دانشگاه بین المللی امام خمینی
IMAM KHOMEINI INTERNATIONAL UNIVERSITY

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشکده فنی- مهندسی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان پایان‌نامه

همسانه سازی ژن تیوردوکسین *h* از گیاه انگور

(*Vitis vinifera* L.)

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

نگارش:

رضا حیدری

استاد راهنما:

دکتر رحیم حداد

استاد مشاور:

دکتر قاسمعلی گروسی

شهریور ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به:

پدر مهربان و **مادر** دلسوزم که در راه پرورشم همچون شمع می سوزند، جان بی مقدارم تقدیمتان.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای راست که بر نعمتش ستایش شده و بر قدرتش پرستیده گشته. ذات مقدسی که به عظمتش در سلطه آسمانی فرید است و به قدرتش در بزرگ منشی وحید. بیان از وصفش ناتوان است و هر گونه توصیفی در مقامش نارسا.

نوشتاری که پیش رو دارید حاصل زحمات افراد بسیاری است که کوچکترین آنها نگارنده این سطور می باشد. سروران و دوستان بزرگواری که اگر کوشش و همیاری آنها نبود موفق به تقدیم این اقل نمی شدم.

بجاست از اساتید گرانمایه، جناب آقایان دکتر حداد و دکتر گروسی که با ارائه راهنمایی های بی دریغ و راهگشای خویش در تمامی مراحل تحقیقاتی و عملی کار، همچنین حسن نظر ایشان نسبت به اینجانب، تشکر و سپاسگذاری نمایم. جناب آقایان دکتر حسینی، دکتر بیکی و دکتر احمدی اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی و گروه ژنتیک و اصلاح نباتات، دکتر علیرضا احمدی استاد محترم دانشگاه الزهرا که هر چه آموختنی بود را به من آموختند.

از جناب آقای مهندس سلیمانی کارشناس محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی گیاهی و سرکار خانم مهندس قنادنیا کارشناس محترم آزمایشگاه کشت بافت گیاهی که این حقیر را در این مهم یاری نمودند، تشکر می نمایم.

مراتب سپاس و قدردانی خود را از استاد محترم جناب آقای دکتر علیزاده عضو هیات علمی دانشگاه تهران که زحمت داوری این پایان نامه را متحمل شدند، ابراز می نمایم.

چکیده

تیوردوکسین ها (Trxs) پروتئین های کوچکی هستند که به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت ها تا یوکاریوت های عالی یافت می شوند. آنها از طریق دو اسید آمینه سیستئین موجود در جایگاه فعالشان در واکنش های تیول- دی سولفید شرکت کرده و قادر به احیاء پیوندهای دی سولفید در پروتئین های هدف می باشند. تیوردوکسین ها براساس ساختارهای اولیه پروتئینی و نحوه قرارگیری در اندامک های سلولی، به گروه ها و زیر گروه های مختلفی تقسیم بندی شده و نقش های مهم و کلیدی را در جنبه های مختلف متابولیسم سلولی ایفا می کنند، از جمله: محافظت سلولی در برابر تنش اکسیداتیو، تنش خشکی و عوامل بیماریزای باکتریایی. در این تحقیق، پس از استخراج RNA کل از بافت های مختلف گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) ارقام بیدانه سفید، بیدانه قرمز و عسگری و سپس سنتز cDNA، ژن تیوردوکسین *h*، تحت عنوان *VvTRXh*، با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) استاندارد، از بافت حبه هر سه رقم جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه سازی شدند. در نهایت، ژن تیوردوکسین *h* از بافت حبه رقم بیدانه سفید، به ناقل دوگانه pBI121 متصل گردیده و به اگروباکتریوم تومفاسینس، جهت انتقال به گیاه، منتقل شد. نتایج توالی یابی و بررسی ها با نرم افزار BLAST نشان داد که ژن های همسانه سازی شده، تیوردوکسین *h* بوده و در ارقام بیدانه سفید (*VvTRXh6*) و عسگری (*VvTRXh7*) و همچنین ژن تیوردوکسین *h* جداسازی شده از بافت برگ رقم بیدانه سفید (*VvTRXh8*) حاوی یک چارچوب باز خواندنی منفرد به طول ۳۴۵ bp می باشند که یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را کد می کنند. هر سه ژن *VvTRXh6*، *VvTRXh7* و *VvTRXh8* حاوی جایگاه فعال معمول WCGPC، اسید آمینه تریپتوفان ویژه (W) و یک موتیف ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول در انتهای آمینوی (MAEE) خود می باشند. بررسی های ترتیب توالی با استفاده از نرم افزار Clustalw، شباهت زیادی را بین توالی های پروتئینی پیش بینی شده این ژن ها با ژن مورد نظر در بانک ژن NCBI و با تیوردوکسین *h* سایر گیاهان نشان داد. همچنین بررسی فیلوژنتیکی به روش دندروگرام با استفاده از نرم افزار Clustalw نشان داد که این آیزوفرم ها متعلق به زیر گروه I تیوردوکسین های *h* می باشند.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تعریف و تاریخچه موضوع مورد پژوهش ۲
۱-۲- اهمیت موضوع مورد پژوهش ۳
۱-۳- سئوالات یا فرضیات ۴
۱-۴- هدف پژوهش ۴
۱-۵- روش پژوهش ۵
۱-۶- مراحل پژوهش ۵
۱-۷- ساختار پایان نامه ۶

