بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرّس

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری رشته: علوم گیاهی گرایش: فیزیولوژی گیاهی

عنوان رساله:

ارزیابی اثرات فیزیولوژیک و تجزیه پروتئوم دو ژنوتیپ برنج تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی منتخب در شرایط تنش دمای پایین

نام دانشجو:

احمد آقایی

استاد راهنما(اصلی):

دکتر حسن زارع مایوان

استاد راهنما(دوم):

دکتر فواد مرادی

استاد مشاور(اول):

دکتر فاطمه زرین کمر

استاد مشاور(دوم):

دکتر قاسم حسینی سالکده

شهریور ماه ۱۳۹۰

تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوارم
به پاس راهی که فرارویم نهادند و با فداکاریها و راهنمایی‌های ارزندهٔ خود، پیمودن این مسیر را میسر نمودند.

و

تقدیم به برادران و خواهران گرامیم
که وجودشان مایهٔ عزت و سرافرازیم می‌باشد.

تقدیر و تشکر:

حمد و سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که بر این بندهٔ حقیر منت نهاد تا دوره‌ای دیگر از دوران تحصیل علم و کمال را با نتیجهٔ مطلوب و رضایت‌بخش به سرانجام برساند.

در اینجا بر خود واجب می‌دانم مراتب قدردانی خود را نسبت به اساتید ارجمندی که افتخار دانشجویی‌شان و دوستان عزیزی که افتخار آشنایی‌شان را داشته‌ام، ابراز دارم.

از جناب آقایان دکتر حسن زارع مایوان و دکتر فواد مرادی که راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند و از محضر ایشان بهره‌های فراوان بردم، کمال تشکر را دارم.

از اساتید مشاور محترم جناب آقای دکتر قاسم حسینی سالکده و سرکار خانم دکتر فاطمه زرین کمر نیز سپاسگزارم. همچنین از سرکار خانم دکتر فائزه قناتی و جناب آقایان دکتر محمود خسروشاهلی، دکتر سید یحیی صالحی و دکتر شاهرخ کاظم‌پور اوصالو که زحمت مطالعهٔ رساله را متقبل شدند و در جلسهٔ دفاع شرکت کردند سپاسگزارم.

از مسئول محترم آزمایشگاه علوم گیاهی سرکار خانم خرمی‌شاد به خاطر همکاری‌های صمیمانهٔ ایشان در طول دوره تحصیل کمال تشکر را دارم. همچنین از کلیهٔ دوستان گرامی در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و دانشگاه تربیت مدرس که در طول این دوره از کمک‌هایشان بهره بردم، صمیمانه سپاسگزارم.

چکیده

آسیب ناشی از دمای پایین یکی از مشکلات متداول کشت زودهنگام برنج در فصل بهار در کشورهای تولیدکننده برنج می‌باشد که تولیدات این گیاه زراعی بسیار مهم را به شدت تحت تأثیر قرار داده و هر ساله خسارتهای فراوانی به کشاورزان وارد می‌کند. امروزه کاهش اثرات تنش دمای پایین به روشهای مختلف مورد توجه محققان بوده و بر همین اساس استفاده از پیش تیمار هورمون‌های گیاهی قبل از بروز دمای پایین در گیاهان به عنوان یکی از رویکردهای موفق و در عین حال سازگار با محیط زیست مطرح می‌باشد. به همین منظور در این تحقیق اثرات پیش تیمار دو هورمون گیاهی اسید آبسیزیک (ABA) و ایندول-۳- استیک اسید (IAA) در سه غلظت صفر (شاهد)، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در کاهش آسیب‌های ناشی از دمای پایین در مرحله گیاهچه‌ای رشد برنج مورد بررسی قرار گرفته است. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده گلخانه و فیتوترون انجام شد. گیاهان ۱۲ ساعت پس از اعمال پیش تیمار هورمونی به شرایط دمای پایین منتقل شده و به مدت دو هفته در دمای ۱۵/۱۰°C فیتوترون نگهداری شدند. نتایج حاصل از بررسی صفات فیزیولوژی نشان داد که هورمون ABA در غلظت ۱۰۰µM و IAA در غلظت ۲۰۰µM تأثیر بهتری در کاهش آسیب‌های ناشی از سرما در گیاه برنج دارا می‌باشند. به منظور بررسی بیشتر، پروفایل پروتئینی گیاهان پیش تیمار شده با غلظت ۲۰۰µM هورمون IAA در دمای پایین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعات پروتئومیکس نشان داد که پروتئینهای تغییر بیان یافته عمدتاً در فرآیند فتوسنتز، متابولیسم انرژی، پروتئین‌سازی و حفظ ساختار پروتئینها، واکنشهای دفاعی و متابولیسم قندها دخالت دارند. همچنین تغییرات میکرومورفولوژی سطح برگ گیاهان و ساختار آناتومی برگ و ریشه دو ژنوتیپ مذکور در دمای پایین مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژی- آناتومی نشان داد که ضخامت برگ، اندازه سلولهای بادکنکی، مساحت بافت آئرانشیم، مساحت بافتهای آوندی چوب و آبکش در آخرین برگ توسعه‌یافته و مساحت بافتهای آئرانشیم و چوب پسین ریشه ژنوتیپ حساس هویزه در اثر دمای پایین به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد. بسته بودن روزنه‌ها و کاهش تعداد پاپیل‌ها در سطح برگ ژنوتیپ هویزه نیز از جمله تغییرات بارز مشاهده شده در تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM بود.

