دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد دررشته مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی کشاورزی

جداسازی ژن ABF4 در کلزا (*Brassica napus*) و بررسی بیان آن در پاسخ به تنش خشکی

توسط

ابراهیم خواجوی پور

استاد راهنما

دکتر هومن راضی

شهریور ماه ۱۳۹۰

بـــه نـــام خـــدا

اظـــهـــارنـــامـــه

اینجانب ابراهیم خواجوی پور(۸۷۰۶۷۹) دانشجوی رشته‌ی مهندسی کشاورزی گـــرایش بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده‌ی کشاورزی اظهارمی‌کنم که ایـــن پایـــان نامـــه حاصـــل پژوهش خودماستودرجاهایی که ازمنـــابع دیگـــران اســـتفاده کـــرده‌ام، نشـــانی دقیـــق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان نامـــه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر نکرده و یا در اختیار دیگران قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین‌نامه مالکیت فکـــری و معنوی، متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: ابراهیم خواجوی پور

تاریخ و امضاء: ۱۳۹۰/۶/۳۱

به نام خدا

جداسازی ژن ABF4 در کلزا (*Brassica napus*) و بررسی بیان آن در پاسخ به تنش خشکی

به وسیله‌ی:

ابراهیم خواجوی پور

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

بیوتکنولوژی کشاورزی

از دانشگاه شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر هومن راضی، استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات(استاد راهنما).....
دکتر علی نیازی، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی(استاد مشاور) .....
دکتر عباس عالم زاده، استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات(استاد مشاور).....

شهریور ماه ۱۳۹۰

تقدیم به نیاکانمان که هدفشان جز اعتلای ایران و ایرانی نبود

و

تقدیم به پدر و مادر گرامیم و استاد راهنمای ارجمندم

سپاسگزاری

با سپاس از یزدان پاک، اینک که موفق به اتمام پایان نامه خود شدم لازم میدانم مراتب سپاسگزاری خود را از تمام کسانی که مرا در انجام این پایان نامه همراهی و راهنمایی نمودند ابراز دارم.ابتدا از پدر و مادر مهربانم که همواره همراه من بوده سپاسگزاری نموده و برایشان صحت و سلامت از خداوند بزرگ مسئلت دارم. از استاد راهنمای گرامی‌ام جناب آقای دکتر راضی کمال قدر دانی را دارم که علاوه بر استاد علمی، استاد معنوی و اخلاق بنده بوده‌اند. برای ایشان آرزوی موفقیت دارم. از جناب آقای دکتر نیازی و دکتر عالم زاده که مشاورین بنده بودند سپاسگزارم. از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر صالحی کمال تشکر را دارم. همچنین از آقای دکتر ابراهیمی، خانم دکتر حیدریان، آقای مهندس رمضانی و خانم مهندس آرام برای کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزنده‌شان قدردانی می‌کنم. از دانشجویان پژوهشکده بیوتکنولوژی به خاطر ایجاد جوی مملو از صمیمیت و همکاری تشکر میکنم. همچنین از دوستان خوبم آقایان دیناری، یاری زاده، بالطف، مقدم، هادیزاده، رجایی و سالاری و از خانمها آتشی و فنایی که از هیچ کوششی در انجام این پایان نامه دریغ نکردند کمال سپاسگزاری را دارم. از سرکار خانم یوسفی و اساتید بخش نیز متشکر و سپاسگزارم.

چکیده

جداسازی ژن ABF4 در کلزا (*Brassica napus*) و بررسی بیان آن در پاسخ به تنش خشکی

به کوشش:

