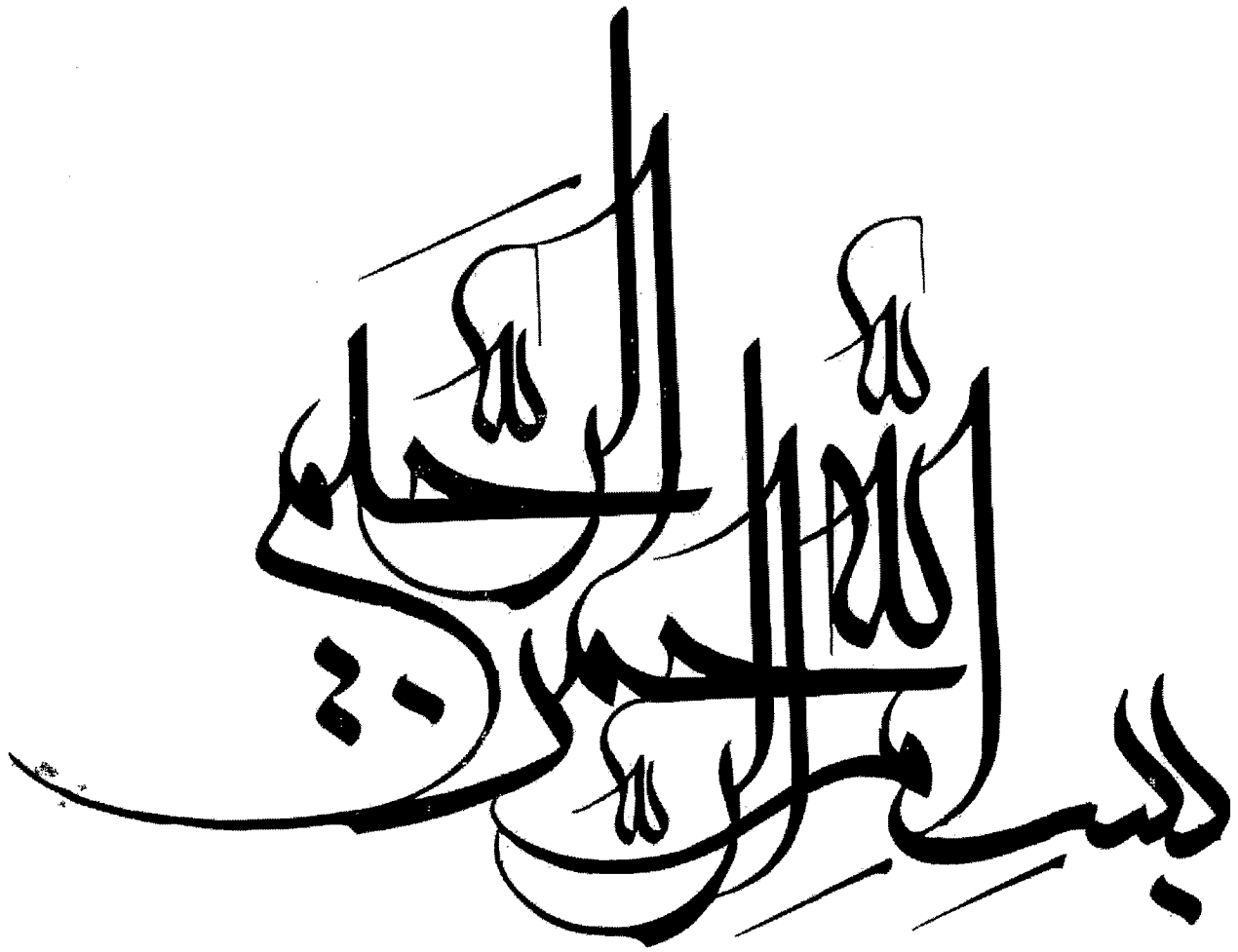


١١١٦١٣

دانشگاه زابل
مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

مطالعه جدا سازی و کلون پروموتر *rd29a* از آرابیدوپسیس

استادان راهنما
دکتر محمود سلوکی
دکتر حسن رهنما

استادان مشاور
مهندس نفیسه مهدیه نژاد
مهندس مصطفی پیر سیدی

تهیه و تدوین
حقیقت وکیلیان

بهمن ۱۳۸۷

۱۳۸۸ /۲/ ۱۵

۱۱۱۶۱۳

بأسمه تعالی

وزارت علوم ، تحقیقات و فناوری

دانشگاه زابل

تاریخ:.....

شماره:.....

پیوست:.....

فرم الف

این پایان نامه با عنوان:**مطالعه** جداسازی و کلون پروموتر *rd29a* از آرابیدوپسیس قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد **مهندسی کشاورزی** گرایش **بیوتکنولوژی** توسط دانشجو **مقیقت وکیلیان** تحت راهنمایی اساتید پایان نامه آقایان **دکتر محمود سلوکی** و **دکتر حسن رهنما** تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضا دانشجو

این پایان نامه ٦ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۸۷/۱۱/۲۹ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۲۰ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام ونام خانوادگی	امضا	تاریخ
۱- استاد راهنما: دکتر **محمود سلوکی**		
۲- استاد راهنما: دکتر **حسن رهنما**		
۳- استاد مشاور: مهندس نفیسه مهدی نژاد		
۴- داور: دکترمحمدرضا اصغری پور		
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکترعلیرضا سیروس مهر		

وزارت علوم تحقیقات فناوری
دانشگاه زابل
اداره تحصیلات تکمیلی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه زابل است.

