بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه محقق اردبیلی

دانشکده: کشاورزی

گروه: زراعت و اصلاح نباتات

تأثیر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و الگوی بیان ژن ***Rab17*** در دو رقم حساس و مقاوم گندم نان

اساتید راهنما

دکترسدابه جهانبخش گده کهریز

دکترخدیجه رضوی

استاد مشاور

دکترعبدالقیوم قلی‌پوری

توسط:

حمیرا چیلان

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به قلب مهربان مادر فداکارم

و

دست‌های پر مهر پدر بزرگوارم

سپاس و ستایش خدایی را که آفریننده قلم است و بدان سوگند یاد می‌کند. معبودی که اگر لطف و عنایتش نبود هیچگاه از این امر خطیر برنمی‌آمدم.

بر خود واجب می‌دانم از تمام کسانی که در مراحل مختلف انجام پروژه، مستقیم و غیر مستقیم یاریم کردند، با ذکر نامی هر چند مختصر، مراتب قدردانی و سپاسگذاری خود را اعلام کنم.

خانواده‌ی عزیزم به ویژه پدر و مادر مهربان و فداکارم که همیشه و در همه‌ی مراحل زندگی مرا مشوق و راهنمایم بود و با دعای خیریشان مرا دلسوزانه یاریم کردند.

اساتید گرانقدرم سرکار خانم دکتر **خدیجه رضوی** که همانند مادری مهربان و استادی دلسوز همیشه مرا راهنمائی و کمک نمودند و سرکار خانم دکتر **سدابه جهانبخش گده کهریز** به خاطر راهنمایی‌ها و پیگیری‌های مستمرشان، دکتر**عبدالقیوم قلی‌پوری** که بسیار فراتر از استاد مشاور در انجام این رساله مرا یاری رساندند و الگوی علمی و اخلاقی من گردیدند، تشکر و قدردانی فراوان می‌نمایم.

کارشناس گروه سرکار خانم مهندس **عطیه خسروی** به خاطر همه‌ی راهنمایی‌ها و دلگرمی‌هایش.

دوستان خوبم در دانشگاه محقق اردبیلی مهندس فرزانه حیدری، مهندس مریم بهی، مهندس آرزو فرشیدی، مهندس پری سیفی، مهندس معصومه نعمتی

کلیه‌ی کارمندان و دانشجویان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، به ویژه دکتر حقیقی، مهندس فاطمه علی‌خانی، دکتر نرگس زینال‌زاده، مهندس زهرا جهانبخشیان، مهندس فاطمه هاشمی و همه عزیزانی که هر کدام به نوعی یاری رسانده‌اند و نامی از آنها برده نشد، بسیار تشکر و قدردانی می‌نمایم.

نام خانوادگی دانشجو: **چیلان** نام: **حمیرا**

عنوان پایان‌نامه: **تأثیرتنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و الگوی بیان ژن*Rab17* در دو رقم حساس و مقاوم گندم نان**

اساتید راهنما: **دکتر سدابه جهانبخش گده کهریز – دکترخدیجه رضوی**

اساتید مشاور: **دکتر عبدالقیوم قلی‌پوری**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: **کشاورزی** گرایش: **بیوتکنولوژی** دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده: **کشاورزی** تاریخ فارغ التحصیلی: / ۱۳۹۰/۱۱ تعداد صفحه:۸۹

کلید واژه: گندم (*Triticum aestivum*)، تنش خشکی، پرولین، کلروفیل، محتوای نسبی آب، پروتئین کل، الگوی بیان، ژن *Rab17*، روش RT-PCR نیمه‌کمی

