۵- بررسی میزان حضور گروه های آزاد اکسیژن (ROS) در گیاهچه ها ۸۸
۳-۳-۶- اندازه گیری و مقایسه ی فعالیت آنتی اکسیدان ها..... ۹۱
۳-۳-۶-۱- سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی ۹۱
۳-۳-۶-۲- سیستم آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی..... ۹۳
۳-۳-۷- منابع تولید ROS در گیاهچه ها ۹۵
۳-۴- مقایسه ی میزان مقاومت به دمای یخ زدگی ۸° *C* -.....۹۷
۳-۵- مقایسه ی میزان بیان ژنی ۹۹
۳-۵-۱- بیان ژن های *CBF*..... ۹۹
۳-۵-۱-۱- میزان بیان نسبی ژن *CBF1* (AT4G25490.1)..... ۹۹
۳-۵-۱-۲- میزان بیان نسبی ژن *CBF2* (AT4G25470.1)..... ۱۰۰
۳-۵-۱-۳- میزان بیان نسبی ژن *CBF3* (AT4G25480.1)..... ۱۰۱
۳-۵-۲- میزان بیان نسبی ژن *COR15A* (AT2G42540.1)..... ۱۰۲
۳-۵-۳- میزان بیان نسبی ژن *FIERY1* (AT5G63980.1) ۱۰٤
۳-۵-۴- میزان بیان نسبی ژن واکنش به تنش اکسیداتیو *DEFL* (AT2G43510.1) ۱۰۵
۳-۵-۵- میزان بیان نسبی ژن واکنش به تنش اکسیداتیو *GST1* (AT1G02930.1) ۱۰٦
۳-۶- بحث ۱۰۷
۳-۷- پیشنهادها ۱۱۶

منابع ۱۱۲

فهرست جدول‌ها شماره صفحه

جدول-۱-۱- سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی درگیاهان ۲۵
جدول۲-۱- کد بندی مراحل مختلف رشد گیاه آرابیدوپسیس..... ۴۴
جدول۲-۲- میزان مواد استفاده شده در ترکیب خاک‌ها..... ۴۵
جدول۲-۳- زمان و دمای تیمارها..... ۴۷
جدول۲- ۴- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در مستر PCR..... ۵۵
جدول ۲-۵- برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر در تکثیر ژن‌ها..... ۵۵
جدول ۲-۶- مشخصات پرایمرها..... ۵۷
جدول ۲-۷-برنامه‌ی مورد استفاده در فرایند Real time PCR..... ۵۸
جدول ۲-۸- بررسی‌های انجام شده در مطلاعات فنوتیپی و فیزیولوزیکی ۵۹
جدول ۲-۹- شرح کارپمپ های دستگاه HPLC..... ۶۱
جدول-۲-۱۰ روش تهیه‌ی ۵۰۰ ml تریس استات ۵۰ mM، (pH = ۵)..... ۶۳
جدول ۲-۱۱- روش تهیه‌ی ۹۶ ml محلول بازدارنده..... ۶۴
جدول۲-۱۲- روش تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف براد فورد..... ۶۷
جدول ۲-۱۳- طرز تهیه محیط واکنش جهت بررسی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز..... ۷۰
جدول۳- ۱- جدول تجزیه واریانس مدت زمان جوانه‌زنی بذور ۷۴
جدول۳- ۲- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی بذور ۷۶
جدول۳- ۳- تجزیه واریانس درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های رشد یافته در سرما..... ۷۸
جدول۳- ۴- تجزیه واریانس بررسی طول ساقه‌ی اصلی گیاه‌چه‌ها..... ۸۱
جدول۳- ۵- تجزیه واریانس وزن‌تر کل در گیاه‌چه‌ها..... ۸۴
جدول۳- ۶- تجزیه واریانس وزن‌تر شاخساره در گیاه‌چه‌ها..... ۸۴
جدول۳- ۷- تجزیه واریانس وزن‌تر ریشه در گیاه‌چه‌ها..... ۸۴
جدول۳-۸- تجزیه واریانس درصد EC گیاهان ۹۷

