١٠٢٧٠٩

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی

جداسازی و تعیین خصوصیات ژن DREB

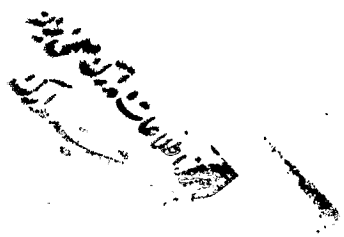
(Dehydration -Responsive Element Binding protein)

القاء کننده تحمل به تنش خشکی در گیاه گندم از دو منبع ژنو می و cDNA

به وسیله‌ی :

سحر صادقی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۵



استاد راهنما:

دکتر ساسان محسن زاده

دکتر حسن محبت کار

خرداد ۱۳۸۶

۱۰۲۷۵۹

به نام خدا

جداسازی و تعیین خصوصیات ژن DREB
(Dehydration-Responsive Element Binding protein)
القاء کننده تحمل به تنش خشکی در گیاه گندم از دو منبع ژنومی و cDNA

به وسیله ی:

سحر صادقی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی

از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته ی:

زیست شناسی سلولی و مولکولی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

اساتید راهنما: دکتر ساسان محسن زاده، استادیار بخش زیست شناسی.....

دکتر حسن محبت کار، استادیار بخش زیست شناسی.....

اساتید مشاور: دکتر مصطفی سعادت، استاد بخش زیست شناسی.....

دکتر علی نیازی، استادیارمرکز بیوتکنو لوژی دانشکده کشاورزی.....

دکتر حسن پاک نیت، دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی.....

خرداد ماه ۱۳۸۶

تقدیم به

پدر مهربان، مادر دلسوز و خواهران عزیزم که همیشه در کنارم بوده اند

و به

همسر وفادارم که همواره یار و همراه من است

و به

فرزند شیرین و نازنینم امیر رضا

سپاس

پروردگار من
آنچه از فضلت بر من ارزانی داشته ای، کاملش بنما و
آنچه از روی آقائیت به من بخشیده ای از من باز مستان

خدای من
بهترین داراییت را امید دارم ، بر عطاهای تو تکیه بنموده ام
و به نگهداری تو نیازمندم

بدینوسیله از اساتید گرامی ام آقای دکتر ساسان محسن زاده که در مسیر به انجام رساندن این پایان نامه از هیچ کمک و راهنمایی دریغ نداشتند و آقای دکتر حسن محبت کار که با راهنمایی های خویش مرا بسیار یاری نمودند ونیز از آقای دکتر مصطفی سعادت ، آقای دکتر علی نیازی و آقای دکتر حسن پاک نیت که به عنوان اساتید مشاور از مشاورت و همراهی ایشان بهره مند بودم ، سپاسگزاری، تشکر و قدر دانی می نمایم.
از آقای دکتر امین ا... بهاءالدینی که نمایندگی تحصیلات تکمیلی بنده را تقبل نمودند کمال تشکر را دارم.
از دوستان و همکلاسی های عزیزم ونیز سایر پرسنل بخش زیست شناسی که به من در انجام این پایان نامه کمک نمودند بسیار تشکر و سپاسگزاری می نمایم.

چکیده

جداسازی و تعیین خصوصیات ژن DREB (Dehydration-Responsive Element Binding protein) القاء کننده تحمل به تنش خشکی در گیاه گندم از دو منبع ژنو می و cDNA

