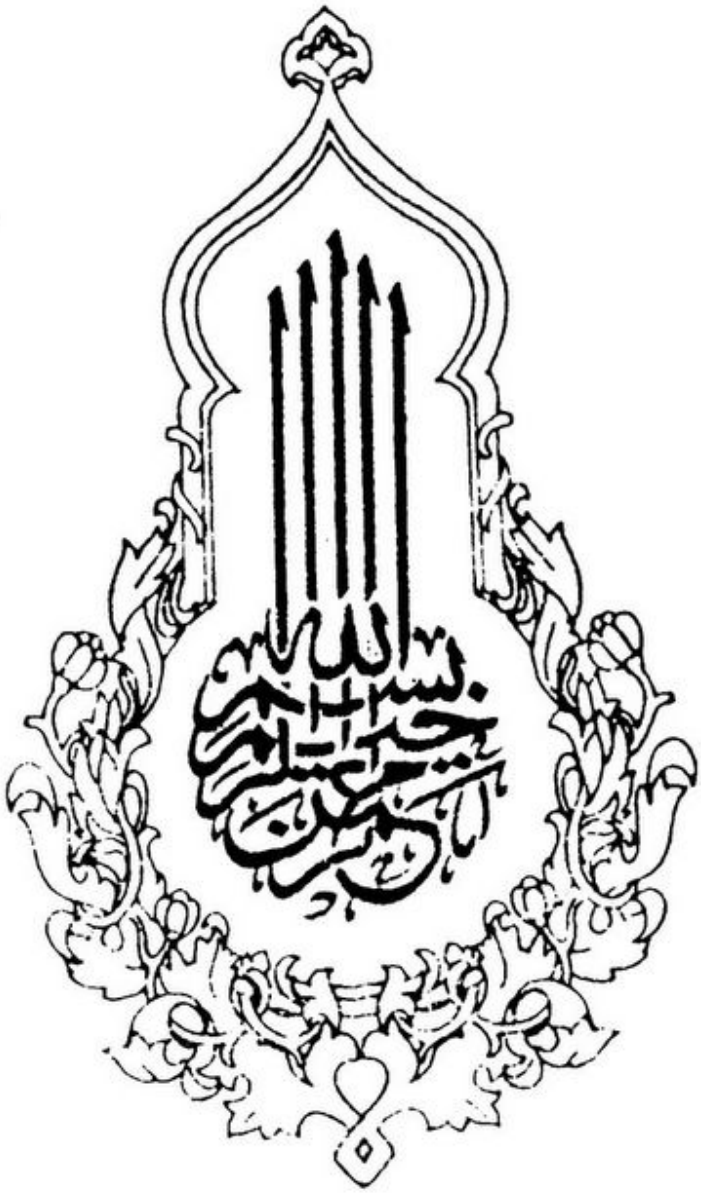
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی
(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

تاثیر جهش *old101* در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) بر واکنش گیاهان به تنش خشکی

از:

یونس میرزایی

استاد راهنما:

دکتر رضا شیرزادیان خرم‌آباد

استادان مشاور:

دکتر محمدمهدی سوهانی، دکتر علی مسعودی نژاد

تیرماه ۱۳۹۱

تقدیم:

به روح پدر و مادرم..

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 محمد مهدی سوهانی و آقای دکتر علی مسعودی نژاد که از هیچ کمکی برایم فروگذار نکردند تشکر ویژه دارم.

از اساتید محترم داور آقایان دکتر علی اعلمی و دکتر هدایت زکی زاده که زحمت باز خوانی 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 بیوتکنولوژی و ژنومیکس آقایان مهندس محمد حسین رضادوست و مهندس حسام الدین حسینی تشکر می کنم.

از دوستان و همکلاسی های خوبم خانم ها و آقایان:

بنفشه فتاح، فاطمه چمنی، صدیقه نصر رمزی، خزر ادریسی، محمد محسن زاده، بنیامین یزدانی

آرینه حیدریان، مینا خوشبخت، ژاله حکمتی، حمیده کاروانکش، حمیده طاهری، هما ایزددوست، فاطمه حسنی، طاهره فتحی، محسن ایمان زاده، تقی مؤذن زاده، علی مبارکی، یعقوب احمدیوسفی

تشکر می کنم و برای همه ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم

فهرست جدول‌ها .....ت
فهرست شکل‌ها.....ث
چکیده فارسی.....ج
چکیده انگلیسی .....چ
مقدمه ۲

