بسم الله الرحمن الرحیم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر تنش سرما بر روی صفات فیزیولوژیک ارقام گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*)

استادان راهنما:
دکتر حمید رضا قاسمپور
دکتر مجتبی تاران

استاد مشاور:
مهندس حیدر ذوالنوریان

نگارش:
سمیه حسینی نیا

مهر ۱۳۹۰

دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی

گرایش فیزیولوژی گیاهی

نام دانشجو:

سمیه حسینی نیا

تحت عنوان:

بررسی اثر تنش سرما بر روی صفات فیزیولوژیک ارقام گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*)

در تاریخ **۱۳۹۰/۷/۱۸** توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه **عالی** به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما	دکتر حمیدرضا قاسمپور	با مرتبه ی علمی دانشیار	امضاء
۲- استاد راهنما	دکتر مجتبی تاران	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء
۳- استاد مشاور	مهندس حیدر ذوالنوریان	با مرتبه ی علمی مربی پژوهشی	امضاء
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر ناصر کریمی	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء
۵- استاد داور خارج از گروه	دکتر عباس رضایی زاد	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء

الهی، تو دوست می‌داری که من تو را دوست دارم، با آن که بی‌نیازی از من، پس چگونه دوست ندارم که تو مرا دوست داری با این همه احتیاج که به تو دارم، از تو ممنونم به خاطر هر آنچه که لیاقتش را نداشتم اما سخاوتمندانه به من ارزانی داشتی.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق » بسی شایسته است از استاتید راهنما جناب آقای دکتر حمیدرضا قاسمپور و جناب آقای دکتر مجتبی تاران و استاد مشاور جناب آقای مهندس حیدر ذوالنوریان که با کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کار ساز و سازنده بارور ساختند ; تقدیر و تشکر نمایم. همچنین از پدر و مادر دلسوز و مهربانم و خانواده عزیزم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب ، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم سپاسگزاری نمایم.

ایمان دارم که مراتب تقدیر و امتنان هرگز به کمال نخواهد رسید تا ادای سپاس کنم در مقابل اساتید محترم داور جناب آقای دکتر ناصر کریمی و جناب آقای دکتر عباس رضایی زاد.

استاد گرامی، جناب آقای دکتر حسین فلاحی که هیچگاه از کمک به من دریغ نکردند و از اینکه سعادت شاگردی در کنار ایشان را داشته ام بر خود می بالم.

تشکر ویژه‌ای دارم از جناب آقای دکتر سیروس قبادی که هرگز لطف و همراهیشان را از بنده دریغ نفرمودند و همچنین از سرکار خانم زهره امیری که‌با محبتی خواهرانه درپیشبرد پایان‌نامه با اینجانب کمال‌همکاری را داشتند.

منشی محترم گروه بیولوژی، سرکار خانم زهرا مختاری که همیشه شرمنده محبت های مادرانه ایشان هستم.

دوستان بسیار خوبم که آشنایی و دوست شدن با آنها از بزرگترین نعمت‌های خداوند به من بوده است خانم ها: سارا شریفی، ژاله سهیلی خواه، زهره شریعتی، سحر حیدری، سادات دوکانه ای فرد، الهام گلعذار، سوما دهلوی،ندا محرابی، پرستو عبدی، شیوا نجفی.آقایان: عبدالرضا نظری، محمد قدمی، اشرفی و سایر دوستان در آزمایشگاه‌های بیوشیمی، تکوین، سلولی،فیزیولوژی جانوری،اکولوژی و بیوسیستماتیک جانوری و دانشکده شیمی و تمام دوستان عزیزی که در رسیدن من به این مرحله نقش داشته اند و از صمیم قلب به من کمک و برایم دعا کرده اند.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم

وتقدیم می کنم‌به برادرم سعید که همیشه تکیه‌گاهم بوده واطمینان‌خاطردارم‌که صلابت نگاهش‌گام هایم‌را استواری می‌بخشد.

و نیزتقدیم‌می کنم به خواهرانم مژگان، پروین و زهرا که‌لحظه لحظه‌با من همراه بوده نه‌تنها در دوران تحصیلم که‌درتمام لحظات‌زندگیم، یاورم بوده وقلب‌گسترده‌وبی مانندشان رایک‌آن ازمن‌دریغ‌نکرده اند.

