وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science, High Technology & Environmental Sciences

دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشکده علوم
بخش زیست شناسی

رساله جهت دریافت درجه دکتری فیزیولوژی گیاهی

مقایسه اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید و آرژینین در کاهش تنش اکسید اتیو ناشی از خشکی در گیاه گوجه فرنگی *(Lycopersicun esculentum)*

استاد راهنما:

دکتر خسرو منوچهری کلانتری

اساتید مشاور:

دکتر محمد مهدی یعقوبی

دکتر ماه بانو تاتا

مولف :

فاطمه نصیبی

۱۳۸۹/۳/۱۱

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

خرداد ماه ۱۳۸۸

۱۳۷۱۸۶

این رساله به عنوان یکی از شرایط احراز درجه دکتری به

گروه زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمیشود.

دانشجو : خانم فاطمه نصیبی

استاد راهنما : آقای دکتر خسرو منوچهری کلانتری

اساتید مشاور: آقای دکتر مهدی یعقوبی

خانم دکتر ماه بانو تاتا

داور ۱ : آقای دکتر حسن ابراهیم زاده

داور ۲ : آقای دکتر احسانپور

داور ۳ : آقای دکترمحمدجواد آروین

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی یا نماینده دانشکده : آقای دکتر مهدی عباس نژاد

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه است.

دانشگاه شهید باهنر کرمان
اداره تحصیلات تکمیلی

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
اداره آموزش
International Center for Science & High Technology & Environmental Sciences

تقدیم به آنان که قداست عشق را در گوهر زیبایی ها

می بینند.

تقدیم به آنان که گوهر زیبایی را در صدف علم

می جویند.

تقدیم به انان که صدف علم را در دریای بیکران جاودانگی ها یافتند.

تقدیم به :

پدر بزرگوارم

مادر فداکارم

همسر عزیزم

تشکر و قدردانی

حمد بی پایان و سپاس بیکران خدای منان که از جلوه های جمال و تجلی کمالش چراغ عرفان افروخته شد و از پرتو جلالش عالم هستی به نور دانش فروغ بی زوال یافت .
شکر بی پایان بر آفرینشگر آسمان و یگانه دانای علم آفرین که با یاری ها ، برکات و تاییدات او موفق به تحصیل علم و دانش و تدوین و تنظیم این رساله گشتم.
اینجانب در انجام این تحقیق افتخار این را داشتم تا از محضر اساتید گرانقدر و بزرگواری بهره ببرم که جای آن دارد تا خالصانه مراتب قدردانی خود را نسبت به لطف این بزرگ اندیشان به پاس رهنمودهای ارزنده شان تقدیم دارم.
وظیفه خود می دانم مراتب قدردانی و سپاس عمیق قلبی خود را به استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر کلانتری که در طول تحصیل و تحقیق مرا از راهنمایی های عالمانه خویش برخوردار ساختند و در تمامی مراحل پژوهشی از هیچ کوششی دریغ ننمودند، تقدیم کنم.
از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر یعقوبی که استاد مشاور این پروژه بودند و در طول تحقیق همواره از راهنمایی های ایشان بهره مند بودم کمال تشکر را دارم .
همچنین ار سرکار خانم دکتر تاتا که در انجام آنالیزهای آماری این جانب را یاری نمودند تشکر می نمایم.
از آقایان دکتر ابراهیم زاده ، دکتر احسانپور و دکتر آروین که زحمت داوری رساله اینجانب را تقبل فرمودند کمال تشکر و امتنان را دارم.
از تمام اساتید و کارشناسان بخش زیست شناسی دانشگاه کرمان که با آموختن علم مرا مدیون خود ساخته اند کمال تشکر و قدردانی را می نمایم و برای همگی این عزیزان از خداوند بزرگ آرزوی توفیق و سلامتی دارم.
از ریاست محترم مرکز علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، ریاست محترم پژوهشکده علوم محیطی، کارشناسان محترم پژوهشکده علوم محیطی و کارکنان محترم این مرکز به خاطر حمایتهای بی دریغشان در انجام این پروژه بسیار سپاسگزارم.
از جناب آقای مهندس مسعود ترک زاده کارشناس ارشد ازمایشگاه علوم محیطی این مرکز که در انجام آزمایشات مولکولی، از تجربیات ارزنده ایشان استفاده کردم تشکر و قدردانی می نمایم.
از تمام دوستان و همکلاسی های عزیزم که در طول این دوره مرا یاری دادند خالصانه قدردانی می نمایم.
از زحمات پدر، مادر، خواهر و برادران عزیزم که همیشه تکیه گاه من در زندگی بوده اند و از هیچ محبتی دریغ نکردند و همواره مشوقم در ادامه تحصیل بودند ممنون و سپاسگزارم و سلامتی و تندرستی آنان را از درگاه خداوند بزرگ مسئلت دارم.