فصل اول:کلیات و مرور منابع

۱- ۱- آرابیدوپسیس ۵
گیاه ٤٥ روزه *Arabidopsis thaliana* ٦
۱-۲- تنش ٦
۱-۲-۱- انواع تنش ٦
۱-۲-۱-۱- سرما ۷
۱-۲-۱-۲- شوری ۷
۱-۲-۱-۳- خشکی ۸
۱-۲-۱-٤- ABA بعنوان هورمون تنش ۱۰
۱-۳- تاثیر تنش بر سلول ۱۱
۱-۳-۱- درک تنش ۱۲
مولکول‌های دریافت کننده پیام ۱۲
۱-٤- ژن‌های واکنش‌گر به تنش ۱٦
۱-٥- *FRY1* یک ژن واکنش‌گر به تنش ۱۷
۱-٦- جهش *old101*.....۲۱
۱-۷- بررسی بیان ژن ۲۲
۱-۷-۱- روش‌های بررسی بیان ژن.....۲۲
۱-۷-۲- روش RT-PCR ۲۳
روش Real time-PCR ۲٥

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- بررسی جوانه زنی بذور جهش یافته و مادری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آبسیسیک اسید (ABA) ۲۹
۲-۱-۱- ضدعفونی بذور.....۲۹
۲-۱-۲- کشت بذور.....۳۰

۲-۱-۳- بررسی جوانه‌زنی بذور ۳۰
۲-۲- بررسی جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت غلظت‌های مختلف NaCl ۳۱
۲-۳- بررسی برخی شاخص‌های مورفولوژیکی در گیاهچه‌های جهش‌یافته و مادری تحت تیمار شوری و خشکی ۳۲
۲-۳-۱- ضدعفونی بذور ۳۲
۲-۳-۲- ساخت محیط 1/2MS ۳۲
۲-۳-۳- کشت بذور روی محیط 1/2MS ۳۳
۲-۳-۴- تهیه محیط القاء تنش خشکی با استفاده از مانیتول و تنش شوری (NaCl) ۳۳
۲-۳-۵- انتقال گیاهچه‌ها به محیط تنش ۳۴
۲-۴- بررسی بیان ژن‌های *FRY1* و *GST1* در گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تیمار خشکی ۳۵
۲-۴-۱- ضدعفونی بذور ۳۵
۲-۴-۲- کشت بذور ۳۵
۲-۴-۳- انتقال گیاهچه‌های رشد یافته به محیط تنش ۳۵
۲-۴-۴- نمونه‌گیری جهت استخراج RNA ۳۶
۲-۴-۵- استخراج RNA ۳۶
۲-۴-۵-۱- بررسی کمیت و کیفیت RNA با اسپکتوفوتومتر ۳۶
۲-۴-۵-۲- بررسی صحت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ۳۶
۲-۵-ساخت cDNA ۳۸
۲-۵-۱- بکارگیری RNA استخراج شده جهت ساخت cDNA ۳۸
۲-۵-۲- بررسی صحت ساخت cDNA ۳۹
۲-۵-۲-۱- واکنش کنترل منفی ۳۹
۲-۵-۲-۲- واکنش کنترل منفی (NTC) ۳۹
۲-۵-۲-۳- واکنش کنترل مثبت ۳۹
۲-۵-۳- بررسی کیفیت cDNA ساخته شده ۴۱
۲-۵-۴- بررسی محصول PCR کنترل ساخت cDNA در فرایند الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ۴۱
۲-۶- بررسی بیان ژن به روش Real time PCR ۴۵

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- بررسی جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تیمار غلظت‌های مختلف ABA و NaCl ۴۹
۳-۱-۱- بررسی جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته و مادری تحت تیمار غلظت‌های مختلف ABA ۴۹
۳-۱-۲- بررسی میزان جوانهزنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تنش شوری (سطوح مختلف NaCl). ۵۴
۳-۳- بررسی برخی شاخص‌های رشد در گیاهچه‌های جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تنش شوری و خشکی ۵۷
۳-۳-۱- بررسی شاخص‌های رشد تحت تیمار شوری (غلظت‌های مختلف NaCl) ۵۷
۳-۳-۲- بررسی شاخص‌های رشد تحت تیمار خشکی (القاء شده به وسیله غلظت‌های مختلف مانیتول) ۶۲
۳-۴- بررسی میزان بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش در گیاهچه‌های جهش‌یافته و مادری تحت تنش خشکی ۶۵
۳-۵ - نتیجه گیری کلی ۷۱
۳-۶- پیشنهادها ۷۴
۳-۷- منابع ۷۶