فهرست شکل‌ها شماره صفحه

شکل۱- ۱-آرابیدوپسیس گیاهی کوچک و دارای سیکل زندگی کوتاه.....۵
شکل ۱-۲- پراکنش آرابیدوپسیس در مناطق مختلف دنیا ۶
شکل ۱-۳- دسته‌بندی خانواده‌ی پروتئینی AP2 .....۱۰
شکل ۱-۴- تاثیر عوامل تاثیرگذار فرادستی بر بیان ژن‌های *CBF*.....۱۴
شکل-۱-۵- بهم خوردن توازن میان ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها.....۲۲
شکل-۱-۶- فرایندانتقال پیام و تغییر بیان ژن‌ها ۲۲
شکل-۱-۷-فرایند متابولیزم فنیل‌پروپانوئیدها ۲۶
شکل۱- ۸- تاثیر ژن *FRY1* در واکنش گیاه به تنش‌های محیطی.....۳۰
شکل ۱-۹-مکانیسم کنترل کنندگی پروتئین SAL1 به وسیله‌ی تجزیه‌ی PAP.....۳۲
شکل۱- ۱۰- ژن *FRY1* با ژن‌های متعدد در ارتباط است.....۳۳
شکل۱- ۱۱- میزان بیان ژن *FRY1* در بافت‌های مختلف متفاوت است ۳۳
شکل۱- ۱۲- محل قرارگیری جهش *old101* در ژن *FRY1*.....۳۵
شکل۲- ۱- ضدعفونی بذر آرابیدوپسیس با استفاده از بخارات HCl در دسیکاتور.....۴۱
شکل۲- ۲- بذرهای آرابیدوپسیس در پتری‌دیش‌های حاوی آب‌مقطر و کاغذ صافی.....۴۲
شکل۲- ۳- مراحل مختلف جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس.....۴۳
شکل ۲-۴ (a) گیاهچه‌های ۶ روزه در گلدان بعد از تنک کردن ۴۶
شکل ۲-۵- مقایسه‌ی رشد گیاه‌چه‌ها در خاک‌ها.....۴۶
شکل ۲-۶- گیاهچه‌های در کد رشدی 3.70 آماده برای تیمار دهی.....۴۷
شکل ۳-۷- پودر کردن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Tissue rupture ۵۰
شکل ۲-۸- بررسی کیفیتRNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪.....۵۲
شکل ۲-۹- بررسی صحت ساخت cDNA.....۵۴
شکل۲- ۱۰ -تصویر ژل آگارز ۱٪ کنترل ساخت cDNA ۵۶
شکل ۳-۱- مدت زمان جوانه‌زنی بذور ۷۴
شکل ۳-۲- درصد جوانه‌زنی بذور.....۷۵
شکل ۳-۳- درصد جوانه‌زنی بذور.....۷۶
شکل ۳-۴- درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های رشد یافته در سرمای 4^oC.....۷۷
شکل ۳-۵- بررسی رشد ژنوتیپ‌ها در 4^oC.....۷۸
شکل ۳-۶- مدت زمان طی شده در کدهای رشدی.....۷۹
شکل ۳-۷- بررسی طول ساقه‌ی اصلی گیاه‌چه‌ها.....۸۰
شکل ۳-۸- مقایسه‌ی طول گیاه‌چه‌ها ۶۵ روز پس از تیمار سرمایی.....۸۲
شکل ۳-۹- مقایسه‌ی ۳ صفت گیاهچه‌ها در روزهای بعد از تیمار سرمایی..... ۸۳