تقدیم به مادر عزیزم و برادر عزیزم حسین

کسانی که وجودم برایشان همیشه رنج بود و وجودشان برایم همیشه مهر، توانشان رفت تا به توانی برسم و موهایشان سپید گشت تا رویم سپید بماند.

تقدیم به
خواهر عزیزم شیرین که بهترین هدیه ی زندگیم هست.

به نام خداوند جان و خرد

در ابتدا بر خود واجب می دانم تا از خانواده عزیزم و خانواده اسدی که در تمام مراحل انجام این پایان نامه مشوق بنده بودند از صمیم قلب تشکر و قدردانی نمایم. از اساتید راهنمای بسیار عزیزم جناب آقایان دکتر **محمود سلوکی** و دکتر **حسن رهنما** که در زمان انجام این پایان نامه همواره از پشتیبانی و راهنمایی های ایشان بهره مند بودم، تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید محترم مهندس **مصطفی پیرسیدی** و مهندس **نفیسه مهدی نژاد** که مشاورت این پایان نامه را و آقای دکتر **محمدرضا اصغری پور** که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند همچنین **دکتر علیرضا سیروس مهر** نماینده تحصیلات تکمیلی، تشکر می نمایم.

از آقایان دکتر جبشی، توحیدفر، امیدی، بی همتا، و از دوستان و همیاران خوبم آقایان اسدی،، زارع، مشایخی، شریفی، رئوفی، مهاجر نراقی، سبحانی، نصیری، فروتن، شیخ حسن، ، رأفت، سی سختی، فیروزی، شمس، رستمی، دبیر و خانم ها محمودی، ایروانی، موسوی، اشتری، راجی، کمالی، اکبری، امامی فر، و سایر دوستانی که از معرفی آنها قاصرم، کمال تشکر را دارم و برای همه آن ها آرزوی موفقیت دارم.

چکیده

انتخاب نوع پروموتر مورد استفاده برای یک سازه ژنتیکی اساساً بـه هـدف از پـروژه مهندسـی ژنتیـک وابـسته می‌باشد.بطوریکه انواع مختلفی از پروموترها با توجه به نوع بافت ویا میزان بیان می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرند. پروموترهای گیاهی در این خصوص برای مهندسی ژنتیک گیاهان به مقدار زیادی مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیرنـد. اغلب پروموترهایی که برای over express ژنها در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرنـد منـشاء ویروسـی دارنـد. برای مثال پروموتر ویروس موزاییک کلم (*CaMV35S*) از این نوع می‌باشد. از ویژگیهای مهم این پرومـوتر ایـن است که قویاً در تمام گیاهان ترانسژنیک قابل بیان می باشد، بنابراین استفاده گسترده‌ای از این پروموتر در تحقیقات وپژوهشهای آکادمیک صورت می‌گیرد. با این وجود استفاده از این پروموتر برای مهندسـی گیاهـان بـه منظـور بـالا بردن تحمل در برابر استرسهای غیرزنده (Abiotic Stress) مفید نمی باشد.بـرای ایـن نـوع از مهندسـی ژنتیـک استفاده از پروموترهای القاء پذیر بسیار مفید می‌باشد. چراکه بیان والقـاء ژن تحـت ایـن پرومـوتر فقـط در شـرایط استرس اتفاق می‌افتد واینکه در اغلب موارد افزایش بیان را در مقایسه با پروموتر *CaMV35S* شاهد هستیم.

یکی از ژنهایی که در گیاه آرابیدوپسیس وجود دارد ودر گروه ژنهای واکنش‌گـر بـه تـنش قـرار دارد، *ژن rd29a* میباشد.پروموتری هم به این نام در این گیاه وجود دارد که حاوی عناصر *ABRE* و *DRE* می‌باشد کـه در القـاء و تظاهر ژن تحت شرایط تنشی،نظیر، سرما، خشکی،شوری و وجود ABA نقش ایفا می‌کند.

در این تحقیق ما بیان ژن *GUS* را با استفاده از دو پروموتر *rd29a* و *CaMV35S* در گیاه توتـون بـه عنـوان گیاه مدل مورد بررسی قرار دادیم. ابتدا پروموتر از گیاه آرابیدوپـسیس جـدا و سـپس در بـالا دسـت ژن *GUS* در وکتـور *pBI121* قـرار داده شـد. سـازه هـا ی *pBI–rd29a-GUS* و *pBI–CaMV35S-GUS* جهـت ترانسفورماسیون گیاه توتون با استفاده از باکتری آگروبـاکتریوم سـویه *Aglo* مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. گیاهـان ترانسژنیک تحت تیمارهای مختلف تنشی (دمای بالا، سرما، خشکی، شوری،ABA) قرار گرفتند و در نهایت میزان بیان ژن *GUS* تحت این شرایط مورد بررسی قرار گرفت. نتایجی که بدست آمد مشخص کـرد کـه تحـت شـرایط تنشی میزان بیان ژن *GUS* تحت پروموتر *rd29a* افزایش قابل ملاحظه ای از خود نشان می دهد.