چکیده

سرما یک محرک تنش‌زای محیطی است که موجب تغییر در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه می‌گردد و خسارات اقتصادی زیانباری را در بخش کشاورزی سبب می‌شود. گیاه گوجه فرنگی گیاهی حساس به سرماست و در شرایط سرما صدمه می‌بیند. در این تحقیق، اثر تنش سرما بر روی صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک، و همچنین بهینه سازی کشت بافت سه واریته گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) شامل: Superqueen، Nemador و UC-105 انجام شد. در آزمایش اول، اثر تنش سرما (۴ درجه سانتیگراد) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روزه، صفات نشت الکترولیت، پرولین، تغییرات پروتئینی، تعداد برگ، تعداد گره و فاصله بین گره مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات پروتئینی توسط SDS-PAGE بررسی شد. در آزمایش اول، طرح به صورت آزمایشات فاکتوریل ۳×۲ بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول، تنش سرما شامل S_0 (بدون تنش) و S1 (تنش سرما در دمای ۴ درجه سانتیگراد) و فاکتور دوم واریته (V) که شامل واریته‌های V_1 (UC-105)، V_2 (Nemador) و V_3 (Superqueen) می‌باشد. در آزمایش دوم، طرح به صورت آزمایشات فاکتوریل ۲×۳×۳ بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل تنظیم کننده‌های رشدی (G) که خود شامل سطوح G0 (بدون تنظیم کننده رشدی)، G_1 (1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin) و G_2 (2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin) است، واریته (V)، شامل UC-105 (V_1)، Nemador (V_2) و Superqueen (V_3)، ریزنمونه (E)، شامل ساقه‌چه (E_1) و ریشه‌چه (E_2) می‌باشد. کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ساقه‌چه و ریشه‌چه در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد و دو غلظت 2,4-D (1,2mg/l) و تنظیم کننده رشدی کینتین در غلظت 0.5mg/l صورت گرفت. نتایج آزمایش اول نشان داد که تنش سرما موجب افزایش میزان پرولین و نشت الکترولیت گیاه نسبت به شرایط بدون تنش می‌شود اما میزان رشد (تعداد برگ، تعداد گره و فاصله بین گره) را کاهش می‌دهد. همچنین مقدار برخی از پروتئین‌ها کاهش یافته و برخی باندها نیز از بین رفتند. با توجه به نتایج آزمایش اول می‌توان چنین استنباط کرد که واریته سوپرکوئین تحت تنش نسبت به دو واریته دیگر از میزان نشت یون کمتر و محتوای پرولین بیشتری برخوردار بوده و همچنین میزان پروتئین در باندهای در این واریته نسبت به دو واریته دیگر، تغییرات کمتری را نشان می‌دهد. در نتیجه، واریته سوپرکوئین نسبت به دو واریته دیگر مقاوم‌تر است. نتایج آزمایش دوم نیز نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه ساقه‌چه در تیمار 2,4-D 1 mg/l همراه با 0.5 mg/l Kin مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: گوجه فرنگی، تنش سرما، پرولین، SDS-PAGE، نشت الکترولیت، کشت بافت