کلمات کلیدی: برنج، دمای پایین، تنش سرما، اسید آبسیزیک، ایندول-۳- استیک اسید، تحمل به سرما

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست علایم و نشانه‌ها ..... ه

فهرست جدول‌ها ..... و

فهرست شکل‌ها ..... ح

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- پیشگفتار ۲

۱-۲- اهداف تحقیق ۵

فصل دوم: مروری بر منابع ۶

۲-۱- گیاه‌شناسی برنج ۷

۲-۲- اهمیت گیاه برنج در تحقیقات زیست‌شناسی گیاهی ۸

۲-۳- وضعیت کشت و تولید برنج در ایران ۹

۲-۴- اثر تنش سرما بر فرآیند فتوسنتز در گیاهان ۹

۲-۴-۱- مفهوم فلورسانس کلروفیل ۱۱

۲-۵- اثر تنش سرما در ایجاد آسیب اکسیداتیو در گیاهان ۱۲

۲-۵-۱- نقش پراکسید هیدروژن در گیاهان ۱۳

۲-۶- اثر تنش سرما بر سیستمهای آنتی‌اکسیدانت در گیاهان ۱۴

۲-۶-۱- نقش آسکوربات در گیاهان ۱۶

۲-۶-۲- نقش آنزیم کاتالاز در گیاهان ۱۷

۲-۶-۳- نقش آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان ۱۸

۲-۶-۴- نقش آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان ۱۸

۲-۶-۵- نقش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان ۱۹

۲-۷- نقش هورمون اسید آبسیزیک در گیاهان تحت شرایط تنش سرما ۱۹
۲-۸- نقش هورمون اکسین در گیاهان ۲۰
۲-۹- نقش قندها در گیاهان ۲۲
۲-۱۰- اثر تنش سرما بر تنظیم اسمزی در گیاهان ۲۳
۲-۱۱- نقش پرولین در گیاهان ۲۳
۲-۱۲- آناتومی برگ گیاه برنج ۲۴
۲-۱۳- آناتومی ریشه گیاه برنج ۲۵
۲-۱۴- ساختارهای اپیدرمی برگ گیاه برنج ۲۵
۲-۱۵- اثر تنش سرما بر پروفایل پروتئینی گیاهان ۲۸

فصل سوم: مواد و روشها ۳۰

۳-۱- معرفی ژنوتیپ‌های گیاه برنج مورد بررسی و علت انتخاب آنها ۳۱
۳-۲- نحوه اجرای آزمایش و شرایط کشت گیاهان ۳۲
۳-۳- نحوه اعمال تیمارهای هورمونی روی گیاهان ۳۳
۳-۴- اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه ۳۵
۳-۵- اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای ۳۵
۳-۶- برآورد محتوای نسبی کلروفیل برگ ۳۵
۳-۷- اندازه‌گیری پارامتر Fv/Fm ۳۵
۳-۸- اندازه‌گیری غلظت کلروفیل کل ۳۶
۳-۹- اندازه‌گیری غلظت پرولین ۳۶
۳-۱۰- اندازه‌گیری غلظت کربوهیدراتهای محلول کل ۳۷
۳-۱۱- اندازه‌گیری میزان نشاسته ۳۷
۳-۱۲- اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن ۳۸
۳-۱۳- اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) ۳۸