واژه های کلیدی: پروموتر– استرس– آرابیدوپسیس– *GUS -rd29a*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع ۴

۱- ۲- تنش‌های محیطی ۸

۲- ۲- مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در گیاهان ۱۰

۲-۳- اصلاح برای مقاومت به تنش ۱۰

۲-۴- فیزیولوژی تحمل به تنش در گیاهان: ۱۱

۲-۵- تنش از دید ژنتیک مولکولی: ۱۱

۲-۵-۱- پروتئین‌ها و ژن‌های القاء شونده با تنش ۱۱

۲-۵-۲- سیگنال های انتقالی در مسیر جریان تنش ۱۳

۲-۶- طبقه بندی ژن‌هایی که تحت تأثیر تنش تحریک می‌شوند ۱۴

۲-۷- بیان ژن در دوره تنش ۱۵

۲- ۸- عوامل رونویسی برای مهندسی رگولون ۱۷

۲- ۹- مهندسی تحمل به تنش با استفاده از عوامل پیام رسانی ۱۸

۲- ۱۰- مطالعات انجام شده در زمینه مقاومت به تنش ۱۹

۲-۱۱- پروموترها ۲۲

۲-۱۱-۱- تقسیم بندی پروموتور بر اساس ساختار ۲۵

۲-۱۱-۱-۱- پروموتورهای پروکاریوتی ۲۵

۲-۱۱-۱-۲- پروموتورهای یوکاریوتی ۲۹

۲-۱۱-۲- انواع پروموتورهای مورد استفاده برای تنظیم بیان ژن ۳۲

۲-۱۱-۲-۱- پروموتورهای دائمی: ۳۲

۲-۱۱-۲-۲- پروموتورهای خاص بافت‌ها: ۳۲

۲-۱۱-۲-۳- پروموتورهای القایی: ۳۳

۲-۱۱-۲-۴- پروموتورهای مصنوعی یا سنتزی: ۳۳

۲-۱۱-۲-۵- پروموتورهای دائمی ۳۴

۲-۱۱-۲-۶- پروموتور پاتوژن‌های گیاهی ۳۵

۲-۱۱-۲-۶-۱- پروموتورهای *Opine* ۳۵

۲-۱۱-۲-۶-۲- پروموتور *CaMV35s* ۳۵

۲-۱۱-۳- پروموتور Cauliflower mosaic virus (*CaMV35s*) ۳۷

۲-۱۱-۳-۱- ساختار پروموتور ۳۷

۲-۱۱-۴- یک پروموتور چگونه تشخیص داده می شود؟ ۳۸

۲-۱۱-۵- تشریح پروموتور ۳۹

۲-۱۱-۶- حدود تقریبی پوشش پروموتور ۳۹

۷-۱۱-۲- سیستم تنظیمی ۴۰
۱-۷-۱۱-۲- پروموتورهای سنتزی ۴۰
۲-۷- ۱۱- ۲- پروموتورهای القایی ۴۳
۳-۷-۱۱-۲- پروموتورهای تنظیم کننده شیمیایی: ۴۴
۱-۳-۷-۱۱-۲- پروموتورهای تنظیم کننده الکلی: ۴۵
۲-۳-۷-۱۱-۲- پروموتورهای تنظیمی فلزی ۴۷
۳-۳-۷-۱۱-۲- پروموتورهای وابسته به پاتوژن (PR) ۴۸
۴-۷-۱۱-۲- پروموتورهای تنظیم کننده فیزیکی ۵۰
۱-۴-۷-۱۱-۲-پروموتورهای تنظیم کننده دمایی ۵۱
۱-۱-۴-۷-۱۱-۲- گرما ۵۱
۲-۱-۴-۷-۱۱-۲- سرما ۵۲
۳-۱-۴-۷-۱۱-۲-پروموتورهای تنظیم کننده نوری ۵۴
۱۲-۲- ژن و پروموتر *rd29a* ۵۴
۱-۱۲-۲- نقش ABA در Signalling ۵۶
۲-۱۲-۲- -پروتئین‌های DREB و نقش آنها در تنش‌های غیرزیستی ۵۹
۳-۱۲-۲- جداسازی *DREB*ها ۶۰
۴-۱۲-۲- بیان ژن‌های کد کننده DREB ۶۰
۵-۱۲-۲- نقش عنصر *DRE* cis-acting در تنش‌های غیرزیستی ۶۲
۶-۱۲-۲- استقلال مسیر پروتئین‌های DREB از مسیر آبسیزیک اسید ۶۳
۱۳-۲- سیستم ترکیبی پروموتر و ژن گزارشگر ۶۴
۱-۱۳-۲- پروموتر *CaMV35S* بعنوان یک پروموتر در سیستم ترکیبی پروموتر- ژن گزارشگر: ۶۵
۱۴-۲- ژن گزارشگر ۶۶
۱-۱۴-۲- -ژن گزارشگر (*GUS*) β -glucurinidase ۶۶
۲-۱۴-۲- ژن گزارشگر لوسیفراز ۶۷
فصل سوم: مواد و روش ها ۶۹
۱ -۳- بخش ملکولی ۶۹
۱-۱-۳- محیط کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها ۶۹
۲-۱-۳- آنتی بیوتیک‌ها: ۷۰
۳-۱-۳- ذخیره باکتری جهت نگهداری طولانی مدت ۷۱
۳-۱-۳-استخراج پلاسمید ۷۱
۴-۱-۳- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA: ۷۳
غلظت DNA ($g\mu\,ml^{-1}$) = ۵۰ × عکس ضریب رقت × (Optical density) OD_{260nm} ۷۳
۵-۱-۳-الکتروفورز با ژل آگاروز ۷۴
۶-۱-۳- طرز تهیه محلول اتیدیوم برماید: ۷۵
۷-۱-۳- تهیه بافر نمونه گذاری(DNA (6x- Loading buffer: ۷۵
۸-۱-۳- طرز تهیه آگارز: ۷۵