فهرست جدول‌ها

جدول۲- ۱- ترکیب و مقادیر استوک اصلی و استوک کاری MS..... ۳۳
جدول۲- ۲-پروتکل کیت RNX-plus ^{TM} جهت استخراج RNA..... ۳۷
جدول۲- ۳- شاخص $A_{260/280}$ جهت بررسی کیفیت RNA..... ۳۷
جدول۲- ۴- پروتکل کیت ساخت cDNA (Fermrntas $_{LIFE\ SCIENCE}$ #K1621)..... ۳۹
جدول۲- ۵- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ۴۱
جدول۲- ۶-ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در ترکیب اصلی PCR ۴۳
جدول۲- ۷- ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده در ترکیب اصلی Real time PCR..... ۴۵
جدول۲- ۸- دوره‌های زمانی مورد استفاده در فرایند Real time PCR جهت تکثیر ژن‌های *FRY1*، *GST1* و *ACTIN2* ۴۵
جدول۳-۱- جدول تجزیه واریانس میزان جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تیمار ABA. ۵۰
جدول۳- ۲- جدول تجزیه واریانس بررسی میزان جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تنش شوری ۵۶
جدول۳- ۳- جدول تجزیه واریانس بررسی میزان جوانه‌زنی بذور جهش‌یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تنش شوری. ۵۷
جدول۳- ۴- جدول تجزیه واریانس بررسی شاخص‌های رشد تحت تیمار شوری ۶۰
جدول۳-۵- جدول تجزیه واریانس بررسی شاخص‌های رشد تحت تیمار شوری ۶۱

فهرست شکل‌ها

شکل۱- ۱- گیاه آرابیدوپسیس ۶
شکل۱- ۲- تولید ABA در واکنش به تنش‌های محیطی ۱۱
شکل۱- ۳- شمای کلی فرایند دریافت پیام و پاسخ سلول به تنش محیطی ۱۳
شکل۱- ۴- IP_3 و DAG دو مولکول پیامبر ثانویه که در واکنش به تنش محیطی تولید می‌گردد ۱۸
شکل۱- ۵- ژن *FRY1* یک ژن واکنش‌گر به تنش ۲۱
شکل۱- ۶- تاثیر ژن *FRY1* در واکنش گیاه به تنش‌های محیطی. ۲۱
شکل۱- ۷- ژن *FRY1* با ژن‌های متعدد در ارتباط است. ۲۲
شکل۱- ۸- میزان بیان ژن *FRY1* در بافت‌های مختلف متفاوت است (http://www.arabidopsis.org). ۲۳
شکل۱- ۹- محل قرارگیری جهش *old101* در ژن *FRY1* ۲۴
شکل۱- ۱۰- نمایش شماتیک بررسی تفاوت بیان ژن به روش RT-PCR (DDRT-PCR). ۲۸
شکل۲- ۱- ضدعفونی بذور آرابیدوپسیس با استفاده از بخارات HCl در دستگاه دسیکاتور ۳۴
شکل۲- ۲- بررسی جوانه‌زنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) ۳۵
شکل۲- ۳- مراحل مختلف جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس ۳۶
شکل۲- ۴- نمونه گیاهچه‌های جهش یافته (*old101*) و مادری(L*er*-0) کشت شده بر روی محیط MS ½ ۴۰
شکل۲- ۵- انتقال گیاهچه‌های جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) به محیط تنش ۴۱
شکل۲- ۶- بررسی کیفیت RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ ۴۴
شکل۲- ۷- کنترل ساخت cDNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ ۴۷
شکل۲- ۸- توالی cDNA ژن *ACTIN2* ۴۹
شکل۲- ۹- توالی cDNA ژن *FRY1* ۵۰
شکل۲- ۱۰ – توالی cDNA ژن *GST1* ۵۲
شکل۲- ۱۱ -تصویر ژل آگارز ۱٪ PCR کنترل ساخت *cDNA* ۵۳
شکل۲- ۱۲- محصول Real time PCR ژن *ACTIN2* ۵۴
شکل۲- ۱۳- محصول Real time PCR ژن *FRY1* ۵۵
شکل۲- ۱۴-محصول Real time PCR ژن *GST1* ۵۶
شکل۳- ۱- جوانه‌زنی بذور جهش یافته و مادری تحت تیمارهای مختلف ABA ۵۹
شکل۳- ۲- جوانه‌زنی بذور جهش یافته و مادری تحت تیمار با سطوح مختلف NaCl ۶۴
شکل۳- ۳- مقایسه طول ریشه در گیاهچه‌های جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) ت ۶۷
شکل۳- ۴- مقایسه تعداد برگ و تعداد برگ زرد شده در گیاهچه در ژنوتیپ‌های جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er-0*) ... ۶۸
شکل۳- ۵- مقایسه گیاهچه‌های جهش یافته و مادری بر اساس برخی از شاخص‌های رشد تحت تیمار شوری (NaCl) ۶۹
شکل۳- ۶- مقایسه طول ریشه در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تیمار خشکی ۷۲
شکل۳- ۷- مقایسه تعداد برگ و تعداد برگ زرد شده در گیاهچه، در ژنوتیپ‌های جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) ... ۷۳
شکل۳- ۸- مقایسه گیاهچه‌های جهش یافته و مادری بر اساس برخی از شاخص‌های رشد تحت تیمار خشکی (مانیتول) ۷۴
شکل۳- ۹- بیان ژن *GST1* در گیاهچه‌های مادری L*er*-0 تحت تیمار ۷۵mMمانیتول ۷۶
شکل۳- ۱۰- بیان ژن *FRY1* در گیاهچه‌های مادری L*er-0* تحت تیمار ۷۵mMمانیتول ۷۷
شکل۳- ۱۱- بیان ژن *GST1* در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* و مادری L*er*-0 تحت تیمار۷۵mM مانیتول ۷۷