به وسیله ی:
سحر صادقی

گیاهان در طول زندگی خود با طیف وسیعی از ناملایمات و تنش های محیطی روبرو هستند که از جمله آنها تنش های غیر زیستی همچون خشکی ، شوری و سرما هستند که اثرات متعددی بر رشد و میزان تولید گیاهان دارند. تنش خشکی یکی از تنش های غیر زیستی محیطی است که به شدت میزان و رشد محصولات گیاهی و کشاورزی را محدود می کند.در مطالعات صورت گرفته بر روی پاسخهای مولکولی گیاهان به تنش ها ژنهای بسیاری شناخته شده اند که شامل دو گروه ژن های عملکردی و ژن های تنظیمی هستند.از جمله ژنهای تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش ها ،خانواده بزرگ فاکتور های رونویسی AP_2/ERF هستند که تنها در دنیای گیاهی یافت می شوند و مشخص ترین ویژگی آنها داشتن ناحیه ای حفاظت شده به نام $AP_2/EREBP$ domain است.این خانواده بزرگ از چندین زیر خانواده تشکیل شده که یکی از مهمترین آنها زیر خانواده DREB(Dehydration-Responsive Element Binding protein) است. در این پژوهش یافتن ژنی از این زیر خانواده در ژرم پلاسم گندم ایرانی (رقم سرداری)مورد تحقیق بوده است. در این تحقیق، بذر های رقم سرداری در محیط هیدروپونیک کشت داده شدند. سپس گیاهان رشد یافته به مدت ۱۴ روز ، تحت تنش خشکی توسط پلی اتیلن گلیکول قرار گرفتند و بعد از گذشت ۲ روز،سریعا برگهای گیاه فریز شده و استخراج RNA و ساخت cDNA به کمک کیت صورت گرفت. بعد از انجام فرایند PCR به کمک پرایمر های طراحی شده و انجام الکتروفورز ژل آگاروز هم برای DNA و هم برای cDNA، باندی حدود ۷۰۰ bp برای هر دو منبع ژنو می و cDNA و برای تمام تنش ها به دست آمد. توالی ۶۴۵ نوکلئوتیدی بدست آمده با شماره دسترسی ES466900 در بانک جهانی ژن ثبت گردید.حضور ناحیه AP_2/ERF در این ژن به کمک پایگاههای جستجوی موتیف های پروتئینی از جمله CDART, Pfam, CDD, SMARTو PROSITE مورد تایید قرار گرفت.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- پاسخهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان نسبت به تنش خشکی ۲
۱-۳- اهمیت مطالعه پاسخهای فیزیولوژیکی و ملکولی گیاهان به تنشهای محیطی ۴
۱-۴- روشهای اعمال تنش خشکی در آزمایشگاه ۶
۱-۵- خانواده بزرگ فاکتورهای رونویسی AP_2/ERF ۷
۱-۵-۱- ناحیه AP_2/ERF ۷
۱-۵-۱-۱- زیر خانواده $Apetala_2$ ۸
۱-۵-۱-۲- زیر خانواده ERF ۸
۱-۵-۱-۳- زیر خانواده RAV ۹
۱-۵-۱-۴- زیر خانواده DREB ۹
۱-۵-۲- توالی DRE/CRT ۱۰
۱-۵-۳ - GCC box ۱۰
۱-۶ - تیره گندم ۱۱
۱-۶-۱- گندم رقم سرداری ۱۱
۱-۷ - هدف پروژه ۱۲

فصل دوم: مروری بر تحقیقات گذشته

مروری بر تحقیقات گذشته ۱۴

عنوان | صفحه

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۲۰
۳-۲ - مواد مورد نیاز ۲۱
۳-۳- روشها ۲۱
۳-۳-۱- کاشت بذر گندم در پتری دیش و اندازه گیری درصد جوانی زنی ۲۱
۳-۳-۲ - اندازه گیری مقدار آب نسبی (Relative Water Content)RWC ۲۲
۳-۳-۳- استخراج DNA ۲۴
۳-۳-۴- انجام واکنش PCR برای DNA استخراج شده از گیاه ۲۶
۳-۳-۵- الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR ۲۷
۳-۳-۶ - اعمال تنش خشکی به گیاهچه های گندم ۲۸
۳-۳--۷ - استخراج RNA ۲۹
۳-۳-۸ - ساخت cDNA ۳۰
۳-۳-۹ - واکنش PCR برای cDNA استخراج شده از گیاه ۳۱
۳-۳-۱۰- خالص سازی محصول PCR به کمک ستون ۳۲
۳-۳-۱۱- استفاده از نرم افزار های کامپیوتری برای تجزیه و تحلیل توالی بدست آمده ۳۳
۳-۳-۱۲- همسانه سازی (Cloning) ۳۳
۳-۳-۱۲-۱- انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری E.coli نژادDH5α
(Transformation) ۳۴
۳-۳-۱۲-۲- انتخاب پر گنه های حاوی پلاسمید نوترکیب (Clone selection) ۳۵
۳-۳-۱۲-۳- استخراج پلاسمید ۳۵
۳-۳-۱۲-۴- بررسی محصول همسانه سازی شده ۳۶

فصل چهارم: نتایج، بحث و پیشنهادات

۴-۱- درصد جوانه زنی ۳۸
۴-۲ - تعیین میزان RWC ۳۸
۴-۳- استخراج DNA ۳۹
۴-۴ - واکنشPCR و بدست آمدن باند مورد نظر ۳۹
۴-۵- تنش خشکی ۴۰
۴-۶- استخراج RNA ۴۰