در پایان، صمیمانه و خالصانه از همسر عزیزم آقای دکتر هاتفی به خاطر همراییها، همدلیها و همکاریهایشان در این دوران سخت و پرمشقت تشکر می نمایم و برایشان آرزوی سربلندی، سلامتی و بهروزی در تمام مراحل زندگی دارم.

این پژوهش به عنوان رساله دکتری و به صورت تفاهم بین دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان صورت گرفته و مراحل آزمایشگاهی آن در پژوهشکده علوم محیطی ماهان انجام شده است.

چکیده

تنش خشکی یکی از مهمترین تنشهای محیطی است که رشد و تولید محصولات کشاورزی را محدود می کند. وقتی گیاهان تحت تنش خشکی قرار می گیرند، انواعی از گونه های فعال اکسیژن که ایجاد صدمات اکسیداتیو می کنند، تولید می شوند. ترکیباتی که به کاهش اثرات زیانبار تنشهای محیطی مثل خشکی کمک می کنند، از نقطه نظر تئوری و کاربردی اهمیت فراوانی دارند. گزارش شده است که نیتریک اکسید یک رادیکال گازی نسبتاً پایدار است که به عنوان مولکول پیامبر کلیدی در گیاهان عمل می کند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، پاتوفیزیولوژیکی و نموی به عنوان واسطه دخالت دارد و اخیراً پیشنهاد شده که این ماده در پاسخ گیاهان به تنش های محیطی نیز شرکت می کند. در این پژوهش از سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان ترکیب رها کننده NO، PTIO به عنوان خورنده NO، آرژینین (Arg) به عنوان گهرمایه آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) و LNAM به عنوان بازدارنده آنزیم NOS استفاده گردید و اثرات این ترکیبات در تخفیف صدمات اکسیداتیو ناشی از خشکی ایجاد شده توسط محلول پلی اتیلن گلیکول بررسی گردید.

نتایج نشان داد که وقتی گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی قرار می گیرد، ثابت پایداری غشاء (MSI) و محتوی نسبی آب (RWC)، کاهش یافته و محصولات پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز افزایش می یابد. پیش تیمار گیاهان با Arg یاSNP باعث افزایش درصد MSI وRWC، کاهش مقدار آلدهیدها و کاهش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در گیاهان تحت تنش گردید. در این بررسی تنش خشکی اثر معنی داری بر رنگیزه های فتوسنتزی نداشت و پیش تیمار گیاهان با Arg و یا SNP نیز اثر معنی داری در مقدار این ترکیبات در گیاهان شاهد و تحت تنش نداشت. خشکی باعث افزایش مقدار گروههای کربونیل و کاهش گروههای تیول پروتئینی و غیر پروتئینی به عنوان شاخص اکسیداسیون پروتئین شد. پیش تیمار گیاهان با SNP گروههای کربونیل را کاهش و گروههای تیول پروتئینی و غیر پروتئینی را افزایش داد و باعث تخفیف اکسیداسیون پروتئینها تحت تنش خشکی گردید اما پیش تیمار با Arg تنها باعث افزایش تیولهای غیر پروتئینی شد و بر مقدار گروههای کربونیل و تیولهای پروتئینی اثر معنی داری نداشت. مقدار پرولین، آمینواسیدهای آزاد و قندهای محلول تحت تنش خشکی افزایش معنی داری نشان دادند. پیش تیمار گیاهان با Arg باعث افزایش معنی دار پرولین وآمینواسیدهای آزاد گردید ولی بر محتوی قندهای محلول تاثیری نداشت. پیش تیمار با SNP بر هیچ یک از اسمولیتهای نام برده اثر معنی داری نداشت. فعالیت آنزیم PAL و مقدار فنلهای محلول، به عنوان آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی، تحت تنش خشکی افزایش یافت و پیش تیمار گیاهان با SNP فعالیت این آنزیم و