ابراهیم خواجوی پور

رابطه نزدیک فیلوژنتیکی بین آرابیدوپسیس و جنس براسیکا، امکان استفاده از توالی ژن‌های آرابیدوپسیس را برای شناسایی و جداسازی ژن‌های ارتولوگ در کلزا (*Brassica napus*) فراهم آورده است. ژن ABF4یک عامل رونویسی کلیدی را در یک مسیر وابسته به هورمون اسید آبسیزیک در گیاه آرابیدوپسیس رمز می‌کند. بیان این ژن در شرایط تنش رطوبتی القا می‌شود. این پژوهش با هدف جداسازی ژن ABF4در کلزا (BnABF4)و بررسی تغییرات بیان این ژن در پاسخ به تنش رطوبتی انجام شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از اگزون‌های شماره ۱ و ۲ ژن ABF4در گیاه آرابیدوپسیس(AtABF4)، یک قطعه از cDNA ژن ABF4در کلزا رقم SML046 به طول ۶۸۹bp جداسازی، همسانه سازی و سپس توالی یابی شد. پس از تایید همولوژی قطعه توالی یابی شده با ژن AtABF4، با استفاده از آغازگرهای جدید و تکنیک RACE، نواحی انتهایی '5 و '3ازcDNA ژن BnABF4جداسازی و توالی یابی شد که نتیجه این مرحله، جداسازی یک قطعه با طول ۵۶۹bp در انتهای '5 و سه قطعه با طول‌های ۵۲۰bp،۴۲۵bpو۳۸۴bp در انتهای '3بود.پس از برهم گذاری قطعات توالی یابی شده مرتبط، نسخه‌هایی کامل از cDNA ژن BnABF4به طول ۱۶۰۰bp، ۱۵۰۵bp و ۱۴۶۴bp جداسازی گردید که به ترتیب ۷۹/۲، ۷۹/۶ و ۷۸/۶٪ با نواحی رمزگردان ژن AtABF4شباهت نشان دادند. آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی این توالی‌ها وجود دامنه bZIP و آبدوست بودن پروتئین‌های رمز شدهرا آشکار کرد. بررسی کمّی بیان ژن BnABF4 در دو شرایط تنش رطوبتی و بدون تنش رطوبتی در اندام‌های برگ، ساقه و ریشه نشان دهنده افزایش بیان این ژن در اندام‌های برگ و ریشه و کاهش بیان آن در ساقه در شرایط تنش رطوبتی بود. بیان ژن BnABF4 در شرایط تنش رطوبتی در ریشه بیش از چهار برابر بیان آن در شرایط عدم تنش رطوبتی بود.

فهرست مطالب

عنوانصفحه

فصل اول :مقدمه ۱

۱-۱- تنش خشکی ۲

۱-۲- کلزا ۴

۱-۳- رابطه تکاملی کلزا وآرابیدوپسیس..... ۵

۱-۴- اهداف پژوهش ۷

فصل دوم:مروری بر پژوهش‌های پیشین ۸

۲-۱- تنش خشکی و پاسخ گیاه به آن ۹

۲-۲- اسید آبسیزیک ۱۰

۲-۳- مسیرهای مستقل از اسید آبسیزیک ۱۱

۲-۳-۱- ژن‌های خانواده DREB..... ۱۱

۲-۳-۲- ژن‌هایNAC , HD- ZIP ۱۲

۲-۴- مسیرهای وابسته به اسید آبسیزیک ۱۲

۲-۴-۱- مسیر NAC..... ۱۳

۲-۴-۲- مسیر عوامل رونویسی MYB/MYC ۱۳

۲-۴-۳- مسیر عوامل رونویسی AREB/ABF ۱۳

۲-۴-۳-۱- ساختار عوامل رونویسی ABF ۱۴

۲-۴-۳-۲- فعال شدن عوامل رونویسی ABF ۱۵

۲-۴-۳-۳- اثر عوامل رونویسی ABF بر روی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش ۱۶