فصل دوم: کلیات

۲-۱- مبداء و تاریخچه پیدایش انگور ۹
۲-۲- تاریخچه کشت انگور ۹
۲-۳- مشخصات گیاهشناسی انگور ۱۰
۲-۴- طبقه بندی گیاه انگور ۱۰
۲-۴-۱- جنس های خانواده ویتاسه ۱۱
۲-۴-۲- جنس ویتیس ۱۲
۲-۵- اهمیت اقتصادی انگور ۱۲
۲-۶- سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد انگور ۱۳
۲-۶-۱- سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد انگور در جهان ۱۳
۲-۶-۱-۱- سطح زیر کشت ۱۳
۲-۶-۱-۲- میزان تولید ۱۴
۲-۶-۱-۳- عملکرد در هکتار ۱۴
۲-۶-۲- سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد انگور در ایران ۱۴
۲-۶-۲-۱- سطح زیر کشت ۱۴

۲-۶-۲-۲- میزان تولید ۱۵
۲-۶-۲-۳- عملکرد در هکتار ۱۵
۲-۷- تقسیم بندی تجارتی انگور ۱۶
۲-۸- ارزش غذایی انگور ۱۶
۲-۹- شرایط اقلیمی پرورش انگور ۱۷
۲-۱۰- تیوردوکسین ها در گیاهان عالی ۱۷
۲-۱۰-۱- تنوع تیوردوکسین ها در گیاهان ۱۸
۲-۱۰-۲- جنبه های فیزیکی و مکانیسمی تیوردوکسین ها ۱۹
۲-۱۰-۳- تیوردوکسین های نوع *h* در گیاهان ۲۰
۲-۱۰-۳-۱- تیوردوکسین های *h* زیر گروه I ۲۱
۲-۱۰-۳-۲- تیوردوکسین های *h* زیر گروه II ۲۲
۲-۱۰-۳-۳- تیوردوکسین های *h* زیر گروه III ۲۲
۲-۱۰-۴- تنش اکسیداتیو در گیاهان ۲۳
۲-۱۰-۴-۱- دلایل تنش اکسیداتیو ۲۴
۲-۱۰-۴-۲- رادیکال های آزاد ۲۴
۲-۱۰-۴-۳- دفاع ضد اکسندگی ۲۷
۲-۱۰-۴-۴- تیوردوکسین های *h* و محافظت در برابر تنش اکسیداتیو ۲۸
۲-۱۰-۴-۵- نقش های دیگر تیوردوکسین های *h* در گیاهان ۲۹
۲-۱۱- همسانه سازی ژن ۳۰
۲-۱۱-۱- مراحل اصلی در آزمایش همسانه سازی ژن ۳۱
۲-۱۱-۲- اجزاء ضروری یک آزمایش همسانه سازی ۳۱

فصل سوم: بررسی منابع

۳-۱- بررسی پژوهش های انجام گرفته ۳۴

فصل چهارم: مواد و روش ها

۴-۱- مواد گیاهی و نمونه برداری ۴۸
۴-۲- استخراج RNA کل ۴۸
۴-۲-۱- ضدعفونی وسائل و محلول های مورد استفاده جهت استخراج RNA کل ۴۹
۴-۳- تخمین کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی ۵۱