مقدار ترکیبات فنلی را تحت تنش خشکی افزایش داد اما پیش تیمار با Arg تاثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم و ترکیبات فنلی در گیاهان شاهد و تحت تنش نداشت. فعالیت آنزیمهای SOD، CAT، GPX و APX در گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد در حالیکه فعالیت GR در گیاهان تحت تنش کاهش یافت.

در گیاهانی که با Arg و یا SNP تیمار شده بودند و سپس تحت تنش خشکی قرار گرفته بودند، فعالیت فعالیت GPX و CAT کاهش یافت اما فعالیت SOD، APX و GR افزایش یافت. در گیاهان تحت تنش همچنین مقدار آسکوربات و گلوتاتیون احیا کاهش و مقدار دهیدروآسکوربات افزایش یافت. در این شرایط پیش تیمار گیاهان با Arg یا SNP باعث افزایش ASA و GSH و کاهش DHASA گردید. از نتایج به دست آمده به نظر می رسد که یکی از نقشهای حفاظتی Arg و SNP مربوط به القا چرخه آسکوربات-گلوتاتیون باشد. در بررسیهای انجام شده مشاهده گردید که پیش تیمار SNP توام با PTIO باعث کاهش یا از بین رفتن اثر SNP گردید و این تایید کننده نقش NO رها شده در این آزمایشات است. نقش حفاظتی NO در تنش خشکی ممکن است مربوط به توانایی NO در مقابله با ROS باشد که باعث کاهش صدمات اکسیداتیو می شود. نتایج آزمایشات انجام شده همچنین نشان داد که اثر Arg و Arg+LNAM در بسیاری از پارامتر ها مشابه بود و تصور می شود که در این شرایط سایر مسیر های متابولیسمی آرژنین به جز مسیر سنتز نیتریک اکسید سنتتاز فعال است. نتایج حاصل از آنالیز مولکولی نیز این نظریه را تایید کرد زیرا در گیاهان پیش تیمار شده با آرژنین بیان ژنهای آرژنین دکربوکسیلاز و آرژیناز I و II بسیار بیشتر از گیاهانی بود که با آرژنین پیش تیمار نشده بودند. بنابر این به نظر می رسد که نقش حفاظتی آرژنین بیشتر مربوط به بیوسنتز پلی آمینها و پرولین تحت این شرایط باشد.

فهرست مطالب

فصل اول – مقدمه

۱-۱- تنش کم آبی در گیاهان ۱

۱-۱-۱- تعریف تنش کم آبی ۱

۱-۲- برخی اثرات کلیدی و مهم تنش خشکی ۳

۱-۲-۱- اثر تنش کم آبی بر فتوسنتز ۴

۱-۲-۲- تنش خشکی و تنظیم اسمزی ۵

۱-۲-۲-۱-کربوهیدراتها ۶

۱-۲-۲-۲- آمین ها ۷

۱-۲-۲-۳- آمینواسیدها ۸

۱-۲-۳- اثر تنش خشکی بر پروتئین ها ۸

۱-۲-۴- تنش کم آبی و هورمونهای گیاهی ۱۱

۱-۲-۵- تنش خشکی و تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) ۱۳

۱-۲-۶- خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو القا شده بوسیله خشکی ۱۴

