

دانشگاه گیلان

دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی بیان برخی از ژن های مرتبط با پیری در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی  
(Ler-0) و موتانت *old101* در آرابیدوبسیس (*Arabidopsis thaliana*) با استفاده از

روش Real time PCR

از:

سیده حمیده طاهری اطاقسرا

استاد راهنما:

رضا شیرزادیان خرم آباد

اسفند ۱۳۹۱

صلى الله عليه وسلم

دانشکده علوم کشاورزی  
گروه بیوتکنولوژی

عنوان:

بررسی بیان برخی از ژنهای مرتبط با پیری در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی  
(*Ler-0*) و موتانت *old101* در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

از:

سیده حمیده طاهری

استاد راهنما:

دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد

استادان مشاور:

دکتر علی اعلمی، دکتر حبیب الله سمیع زاده

اسفند ماه ۱۳۹۱

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد که زحمت راهنمایی این پایان نامه را برعهده گرفتند و از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند سپاس گزارم.

از استادان محترم جناب آقای دکتر علی اعلمی و جناب آقای دکتر حبیب‌الله سمیع‌زاده که زحمت مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشتند سپاس گزارم.

از اساتید محترم داور آقایان دکتر محمد مهدی سوهانی و محمود قاسم نژاد که زحمت بازخوانی پایان نامه را بر عهده داشتند سپاس گزارم.

از مدیر محترم گروه بیوتکنولوژی جناب آقای دکتر حسن حسنی بسیار سپاس گزارم.

از اعضاء محترم هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی، مسئولین و کارکنان محترم دانشکده کشاورزی سپاس‌گزاری می‌کنم.

از همکلاسی‌های خوبم که لحظات خوبی را در کنارشان داشتم سپاس گزارم و برای همه‌ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم.

از دوستان عزیزم که مرا از همراهی، کمک و مهربانی‌های خویش بهره‌مند نمودند بسیار سپاس گزارم و برای آنها آرزوی سعادت دارم.

با سپاس فراوان از خانواده عزیزم

که تمام تجربه‌های یکتا و زیبایی زندگیم، مدیون حمایت، صبر و حضور آنهاست.

## فهرست مطالب

خ	چکیده فارسی
د	چکیده انگلیسی
۲	مقدمه

## فصل اول: کلیات و مرور منابع

۵	۱-۱-آرابیدوپسیس
۶	۲-۱-فرایند پیری
۷	۱-۲-۱-پیری وابسته به سن
۷	۲-۲-۱-پیری وابسته به هورمون‌های گیاهی
۸	۱-۲-۲-۱-هورمون‌های القاکننده پیری
۸	۱-۱-۲-۲-۱-جاسمونیک اسید
۸	۱-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>jar1</i>
۸	۲-۱-۲-۲-۱-سالیسیلیک اسید
۹	۱-۲-۲-۲-۱-موتانت <i>pad4</i>
۹	۲-۲-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>NahG</i>
۹	۳-۲-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>edr1</i>
۱۰	۳-۱-۲-۲-۱-اتیلن
۱۳	۱-۳-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>ein2</i>
۱۵	۲-۳-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>old101</i>
۱۶	۳-۳-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>old102</i>
۱۶	۴-۳-۱-۲-۲-۱-موتانت <i>old3</i>
۱۶	۵-۳-۱-۲-۲-۱-بررسی فعالیت مسیر بیوسنتز اتیلن در ژنوتیپ‌های مورد نظر با استفاده از واکنش سه‌گانه
۱۸	۳-۱-ژن‌های مرتبط با فرایند پیری
۱۹	۱-۳-۱-ژن <i>FRY1</i>
۲۰	۲-۳-۱-ژن <i>GST1</i>
۲۱	۳-۳-۱-ژن <i>PR1</i>
۲۱	۴-۳-۱-ژن <i>SAG21</i>
۲۲	۵-۳-۱-ژن <i>SAG12</i>
۲۲	۶-۳-۱-ژن <i>CAB</i>
۲۲	۴-۱-بررسی بیان ژن
۲۳	۱-۴-۱-تعریف Real Time PCR
۲۳	۱-۱-۴-۱-اجزای دستگاه Real Time PCR
۲۴	۲-۱-۴-۱-اجزای مختلف منحنی تکثیر

- ۲۴-۱-۴-۳- آشکارسازی .....  
 ۲۵-۱-۴-۴- پارامتر CT .....  
 ۲۶-۱-۴-۵- نرمالسازی داده‌ها .....  
 ۲۶-۱-۴-۶- کمی‌سازی نسبی .....  
 ۲۷-۱-۴-۷- تحلیل اطلاعات کمی Real Time PCR .....