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول؛ مقدمه

۱-۱-کلیات ۲
۱–۲ –تنش در گیاهان ۲
۱–۳ -تنش سرما ۳
۱–۴-اثر سرما روی فیزیولوژی گیاهان ۵
۱–۵- خوسرمایی و نقش آن در مقاومت به سرما ۷
۱–۶ – نشت الکترولیت (یون)ها ۹
۱–۷ – نقش پرولین ۱۰
۱–۸ - تغییرات بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها در طی تنش سرما ۱۲
۱-۸-۱-اثر تنش سرما روی پروتئین‌ها ۱۲
۱-۸-۲-فاکتورهای رونویسی و ژن‌ها ۱۳
۱–۹ –استفاده از روش الکتروفورز (electrophoresis) برای بررسی پروتئین‌ها ۱۴
۱-۹-۱- روش های الکتروفورز ۱۴
۱-۹-۲- الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۶
۱-۹-۲-۱- نقش سدیم دودسیل سولفات ۱۶
۱-۹-۲-۲- اثر ژل پلی اکریل آمید ۱۷
۱–۱۰– معرفی گیاه گوجه فرنگی ۱۸
۱-۱۰–۱-تاریخچه گوجه فرنگی ۱۹
۱-۱۰–۲-خواص و کاربرد گوجه فرنگی ۱۹
۱-۱۰–۳ - سطح زیر کشت، عملکرد و میزان تولید گوجه فرنگی در ایران و استان کرمانشاه ۲۲
۱-۱۰–۴ –اثر سرما روی گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) ۲۳
۱–۱۱ – کشت بافت ۲۴
۱-۱۱-۱- تاریخچه کشت بافت ۲۴
۱-۱۱-۲- محیط کشت بافت گیاهی ۲۶
۱-۱۱-۳- ترکیب محیط کشت ۲۶
۱-۱۱-۳-۱- عناصر معدنی ۲۶
۱-۱۱-۳-۲- مواد آلی ۲۷
۱-۱۱-۳-۳- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۲۸
۱-۱۱-۴- انتخاب محیط کشت ۳۰
۱-۱۱-۵- کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی ۳۰

۱-۱۱-۶- تشکیل کالوس در گیاهان ۳۱
۱-۱۲ – اهداف این تحقیق ۳۳

فصل دوم؛ مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری واریته گوجه فرنگی ۳۵
۲-۲- شرایط مناسب جهت کشت بذور ۳۵
۲-۳- اعمال استرس سرما ۳۶
۲-۴ - بررسی تغییرات مورفولوژیک ۳۷
۲-۵- اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت(یون)ها ۳۸
۲-۶- اندازه‌گیری میزان پرولین ۳۸
۲-۷ - بررسی تغییرات پروتئین با استفاده از روش الکتروفورز ۴۰
۲-۷-۱- استخراج عصاره پروتئینی ۴۰
۲-۷-۲ - الکتروفورز تک بعدی یا الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات ۴۰
۲-۷-۲-۱ روش تهیه ژل صفحه‌ای ۴۲
۲-۷-۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها ۴۳
۲-۷-۲-۳- رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو R-۲۵۰ ..... ۴۳
۲-۷-۲-۳-۱- روش رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ۴۴
۲-۷-۲-۳-۲– نگهداری و خشک کردن ژل ۴۴
۲-۸ – کشت بافت ۴۵
۲-۸-۱- استریل کردن و جوانه زنی بذرها به منظور تهیه ریزنمونه ۴۵
۲-۸-۲- محیط کشت گیاهی MS ۴۶
۲-۸-۲-۱- تهیه محلول مادری MS (غلظت 10X) ۴۶
۲-۸-۲-۲- محلول مادری ویتامین‌ها ۴۶
۲-۸-۲-۳- محلول مادری آهن با غلظت (10X) ۴۷
۲-۸-۲-۴- محلول مواد غذایی کم مصرف با غلظت (100X) ۴۷
۲-۸-۲-۵- محلول مادری مواد مغذی پر مصرف با غلظت (10X) ۴۷
۲-۸-۲-۶- محلول مادری یدید پتاسیم (KI) (ماده غذایی کم مصرف) با غلظت (1000X) ۴۸
۲-۸-۲-۷- دستورالعمل تهیه یک لیتر محیط کشت MS ۴۸
۲-۸-۳- تنظیم کننده‌های رشدی (Plant growth regulators) مورد استفاده ۴۸
۲-۸-۴- کالوس‌زایی ۴۹
۲-۸-۴-۱- تهیه ریزنمونه از مواد گیاهی برای تولید کالوس ۴۹
۲-۸-۴-۲- محیط القای کالوس ۵۰