۱-۲-۶-۱- پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ۱۴

۱-۲-۶-۲ -اکسیداسیون پروتئین ها ۱۸

۱-۲-۶-۳- اکسیداسیون اسیدهای نوکلئیک ۱۹

۱-۲-۷- مکانیسم های دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو ۱۹

۱-۲-۷-۱- مکانیسم های دفاعی آنزیمی ۲۰

۱-۲-۷-۱-۲- کاتالاز CAT ۲۱

۱-۲-۷-۱-۳- پراکسیدازها ۲۱

۱-۲-۷-۱-۳-۱- آسکوربات پراکسیداز APX : ۲۱

۱-۲-۷-۱-۳-۲ -گایاکول پراکسیداز GPX: ۲۳

۱-۲-۷-۱-۳-۳-گلوتاتیون پراکسیداز GP : ۲۳

۱-۲-۷-۱-۴ گلوتاتیون ردوکتاز GR : ۲۴
۱-۲-۷-۲- مکانیسم دفاعی غیر آنزیمی ۲۶
۱-۲-۷-۲ -۱- α- توکوفرول ۲۷
۱-۲-۷-۲ -۲ - آسگوربیگ اسید ۲۸
۱-۲-۷-۲ -۳- گلوتاتیون احیا (GSH) ۲۹
۱-۲-۷-۲ -۴- ترکیبات فنلی ۳۱
۱-۲-۷-۲ -۵- کاروتنوئیدها ۳۳
۱-۲- نیتریک اکسید ۳۴
۱-۲-۱- خصوصیات فیزیکی شیمیایی نیتریک اکسید ۳۵
۱-۲-۲- بیوسنتز نیتریک اکسید ۳۷
۱-۲-۲-۱- مسیر های آنزیمی تولید NO ۳۷
۱-۲-۲-۱-۱- نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) ۳۷
۱-۲-۲-۱-۲- نیترات ردوکتاز(NR) ۴۰
۱-۲-۲-۲- منابع غیر آنزیمی نیتریک اکسید ۴۱
۱-۲-۳-ترکیبات رها کننده NO ۴۳
۱-۲-۴- بازدارنده های سنتز و رباینده های NO ۴۳
۱-۲-۵- اثرات فیزیولوژیکی NO ۴۴
۱-۲-۵-۱ - NO و رشد و نمو گیاه ۴۴
۱-۲-۵-۲- NO و هورمونهای گیاهی ۴۵
۱-۲-۵-۳- عملکرد NO در تنش های غیر زیستی ۴۸
۱-۲-۵-۴- نقش NO در تنش های زیستی ۵۳
۱-۲-۶- نیتریک اکسید به عنوان یک مولکول سیگنالینگ ۵۵
هدف از انجام پژوهش ۵۸