چکیده فارسی

تاثیر جهش *old101* در **گیاه آرابیدوپسیس** (*Arabidopsis thaliana*) بر واکنش گیاهان به تنش خشکی

یونس میرزایی

رشد و نمو گیاهان، همواره تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد. گیاهان در سطح مولکولی با تغییر میزان بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش به تغییرات نامساعد محیطی واکنش نشان می‌دهند. محصول این ژن‌ها ممکن است در تولید هورمون‌های گیاهی از جمله ABA، SA و JA نقش داشته باشد. ژن *FRY1* ازجمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش‌های محیطی است و با کدگذاری آنزیم اینوزیتول پلی فسفات-۱-فسفاتاز در هیدرولیز مولکول اینوزیتول-۱، ٤ ، ٥-سه فسفات (IP_3) نقش دارد. در اگزون شماره ۲ ژن *FRY1* یک جهش نقطه‌ای تحت عنوان *old101* باعث جایگزینی نوکلئوتید G با A شده است. جوانه‌زنی بذور جهش یافته (*old101*) و مادری (L*er*-0) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ABA و سطوح مختلف NaCl مورد بررسی قرار گرفت. میزان جوانه‌زنی بذور جهش یافته (*old101*) تحت تنش شوری و ABA در مقایسه با بذور مادری (L*er*-0) بطور معنی‌داری کاهش یافت. برخی از شاخص‌های رشد در گیاهچه‌های *old101* و مادری (L*er*-0) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف NaCl و مانیتول در محیط غذایی 1/2MS بررسی شد. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار برخی از صفات مورد بررسی در گیاهچه‌های جهش یافته *old101* است. همچنین میزان بیان ژن‌های *FRY1*و *GST1* در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تنش خشکی اندازه‌گیری شد. که مطابق نتایج بدست آمده میزان بیان ژن *GST1* و *FRY1* در گیاهچه‌های جهش یافته بیشتر بود. احتمالاً افزایش IP3 و ABA در دوره جوانه‌زنی بذور جهش یافته موجب کاهش جوانه زنی آن‌ها شده است علاوه بر این احتمالا تغییر فعالیت پروتئین FRY1 در اثر جهش *old101* باعث اختلال در فرایند انتقال پیام در سلول شده و موجب افزایش حساسیت گیاهچه‌های جهش یافته *old101* و افزایش بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش در این گیاهچه‌ها شده است.

کلید واژه: *old101*، تنش شوری، *ABA*، *FRY1*، آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*).

چکیده انگلیسی

Effect of *Old101* Mutation on plant response to drought stress in ***Arabidopsis thaliana***

Younes Mirzaee

Plant growth and development, always is influenced by biotic and abiotic stresses. Plants at the molecular level react to adverse environmental changes by altering the expression of stres-responsive genes. The products of these genes may be involved in the production of plant hormones including ABA, JA and SA. *FRY1* is a stress-responsive gene encoding inositol poly-phosphate-1-phosphatase which is involved in the hydrolysis of IP_3. An EMS-induced point mutation in *FRY1* gene changed G into A in exon 2 and called *old101*. A seed germination assay has been done on (*old101*) and wild type (L*er*-0) seeds under different concentrations of NaCl and ABA. Mutant seeds (*old101*) under salinity stress and ABA germinated significantly slower when compared with wild type seeds (L*er*-0). Some of the plant growth indexes were investigated in mutant and wild type seedlings under NaCl and mannitol-induced drought stress. A significant reduction has been recorded in several growth indexes of *old101* seedlings. The gene expression levels of *FRY1* and *GST1* were compared in mutant and wild type seedlings under mannitol-induced drought stress. A significant increase in *FRY1* and *GST1* expression levels has been detected in wild type plants under mannitol-induced drought stress. Moreover, a singnificant increase in GST1 expression was detected in *old101* seedlings under mannitol-induced drought stress when compared with the wild type seedlings. Likely, increase in ABA and IP_3 levels in *old101* seedlings delayed the seed germination in mutant seedlings. In addition to possibly changing the activity of FRY1 protein, mutation causes disruption of the cells message transmission process and increases the sensitivity of mutant seedlings and increased expression of stress-responsive genes in the *old101* seedling.