۹-۱-۳- طرز تهیه محلول TAE (50X) ۷۶
۱۰-۱-۳- ساخت ناقل پلاسمیدی *pBI - rd29a* ۷۶
۱-۱۰-۱-۳- جداسازی پیشبر *CaMV35S* از پلاسمید *pBI121* ۷۶
۲-۱۰-۱-۳- جدا سازی پیشبر *rd29a* از گیاه آرابیدوپسیس ۷۶
۳-۱۰-۱-۳-جداسازی پیشبر *rd29a* از وکتور همسانه‌ساز *PGEM7ZF(-)* ۷۸
۴-۱۰-۱-۳-روش الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۷۸
۵-۱۰-۱-۳- بازیافت قطعات پیشبر *rd29a* و حامل *pBI121* فاقد پیشبر از روی ژل آگارز ۷۹
۶-۱۰-۱-۳- الحاق قطعات پیشبر *rd29a* و حامل *pBI121* ۸۰
۱۱-۱-۳- روش آماده سازی *E. coli* جهت پذیرش پلاسمید ۸۰
۱۲-۱-۳- اندازه گیری OD (دانسیته نوری) باکتری ۸۱
۱۳-۱-۳- روش تراریختی سلول‌های *E. coli* ۸۱
۱۴-۱-۳- طراحی آغازگر برای پیشبر *rd29a* ۸۲
۱۵-۱-۳- روش انجام PCR برای پیشبر *rd29a* ۸۳
۱۶-۱-۳- روش انتقال پلاسمید به آگروباکتریوم به روش Freeze-Thaw ۸۴
۱۷-۱-۳- انجام PCR برای کلونیهای آگروباکتریوم ۸۵
۲-۳- کشت بافت گیاهی و انتقال ژن ۸۵
۱-۲-۳-محیط کشت گیاهی MS ۸۵
۱-۱-۲-۳- محلول‌های ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی ۸۶
۲-۱-۲-۳- تهیه محیط کشت ۱/۲MS ۸۶
۴-۱-۲-۳- تهیه محیط MS کامل ۸۷
۵-۱-۲-۳- محیط MS گزینش‌گر (Selection Media) ۸۸
۲-۲-۳- تراریخت نمودن گیاه توتون با ژن *rd29a-GUS* ۸۸
۱-۲-۲-۳- تولید گیاهان استریل توتون در محیط ۱/۲MS ۸۹
۲-۲-۲-۳- تراریختی گیاه توتون ۸۹
۳-۲-۲-۳- بهینه‌سازی روش انتقال ژن به توتون ۹۱
۴-۲-۲-۳- انتقال نو ساقه‌های سبز و رشد یافته به محیط ریشه‌زایی ۹۱
۵-۲-۲-۳-انتقال گیاهان تراریخت به گلدان ۹۲
۳-۳-آنالیز گیاهان تراریخت ۹۲
۱-۳-۳- استخراج DNA ژنومی از گیاه توتون ۹۲
۲-۳-۳- اثبات حضور ژن *gus* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۹۵
۳-۳-۳- اثبات حضور پیشبر *rd29a* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۹۷
۴-۳-۳-اثبات حضور ژن *nptII* (کانامایسین)باستفاده از آغازگرهای اختصاصی ۹۸
۵-۳-۳-آنالیز لکه گذاری (DOT Blot) ۹۹
۱-۵-۳-۳- پیش دورگه سازی (Prehybridization) ۹۹
۲-۵-۳-۳- دورگه سازی با کاوشگر نشاندار تک رشته‌ای (Hybridization) ۹۹
۳-۵-۳-۳-شستشوی غشاء (Washing) ۹۹

