بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه خوارزمی

دانشکده علوم -گروه زیست شناسی

رشته زیست شناسی علوم گیاهی -گرایش فیزیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

موضوع پایان نامه:

مکانیسم مولکولی مقاومت گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* (***Arabidopsis thaliana* L.**) به تنش اکسیداتیو ناشی از سرما

اساتید راهنما:

آقای دکتر رمضانعلی خاوری نژاد

آقای دکتر رضا شکسته بند

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر فرزانه نجفی

نگارش:زهرا قراری

بهمن ماه ۱۳۹۰

سپاس نامه

بار الها اعتراف می کنم که نه زبان شکر تو را دارم و نه توان تشکر از بندگان تو، اما بر خود واجب می دانم تا در حد توان و با زبانی قاصر از زحمات تمام کسانی که به یاری بنده حقیر شتافتند، سپاس گزاری نمایم:

در ابتدا از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر رمضانعلی خاوری نژاد که این پایان نامه بهانه ای شد تا حقیر به اندازه وسع خویش از علم ایشان بهره مند گردم صمیمانه سپاسگزارم.

نهایت سپاس و قدر دانی خود را نثار استاد فرزانه جناب آقای دکتر رضا شکسته بند می نمایم که با حوصله ای بی نظیر و رأفتی فراوان سخت کوشی و پشتکار عمل در کار را به من آموخت.

از استاد محترم سرکار خانم دکتر فرزانه نجفی که بدون هدایت و سخاوت علمی ایشان امکان تکمیل این پژوهش میسر نمی گردید، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر فرخ قهرمانی نژاد و جنای آقای دکتر وحید نیکنام که با قبول زحمت داوری این پایان نامه، ما را از نقطه نظرات ارزشمند خویش بهره مند ساختند، تشکر می نمایم.

از جناب آقای دکتر محمد نبیونی جهت راهنمایی های بی دریغ شان و همکاری صمیمانه در تکمیل این پژوهش نهایت سپاس و تشکر را دارم.

از سرکار خانم دکتر شهربانو عریان مدیر محترم گروه زیست شناسی و جناب آقای دکتر فرخ قهرمان نژاد نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم.

از دوستان مهربان و صمیمی ام خانمها لیلا کرمی و زهرا نظری که در این کار دلسوزانه مرا یاری نمودند بی نهایت سپاسگزارم.

از تمامی دوستان عزیزی که در طول این دوران مشوق و یاریگر بنده بودند: خانم ها وحیده مصدق، یترا لطیفی، زهرا صفائی نژاد، سارا میرسپاسی، مهتاب رشیدی، مهناز قلی زاده و آقایان مهدی یوسفی نیا و آزادرسگار کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در پایان از خانواده عزیزم بالاخص پدر و مادر مهربانم و خواهر عزیزم فاطمه خانم صمیمانه سپاسگزاری می نمایم و این پایان نامه را به عنوان برگ سبزی پیشکش وجود سبزشان می نمایم.

خلاصه

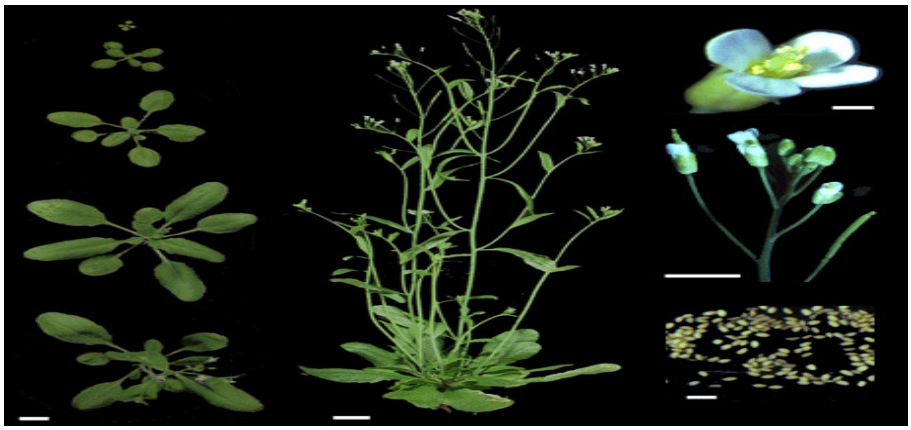
به منظور فهم برخی مکانیسم های فیزیولوژیکی و مولکولی حساسیت به تنش chilling و سرما در گیاهان تاثیرات تنش chilling و سرما را روی برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا بررسی کردیم. گیاهان چهار هفته ای (گیاه وحشی و ۴ جهش یافته حساس به chilling شامل chs2-2، chs2-1، chs1-2 و chs1-1) به مدت یک هفته در معرض ۲ تیمار دمایی متفاوت (۱۳ درجه سانتیگراد و ۴ درجه سانتیگراد) و دمای کنترل (۲۳ درجه سانتیگراد) بودند. محتوای کلروفیل و Fv/Fm در همه جهش یافته ها تحت تیمار ۱۳ درجه سانتیگراد در مقایسه با تیمار ۴ درجه سانتیگراد و شرایط کنترل تغییر کرد. دو جهش یافته chs1-1 و chs1-2 کمترین محتوای کلروفیل و شدت فتوسنتز را در میان ژنوتیپ های سنجش شده داشتند. محتوای پرولین در همه جهش یافته ها و گیاه وحشی به وسیله تیمار ۱۳ و ۴ درجه سانتیگراد در مقایسه با کنترل افزایش یافت. محتوای مالون دی آلدهید ساقه و برگ گیاهان جهش یافته به استثنای گیاه وحشی به طور برجسته ای به وسیله تنش chilling، در مقایسه کنترل و تیمار ۴ درجه سانتیگراد افزایش یافت. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیمی نشان داد که فعالیت آنزیم بنزیدین پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تیمار ۱۳ درجه سانتیگراد نسبت به دو تیمار دمایی دیگر در جهش یافته ها نسبت به گیاه وحشی افزایش یافته است. این افزایش در دو جهش یافته chs1-1 و chs1-2 نسبت به دو جهش یافته دیگر بیشتر بود. محتوای پروتئین تحت chilling در همه موتان ها نسبت به تیمار ۴ درجه سانتیگراد و شرایط کنترل کاهش یافت. بیان Mn SOD و Fe SOD1 گیاهان جهش یافته تحت تنش chilling و سرما افزایش یافت. بیان ProDH2 در برخی از گیاهان جهش یافته به وسیله تیمار chilling افزایش یافت، در صورتی که بیان P5CDH تحت این شرایط کاهش یافت، و به این ترتیب منجر به افزایش برجسته در مقدار P5C و تولید ROS به عنوان نتیجه ای از فعالیت چرخه P5C گردید. احتمالا برخی آسیب ها در متابولیسم پرولین از طریق جهش منجر به حساسیت بیشتر به تنش chilling و سرما می گردد. یافته های ما نشان داد که دو جهش یافته chs1-1 و chs1-2 بیشترین حساسیت را از میان ژنوتیپ های سنجش شده دارند. احتمالا برخی جهش ها در سیستم های فتوسنتزی و متابولیسم پرولین منجر به حساسیت بیشتر به تنش chilling و سرما می گردد.