۳-۱۴- اندازه‌گیری غلظت آسکوربات ۳۹
۳-۱۵- استخراج پروتئین محلول کل از نمونه‌های گیاهی ۴۰
۳-۱۶- اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول کل ۴۰
۳-۱۷- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ۴۰
۳-۱۸- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) ۴۱
۳-۱۹- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ۴۱
۳-۲۰- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ۴۱
۳-۲۱- مطالعه برشهای عرضی برگ و ریشه گیاهان برنج با استفاده از میکروسکوپ نوری ۴۲
۳-۲۲- مطالعه ساختارهای سطح اپیدرم برگ گیاهان برنج با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره۴۲
۳-۲۳- مراحل انجام آزمایشات پروتئومیکس ۴۴
۳-۲۳-۱- مرحله اول- استخراج پروتئین ۴۴
۳-۲۳-۲- مرحله دوم – الکتروفورز دو بعدی ۴۵
۳-۲۳-۳- مرحله سوم- اسکن ژل‌ها ۴۶
۳-۲۴- آنالیزهای آماری ۴۷
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۸
۴-۱- صفات فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی ۴۹
۴-۲- مطالعات مورفولوژی – آناتومی ۸۰
۴-۲-۱- مطالعات میکروسکوپ نوری (LM) ۸۰
۴-۲-۲- مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) ۹۰
۴-۳- مطالعات پروتئومیکس ۹۵
۴-۳-۱- نتایج حاصل از آنالیز ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره ۹۵
۴-۳-۲- پروتئینهای دخیل در چرخه کالوین فرآیند فتوسنتز ۱۰۰
۴-۳-۳- پروتئینهای مرتبط با زنجیره انتقال الکترون ۱۰۲

۴-۳-۴- پروتئینهای مرتبط با متابولیسم انرژی ۱۰۴
۴-۳-۵- پروتئینهای مرتبط با بیوسنتز پروتئین ۱۰۵
۴-۳-۶- پروتئینهای دخیل در حفظ فولدینگ صحیح سایر پروتئینها ۱۰۶
۴-۳-۷- پروتئینهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی ۱۰۷
۴-۳-۸- پروتئینهای مرتبط با متابولیسم قندها ۱۱۱
فهرست مراجع ۱۱۳
منابع فارسی ۱۱۳
منابع انگلیسی ۱۱۴

فهرست علایم و نشانه‌ها

عنوان	علامت اختصاری
آسکوربات پراکسیداز	APX
آلبومین سرم گاوی	BSA
اسید آبسیزیک	ABA
ایندول-۳- استیک اسید	IAA
تری کلرو استیک اسید	TCA
حداقل اختلاف معنی‌دار	LSD
دی تیو تریتول	DTT
سوپراکسید دیسموتاز	SOD
فلورسانس متغیر / فلورسانس بیشینه	Fv/Fm
کاتالاز	CAT
گایاکول پراکسیداز	GPX
میکروسکوپ الکترونی نگاره	SEM
میکروسکوپ نوری	LM
میکرومولار	µM

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- مشخصات ژنوتیپ‌های گیاه برنج مورد مطالعه. ۳۲

جدول ۴-۱- میانگین مربعات مؤلفه‌های ماده خشک اندام هوایی، ماده خشک ریشه، هدایت روزنه-ای، عدد SPAD، کلروفیل کل اندام هوایی و Fv/Fm دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۵۳

جدول ۴-۲- میانگین مربعات مؤلفه‌های پرولین اندام هوایی، پرولین ریشه، نشاسته اندام هوایی، نشاسته ریشه، قندهای محلول کل اندام هوایی و قندهای محلول کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۵۴

جدول ۴-۳- میانگین مربعات مؤلفه‌های پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اندام هوایی، H_2O_2 ریشه، مالون دی آلدئید (MDA) اندام هوایی، MDA ریشه، آسکوربات کل اندام هوایی و آسکوربات کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۵۸