۴-۵-۳-۳- مراحل آشکار سازی (Detection) ۱۰۰
۶-۳-۳- آنالیز لکه گذاری سادرن (Southern Blot) ۱۰۰
۱-۶-۳-۳- هضم آنزیمی DNAی ژنومی ۱۰۱
۲-۶-۳-۳- تهیه کاوشگر (Probe) ۱۰۱
۳-۶-۳-۳- انتقال DNA از ژل به غشاء: ۱۰۲
۴-۶-۳-۳- پیش دورگه سازی (Prehybridization) ۱۰۳
۵-۶-۳-۳- دورگه سازی با کاوشگر نشاندار تک‌رشته ای (Hybridization) ۱۰۳
۶-۶-۳-۳- شستشوی غشاء (Washing) ۱۰۳
۷-۶-۳-۳- مراحل آشکار سازی (Detection) ۱۰۳
۷-۳-۳- ارزیابی بیان ژن گلوکورونیداز ۱۰۴
۱-۷-۳-۳- طرز تهیه بافر فسفات ۱۰۵
فصل چهارم: نتایج و بحث ۱۱۰
۱- ۴- ساخت حامل پلاسمیدی *pBI – rd29a* ۱۱۰
۲- ۱- ۴- کلون کردن ژن در داخل کلونینگ وکتور ۱۱۰
۳- ۱- ۴- جداسازی پیشبر *rd29a* از وکتور همسانه‌ساز *PGEM7ZF(-)* ۱۱۱
۲- ۴- تلقیح گیاه توتون با استفاده از آگروباکتریوم سویه *Aglo* حاوی وکتور *pBI121* و *pBI-rd29a* ۱۱۲
۳- ۴- انتقال نو ساقه‌های سبز و رشد یافته به محیط ریشه‌زایی ۱۱۲
۴- ۴- انتقال گیاهان تراریخت به گلدان ۱۱۳
۵- ۴- آنالیز گیاهان تراریخت ۱۱۳
۲- ۵- ۴- اثبات حضور ژن *gus* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱۱۴
۳- ۵- ۴- اثبات حضور پروموتر *rd29a* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱۱۴
۴- ۵- ۴- اثبات حضور ژن *nptII* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱۱۵
۵- ۵- ۴- نتایج آنالیز لکه‌گذاری (DOT Blot) ۱۱۵
۶- ۵- ۴- نتایج آنالیز لکه گذاری سادرن (Southern Blot) ۱۱۶
۶- ۴- تیمارهای تنشی ۱۱۶
۱- ۶- ۴- تیمار تنش شوری NaCl ۱۱۷
۲- ۶- ۴- تیمار تنش خشکی (PEG) ۱۱۸
۳- ۶- ۴- تیمار تنش دمایی ۱۱۹
۷- ۴- تنش ABA ۱۲۰
۸-۴- بحث ۱۲۱
۹-۴- نتیجه‌گیری ۱۲۴
۱۰-۴- پیشنهادات ۱۲۵
فصل پنجم: منابع مورد استفاده ۱۲۷
منابع و مآخذ ۱۲۷

فهرست جداول

جدول ۱-۲- عناصر چندگانه پروموترها ۳۰
جدول ۲-۲- ژنهای استرس سرمایی *E.coli* ۵۳
جدول ۱-۳- مواد و مقدار مواد مورد نیاز برای تهیه LB ۶۹
جدول ۲-۳- تهیه Loading buffer ۷۵
جدول ۳-۳ - توالی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب پیشبر *rd29a* ۸۲
جدول ۴-۳- ترکیب محلول مادری جهت PCR ۸۳
جدول ۵-۳- برنامه PCR برای پیشبر *rd29a* ۸۴
جدول ۶-۳- توالی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب ژن GUS ۹۶
جدول ۷-۳- شرایط انجام واکنش PCR ۹۶
جدول ۸-۳- توالی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب پیشبر *rd29a* ۹۷
جدول ۹-۳- شرایط انجام واکنشPCR ۹۷
جدول ۱۰-۳- توالی آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب ژن *nptII* ۹۸
جدول ۱۱-۳- شرایط انجام واکنش PCR ۹۸
جدول ۱۲-۳- هضم آنزیمی دوگانه ۱۰۱
جدول ۱۳-۳- هضم آنزیمی تک گانه ۱۰۱
جدول ۱۴-۳- واکنش PCR برای تهیه پروب ۱۰۲
جدول ۱۵-۳- ترکیب بافر ایکس- گلوگ برای بررسی بیان ژن *GUS* ۱۰۵