فصل اول

مقدمه

۱-۱ -گیاه شناسی *آرابیدوپسیس تالیانا*

آرابیدوپسیس یکی از گونه های کلمیان (*Cruciferae* یا *Brussicaceae*) با پراکنش طبیعی گسترده در سرتاسر اروپا ، آسیا و آمریکای شمالی می باشد. اکوتیپ های *Columbia* و *Landsberg* استانداردهای مورد قبول برای مطالعات ژنتیک و مولکولی را دارند. چرخه کامل زندگی شامل جوانه زنی، تشکیل یک گیاه رزتی، ساقه دادن ساقه اصلی، گلدهی و بلوغ اولین دانه ها در ۶ هفته تکمیل می گردد. پس از رشد کامل*آرابیدوپسیس* تقریبا تمام قسمت های آن کوچک می باشند، گل ها ۲ میلی متر طول دارند، با باز شدن غنچه ها خودگشنی می کنند. دانه ها در هنگام بلوغ ۰/۵میلی متر طول دارند و در میوه های باریک که به عنوان خورجین شناخته شده اند تولید می شوند. نمو دانه رست ها به گیاهان رزتی که وسعت قطرشان به ۲ الی ۱۰ سانتی متر می رسد، به شرایط رشد بستگی دارد. برگ ها با موهای کوچک تک سلولی موسوم به تریکوم که به عنوان مدلی برای مطالعه مورفوژنزیس و تمایز سلولی مناسب می باشند، پوشیده شده اند.



شکل ۱-۱- اندام های مختلف گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* (Reboud *et al*., 2004).

گیاهان می توانند در ظرف های پتری یا گلدان های مورد حفاظت در گلخانه یا تحت نورهای فلورسنس در آزمایشگاه رشد داده شوند.گل دهی ۳ هفته بعد از کاشت شروع می شود که منجر به تشکیل گل آذینی می گردد که در یک تصاعد خطی گل ها و خورجین ها را برای چندین هفته قبل از آغاز پیری تشکیل می دهد.

گل ها از یک حلقه بیرونی حاوی ۴ کاسبرگ سبز و حلقه های داخلی شامل ۴ گلبرگ سفید، ۶ پرچم تولیدکننده گرده و یک مادگی که میوه را به وجود می‌آورد تشکیل شده است.گیاهان بالغ ۱۵ الی ۲۰ سانتی متر طول دارند و اغلب چند صد خورجین با بیش از ۵۰۰۰ بذر تولید می کنند. ریشه ها از نظر ساختار ساده هستند، برای مطالعات کشت بافت آسان هستند و ارتباطات همزیستی پایدار با باکتری های تثبیت کننده ازت انجام می دهند. پاتوژن های طبیعی شامل یک سری متنوع از حشرات، باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها می باشند (Meinke *et al* , 1998).

۱ -۱ -۱ -رده بندی علمی

Kingdom: Plantae, Angiosperms, Eudicots, Rosids, Brassicales, Brassicaceae, ***Arabidopsis*** (Al-Shehbaz *et al*., 2002)

۱ -۱ -۲ - فهرست گونه ها ، زیرگونه ها و پراکنش آن ها

۱)*Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalrée دارای ۲ زیرگونه :

A. arenosa subsp. *arenosa*

پراکنش: اروپا: بومی استرالیا، بلاروس، بوسنی هرزگوین، جمهوری چک، شمال شرقی فرانسه، بولگاریا، کرواسی، آلمان، هانگری، شمال ایتالیا، لاتویا، لتونیا، مقدونیه، لهستان، رومانی، اسلواکی، اسلونی، اوکراین، سوئیس و یوگوسلاوی، بومی شده بلژیک، دانمارک، استونی، فنلاند، هلند، نروژ، روسیه و جنوب سیبری و سوئد، عدم حضور در آلبانی، یونان، مرکز و جنوب ایتالیا و ترکیه.