### فصل دوم: مواد و روش‌ها

- ۲۹-۱-۲- اندازه‌گیری طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در دو گروه ژنوتیپی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ACC .....  
 ۲۹-۱-۲-۱- ضد عفونی بذور .....  
 ۲۹-۱-۲-۲- ساخت محیط کشت MS .....  
 ۳۰-۱-۲-۳- تهیه محیط کشت حاوی ACC .....  
 ۳۱-۱-۲-۴- کشت بذور روی محیط MS .....  
 ۳۱-۱-۲-۵- شرایط نگهداری بذور بعد از کشت .....  
 ۳۱-۱-۲-۶- اندازه‌گیری طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه .....  
 ۳۲-۱-۲-۲- بررسی بیان ژن‌های *CAB* و *GST1*, *PRI*, *SAG21*, *SAG12*, *FRY1* .....  
 ۳۲-۱-۲-۱- کشت بذور .....  
 ۳۲-۱-۲-۲- شرایط نگهداری .....  
 ۳۲-۱-۲-۳- تیمار اتیلن .....  
 ۳۴-۱-۲-۳- استخراج RNA .....  
 ۳۴-۱-۳-۱- نمونه‌گیری .....  
 ۳۴-۱-۳-۲- استخراج RNA .....  
 ۳۵-۱-۳-۳- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده .....  
 ۳۵-۱-۳-۴- الکتروفورز ژل آگارز .....  
 ۳۵-۱-۴-۲- ساخت cDNA .....  
 ۳۶-۱-۴-۱- تیمار DNase .....  
 ۳۶-۱-۴-۲- تیمار EDTA .....  
 ۳۷-۱-۴-۳- سنتز cDNA .....  
 ۳۷-۱-۴-۵- بررسی صحت ساخت cDNA .....  
 ۳۷-۱-۵-۱- کنترل منفی RT .....  
 ۳۷-۱-۵-۲- کنترل منفی .....  
 ۳۸-۱-۵-۳- کنترل مثبت .....  
 ۳۸-۱-۶-۲- واکنش PCR جهت بررسی کیفیت cDNA ساخته شده است .....  
 ۳۹-۱-۶-۱- استفاده از الکتروفورز ژل آگارز برای بررسی محصول PCR کنترل انجام شده با cDNA .....  
 ۴۰-۱-۷-۲- واکنش Real Time PCR .....

۴۲.....	۲-۸- استخراج RNA از گیاهچه‌های اتیوله ۵ روزه
۴۲.....	۲-۸-۱- نمونه‌گیری
۴۳.....	۲-۸-۲- استخراج RNA
۴۴.....	۲-۸-۳- ساخت cDNA

### فصل سوم: نتایج و بحث

۴۷.....	۳-۱- بررسی وجود علائم واکنش سه‌گانه در موتانت‌ها و ژنوتیپ‌های مادری
۴۸.....	۳-۱-۱- بررسی تغییرات واکنش سه‌گانه در عدم حضور اتیلن
۴۹.....	۳-۱-۲- بررسی تغییرات واکنش سه‌گانه در حضور اتیلن
۵۰.....	۳-۲- اندازه‌گیری طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه
۵۰.....	۳-۲-۱- بررسی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه مرتبط به گروه ژنوتیپی با ژنوتیپ مادری <i>Ler-0</i>
۵۵.....	۳-۲-۱-۱- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>old101</i> و <i>old102</i> با ژنوتیپ مادری <i>Ler-0</i>
۵۶.....	۳-۲-۱-۲- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>old3</i> و ژنوتیپ مادری <i>Ler-0</i>
۵۷.....	۳-۲-۱-۳- افزایش ناگهانی طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در غلظت ۲۰ میکرومول از ACC
۵۸.....	۳-۲-۲- اندازه‌گیری طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در در گروه ژنوتیپی با ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۶۳.....	۳-۲-۲-۱- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>pad4</i> و ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۶۴.....	۳-۲-۲-۲- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>ein2</i> و ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۶۶.....	۳-۲-۲-۳- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>edr1</i> و ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۶۹.....	۳-۲-۲-۴- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>jar1</i> و ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۷۰.....	۳-۲-۲-۵- مقایسه طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه در موتانت <i>NahG</i> و ژنوتیپ مادری <i>Col-0</i>
۷۱.....	۳-۳- بررسی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با پیری در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۷۱.....	۳-۳-۱- بررسی بیان ژن <i>FRY1</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۷۶.....	۳-۳-۲- بررسی بیان ژن <i>GST1</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۸۰.....	۳-۳-۳- بررسی بیان ژن <i>PR1</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۸۴.....	۳-۳-۴- بررسی بیان ژن <i>SAG21</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۸۶.....	۳-۳-۵- بررسی بیان ژن <i>CAB</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۹۰.....	۳-۳-۶- بررسی بیان ژن <i>SAG12</i> در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی <i>Ler-0</i> و موتانت <i>old101</i>
۹۲.....	۳-۴- استخراج RNA از گیاهچه‌های اتیوله ۵ روزه
۹۳.....	۳-۵- نتیجه‌گیری کلی
۹۵.....	۳-۶- پیشنهادها
۹۶.....	منابع