عنوان | صفحه

۴-۷ - خالص سازی محصول PCR و تعیین توالی(Sequencing) قطعه مورد نظر ۴۱
۴-۸ - همسانه سازی (Cloning) ۵۰
۴-۹- نتیجه گیری ۵۱
۴-۱۰- پیشنهادات ۵۲
منابع فارسی ۵۴
منابع لاتین ۵۵
پیوست **۶۱**

فهرست جدول ها:

عنوان و شماره صفحه

جدول شماره ۳-۱- عناصر پر مصرف مورد نیاز برای تهیه محلول هوگلند ۲۲
جدول شماره ۳-۲- عناصر کم مصرف مورد نیاز برای تهیه محلول هوگلند ۲۲
جدول شماره ۳-۳- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر استخراج ۲۴
جدول شماره ۳-۴- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر شستشو ۲۴
جدول شماره ۳-۵- مواد مورد نیاز برای تهیه بافرTE ۲۵
جدول شماره ۳-۶ - مواد مورد نیاز برای هر واکنشPCR ۲۷
جدول شماره ۳-۷ - برنامه زمانی و دمایی هر مرحله واکنش PCR ۲۷
جدول شماره۳-۸ - دستور العمل ساخت بافر 5X TBE ۲۸
جدول شماره ۳-۹- محلول واکنش RT ۳۱
جدول شماره۳-۱۰ مواد مورد نیاز برای عمل Ligation ۳۳
جدول شماره ۴-۱ تعداد بذر های دارای بیش از ۲mm ریشه چه در هر پتری دیش..... ۳۸
جدول شماره ۴-۲ RWC گیاه مورد نظر برای استخراج DNA ۳۸
جدول شماره ۴-۳- درصد RWC گیاهان تحت تنش..... ۴۰

فهرست شکل ها:

عنوان و شماره صفحه

شکل شماره ۳-۱- کشت هیدروپونیک گیاهچه های گندم در اتاقک رشد ۲۳
شکل ۴-۱- الکتروفورز ژل آگاروز DNA استخراج شده از گیاه گندم ۳۹
شکل ۴-۲ - باند bp ۷۰۰ از قطعه ژنی بدست آمده از ژنوم گیاه ۳۹
شکل۴-۳ - باند bp ۷۰۰ از قطعه ژنی بدست آمده از cDNA گیاه در تنش های مختلف ۴۱
شکل شماره ۴-۴ - توالی پروتئینی بدست آمده از نرم افزارTranseq ۴۲
شکل شماره ۴-۵ - نتیجه جستجو در پایگاه CDART برای یافتن ناحیه حفاظت شده
AP_2/ERF در توالی بدست آمده ۴۳
شکل شماره۴-۶ - نتیجه جستجو در پایگاه CDD برای یافتن ناحیه حفاظت شده AP_2/ERF
در توالی بدست آمده ۴۴
شکل شماره۴-۷- نتیجه جستجو در پایگاه Pfam برای یافتن ناحیه حفاظت شده AP_2/ERF
در توالی بدست آمده ۴۴
شکل شماره۴-۸ - نتیجه جستجو در پایگاه PROSITE برای یافتن ناحیه حفاظت شده
AP_2/ERF در توالی بدست آمده ۴۴
شکل شماره۴-۹- نتیجه جستجو در پایگاه SMART برای یافتن ناحیه حفاظت شده
AP_2/ERF در توالی بدست آمده ۴۵
شکل شماره۴-۱۰- نمایش سه بعدی ناحیهAP_2/ERF نتیجه جستجو در پایگاه Pfam ۴۵
شکل شماره۴-۱۱ - نتیجه حاصل از alignment ناحیه AP2/ERF در توالی به دست آمده با
چند توالی در بانک جهانی ژن ۴۷
شکل شماره ۴-۱۲- شجره نامه تهیه شده به کمک نرم افزار DNAMAN ۴۹
شکل شماره ۴-۱۳- پتری حاوی کلون های آبی و سفید ۵۰
شکل ۴-۱۴ - باند bp ۷۰۰ تایید کننده حضور ژن مورد نظر در پلاسمید های نوترکیب ۵۱

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱-۱ مقدمه

گیاهان در طول زندگی خود با طیف وسیعی از ناملایمات و تنش های محیطی روبرو هستند (Knight and Knight,2001). برای مثال تنش های غیر زیستی محیطی همچون خشکی، سرما و شوری که اثرات متعددی بر رشد و میزان تولید گیاهان دارند (Sakuma *etal.*, 2002) . گیاهان به این نوع تنش ها پاسخ داده و در برابر آنها خود را تطبیق می دهند تا بتوانند تحت شرایط تنش بقای خود را حفظ کنند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) .