A. arenosa subsp. *borbasii*

پراکنش: شرق بلژیک، جمهوری چک، شمال شرقی، آلمان، هانگری، لهستان، رومانی، اسلواکی، سوئیس، اوکراین و احتمالاً در دانمارک.

۲)*Arabidopsis cebennensis* (D.C.) پراکنش: جنوب شرقی فرانسه

۳) *Arabidopsis croatica* (Schott)O'Kane& Al-Shehbazپراکنش: بوسنی، کرواسی.

۴) *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane& Al-Shehbaz دارای ۳ زیرگونه:

A. halleri subsp. *halleri*

پراکنش: استرالیا، کرواسی، جمهوری چک، آلمان، شمال و مرکز ایتالیا، لهستان، رومانی، اسلواکی، اسلوونی، سوئیس و جنوب اوکراین، احتمالا در شمال فرانسه وارد شده و در بلژیک منقرض شده است.

A. halleri subsp. *ovirensis* (Wulfen) O'Kane& Al-Shehbaz

پراکنش: آلبانی، استرالیا، شمال شرقی ایتالیا، رومانی، اسلواکی، اسلوونی، جنوب غربی اوکراین، یوگوسلاوی.

A. halleri subsp. *gemmifera* (Matsumura) O'Kane& Al-Shehbaz

پراکنش: شرق روسیه، شمالی ترین قسمت چین، کره، ژاپن و تایوان.

۵) *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane& Al-Shehbaz دارای ۳ زیرگونه:

A. lyrata subsp. *lyrata*

پراکنش: شمال شرقی روسیه، آلاسکا، کانادا (غرب انتاریو) و مرکز و جنوبی ترین قسمت ایالات متحده (جنوب ورمونت به سمت شمال جورجیا و شمال می سی سی پی به سمت میسوری ومینسوتا).

A. lyrata subsp. *petraea* (Linnaeus) O'Kane& Al-Shehbaz

پراکنش: استرالیا، جمهوری چک، انگستان، آلمان، هانگری، ایسلند، ایرلند، شمال ایتالیا، نروژ، روسیه(شمال غربی روسیه، سیبری و خاور دور) اسکاتلند، سوئد، اوکراین، شمال آمریکا(آلاسکا و یوکان)، ظاهرا در لهستان منقرض شده است.

A. lyrata subsp. *kamchatica* (Fischer ex D.C.) O'Kane& Al-Shehbaz

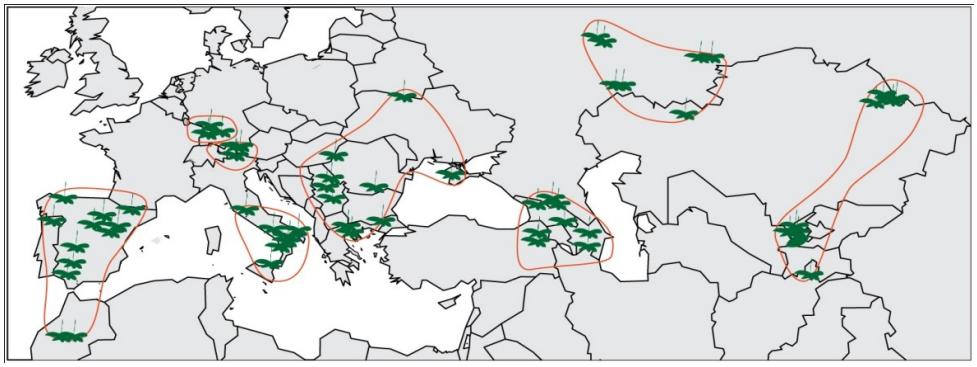
پراکنش: شمال آلاسکا، کانادا (یوکان، ناحیه مکنزی، بریتیش کلمبیا)، ایسلند، شرق سیبری، شرق روسیه، کره، شمال چین، ژاپن و تایوان.

۶) *Arabidopsis neglecta* (Schultes) O'Kane& Al-Shehbaz پراکنش: کوه های کارپاشیان(انگلستان، رومانی، اسلواکی و مجاور اوکراین).

۷) *Arabidopsis pedemontana* (Boiss.) O'Kane& Al-Shehbaz پراکنش: شمالی ترین نقطه ایتالیا و احتمالا نزدیک به جنوب غربی سوئیس منقرض شده است.

۸).*Arabidopsis suecica* (Fries) Norrlin & Meddel پراکنش: فنوسکاندینیویا و ناحیه بالتیک.

۹).*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh پراکنش: تقریبا بومی کل محدوده اروپا به سمت مرکز آسیا، هم اکنون بومی جهانی شده است(Al-Shehbaz *et al*., 2002).



شکل۱-۲- تصویر پراکنش جهانی *آرابیدوپسیس تالیانا*(ناحیه سبز روی نقشه جهانی) (Cao *et al*., 2011) .