## فهرست جدول‌ها

- جدول ۲-۱- ترکیب و مقادیر استوک اصلی و استوک کاری MS ..... ۳۰
- جدول ۲-۲- مقادیر مورد نیاز از استوک ACC برای استفاده در حجم‌های مورد نیاز از محیط کشت ..... ۳۱
- جدول ۲-۳- پروتکل تیمار DNase ..... ۳۶
- جدول ۲-۴- پروتکل کیت ساخت cDNA (Fermntas LIFE SCIENCE #K1621) ..... ۳۷
- جدول ۲-۵- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در مستر PCR ..... ۳۸
- جدول ۲-۶- سیکل دمایی و زمانی در PCR ..... ۳۸
- جدول ۲-۷- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده ..... ۳۹
- جدول ۲-۸- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در ترکیب Real time PCR ..... ۴۰
- جدول ۲-۹- تیمارها و ژنوتیپ‌های مورد استفاده برای ساخت cDNAهای مورد استفاده در آزمایش Real Time PCR ..... ۴۰
- جدول ۲-۱۰- آماده‌سازی پلیت Real time PCR ..... ۴۱
- جدول ۲-۱۱- دوره‌های زمانی مورد استفاده در فرایند Real time PCR جهت تکثیر ژن ..... ۴۱
- جدول ۲-۱۲- پروتکل کیت RNXplus ..... ۴۳
- جدول ۳-۱- بررسی وجود یا عدم وجود سه علامت مربوط به واکنش سه‌گانه در گروه ژنوتیپی با ژنوتیپ مادری *Ler-0* ..... ۴۹
- جدول ۳-۲- بررسی وجود یا عدم وجود سه علامت مربوط به واکنش سه‌گانه در گروه ژنوتیپی با ژنوتیپ مادری *Col* ..... ۴۹
- جدول ۳-۳- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old101*، *old3* و *old102* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول از ACC ..... ۵۱
- جدول ۳-۴- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old101*، *old3* و *old102* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول از ACC ..... ۵۲
- جدول ۳-۵- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old101*، *old3* و *old102* در سطوح مختلف ACC به روش برش‌دهی ..... ۵۳
- جدول ۳-۶- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Ler-0*، *old101*، *old3* و *old102* در سطوح مختلف ACC به روش برش‌دهی ..... ۵۳
- جدول ۳-۷- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG* و *pad4* و *edr1* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول از ACC ..... ۵۸
- جدول ۳-۸- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG* و *pad4* و *edr1* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول از ACC ..... ۵۹
- جدول ۳-۹- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG* و *pad4* و *edr1* در سطوح مختلف ACC به روش برش‌دهی ..... ۶۰
- جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG* و *pad4* و *edr1* در سطوح مختلف ACC به روش برش‌دهی ..... ۶۱



## فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- گیاه آرابیدوپسیس ..... ۶
- شکل ۲-۱- مسیر بیوسنتز اتیلن ..... ۱۰
- شکل ۳-۱- گیرنده‌های اتیلن در غشای شبکه آندوپلاسمی ..... ۱۱
- شکل ۴-۱- مسیر سیگنالینگ اتیلن ..... ۱۳
- شکل ۵-۱- مقایسه گیاهچه‌های مادری و *ein2* در معرض اتیلن و شرایط عادی ..... ۱۴
- شکل ۶-۱- محل قرارگیری جهش *old101* در ژن *FRY1* ..... ۱۵
- شکل ۷-۱- واکنش سه‌گانه ..... ۱۷
- شکل ۸-۱- تاثیر ژن *FRY1* در واکنش گیاه به تنش‌های محیطی ..... ۲۰
- شکل ۹-۱- نمودار نتایج Real time PCR برای ۵ نمونه ..... ۲۵
- شکل ۱-۲- اندازه‌گیری طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه ..... ۳۲
- شکل ۲-۲- گیاهچه‌های ۱۸ روزه *old101* و *Ler-0* رشد یافته در شرایط عادی ..... ۳۳
- شکل ۳-۲- گیاهچه‌های ۳۵ روزه *old101* و *Ler-0* رشد یافته در شرایط عادی ..... ۳۳
- شکل ۴-۲- گیاهچه‌های ۳۵ روزه *old101* و *Ler-0* رشد یافته تحت تیمار اتیلن ..... ۳۳
- شکل ۵-۲- محصول Real Time PCR ژن‌های *GST1* و *ACTIN2* در گیاهان *old101* و *Ler-0* در ۱۸ روزگی و پس از ۳ روز رشد در شرایط عادی ..... ۴۲
- شکل ۶-۲- بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ..... ۴۴
- شکل ۷-۲- کنترل ساخت cDNA با استفاده از ژل آگارز ..... ۴۴
- شکل ۱-۳- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102* با شاهد *Ler-0* در همه غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ..... ۵۲
- شکل ۲-۳- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102* با شاهد *Ler-0* در همه غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ..... ۵۳
- شکل ۳-۳- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102*، *Ler-0* و ۱۰، ۵، ۱، ۰ در غلظت‌های ۲۰ میکرومول از ACC به روش دانکن و در سطح ۱٪ ..... ۵۴
- شکل ۴-۳- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102*، *Ler-0* و ۱۰، ۵، ۱، ۰ در غلظت‌های ۲۰ میکرومول از ACC به روش دانکن و در سطح ۱٪ ..... ۵۴
- شکل ۵-۳- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102*، *Ler-0* در هر یک از غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۵۶
- شکل ۶-۳- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *old101*، *old3*، *old102*، *Ler-0* در هر یک از غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۵۷
- شکل ۷-۳- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* با شاهد Col در همه غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ..... ۵۹
- شکل ۸-۳- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* با شاهد Col در همه غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD در سطح ۱٪ ..... ۶۰