Key words: *old101*, salt stress, ABA, *FRY1*, *Arabidopsis thaliana*

مقدمه

گیاهان طی روند تکاملی خود در واکنش به محیط زنده و غیر زنده از موجودات اولیه (تک سلولی) پدید آمده‌اند [Jiang kang zho, 2002]. در این فرایند دسترسی یا عدم دسترسی به آب از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده است. کمبود آب بر روند رشد و توسعه گیاهان تاثیر اساسی داشته و در بسیاری از مناطق دنیا عامل اصلی کاهش تولید گیاهان است [Jiang kang zho, 2002]. مهمترین عامل مؤثر بر سازگاری گیاهان در مواجه با شرایط نامساعد محیطی تغییرات ژنتیکی بوده است که دراین امر ژن‌های فراوانی موثر هستند [Neuwald and Krishnan, 1992]. ازجمله ژن‌های واکنش‌گر به تنش[۱] در گیاهان: *ADH*[۲]، *HSP70*[۳]، *COR47*[۴]، *RD29A*[۵] و *COR15A*[۶] می‌باشند. تحت تاثیر تنش‌های محیطی ازقبیل شوری، خشکی، سرما و ABA[۷]، بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش دچار تغییر شده و در نتیجه گیاه به عوامل محیطی واکنش نشان می‌دهد[Xiong and Ishitani 2001]. با توجه به تاثیرات جدی تنش‌های محیطی بر رشد و عملکرد گیاهان، بررسی و شناسایی واکنش گیاهان در مواجه با شرایط محیطی مختلف از جنبه مولکولی ضروری است.

بطور کلی فرایند دریافت پیام‌های محیطی و واکنش سلول گیاهی به آن شامل سه مرحله است:

۱- دریافت پیام تنش توسط غشاءسلول،

۲- انتقال پیام به هسته سلول،

۳- بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش و واکنش به تنش محیطی [Xiong and Karen 2002].

---

[1]- Stress responsive genes

[2]- Alchol Dehydrogenase

[3]- Heat shock proteins 70

[4]- Cold regulated 47

[5]- Regulating Dehydration-responsive gene 29

[6]- Cold regulated 15A

[7]- Abscisic Acid

پس از دریافت پیام به وسیله غشاء سلول مولکول‌هایی تحت عنوان پیامبر ثانویه تولید می‌شود که باعث انتقال پیام به هسته سلول شده و در نتیجه باعث تغییر بیان ژن‌های واکنش‌گر به تنش می گردد [Xiong and Karen 2002]. ازجمله مولکول-های پیامبر ثانویه IP_3[8] (اینوزیتول ۱و ۴و ۵ سه فسفات) است. مقدار IP_3 تحت تنش‌های محیطی مختلف تغییر می‌کند. مقدار IP_3 باعث آزادسازی کلسیم از منابع درون سلولی شده و بدنبال آن بیان ژن‌ها ی واکنش‌گر به تنش تغییر می‌کند [2002 Xiong and Karen]. یک آنزیم موثر درتنظیم مقدار IP_3 سلول، اینوزیتول پلی فسفات ۱-فسفاتاز است. این آنزیم درگیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به وسیله ژن *FRY1* کدگذاری می‌شود [Xiong and Karen 2002]. ژن *FRY1* (*At5g63980*) بطول ۲۱۲۱ جفت‌باز شامل ۷ اگزون بوده و درانتهای بازوی کوچک کروموزم شماره ۵ آرابیدوپسیس قرار دارد [Quintero et al., 1996]. در ژن *FRY1* جهش‌های متعددی گزارش شده است، از جمله می‌توان به *fry1-1*، *fry1-2*، *fry1-6* اشاره کرد [Xiong and Karen, 2002]. جهش نقطه‌ای *old101* دراگزون شماره ۲ ژن *FRY1* رخ داده و باعث جایگزینی نوکلئوتید G با نوکلئوتید A شده است، تحت تاثیر این جهش درپروتئین کد شده اسیدآمینه آسپارتیک اسید (Asp) با اسیدآمینه آسپاراژین (Asn) جایگزین شده است [Shirzadian-khoramabad et al., 2008] . در این پژوهش تاثیر جهش *old101* بر میزان جوانه زنی بذور آرابیدوپسیس در واکنش به هورمون ABA و تنش شوری، میزان رشد و توسعه گیاهچه‌های جهش یافته *old101* تحت تنش‌های شوری و خشکی القا شده توسط مانیتول در مقایسه با ژنوتیپ مادری L*er*-0 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان بیان برخی از ژن‌های واکنش‌گر به تنش در گیاهچه‌های جهش یافته و مادری تحت تنش خشکی (القاء شده به وسیله مانیتول) مورد مطالعه قرار گرفت.