۱-۱-۳-جهش یافته های حساس به تیمار سرما

جهش یافته های حساس به chilling (تیمار سرما) در ۴ کلاس فنوتیپی طبقه بندی می شوند. کلاس ۱ جهش یافته ها ابتدا زرد، پژمرده و در نهایت می میرند. برگ های پیر کلاس ۲ جهش یافته ها همان پاسخ را نشان می دهند اما برگ های رزتی کاملا سالم می مانند. کلاس ۳ موتان ها لکه های زرد را توسعه می دهند که همیشه پیوسته نیستند و قسمت هایی سبز می مانند. در کلاس ۴ بخشی از هر برگ نزدیک به مرکز رزتی زرد می شوند. گیاهان در کلاس های۲ ،۳ و ۴ نهایتاً گل و دانه را پس از چندین هفته تحت تیمار سرما تولید می کنند. کلاس ۱ موتان ها پس از سه روز قرارگیری در معرض تیمار سرما می میرند و نمی توانند پس از این زمان با بازگشت به دمای رشد نرمال نجات یابند. در مطالعه کنونی ۴ جهش یافته ST106,PM11,ST117 و PM2 مربوط به کلاس ۱ بررسی شدند، که از بین این جهش یافته ها ۲ جهش یافته ST106 و PM11 مغلوب و ۲ جهش یافته دیگر دارای جهش غالب بودند.

جدول ۱-۱- طبقه بندی فنوتیپی و ژنوتیپی جهش یافته های حساس به تیمار سرما گیاه *آرابیدوپسیس* (Schneider *et al*.,1994).

Mutant strain,			locus	M2 batch	dominance	resistant	sensitive, X^2 (a)	
Class 1	Plant dies							
		ST106	*(chs1-2)*	3	R	79	28	0.1
		PM11	*(chs1-1)*	1	R	294	87	0.9 b
		ST117	*(chs2-2)*	3	D	55	145	0.7
		PM2	*(chs2-1)*	1	D	19	59	0
		ST119	*(chs3)*	3	R	205	45	6.5
Class 2	Old leaves die							
		ST13	*(chs4-1)*	2	R	185	51	1.5
		ST35	*(chs4-2)*	2	R	137	49	0.2
		ST64	*(chs4-3)*	2	R	405	64	32.2
Class 3	Chlorotic patches							
		ST34	*(chs5)*	2	R	37	10	0.4
		ST39	*(chs6-1)*	2	R	73	23	0.1
		ST48	*(chs6-2)*	2	R	70	16	1.9
		ST83	*(chs6-3)*	3	R	171	49	0.9
Class 4	Chlorotic middle							
		ST23	*(chs7)*	2	R	136	44	0
		ST25	*(chs8)*	2	R	29	10	0
		ST27	*(chs9)*	2	R	162	70	3.3
		ST28	*(chs10)*	2	R	169	69	2
		ST36	*(chs11)*	2	R	53	17	0
		ST45	*(chs12)*	2	R	14	6	0.3
		ST74	*(chs13)*	2	R	104	31	0.3
		ST88	*(chs14)*	3	R	182	65	0.2
		ST115	*(chs15)*	3	R	28	10	0

۱-۲-خواص ضد میکروبی و ضد قارچی

گیاهان *آرابیدوپسیس* تحت تاثیر ویروس موزائیک تنباکو (TMV)یا تیمار با ۲ و ۶ دی کلروایزومیکوتینیک اسید (INA) یا سالیسیلیک اسید (SA)، چندین نوع پروتئین را تولید می کنند که منجر به القاء مقاومت سیستمیک (systemic) مورد نیاز می گردد (Uknes *et al*., 1992 and Ward *et al*., 1991).

۱-۲-۱-پروتئین های شبه thaumatin (Thaumatin Like Protein,TLP)

پروتئین thaumatin یک پروتئین طعم شیرین، ایزوله شده از گیاه *Thaumatococcus daniellii* نواحی گرمسیری (Cornelissen *et al*., 1986) می باشد. این پروتئین ها به ۳ زیرگروه تقسیم می شوند: اسیدی (PR-S)، بازی (اسموتین) و پروتئین های طبیعی (پروتئین های مشابه اسموتین، OLP) .

ATLP-1 یک پروتئین خارج سلولی اسیدی می باشد که می تواند به وسیله سالیسیلیک اسید و پاتوژن های مختلف القا شود (Hu and Reddy, 1997). بیان ATLP-1 تحت تاثیر پاتوژن یا ترکیبات القا کننده SAR القا نمی شود .

ATLP-2 مشابه با ATLP-1 می باشد به جز اینکه فاقد نوکلئوتیدهای ۱۰۹ در ناحیه ترجمه نشده ´3 در جلو دم پلیA می باشد (Hu and Reddy, 1995). از این رو احتمال دارد که ATLP-1 و ATLP-2 از یک ژن به وسیله پردازش متمایز رونوشت مشتق شده باشند.

ATLP-3 فعالیت ضد قارچی دارد (Hu and Reddy, 1997) و مشابهت توالی شاخصی را با پروتئین های PR5 اسیدی از همان گیاه و دیگر گیاهان نشان می دهد و بیانش به وسیله سالیسیلیک اسید و پاتوژنهای مختلف القا می شود.

ATLP3 فعالیت ضد قارچی قوی بر علیه چندین نوع نژاد قارچی مثل *Fusarium oxysporium, Alternaria solani, Trichoderma reesei,Candida albicans* نشان می دهد. بازدارندگی رشد به وسیله ممانعت از جوانه زنی اسپورهای قارچی صورت می گیرد. جوشاندن ATLP-3 به مدت ۵ دقیقه منجر به فقدان کامل فعالیت ضد قارچی اش می شود.