- شکل ۳-۹- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* در همه غلظت‌های ACC به روش دانکن و در سطح ۱٪ ..... ۶۱
- شکل ۳-۱۰- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC به روش دانکن و در سطح ۱٪ ..... ۶۲
- شکل ۳-۱۱- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* در همه غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۶۲
- شکل ۳-۱۱- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* در هر یک از غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۶۲
- شکل ۳-۱۲- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ‌های *Col*، *ein2*، *jar1*، *NahG*، *pad4* و *edr1* در هر یک از غلظت‌های ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۶۳
- شکل ۳-۱۳- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ *ein2* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۶۴
- شکل ۳-۱۴- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ *ein2* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC با استفاده از آزمون LSD ..... ۶۵
- شکل ۳-۱۵- مقایسه میانگین طول هیپوکوتیل ژنوتیپ *edr1* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC با استفاده از آزمون دانکن ..... ۶۷
- شکل ۳-۱۶- مقایسه میانگین طول ریشه‌چه ژنوتیپ *edr1* در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومول از ACC با استفاده از آزمون دانکن ..... ۶۸
- شکل ۳-۱۷- سطوح بیان ژن *FRY1* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۱۸ و ۳۵ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۷۲
- شکل ۳-۱۸- سطوح بیان ژن *GST1* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سن ۱۸ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۷۷
- شکل ۳-۱۹- سطوح بیان ژن *PR1* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۱۸ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۸۰
- شکل ۳-۲۰- سطوح بیان ژن *PR1* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۳۵ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۸۱
- شکل ۳-۲۱- سطوح بیان ژن *SAG12* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۱۸ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۸۴
- شکل ۳-۲۲- سطوح بیان ژن *SAG21* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۱۸ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۸۶
- شکل ۳-۲۳- سطوح بیان ژن *SAG21* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۳۵ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۸۷
- شکل ۳-۲۴- سطوح بیان ژن *CAB* در موتانت *old101* و ژنوتیپ وحشی *Ler-0* در سنین ۳۵ روزگی تحت تیمار اتیلن و شرایط نرمال ..... ۹۰

## چکیده

بررسی بیان برخی از ژنهای مرتبط با پیری در واکنش به اتیلن در گیاهان وحشی (*Ler-0*) و موتانت *old101* در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

سیده حمیده طاهری اطاقسرا

فرایند پیری از آغاز تا پایان مرگ سلولی با تغییر در میزان بیان برخی از ژن‌ها همراه می‌باشد. از جمله می‌توان به دو دسته اصلی این ژن‌ها شامل PAGs (Photosynthesis Associated Genes) و SAGs (Senescence Associated Genes) اشاره کرد. هورمون اتیلن از جمله الفاکننده‌های پیری در گیاهان می‌باشد. ژن *FRY1* از جمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش‌های محیطی است که بر میزان تولید اتیلن موثر است. در آگزون شماره ۲ ژن *FRY1* یک جهش نقطه‌ای تحت عنوان *old101* باعث جایگزینی نوکلئوتید G با A شده است. به منظور بررسی فعالیت مسیر بیوسنتزی اتیلن، طول هیپوکوتیل و ریشه‌چه گیاهان اتیوله در دو گروه ژنوتیپی، شامل گروه اول: ژنوتیپ مادری *Ler-0* و گروه دوم: ژنوتیپ مادری *Col-0* (*Col-0*، *ein2*، *jar1*، *Nahg6*، *pad4*، *edr1*) اندازه‌گیری و با ژنوتیپ مادری خود مقایسه شدند. از نظر صفات مورد بررسی از گروه اول موتانت‌های *old101* و *old102* مشابه با ژنوتیپ مادری خود و از گروه دوم ژنوتیپ *pad4* مشابه با ژنوتیپ مادری خود بودند. همچنین میزان بیان ژن‌های *FRY1*، *GST1*، *PR1*، *SAG21*، *SAG12* و *CAB* در گیاهچه‌های جهش یافته (*old101*) و مادری (*Ler-0*) تحت تیمار اتیلن اندازه‌گیری شد. مطابق با نتایج بدست آمده بیان ژن‌های *FRY1*، *GST1*، *PR1* و *SAG21* با افزایش سن و تحت تاثیر تیمار اتیلن در ژنوتیپ مادری به طور چشمگیری افزایش یافته است. در حالیکه با افزایش سن میزان بیان این ژن‌ها در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* نسبت به گیاهان مادری کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. از طرفی بیان ژن *CAB* با افزایش سن و تحت تیمار اتیلن در گیاهچه‌های جهش یافته نسبت به ژنوتیپ *Ler-0* بیشتر بوده است. احتمالاً تاثیر جهش *old101* بر میزان فعالیت پروتئین *FRY1* موجب کاهش فعالیت ۳'، ۵' (۲')، بی فسفات نوکلئوتید فسفاتاز شده که با تجمع PAP همراه بوده و موجب تاثیر بر مسیر سیگنالینگ اتیلن و تغییر بیان ژن‌ها و در نهایت منجر به تاخیر در فرایند پیری شده است.