۴-۳-۱- اسپکتروفتومتری RNA کل استخراجی ۵۱
۴-۳-۲- الکتروفورز ژل آگارز- فرم آلدئید ۱/۲ درصد ۵۲
۴-۴- واکنش نسخه برداری معکوس و ساخت رشته اول cDNA ۵۳
۴-۵- الکتروفورز محصول واکنش نسخه برداری معکوس ۵۵
۴-۶- جداسازی ژن *VvTRXh* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۵۶
۴-۶-۱- طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن ۵۷
۴-۶-۲- نحوه انجام RT-PCR اختصاصی ۵۹
۴-۶-۳- RT-PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز *pfu* ۶۰
۴-۶-۴- RT-PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز تک ۶۱
۴-۷- بررسی محصولات RT-PCR ۶۱
۴-۷-۱- بررسی محصولات RT-PCR بوسیله الکتروفورز ژل آگارز ۶۱
۴-۷-۲- بررسی محصولات RT-PCR بوسیله هضم آنزیمی ۶۲
۴-۸- خالص‌سازی محصولات RT-PCR از ژل آگارز ۶۳
۴-۹- هضم آنزیمی محصولات RT-PCR خالص‌سازی شده از ژل ۶۵
۴-۱۰- هضم آنزیمی ناقل پلاسمیدی و حذف فسفر انتهای '۵ ۶۷
۴-۱۱- اتصال ژن *VvTRXh* به ناقل pUC19 ۷۰
۴-۱۲- رشد و تکثیر باکتری *E. coli* و اگروباکتریوم ۷۱
۴-۱۳- محیط‌های کشت باکتریایی ۷۲
۴-۱۳-۱- محیط کشت LB ۷۲
۴-۱۳-۲- محیط کشت SOB حاوی آگار، آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG جهت انجام آزمون سفید-آبی ۷۳
۴-۱۳-۳- محیط کشت SOC ۷۴
۴-۱۴- ذخیره‌سازی باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت مایع ۷۴
۴-۱۵- آماده‌سازی سلول‌های مستعد *E. coli* با استفاده از کلرید کلسیم ۷۵
۴-۱۶- تهیه ذخیره سلول‌های مستعد ۷۶
۴-۱۷- انتقال پلاسمید حاوی ژن به سلول‌های مستعد *E. coli* ۷۷
۴-۱۷-۱- تخمین بازده سلول‌های تراریخت با استفاده از کنترل مثبت ۷۸
۴-۱۸- آزمون سریع کلونی‌های نوترکیب بوسیله PCR ۷۹

۴-۱۹- استخراج پلاسمید با استفاده از روش تحلیل قلیایی و SDS ۷۹
۴-۲۰- بررسی کلونی‌های نوترکیب ۸۲
۴-۲۱- تعیین جهت ژن همسانه سازی شده بر روی ناقل pUC19 ۸۲
۴-۲۲- توالی‌یابی DNA ۸۳
۴-۲۳- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pUC19 و ناقل دوگانه pBI121 ۸۴
۴-۲۴- اتصال ژن *VvTRXh* به ناقل دوگانه pBI121 ۸۶
۴-۲۵- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد *E. coli* ۸۶
۴-۲۶- بررسی کلونی های نوترکیب *E. coli* ۸۷
۴-۲۷- تهیه سلول های مستعد اگروباکتریوم با استفاده از کلرید کلسیم ۸۷
۴-۲۸- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد اگروباکتریوم ۸۹
۴-۲۹- بررسی کلونی های نوترکیب اگروباکتریوم ۹۰