۱-۲-۲- پروتئین های اسموتین

فعالیت ضد قارچی علیه چندین پاتوژن قارچی در سنجش های in vitro نشان می دهند. برای مثال زآماتین، یک اسموتین ایزوله شده از ذرت (*Zea mays*) فعالیت ضد قارچی بر علیه *Candida albicans*, *Neurosporacrassa*and *Trichodermareesei* نشان می دهد و موجب فقدان مواد سیتوپلاسمی از قارچ و موجب گسیختگی در هیف قارچ می گردد. غلظت های بالای TLP ها می

تواند به طور فعال غشای قارچ را لیز کند، اما در غلظت های پایین ممکن است منجر به نفوذپذیری غشا شوند. تغییراتی که منجر به فقدان تشکیلات سلولی می گردد (Roberts and Selitrennikoff, 1990).

۱-۲-۳- پروتئین های مشابه اسموتین

افزایش تولید اسموتین در گیاهان تراریخت مقاومت گیاه به چندین پاتوژن را افزایش می دهد (Liu *et al*., 1994). ایزوفرم طبیعی OLP، در چندین گیاه نظیر تنباکو، سیب زمینی و *آرابیدوپسیس* شناسایی شده است (King *et al*, 1988, Melchers *et al*,1993, Zhu *et al*,1993, Hu and Reddy, 1997, Chen *et al*, 1996, Capelli*et al*, 1997). این ایزوفرم ها به انواع تحریکات غیر زیستی و به قارچ پاتوژن پاسخ می دهند. از جمله PR5که به پروتئین خارج سلولی (PR5 اسیدی)، ترجمه می شود و یک پروتئین کیناز رسپتور (PR5K) با دومین انتهای آمینواسیدی بسیار مشابه با پروتئین های ضد قارچی خانواده1992 (Uknes *et al*., Wang) PR5 PR5K پلی پپتیدی با ۶۶۵ آمینواسید می باشد که شامل یک دومین خارج سلولی، یک دومین بین غشایی و یک سرین -ترئونین پروتئین کیناز داخل سلولی می باشد. دومین خارج سلولی PR5K در گیاهان تحت چالش با میکروارگانیسم های پاتوژن تجمع می کند. دومین کیناز PR5K به یک خانواده سرین -ترئونین پروتئین کینازها مربوط می باشد که در بیان خودناسازگاری و مقاومت بیماری درگیر می باشند. از مشابهت ساختاری بین دومین خارج سلولی PR5K و پروتئین های ضد میکروبی PR5 پیشنهاد می شود که امکان یک برهمکنش با اهداف میکروبی متداول دارد(Wang *et al*, 1996) .

۱-۳-تنش و گیاهان

تنش (stress) در تعریف عام عبارت است از هر نیرویی که به جسمی وارد می شود که بر اثر این نیرو تغییراتی در ابعاد جسم بوجود می آید که آن تغییرات را کرنش (strain) گویند. در گیاهان تنش برابر است با تحریکاتی که منجر به برهم خوردن تعادل زیستی گیاه شود. حالت تنش در شرایطی پیش می آید که یک عامل محیطی خارج از حد نرمال بر گیاه اثر گذارد. سرماخوردگی

یکی از مهمترین تنش‌های محیطی موثر در رشد گیاهان و تولید محصولات زراعی است. سرماخوردگی و یخ زدگی توزیع جغرافیایی، رشد فصلی و کاهش معنی دار تولید را در بسیاری از گیاهان زراعی باعث می شوند (Gaspar *et al*, 2002).

تنش به دو دسته تقسیم می شود: ۱) زیستی(Biotic stress) و۲) غیر زیستی (stress Abiotic)

از جمله تنش‌های غیرزیستی می توان به دما (Temperature stress) اشاره نمود که این نوع تنش نیز خود به ۳ دسته تقسیم می‌شود: ۱)تیمار سرما (Chilling stress) ، ۲)تنش یخبندان (Freezing) و۳) تنش حرارت بالا (Heat stress) (Oktem *et al*, 2008).

یکی از مهم ترین عوامل محیطی محدود کننده رشد گیاهان، دمای پایین می باشد. گونه های مختلف گیاهی از نظر قابلیت تحمل به تنش دمای پایین، بسیار متفاوتند. گیاهان گرمسیری حساس به سرما، حتی در دمای بالاتر از دمای انجماد بافتها، به طور جبران ناپذیری آسیب می‌بینند. گیاه به واسطه اختلال در فرایندهای متابولیکی، تغییر در خواص غشاهای سلولی و اندامکی، تغییر در ساختمان پروتئین‌ها و اثرات متقابل میان ماکرومولکول‌ها و نیز توقف واکنش‌های آنزیمی دچار صدمه می‌گردد. گیاهانی که به یخبندان حساس ولی به سرما متحمل هستند، در دمای اندکی زیر صفر قادر به ادامه حیات بوده، ولی به محض تشکیل کریستال‌های یخ در بافت‌ها، به شدت آسیب می بینند. این در حالی است که گیاهان متحمل به یخبندان قادر به ادامه حیات در سطوح متفاوتی از دماهای یخبندان هستند، البته درجه واقعی تحمل بستگی به گونه گیاهی، مرحله نموگیاه و مدت زمان تنش دارد (Zhang *et al*, 2000).

۱-۳-۱-تیمار سرما

این تنش در دمای بالاتر از صفر اتفاق می افتد و در نتیجه بر حالت عادی گیاه اثری ندارد. این درجه حرارت را بین ۱۵-۰ درجه سانتیگراد تقسیم بندی کرده اند که گیاهان بر اساس نوع گیاه از نظر حساسیت به تنش سرما در این محدوده قرار می گیرند. آثار اولیه تنش سرماعبارتند از : تغییر رنگ ، کلروز، کاهش عمومی رشد، تخریب بافت‌های سلولی، عدم جوانه زنی بذور، عدم انتقال مواد فتوسنتزی ، عدم جذب عناصر غذایی.