کلید واژه: SAGs، PAGs، پیری، *FRY1*، واکنش سه‌گانه

## Abstract

Expression analysis of senescence induced-related genes in response to ethylen in wild type (*Ler-0*) and mutant *old101* plants in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*)

Seyyedeh Hamideh Taheri Otaghsara

The senescence process, from the beginning is associated with many significant changes in expression levels of two main gene categories including PAGs (Photosynthesis Associated Genes) and SAGs (Senescence Associated Genes). Ethylene as a plant hormone is one of major inducers of plant senescence. *FRY1* is a stress-responsive gene and mutation in *FRY1* gene changed G into A in exon 2 and called *old101*. hypocotyle and root length of dark grown plantlet of two genotype group including *Ler-0* parental group (*Ler-0*, *old101*, *old3*, *old102*) and Col-0 parental group (*Col-0*, *ein2*, *jar1*, *Nahg6*, *pad4*, *edr1*) was measured and were compared with the wild type on various concentration of ACC. According to the obtained results, in *Ler-0* parental group the ethylene biosynthesis pathway is active in the same way in *old101*, *old102* and *Ler-0* plants. In Col-0 parental group the ethylene biosynthesis pathway is active in the same way in *pad4* and Col-0 plant. The gene expression levels of *FRY1*, *GST1*, *PR1*, *SAG21*, *SAG12* and *CAB* were compared in mutant and wild type seedlings under ethylene stress. A significant increase in *FRY1*, *GST1*, *PR1*, *SAG21* and *SAG12* expression levels has been detected in wild type plants under ethylene stress. but significant decrease in this genes expression was detected in *old101* seedlings under ethylene stress when compared with the wild type seedlings. The gene expression levels of *CAB* had a significant decrease in wild type plants under ethylene stress. But a significant increase in *CAB* genes expression levels was detected in *old101* seedlings under ethylene stress when compared with the wild type seedlings. Likely, accumulation of PAP levels or changing in the activity of *FRY1* protein in *old101* plants influence the ethylene biosynthesis and signaling pathway and decrease *FRY1*, *GST1*, *PR1*, *SAG21* and *SAG12* genes expression but increase *CAB* genes expression levels that resulting in delayed senescence in *old101* plants.

Key words: SAGs, PAGs, *FRY1*, Triple response

## فصل اول

کلیات و مرور منبع

## ۱-۱- آرابیدوپسیس

گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) یک گیاه علفی کوچک متعلق به خانواده Brassicaceae می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن ویژگی‌هایی از قبیل اندازه‌ی کوچک، شرایط آسان برای رشد، خود لقاحی و زمان تولید مثلی کوتاه مدت و چرخه‌ی زندگی کوتاه در آزمایشات بیولوژیکی و ژنتیکی به عنوان گیاه مدل مورد توجه قرار گرفته است [Francoice et al., 2008].

آرابیدوپسیس بومی اوراسیا می‌باشد و آن را از سواحل دریاها تا ارتفاعات کوه‌ها می‌توان یافت و امروزه به عنوان علف هرز در آمریکای شمالی، اروپا، آفریقای شمالی، استرالیا یافت می‌شود. در شرایط گلخانه‌ای در طول ۶ تا ۸ هفته چرخه‌ی زندگی این گیاه کامل می‌شود. خاک مناسب برای رشد آن خاک لومی و ماسه‌ای بوده [Hoffman., 2002] و معمولا برای جوانه‌زنی به یک دوره چند روزه سرمادهی و نور نیاز دارند. گیاه آرابیدوپسیس یکی از کوچک‌ترین ژنوم‌ها را در میان گیاهان عالی داراست. علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، توانایی ترانسفرماسیون در این گیاه آنرا به گیاهی مطلوب جهت مطالعات ژنتیک مولکولی تبدیل کرده است [Francois et al, 2008]. اندازه ژنوم آرابیدوپسیس تقریبا ۱۳۰ mbp بوده و در سطح ۵ کروموزوم سازماندهی شده‌اند [Koorneef and Scheres., 2001].



