بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده تولید گیاهی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc) در رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

مطالعه الگوی بیان برخی ژن‌های درگیر در واکنش به تنش سرما در ذرت

پژوهش و نگارش:

عادل لطفی

استاد راهنما:

دکتر سعید نواب‌پور

استاد مشاور:

دکتر سیده ساناز رمضانپور

۱۳۹۱

تعهد نامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین برخی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **عادل لطفی** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی در کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

راز و رمز پویای علم و کشف معانی بدیع و تجلی جلوه های شهودی معرفت کیمیایی است که آسمان علم به برکت سیما و سیره ی نورانی **نبی مکرم صلی الله علیه و آله و سلم**، انسان در بند خاک را به معراج حضور می خواند.

و چه خرم علمی که از چشمه ی معارف سیراب شود و چه زیبا دانشی که قبای پرنیانش به عطر و بوی گلستان محمدی معطر شود و چه معماری باشکوهی، بنایی که سنگ هویت و فرهنگ آن ریشه در مدینه النبی بیابد و امروز کاخ آباد علم به سروش معنوی و مفهوم پیام او بیش از پیش محتاج راهنمایانی است که علاوه بر حفظ آبادانی آن در راه اعتلای آن به فرزندان خویش محبت نمایند.

باب علم النبی را چه راز و رمزی است و چرا نام علی بر فلک نگاشته اند. انا مدینة العلم و علی بابها، فمن اراد العلم، فلیأت الباب؛ «من شهر علم هستم و دروازه آن شهر، علی بن ابیطالب است، هر کس علم بخواهد به دروازه شهر بیاید.»

راستی که ناقابل است برای نام **علی (ع)**...

تقدیم به

پدر و مادر نازنینم به پاس تمامی زحمات بی دریغشان؛

برادران و خواهران گرانقدرم

که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب، مراتب تحصیلی و نیز این پایان نامه را به نحو احسن به اتمام برسانم.

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا بر منتهای همت خود کامران شدم.

سپاسگزاری

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد فرهیخته و فرزانه **جناب آقای دکتر سعید نواب پور** که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر نمایم. از راهنمایی های استاد مشاورم **سرکار خانم دکتر سیده سانازر مضانپور**، تقدیر و تشکر می نمایم. راهنمایی های بی دریغ ایشان باب علم بیوتکنولوژی را به رویم گشود.

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم؛ چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب به من آموختند.

چکیده

تنش سرما از مهم‌ترین عوامل محدود کننده کشت زود هنگام محصولات زراعی مانند ذرت می‌باشد. سرما از طریق تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) در گیاهان منجر به بروز تنش اکسیداتیو می‌گردد. در این مطالعه به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های درگیر در واکنش به تنش سرما (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و متالوتیونین) آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه رقم ذرت سینگل‌کراس ۲۶۰، سینگل‌کراس ۳۰۲ و دبل‌کراس ۳۷۰ انجام شد. نتایج حاصل از الگوی بیان ژن‌ها نشان داد که در بین ارقام مورد بررسی سینگل‌کراس ۲۶۰ بالاترین میزان بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و رقم سینگل‌کراس ۳۰۲ کم‌ترین میزان بیان ژن‌های مزبور را داشت. بررسی الگوی بیان ژن متالوتیونین نیز نشان داد که میزان بیان این ژن در رقم سینگل‌کراس ۲۶۰ کم‌ترین و رقم سینگل‌کراس ۳۰۲ بالاترین میزان می‌باشد. بیان بالای ژن متالوتیونین در رقم سینگل‌کراس ۳۰۲ احتمالا به دلیل بروز تنش اکسیداتیو در اثر تنش سرما، انباشته شدن پراکسید هیدروژن و بیان پایین ژن کاتالاز می‌باشد. همچنین، شاخص‌های رشد شامل درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، سطح برگ و کلروفیل a و b با میزان بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز همبستگی خوبی را نشان داد. رقم سینگل‌کراس ۲۶۰ و رقم سینگل‌کراس ۳۰۲ از لحاظ بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، سطح برگ و کلروفیل به ترتیب بیشترین و کم‌ترین میزان را داشتند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از کاهش کلروفیل و آسیب به دستگاه فتوسنتزی گیاه جلوگیری می‌نماید. با افزایش تنش، ثبات کلروفیل در گیاه کاهش می‌یابد اما در گیاهان متحمل، ثبات بیشتری در میزان کلروفیل وجود دارد.