فصل پنجم: نتایج و بحث

۵-۱- استخراج RNA کل ۹۲
۵-۲- واکنش نسخه برداری معکوس (RT) و سنتز DNA مکمل (cDNA) ۹۶
۵-۳- واکنش زنجیره ای پلیمر از نسخه برداری معکوس (RT-PCR) استاندارد ۹۷
۵-۴- خالص سازی محصول RT-PCR از ژل آگارز ۹۸
۵-۵- نتایج هضم آنزیمی ۹۹
۵-۵-۱- تایید محصول RT-PCR با استفاده از هضم آنزیمی ۹۹
۵-۵-۲- هضم آنزمی ژن و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم برشی *Kpn*I ۹۹
۵-۶- واکنش اتصال بین ژن *VvTRXh* و ناقل پلاسمیدی pUC19 ۱۰۱
۵-۷- انتقال مولکول DNA نوترکیب به درون سلول مستعد *E. coli* ۱۰۱
۵-۸- تایید کلونی های نوترکیب ۱۰۵
۵-۸-۱- شناسایی سریع کلونی های نوترکیب ۱۰۵
۵-۸-۲- استخراج پلاسمیدهای نوترکیب از کلونی های تراریخته به روش تحلیل قلیایی با SDS ۱۰۷
۵-۸-۳- تایید کلونی های نوترکیب بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۱۰۸
۵-۸-۴- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی ۱۰۸
۵-۹- تعیین جهت ژن *VvTRXh* همسانه سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی ۱۰۹
۵-۱۰- توالی یابی DNA ژن های همسانه سازی شده ۱۱۱

۵-۱۱- نتایج بررسی های ترتیب توالی و روابط فیلوژنتیکی ۱۱۲
۵-۱۲- هضم آنزیمی ناقل پلاسمیدی pUC19 نوترکیب و ناقل دوگانه pBI121 ۱۱۷
۵-۱۳- واکنش اتصال بین ژن *VvTRXh* و ناقل دوگانه pBI121 ۱۱۸
۵-۱۴- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد *E. coli* ۱۱۸
۵-۱۵- تایید کلونی های نوترکیب *E. coli* ۱۱۹
۵-۱۵-۱- تایید کلونی نوترکیب بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۱۱۹
۵-۱۵-۲- تایید کلونی نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی ۱۲۰
۵-۱۶- انتقال ناقل نوترکیب pBI121 به سلول های مستعد اگروباکتریوم ۱۲۱
۵-۱۷- تایید کلونی های نوترکیب اگروباکتریوم ۱۲۲

فصل ششم: جمع بندی و پیشنهادها

۶-۱- نتیجه گیری ۱۲۴
۶-۲- پیشنهاد ها ۱۲۷

منابع ۱۲۸

پیوست ها ۱۳۶

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول (۲-۱) جنس های خانواده ویتاسه بر اساس طبقه بندی PLANCHON ۱۱

جدول (۴-۱) مقدار و ترکیبات واکنش سنتز cDNA ۵۵

جدول (۴-۲) مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت RT-PCR اختصاصی ژن ۵۹

جدول (۴-۳) مقدار و غلظت ترکیبات RT-PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز *pfu* ۶۰

جدول (۴-۴) چرخه حرارتی RT-PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز *pfu* ۶۰

جدول (۴-۵) مقدار و غلظت ترکیبات RT-PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلیمراز تک ۶۱

جدول (۴-۶) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی محصولات RT-PCR ۶۳

جدول (۴-۷) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی ژن *VvTRXh* ۶۶

جدول (۴-۸) مقدار و غلظت ترکیبات واکنش اتصال ۷۱

جدول (۴-۹) محیط کشت LB ۷۳

جدول (۴-۱۰) محیط کشت SOB ۷۳

جدول (۴-۱۱) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی به منظور تعیین جهت ژن همسانه سازی شده روی ناقل پلاسمیدی pUC19 ۸۳

جدول (۴-۱۲) مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pUC19 و ناقل دوگانه pBI121 ۸۵

جدول (۵-۱) نتایج اسپکتروفتومتری RNA کل استخراجی از بافت های مختلف گیاه انگور، رقم بیدانه سفید ۹۵