فصل دوم – مواد و روشهای آزمایشگاهی

۲-۱ تهیه و انتخاب بذرهای گیاه مورد پژوهش: ۶۰

۲-۲ کشت گیاه: ۶۰

۲-۳- شرایط نور و دما برای رشد گیاه مورد آزمایش ۶۰

۲-۴- نحوه اعمال تیمارها: ۶۰

۲-۵ - مطالعات مرفولوژیکی ۶۲

۲-۵-۱ اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC) ۶۲

۲-۵-۲ اندازه گیری شاخص پایداری غشاء (MSI) ۶۳

۲-۶ -مطالعات بیوشیمیایی: ۶۳

۲-۶-۱- اندازه گیری مقدار رنگیزه های گیاهی ۶۳

۲-۶-۱-۱- سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید. ۶۳

۲-۶-۱-۲ سنجش محتوای پلی فنل کل (Total Polyphenols) ۶۴

۲-۶-۱-۲-۱ تهیه عصاره گیاهی: ۶۴

۲-۶-۱-۲-۲ رسم منحنی استاندارد ۶۵

۲-۶-۲ اندازه گیری مقدار پرولین: ۶۵

۲-۶-۲-۱ تهیه عصاره: ۶۵

۲-۶-۲-۲ - تهیه معرف: ۶۵

۲-۶-۲-۳- روش اندازه گیری پرولین: ۶۶

۲-۶-۲-۴ - رسم منحنی استاندارد: ۶۶

۲-۶-۳ - اندازه گیری مقدار آمینواسیدهای آزاد (FAA) ۶۷

۲-۶-۳-۱- تهیه عصاره گیاهی: ۶۷

۲-۶-۳-۲- تهیه معرف: ۶۷

۲-۶-۳-۳ - روش اندازه گیری: ۶۷

۲-۶-۳-۴ - رسم منحنی استاندارد: ۶۷

۲-۶-۴- سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها: ۶۸
۲-۶-۴-۱ -سنجش غلظت مالون دآلدئید: ۶۸
۲-۶-۴-۲- سنجش سایر آلدئیدها (پروپانال بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال). ۶۹
۲-۶-۵- اندازه گیری اکسیداسیون پروتئین ها: ۶۹
۲-۶-۵-۱-اندازه گیری گروههای کربونیل باند شده به پروتئین ۷۰
۲-۶-۵-۱-۱ - تهیه عصاره گیاهی: ۷۰
۲-۶-۵-۱-۲- روش اندازه گیری گروههای کربونیل: ۷۰
۲-۶-۵-۲ - اندازه گیری محتوای گروههای تیول کل (TT)، تیولهای پروتئینی (PT) و غیر پروتئینی (NPT) ۷۱
۲-۶-۵-۲-۱- تهیه عصاره گیاهی ۷۱
۲-۶-۵-۲-۲-اندازه گیری گروه های تیول کل ۷۱
۲-۶-۵-۲-۳-اندازه گیری گروه های تیول غیر پروتئینی (NPT) ۷۲
۲-۶-۶- اندازه گیری مقدار پراکسید هیدروژن ۷۲
۲-۶-۶-۱ منحنی استاندارد: ۷۳
۲-۶-۷ -اندازه گیری مقدار آسکوربات و دهیدروآسکوربات ۷۳
۲-۶-۷-۱- تهیه عصاره ۷۳
۲-۶-۷-۲- تهیه محلولهای مورد نیاز: ۷۳
۲-۶-۷-۳-روش اندازه گیری آسکوربات و دهیدرو آسکوربات: ۷۴
۲-۶-۷-۴-رسم منحنی استاندارد ۷۵
۲-۶-۸ - اندازه گیری مقدار گلوتاتیون احیا (GSH) ۷۵
۲-۶-۸-۱- رسم منحنی استاندارد: ۷۵
۲-۶-۹-اندازه گیری مقدار قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون ۷۶
۲-۶-۹-۱- تهیه عصاره ۷۶
۲-۶-۹-۲ -تهیه معرف ۷۶

۲-۶-۹-۳- روش اندازه گیری ۷۶
۲-۶-۹-۴- رسم منحنی استاندارد گلوکز..... ۷۶
۲-۷- سنجش فعالیت آنزیم ها:..... ۷۷
۲-۷-۱- سنجش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) (EC ۱,۱۳,۱۱,۱۲) ۷۷
۲-۷-۲- سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیداتیو:..... ۷۷
۲-۷-۲-۱-تهیه عصاره پروتئینی:..... ۷۷
۲-۷-۲-۲-سنجش فعالیت انزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)(EC 1.15.1.1):..... ۷۸
۲-۷-۲-۳ سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز CAT (EC 1.11.1.6)..... ۷۸
۲-۷-۲-۳-۱-رسم منحنی استاندارد آب اکسیژنه:..... ۷۹
۲-۷-۲-۴-سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX)(EC 1.11.1.7)..... ۷۹
۲-۷-۲-۵- سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.11)..... ۷۹
۲-۷-۲-۵-۱ رسم منحنی استاندارد آسکوربات:..... ۸۰
۲-۷-۲-۶- سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز GR (EC 1.6.4.2) ۸۰
۲-۷-۳ سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) (EC 4.3.1.) ۸۱
۲-۷-۳-۱ تهیه عصاره گیاهی:..... ۸۱
۲-۷-۳-۲ سنجش فعالیت آنزیم:..... ۸۱
۲-۷-۳-۳ رسم منحنی استاندارد:..... ۸۲
۲-۷-۴ سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد..... ۸۲
۲-۷-۴-۱ تهیه معرف بیوره:..... ۸۲
۲-۷-۴-۲ رسم منحنی استاندارد:..... ۸۲
۲-۸- بررسی بیان ژنهای آرژینین دکربوکسیلاز (ADC) و آرژیناز I و II..... ۸۳
۲-۸-۱- استخراج RNA کل از سلولهای برگ گوجه فرنگی ۸۳
۲-۸-۲- تیمار RNA با آنزیم DNase I..... ۸۵
۲-۸-۳- ساخت DNA مکمل ۸۶