واژگان کلیدی: تنش سرما، ذرت، بیان ژن، شاخص‌های رشد

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اوّل: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- بیان مسئله ۳

۱-۳- فرضیات تحقیق ٦

۱-٤- اهداف تحقیق ٦

فصل دوّم: بررسی منابع

۲-۱- گیاهشناسی ذرت ۸

۲-۲- اقلیم مناسب ذرت ۹

۲-۳- تنش سرما ۱۰

۲-٤- نشانه‌های خسارت سرمازدگی ۱۱

۲-۵- خسارت مستقیم سرمازدگی ۱۲

۲-٦- خسارت غیرمستقیم سرمازدگی ۱۳

۲-٦-۱- اثرات تنش سرمایی در سطح سلولی و نشت مواد محلول از غشاها ۱۳

۲-٦-۲- بازدارندگی فتوسنتزی ۱٤

۲-٦-۳- اختلال در فعالیت آنزیم‌ها ۱۵

۲-٦-٤- تجمع سموم ۱۷

۲-۷- خسارت ثانویه سرمازدگی و تنش اکسیداتیو ۱۸

۲-۸- تنش سرما و فرایندهای رشد ۱۸

۲-۸-۱- جوانه زنی ۱۸

۲-۸-۲- اثر بر فرایندهای مرحله رویشی گیاه ۱۹

۲-۹- تغییرات کلروفیل ۲۰

۲-۱۰- تشخیص سیگنال سرما و احساس دمای پایین ۲٤

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱۱- مقاومت به سرمازدگی ۲۵
۲-۱۱-۱ مقاومت در سطح سلول و فرایندهای رویشی ۲۶
۲-۱۲- تنظیم بیان ژن‌ها در پاسخ به دمای پایین ۲۹
۲-۱۲-۱- بیان ژن ۳۰
۲-۱۳- تنش سرما و اسید نوکلئیک ۳۱
۲-۱٤- تغییرات آنزیمی طی تنش سرما ۳۲
۲-۱۵- نقش آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقاومت به تنش سرما در گیاهان ۳۸
۲-۱۵-۱- تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۳۸
۲-۱۵-۲- تغییرات آنزیم کاتالاز ٤۰
۲-۱٦- متالوتیونین ٤۱
۲-۱۷- روش‌های ارزیابی بیان ژن‌ها ٤۳
۲-۱۷-۱- واکنش چرخه‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ٤٤
۲-۱۷-۲- تئوری واکنش چرخه‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ٤۵
۲-۱۸- رنگ‌های متصل شونده به DNA دو رشته‌ای ٤٦

فصل سوّم: مواد و روش‌ها

۳-۱- روش کاشت و اعمال تنش سرما ٤۸
۳-۲- نمونه‌برداری برای صفات مورفولوژیکی ٤۸
۳-۳- اندازه‌گیری کلروفیل ٤۸
۳-٤- نمونه‌برداری جهت استخراج RNA ٤۹
۳-۵- کوبیدن نمونه‌های برگی ٤۹
۳-٦- استخراج RNA ۵۰
۳-٦-۱- تعیین کمیت و کیفیت RNA ۵۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۷- آزمایش اندازه‌گیری کمّی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ۵۱
۳-۷-۱- تیمار DNase ۵۱
۳-۷-۲- ساخت cDNA ۵۲
۳-۷-۳- PCR استاندارد جهت تأیید ساخت cDNA ۵۲
۳-۷-٤- طراحی آغازگرها ۵۳
۳-۷-۵- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده ۵۵
۳-۷-٦- بهینه سازی شرایط واکنش Real-Time PCR ۵۵
۳-۷-۷- چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در زمان واقعی ٥٦
۳-۷-۸- نرمال سازی داده‌ها ۵۷
۳-۷-۹- کنترل کارایی واکنش ۵۸
۳-۸- تجزیه داده‌ها ۵۸
۳-۸-۱- تجزیه داده‌های صفات مورفولوژیکی ۵۸
۳-۸-۲- داده‌های مولکولی ۵۸