از نظر فیزیولوژیکی برخی از آثار این تنش الاستیک یا برگشت‌پذیر خواهند بود و با رفع دوره سرما بهبود خواهند یافت. مانند کاهش موقت فتوسنتز، توقف رشد سلولی، کاهش جذب آب و مواد معدنی. برخی از آثار دیگر این تنش مانند فتوسنتز در اثر تخریب کلروپلاست‌ها غیر قابل برگشت یا پلاستیک می‌باشند. از نمونه‌های دیگر آثار غیر قابل برگشت تنش سرما می توان اثر بر تنفس، پیری زودرس را نام برد (Jan *et al*, 2009).

۱-۳-۲- تنش یخبندان

تنش یخ زدگی زمانی پیش می‌آید که درجه حرارت به پایین تر از نقطه انجماد آب (صفر درجه سانتی گراد) تنزل نماید. در اثر این تنش در داخل بافت‌ها یخ تشکیل می‌شود. مکانیزم این عمل به این صورت است که یخ زدگی آب بین سلولی باعث منفی تر شدن پتانسیل آب بین سلولی نسبت به درون سلول می‌شود. با توجه به اینکه آب از محل دارای پتانسیل آب بیشتر به طرف محل دارای پتانسیل آب کمتر حرکت می‌کند، بنابراین آب درون سلول به فضای بین سلولی که دارای پتانسیل آب کمتر می‌باشد حرکت می‌کند. علت این امر برقراری تعادل پتانسیل آب بین سلولی و درون سلولی می‌باشد. در این حالت برگ‌ها و سایر اندام‌های گیاه حالت پلاسمولیز به خود می‌گیرند. تا این مرحله گیاه آسیب جدی نمی‌بیند. در واقع مرگ سلولی زمانی اتفاق می‌افتد که هوا گرم‌تر می‌شود. زیرا با ذوب شدن یخ سلول‌ها، با توجه به اینکه سلول‌ها جهت تنظیم فشار باید آب جذب کنند و این جذب باعث بالا رفتن فشار تورگر می‌شود، فشار زیاد به غشاهای سیتوپلاسمی آسیب رسانده و آنرا از چند نقطه پاره می کند، لذا سلول بر اثر پارگی غشا از بین می‌رود. به همین دلیل گیاهان حساس به تنش سرما مانند ذرت، لوبیا و نیشکر به هنگام قرارگیری در معرض دماهای پایین به صورت شل و خیس در می آیند و غشا سلولی آنها بسیار آسیب می‌بینند (Pearce, 2007; Quellet, 2007).

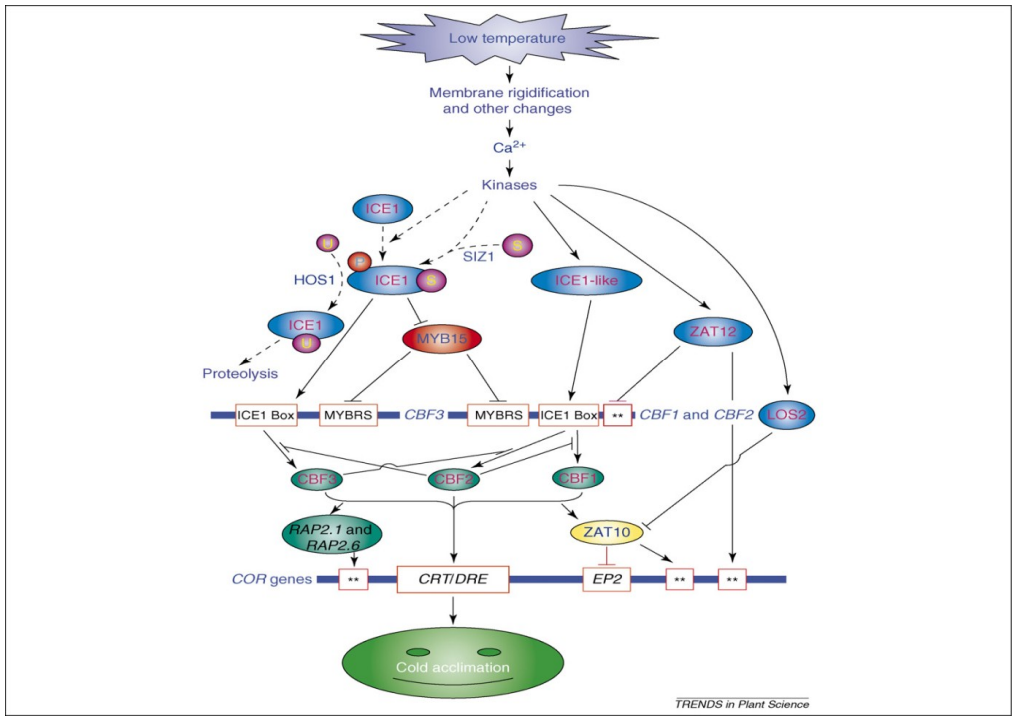
۱-۳-۳- اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تیمار سرما بر گیاهان

خشکی، شوری و دمای پایین جذب و رسانایی آب را تحت تاثیر قرار می دهند. عوامل محیطی با تاثیر بر عرضه آب منجر به تغییراتی در باز شدن روزنه ها می شود، که اگر تنش همچنان ادامه یابد