شکل ۱-۱- گیاه آرابیدوپسیس

## ۱-۲- فرایند پیری

فرایند پیری از جمله چشمگیرترین و مهمترین پدیده‌هایی است که در طول رشد و نمو گیاهان دیده می‌شود. این فرایند آخرین مرحله از مراحل رشد و نمو بوده و در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود. بنابراین موجب محدود کردن طول عمر یک گیاه می‌گردد [Lim et al., 2003]. در سطح سلول پسوی‌های پیری مختلفی وجود دارد که اغلب آنها اتولیتیک بوده و شامل اتفاقات بیوشیمیایی و ژنتیکی‌ای هستند که از درون خود سلول‌های در حال پیری سرچشمه می‌گیرند. پیری ممکن است مرتبط به توسعه و سن گیاه، هورمون‌ها و یا مواد غذایی در گیاه باشد. هسته، واکوئل، پلاستیدها و میتوکندری در طول فرایند پیری برهم‌کنش دارند. همان‌طور که کلروپلاست‌ها به پلاستیدهای رنگدانه‌دار تمایز می‌یابند، برگ‌ها، میوه‌ها و برخی از گل‌ها کلروفیل خود را از دست می‌دهند. محصولات کلروفیل تجزیه شده به واکوئل سلول منتقل می‌شود. به دنبال تجزیه کلروفیل رنگ برگ‌ها تغییر کرده و به زردی می‌گراید [Borras et al., 2002]. پروتئین‌ها و نوکلئیک اسید هیدرولیز می‌شوند و نیتروژن و فسفر از برگ‌های مسن به برگ‌ها و بافت‌های جوان‌تر منتقل می‌شوند. در ابتدای رشد، اندام‌های گیاهی به عنوان مخزن مواد غذایی عمل کرده و اندام‌های جوان محل ورود مواد غذایی بوده اما با افزایش سن به تدریج اندام‌ها از حالت مخزن به حالت منبع تبدیل می‌شوند و موجب خروج مواد غذایی از اندام مسن به اندام جوان می‌شوند [Lim et al., 2002]. پیری به صورت یک واکنش استراتژی به استرس‌های فصلی و استرس‌های غیر قابل پیش‌بینی

از جمله تغییر طول روز، غرقاب شدن، خشکی، نور بیش از حد، تاریکی، محدودیت‌های غذایی و بیماری نیز روی می‌دهد [Schippers et al., 2007].

#### ۱-۲-۱- پیری وابسته به سن

پیری وابسته به سن ناشی از رشد گیاه بوده و یک فرایند کاملاً برنامه‌ریزی شده از لحاظ ژنتیکی می‌باشد. با افزایش سن گیاه حتی اگر گیاه از شرایط رشدی مناسب، از قبیل مواد غذایی کافی، نور مناسب و به دور از حمله‌ی پاتوژن‌ها و استرس‌های غیر زنده باشد نیز وارد فرایند پیری می‌شود. در گیاهان تک لپه این فرایند با توسعه‌ی اندام زایشی گیاه که همراه با حرکت مواد غذایی از بخش‌های رویشی گیاه به بخش زایشی است، آغاز می‌گردد. در گیاه آرابیدوپسیس نیز پیری گیاه به توسعه‌ی اندام زایشی ارتباط دارد اما برای شروع پیری در اندامی مانند برگ (onset of leaf death)، علاوه بر فاکتور ذکر شده، تغییرات مرتبط با سن (Age related changes) که تحت کنترل ژنتیکی می‌باشند نیز دخیل هستند. یعنی در بهترین شرایط محیطی نیز طول عمر معینی دارند [Schippers et al., 2007]. پیری وابسته به مواد غذایی نیز به وضعیت و نسبت کربن به نیتروژن بافت بستگی دارد و کاهش مقدار نیتروژن در بافت، به عنوان سیگنال پیری عمل می‌کند.

#### ۱-۲-۲- پیری وابسته به هورمون‌های گیاهی

هورمون‌های گیاهی نیز نقش مهم در القا یا به تاخیر انداختن پیری دارند. در میان هورمون‌های گیاهی، جیبرلیک اسید، اکسین و سیتوکنین موجب تاخیر در پیری شده و هورمون‌های جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، ایندول بوتریک اسید و اتیلن موجب تسریع در پیری می‌شوند [Guiboleau et al., 2010]. در مسیر سیگنالینگ هورمون‌های مختلف گیاهی به طور چشمگیری هم‌پوشانی وجود دارد و بنابراین مطالعه‌ی مسیر سیگنالینگ یک هورمون، به تنهایی کاری پیچیده به نظر می‌آید. هورمون‌های گیاهی با یکدیگر و دامنه وسیعی از سیگنال‌های رشدی، محیطی و متابولیکی اثر متقابل دارند. در گیاهان سه راه اصلی برای کنترل واکنش گیاه به هورمون‌ها وجود دارد. ۱- تنظیم در سطح بیوسنتز هورمون ۲- تنظیم در سطح درک هورمون توسط گیرنده‌ها و پسوی سیگنالینگ ۳- تنظیم در سطح بیان ژن‌ها [Schippers et al., 2007].



## ۱-۲-۲-۱- هورمون‌های القا کننده پیری

## ۱-۱-۲-۲-۱- جاسمونیک اسید (JA)

بررسی‌ها نشان داده‌اند که متیل جاسمونیت و پیش‌ساز متابولیکی آن که جاسمونیک اسید می‌باشد، موجب تحریک آغاز پیری در گیاهان می‌شوند. همچنین این هورمون در واکنش‌های دفاعی گیاهان علیه پاتوژن‌ها دارای فعالیت موثر است. همزمان با افزایش جاسمونیک اسید در برگ‌های پیر، ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های کاتالیزکننده در واکنش مسیر سیگنالینگ جاسمونیک اسید فعال می‌شوند [He et al., 2002]. جاسمونیک اسید یک نقش دفاعی علیه پاتوژن و حشرات ایفا می‌کند.