چکیده: در این پژوهش پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی دو رقم گندم زراعی به نام‌های سرداری و زرین نسبت بتنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفت. تنش خشکی در دوره‌های مختلف از طریق قطع آبیاری بر گیاهان گلدانی اعمال گردید و عواملی مثل رطوبت نسبی برگ، میزان کلروفیل و مقدار اسیدآمینه‌ی پرولین در هر دو رقم اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در ابتدا با اعمال تنش خشکی کاهش کمی در میزان رطوبت نسبی در هر دو رقم مشاهده شد، ولی با افزایش شدت تنش رطوبت نسبی به طور معنی‌داری در رقم زرین کاهش یافت. تنش خشکی متوسط و شدید میزان کلروفیل (a و b) برگ را تحت تأثیر قرار داد. تنش متوسط میزان کلروفیل (a و b) برگ را در رقم زرین کاهش داد، ولی این کاهش معنی‌دار نبود. در رقم سرداری ابتدا یک افزایش در مقدار رنگیزه (a و b) مشاهده شد، اما با افزایش شدت تنش میزان کلروفیل (a و b) در هر دو رقم کاهش یافت، اما این کاهش تنها در رقم زرین معنی‌دار بود. با اعمال تنش خشکی به دلیل افزایش بیان ژن سنتز کننده‌ی پرولین و همچنین کاهش مصرف پرولین در تنش خشکی افزایش معنی‌داری در میزان اسیدآمینه‌ی پرولین مشاهده شد. تنش خشکی تغییراتی را در الگوی پروتئینی هر دو رقم مورد بررسی القا کرد. در تنش متوسط (۷ روز تنش خشکی) پلی‌پپتیدهای شبیه به دهیدرین ۲۰، ۱۵ و ۵ کیلو دالتونی در هر دو رقم نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت و ۷ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۸ الی ۶۱ کیلو دالتون و دو پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۲ و ۷۵ کیلو دالتون به ترتیب در رقم زرین و سرداری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافتند و سه پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۵، ۴۰ و ۶۳ کیلو دالتون و پلی‌پپتید ۱۲ کیلو دالتونی به ترتیب در رقم سرداری و زرین کاهش یافت. در تنش شدید (۱۰ روز تنش خشکی) ۵ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۵۰ تا ۲۰۰ کیلودالتون در رقم زرین و ۴ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۳۷ تا ۴۸/۵ کیلو دالتون در رقم سرداری افزایش یافت. ۱۳ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۲۰ تا ۱۸۰ کیلو دالتون در رقم زرین و ۴ پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۲ تا ۸۰ کیلو دالتون در رقم سرداری کاهش یافت. به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر روی بیان ژن *Rab17* از روش RT-PCR نیمه‌کمی استفاده شد و نتایج بررسی الگوی بیان این ژن در هر دو رقم سرداری و زرین تحت تنش خشکی نشان داد که با اعمال تنش ۷ روزه میزان بیان ژن *Rab17* در هر دو رقم به طور معنی داری کاهش یافت که با آبیاری مجدد به مدت سه روز، به میزان بیشتری کاهش یافت، ولی در تنش ۱۰ روزه میزان بیان این ژن در هر دو رقم به طور معنی داری افزایش یافت و بالاترین میزان بیان ژن *Rab17* در رقم سرداری مشاهده گردید. می‌توان چنین استنباط کرد که تفاوت واکنش ارقام مختلف یک گیاه به شرایط تنش ناشی از شدت بیان یک ژن در آن ارقام است نه به دلیل بیان ژن جدید که در رقم حساس وجود ندارد.

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱-مقدمه ۲

تاریخچه، گیاهشناسی و اهمیت گندم ٤

۱-۳- تنش خشکی ٥

۱-۳-۱- تعریف تنش ٥

۱-۳-۲- تعریف تنش خشکی ٦

۱-٤- تنش خشکی در ایران و جهان ۷

۱-٥- پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان به تنش خشکی ۷

۱-٦- تنظیم اسمزی ۱۰

۱-۷- پاسخ‌های مولکولی گیاهان به تنش آب ۱۱

۱-۸- پروتئین‌های LEA و دهیدرین‌ها ۱۳

۱-۸-۱- ساختار و خصوصیت دهیدرین‌ها ۱٥

۱-۸-۲- تنظیم و بیان دهیدرین‌ها ۱٦

فصل دوم: مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد ژنتیکی مورد استفاده ۱۹