شکل ۳-۱۰- مقایسه‌ی بخش‌های مشابه گیاه‌چه‌های مادری و موتانت.....۸۶
شکل ۳-۱۱- بررسی محتوای کلروفیل a و b ۸۷
شکل -۳-۱۲- مقایسه‌ی مدت زمان طی شده در مراحل رشد ونمو.....۸۸
شکل ۳-۱۳- مقایسه‌ی میزان رشد و نمو گیاه‌چه‌های دو ژنوتیپ.....۸۹
شکل ۳-۱۴- اندازه‌گیری میزان (ROS) دربرگ‌های گیاه‌چه‌ها ۹۰
شکل ۳-۱۵- اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی آنزیم‌های CAT، POD، SOD و APX.....۹۲
شکل ۳-۱۶- اندازه‌گیری میزان پروتئین کل در گیاه‌چه‌ها.....۹۳
شکل ۳-۱۷- اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی آنزیم PAL در گیاه‌چه‌ها.....۹۴
شکل ۳-۱۸- اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین و کلروژنیک اسید.....۹۶
شکل ۳-۱۹- میزان بیان ژن *PAL* ۹۵
شکل ۳-۲۰- مقایسه‌ی میزان ROS در بذرهای جوانه‌زده‌ی دو ژنوتیپ (کد رشدی 0.7).....۹۶
شکل۳-۲۱- میزان EC گیاهان تیمار شده با دمای ۸°C - به مدت ۲۴ ساعت.....۹۸
شکل ۳-۲۲- مقایسه‌ی بازیابی بعد از ۵ شبانه‌روز در گیاهان تیمار شده با دمای ۸°C -.....۹۸
شکل ۳-۲۳- مقایسه‌ی بیان نسبی ژن *CBF1* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۰
شکل ۳-۲۴- مقایسه‌ی بیان نسبی ژن *CBF2* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۱
شکل ۳-۲۵- مقایسه‌ی بیان نسبی ژن‌های *CBF3* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۲
شکل ۳-۲۶- مقایسه‌ی بیان *نسبی ژن COR15A* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۳
شکل ۳-۲۷- مقایسه‌ی بیان نسبی *ژن FRY1* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۴
شکل ۳-۲۸- مقایسه‌ی بیان نسبی *ژن DEFL* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۵
شکل ۳-۲۹- مقایسه‌ی بیان نسبی *ژن DEFL* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۶
شکل ۳-۳۰- مقایسه‌ی بیان نسبی *ژن GST1* در گیاه‌چه‌ها.....۱۰۷
شکل-۳- ۳۱- NADH و NADPH دهیدروژناز وابسته به کلسیم تهیه شده از شبکه‌ی آندوپلاسمی.....۱۱۳
شکل-۳-۳۲- نقش کلسیم در فعالیت میتو کندری و افزایش ROS.....۱۱۴

چکیده فارسی:

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌های *CBF* و *OLD101 / FRY1* در واکنش به تنش سرما در گیاهان وحشی و جهش‌یافته *old101* در آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) با استفاده از RT-PCR نیمه‌مقایسه‌ای.