فصل سوم؛ نتایج و بحث

۳-۱- تنش سرما ۵۲
۳-۱-۱- شرایط ۴ روز تنش سرما ۵۲
۳-۱-۱-۱- نتایج تجزیه واریانس در روز چهارم تنش سرما ۵۲
۳-۱-۱-۲- مقایسه میانگین واریته‌ها در روز چهارم تنش سرما ۵۳
۳-۱-۱-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش سرمایی در واریته‌ها در روز چهارم تنش سرما ۵۴
۳-۱-۲- شرایط ۷ روز تنش سرما ۵۶
۳-۱-۲-۱- نتایج تجزیه واریانس در روز هفتم تنش سرما ۵۶
۳-۱-۲-۲- مقایسه میانگین واریته‌ها در روز هفتم تنش سرما ۵۷
۳-۱-۲-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش سرمایی در واریته‌ها در روز هفتم تنش سرما ۵۸
۳-۱-۳- شرایط ۱۱ روز تنش سرما ۶۰
۳-۱-۳-۱- نتایج تجزیه واریانس در روز یازدهم تنش سرما ۶۰
۳-۱-۳-۲- مقایسه میانگین واریته‌ها در روز یازدهم تنش سرما ۶۱
۳-۱-۳-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش سرمایی در واریته‌ها در روز یازدهم تنش سرما ۶۲
۳-۱-۴- شرایط ۲۱ روز تنش سرما ۶۵
۳-۱-۴-۱- نتایج تجزیه واریانس در روز بیست و یکم تنش سرما ۶۵
۳-۱-۴-۲- مقایسه میانگین واریته‌ها در روز بیست و یکم تنش سرما ۶۶
۳-۱-۴-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش سرمایی در واریته‌ها در روز بیست و یکم تنش سرما ۶۸
۳-۱-۵- بررسی کلی تنش سرما در صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک مذکور ۷۱
۳-۱-۵-۱- فاصله بین گره ۷۱
۳-۱-۵-۲- تعداد برگ و تعداد گره ۷۴
۳-۱-۵-۳- روند رشد ۷۷
۳-۱-۵-۴- نشت الکترولیت‌ها(یون ها) ۸۵
۳-۱-۵-۵- پرولین ۸۷
۳-۱-۶-SDS-PAGE ۸۹
۳-۱-۶-۱-الگوی پروتئینی در شرایط سرمای ۷ روزه ۸۹
۳-۱-۶-۲- الگوی پروتئینی در شرایط سرمای ۲۱ روزه ۹۰
۳-۲- کشت بافت ۹۳
۳-۲-۱- کالوس‌زایی ۹۳
۳-۲-۱-۱- نتایج تجزیه واریانس برای صفت کالوس‌زایی ۹۳
۳-۲-۱-۲- نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفت کالوس‌زایی ۹۴
۳-۲-۱-۲-۱- غلظت تنظیم کننده‌های رشدی(G) ۹۴

۳-۲-۱-۲-۲- اثر واریته (V) برای صفت کالوس‌زایی ۹۵
۳-۲-۱-۲-۳- اثر متقابل واریته در غلظت تنظیم کننده رشدی (G×V) ۹۶
۳-۲-۱-۲-۴- اثر متقابل تنظیم کننده رشدی در ریزنمونه (G×E) ۹۸
۳-۲-۱-۲-۵- اثر متقابل واریته در ریزنمونه (V×E) ۹۹
۳-۲-۱-۲-۶- اثرات سه گانه غلظت تنظیم کننده رشدی، واریته و ریزنمونه (G×V× E) ۱۰۱
۳-۳- نتیجه‌گیری کلی ۱۰۵
۳-۴- پیشنهادات ادامه کار ۱۰۶

فصل چهارم

منابع ۱۰۸

فهرست اشکال

عنوان صفحه

فصل اول

شکل ۱-۱- انواع تنش سرما و مشخصات آن‌ها ۴
شکل ۱-۲- خوسرمایی، فرایندهای سلولی بسیار متفاوتی را القا می‌کند ۸
شکل ۱-۳- مراحل بیوسنتز پرولین ۱۱
شکل ۱-۴- اساس جداسازی پروتئین‌ها در سه روش متفاوت الکتروفورز ۱۵
شکل ۱-۵- ساختمان سدیم دودسیل سولفات ۱۷
شکل ۱-۶- رده بندی کران کوئیست (Cronquist phylogenetic) و نمای شماتیک از گیاه گوجه فرنگی (*lycopersicon esculentum*) ۱۸
شکل ۱-۷- ساختار تعدادی از تنظیم کننده‌های رشدی اکسینی ۲۹
شکل ۱-۸- ساختمان شیمیایی تعدادی از سیتوکینین‌ها ۳۰
شکل ۱-۹- روش تهیه کالوس از قطعات ریشه هویج ۳۳