۲-۲-آماده‌سازی بذرها ۱۹

۲-۳- کاشت بذور ۱۹

۲-٤- سنجش مقدار آب نسبی برگ ۱۹

۲-٥- سنجش مقدار کلروفیل برگ ۲۰

۲-٦- سنجش مقدار پرولین در برگ ۲۰

۲-٦-۱- روش استخراج ۲۱
۲-۷- استخراج پروتئین‌های کل محلول از برگ ۲۱
۲-۷-۱- ترکیبات و طرز تهیه بافر استخراج پروتئین ۲۱
۲-۷-۲- ترکیبات و طرز تهیه بافر نمونه ۲۲
۲-۷-۳- روش استخراج پروتئین ۲۲
۲-۷-٤- تعیین مقدار کمی (غلظت) پروتئین‌ها به روش براد فورد با استفاده از اسپکتروفتومتری ۲۲
۲-۷-۵- الکتروفورز پروتئین‌ها ۲۳
۲-۷-٦- محلول‌ها ۲٤
۱- محلول اکریل آمید ۳۰ ٪ (w/v) - بیس اکریل آمید ۰/۸ (w/v) (محلول A) ۲٤
۲- بافر ژل جدا کننده (Resolving gel) ذخیره (تریس اسید کلریدریکی ۲ مولار با pH ۸/۸) (محلول B). ۲٤
۳- بافر ژل متراکم کننده (Stacking gel) ذخیره (تریس اسید کلریدریکی ۱ مولار با pH ٦/۸) (محلولC). ۲۵
٤- محلول ذخیره SDS ۱۰٪ (w/v) (محلول D) ۲۵
۵- محلول پرسولفات آمونیم ۱٪ (w/v) (محلول E) ۲۵
٦- محلول تمد (TEMED) ۲۵
۷- بافر تانک الکتروفورز [بافر الکترولیت] (تریس ۰/۰۲۵ مولار، گلایسین ۰/۱۹۲ مولار و SDS ۰.۱٪ با pH ۸/۳)
..... ۲۵
۸- محلول رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie brilliant blue) ۲٦
۹- محلول رنگ‌بر (Destaining Solution) ۲٦
۲-۷-۷- طرز تهیه ژل صفحه‌ای عمودی ۲٦
۲-۷-۸- الکتروفورز پروتئین‌ها ۲۷
۲-۷-۹- رنگ آمیزی پروتئین‌ها و رنگ‌بری از ژل ۲۸
۲-۷-۱۰- روش رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۲۸
۲-۷-۱۱- رنگ‌بری ژل ۲۹

۲-۸- استخراج DNA ژنومی به روش CTAB ۲۹
۲-۹- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای توبولین برای هر دو رقم سرداری و زرین ۳۲
۲-۱۰- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز برای بررسی نتایج PCR ۳۳
۲-۱۱- بهینه‌سازی واکنش PCR ۳۳
۲-۱۲- استخراج RNA کل از بافت گیاهی ۳٤
۲-۱۲-۱- مراحل استخراج RNA کل از بافت برگ ۳٤
۲-۱۲-۲- تعیین خصوصیات کمی و کیفی RNA ۳۵
۲-۱۳- تیمار RNA کل با آنزیم DNaseI ۳٦
۲-۱٤- ساخت cDNA تک رشته‌ای ۳٦
۲-۱۵- بازیافت باند مورد نظر از روی ژل آگارز ۳۷
۲-۱۵-۱ مراحل بازیافت باند مورد نظر از روی ژل آگارز ۳۷
۲-۱۵-۲- رسوب گذاری با اتانول ۳۹
۲-۱٦- وارد کردن قطعه‌ی مورد نظر به درون ناقل ۳۹
۲-۱۷- انتقال DNA نوترکیب به باکتری ٤۰
۲-۱۷-۱- مراحل انتقال DNA نوترکیب به سلول‌های مستعد ٤۰
۲-۱۷-۲- تهیه‌ی سلول‌های مستعد ٤۰
۲-۱۸- کلنی PCR جهت تأیید کلنی‌ها ٤۳
۲-۱۹- کشت شبانه‌ی کلنی‌های مثبت ٤۳
۲-۲۰- استخراج پلاسمید به روش miniprep ٤٤
۲-۲۱- هضم آنزیمی جهت تأیید نهایی کلنی‌ها ٤٦
۲-۲۲- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ٤٦
۲-۲۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت بررسی کیفیت cDNAها ٤۷
۲-۲٤- بررسی بیان ژن با استفاده از PCR نیمه کمی ٤۸