فهرست تصاویر

شکل ۱-۱- نحوه عمل محصولات ژنی قابل تحریک با تنش اسمزی ۴
شکل ۱- ۲- مسیر ترجمه یا ساخته شدن پروتئین از روی DNA ۲۴
شکل ۲- ۲- نمونه ای از سازماندهی ژن ۲۴
شکل-۳-۲- فاصله مطلوب RNA پلیمراز ۲۷
شکل ۴-۲- افزایش فاصله مطلوب RNA پلیمراز ۲۷
شکل ۵-۲- سیستم تنظیمی استرس ۲۹
شکل ۶-۲- ساختار ژن در یوکاریوت‌ها ۲۹
شکل ۶-۲ – مثال هایی از چند ترکیب پروموتور *UAS* ۳۶
شکل ۷-۲- توالی نوکلئوتیدی *CaMV35S* ۳۸
شکل ۸-۲ ناحیه تنظیمی Ubiquitin گیاهی حاوی یک پروموتور باضمایم ۴۰
شکل -۸-۲- اجزای یک پروموتر سنتزی ۴۲
شکل ۹-۲ یک کاست بیانی القاء شونده با الکل ۴۷
شکل ۱۰-۲- پلاسمید حاوی پروموتور *PR-1* ذرت ۵۰
شکل۳-۱- وکتور همسانه ساز PGEM7ZF(-) ۷۷
شکل۳-۳- نقشه فیزیکی باینری وکتور *pBI121 –rd29a-GUS* ۸۲
شکل ۱-۴- PCR پیشبر *rd29a* ۱۱۰
شکل۲- ۴- وکتور همسانه‌ساز ۱۱۰
شکل ۳- ۴- هضم آنزیمی پلاسمید *rd29a* *PGEM7ZF*(-) ۱۱۱
شکل ۴- ۴- هضم وکتور *pBI -rd29a* ۱۱۱
شکل ۴- ۴- هضم وکتور *pBI -rd29a* ۱۱۲
شکل ۶- ۴- ریشه‌زایی نمونه‌های باززا شده ۱۱۲
شکل ۶- ۴- نمونه‌های منتقل شده به گلدان ۱۱۳
شکل ۷- ۴- استخراج DNA ژنومی از گیاه توتون ۱۱۳
شکل ۸- ۴- PCR ژن *gus* ۱۱۴
شکل۳- ۴- PCR پروموتر *rd29a* ۱۱۴
شکل ۱۰- ۴- PCR ژن *nptII* ۱۱۵
شکل ۱۱- ۴- نتایج آنالیز لکه‌گذاری (DOT Blot) ۱۱۵
شکل ۱۲- ۴- نتایج آنالیز لکه گذاری سادرن (Southern Blot) ۱۱۶
شکل ۱۲- ۴- تیمارهای شوری (NaCl) ۱۱۷
شکل ۱۳- ۴- تیمارهای خشکی ۱۱۸
شکل ۱۳- ۴- تیمارهای دمایی ۱۱۹
شکل ۱۴- ۴- تیمار ABA ۱۲۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

از آنجایی که گیاهان همواره در جای خود ثابت هستند، رشد و عملکردشان به شدت تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی، شوری و تغییرات دمایی است. طبق آمارها ۷۰ درصد از عملکرد بالقوه گیاهان زراعی بر اثر تنش‌های محیطی کاهش می‌یابد. در این میان، تنش آبی ناشی از خشکی و دمای بالا رایج‌ترین تنش غیرزیستی است که رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد.

چنگ و همکاران (۱۹۹۹) اذعان داشتند گیاهان به وسیله یک سری فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به این شرایط واکنش نشان می‌دهند و با آنها سازگار می‌شوند. مسیرهای پیام رسانی متعددی وجود دارند که واکنش گیاهان به تنش را تنظیم می‌کنند. در ضمن بین شبکه‌های انتقال پیام عوامل تنشی متفاوت همپوشانی وجود دارد. کشف ساز و کاری که گیاهان بدان وسیله پیام‌های محیطی را دریافت می‌کنند و انتقال این مکانیزم به سایر گیاهان برای فعال کردن این واکنش در آنها و بهبود تحمل به تنش در گیاهان تراریخته یک هدف مهم اصلاحی می‌باشد.

تنش‌های غیرزیستی در واقع تحریکات پیچیده‌ای هستند که اطلاعات خاصی را در اختیار گیاه قرار می‌دهند. براساس چندگانه بودن مسیرهای پیام‌رسانی، احتمالاً چندین حسگر اولیه وجود دارند که پیام‌های اولیه تنش را دریافت و با بیان تعداد زیادی ژن به آنها پاسخ می‌دهند. واکنشهای سلولی و مولکولی به تنش‌های غیرزیستی شامل دریافت پیام، انتقال پیام به سیتوپلاسم و هسته، بیان ژن و سرانجام

تغییرات متابولیکی است که به تحمل به تنش منجر می‌شود. ژن‌هایی که توسط تنش تحریک می‌شوند براساس عمل محصول‌شان در دوگروه قابل دسته‌بندی هستند (شکل ۱-۱).

الف- گروه اول شامل موارد زیرند:

- پروتئین‌های کارکردی[1] همچون پروتئین‌های غشا که حرکت آب را در غشای سلولی کنترل می‌کنند (پروتئین‌های کانال آب و ترانسپورترهای غشایی).
- آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز اسمولیت‌ها (پرولین، بتائین، قندها و ...)
- آنزیم‌های سم‌زدا[2] که متابولیسم سلولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را در حد نرمال نگه می‌دارند (glutathione S-transferase, hydrolase, catalase, suproxide dismutase and ascorbate peroxidase).
- و پروتئین‌های دیگری که در محافظت از ماکرومولکول‌ها نقش دارند (LEAprotein, osmotin, antifreeze proteins, chaperons and mRNA binding protein etc.).