فصل دوم

شکل ۲-۱- انتقال گیاهان ۲۶ روزه به گلدان ۳۶
شکل ۲-۲- سه واریته در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما S1 (پایین) و بدون تنش S0 (بالا) ۳۷
شکل ۲-۳- منحنی استاندارد پرولین آزاد ۳۹
شکل ۲-۴- قرارگیری پلیت‌های حاوی بذرها در اتاق رشد به منظور جوانه زنی ۴۵

فصل سوم

شکل ۳-۱- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما بر روی صفت فاصله بین گره در واریته UC-105 ..... ۷۲
شکل ۳-۲- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما بر روی صفت فاصله بین گره در واریته Nemador ۷۳
شکل ۳-۳- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما بر روی صفت فاصله بین گره در واریته Superqueen ۷۳
شکل ۳-۴- اثر ساده واریته بر روی صفت فاصله بین گره، در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۷۴
شکل ۳-۵- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما بر روی صفت تعداد برگ در هر سه واریته ۷۵

شکل ۳-۶- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما بر روی صفت تعداد گره در هر سه واریته ۷۶
شکل ۳-۷- اثر ساده واریته بر روی صفت تعداد برگ در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۷۶
شکل ۳-۸- اثر ساده واریته بر روی صفت تعداد گره در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۷۷
شکل ۳-۹- افزایش تعداد برگ در واریته UC-105 در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۷۸
شکل ۳-۱۰- افزایش تعداد گره در واریته UC-105 در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۷۸
شکل ۳-۱۱- افزایش تعداد برگ در واریته Nemador در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۷۹
شکل ۳-۱۲- افزایش تعداد گره در واریته Nemador در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۷۹
شکل ۳-۱۳- افزایش تعداد برگ در واریته Superqueen در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۸۰
شکل ۳-۱۴- افزایش تعداد گره در واریته Superqueen در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۸۰
شکل ۳-۱۵- افزایش تعداد برگ در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۸۱
شکل ۳-۱۶- افزایش تعداد گره در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۸۲
شکل ۳-۱۷- افزایش فاصله بین گره در واریته UC-105 در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۸۲
شکل ۳-۱۸- افزایش فاصله بین گره در واریته Nemador در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۸۳
شکل ۳-۱۹- افزایش فاصله بین گره در واریته Superqueen در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) ۸۴
شکل ۳-۲۰- افزایش فاصله بین گره در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۸۴
شکل ۳-۲۱- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) بر روی صفت نشت یون در سه واریته گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و۲۱ روز تنش سرما. ۸۶
شکل ۳-۲۲- اثر ساده واریته بر روی صفت نشت یون در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۸۶
شکل ۳-۲۳- تغییرات محتوای پرولین در سه واریته UC-105 (a)، Nemador (b) و Superqueen (c). ۸۷