آب جزو مهمترین نیازهای موجودات زنده است که کمبود و یا کیفیت نامطلوب آن همواره استقرار، رشد و عملکرد گیاهان را با محدودیت مواجه ساخته است. این مشکل نه تنها در مناطق خشک و نیمه خشک مورد توجه می باشد، بلکه در نقاط پر بارش ولی با پراکنش نامطلوب بارندگی، نیز دارای اهمیت می باشد(Somerville and Briscoe,2001) . خشکی های مکرر و کمبود آب مداوم، قدرت تولید غذا را در مناطق مختلف جهان تهدید می کند. طبق مطالعات انستیتو بین المللی مدیریت آب IWMI (International Water Management Institute) یک سوم جمعیت جهان در سال ۲۰۲۵ در مناطق خشک زندگی خواهند نمود(Inocencio and Sally,2003) .

تنش های غیر زیستی مختلف خشکی، شوری و سرما گرچه به شکل های مختلف اعمال می شوند ولی همگی اثر مشابهی بر میزان آب گیاه دارند. تحت این تنش ها سلولهای گیاهی آب از دست می دهند و فشار تورژسانس آنها کاهش پیدا می کند. در این تنش ها فشار اسمزی در گیاهان دستخوش تغییر شده و همه این تنش ها نوعی تنش اسمزی محسوب می شوند (Sakuma *et al.*, 2002) . در پاسخ به تنش ها، گیاهان خود را در سطح مورفولوژی، آناتومی، فیزیولوژی و بیوشیمی تطبیق می دهند (Zhang *et al.*, 2000) . مکانیسم هایی که گیاهان برای بالا بردن تحمل خود در برابر تنش ها بکار می برند شامل سازگاری های فیزیکی و تغییرات سلولی و ملکولی است که بلافاصله بعد از دریافت پیام های تنش صورت می گیرد (Knight and Knight, 2001). ماهیت پاسخ ها به گونه ای است

که به عواملی چون شدت و مدت تنش، ژنوتیپ گیاه، مرحله تکوینی و فاکتورهای محیطی بوجود آورنده تنش بستگی کامل دارد (Bray,1993). تنش ها به عنوان عامل بیرونی که اثر سوء بر رشد و نمو گیاه دارند شناخته شده اند (Taiz and Zeiger, 2002).

خشکی یکی از تنش های اصلی محیطی است که بشدت میزان و رشد محصولات گیاهی و کشاورزی را محدود می کند و با توجه به خشک و یا نیمه خشک و کم آب بودن اکثر مناطق جهان از جمله کشور ما ایران این تنش بصورت جدی محصولات و تولیدات کشاورزی را تهدید می کند. مانند سایر تنش های غیر زیستی، خشکی تغییرات اساسی در رشد و تکوین محصولات زراعی از طریق تغییرات پیچیده درمسیرهای فیزیولوژی را باعث می شود (Pellegrineschi *etal* ., 2002) .

۱-۲ پاسخهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان نسبت به تنش خشکی

پاسخ های فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش خشکی شامل تغییراتی در فیزیولوژی جذب و انتقال آب، میزان فتو سنتز، افزایش مقدار اسمولیتها که در تنظیم اسمزی موثرند و تغییر در رشد و نمو گیاه است. پاسخ های بیوشیمی نیز شامل تغییر در بیوسنتز اسیدهای آمینه، پروتئین ها ، کربوهیدراتها که متابولیسم گیاه را تحت تاثیر قرار می دهند، می باشد. اولین مرحله در شروع پاسخهای مولکولی دریافت پیام تنش و فرستادن اطلاعات درباره آن از طریق یک مسیر آبشاری انتقال پیام می باشد (Knight and Knight,2001). این مسیر در نهایت به تغییرات فیزیولوژیکی نظیر بسته شدن روزنه ها و یا بیان برخی ژنها و در نتیجه تغییر فرآیندهای سلولی و مولکولی منجر می گردد (Knight and Knight,2001). چون این تغییرات بوسیله ژنها تنظیم می شوند تلاشها در سالهای اخیر برروی جدا سازی و شناسایی ژنهای القا شونده توسط تنش ها متمرکز بوده است (Zhang *etal*., 2000) .