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- نتایج بررسی صفات مورفولوژیک ٦۲
٤-۱-۱- درصد جوانه‌زنی ٦۲
٤-۱-۲- سرعت جوانه‌زنی ٦٤
٤-۱-۳- کلروفیل a ٦٦
٤-۱-٤- کلروفیل b ٦۷
٤-۱-۵- سطح برگ ٦۹
٤-۲- نتایج حاصل از ارزیابی‌های مولکولی ۷۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٢-١- نتایج حاصل از ارزیابی الگوی تظاهر ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD).....٧٢
٤-٢-٢- نتایج حاصل از ارزیابی الگوی تظاهر ژن کاتالاز.....٧٤
٤-٢-٣- نتایج حاصل از ارزیابی الگوی تظاهر ژن متالوتیونین.....٧٧
٤-٣- نتایج حاصل از بررسی روند میان بیان ژن‌های دفاعی و شاخص‌های فیزیولوژیک ٨١
٤-٣-١- نتایج بررسی روند میان بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز با درصد جوانه‌زنی.....٨١
٤-٣-٢- نتایج بررسی روند میان بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز با سرعت جوانه‌زنی ٨٣
٤-٣-٣- نتایج بررسی روند میان بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز با کلروفیل a وb.....٨٤
٤-٣-٤- نتایج بررسی روند میان بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز با سطح برگ ٨٧
٤-٤- نتیجه‌گیری کلی.....٩٠
٤-٥- پیشنهادات.....٩٣
فهرست منابع ٩٦

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱) ساختار کلروفیل a و b ۲۱
شکل ۲-۲) توازن رداکس در سلول مستلزم تولید و از بین بردن ROSها است ۳٤
شکل۲-۳) نحوه تنظیم، حذف و اثرات سلولی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳٦
شکل ۲-٤) منحنی پاسخ واکنش چرخه‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ٤٦
شکل ۳-۱) آغازگرهای*ZmCAT2* و *ZmSOD3* درcDNAهای ارقام سینگل کراس ۲٦۰،۳۰۲ و دبل کراس ۳۷۰ روی ژل آگارز یک درصد ۵۵
شکل۳-۲) منحنی تکثیر ژن خانه‌دار GAPDH در تیمارهای مختلف آزمایشی ۵۷
شکل۳-۳) منحنی رگرسیونی استاندارد رسم شده بر اساس لگاریتم سری‌های رقت و Ct (حد آستانه) بدست آمده از دستگاه برای ژن خانه دار ۵۹
شکل ٤-۱-۱-الف) تغییرات درصد جوانه‌زنی در ارقام مورد بررسی ٦۲
شکل ٤-۱-۱-ب) تغییرات درصد جوانه‌زنی در تیمارهای دمایی مورد نظر ٦۳
شکل ٤-۱-۲) تغییرات سرعت جوانه‌زنی ٦۵
شکل ٤-۱-۳-الف) تغییرات کلروفیل a ٦٦
شکل ٤-۱-۳-ب) تیمار دمایی ۹ درجه سانتیگراد ٦۷
شکل٤-۱-٤) تغییرات میزان کلروفیل b ٦۸
شکل ٤-۱-۵) تغییرات سطح برگ ۷۰
شکل ٤-۲) نمونه تصاویر باندهای تشکیل شده مربوط به استخراج RNA ۷۱
شکل ٤-۲-۱) روند تغییرات بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در سه رقم مورد بررسی ۷۳
شکل ٤-۲-۲) روند تغییرات بیان ژن کاتالاز در سه رقم مورد بررسی ۷۵
شکل ٤-۲-۳) روند تغییرات بیان ژن متالوتیونین در سه رقم مورد بررسی ۷۸
شکل ٤-۳-۱) مطالعه روند تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به درصد جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف دمایی در ارقام مورد بررسی ۸۱
شکل ٤-۳-۲) مطالعه روند تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف دمایی در ارقام مورد بررسی ۸۳
شکل ٤-۳-۳) مطالعه روند تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به کلروفیل a و b در تیمارهای مختلف دمایی در ارقام مورد بررسی ۸۵
شکل ٤-۳-٤) مطالعه روند تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به سطح برگ در تیمارهای مختلف دمایی در ارقام مورد بررسی ۸۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱) نحوه تشکیل انواع اکسیژن فعال ۳۳
جدول ۳-۱) پروفیل حرارتی PCR ۵۳
جدول ۳-۲) مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش QRT-PCR ٥٤
جدول ۳-۳) شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر ٥٦
جدول ۳-٤) چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۵۷
جدول ٤-۱) تجزیه واریانس صفات مورد بررسی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی ٦٤
جدول ٤-۲) بررسی همبستگی صفات مورد ارزیابی و ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ۸۰
جدول ٤-۳) تجزیه واریانس بیان ژن‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و متالوتیونین به صورت طرح کاملا تصادفی. ۸۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