جدول (۵-۲) نسبت ها و غلظت های مختلف ناقل و قطعه DNA در واکنش اتصال ۱۰۱

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل (۲-۱) مسیرهای مختلف فعالیت تیوردوکسین در کلروپلاست ها، میتوکندری ها و سیتوزول ۱۹
شکل (۲-۲) نحوه عمل و مکانیسم تیوردوکسین و گلوتاتیون ۲۹
شکل (۴-۱) توالی نوکلئوتیدی ژن تیوردوکسین *h* موجود در بانک ژن NCBI ۵۷
شکل (۵-۱) الکتروفورز RNA کل استخراجی از بافت های مختلف روی ژل آگارز- فرم آلدئید ۱/۲ درصد ۹۵
شکل (۵-۲) الکتروفورز cDNA سنتز شده در بافت های مختلف روی ژل آگارز ۲/ ۱درصد ۹۶
شکل (۵-۳) الکتروفورز محصول RT-PCR در بافت های مختلف روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۹۸
شکل (۵-۴) الکتروفورز محصول RT-PCR از بافت حبه، جهت خالص سازی ژن *VvTRXh* از ژل آگارز ۰/۸ درصد ۹۸
شکل (۵-۵) الکتروفورز ژن *VvTRXh* از بافت حبه، پس از خالص سازی از ژل روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۹۸
شکل (۵-۶) تایید محصول RT-PCR از بافت حبه با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۷ درصد ۹۹
شکل (۵-۷) ایجاد انتهای چسبان در ژن *VvTRXh* از بافت حبه با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *Kpn*I و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۱۰۰
شکل (۵-۸) ایجاد انتهای چسبان در ناقل پلاسمیدی pUC19 با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *Kpn*I و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۱۰۰

شکل (۵-۹) شناسایی کلونی های باکتریایی نوترکیب از بافت حبه با استفاده از آزمون سفید-آبی ۱۰۴
شکل (۵-۱۰) واکشت و خالص سازی کلون های نوترکیب از بافت حبه بر روی محیط کشت جامد LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۵
شکل (۵-۱۱) آزمون سریع کلونی های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۱۰۶
شکل (۵-۱۲) الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب استخراجی از کلون های تراریخته روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۱۰۷
شکل (۵-۱۳) تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۱۰۸
شکل (۵-۱۴) تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۱۰۹
شکل (۵-۱۵) نتایج حاصل از تعیین جهت ژن همسانه سازی شده با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Hinf*I و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ۱۱۰
شکل (۵-۱۶) توالی نوکلئوتیدی ژن *VvTRXh6* همسانه سازی شده از بافت حبه انگور، رقم بیدانه سفید ۱۱۲
شکل (۵-۱۷) توالی پروتئینی ژن *VvTRXh6* همسانه سازی شده از بافت حبه انگور، رقم بیدانه سفید ۱۱۲
شکل (۵-۱۸) ترتیب توالی پروتئینی ژن های *VvTRXh6*، *VvTRXh7* و *VvTRXh8* با گیاهان دیگر با استفاده از نرم افزار Clustalw ۱۱۴
شکل (۵-۱۹) درخت فیلوژنتیکی رسم شده ژن های همسانه سازی شده با سایر آیزوفرم های انگور و آیزوفرم های گیاهان آرابیدوپسیس تالیانا و *P. trichocarpa* به منظور تعیین زیرگروه ژن های همسانه سازی شده با استفاده از نرم افزار Clustalw ۱۱۶
شکل (۵-۲۰) هضم آنزیمی ناقل دوگانه pBI121 و ناقل پلاسمیدی pUC19 نوترکیب با آنزیم های *Bam*HI و *Sac*I و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ۱۱۷

شکل (۵-۲۱) الکتروفورز قطعات Kb ۱۳ و bp ۳۷۰ پس از خالص سازی از روی ژل..... ۱۱۸
شکل (۵-۲۲) شناسایی کلون *E. coli* نوترکیب روی محیط کشت SOB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین.....۱۱۹
شکل (۵-۲۳) الکتروفورز پلاسمید pBI121 نوترکیب استخراجی از کلون تراریخته روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....۱۲۰
شکل (۵-۲۴) تایید کلونی نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.....۱۲۰
شکل (۵-۲۵) تایید کلونی نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....۱۲۰
شکل (۵-۲۶) شناسایی کلون های اگروباکتریوم نوترکیب روی محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک های ریفامپیسین و کانامایسین.....۱۲۱
شکل (۵-۲۷) تایید کلونی های نوترکیب اگروباکتریوم با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.....۱۲۲