۱-۱-۲-۲-۱- موتانت *jar1* (JA response mutant)

پروتئین JAR1 یک JA-amino synthase است که برای فعال سازی جاسمونیک اسید به منظور سیگنالینگ مطلوب در آرآبیدوپسیس لازم است. این آنزیم موجب اتصال یک آمینواسید به JA (جاسمونیک اسید) شده و در نتیجه این اتصال موجب فعال سازی JA می‌شود و سیگنالینگ مطلوب JA صورت می‌گیرد. در موتانت *jar1* به دلیل نقص آنزیمی مقدار JA (جیبرلیک اسید) فعال کاهش می‌یابد. در نتیجه مکانیسم دفاع نیز کاهش یافته و ضعیف می‌شود [Staswick and Tiryaki., 2004].

## ۱-۲-۲-۲-۱- سالیسیلیک اسید (SA)

سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنولی می‌باشد که در مسیر سیگنالینگ در هنگام حمله پاتوژن و در طول پیری نقش کلیدی دارد. مقدار این هورمون در اواخر دوران پیری برگ نسبت به اوایل شروع این فرایند تا ۴ برابر افزایش می‌یابد و این نشان‌دهنده‌ی افزایش تاثیر نقش سالیسیلیک اسید در اواخر پیری می‌باشد [Schippers et al., 2007]. موتانت‌های آرآبیدوپسیس که دارای نقص در سوی سیگنالینگ سالیسیلیک اسید هستند از جمله *pad4* و *NahG* و موتانت *edr1* که دچار افزایش تولید سالیسیلیک اسید شده است برای بررسی بیان ژن‌های مرتبط با پیری استفاده می‌شود.

### ۱-۲-۱-۲-۲-۱ موتانت *pad4* (PhytoAlexin-Deficient Mutant)

ژن *PAD4* برای سنتز کامالکسین در واکنش به آلودگی‌های باکتریایی و ویروسی در گیاه لازم است. موتانت‌های *pad4* در واکنش دفاعی نقص نشان می‌دهند که ناشی از نقص در سنتز کامالکسین و *PR genes*<sup>۱</sup> می‌باشد [Zhou et al., 1998]. در موتانت *pad4* (PhytoAlexin-Deficient Mutant) به دلیل تولید آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز که تخریب کننده سالیسیلیک اسید می‌باشد، مقدار تجمع سالیسیلیک اسید در سلول‌ها و به دنبال آن میزان کامالکسین در سلول کاهش می‌یابد از آنجائیکه برای سنتز کامالکسین نیاز به سالیسیلیک اسید می‌باشد. در نتیجه مقاومت این موتانت‌ها در مقابل پاتوژن‌ها کاهش می‌یابد [Kunkel and Brook., 2002].

### ۱-۲-۱-۲-۲-۱ موتانت *NahG*

گیاهان ترانسژنیک آرابیدوپسیس حاوی ژن *NahG* باکتریایی هستند. این ژن در باکتری *Pseudomonas studzeri* سویه *naphtalen-degrading* شناسایی شده است. در اثر بیان این ژن آنزیم سالیسیلات هیدروکسیلاز تولید می‌شود. در نتیجه سطح این آنزیم در گیاه افزایش می‌یابد. این آنزیم می‌تواند سالیسیلیک اسید را متابولیزه کند. سالیسیلات هیدروکسیلاز مانع تجمع SA (سالیسیلیک اسید) در هنگام حمله‌ی پاتوژن می‌شود. در نتیجه قدرت دفاعی گیاه را کاهش می‌دهد. انتقال این ژن به منظور بررسی اثرات SA (سالیسیلیک اسید) و مسیر سیگنالینگ آن انجام شد [Lawton et al., 1995].

### ۱-۲-۱-۲-۲-۱ موتانت *edr1*

گیاهان موتانت *edr1* (Enhanced disease resistant1) در مقابل بیماری‌های گیاهی دارای مقاومت بیشتری می‌باشد. ژن *EDR1* (ENHANCED DISEASE RESISTANCE1) یک کیناز مشابه *CTR1* را کد می‌کند. این کیناز تنظیم کننده منفی در فرایند مقاومت به بیماری و پیری القا شونده با اتیلن است. موتاسیون *edr1* در ژن *EDR1* منجر به افزایش مقاومت در گیاه علیه بیماری سفیدک پودری می‌شود این افزایش مقاومت ناشی از افزایش تولید سالیسیلیک اسید

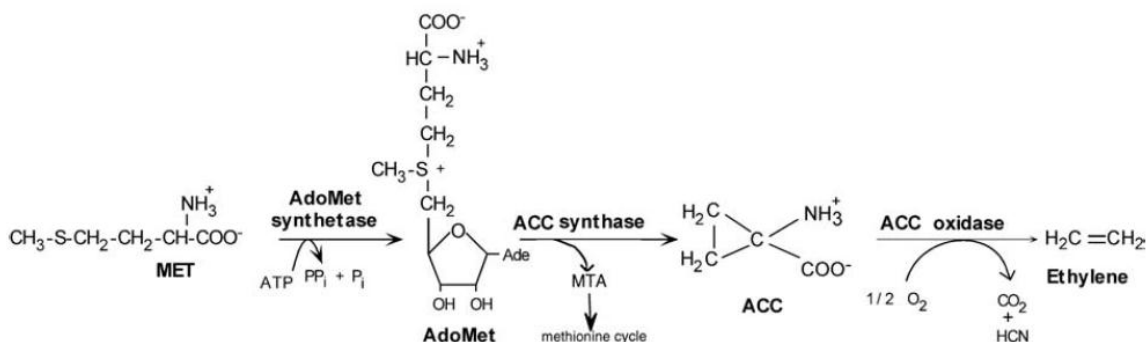
<sup>۱</sup> . Pathogenesis Resistance genes

در این موتانت‌ها می‌باشد [Tang et al., 2005]. مقاومت ایجاد شده توسط این موتانت با چندین واکنش دفاعی از جمله مرگ سلول میزبان که مانع گسترش بیماری خواهد شد، همراه است [Frye et al., 2000].