۲-۵- ژن AREB2 / ABF4 ..... ۱۶

فصل سوم:مواد و روش‌ها ۱۸
۳-۱- رقم گیاه و شرایط رشد ۱۹
۳-۲- جداسازی، همسانه سازی و توالی یابی قطعه‌ای از cDNA ژن ABF4 در کلزا ۱۹
۳-۲-۱- طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن ABF4 ..... ۱۹
۳-۲-۲- استخراج RNA ۲۰
۳-۲-۳- سنتز رشته اول cDNA ۲۱
۳-۲-۴- تکثیر قطعه مورد نظر ژن BnABF4 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۲
۳-۲-۵- الکتروفورز ژل آگارز ۲۳
۳-۲-۶- خالص سازی قطعه تکثیر شده از روی ژل آگارز ۲۳
۳-۲-۷- همسانه سازی قطعه مورد نظر در پلاسمید ۲۴
۳-۲-۷-۱- اتصال قطعه مورد نظر به درون ناقل پلاسمیدی ۲۵
۳-۲-۷-۲- انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه XL-blue ۲۶
۳-۲-۷-۳- انتخاب همسانه‌ها ۲۷
۳-۲-۷-۴- استخراج پلاسمید نوترکیب ۲۷
۳-۲-۷-۵- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب ۲۸
۳-۲-۷-۶- نگهداری باکتری‌ها در گلیسرول و تهیه استوک باکتری ۲۸
۳-۲-۸- تعیین توالی نوکلئوتیدی ۲۸
۳-۳- جداسازی نواحی انتهایی cDNA ژنBnABF4 با روش RACE ۲۹
۳-۳-۱- 5'-RACE ۲۹
۳-۳-۱-۱- خالص سازی رشته اول cDNA ۳۰
۳-۳-۱-۲- دنباله‌دار کردن رشته اول cDNA ۳۰
۳-۳-۱-۳- اولین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۱
۳-۳-۱-۴- دومین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۲
۳-۳-۱-۵- الکتروفورز ژل آگارز ۳۳
۳-۳-۱-۶- تعیین توالی نوکلئوتیدی ۳۳
۳-۳-۲- 3'RACE ۳۴

۳-۴- بررسی القای بیان ژن BnABF4در پاسخ به تنش رطوبتی با روش‌های RT-PCR و RT-PCR Real time ۳۵
۳-۴-۱- القای تنش خشکی و نمونه‌گیری ۳۵
۳-۴-۲- استخراج RNA ۳۵
۳-۴-۳- تعیین کمیت و کیفیت RNA ۳۷
۳-۴-۴- حذف آلودگی ژنومی ۳۷
۳-۴-۵- سنتز رشته اول cDNA ۳۸
۳-۴-۶- واکنش RT-PCR ژن BnABF4و ژن کنترل داخلیef1 ..... ۳۹
۳-۴-۷- واکنش Real time RT-PCR ژن BnABF4و ژن کنترل داخلیef1 ..... ۴۱
۳-۴-۸- نرمال سازی بیان ژن BnABF4 پس از واکنش Real-time RT PCR ۴۲
۳-۵- آنالیزهای بیوانفورماتیکی ۴۳

فصل چهارم: نتایج ۴۴
۴-۱- استخراج RNA از برگ گیاه کلزا ۴۵
۴-۲- جداسازی قطعه‌ای از cDNA ژن ABF4 در کلزا ۴۶
۴-۳- همسانه سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۶
۴-۴- تعیین توالی قطعه تکثیر شده از cDNA ۴۷
۴-۵- جداسازی نواحی انتهای cDNA ژن BnABF4 با روش RACE ۴۸
۴-۵-۱- جداسازی انتهای '5 از cDNA ژن BnABF4 ..... ۴۸
۴-۵-۲- همسانه سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 'RACE5 ..... ۴۹
۴-۵-۳- تعیین توالی انتهای '5 از cDNA ۵۰
۴-۵-۴- جداسازی انتهای '3 از cDNA ژن BnABF4 ..... ۵۱
۴-۵-۵- همسانه سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 'RACE3 ..... ۵۲
۴-۵-۶- تعیین توالی انتهای '3 از cDNA ۵۲
۴-۶- برهم گذاری قطعات توالی‌یابی شده cDNA ژن BnABF4 ..... ۵۴
۴-۶-۱- توالی cDNA به طول ۱۶۰۰ bp(BnABF4-1) ۵۴