[8] - Inositol-1,4,5-tris Phosphate.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱- ۱- آرابیدوپسیس

آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) یک گیاه کوچک، یکساله، روز بلند، بطول۱۰- ۴۰ سانتی‌متر بوده و از خانواده خردل (*Brassicacea*) می باشد [Francois et al., 2008] (شکل ۱-۱). این گیاه بومی مناطق اورآسیا شناخته شده [Al-Shehbaz and O'Kane Jr, 2002] و در حال حاضر به عنوان یک علف هرز درآمریکای شمالی، اروپا و استرالیا یافت می‌شود [Jørgensen and Mauricio, 2004; Alonso-Blanco and. Koornneef, 2000]. خاک مناسب رشد این گیاه خاک لومی و ماسه‌ای بوده و محل رشد آن در مناطقی شامل ساحل رودخانه، کنار جاده‌ها، شیب‌های سنگلاخ، مناطق بایر و اراضی کشاورزی است. ارتفاع خاستگاه این گیاه از سطح دریا بطور متوسط ۴۲۵۰ متر می‌باشد [Hoffmann, 2002]. دوره زندگی این گیاه طی ۵۰ روز کامل شده و تولید بذر می کند. طول دوره زندگی کوتاه ، تولید بذر فراوان، خودگشن بودن، ژنوم کوچک (۲۵۴۹۸ ژن)، قابلیت ترانسفرماسیون و امکان ایجاد جهش‌های متعدد باعث انتخاب آرابیدوپسیس به عنوان یک موجود ایده‌آل برای مطالعات آزمایشگاهی شده است [Francois et al., 2008]. این گیاه از نظر ژنتیکی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته و دارای جهش یافته‌های فراوان با تنوع ژنتیکی گسترده است، ژنوم آرابیدوپسیس کوچک بوده و 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 et al.,1998].

شکل۱- ۱- گیاه آرابیدوپسیس

گیاه ۴۵ روزه *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta*

۱-۲- تنش

تعریف تنش از دیدگاه بیولوژیکی دشوار است، اما اغلب بعنوان عاملی شناخته می‌شود که مانع پدید آمدن یک سیستم بیولوژیکی کارآمد است[Kiyoharu and Ryozo, 2002]. رشد و تولید گیاهان تحت تاثیر تنش‌های محیطی شامل تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. تنش‌های غیر زیستی (خشکی، شوری، سرما، گرما، فلزات سنگین) عامل اصلی تهدید کننده رشد گیاهان و کشاورزی پایدار است که سالانه بطور متوسط باعث کاهش بیش از ۵۰٪ تولید غلات در دنیا می‌شود [Bray et al., 2000; Mahajan and Tuteja, 2005].

۱-۲-۱- انواع تنش

۱-۲-۱-۱- سرما

انواع گیاهان جهت رشد و تمایز مناسب نیازمند شرایط دمایی خاص خود می‌باشند. بسیاری از گیاهان به ویژه گیاهان مناطق گرمسیری در معرض سرما دچار خسارت می‌شوند [Lynch, 1990]. در واکنش به تنش سرمایی نشانه‌های فنوتیپی مختلفی بروز می‌کند که از جمله می‌توان به: کاهش سطح برگ، پژمردگی، کلروز (زردی برگ) و در بیشتر موارد نکروزه شدن بافت (مرگ بافت) اشاره کرد [Mahajan and Tuteja, 2005]. غشاء سلول گیاهی واجد دو نوع اسید چرب شامل اسیدهای چرب اشباء و غیر اشباء است. اسیدهای چرب اشباء در دمای معمولی به حالت جامد بوده و اسیدهای چرب غیر اشباء به صورت مایع هستند. مقدار اسیدهای چرب غیر اشباء موجود در ساختار غشاء تعیین کننده میزان سیالیت غشاء است [Steponkus et al., 1993]. دمایی که غشاء از حالت نیمه سیال به حالت کریستالی تغییر فاز می یابد را دمای گذار گویند. نسبت اسیدهای چرب اشباء در غشاء سلول گیاهان حساس به سرما بالا بوده و بنابراین دمای گذار (انتقال) آنها نیز بالا است اما گیاهان مقاوم به سرما دارای نسبت بالای اسیدهای چرب غیراشباء در غشاء سلول خود می‌باشند و بنابراین دمای انتقال آنها نیز پایین بوده و نسبت به سرما مقاوم هستند [Mahajan and Tuteja, 2005].