۲-۸-۴- طراحی پرایمر ۸۸
۲-۸-۵- واکنش PCR ۸۹
۲-۸-۶- الکتروفورز ژل آگارز ۹۱
۲-۸-۶-۱- مراحل انجام کار : ۹۲
۲-۹- آنالیز آماری ۹۳

فصل سوم- نتایج

۳-۱ محتوی نسبی آب برگ (RWC) ۹۵
۳-۲ شاخص پایداری غشاء (MSI) ۹۷
۳-۳ رنگیزه های فتو سنتزی: ۹۹
۳-۴ ترکیبات پلی فنلی ۱۰۴
۳- ۵ پرولین ۱۰۶
۳-۶ آمینواسیدهای آزاد ۱۰۸
۳-۷ مالون دآلدهید و سایر آلدهیدهای تولید شده در واکنشهای پراکسیداسیون لیپید ۱۱۰
۳-۸- اکسیداسیون پروتئین ها ۱۱۳
۳-۸- ۱گروههای کربونیل: ۱۱۳
۳-۸-۲ گروههای تیول پروتئینی، غیر پروتئینی و تیول کل ۱۱۵
۳-۹ محتوی پراکسید هیدروژن ۱۱۹
۳- ۱۰مقدار آسکوربات و دهیدر آسکوربات ۱۲۱
۳-۱۱ مقدار گلوتاتیون احیا (GSH): ۱۲۴
۳-۱۲ مقدار قندهای محلول ۱۲۶
۳-۱۳ فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز(LOX): ۱۲۸
۳- ۱۴فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD): ۱۳۰
۳-۱۵ فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT) ۱۳۲
۳-۱۶ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(APX) ۱۳۴

۳-۱۷ فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)..... ۱۳۶
۳-۱۸ فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR)..... ۱۳۸
۳-۱۹ فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)..... ۱۴۰
۳-۲۰ سنجش مقدار پروتئینهای محلول..... ۱۴۲
۳-۲۱ آنالیز مولکولی اثر تیمار آرژینین بر بیان ژن های آرژینین دکربوکسیلاز (ADC) و آرژیناز
(ARG) در برگهای گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی..... ۱۴۴

فصل چهارم –بحث و نتیجه گیری

۴-۱ محتوی نسبی آب برگ: ۱۵۰
۴-۲ فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز، پراکسیداسیون لیپیدها و شاخص پایداری غشاء:..... ۱۵۲
۴-۳ رنگیزه های فتوسنتزی:..... ۱۵۶
۴-۴ ترکیبات پلی فنلی و فعالیت آنزیم PAL..... ۱۵۷
۴-۵ پرولین و اسیدهای آمینه آزاد..... ۱۶۰
۴-۶ اکسیداسیون پروتئین ها و گروههای کربونیل، تیولهای پروتئینی و غیر پروتئینی در گیاه گوجه
تحت تنش خشکی..... ۱۶۳
۴-۷ آسکوربات، دهیدروآسکوربات و گلوتاتیون احیاء..... ۱۶۶
۴-۸ محتوی کربوهیدراتهای محلول..... ۱۶۷
۴-۹ آنزیمهای آنتی اکسیداتیو، GR, APX, GPX, CAT, SOD..... ۱۶۹
۴-۱۰ آنالیز مولکولی اثر تیمار آرژینین بر بیان ژن های آرژینین دکربوکسیلاز (ADC) و آرژیناز (ARG)
در برگهای گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی ۱۷۵
نتیجه گیری کلی ۱۷۸
پیشنهادها ۱۸۰
منابع..... ۱۸۲

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- تنش کم آبی در گیاهان

۱-۱-۱- تعریف تنش کم آبی

تعریف دقیق تنش کم آبی و اینکه گیاه در چه شرایطی تحت تنش کم آبی است بسیار دشوار است. یک تعریف وسیع و گسترده از تنش کم آبی اینگونه بیان شده است که تنش کم آبی به شرایطی اطلاق می شود که آب در دسترس گیاه کمتر از نیاز گیاه برای ماکزیمم رشد باشد (Hubick et al 1982).