شکل ۳-۲۴- اثر متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهد S0) × واریته (V) بر روی صفت پرولین در سه واریته گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما ۸۸
شکل ۳-۲۵- اثر ساده واریته بر روی پرولین در سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴، ۷، ۱۱ و ۲۱ روز تنش سرما.. ..... ۸۸
شکل ۳-۲۶- الگوی پروتئینی با روش الکتروفورز SDS –PAGE در سه واریته Superqueen ، Nemador و UC-105 در شرایط سرمای ۷ روزه ۸۹
شکل ۳-۲۷- الگوی پروتئینی با روش الکتروفورز SDS –PAGE در سه واریته Superqueen ، Nemador و UC-105 در شرایط سرمای ۲۱ روزه ۹۰
شکل ۳-۲۸- ساختمان کلروپلاست و تیلاکوئید ۹۲
شکل ۳-۲۹- عمل فتوسنتز در کلروپلاست ۹۳
شکل ۳-۳۰- اثر غلظت تنظیم کننده رشدی(G) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی ۹۵
شکل ۳-۳۱- اثر واریته (V) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی ۹۶
شکل ۳-۳۲- اثر متقابل غلظت تنظیم کننده رشدی(G)× واریته (V) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی ... ۹۸
شکل ۳-۳۳- اثر متقابل غلظت تنظیم کننده رشدی (G) در ریزنمونه(E) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی ۹۹
شکل ۳-۳۴- اثر متقابل واریته (V) در ریزنمونه(E) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی ۱۰۰
شکل ۳-۳۵- اثر سه گانه غلظت تنظیم کننده رشدی (G)× واریته (V)× ریزنمونه (E) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی.....۱۰۳
شکل ۳-۳۶- القای کالوس در *Lycopersicon esculentum* ۱۰۳

فهرست جداول

عنوان صفحه

فصل اول

جدول ۱-۱- مواد تشکیل دهنده میوه گوجه فرنگی به ازای ۱۰۰ گرم میوه تازه ۲۲

فصل دوم

جدول ۲-۱- اجزای ژل پایین و بالا و حجم مورد نیاز آنها ۴۲
جدول ۲-۲- تهیه محلول مادری MS (غلظت 10X) ۴۶
جدول ۲-۳- محلول مادری ویتامین‌ها ۴۷
جدول ۲-۴- محلول مادری آهن با غلظت (10X) ۴۷
جدول ۲-۵- محلول مواد غذایی کم مصرف با غلظت (100X) ۴۷
جدول ۲-۶- محلول مادری مواد مغذی پر مصرف با غلظت (10X) ۴۸
جدول ۲-۷- حلال، ضدعفونی کردن و شرایط نگهداری بعضی از عوامل رشد ۴۹
جدول ۲-۸- تنظیم کننده‌های رشدی مورد استفاده (Kin و 2,4-D) برای القای کالوس ۵۰

فصل سوم

جدول ۳-۱- تجزیه واریانس برای شرایط ۴ روز تنش سرما در گیاه گوجه فرنگی ۵۳
جدول ۳-۲- نتایج مقایسه میانگین صفات مختلف اندازه گیری شده بر روی سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۴ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۵۴
جدول ۳-۳- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهدS0) × واریته (V) در شرایط ۴ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۵۶
جدول ۳-۴- تجزیه واریانس برای شرایط ۷ روز تنش سرما در گیاه گوجه فرنگی ۵۷
جدول ۳-۵- نتایج مقایسه میانگین صفات مختلف اندازه گیری شده بر روی سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۷ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۵۸
جدول ۳-۶- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهدS0) × واریته (V) در شرایط ۷ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۶۰
جدول ۳-۷- تجزیه واریانس برای شرایط ۱۱ روز تنش سرما در گیاه گوجه فرنگی ۶۱
جدول ۳-۸- نتایج مقایسه میانگین صفات مختلف اندازه گیری شده بر روی سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۱۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۶۲
جدول ۳-۹- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهدS0) × واریته (V) در شرایط ۱۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۶۴
جدول ۳-۱۰- تجزیه واریانس برای شرایط ۲۱ روز تنش سرما در گیاه گوجه فرنگی ۶۵