می تواند در حرکت یک زنجیره از وقایع منشا گرفته از تغییرات در غلظت درونی دی اکسید کربن برگ تنظیماتی ایجاد کند و به طور متوالی کاهش چرخه کربن، واکنش نوری ، شارژ انرژی و پمپ پروتون را تحت تاثیر قرار دهد (Nelson *et al*., 1998). مسیرهای دیگر به عنوان نتیجه ای از شاتینگ کربن از میان چرخه تنفس نوری تحت تاثیر قرار می گیرند. سرانجام تخصیص و ذخیره سازی کربن و نیتروژن مورد نیاز برای تعدیل دوباره واکنش هایی که ممکن است منجر به تغییر رشد و نمو شوند، صورت می گیرد (Noctor and Foyer, 1998). توانایی برای سازگاری با سرما یک رفتار پلی ژنیک است که شامل تعداد زیادی از ژن هایی می باشد که بیانشان به طور عمده به وسیله دمای پایین کنترل می شود. تغییر در سطح بیان این ژن ها منجر به تغییرات متعدد مولکولی و فیزیولوژیکی مشخصه فرایند سازش با سرما می شود. پیچیدگی فرایند هم هوایی در تعداد ژن هایی که تحت تاثیر دمای پایین هستند منعکس می شود که با یک برآورد اخیر تا ۵% از رونوشت *آرابیدوپسیس* مطابق می باشد (Krebs *et al*, 2002).

1-۳-٤-تنظیم بیان ژن در پاسخ به دمای پایین

گیاهان احتمالا دماهای پایین را به واسطه سخت شدن غشا و یا دیگر تغییرات سلولی شان حس می کنند که ممکن است یک سیگنال کلسیمی را القا کند و پروتئین کینازهای لازم برای سازگاری با سرما را فعال کند. بیان *ICE1*(Induced of CBF Expression 1) به وسیله تنش سرما از طریق sumoylation و فسفریلاسیون فعال می شود. تنش سرما sumoylation، *ICE1* را در K393 القا می کند که برای رونویسی(C-repeat Binding Factor) CBF های فعال شونده با *ICE1* (القا کننده بیان CBF1 (یک فاکتور رونویسی bHLH نوع MYC)) و سرکوب MYB15 (Myeloblastosis) ضروری است. CBF ها بیان ژن های (Cold Responsive)*COR* را که مقاومت به یخ زدگی را اعطا می کنند، تنظیم می کنند. بیان *CBF* ها به طور معکوس به وسیله *MYB15* و Zinc Finger Transcription Factor) *ZAT12*) تنظیم می شود.



شکل ۱-۵- نمودار شبکه رونویسی پاسخگو به سرما در *آرابیدوپسیس* (TRENDS in Plant Science, 2007).

CBF : فاکتور متصل شونده به تکرار C (یک نوع فاکتور رونویسی AP2) ، CRT : عناصر با تکرار C، DRE : عناصر پاسخ گو به دهیدراسیون، *HOS1* : بیان بالایی از ژن های پاسخ گو به طور اسمزی (یک یوبی کوتین لیگاز E3 انگشت حلقه)، *ICE1* : القا کننده بیان *CBF1* (یک فاکتور رونویسی bHLH نوع MYC)، *LOS2* : بیان پایینی از ژن های ۲ پاسخ گو به طور اسمزی (یک انولاز ۲ عملکردی با فعالیت سرکوب رونویسی) ، *MYB* : مایلوبلاستوزیس، MYBRS: فاکتور شناسایی توالی رونویسی*MYB*، *SIZ1*، *SAP*و MiZ1 (یک SUMO لیگاز E3) ، P : فسفریلاسیون، S (SUMO)، U : یوبی کوتین (Chinnusamy *et al.*, 2007) .

HOS1(High Expression of Osmotically Responsive Genes1) یوبی کوئینی شدن و تجزیه پروتئوزومال *ICE1* را میانجی گری می کند و بنابراین به طور معکوس رگولون های *CBF* را تنظیم می کند.*CBF* ها بیان *ZAT10* (*STZ*) را که ممکن است فروتنظیم بیان ژن های *COR* را انجام دهد را القا کند. بیان *LOS2*(Low Expression of Osmotically Responsive Genes 2) تنظیم شونده با سرما رونویسی *ZAT10* را سرکوب می کند. *ZAT10* و *ZAT12* هر دو فاکتورهای رونویسی انگشت روی C_2H_2 می باشند.