با توجه به تعریف کریمر (۱۹۸۳) تنش کم آبی به شرایطی گفته می شود که پتانسیل آبی گیاه و تورگر به حدی کاهش یابد که عملکرد طبیعی گیاه را مختل کند و این شرایط به گونه گیاهی، مراحل نمو، شرایط محیطی و فرایندهای مورد مطالعه بستگی دارد.

آب دارای چهار عملکرد عمومی در گیاهان است که عبارتند از:

۱- سازنده اصلی بافت های فعال فیزیولوژیکی است.

۲- یک عامل مهم در فتوسنتز و فرایندهای هیدرولیزی است.

۳- یک حلال عمومی است که نمک ها، قندها و سایر مواد حل شونده در آن حل شده و از سلول به سلول و اندام به اندام حرکت می کند.

۴- آب عامل اصلی حفظ تورژسانس سلول است که لازمه رشد و توسعه سلولها می باشد (Kramer1983).

بنابراین آب یک فاکتور مهم است که رشد و نمو گیاه را از طریق تاثیر بر فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تحت تاثیر قرار می دهد.

بنا بر پیشنهاد کریمر (۱۹۸۳) سه فاکتور مهم از عواملی است که باعث کم آبی در گیاه می شود:

۱- میزان حرکت آب از خاک به ریشه

۲- ارتباط بین پتانسیل آبی خاک و پتانسیل آبی برگ.

۳- میزان تعرق.

گیاهان فقط زمانی می توانند آب را از خاک دریافت کنند که پتانسیل آبی آنها کمتر از پتانسیل آبی خاک باشد. همچنین در مطالعات متعدد به کرات اظهار کرده اند که تنش کم آبی زمانی اتفاق می افتد که میزان تعرق بیشتر از میزان جذب آب توسط ریشه گیاه باشد (Kramer1983).

بسته به دوره و گستردگی تنش خشکی، دامنه ای از فرایندها در سطح مولکولی، بیوشیمیایی، سلولی و در تمام گیاه ممکن است تغییر کند.

از آنجائیکه گیاهان خشکی زی نوساناتی از دسترسی به آب را به طور دائم تجربه می کنند، بسیاری از آنها دارای ویژگی های تطابقی بوده و تنش خشکی را تخفیف می دهند. این مکانیسم های تخفیفی به طور معمول به اجتناب ازخشکی[1] و تحمل خشکی[2] دسته بندی می شوند (Nguyen 1997). گیاهانی که از خشکی اجتناب می کنند دوره زندگی خود را قبل از فصل کم آبی کامل می کنند. برخی از افی مرالها در این گروه جای می گیرند و می توانند چرخه کوتاه زندگی خود را در فصل بارانی کوتاه کامل کنند. برخی دیگر از گیاهان طوری تطابق پیدا می کنند که آب بیشتری جذب کنند و مقدار کمی آب از دست بدهند و بنابر این از خشکی اجتناب می کنند (Bartels et al 2001). وقتی گیاه از خشکی اجتناب می کند تغییرات مرفولوژیکی در ریشه و قسمت هوایی اتفاق می افتد. کاهش رشد قسمت هوایی و افزایش نمو ریشه منجر به افزایش جذب آب و کاهش تعرق می شود و بنابراین آب بافت

[1] Drought-avoidance
[2] Drought-tolerance

گیاهی حفظ می شود. کاهش سطح برگ، ریشه های عمیق و نسبت بالای ریشه به ساقه به عنوان اجتناب از خشکی در بسیاری از گونه ها محسوب می شود (Batlang 2006).