۲-۲۵- بهینه‌سازی شرایط PCR نیمه کمی ٤٨
۲-۲٦- کمی کردن شدت باندها ٥٠
۲-۲۷- تجزیه و تحلیل آماری ٥٠

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- اعمال تنش خشکی از طریق قطع آبیاری در گلدان ٥٢
۳-۲- تأثیر تنش خشکی بر روی محتوای نسبی آب ٥٢
۳-۳- تأثیر تنش خشکی بر روی میزان پرولین آزاد در بافت برگ ٥٤
۳-٤- تأثیر تنش خشکی بر روی میزان رنگیزه‌های گیاهی برگ گندم ٥٦
۳-٥- تأثیر تنش خشکی بر الگوی پروتئینی برگ در گندم ٥٨
۳-٦- بررسی DNA ژنومی استخراج شده از برگ گیاه گندم ٦٢
۳-۷- استخراج RNA کل از بافت برگ ٦٤
۳-۸- همسانه سازی ژن Rab17 از الگوی cDNA ٦٦
۳-۹- بررسی الگوی بیان ژنRab17 با استفاده از RT-PCR نیمه کمی ٦٨
۳-۹-۱- الگوی بیان ژن Rab17 در دو رقم سرداری و زرین ٦٩
۳-۱۰- نتیجه گیری نهایی ۷٥
۳-۱۱- پیشنهادات ۷٦

فهرست منابع

فهرست جدول

عنوان | صفحه

جدول شماره ۲-۱. مواد مورد نیاز برای تهیه‌ی بافر استخراج DNA (۵۰ میلی‌لیتر) ۳۰
جدول شماره ۲-۲. مقدار و مواد مورد نیاز برای تکثیر ژن توبولین ۳۲
جدول شماره ۲-۳. برنامه دمایی و زمانی جهت تکثیر ژن توبولین ۳۲
جدول شماره۲-٤. ترکیب شیمیایی بافر TBE pH ۸/۳ ..... ۳۳
جدول شماره ۲-۵. تهیه‌ی ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر بارگذاری ۳۳
جدول شماره ۲-٦. محلول واکنش RT ۳۷
جدول شماره ۲-۷. زمان بار گذاری، اندازه قطعه ، غلظت ژل آگارزو ولتاژ مورد نیاز برای خالص سازی با کیت RECOCH ۳۸
جدول شماره ۲-۸. مقدار و مواد مورد نیاز جهت واکنش اتصال ۳۹
جدول شماره ۲-۹. مقدار و مواد مورد نیاز جهت تهیه‌ی محلول TFBI pH ۵/۸ ..... ٤۱
جدول شماره ۲-۱۰. مقدار و مواد مورد نیاز برای تهیه‌ی محلول TFBII ٤۲
جدول شماره ۲-۱۱. مقدار و مواد مورد نیاز برای محیط کشت LB مایع pH ٤۲
جدول شماره ۲-۱۲. مقدار و مواد مورد نیاز برای کلونی PCR ٤۳
جدول شماره ۲-۱۳. مقدار و مواد لازم برای ۵۰ میلی‌لیتر بافر GET ٤٤
جدول شماره ۲-۱٤. مقدار و مواد مورد نیاز جهت تهیه‌ی ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده ٤٤
جدول شماره ۲-۱۵. مقدار و مواد مورد نیاز جهت تهیه‌ی پتاسیم استات ۵ M (۱۰۰ ml) ٤۵
جدول شماره ۲-۱٦. مقدار و مواد و مورد نیاز جهت هضم آنزیمی ٤٦
جدول شماره ۲-۱۷. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با برنامه Oligo بر اساس ژنوم گندم برای ژن Rab17 ..... ٤۷
جدول شماره ۲-۱۸. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با برنامه Oligo بر اساس ژنوم گندم برای ژن توبولین ٤۷
جدول شماره ۲-۱۹. مقدار و مواد مورد نیاز برای تکثیر ژن توبولین ٤۸
جدول شماره ۲-۲۰. مقدار و مواد مورد نیاز برای تکثیر ژن Rab17 ..... ٤۹
جدول شماره ۲-۲۱. برنامه شیب دمایی جهت تکثیر ژن Rab17 ..... ٤۹
جدول شماره ۳-۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) عامل زمان، تنش خشکی و رقم بر برخی مشخصات فیزیولوژیکی و بیان ژن Rab17 گیاهچه‌های گندم ۵۲
جدول شماره ۳-۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) بیان ژن Rab17 در دو رقم سرداری وزرین تحت تنش خشکی و آبیاری کامل ۵۲