۴-۶-۲- توالی cDNA به طول ۱۵۰۵ bp (BnABF4-2) ۵۵
۴-۶-۳- توالی cDNA به طول ۱۴۶۴ bp (BnABF4-3) ۵۶
۴-۷-همردیفی توالی‌های cDNA جداسازی شده ژن BnABF4 با توالیcDNA ژن AtABF4 ..... ۵۸
۴-۸- همردیفی نواحی رمز شونده(CDS)توالی‌هایجداسازی شده با توالی CDS ژن AtABF4 ..... ۶۱
۴-۹- آنالیزهای بیوانفورماتیکی cDNAهای جداسازی و توالی‌یابی شده ژن BnABF4 ..... ۶۳
۴-۹-۱-توالی اسید آمینه‌ای ناحیه رمزگردان cDNAهای جداسازی شده ژن BnABF4 ..... ۶۳
۴-۹-۲- هم ردیفی آمینواسیدی توالی‌های BnABF4 و AtABF4 ..... ۶۴
۴-۹-۳- تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌های BnABF4 و جایگاه دامنه bZIP در توالی‌های آمینو اسیدی ۶۵
۴-۱۰- بررسی القای بیان ژن BnABF4در پاسخ به تنش رطوبتی با روش RT-PCR و Real time RT-PCR ۶۷

فصل پنجم: بحث ۷۱
۵-۱- جداسازی نسخه‌های متعدد از ژن BnABF4 ..... ۷۲
۵-۲- بررسی القای بیان ژن BnABF4 در پاسخ به تنش رطوبتی ۷۳
۵-۳- نتیجه گیری کلی ۷۴
۵-۴- پیشنهادات ۷۶

فهرست منابع ۷۷

پیوست‌ها ۸۴

فهرست جداول

عنوانصفحه

جدول ۳-۱- آغازگرهای طراحی شده برای جداسازی قطعه‌ای از ABF4 در کلزا ۲۰

جدول ۳-۲- مواد مورد استفاده در مرحله اول سنتز رشته اول cDNA ۲۱

جدول ۳-۳- مواد مورد استفاده در مرحله دوم سنتز رشته اول cDNA ۲۲

جدول ۳-۴- مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۲۲

جدول ۳-۵- چرخه گرمایی استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ۲۳

جدول ۳-۶- مواد استفاده شده در واکنش اتصال ۲۵

جدول ۳-۷- مواد استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیبpTZ57R/T ۲۸

جدول ۳-۸- توالی آغازگرهای استفاده شده در 3'RACE و 5'RACE ۲۹

جدول ۳-۹- مواد مورد استفاده در واکنش دنباله دار کردن رشته اول cDNA ۳۱

جدول ۳-۱۰- مواد مورد استفاده در اولین مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 5'RACE ۳۲

جدول ۳-۱۱- چرخه گرمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 5'RACE ۳۲

جدول ۳-۱۲- مواد مورد استفاده در دومین مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 5'RACE ۳۳

جدول ۳-۱۳- مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 3'RACE ۳۴

جدول ۳-۱۴- مواد مورد استفاده برای اعمال تیمار DNase I ۳۸

جدول ۳-۱۵- مواد مورد استفاده در مرحله اول سنتز رشته اول cDNA ۳۸

جدول ۳-۱۶- مواد مورد استفاده در مرحله دوم سنتز رشته اول cDNA ۳۹

جدول ۳-۱۷- آغازگرهای استفاده شده در واکنش RT-PCR و Real Time PCR ۳۹

جدول ۳-۱۸- مواد مورد استفاده در واکنش RT-PCR برای تکثیر ژن BnABF4 و ژن
کنترل داخلی (ef1).....۴۰ .

جدول ۳-۱۹- چرخه گرمایی استفاده شده در واکنش RT-PCR ژن BnABF4 و ژنef1 ..... ۴۰

جدول ۳-۲۰- مواد مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR برای تکثیر ژن BnABF4و ژن کنترل داخلی (ef1)..... ۴۱
جدول ۳-۲۱- چرخه گرمایی استفاده شده در واکنش Real-Time PCR ژن ef1 ..... ۴۱
جدول ۳-۲۲- چرخه گرمایی استفاده شده در واکنش Real-Time PCR ژن BnABF4 .....۴۲
جدول ۴-۱- میزان همانندی توالی‌های نوکلئوتیدی cDNA ژنهای BnABF4 و AtABF4 با نرم افزار Vector-NTI بر حسب در صد ۵۸
جدول ۴-۲- میزان همانندی توالی‌های نوکلئوتیدی CDS ژنهای BnABF4 و AtABF4 با نرم افزار Vector-NTI بر حسب در صد ۶۱
جدول ۴-۳- میزان همانندی توالی‌های آمینو اسیدی پروتئین‌هایBnABF4 و AtABF4 با نرم افزار Vector-NTI بر حسب در صد ۶۴