جدول ۴-۴- میانگین مربعات مؤلفه‌های فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اندام هوایی، پروتئین محلول کل اندام هوایی و پروتئین محلول کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۶۲

جدول ۴-۵- مقایسه میانگین صفات ماده خشک اندام هوایی، ماده خشک ریشه، هدایت روزنه‌ای، عدد SPAD، کلروفیل کل اندام هوایی و Fv/Fm دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۶۶

جدول ۴-۶- مقایسه میانگین صفات پرولین اندام هوایی، پرولین ریشه، نشاسته اندام هوایی، نشاسته ریشه، قندهای محلول کل اندام هوایی و قندهای محلول کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۶۷

جدول ۴-۷- مقایسه میانگین صفات پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اندام هوایی، H_2O_2 ریشه، مالون دی آلدئید (MDA) اندام هوایی، MDA ریشه، آسکوربات کل اندام هوایی و آسکوربات کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۶۸

جدول ۴-۸- مقایسه میانگین صفات فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اندام هوایی، پروتئین محلول کل اندام هوایی و پروتئین محلول کل ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی و هورمونی ۶۹

جدول ۴-۹- میانگین مربعات مؤلفه‌های مربوط به آناتومی برگ دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی ۸۱

جدول ۴-۱۰- مقایسه میانگین صفات مربوط به آناتومی برگ دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی ۸۲

جدول۴-۱۱- میانگین مربعات مؤلفه‌های مربوط به آناتومی ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی ۸۶

جدول ۴-۱۲- مقایسه میانگین صفات مربوط به آناتومی ریشه دو ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی ۸۷

جدول ۴-۱۳- تعداد لکه‌های پروتئینی دارای تفاوت معنی‌دار ($P < ۰/۰۱$) با در نظر گرفتن فاکتورهای مختلف در بین ژنوتیپ‌های هویزه و IRCTN34 ..... ۹۵

جدول ۴-۱۴- مشخصات پروتئینهای شناسایی شده در تحقیق حاضر ۹۸

ادامه جدول ۴-۱۴- مشخصات پروتئینهای شناسایی شده در تحقیق حاضر ۹۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- تصویر بخشهای مختلف تشکیل‌دهنده کوتیکول در گیاهان ۲۷

شکل ۳-۱- شمای نحوه آماده‌سازی ظروف کشت گیاهان برنج به روش آبکشت (هیدروپونیک) ۳۳

شکل۳- ۲- شمای نحوه اجرای آزمایش ۳۴

شکل ۳-۳- تصویری از پایه‌های فلزی مورد استفاده جهت قرار دادن نمونه‌های گیاهی ۴۳

شکل ۳-۴- تصویری از دستگاه لایه‌نشان طلا که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته است ۴۴

شکل۳-۵- تصویری از دستگاه میکروسکوپ الکترونی SEM مورد استفاده در تحقیق حاضر..... ۴۴

شکل ۴-۱- برش عرضی برگ گیاه برنج در محل رگبرگ اصلی، بافتهای آوندی چوب (زایلم، Xy) و آبکش (فلوئم، Ph) و همچنین بافت اسکلرانشیمی (Sc) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۳

شکل ۴-۲- برش عرضی برگ گیاه برنج در محل رگبرگ اصلی، بافتهای آوندی چوب (زایلم، Xy) و آبکش (فلوئم، Ph) و همچنین بافت اسکلرانشیمی (Sc) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ متحمل به سرمای IRCTN34 در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۳

شکل ۴-۳- برش عرضی برگ گیاه برنج، بافتهای مزوفیل (M) و سلولهای بادکنکی (بولیفورم، Bu) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۴

شکل ۴-۴- برش عرضی برگ گیاه برنج، بافتهای مزوفیل (M) و سلولهای بادکنکی (بولیفورم، Bu) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ متحمل به سرمای IRCTN34 در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۴

شکل ۴-۵- برش عرضی ریشه گیاه برنج، بافتهای آئرانشیم (Ae) و آوندهای چوب پسین (MX) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۸

شکل ۴-۶- برش عرضی ریشه گیاه برنج، بافتهای آئرانشیم (Ae) و آوندهای چوب پسین (MX) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ متحمل به سرمای IRCTN34 در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۸