مسیر انتقال پیام در پاسخ به تنش های محیطی ترکیبات و پروتئین های زیادی را شامل می شود(Seki et al., 2003) .

تحت شرایط تنش نه تنها ژنهایی با محصولات متابولیکی برای حفاظت سلول در برابر کمبود آب بیان می شوند بلکه ژنهایی برای تولید محصولات لازم در مسیر های آبشاری انتقال پیام تحت این تنش ها تنظیم و القا می شوند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) .

در مطالعات اخیر برروی پاسخ های مولکولی گیاهان ژن های بسیاری شناخته شده اند. این ژنهای القا شونده تحت تنش براساس نقش محصولاتی که کد می کنند به دو دسته تقسیم می شوند:

۱-گروه اول شامل پروتئین های عملکردی (Functional) است که احتمالا در تحمل به تنش نقش دارند از جمله:

- کانالها و پروتئین های غشائی برای عبور دادن آب از غشاء
- آنزیمهایی که موجب ساخته شدن تنظیم کننده های اسمزی مختلف (مانند قندها ، بتائین، پرولین و غیره) می شوند.
- پروتئین هایی که از ماکرومولکولها و غشاء ها در سلولها محافظت می کنند مانند اسمتین ،پرونئین های LEA ، پروتئین های ضد یخ زدگی ، چاپرونها (برای تنظیم منفی پروتئازها و یوبیکوئیتین (Bray,1993)) و پروتئین های باند شونده به mRNA
- پروتئازها: برای تخریب پروتئین های آسیب دیده طی از دست رفتن آب سلولی (مانند یوبیکوئیتین) (Bray,1993) .
- آنزیمهای سم زدا (GST، کاتالاز ، سوپر اکسیداز دسموتاز و غیره)

۲-گروه دوم شامل پروتئین های تنظیمی است که عوامل پروتئینی درگیر در تنظیم آبشار انتقال پیام هستند که احتمالا در پاسخ به تنش دخالت دارند از جمله:

- پروتئین کینازها
- فاکتورهای رونویسی
- فسفو لیپاز C
- پروتئین های ۳-۳- ۱۴

در هنگام مواجه گیاه با تنشهای غیر زیستی مانند خشکی، شوری و سرما، هورمون گیاهی آبسیزیک اسید (ABA) افزایش می یابد و نقش های بسیار مهمی در تحمل گیاه به این تنشها ایفا می کند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) .

در این تنش ها ABA از مسیر بیوسنتز کاروتنوئید بوجود آمده و غلظت آن در سلول افزایش پیدا می کند (Bray, 1993). بنابراین ABA یک پیام فیزیولوژیکی اساسی در پاسخ به تنش ها از جمله تنش خشکی است(Kizis *etal.*, 2001)؛ و بیان ژنهای بسیاری که برای پاسخ به تنش خشکی مورد نیاز است را القا می کند. سنتز ABA نیاز به آنزیم ها و پروتئین های متعددی دارد که لازم است ژن های کد کننده این آنزیم ها قبل از سایر ژنها بیان شوند (Bray, 1993) . مطالعات نشان داده همه ژنهای القا شونده تحت شرایط خشکی بوسیله ABA القا نمی شوند بلکه تعدادی از این ژنها در عدم حضور ABA بیان می شوند(Bray, 1993) .

بنابراین هم اکنون فرض بر این است که ۴ مسیر سیگنالی مستقل از یکدیگر بیان ژنهای القا شونده تحت شرایط خشکی را بر عهده دارند : دو مسیر وابسته به ABA و دو مسیر مستقل از ABA (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) .

در یکی از مسیرهای وابسته به ABA ، این هورمون باعث بیان ژنهای القاء شونده تحت تنش می گردد. این ژنها در پروموتور خود عنصر cis-acting با نام ABRE (Abcisic acid Responsive Element) دارند که فاکتورهای رونویسی از نوع bZIP به آن متصل می شوند. ABRE در القا ژنها بعد از تجمع ABA طی تنش عملکرد دارد. در مسیر دیگر وابسته به ABA ، بیان ژنهای القا شونده تحت تنش نیاز به بیوسنتز فاکتورهای رونویسی دیگری ازجمله MYB و MYC و همچنین bZIP دارد. از جمله این ژنها rd22 است که در پروموتور خود دارای ناحیه ای ۶۷ بازی است که بوسیله فاکتورهای رونویسی شناسایی و بیان ژن القا می گردد. بسیاری از فاکتورهای رونویسی که تحت القاء ABA بیان می شوند در تنظیم تدریجی ژنها دخیل اند.