ذرت از غلات مهم مناطق گرمسیر و معتدل جهان است، این گیاه در سال ۲۰۰۸ بین محصولات زراعی از نظر عملکرد و میزان تولید در دنیا رتبه اول و از نظر سطح زیرکشت مقام سوم (بعد از گندم و برنج) را دارا بوده است. در مورد منشاء و تکامل اولیه‌ی ذرت توافق کمی وجود دارد، اما توافق کلی بر این است که ذرت ۷۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال پیش در جنوب مکزیک اهلی شده است. پس از کشف آمریکا توسط اروپایی‌ها، به سرعت در سرتاسر اروپا پراکنده شد (امامی و همکاران، ۱۳۸۴) و کشت آن، قرن هفدهم میلادی در قاره اروپا رونق گرفت. لینه در سال ۱۷۳۷ میلادی نام آن را ***Zea mays*** گذاشت (پورصالح، ۱۳۷۳). بر اساس آمار FAO[1] سطح زیرکشت ذرت در جهان در سال ۲۰۰۵ میلادی معادل ۱۴۷ میلیون هکتار، عملکرد آن ۴۷۰۰ کیلوگرم در هکتار و میزان تولید ۶۹۴ میلیون تن گزارش شده است. طبق آمار جدید، FAO تولید جهانی ذرت در سال ۲۰۰۸ را معادل ۸۲۶ میلیون تن گزارش کرده است. ایران با داشتن تنوع آب و هوایی مناسب، از جمله منطقه‌های مستعد تولید ذرت است. طی سال‌های ۲۰۰۵-۱۹۹۱ سطح زیر کشت آن از ۴۱٫۹۶۹ به حدود ۲۰۵٫۰۰۰ هکتار، عملکرد در واحد سطح از ۴٫۵۰۰ به حدود ۷٫۰۰۰ کیلوگرم و میزان تولید از ۱۸۷ هزار تن به ۱/۵ میلیون تن افزایش یافته است. طی این سال‌ها میزان واردات ذرت از ۱/۲۱۸ میلیون تن به ۱/۷۶۴ میلیون تن افزایش پیدا کرده ولی ایران صادرکننده ذرت نبوده است (به استثناء سال ۲۰۰۳، که میزان صادرات ذرت ۳۰ تن بوده است) (امیرتیموری و چیذری، ۱۳۸۷).

ذرت گیاهی یکساله از خانواده گرامینه و از جنس ***Zea*** است. دانه‌ی ذرت به صورت سنتی برای مصرف مستقیم انسان استفاده می‌شود، اما مصرف اصلی آن در سطح جهانی برای تغذیه‌ی دام است. در ایالات متحده‌ی آمریکا حدود ۷۵ درصد از دانه‌ی ذرت برای تغذیه دام و حدود ۲۰ درصد از آن به عنوان منبعی برای تولیدات صنعتی استفاده می‌شود. نشاسته به‌عنوان ماده اصلی تشکیل دهنده دانه ذرت پایه‌ی تمام مصارف مختلف صنعتی است.

نظر به اهمیت ذرت در اقتصاد کشاورزی کنترل عوامل خسارت‌زا به این محصول استراتژیک توسط اصلاحگران نبات امری ضروری به نظر می‌رسد. سهم بهبود ژنتیکی از راه اصلاح ذرت نسبت به سرعت افزایش عملکرد در ایالات متحده بین ۶۰ تا ۸۰ درصد برآورد شده است (دوویک، ۱۹۹۲)،

1. Food and Agricultural Organization