علی مبارکی

سرما از جمله تنش‌های محدود کننده‌ی رشد گیاهان محسوب می شود. شناسایی مکانیزم‌های سازگاری به سرما در گیاهان جهت دست یابی به ارقام سازگار با سرما ضروری است. ژن *FIERY1* (*FRY1*) از جمله ژن‌هایی است که پروتئین آن نقش مهمی را در فرایند تنظیم واکنش گیاهان در مواجهه با تنش سرمایی ایفا می‌کند. در این پژوهش واکنش گیاهان موتانت *old101* و مادری L*er*-0 در شرایط تنش سرما از لحاظ خصوصیات مولکولی، فنوتیپی و فیزیولوژیکی بررسی شد. به این منظور آزمایش جوانه‌زنی در دماهای مختلف و شرایط نور و تاریکی جهت بررسی صفات سرعت و درصد جوانه‌زنی انجام شد. همچنین ابتدا گیاهچه‌ها به‌مدت ۱۷ روز در شرایط طول روز ۱۶ ساعت و دمای ۲۳ درجه نگهداری و سپس به‌مدت ۱۲۷ روز به شرایط دمای 4^{o}C و طول روز مشابه انتقال یافتند. در طول دوره‌ی تیمار سرمایی فوق میزان بیان نسبی ژن‌های واکنش‌گر به تنش شامل (*CBF1*، *CBF2*، *CBF3*، *COR15A*، *FRY1*، *GST1* و *DEFL*) درگیاهان موتانت*old101* با گیاهان مادری L*er*-0 مقایسه شد. همچنین صفات فنوتیپی شامل (طول ساقه‌ی اصلی، وزن تر قسمت هوایی، وزن تر ریشه و طول دوره رشدی) و صفات فیزیولوژیکی شامل (میزان تنش اکسیداتیو و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی) در گیاهان فوق مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده از بررسی بیان نسبی ژن‌ها نشان‌داد که بیان نسبی ژن‌هایی *CBF1*، *CBF2*، *DEFL*، *GST1* و *FRY1* در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* بمراتب کمتر از گیاهچه‌های مادری L*er*-0 و بیان نسبی ژن‌های *CBF3* و *COR15A* در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* بمراتب بیشتر از گیاهچه‌های مادری L*er*-0 می‌باشد. نتایج فنوتیپی حاکی از کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی، افزایش حساسیت، افزایش طول دوره رشد، کاهش طول ساقه، کاهش وزن‌تر (کل، شاخساره و ریشه) درگیاهان جهش‌یافته *old101* در مقایسه با گیاهان مادری بود. نتایج فیزیولوژیکی نیز حاکی از تأخیر در زمان کاهش محتوای کلرفیل a و b و تاخیر در زمان افزایش آنتوسیانین و کلروژنیک اسید و فعالیت آنزیم PAL با افزایش سن گیاه و کاهش میزان تنش‌اکسداتیو (ROS) در گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان مادری است.

Abstract

Monitoring of wild type and *old101* mutant Arabidopsis (*Arabidopsis taliana*) plants in response to cold-induced *in vitro* stress.

Ali Mobaraki

Cold temprature is one of the important abiotic stresses limiting the growth and development in plants. Identification of acclimation mechanisms and related involved genes in plants could be an important aspect in production of cold resistant plnats. Previously identified gene (*FRY1*) *FIERY1* is involved in regulation of cold signal transduction by activation of stress-responsive genes. The Arabidopsis FIERY1 protein is an inositol polyphosphate 1-phosphatase that is upregulated upon treatments with cold, drought, salt stress, or ABA resulting in transition increased IP3 (Inositol-1,4,5 triphosphate) in plants. In this research, we first looked at the seed germination of L*er*-0 and *old101* under different temperatures and light conditions. Than various phenotypical, physiological and molecular aspects of wild type L*er*-0 and *old101* mutants plants have been characterized in respons to cold stress conditions. Therefore, 17-day-old plants have been placed in 4 ºC for a long time following phenotypical, physiological and molecular charachterizations in various time points. In this regard, relative gene expression levels of several stress responsive genes including *CBF1, CBF2, CBF3, GST1, DEFL, FRY1 and COR15* have been measured using Q Real Time PCR approach. On the basis of obtained results, *old101* seeds were germinated considerably slower under *in vitro* cold-induced stress, and enhanced sensitivity to cold stress conditions when the growth and development charachters and differents physiological traits in *old101* mutant plants were compared with the wild type plants. Gene expression levels of most of responsive gene have been considerably decreased in mutant plants. Moreover, ROS levels and antioxidant system activity in *old101* plants showed a significant change in comparision with the wild type plants. As a conclusion, more sensitivity to cold stress condition is a result of low activity of antioxidant systems in combination with decreased levels of ROS and *FRY1* expression levels which might be a cause of low activity of inositol polyphosphate 1-phosphatase of FRY1 in *old101* plants.

Keywords: cold stress, *FIERY1*, *GST1*, ROS, antioxidant.