ازجمله ژنهای القا شونده در مسیر غیر وابسته به ABA، Kin1, rd29A(LTi78,COr78) (Kin 2) ، COr6.6 ، COr47(rd17) هستند که در پروموتور آنها عنصر cis-acting DRE (Dehydration Responsive Element) وجود دارد. DRE در تنظیم "ژنهای سریع القا شونده" تحت تنش نقش دارد و فاکتورهای رونویسی به نام DREB این عنصر را شناسایی کرده به آن متصل می شوند و به این ترتیب بیان ژنهای دارای این عنصر را القا می کنند.

مسیر دیگر غیر وابسته به ABA کاملا شناسایی نشده اما ژنهایی مانند rd 21، rd 19 در این مسیر بیان می شوند که نه به سرما پاسخ می دهند و نه به ABA و کد کننده پروتئازها هستند(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) .

۱-۳ اهمیت مطالعه پاسخهای فیزیولوژیکی و ملکولی گیاهان به تنشهای محیطی

در سالهای اخیر اطلاعات زیادی درباره مسیرهای انتقال پیام طی تنش ها بدست آمده است که هر کدام از این مسیرها تنها بخشی از شبکه پیچیده انتقال پیام بوده و همپوشانی عظیمی بین شاخه های مختلف این شبکه وجود دارد (Knight and Knight,2001).

اهمیت مطالعه پاسخهای فیزیولوژیکی و ملکولی گیاهان به تنشهای محیطی از جمله تنش خشکی در مدیریت کشاورزی در مورد زمان و نحوه کاشت، داشت و برداشت محصولات زراعی و همچنین در برنامه ریزی تحقیقاتی به منظور اصلاح گیاهان بطریق کلاسیک و یا روشهای نوین بیوتکنولوژی می باشد. برای انتقال ژن به گیاهان زراعی بایستی اطلاعات کافی در مورد پاسخ های مولکولی گیاهان در دسترس باشد (Bohnert and Jense, 1996) .

در توسعه استراتژی های اکتشاف ژنهای گیاهی که باعث جداسازی ژنهای جدید بسیاری از گیاهان شده چند رویکرد اساسی آزمایشگاهی دخیل بوده اند :

۱- دستیابی به نقشه ژنتیکی گیاهان و توانایی جداسازی ژنها براساس نقشه

۲- استفاده از بر همکنش های پروتئین- پروتئین که اجازه جداسازی چندین ژن شرکت کننده در یک مسیر واحد یا فرآیند متابولیکی مشترک را می دهد.

۳- بیوانفورماتیک: بخصوص توسعه و استفاده از اطلاعات EST، جستجوی اینترنتی، روشهای آنالیز سریع بیان ژنها در پاسخ به تنش های محیطی و یا مراحل مختلف تکوین.

پیشرفتهای چشمگیر اخیر در این عرصه ها می تواند اثر مهمی در بهبود و اصلاح محصولات و تولیدات کشاورزی که غذای اصلی مردم جهان هستند داشته باشد (Gregory, 1998).

با توجه به شرایط اقلیمی خشک و نیمه خشک ایران و محدودیت آب، تهیه ارقام و لاین های که در شرایط تنش آبی (خشکسالی) بتوانند عملکرد قابل قبول و پایداری داشته باشند ضرورت دارد. برای دستیابی به چنین لاین ها و ارقامی از روش های گزینش بر مبنای شاخص های تحمل به تنش می توان استفاده کرد . برای حصول به این هدف، شناخت کافی از خصوصیات ژنتیکی صفات در نباتات مختلف برای اتخاذ تدابیر اصلاحی از اهمیت ویژه ای برخوردار است برای انجام هر برنامه اصلاحی، اطلاع از ساختار ژنتیکی و چگونگی کنترل صفات توسط ژن ها ضروری است. بررسی های ژنتیک و فیزیولوژیک در موسسه تحقیقات دیم نشان داده است که ارقام برخوردار از زودرسی، طول و حجم بیشتر ریشه ، طول زیاد کلئوپتیل، برگ های نازک و باریک و مومی بودن اندام ها از ویژگی های مهم در تحمل گیاه به تنش خشکی و سرما به شمار می آیند(اسکندری،۱۳۷۷).