۱-۲-۱-۲- شوری

روند افزایش شوری در زمین‌های زراعی بسیار نگران کننده است و با روند کنونی در ۲۵ سال آینده به میزان ۳۰٪ و تا نیمه‌ی قرن ۲۱ حدود۵۰٪ از زمین‌های زراعی غیر قابل کشت خواهد شد [Wang et al., 2003]. میزان تبخیر آب و رسوب نمک بعنوان عوامل تعیین‌کننده شوری خاک محسوب می‌شوند. غلظت بالای نمک در خاک موجب تخریب ساختمان خاک شده و باعث کاهش تخلخل، تهویه و نفوذپذیری خاک می‌شود. شوری بالا همچنین با کاهش پتانسیل اسمزی آب درخاک همراه است لذا افزایش شوری باعث اختلال در فرایند جذب آب توسط ریشه گیاه می‌گردد، بنابراین شوری باعث ایجاد نوعی خشکی فیزیولوژیکی در گیاه می‌شود [Mahajan and Tuteja, 2005]. تنش شوری باعث کاهش آب سلول می‌شود. جهت جلوگیری از این پدیده و محافظت از پروتئین‌های سلولی، غلظت نمک‌های محلول در سلول تحت عنوان نمک‌های سازگارکننده افزایش می‌یابد [Ford, 1984; Breesan et al 1998]. تجمع این مواد در درون سلول باعث

کاهش پتانسیل اسمزی سلول شده و درنتیجه مانع خروج آب از سلول می‌گردد [Mahajan and Tuteja, 2005]. ازجمله متابولیت‌های اسمولیتی مهم قندهایی شامل فروکتوز و ساکارز، قندهای الکلی و قندهای مرکب شامل ترهالوز و فروکتان است. علاوه براین متابولیت‌های باردار شامل گلیسین، بتائین، پرولین و اکتوئین نیز مؤثر هستند [Delauney and Verma, 1993; McCue, 1990] .

۱-۲-۱-۳- خشکی

گیاهان طی روند تکامل همواره تحت تاثیر عوامل نامساعد محیطی قرار داشته و یکی از مهمترین عوامل تاثیر گذار بر رشد و تکامل گیاهان دسترسی یا عدم دسترسی به آب بوده است [Zho, 2002]. خشکی مهمترین عامل محیطی مؤثر بر رشد و توسعه گیاهان است. در مناطقی که میزان آب در دسترس کم بوده و بارندگی درطول فصل رشد گیاه دارای نوسان است تنش خشکی بسیار مخرب است [Xiong and Zho, 2001]. آب به عنوان بستر انجام واکنش‌های بیوشیمیایی در سلول زنده بسیار ضروری است. علاوه براین فشار تورژسانس حاصل از جذب آب عامل گسترش سلول گیاهی است [Xiong and Zho 2002]. تنش خشکی توازن اسمزی سلول را مختل کرده و طیف گسترده‌ای ازواکنش‌ها در سطح مولکولی، سلولی و گیاه کامل بر می‌انگیزد. گیاهان به سه طریق نسبت به خشکی واکنش نشان می دهند:

۱-گریز، در این حالت رشد گیاه متوقف شده بزودی به گل رفته و تولید بذر می‌کند

۲- اجتناب، در این حالت با بسته شدن روزنه‌ها و کاهش رشد بخش هوایی، اتلاف آب کاهش یافته و از طریق توسعه ریشه جذب آب افزایش می‌یابد [Jones, 2007] .

۳-مقاومت یا سازگاری، که در این حالت گیاه به تنش خشکی واکنش نشان داده و مسیرهای متابولیکی مقاومت به تنش در گیاه فعال می‌شود [Wilson et al., 2009].

فرایند واکنش به تنش خشکی شامل سه مرحله است:

۱- توازن اسمزی و یونی سلول مختل شده هموستاز سلولی تغییر می‌کند.

۲- خسارات ناشی از تنش از طریق فرایند سمزدایی کنترل می‌شود.

۳-تقسیم سلولی جهت مواجه‌ی گیاه با شرایط تنش تنظیم می‌شود [Zho et al., 1997].