مقدمه

سرما، خشکی و شوری از جمله تنش‌هایی هستند که بر رشد و نمو گیاهان و تولید محصولات زراعی اثر مضر دارند [رهایی و همکاران، ۲۰۱۰]. 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 [Huang et al., 2012]. قرار گرفتن در معرض سرما از مهم-ترین تنشهای غیرزیستی برای گیاهان در مناطق معتدله می‌باشد [Janska et al., 2010]. سرما عامل محدودکننده‌ی رشد گیاهان بوده و به دو دسته‌ی دمای سرمازدگی (۱۵-۰ درجه سانتی‌گراد) و دمای یخزدگی (<۰ درجه سانتی‌گراد) تقسیم می شود بیشتر گیاهان نمی‌توانند تنش یخزدگی را به‌راحتی پشت‌سر بگذارند، ولی پس از قرار گرفتن در معرض دمای سرمازدگی می‌توانند مقاومتشان را نسبت به دمای یخزدگی افزایش دهند [Zhou et al., 2011]. گیاهان می‌توانند با درک تنش سرما و سپس فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی و سازگاری خود باعث افزایش مقاومت در برابر تنش سرمایی شوند. بطور عمومی یک فرایند انتقال پیام با درک پیام شروع شده و پس از آن به وسیله پیامبرهای ثانویه شامل القای کلسیم، انواع احیاکننده‌های-اکسیژن (ROS)[1] و اینوزیتول فسفاتازها ادامه می‌یابد. پیامبرهای ثانویه بالا در جهت تعدیل سطح کلسیم داخل سلولی فعالیت می‌کنند [Huang et al., 2012]. سطوح کلسیم Ca^{2+} به عنوان یک پیامبر ثانویه در انتقال پیام تنش سرمایی عمل می‌کنند [Chinnusamy et al., 2010]. کلسیم ممکن است از فضای خارج سلولی وارد سلول شده و یا از طریق ذخایر کلسیم داخل سلولی تامین شود. مطالعات مرتبط با تغییرات پتانسیل القاشده با سرما در غشای پلاسمایی پروتوپلاست‌های مزوفیل گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که کانال کلسیم فعال شونده با سرما در تنظیم پیامهای سیتوسولی کلسیم درگیر می‌باشد [Rosenberg et al., 1993]. مطالعات فارماکولوژیکالی[2] بر این نکته تاکید دارد که IP3[3] بر فعالیت کانال‌های درون‌سلولی کلسیم در جریان بیان ژن‌های *COR*[4] تاثیر گذار است [Charlesworth et al., 2001]. ژن (At5g63980) *FRY1* بطول

[1] - Reactive oxygen species

[2]- Pharmacological

[3]- Inositol-1,4,5 triphosphate

[4] - Coldresponsive genes

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 در واکنش گیاه به تنش محیطی مؤثر است (شکل۱-۸) [Xiong et al., 2004].

در ژن *FRY1* جهش‌های متعددی گزارش شده است، از جمله می‌توان به *fry1-1*، *fry1-2*، *fry1-6* ، *hos2* و *old101* اشاره کرد [Xiong, Lee, et al., 2002; Shirzadian-Khoramabad et al., 2008]. بررسی‌های ژنتیکی نشان داد که موتاسیون های ایجاد شده در ژن *FIERY1 (FRY1)* باعث کاهش اثر آنزیمی اینوزیتول پلی‌فسفات ۱ فسفاتازی پروتیین FRY1، که این امر منجر به افزایش قابل توجه IP3 و پایدار ماندن سطوح آن ، در گیاهان موتانت گردید. این در حالیست که افزایش سطوح IP3 در گیاهان وحشی زودگذر می‌باشد این وضعیت منجر به افزایش القای ژن‌های *CBF* و *COR* شد [Xiong et al., 2001]. پروتئین‌های CBF در کنترل رونویسی فرایند سازگاری به سرما درگیر بوده و به‌عنوان فاکتور مهم کنترل‌کننده‌ی ژنهای موثر در اکنش به سرما (*COR*) مطرح شده‌اند [Zhou et al., 2011]. 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 است [Shirzadian-Khoramabad et al., 2008]. در این پژوهش تاثیر جهش *old101* بر میزان جوانه‌زنی در دماهای مختلف و شرایط نور و تاریکی انجام شد و صفات سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی اندازه‌گیری شد همچنین میزان رشد و توسعه گیاهچه‌های جهش یافته *old101* تحت تنش سرمای 4^{o} C در مقایسه با ژنوتیپ مادری L*er*-0 مورد بررسی قرار گرفت، به صورتی که گیاهچه‌ها در طول نگهداری در دمای ^{o} 4C از نظر صفات طول ساقه‌ی اصلی، وزن تر قسمت هوایی، وزن تر ریشه و طول دوره رشدی،میزان تنش اکسیداتیو و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) مقایسه شده و همچنین میزان نسبی بیان برخی از ژن‌های واکنش‌گر به تنش در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تنش سرما در زمان‌های مختلف با روش Q Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