### ۱-۲-۲-۳-۱ اتیلن

هورمون گیاهی اتیلن که دارای ساختار دوکربنه ساده‌ای می‌باشد در بسیاری از جنبه‌های چرخه‌ی زندگی گیاه از جمله جوانه زنی بذر، توسعه ریشه موئین، گره‌زایی در ریشه، رسیدن میوه و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گیاه دخالت دارد و نقش کلیدی در تنظیم شروع پیری برگ ایفا می‌کند. تولید اتیلن در گیاه توسط سیگنال‌های سیگنال‌های داخلی و هم-چنین محرک‌های محیطی زنده و غیر زنده تنظیم می‌شود [Stepanova and Ecker., 2000].

در مسیر بیوسنتز اتیلن، ابتدا آمینواسید متیونین به SAM<sup>۲</sup> و سپس SAM به ACC تبدیل شده و در مرحله بعد ACC به اتیلن در گیاه تبدیل می‌شود [Wang et al., 2002] (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- مسیر بیوسنتز اتیلن

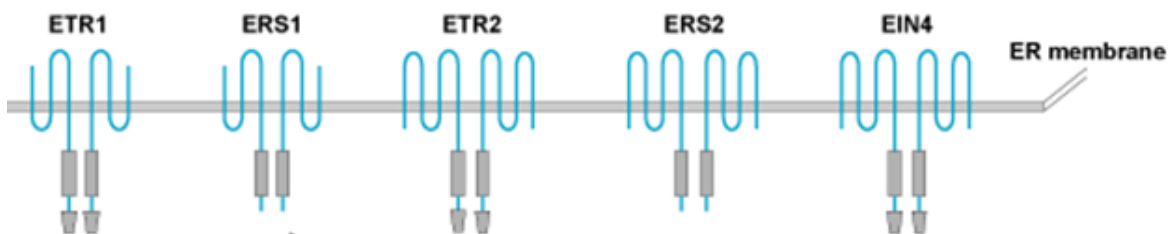
در اولین مرحله، متیونین توسط آنزیم SAM سنتاز<sup>۳</sup> و با مصرف ATP به SAM تبدیل می‌شود. SAM یک سوبسترای مهم در بسیاری از چرخه‌های بیوشیمیایی از جمله چرخه بیوسنتز اتیلن است. مهم‌ترین قسمت این چرخه

<sup>۲</sup>. S- Adenosine methionine

تبدیل SAM به ACC توسط آنزیم ACC سنتاز است. در مرحله بعد ACC توسط آنزیم ACC اکسیداز<sup>۴</sup>، اکسید می‌شود و به اتیلن تبدیل می‌گردد. مرحله‌ی محدود کننده در بیوسنتز اتیلن تبدیل SAM به ACC توسط آنزیم ACC سنتاز می‌باشد.

اتیلن پس از تولید در گیاه توسط خانواده‌ای از گیرنده‌ها که شامل ۵ عضو یا گیرنده است و ساختاری مشابه گیرنده‌های دو جزئی هیستیدین کینازی در باکتری‌ها دارند، دریافت می‌شود. اولین بار آنالیز ژنتیکی گیرنده‌های اتیلن توسط تونی بلیکر در سال ۱۹۸۸ [Hall et al., 2007]. آغاز شد سیستم گیرنده‌ها به این صورت است که هر گیرنده شامل دو پروتئین است: یک حس‌گر (هیستیدین کیناز) و یک دریافت کننده [chang and meyerowitz., 1995].

در گیاهی مانند آرابیدوپسیس ۵ گیرنده‌ی اتیلن وجود دارد که شامل ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 و EIN4 هستند [Omalley et al, 2005; Schaller and Kieber., 2002]. این گیرنده‌ها در غشای شبکه آندوپلاسمی قرار دارند [Chang and Meyerowitz., 1995; Ma et al, 2006].



شکل ۱-۳- گیرنده‌های اتیلن در غشای شبکه آندوپلاسمی (www. AccessScience.com)

وقتی حضور اتیلن توسط گیرنده‌ها درک شد، پیام حضور اتیلن در یک مسیر سیگنالینگ ارسال خواهد شد. اولین عضو در مسیر سیگنالینگ اتیلن، پروتئینی با ۲۸۱ آمینواسید است که CTR1 نامیده می‌شود. این پروتئین به طور مستقیم با

<sup>3</sup> . SAM synthetase

<sup>4</sup> . ACC oxidase