اختصارات

1-CP	1-Cysteine peroxiredoxin
2-CP	2-Cysteine peroxiredoxin
Amp	Ampicillin
APX	Ascorbate peroxidase
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
cDNA	Complementary deoxynucleic acid
CDSP32	Chloroplastic drought-induced stress protein
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxynucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FTR	Ferredoxin-thioredoxin reductase
GFP	Green fluorescent protein
GP	Guaiacol type peroxidase
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
Grx	Glutaredoxin
GS	Glutamine synthetase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulphide
GST	Glutathione S-transferase
gusA	β-glucuronidase
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
Kan	Kanamycin
LB	Left border

LB	Luria–Bertani medium
mBBr	Monobromobimane
MDHAR	Monodehydro ascorbate reductase
MPX	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSR	Methionine sulfoxide reductase
NADPH	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
nptII	Neomycin phosphotransferase II
NTR	NADP-thioredoxin reductase
ORF	Open reading frame
PDI	Protein disulfide isomerases
Prx	Peroxiredoxin
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RB	Right border
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLG	S Locus glycoprotein
SLR	S Locus related
SOD	Superoxide dismutase
SRK	S Receptor kinase
THL	Thioredoxin-like
TR	Thiredoxin reductase
Trp	Tryptophan
Trx	Thioredoxin
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تعریف و تاریخچه موضوع مورد پژوهش

یکی از مهمترین تنش های محیطی که عامل اصلی کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی و باغی در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می شود، تنش خشکی است و زمانی در گیاه رخ می دهد که میزان آب دریافتی گیاه کمتر از مصرف آن باشد. از مهمترین اثرات تنش خشکی، افزایش مقادیر انواع اکسیژن فعال (ROS) و به دنبال آن بروز تنش اکسیداتیو در گیاهان می باشد که موجب صدمه به ماکرومولکول ها و ساختار سلولی می شوند.

بررسی ها نشان می دهند که مهمترین ژن هایی که در اثر تنش اکسیداتیو با افزایش بیان روبرو می شود، ژن های خانواده تیوردوکسین های *h* هستند که در تمام بافت های گیاهی به فراوانی یافت می شوند. این پروتئین ها به عنوان ضد اکسنده عمل کرده و به علت داشتن گروه دی تیول، به عنوان دهنده الکترون به چند آنزیم درگیر در محافظت در برابر تنش اکسیداتیو ایفای نقش نموده و بدین ترتیب در محافظت سلولی در برابر تنش اکسیداتیو دخالت می کنند. بنابراین به نظر می رسد که با افزایش بیان ژن های خانواده تیوردوکسین *h* بتوان گیاهان تراریخته متحمل به تنش اکسیداتیو و نهایتاً متحمل به تنش خشکی را تولید نمود و میزان عملکرد در واحد سطح را بهبود بخشید.

در طول دهه های ۷۰ و ۸۰ میلادی، دو سیستم تیوردوکسین گیاهی شامل: سیستم کلروپلاستی و سیستم سیتوزولی شناسایی شدند. سیستم کلروپلاستی از یک تیوردوکسین وابسته به فردوکسین (FTR) و دو نوع تیوردوکسین *m* و *f* تشکیل می شود که فعالیت آنزیم های درگیر در متابولیسم کربن را در فرآیند فتوسنتز تنظیم می کند. در سیتوزول بافت های هتروتروفیک، یک آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADP (NTR) و یک تیوردوکسین نوع *h* شناسایی شدند. گلوتاردوکسین های گیاهی نیز بعدها و در سال ۱۹۹۴ شناسایی شدند. امروزه نگرش ما نسبت به تیوردوکسین ها و گلوتاردوکسین های گیاهی بوسیله برنامه های توالی یابی، که تعداد غیر منتظره ای از ژن های کدکننده تیوردوکسین ها را نشان می دهند، کاملاً تغییر کرده است. در همان زمان مشخص شد که ژنوم گیاهان، پراکسی ردوکسین های کلروپلاستی، سیتوزولی و میتوکندریایی را کد می کنند که این نشان دهنده نقش آنها در دفاع ضد اکسندگی می باشد. همچنین بررسی های

پروتئومیکس، تعداد زیادی از پروتئین هایی را که توسط تیوردوکسین ها احیاء می شوند را شناسایی نمود.