[1] - Onset of leaf death 101 (old101)

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱-آرابیدوپسیس

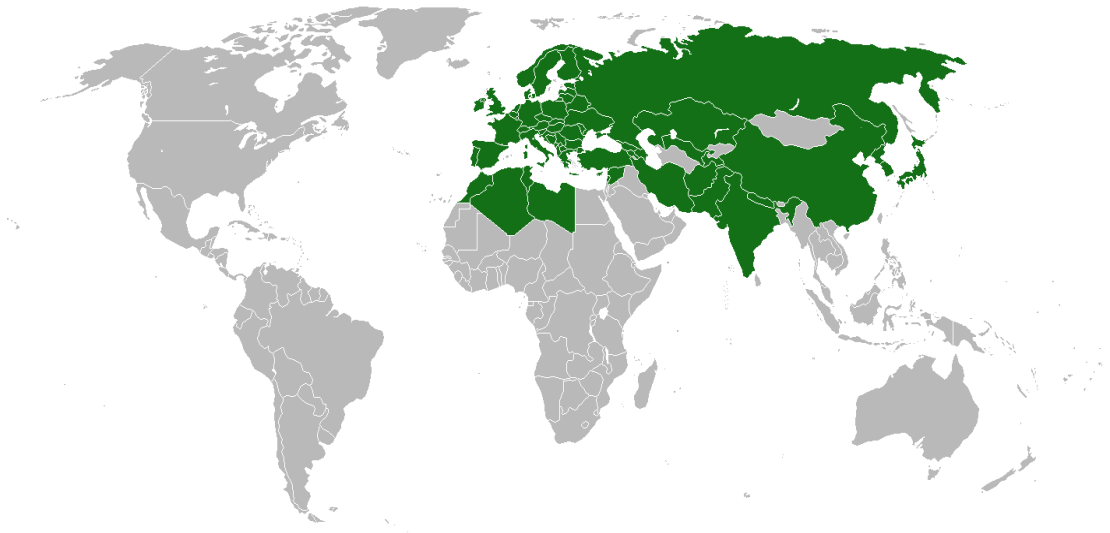
با ورود به قرن بیست و یکم استفاده سالم و پایدار از محیط زیست و محیط طبیعی و ملاحظات مرتبط با سلامت انسان از مهمترین موضوعات مورد دغدغه بشر است [Rosenberg et al., 1993]. این ملاحظات بشدت با کشاورزی (غذا)، اکولوژی و محیط زیست مرتبط می‌باشد که در این بین زیست شناسی و بخصوص زیست‌شناسی گیاهی مهمترین نقش را ایفا می نماید و با توجه به اینکه گیاهان تنها منابع تجدیدشونده بوده وهمچنین مواد و انرژی سازنده را تشکیل می‌دهند، بنابر این زیست گیاهی قدرتمند ترین ابزار برای استفاده مناسب از منابع گیاهی می‌باشد[Charlesworth et al., 2001].