ادامه جدول ۳-۱۰- تجزیه واریانس برای شرایط ۲۱ روز تنش سرما در گیاه گوجه فرنگی ۶۶
جدول ۳-۱۱- نتایج مقایسه میانگین صفات مختلف اندازه گیری شده بر روی سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۲۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪..... ۶۷
ادامه جدول ۳-۱۱- نتایج مقایسه میانگین صفات مختلف اندازه گیری شده بر روی سه واریته گیاه گوجه فرنگی در شرایط ۲۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۶۸
جدول ۳-۱۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهدS0) × واریته (V) در شرایط ۲۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۷۰
ادامه جدول ۳-۱۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل شرایط تنش سرما (S) (در دو سطح تنش سرما S1 و شاهدS0) × واریته (V) در شرایط ۲۱ روز تنش سرما به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۷۱
جدول ۳-۱۳- تجزیه واریانس برای صفت کالوس‌زایی در سه واریته گیاه گوجه فرنگی..... ۹۴
جدول ۳-۱۴- نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت تنظیم کننده رشدی(G) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۹۵
جدول ۳-۱۵- نتایج مقایسه میانگین اثر واریته (V) برای صفت کالوس‌زایی در گیاه گوجه فرنگی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۹۶
جدول ۳-۱۶- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت تنظیم کننده رشدی(G)× واریته (V) برای صفت کالوس-زایی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪ ۹۷
جدول ۳-۱۷- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت تنظیم کننده رشدی (G)× ریزنمونه (E) برای صفت کالوس‌زایی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪..... ۹۹
جدول ۳-۱۸- نتایج مقایسه میانگین واریته (V)× ریزنمونه (E) برای صفت کالوس‌زایی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪..... ۱۰۰
جدول ۳-۱۹-نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه غلظت تنظیم کننده رشدی(G)× واریته (V)× ریزنمونه (E) برای صفت کالوس‌زایی به روش آزمون دانکن در سطح ۵٪..... ۱۰۲

اختصارات

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
2ip	1-2-Isopentenyl adenine
APS	Ammoniun Persulfate
BAP	6-Benzylaminopurine
CBF	C-repeat binding factor
CRT	C-repeat
DRE	Dehydration-Responsive Element
DREB	DRE-binding protein
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
EREBP	Ethylene Responsive-Element binding protein
IAA	3-Indol Acetic Acid
IBA	3-Indol Butyric Acid
Kin	Kinetin
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LHCP-II	Light-harvesting chla/b proteins of photosystem II
MS	Murashige and Skoog
NAA	α- Naphtalen Acetic
ROS	Reactive Oxygen species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N´,N´-tetra methyl ethylen diamine

فصل اول

مقدمه

۱-۱-کلیات

در حدود دو سوم از مناطق جهان، سالیانه تحت دماهای زیر نقطه انجماد قرار می‌گیرند و از این میزان حدود نیمی از آن، از دماهای زیر ۱۲ درجه سانتیگراد رنج می‌برد (Ashraf and Foolad, 2007; Steponkus et al., 1993b; Nilsen and Orcutt, 1996). تنش سرما اثرات زیانباری روی رشد و نمو گیاهان داشته و محدودیت‌های قابل توجهی در پراکنش گیاهان و محصولات کشاورزی خواهد داشت (Chinnusamy *et al*., 2007; Wang, 1982). لذا به نظر می‌رسد که بقاء زمستانه[1] به عنوان یک ویژگی مهم، جهت حصول حداکثر عملکرد دانه در گیاهان لازم و ضروری است، در همین راستا تحمل به یخ زدگی[2] به عنوان یکی از عوامل ضروری جهت بقاء در شرایط سخت زمستان ذکر شده است ضمن این که استقرار ضعیف گیاهچه‌ها، بافت خاک، خسارت بیماری‌ها و آفات و همچنین فقدان پوشش برف به عنوان عواملی که بر روی بقاء زمستانه و تحمل یخ زدگی اثر منفی دارند، معرفی شده‌اند (Teutonica *et al*., 1993). بنابراین مطالعات بسیار گسترده و همچنین تلاش‌های بسیار در زمینه اثرات شدید تنش سرما روی زندگی گیاه، برای بهبود مقاومت در برابر سرما در خصوص محصولات گیاهی مهم و عمده، انجام شده است (Jaglo-Ottonsen *et al*., 1998; Thomashow, 2001; Rontein *et al*., 2002 ;Kasuga et al., 1999; Beck *et al*., 2004).