طی سالیان متمادی، کشاورزان روش گزینش صفات مورد نظر و تولید گیاهان برتر از نظر عملکرد کمی و کیفی و نیز تحمل شرایط نامساعد محیطی را بدون اطلاع از مکانیسمهای موجود در گیاه، انجام داده اند. اما تشخیص صفات با ارزش و موثر و بکار گیری آنها در نسلهای آینده گیاه از اهمیت فوق العاده ای در اصلاح نباتات برخوردار می باشد. گرد آوری ژنهای مورد نظر در یک گیاه از طریق کلاسیک یک فرایند طولانی، پر زحمت و وابسته به ژرم پلاسم می باشد(Babu *etal.*, 2004) .

گرچه روشهای معمول اصلاح و گزینش گیاهان مناسب، سبب پیشرفت استفاده از گیاهان مقاوم شده اما با پیشرفتهای صورت گرفته در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، تغییر و انتقال ژنهای کنترل کننده خصوصیات گیاهان امکان پذیر شده و موجب تحمل به تنشهای غیر زیستی در گیاهان شده است (Pellegrineschi *etal.*, 2004).

پاسخ گیاهان به تنش های غیر زیستی بصورت چند ژنی است؛ بنابراین انتقال تنها یک ژن به گیاه ترا ریخت احتمالا نخواهد توانست تمام آبشار های تغییرات سلولی لازم برای تحمل به تنش را در گیاه فراهم آورد مگر آنکه از ژنهای تنظیمی خاصی استفاده شود (Zhang *etal.*,2000).

اخیرا ژنهای کد کننده فاکتورهای رونویسی القاء شونده تحت تنش های غیر زیستی شناسایی و کلون شده و در آزمایشات مهندسی ژنتیک بکارگرفته شده اند و بیان این ژنها باعث افزایش تحمل به تنش ها به طور موفقیت آمیز شده است(Zhang *etal.*, 2000) .

با توجه به محدودیتهایی که در گزینش فنوتیپ مناسب وجود دارد، راههای دیگری مانند استفاده از روش های جدید مولکولی باید برای تکمیل گزینش فنوتیپ مناسب مورد بررسی قرار گیرند(Pellegrineschi *etal.*,2002).

تکنولوژی زیستی بی شک شیوه مناسبی است برای :

۱- تایید عملکرد یک ژن

۲- بهبود عملکرد ژرم پلاسم با وارد کردن ژنی جدید و یا تغییر بیان یک ژن با پروموتورهای مناسب

۳- شناسایی ژنو تیپ های جدید از طریق غربالگری گیاهان تغییر یافته با تعداد زیادی ژن تحت شرایط تنش مختلف (Sakuma *etal.*,2006)

در بین ژنهای جدا شده تا به امروزه چند گروه ژنی هدف اصلی برای بهبود و اصلاح مقاومت (تحمل) به تنش هایی غیر زیستی بوده اند آنها شامل:

- ژن هایی برای بیوسنتز اسمولیتها
- ژن های کد کننده پروتئین ها LEA
- ژن های کد کننده آنزیمهای جمع کننده اکسیژن فعال
- ژن های کد کننده چاپرونها
- ژن های کد کننده فاکتورهای رونویسی
- ژن های کد کننده آنزیمهای تغییر دهنده اسیدهای چرب اشباع غشاء
- ژن های کد کننده پروتئین های مورد نیاز برای برقراری تعادل یونی (Zhang *etal.*, 2000).

با توجه به پیچیدگی تنش های غیر زیستی که از نظر شدت و مدت تنش متفاوت هستند، وارد کردن یک یا تعداد کمی ژن ممکن است اثر محدودی بر میزان تولیدات گیاهان تحت شرایط تنش داشته باشد. یک ژنو تیپ که تحت طیفی از شدت های مختلف تنش، عملکرد خوبی داشته باشد احتمالا ترکیبی از تراژن های کلیدی با آللهای مناسب است (Pellegrineschi *etal.*, 2002).