فهرست نگاره‌ها

عنوانصفحه

نگاره ۱-۱- روابط ژنتیکی گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید جنس براسیکا ۵

نگاره ۱-۲- رابطه تکاملی کلزا (*B. napus*) و آرابیدوپسیس (*A. thaliana*) ۶

نگاره ۲-۱- شبکه‌های تنظیمی بیان ژن‌های القا پذیر به وسیله تنش‌های محیطی ۱۱

نگاره ۲-۲- ساختار شماتیک ژن AtABF4 .....۱۷

نگاره ۳-۱- ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T ۲۵

نگاره ۴-۱- الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ کلزا بر روی ژل آگاروز ۱٪ ۴۵

نگاره ۴-۲- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگرهای اختصاصی AtABF4-F و AtABF4-R با T_A=56°C و تکثیر قطعه ای با طول تقریبی ۷۰۰ bp..... ۴۶

نگاره۴-۳- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم‌های برشی *EcoRI*و *HindIII*..... ۴۷

نگاره۴-۴- نتیجه جستجوی BLASTn توالی جداسازی شده ۶۸۹bp از کلزا ۴۷

نگاره ۴-۵- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 5'RACEبا جفت آغازگرهای اختصاصی BnABF4-R1 و PCR anchor با T_A=60 °C..... ۴۹

نگاره۴-۶- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم‌های برشی *EcoRI*و *HindIII*..... ۵۰

نگاره ۴-۷- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 3'RACE با جفت آغازگرهای اختصاصی BnABF4-F1 و Oligo dT-anchor با T_A=60 °C ۵۱

نگاره ۴-۸- الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم‌های برشی *EcoR1* و *HindIII*..... ۵۲

نگاره ۴-۹- همردیفی نوکلئوتیدی cDNA توالی‌های ژن BnABF4 و AtABF4 با نرم افزار Vector-NTI ۵۸

نگاره۴-۱۰- همردیفی نوکلئوتیدی توالی‌های CDS ژن BnABF4 و AtABF4 با
نرم افزار Vector-NTI ۶۱
نگاره ۴-۱۱- همردیفی توالی‌های آمینو اسیدی پروتئین‌های BnABF4 و AtABF4 با
نرم افزار Vector-NTI ۶۵
نگاره ۴-۱۲- طرح ساختار سه بعدی پروتئین BnABF4 ..... ۶۶
نگاره ۴-۱۳- ناحیه دامنه bZIP در توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های BnABF4 و
مقایسه با AtABF4 ..... ۶۶
نگاره ۴-۱۴- بررسی هیدروپاتیسیتی پروتئین‌های رمز شده توسط نسخه‌های BnABF4 .....۶۷
نگاره ۴-۱۵- الکتروفورز محصول واکنش RT-PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی ژن
BnABF4 و آغازگرهای ژن Elongation Factor 1 به عنوان کنترل داخلی ۶۸

فهرست نمودارها و پیوست‌ها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱- نمودار کمی میزان بیان ژن BnABF4 در اندام‌های مختلف در شرایط بدون تنش رطوبتی ۶۹
نمودار ۴-۲- نمودار کمی میزان بیان ژن BnABF4 در برگ، ساقه و ریشه در شرایط بدون تنش و القای تنش رطوبتی ۶۹
پیوست۱- همردیفی ژنهای خانواده ABF و موقعیت آغازگرها ۸۵
پیوست ۲- موقعیت آغازگرهای طراحی شده جهت RACE بر روی قطعه ۶۸۹ bp جداسازی شده در کلزا ۸۹
پیوست ۳- موقعیت آغازگرهای بررسی بیان بر روی توالی cDNA ژن BnABF4 ..... ۸۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تنش خشکی