تیوردوکسین ها پروتئین های کوچکی هستند که تبادل تیول- دی سولفید را کاتالیز نموده و در تنظیم محیط ردوکس سلولی دخالت دارند. در گیاهان، سیستم تیوردوکسین کاملاً پیچیده است بطوری که حداقل ۲۰ آیزوفرم از تیوردوکسین در گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا[1] شناسایی شده است. بر اساس آنالیز توالی اولیه و موقعیت زیر سلولی، تیوردوکسین ها به گروه ها و زیر گروه های مختلفی تقسیم بندی می شوند. آنها در جنبه های مختلفی از زندگی گیاهان از قبیل؛ رشد و توسعه و سازگاری با تغییرات و تنش های محیطی دخالت دارند.

۱-۲- اهمیت موضوع مورد پژوهش

کشور ما با متوسط بارش ۲۴۰ میلی متر در سال، جزء مناطق خشک جهان به حساب می آید و بخش اعظم اراضی کشاورزی آن در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته است. بنابراین به نظر می رسد که مهم ترین چالش در بخش تولید محصولات کشاورزی در کشورمان، عامل محدود کننده خشکی و کم آبی است. با توجه به پیشرفت های وسیع علمی در بخش مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی کشاورزی، بهترین و مناسب ترین راه برای مقابله با این عامل محدود کننده، تولید و بکارگیری گیاهان تراریخته متحمل به خشکی در سطح وسیع در مزارع می باشد.

از آنجا که انگور یکی از مهمترین گیاهان باغی جهان و ایران به شمار می رود بطوری که سطح زیر کشت آن هر ساله افزایش یافته و بصورت های مختلف در بازارهای داخلی و خارجی مصرف می شود و با توجه به وسعت کشت انگور و اهمیت اقتصادی آن در کشور و نیز شرایط اقلیمی مناسب کشور جهت کشت این محصول مهم باغی، نیاز به تولید گیاهان انگور تراریخته متحمل به تنش خشکی و تنش اکسیداتیو بیش از پیش احساس شده و بدین ترتیب می توان گیاهان مقاومی را تولید نمود و میزان تولید و عملکرد در واحد سطح را افزایش داد.

1- *Arabidopsis thaliana*

۱-۳- سئوالات یا فرضیات

با توجه به اینکه ژن تیوردوکسین *h* (*TRXh*) در تمام بافت های انگور، بویژه بافت حبه، بیان می شود، می توان با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، اقدام به تکثیر ژن مربوطه نموده و در مرحله بعد به منظور تخلیص و نگهداری ژن، آن را درون ناقل مناسبی همسانه سازی کرده تا بتوان از آن در سایر تحقیقات مولکولی از جمله انتقال ژن، استفاده نمود. بدین منظور، ابتدا RNA کل از بافت حبه انگور استخراج گردیده و پس از سنتز cDNA از آن به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده می شود. به دلیل استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن مورد نظر تکثیر یافته و می توان پس از تولید مولکول DNA نوترکیب، آن را همسانه سازی نمود.

۱-۴- هدف پژوهش

همانطور که گفته شد، کشور ما جزء مناطق خشک جهان به حساب می آید و بخش اعظم اراضی کشاورزی آن در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته است. با در نظر گرفتن اینکه انگور یکی از محصولات مهم باغی از نظر اقتصادی و تجاری در جهان و ایران می باشد، بنابراین تولید گیاهان تراریخته انگور متحمل به تنش خشکی و تنش اکسیداتیو بسیار ضروری به نظر می رسد. گام اول در جهت نیل به این هدف، شناسایی ژن های متحمل در برابر تنش خشکی و در مرحله بعد همسانه سازی آنها و سپس انتقال به گیاهان مدل و بررسی اثرات این ژن ها و نهایتاً انتقال آنها به واریته های حساس گیاهان زراعی و باغی است. یکی از ژن هایی که در برابر تنش خشکی و تنش اکسیداتیو با افزایش بیان روبرو می شود، ژن *TRXh* از خانواده تیوردوکسین ها می باشد که در این پژوهش این ژن از بافت حبه انگور ارقامی که از نظر تجاری و اقتصادی مهم می باشند مانند: بیدانه سفید، بیدانه قرمز و عسگری جداسازی و همسانه سازی می شود تا در سایر تحقیقات مولکولی از جمله: مطالعه و بررسی روابط فیلوژنتیکی، شناسایی آیزوفرم های دیگری از این ژن و انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.