۱-۴ روشهای اعمال تنش خشکی در آزمایشگاه:

از چند روش برای اعمال تیمار خشکی به گیاهان استفاده می شود:

الف- استفاده از پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت هیدروپونیک و یا در محلول غذایی به منظور آبیاری خاک گلدان

ب- جدا کردن کل گیاه و یا برگهای آن و قرار دادن بمدت چند ساعت در هوای اتاق و یا قرار دادن ظرف کشت بافت در معرض هوای اتاق

ج- کاهش و یا عدم آبیاری خاک گیاه

۱-۵ خانواده بزرگ فاکتورهای رونویسی AP_2/ERF

در مسیر پاسخ به تنش غیر وابسته به ABA، خانواده بزرگی از فاکتورهای رونویسی به نام AP_2/ERF دخیل هستند که نقش مهمی در پاسخ به تنش های غیر زیستی ایفا می کنند. خانواده AP_2/ERF یک خانواده بسیار بزرگ چند ژنی هستند که تنها در دنیای گیاهی یافت می شوند و بیش از صد عضو دارند (Sakuma *etal.*,2002). مهمترین خصوصیت اعضای این خانواده داشتن ناحیه ای متصل شونده به DNA به نام AP_2/ERF domain است. اعضای مختلف این خانواده فرایند های متفاوتی مانند تشکیل گل و برگ تا پاسخ به تنشهای زیستی و غیر زیستی را تنظیم می کنند(Shen *etal.*, 2003) . این عوامل در بسیاری از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، تنباکو، گوجه فرنگی، برنج، گندم، ذرت و غیره شناخته شده اند (Cao *etal.*, 2001).

پروتئین های خانواده AP_2/ERF شامل قسمتهای مشخص زیر هستند:

- ناحیه باند شونده به DNA (ناحیه AP_2)
- ناحیه هدایت کننده به هسته (توالی های بازی)
- نواحی فعال کننده رونویسی (توالی های اسیدی و غنی از سرین)

(Cao *etal.*, 2001)

۱-۵-۱ ناحیه AP_2/ERF

این ناحیه شامل ۳ رشته غیر موازی β-شیت و یک α-هلیکس که بطور موازی بر روی قسمت β-شیت قرار گرفته است (شکل ۲).

ناحیه AP2 دارای دو قسمت است:

۱- یک بخش ۲۰ اسیدآمینه ای در قسمت N- ترمینال که غنی از اسید آمینه های بازی و هیدروفیل است و YRG element نامیده می شود.

۲- بخش C – ترمینال که تشکیل ناحیه آمفیپاتیک α- هلیکس را می دهد وRAYD element نامیده می شود (Kizis *etal.*,2001) .

ناحیه AP_2 که در گونه های مختلف گیاهی بصورت حفاظت شده وجود دارد، دارای ۵۷-۷۰ اسید آمینه می باشد. برخی از زیر خانواده های این خانواده دارای دو ناحیه AP_2 مانند زیر خانواده $Apetala_2$ و بعضی مانند زیر خانواده های ERF(Ethylene Responsive Factor), RAV و DREB (Dehydration Responsive Element Binding factor) دارای یک ناحیهAP_2 هستند.

۱-۵-۱-۱ زیر خانواده $Apetala_2$:

اعضای مختلف این زیر خانواده در مراحل تکوین گیاهان عملکرد دارند برای مثال Apetala2 کنترل تکوین گل و دانه را بر عهده دارد، Aintegumenta شبیه Apetala2 است و تکوین تخمک و اجزای گل را عهده دار است و یا Glossy15 تکوین برگ در ذرت را بر عهده دارد(Sakuma *etal.*, 2002) .

۱-۵-۱-۲ زیر خانواده ERF:

بیان این دسته از فاکتورهای رونویسی در هنگام آسیب دیدگی گیاه، حمله پاتوژن ها و در پاسخ به حضور هورمون گیاهی اتیلن القاء می گردد. اتیلن یک هورمون گازی گیاهی است که در جنبه های مختلف تکوین و رشد گیاهی از جمله تولید دانه، رسیدن میوه، ریزش برگها، پیری ارگانها و غیره نقش دارد و تولید آن توسط بسیاری از محرکهای محیطی از جمله هورمون های گیاهی (جاسمونیک اسید و سالیسیک اسید)، زخم شدن، حمله عوامل بیماریزا و سرما افزایش می یابد. فاکتورهای ERF به قسمتی از پروموتور ژنها به نام GCC box بطور اختصاصی متصل شده بیان ژنهای القا شونده توسط اتیلن را فعال می کند و به این ترتیب پروتئین های مربوط به دفاع دربرابر آسیب ها و پاتوژنها که برای تنظیم مسیرهای مقاومت در برابر بیماریها مورد نیاز هستند تولید می شوند (Cao *etal.*, 2001) , (Mizuno *etal.*, 2006) .