شکل ۴-۷- برش عرضی ریشه گیاه برنج، لایه‌های هیپودرم (Hy) و اسکلرانشیمی (Sc) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۹

شکل ۴-۸- برش عرضی ریشه گیاه برنج، لایه‌های هیپودرم (Hy) و اسکلرانشیمی (Sc) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ متحمل به سرمای IRCTN34 در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند ۸۹

شکل ۴-۹- تصاویر گرفته شده از سطح رویی برگ (adaxial surface) برنج با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، روزنه (S) و پاپیل‌ها (Pa) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند. ۹۰

شکل ۴-۱۰- تصاویر گرفته شده از سطح رویی برگ (adaxial surface) برنج با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، روزنه (S) و پاپیل‌ها (Pa) به منظور نشان دادن تغییرات ایجاد شده در اثر تنش سرما در گیاهچه‌های متحمل به سرمای IRCTN34 در شرایط دمایی شاهد (A) و تیمار سرما (B) در شکل مشخص شده‌اند. ۹۱

شکل ۴-۱۱- لکه‌های پروتئینی شناسایی شده در تحقیق حاضر در یکی از ژل‌ها به عنوان نمونه نشان داده شده است (ژل رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره در نمونه شاهد گیاه هویزه). ۹۶

شکل ۴-۱۲- دیاگرام مربوط به توزیع ۲۲ پروتئین شناسایی شده در گروه‌های مختلف بر اساس عملکرد آنها ۹۷

شکل ۴-۱۳- واکنشهای مختلف چرخه کالوین. این شکل به منظور مشخص کردن واکنشهای انجام شده توسط آنزیمهای RuBisCO، PGK، SBPase و PRKase ارائه شده است که در این تحقیق بیان پروتئینهای مربوط به آنها مطالعه شده است ۱۰۲

شکل ۴-۱۴- نقش FNR در مسیر انتقال الکترون کلروپلاستی. A: انتقال الکترون خطی یا زنجیری و B: انتقال الکترون چرخه‌ای را نشان می‌دهد. FNR به دو شکل محلول و متصل به غشاءهای تیلاکوئیدی وجود دارد. ۱۰۳

شکل ۴-۱۵- نقشهای مختلف آنزیم GST در گیاهان ۱۰۸

شکل۴-۱۶- نقش آنزیم DHAR در گیاهان ۱۰۹

شکل ۴-۱۷- مسیر بیوسنتزی آسکوربات با واسطه GDP- مانوز و L- گالاکتوز در گیاهان. آنزیم GDP- مانوز-۳،۵- اپیمراز (e) پروتئینی است که در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار گرفته است.....۱۱۰

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پیشگفتار

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی در دنیا می‌باشد و با توجه به اینکه محصول این گیاه در سبد غذایی افزون بر نیمی از جمعیت جهان قرار دارد، تولید پایدار آن برای تأمین امنیت غذایی مردم حیاتی است. در سال ۲۰۱۰ میلادی در حدود ۶۰۳ میلیون تن شلتوک برنج در سراسر جهان تولید شده است که قسمت اعظم آن (در حدود ۵۸۳ میلیون تن) توسط کشورهای آسیایی بوده است. آمارها نشان می‌دهند که نزدیک به ۹۰٪ از تولید و مصرف برنج به کشورهای آسیایی مربوط می‌شود. برنج قریب به ۲۷٪ از انرژی مورد نیاز مردم جهان و ۲۰٪ پروتئین رژیم غذایی آنها را تأمین می-کند (**Feizabadi, 2011**). از دهه ۱۹۶۰ میلادی تا به امروز جمعیت دنیا تقریباً دو برابر شده و به بیش از ۶/۵ میلیارد نفر رسیده است. این افزایش سریع جمعیت جهان در کنار کاهش چشمگیر سطح زیر کشت گیاهان زراعی از جمله برنج موجب ایجاد نگرانی در بروز بحران غذایی شده است. تخمین‌ها نشان می-دهند که تا سال ۲۰۵۰ میلادی جمعیت جهان به حدود ۸/۹ میلیارد نفر خواهد رسید و برای تأمین غذای این تعداد، تولیدات گیاهان زراعی بایستی حدوداً ۵۰٪ افزایش یابد (**Sakamoto, 2006**). کشور ایران یکی از واردکنندگان بزرگ برنج در دنیا تلقی می‌شود که علت آن را می‌توان به عدم تناسب بین آهنگ رشد جمعیت و تولید برنج در داخل و افزایش تقاضای مردم برای تهیه این محصول نسبت داد (**Feizabadi, 2011**).