تحمل به تنش خشکی و شوری را می‌توان با ورود ژن‌های کدکننده پروتئین‌های LEA، پرولین سنتتاز یا بتائین سنتتاز و غیره در گیاهان افزایش داد.

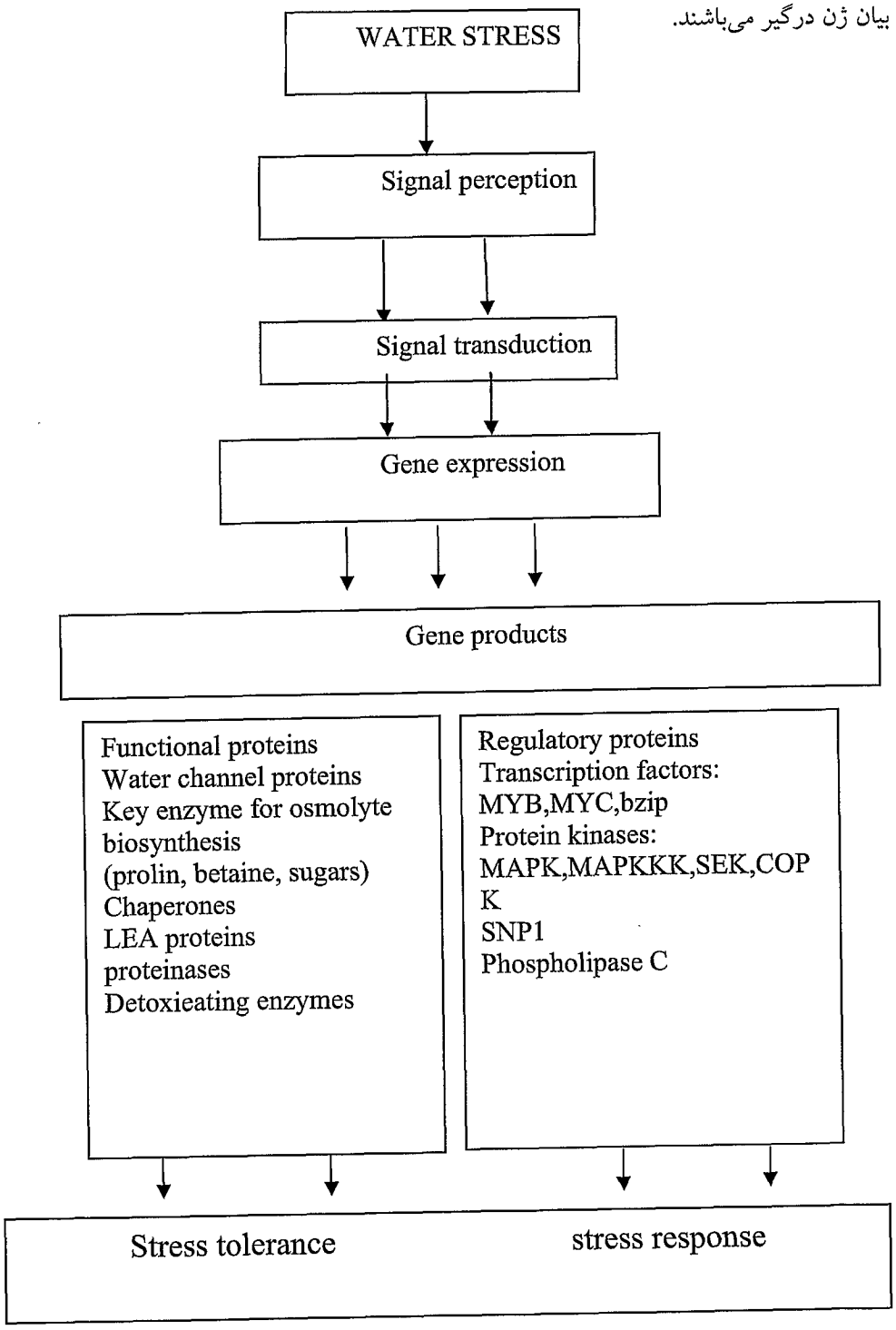
ب- اما گروه دوم پروتئین‌های تنظیمی[3] یعنی عوامل رونویسی (bZIP, MYC, MYB and DREB, tec).پروتئین کینازها (MAP kinase, CDPkinase, receptor protein kinase, ribosomal-protein kinase and transcription-regulation protein kinase, etc.) و

1 - Functional proteins

2 - Detoxification enzymes

3 - Regulatory

پروتئینازها (Phosphoesterses and phospholipase C, etc.) هستند که در تنظیم انتقال پیـام و بیان ژن درگیر می‌باشند.



شکل ۱-۱- نحوه عمل محصولات ژنی قابل تحریک با تنش اسمزی در واکنش به تنش. محصولات این ژن‌ها به پروتئین‌های regulatory (تنظیمی) که در بیان ژن و انتقال سیگنال در واکنش به تنش اسمزی فعالیت دارند.