گیاهان در شرایط بهینه‌ی رشد خود، رشد و نمو مطلوب و در نهایت بالاترین عملکرد را دارند. اما معمولا شرایط بهینه یا نزدیک به آن در طی دوره رشد، در اختیار گیاه قرار نمی‌گیرد. اختلال در عواملی مانند آب، درجه حرارت، عناصر و مواد غذایی مورد نیاز گیاه، شدت نور و دوره روشنایی، و همچنین عوامل زیستی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و آفات گیاهی می‌توانند شرایط بهینه رشد گیاه را بر هم بزنند و بر رشد و نمو، فیزیولوژی و حیات گیاه اثرات جدی به جای گذارند. به این عوامل خارجی محدود کننده‌ی رشد، عوامل تنش زا می‌گویند. به عبارت دیگر تنش، به عنوان یک عامل خارجی که باعث تاثیر منفی بر زندگی گیاه می‌گردد تعریف می‌شود(تایز و زایگر،۱۳۸۶).

عوامل تنش زا به دو دسته تقسیم می‌شوند: عوامل زنده و عوامل غیر زنده. یکی از عوامل غیر زنده‌ی تنش زا، خشکی است که بر روی رشد گیاه تاثیر منفی بسزایی دارد و باعث کاهش عملکرد گیاه می‌شود. خشکی بخصوص در مناطق خشک و نیمه خشک مهم ترین عامل محدود کننده‌ی رشد گیاه است(Fujita *et al*., 2005). خشکی از طریق کاهش عملکرد باعث کاهش منابع غذایی شده و بر بحران غذایی جامعه بشری دامن می‌زند. علاوه بر این، منابع ژنتیکی هم ممکن است تحت شرایط تنش با کاهش و از دست رفتن گونه‌ها همراه باشند.

گیاهان در شرایط تنش خشکی با ایجاد تغییرات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و متابولیسمی در کلیه اندام‌های خود، به تنش پاسخ می‌دهند. تاکنون تعداد زیادی از ژنهای القا شده بر اثر تنش خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی شناخته شده‌اند و بررسی‌های زیادی توسط پژوهشگران در زمینه‌ی اساس مولکولی تحمل گیاهان به تنش خشکی انجام شده است (جعفریه یزدی و همکاران.،۱۳۸۵).

اسید آبسیزیک یکی از هورمون‌های گیاهی است که در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی نقش عمده‌ای ایفا می‌کند و از این رو به آن، هورمون تنش نیز گفته می‌شود(تایز و زایگر،۱۳۸۶). میزان این هورمون در هنگام وقوع تنش، به سرعت افزایش می‌یابد و این افزایش، باعث القای بیان تعدادی

از ژنهای مرتبط با تنش می‌شود. از جمله ژنهایی که بیان آنها تحت تاثیر اسید آبسیزیک در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد، ژنهای رمزکننده عوامل رونویسی[1] AREB/ABF است.

به طور کلی فرآورده‌های ژنهای رمزکننده‌ی پروتئین را می‌توان به دو دسته پروتئین‌های کارکردی و پروتئین‌های تنظیمی تقسیم کرد. پروتئین‌های تنظیمی در تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال‌های سلولی و همچنین تنظیم بیان ژنها شرکت دارند. عوامل رونویسی جز پروتئین‌های تنظیمی هستند و بیان بسیاری از ژنها از جمله ژنهای پاسخ دهنده به تنش‌ها را تنظیم می‌کنند. عوامل رونویسی به موتیف‌های خاصی در پروموتر برخی ژنها متصل شده و بیان آنها را تنظیم می-کنند. عوامل رونویسی خانواده ABF متعلق به پروتئین‌های کلاسbZIP هستند و به موتیف‌هایی به نام ABREs[2] متصل می‌شوند که جزء عناصر عملگر سیس هستند و در ناحیه پروموتری برخی از ژنهای پاسخ دهنده به تنش‌ها وجود دارند(Yoshida *et al*., 2010; Nakashima *et al*., 2009). بیان ژنهای رمز کننده عوامل رونویسی خانواده AREB /ABF در پاسخ به تنش‌های غیر زنده افزایش می‌یابد که این افزایش بیان، به نوبه خود بیان ژنهای وابسته به اسید آبسیزیک به نام‌های *RD20A* و *RD29B* را افزایش می‌دهد(Choi *et al*., 2005; Kang *et al*., 2002).