بسیاری از کشورهای تولیدکننده برنج با تنشهای ناشی از پدیده تغییر اقلیم (climate change) نظیر خشکی و دمای پایین (low-temperature stress) مواجه هستند و به همین دلیل مقدار زیادی از تولیدات برنج خود را از دست می‌دهند. کاهش عملکرد برنج در اثر تنش سرما (chilling stress) یک مشکل و مسئله جهانی است (منظور دماهای بالاتر از صفر درجه سانتیگراد و پایین‌تر از ۱۵°C می‌باشد)، چون این گیاه زراعی نسبت به دماهای پایین بسیار حساس می‌باشد (**Sharifi and Aminpanah, 2010**). منشأ این گیاه حساس به سرما، به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری برمی‌گردد و به همین علت در نواحی معتدله و دارای ارتفاع بالا از سطح دریا، کشت آن به شدت تحت تأثیر تنش سرما قرار گرفته و برنجکاران با کاهش چشمگیر در تولید مواجه می‌گردند. به خصوص در مراحل رشد اولیه گیاه برنج، وقوع دمای پایین موجب بروز مشکلات عمده‌ای در استقرار گیاهچه‌ها می‌شود. حتی گاهی سرما باعث جلوگیری از جوانه‌زنی بذرهای برنج شده و ظهور دانه‌رست‌ها را با مشکل مواجه می‌نماید. شرایط دمایی بهینه برای جوانه‌زنی بذرها و رشد مرحله گیاهچه‌ای در برنج مابین ۲۵°C تا ۳۵°C بوده و بروز دماهای پایین‌تر از ۱۵°C طی مراحل ذکر شده، موجب استقرار ضعیف و حتی مرگ گیاهچه‌ها می‌گردد. تنش سرما اغلب در نواحی اصلی کشت برنج در ایران (نواحی شمال ایران، شامل استانهای مازندران، گیلان و گلستان) طی فروردین ماه که زمان جوانه‌زنی بذرها و انتقال گیاهچه‌ها از خزانه به زمین اصلی می‌باشد، اتفاق می‌افتد و موجب بروز خساراتی در محصول برنج می‌شود (**Sharifi, 2010**). بررسی آمار چهل ساله هواشناسی شمال کشور ایران نشان می‌دهد که شالیزارهای این ناحیه همواره در خطر بروز تنش سرما بوده و حتی در پاره‌ای سالها دمای هوا به پایین‌تر از نقطه بحرانی تحمل برنج می‌رسد. از طرفی در استانهایی مانند خوزستان با متوسط سطح کشت برنج سالیانه بیش از پنجاه هزار هکتار که این استان را در رده پنجمین استان تولیدکننده برنج کشور قرار داده (استانهای مازندران، گیلان، گلستان، فارس و خوزستان به ترتیب رتبه‌های اول تا پنجم را از نظر سطح زیرکشت و میزان تولید شلتوک برنج در کشور به خود اختصاص داده‌اند) و مناطق جنوبی استان کهگیلویه و بویر احمد که دمای هوا در اواخر فصل زمستان چندان پایین نبوده و هوای بهار نیز مناسب برای زراعت برنج است، وجود ارقام متحمل به سرما در مرحله گیاهچه‌ای امکان دو بار کشت در سال را فراهم می‌آورد، زیرا در قسمت‌های وسیعی از