۱-۳-۵-مسیرهای ترارسانی علامت تنش سرما

انتقال سیگنال تنش سرما فرایند پیچیده ای است. بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی مانند تجزیه بافتی و پیری به واسطه تنش سرما رخ می دهد. دمای پایین ابتدا به وسیله غشای پلاسمایی یا به علت تغییر در سیالیت غشا و یا به کمک سنسورهایی نظیر کانال های نفوذپذیر Ca^{+2} ، هیستیدین کینازها، کینازها و فسفولیپازهای گیرنده درک می شود. تغییرات سیالیت غشا به عنوان نتیجه فوری از دمای پایین می باشد. غشا از لحاظ کیفی و کمی تغییر در ترکیب لیپیدش را تحت تنش سرما تحمل می کند. درجه اسید چرب غیر اشباع و محتویات فسفولیپیدهایش را در طی سازگاری با سرما افزایش می دهد. بنابراین تصور می شود که سخت شدن غشا ممکن است نقش مهمی را در محافظت از سرما بازی کند. این تغییر در سفتی غشا به وسیله پروتئین های غشایی درک می شود و آن ها به عنوان سنسورها یا تنظیم کننده های اولیه عمل می کنند. تنش سرما انتقال درون شارش Ca^{+2} به درون سیتوسل را القا می کند. بنابراین کانال های نفوذپذیر کلسیم مسئول برای این انتقال به عنوان سنسورهایی برای دمای پایین بررسی شده اند. فعال سازی کانال های کلسیم به وسیله سرما تصور می شود نتیجه ای از تغییرات فیزیکی در ساختار سلولی باشد و هیستیدین کینازهای *Bacillus subtilis* DesK (Aguilar *et al*, 2001) سنسورهای دمایی هستند و بیان ژن غیر اشباع کننده را در پاسخ به دمای پایین تنظیم می کنند. هیستیدین کیناز دو جزئی AtHK1 در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تنش های دمای پایین، شوری بالا و دهیدراسیون را حس می کند و علامت را به هسته به وسیله یک آبشار فسفریلاسیون انتقال می دهد(Urao *et al*, 1999).کینازهای رسپتور مانند (RLKs)، دیگر سنسورهای فرضی دمای پایین می باشند که در انتقال علائم خارج سلولی به مولکول های هدف درون سلولی عمل می کنند. در گیاه *آرابیدوپسیس* القای بیان یک سری از افراد این خانواده (RPK1) به وسیله سرما، دهیدراسیون، شوری بالا و ABA نشان داده شده است (Hong *et al*., 1997). تغییرات در متابولیسم فسفولیپیدهای غشا در پاسخ به علامت دهی سرما درگیر شده اند. فسفولیپاز C وD سریعا ۱۵ ثانیه بعد از تیمار سرما تجمع می کنند(Ruelland *et al*., 2002). پس از آن اسکلت سلولی سازماندهی مجدد می کند و درون شارش سیتوسلی Ca^{+2}اتفاق می افتد. یک ارتباط مثبت بین درون شارش Ca^{+2} القا شده با سرما و تجمع رونوشت

های القا شونده با سرما برای یونجه (Monroy and Dhindsa 1995; Reddy and Reddy 2004) و *آرابیدوپسیس* (Henriksson and Trewavas 2003) نشان داده شده است.

LOW TEMPERATURE

⇩

MEMBRANE RIGIDIFICATION

⇩

CYTOSKELETAL REARRANGEMENTS

⇩

Ca2+INFLUX

⇩

Ca2+ SIGNAL DECODERS

⇩

ALTERED GENE EXPRESSION

⇩

FREEZING TOLERANCE

شکل۱-۶- مدل نشان دهنده وقایع آغازی در علامت دهی سرما (Puhakainen, 2004).

افزایش Ca^{+2} سیتوسلی به وسیله CDPK ها، فسفاتاز و MAP کینازها حس می شود که علائم را برای شروع آبشارهای رونویسی انتقال می دهند. تصور می شود که دستگاه فتوسنتزی نیز برای

درک دمای پایین و انتقال سیگنال مسئول باشد. بسیاری از مسیرهای القا شونده با سرما برای محافظت گیاهان از تاثیرات زیان بار تنش سرما فعال می شوند اما تاکنون بیشترین مسیر مطالعه شده، مسیر علامت دهی *ICE-CBF-COR* می باشد (Gilmour *et al*, 2004; Novillo *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2007). هر چند که اهمیت مسیرهای مستقل از *CBF* در هم هوایی سرما به میزان کمتری به وسیله مطالعات جهش یافته های *آرابیدوپسیس* تائید شده است (Davletova *et al*., 2005; Vogel *et al*., 2005). علامت دهی تنش سرما برخی مسیرهای مشترک با دیگر مسیرهای علامت دهی تنش های غیرزیستی و زیستی دارد که نشان دهنده تداخل در میان این مسیرها می باشد (Beck *et al*., 2007,Chinnusamy *et al*., 2004, Knight and Knight., 2001, Vij and Tyagi., 2007, Xiong *et al*., 2002, Zhu, 2001).

۱ -٤ -انواع فعال اکسیژن (ROS)

دمای پایین یکی از مهم ترین فاکتورهای محیطی می باشد که رشد و نمو گیاه را تنظیم و حاصلخیزی آن را محدود می کند (Cao *et al*, 2002). گیاهان می توانند به تنش دمای پایین پاسخ دهند و به وسیله چندین پاسخ فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی سازش یابند (Foyer *et al*,1998). شواهد روزافزونی وجود دارد که تنش دمای پایین افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن را القا می کند (Chaitanya *et al*, 2001).

به دلیل فعال تر بودن گونه‌های فعال اکسیژن نسبت به اکسیژن مولکولی (O_2) و همچنین واکنش با اکثر اجزاء ارگانیک سلول زنده معمولا سلول‌های گیاهی سعی می‌کنند غلظت ROS را در حد امکان در سطوح پایین نگه دارند (Wojtaszek, 1997). واکنش پذیری بالای ROS بر اساس ویژگی کنفورماسیون الکترونی‌شان می باشد. گونه های فعال اکسیژن به علت آسیب رسانی به غشاهای سلولی از طریق القای پراکسیداسیون لیپید معروف هستند (Ramadevi and Prasad,1998). تولید ROSها در کده های مختلف سلولی شامل میتوکندری، کلروپلاست ها، میکروزوم ها، گلی اکسیزوم ها، پروکسیزوم ها، آپوپلاست ها و سیتوسل صورت می گیرد (Elstner, 1991) (شکل ۱-۷). در حالی که همه کده های سلولی جایگاه های احتمالی تولید