عامل رونویسی ABF4 یا AREB2 یکی از اعضای خانواده ABF است که به طور مداوم در ریشه‌ها، روزنه‌های آبی و برخی سیستم‌های آوندی بیان می‌شود و به وسیله شوری و خشکی زیاد، در همه بافت‌های رویشی القاء می‌شود اما در بذرها بیان نمی‌شود و در هدایت تنش اسمزی عمل می‌کند(Choi *et al*., 2000). گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس که حاوی یک نسخه اضافی از ژن ABF4 هستند، تحمل بیشتری به خشکی نشان دادند (Kang *et al*., 2002).

علاوه بر مسیرهای پاسخ به تنش وابسته به اسید آبسیزیک، مسیرهای ژنتیکی و مولکولی دیگری هم در پاسخ به تنش‌ها در گیاهان وجود دارند که به آنها مسیرهای مستقل از اسید آبسیزیک می‌گویند. در این مسیرها، تعدادی عوامل رونویسی مثل عوامل رونویسی HD-ZIP، NAC و عوامل رو نویسی DREB از خانواده AP2/ERF وجود دارند که به ژنهای پاسخ دهنده به تنش متصل شده و بیان آنها را در برابر تنش تنظیم می‌کنند.

---

[1]. Transcription Factors
[2]. ABA-responsive elements

۱-۲- کلزا

رشد فزاینده‌ی جمعیت کشور، توجه به تامین غذا را افزون‌تر کرده است. از این میان روغن‌ها به عنوان یک گروه با ارزش مواد غذایی جهت تامین انرژی محسوب می‌شوند و پس از غلات، دومین گروه مهم غذایی جهان را تشکیل می‌دهند(شیرانی راد و همکاران، ۱۳۸۹). کلزا یکی از مهمترین دانه‌های روغنی است و امروزه از نظر تولید و سطح زیر کشت دومین دانه روغنی پس از سویا و سومین روغن نباتی پس از سویا و نخل روغنی در جهان است(زعیم و زارعی، ۱۳۸۹). طبق آمار فائو، میزان تولید این گیاه استرات‌ژیک روغنی در جهان در سال زراعی ۲۰۰۸-۲۰۰۷ حدود ۱۲ درصد از میزان کل تولید جهانی دانه‌های روغنی معادل ۴۵/۳ میلیون تن بود که در سال زراعی ۲۰۱۰-۲۰۰۹ به ۵۸/۳ میلیون تن رسید (www.FAO.org) که نشان دهنده رشد ۲۸/۷ درصدی است.

دانه ارقام بهنژادی شده‌ی کلزا دارای۴۰ تا ۴۵ درصد روغن و کنجاله‌ی آن حاوی ۴۳-۳۸ درصد پروتئین است که از لحاظ غذایی آن را بسیار ارزشمند کرده است(زعیم و زارعی، ۱۳۸۹). همچنین این گیاه با شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک ایران سازگاری دارد و به همین دلایل سطح زیر کشت آن در بیست سال اخیر نسبت به سایر محصولات کشاورزی رشد چشمگیری داشته است (نصری و خلعتبری ،۱۳۸۸). از آنجا که سرانه مصرف روغن در کشور بالاست و بیش از ۹۰ درصد روغن مصرفی در ایران از طریق واردات و تنها کمتر از ۱۰ درصد از تولید داخلی تامین می‌شود، تولید دانه‌های روغنی بخصوص کلزا در سال‌های اخیر از سوی مسئولان وزارت جهاد کشاورزی در اولویت‌های نخست قرار گرفته است(شعبانی و همکاران، ۱۳۸۹).

کلزا (*Brassica napus*) گیاهی یکساله، تتراپلوئید و متعلق به خانواده شب بوئیان یا چلیپاییان (*Brassicaceae*) و جنس *Brassica* است که از تلاقی دوگونه دیپلوئید *Brassica oleracea* و *Brassica rapa* و دو برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید حاصل، بوجود آمده و تعداد کروموزوم‌های آن ۳۸ عدد است(نگاره ۱-۱). کلزای روغنی مهمترین گونه زراعی جنس براسیکا می‌باشد. منشا آن، جنوب اروپاست و در اوایل قرن هیجده به آسیا وارد شده است. کشت تجاری کلزا از سال ۱۹۴۲ در