این استانها علاوه بر اینکه زمین کشاورزی عامل محدودکننده زراعت برنج نیست، وجود آب فراوان و با کیفیت مطلوب در اواخر زمستان نسبت به تاریخ کاشت مرسوم (از خرداد تا مرداد) موجب کاهش خسارت در شالیزارهای این مناطق می‌شود. این کار باعث افزایش تولید برنج در کشور شده و بر درآمد سرانه شالیکاران خواهد افزود. در حال حاضر برای مقابله با معضل سرما در مراحل اولیه رشد گیاه برنج، کشاورزان یا با به تأخیر انداختن تاریخ کاشت از سرمای اول فصل دوری می‌جویند که خود این روش سبب افزایش احتمال بروز تنش سرما در مرحله زایشی می‌شود و یا از پوشش پلاستیکی بر روی گیاهچه‌ها استفاده می‌نمایند که این رویکرد نیز احتمال بروز تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای را مرتفع نساخته و هر ساله شاهد خسارات زیادی در نواحی شمال کشور هستیم. میزان آسیب ناشی از تنش سرما متغیر بوده و تاکنون آمار دقیقی ارائه نشده است، ولی با این حال تمامی شالیزارهای کشور به نوعی با این مشکل روبرو هستند (**حسیبی و همکاران، ۱۳۸۹ و ۱۳۸۶؛ حسیبی، ۱۳۸۶**).

امروزه استراتژی‌های مختلفی برای افزایش تحمل گیاهان زراعی در برابر تنشهای غیرزیستی مختلف به کار گرفته می‌شود. از جمله این رویکردها می‌توان به تولید ارقام زراعی اصلاح ژنتیکی شده اشاره کرد. موفقیت در روشهای اصلاح نباتات به منظور ایجاد ارقام زراعی متحمل به تنشهای غیرزیستی نظیر سرما، نیازمند تحقیقات وسیع و دقیق در سطوح فیزیولوژی و ژنتیک مولکولی گیاهان می‌باشد. به کمک اینگونه مطالعات می‌توان سازوکارهای کنترل‌کننده تحمل به تنش را شناسایی نموده و بر اساس الگوی بیان ژنها و پروتئینهای مرتبط با یک تنش خاص، ارقام زراعی متحمل به آن تنش را از طریق روشهای زیست-فناوری (biotechnology) و مهندسی ژنتیک (genetic engineering) (تحت عنوان گیاهان تراریخته یا تغییریافته ژنتیکی، transgenic plants) ایجاد نمود (**Bhatnagar-Mathur and Sharma, 2008**). هم‌چنین رویکرد استفاده از تیمار گیاهان با ترکیبات شیمیایی مختلف نظیر هورمونهای گیاهی (phytohormones)، عناصر غذایی، اسیدهای آمینه و اسمولیت‌ها قبل از مواجهه گیاهان با شرایط تنش‌زا نیز امروزه به طور وسیع جهت کاهش آسیب‌های ناشی از تنشهای مختلف در گیاهان زراعی به کار گرفته می‌شود. در این بین، استفاده از ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی (plant growth regulators, PGRs) جزء روشهای موفق در بهبود تحمل گیاهان به تنشها از جمله تنش سرما به شمار می‌آید.

۱-۲- اهداف تحقیق

از اهداف مهم تحقیق حاضر می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

- افزایش تحمل به سرما در گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه با استفاده از هورمونهای گیاهی اسید آبسیزیک (abscisic acid, ABA) و ایندول-۳-استیک اسید (indole-3-acetic acid, IAA) و تعیین مؤثرترین غلظت هورمون‌های مذکور (از بین سه غلظت استفاده شده)
- تعیین سازوکارهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دخیل در ایجاد تحمل به سرما در گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه در ارتباط با هورمون‌های گیاهی ABA و IAA
- تعیین پروتئین‌های دخیل در ایجاد تحمل به سرما در گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه در ارتباط با هورمون گیاهی IAA به کمک رویکرد پروتئومیکس (proteomics)
- مقایسه اثرات سرما در سطح آناتومی برگ و ریشه (مطالعات با استفاده از میکروسکوپ نوری، light microscope, LM) و میکرومورفولوژی سطح پشتی (abaxial) و رویی (adaxial) برگ (مطالعات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره، scanning electron microscope, SEM) در گیاهچه‌های برنج مورد مطالعه
- مقایسه اثرات سرما بر روی دو ژنوتیپ برنج (ژنوتیپ حساس به سرما، chilling-sensitive, CS، تحت عنوان هویزه و ژنوتیپ متحمل به سرما، chilling tolerant, CT، تحت عنوان IRCTN34) در مرحله گیاهچه‌ای به منظور تعیین علت حساسیت و تحمل دو ژنوتیپ مذکور.