در طول تاریخ علم بیولوژی بسیاری ازدانشمندان علوم تجربی ، کار بر روی یک تعداد محدود از ارگانیزم‌ها (ارگانیزم‌های مدل) را برگزیده‌اند، دامنه این ارگانیزم‌های مدل از باکتری‌ها تا شامپانزه را در بر می‌گیرد. در اختیار گذاشتن یک استاندارد در هر مقطع تحقیقاتی و انباشته شدن حجم بزرگی از اطلاعات به واسطه تمرکز در تحقیقات، علت استفاده از ارگانیزم‌های مدل در تحقیقات علمی می‌باشد. به دلیل بنیادی بودن فرایندهای بیولوژیکی مانند فرایندهای متابولیزمی، نموی و ژنتیکی و ثبات آنها در جریان تکامل، با مطالعه بر روی ارگانیزم‌های نسبتآ اولیه مانند مگس سرکه یا کرم نماتد امکان پیشبینی و بسط دادن نتایج بدست آمده به دیگر اورگانیزم های پیچیده‌تر مانند انسان وجود دارد [Davis et al., 1990]. گیاه آرابیدوپسیس درزیست-شناسی گیاهی به عنوان یک گیاه مدل ژنتیکی 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, Van Himbergen, et al., 1998].

آرابیدوپسیس (Arabidopsis thaliana) یک گیاه کوچک، یکساله، روز بلند، بطول۱۰- ۴۰ سانتی‌متر بوده و از خانواده خردل (Brassicacea) می باشد [François et al., 2008] (شکل ۱-۱). این گیاه بومی مناطق اورآسیا شناخته شده [Al-Shehbaz et al., 2002] (شکل ۱-۲). خاک مناسب رشد این گیاه خاک لومی و ماسه‌ای است دوره زندگی این گیاه طی ۵۰ روز کامل شده و تولید بذر می کند. طول دوره زندگی کوتاه ، تولید بذر فراوان، خودگشن بودن، ژنوم کوچک (۲۵۴۹۸ ژن)، قابلیت ترانسفرماسیون و امکان ایجاد جهش‌های متعدد باعث انتخاب آرابیدوپسیس به عنوان یک موجود ایده‌آل برای مطالعات آزمایشگاهی شده است [François et al., 2008].

http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm

شکل۱- ۱-آرابیدوپسیس گیاهی کوچک و دارای سیکل زندگی کوتاه، بذر فراون و قابلیت رشد حتی در میان سنگ‌فرش خیابان



http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis

شکل ۱-۲- پراکنش آرابیدوپسیس در مناطق مختلف دنیا (نقاط دارای رنگ تیره بر روی نقشه)

۱-۲- غذا :

تداوم افزایش رشد جمعیت انسان متوقف نشده است. تخمین زده‌می‌شود که جمعیت انسان‌های کره زمین در سال ۲۰۵۰ به ۹ میلیارد نفر برسد و این مستلزم دوبرابر شدن تولید غذا می‌باشد [Tuteja et al., 2012]. دربرخورد با این چالش دو راهکار وجود دارد. راهکار اول افزایش سطح زیر کشت محصولات کشاورزی و راهکار دوم ، افزایش توان بهره‌وری محصولات کشاورزی است. اقیانوس‌ها و مناطق سرد قطبی حدود ۸۰٪ از سطح زمین را اشغال کرده‌اند. تنها یک سوم از کل سرزمین ها فاقد یخبندان می‌باشد و حدود ۴۲٪ از این نواحی معمولاً دماهای زیر 20° C - را تجربه می‌کنند [Juntilla et al., 1999]. با این حال تنهارحدود ۱۰٪ از ۱۴ میلیارد هکتار زمین موجود کشت می‌شوند. علت اصلی آن به‌خاطر تنش‌های غیزریستی (خشکی، شوری، سرما و ...) و سپس سایر عوامل محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد. این مشکلی است که نمی توان به حال خود رها شود [Yadav, 2010]. در حال حاظر میانگین بهره‌وری در بیشتر محصولات حدود نصف توان موجود می‌باشد. این شکاف در بازده به‌علت خسارت ناشی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی است [Tuteja et al., 2012]. مانع اصلی در مقابل هر دو راهکار