۱-۲-تنش[3] در گیاهان

در بیشتر تعاریف تنش را به عنوان یک عامل خارجی در نظر می‌گیرند که به طور قابل توجهی گیاه را از حالت مطلوب برای رشد و فعالیت باز می دارد و واکنش‌ها و تغییرات فیزیولوژیک را در گیاه سبب می‌شود. نتیجه این تغییرات فیزیولوژیکی ممکن است بصورت آسیب‌های قابل برگشت (Reversible) و غیر قابل برگشت (Irreversible) بروز نماید. ضایعات اولیه اختلالاتی هستند که در واکنش‌های متابولیسمی بصورت موقتی ایجاد می‌شوند و معمولاً در صورت رفع عامل تنش‌زا قابل برگشت می‌باشند و آسیب‌های ثانویه اختلالات متابولیسمی‌ای هستند که معمولاً پس از رفع تنش به حالت اولیه برنمی‌گردند (Allen and Ort, 2001; Jafari *et al*., 2007). این عوامل الزاماً مرگ آنی گیاه را در پی نداشته و ممکن است بطور دائم یا

1 - Winter survival
2 - Freezing tolerance
3- Stress

موقتی در زیستگاه حاکم باشد. از دیدگاه اکولوژی هر عاملی که مانع رسیدن توان تولید گیاه به پتانسیل ژنتیکی آن گردد نوعی تنش به شمار می‌رود. از نظر بیولوژیکی تنش را تقاضای فزایندهٔ وارد به گیاه از سوی عوامل تنش‌زا می‌دانند که ناپایداری فعالیت‌های گیاهی را موجب می‌شود و تنها اگر تنش فراتر از محدودهٔ تحمل گیاه نباشد گیاه با آن تطابق می‌یابد و عمل بازگشت به حالت طبیعی صورت می‌گیرد. در غیر این صورت، آسیب واقعی یا حتی مرگ رخ می‌دهد. نکتهٔ شایان توجه در ارتباط با پاسخ گیاه به تنش، کاربرد دو واژهٔ تطابق[1] و سازگاری[2] است که هر دو برای بیان روش‌هایی که موجود زنده به وسیلهٔ آنها در برابر تنش، تحمل پیدا می‌کند به کار برده می‌شود. اما باید دانست که سازگاری بیانگر تغییرات قابل توارث در ساختمان و فعالیت موجود زنده است که توان آن را در کنار آمدن با شرایط تنش‌زا افزایش می‌دهد (Grime, 1979).

گیاهان در طول چرخه زندگیشان تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی هستند. گیاهان به طور مداوم مورد هدف تهاجم فاکتورهای تنش زیستی مانند قارچ، ویروس و گیاهخواران قرار می‌گیرند (Poschenrieder *et al.*, 2006). تنش‌های غیر زیستی توسط دماهای بسیار بالا یا پایین، خشکی، شوری، سمّیت شیمیایی، اکسیداتیو و غیره اعمال می‌شود (Priyanka *et al.*, 2010).

تنش‌های غیر زیستی به یک سری از تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی منجر می‌شود که اثرات زیانباری روی رشد و حاصلخیزی گیاه دارد (Khan *et al.*, 2009). گیاهان به تنش‌های غیر زیستی از طریق فرآیندهای گوناگون فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی (Shinozaki *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2007) و مولکولی (Mittler, 2006) پاسخ می‌دهند و با شرایط محیطی حاصل از این تنش‌ها سازگار می‌شوند. در نتیجه، مقاومت در برابر تنش را به دست می آورند (Shinozaki *et al.*, 2003; Thomashow, 1999; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006). البته سازگاری گیاه به یک شرایط تنش ویژه نیازمند یک پاسخ ویژه نیز به این نوع تنش می‌باشد. پاسخ ویژه‌ای که به یک تنش، داده می شود با پاسخ‌هایی که به تنش‌های دیگر(با اندک تفاوت) داده می شود، متفاوت است (Xiong *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2007; Zhu, 2002; Ashraf and Foolad, 2007; Mittler, 2006).

۱-۳-تنش سرما

گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده به عنوان یک تنش محسوب می‌شود. گزارش شده که وقتی گیاه در معرض دماهای بین صفر تا ۱۵ درجه سانتیگراد قرار گیرد تغییرات فیزیولوژیکی در آن بوجود می‌آید (Jafari *et al.*, 2007). دمای پایین ممکن است تنش را روی یک گیاه، به دو صورت اعمال کند: ۱- توسط اثرات دمای پایین به تنهایی و ۲- دهیدراسیون سلول‌ها و

[1]- Acclimation
[2] - Adaptation