تحمل به خشکی یعنی توانایی گیاه برای ادامه عملکردهای بیوشیمیایی در شرایطی که پتانسیل آبی بافت گیاه پایین است . پاسخ های گیاهی به کمبود آب می تواند شامل تغییر در مسیرهای بیوشیمیایی و بیان ژنهایی باشد که پروتئین های خاصی را کد می کنند و این پروتئین ها در تطابق به خشکی نقش دارند. این پروتئین ها می توانند آنزیم هایی باشند که در سنتز اسمولیت ها، آنتی اکسیدانها و یا هورمونهایی مثل ABA و غیره شرکت می کنند. این تغییرات منجر به بالا بردن تحمل به خشکی می شود که در این صورت گیاه در پتانسیل آبی پائین که نتیجه کمبود آب است به عملکرد خود ادامه می دهد (Jones et al 1981). مکانیسمهای تطابق این امکان را برای گیاهان فراهم می سازند تا چرخه زندگی خود را حتی در مناطق خشک کامل کنند. در مورد گیاهان زراعی، پیشرفتهای ژنتیکی برای تطابق به خشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته و از آن برای انتخاب گیاهان مقاوم در مناطق مختلف استفاده شده است (Nguyen1997).

علاوه بر روشهای اصلاحی متداول، پیشرفت در دستاوردهای مولکولی راهی مطمئن برای تحقیقات فیزیولوژیکی و اصلاحی است تا گیاهان را به خشکی مقاوم نمود (Nguyen1997). همچنین می توان با استفاده از مواد شیمیایی حساسیت گیاه را به خشکی کاهش داد.

۱-۲- برخی اثرات کلیدی و مهم تنش خشکی

اثر نهایی خشکی کاهش بازده تولید گیاهی است که در گیاهان زراعی مثل برنج (*Oryza sativa*) (Brevedan and Egli 2003)، گندم (*Triticum aestivum*) (Cabuslay et al 2002)، سویا (*Glycine max*) (Kirigwi et al 2004) و نخود (*Cicer aerietum*) (Khanna-Chopra

and Khanna-Chopra 2004) گزارش شده است. کاهش محصول، نتیجه اختلال در برخی فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است که مهمترین آنها فرایند فتوسنتز است.

۱-۲-۱- اثر تنش کم آبی بر فتوسنتز

محدودیت در انجام فتوسنتز توسط تنش کم آبی را می توان در قالب دو اثر زیر بیان کرد (Kalantari 1989):

الف) کاهش هدایت روزنه ای

ب) کاهش ظرفیت بیوشیمیایی برگها برای فتوسنتز

وقتی گیاهان کم آبی را تجربه می کنند، روزنه های خود را می بندند (Lawlor and Cornic Saccardy et al 1996, Tezara et al 1999, 2002). این فرایند به میزان زیادی توسط پتانسیل آبی برگ تنظیم می شود اما می تواند با واسطه ABA هم انجام شود. بسته شدن روزنه ها باعث کاهش از دست رفتن آب شده اما انتشار CO_2 به داخل سلولهای گیاهی را محدود می کند و متابولیسم CO_2 را تغییر می دهد (Chaves 1991). Pelleschi و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش کرده اند که کاهش انتشار CO_2 در زمان بسته شدن روزنه ها در گیاهان C_3 که تحت تنش کم آبی قرار دارند دلیل اصلی کاهش فتوسنتز می باشد. اگر چه Tezara و همکاران ۱۹۹۹ گزارش کردند که علت کاهش فتوسنتز در اثر تنش کم آبی در آفتابگردان *(Helianthus annuus)* که گیاه دیگری از تیپ C_3 است، تغییر متابولیسم CO_2 است تا کاهش انتشار CO_2 به درون برگ گیاه. کاهش CO_2 در دسترس، تثبیت کربن را بازداشته و سرانجام ظرفیت فتوسنتزی کاهش می یابد (Bartels and Salamini 2001).

Ferrar و همکاران ۱۹۸۶گزارش کرده است که تنش کم آبی حساسیت دستگاه فتوسنتزی به ممانعت نوری[1] را تحت تاثیر قرار می دهد (Ferrar and Osmond 1986).

[1] Photoinhibition