عوامل فعال کننده رونویسی با یک‌سری توالی خاص در ناحیه راه‌انداز ژن‌های مربوط به تنش‌های غیرزیستی کنش دارند و بنابراین بیان تعداد زیادی ژن را افزایش می‌دهند که منجر به افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی می‌شوند. آنالیزهای ژنومی و مولکولی نشان می‌دهند که بسیاری از سیستم‌های تنظیم رونویسی در تحریک ژن‌ها برای واکنش دادن به تنش دخالت دارند. تحقیقات اخیر تعداد زیادی از عوامل رونویسی را که در تنظیم واکنش به تنش‌های مختلف دخیل هستند را معرفی کرده‌اند.

عوامل رونویسی اغلب شامل خانواده‌هایی از پروتئین‌ها هستند که یک دامین[4] هومولوگ مشترک برای اتصال به DNA دارند.

پروتئین‌های متصل شونده به عنصر واکنش‌دهنده به بی آبی[5] (DREB) عوامل رونویسی هستند که یکسری از ژن‌های مربوط به تنش غیرزیستی را تحریک می‌کنند و موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش می‌شوند.

۲- ۱- مهندسی تحمل به تنش

استراتژی‌های سنتی اصلاحی، تعداد کمی واریته زراعی متحمل به تنش ایجاد کرده است. ونگ و همکاران (۲۰۰۶) اظهار کردند که برخلاف اصلاح کلاسیک و انتخاب به کمک مارکر، به نظر می‌رسد که انتقال مستقیم ژن با استفاده از مهندسی ژنتیک، راه حل جذاب‌تر و سریع‌تری برای بهبود تحمل به تنش باشد. این موضوع در مورد مبارزه با آفات و کاهش علف‌های هرز موفق بوده است. در مورد تنش‌های

4 - Domain

5 - Dehydration responsive element binding proteins

غیرزیستی، مهندسی پروتئین‌های تنشی یا آنزیم‌هایی که در مسیرهای بیوسنتزی مربوط به واکنشهای تنشی درگیر هستند، همواره مورد توجه دانشمندان بوده است.

ظاهراً وارد کردن هرتک ژن، ممکن است تحمل پایدار به تنش را در بر نداشته باشد و بیان دائمی این ژن‌ها با استفاده از راه‌اندازهای دائمی[6] ممکن است پیچیدگی زیادی مثل کمبود انرژی و سایر اثرات مضر را باعث شود(شیماموورا و همکاران، ۲۰۰٤).

مهندسی ژنتیک گیاهی برای تحمل به تنش‌های شدید غیرزیستی، به وسیله تنظیم بیان عوامل رونویسی تحریک شده در تنش انجام می‌شود که در نتیجه بیان تعداد بسیاری از ژن‌های پائین دست مربوطه تنظیم می‌شود. بنابراین عوامل رونویسی ابزاری قدرتمند برای مهندسی ژنتیک هستند، زیرا اوراکسپرس[7] آنها منجر به تنظیم یک‌سری از ژن‌های تحت کنترل آنها می‌شود.

با این فرض، اهداف زیر منظور نهایی این تحقیق می‌باشد.

ساخت سازه[8] *pBIrd29a* جهت انتقال به گیاهان مختلف، انتقال این سازه به گیاه توتون و بررسی و مقایسه بیان ژن *GUS* با پیشبر *rd29a* و *CaMV35S* در شرایط مختلف تنش‌های محیطی.

6 - Constitutive

7 - Overexpression

8 -Construction

۱-۱- مقدمه

از آنجایی که گیاهان همواره در جای خود ثابت هستند، رشد و عملکردشان به شدت تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی همچون خشکی، شوری و تغییرات دمایی است. طبق آمارها ۷۰ درصد از عملکرد بالقوه گیاهان زراعی بر اثر تنش‌های محیطی کاهش می‌یابد. در این میان، تنش آبی ناشی از خشکی و دمای بالا رایج‌ترین تنش غیرزیستی است که رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد.

چنگ و همکاران (۱۹۹۹) اذعان داشتند گیاهان به وسیله یک سری فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به این شرایط واکنش نشان می‌دهند و با آنها سازگار می‌شوند. مسیرهای پیام رسانی متعددی وجود دارند که واکنش گیاهان به تنش را تنظیم می‌کنند. در ضمن بین شبکه‌های انتقال پیام عوامل تنشی متفاوت همپوشانی وجود دارد. کشف ساز و کاری که گیاهان بدان وسیله پیام‌های محیطی را دریافت می‌کنند و انتقال این مکانیزم به سایر گیاهان برای فعال کردن این واکنش در آنها و بهبود تحمل به تنش در گیاهان تراریخته یک هدف مهم اصلاحی می‌باشد.

تنش‌های غیرزیستی در واقع تحریکات پیچیده‌ای هستند که اطلاعات خاصی را در اختیار گیاه قرار می‌دهند. براساس چندگانه بودن مسیرهای پیام‌رسانی، احتمالاً چندین حسگر اولیه وجود دارند که پیام‌های اولیه تنش را دریافت و با بیان تعداد زیادی ژن به آنها پاسخ می‌دهند. واکنشهای سلولی و مولکولی به تنش‌های غیرزیستی شامل دریافت پیام، انتقال پیام به سیتوپلاسم و هسته، بیان ژن و سرانجام