نخستین واکنش گیاهان به بروز تنش خشکی، بسته شدن روزنه‌ها است که جهت جلوگیری از هدر رفتن آب در گیاه رخ می‌دهد. بسته شدن روزنه‌ها ممکن است در نتیجه تبخیر مسقیم از سلول‌های نگهبان روزنه و بدون تاثیر فرایندهای متابولیکی باشد، این نوع واکنش روزنه تحت عنوان واکنش غیر فعال[9] شناخته می‌شود و حالت دیگر بسته شدن روزنه‌ها وابسته به فرایندهای متابولیکی است، به گونه‌ای که عوامل متابولیکی از طریق جابجایی یون‌های درون سلول و در نتیجه تغییر پتانسیل آب باعث بسته شدن روزنه می‌شوند. این حالت بعنوان واکنش فعال[10] شناخته می‌شود و به وسیله هورمون گیاهی آبسیسیک اسید ABA تنظیم می‌شود [Mahajan and Tuteja, 2005]. پس از بسته شدن روزنه‌ها تحت تنش خشکی، بدلیل کاهش میزان CO_2 قابل دسترس گیاه فعالیت فتوسیستم۲ کاهش می‌یابد. همچنین در نتیجه خشکی شدید، بدلیل محدودیت فعالیت آنزیم رابیسکو میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد [Bota et al., 2004; Loreto et al., 1995]. کاهش میزان CO_2 سلولی باعث احیاء مضاعف اجزاء زنجیره تنفسی شده در نتیجه الکترون به اکسیژن موجود در فتوسیستم ۱ منتقل می‌شود. این فرایند باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS[11]) شامل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود. رادیکال‌های آزاد بعنوان پیامبر ثانویه درفرایند القاء پیام ROS عمل کرده و در فعال‌سازی فرایندهای سلولی تحت‌تاثیر هورمون‌های گیاهی نقش دارند [Desikan et al., 2004]. منابع آسکوربات و گلوتاتیون بعنوان سیستم سمزدایی، در کنترل رادیکال‌های آزاد مؤثر است [Desikan et al., 2004]. گیاهان از طریق فرایند سازگاری اسمزی، با تنش خشکی مقابله می‌کنند. در این فرایند مواد محلول در فضای درون سلول افزایش یافته و در نتیجه پتانسیل اسمزی سلول نسبت به فضای اطراف کاهش می‌یابد بنابراین باعث تسهیل ورود آب به سلول شده و در نتیجه فشار تورژسانس درسلول‌ها افزایش می‌یابد.

---

[9] - Hydropassive

[10] - Hydroactive

[11] - Reactive Oxygen Species

طی فرایند سازگاری اسمزی در سلول ترکیبات فراوانی سنتز می‌شوند، این مواد درحفظ توازن اسمزی و همچنین حفاظت غشاء و ماکرومولکول‌های موجود در سلول نقش حیاتی دارند. از جمله این ترکیبات می‌توان به پرولین، گلوتامات، گلیسین، بتائین، مانیتول، سوربیتول، فروکتان‌ها، پلی‌یول‌ها، ترهالوز، ساکارز، الیگوساکاریدها و یون‌های غیر آلی مانند K^+ اشاره کرد. این ترکیبات باعث حفظ آب سلول شده و از دهیدراسیون سلول جلوگیری می‌کنند [Hoekstra et al., 2001; Ramanjulu and Bartels, 2002].

۱-۲-۱-۴- ABA بعنوان هورمون تنش

تحت تنش‌های غیر زیستی مقدار ABA در سلول گیاهی افزایش می‌یابد [Gazzarrini and McCourt, 2001; Spollen et al., 2000]. تحت تنش‌های محیطی میزان بیان ژن‌های مؤثر در سنتز ABA افزایش یافته و در نتیجه سنتز این هورمون در بافت گیاه بیشتر می‌شود (شکل۱-۲) [Xiong et al., 2002]. ABA در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر نمو جنینی، خواب بذر، تعرق از سطح برگ و مقاومت به تنش دخیل است [Schwartz et al., 1997; Leung and Giraudat, 1998] (شکل ۱-۳). تحت شرایط نرمال مقدار ABA در سلول‌های گیاهان بسیار پایین است، اما در مراحل پایانی نمو جنین و تحت تنش‌های محیطی شامل خشکی و شوری مقدار این هورمون در گیاه بطور چشمگیری افزایش می‌یابد. تحت تاثیر تنش‌های محیطی میزان بیان ژن‌های مؤثر در مسیر سنتز ABA دچار تغییر شده و بنابراین میزان سنتز ABA دچار تغییر می‌شود. ABA و تنش‌های محیطی باعث افزایش میزان IP_3 و کلسیم و در نتیجه فعال‌سازی بسیاری از ژن‌های واکنش‌گر به تنش می‌شود که این ژن‌ها در فرایند سازگاری گیاه با تنش محیطی دارای نقش حیاتی می‌باشند [Zho et al., 1997] .