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

شکل شماره ۳-۱. اثر قطع آبیاری و آبیاری مجدد بر مقدار آب نسبی برگ در دو رقم سرداری و زرین گندم... ۵۳

شکل شماره ۳-۲. تغییرات میزان پرولین آزاد در دو رقم سرداری و زرین در دوره‌های مختلف خشکی ۵۵

شکل شماره ۳-۳. روند تغییرات کلروفیل a و b در دو رقم سرداری وزرین در دوره‌های مختلف خشکی..... ۵۷

شکل شماره ۳-٤. تفکیک پروتئین‌های محلول برگی در رقم سرداری و زرین گندم در دو تیمار خشکی و آبیاری در روز ۱۰نمونه‌برداری قبل از اعمال تنش خشکی ۵۸

شکل شماره ۳-۵. تفکیک پروتئین‌های محلول برگی در رقم سرداری و زرین گندم در دو تیمار خشکی و آبیاری در روز نمونه‌برداری ۷ روز پس از تنش خشکی..... ۵۹

شکل شماره ۳-٦. تفکیک پروتئین‌های محلول برگی در رقم سرداری و زرین گندم در دو تیمار خشکی و آبیاری در روز نمونه‌برداری ۳روز پس از آبیاری ٦۰

شکل شماره ۳-۷. تفکیک پروتئین‌های محلول برگی در رقم سرداری و زرین گندم در دو تیمار خشکی و آبیاری در روز نمونه‌برداری ۱۰ روز تنش خشکی..... ٦۱

شکل شماره ۳-۸. DNA ژنومی استخراج شده از برگ گیاه گندم به روش CTAB..... ٦۲

شکل شماره ۳-۹. رقت‌های مختلف DNA ژنومی جهت بهینه سازی واکنش PCR در رقم سرداری..... ٦۳

شکل شماره ۳-۱۰. رقت‌های مختلف DNA ژنومی جهت بهینه سازی واکنش PCR در رقم زرین ٦۳

شکل شماره ۳-۱۱. بررسی شیب دمای اتصال در واکنش PCR در رقم سرداری با آغازگرهایRab17..... ٦٤

شکل شماره ۳-۱۲. بررسی شیب دمای اتصال در واکنش PCR در رقم زرین با آغازگرهای Rab17 ..... ٦٤

شکل شماره ۳-۱۳. استخراج RNA کل از بافت برگ گیاه گندم..... ٦۵

شکل شماره ۳-۱٤. واکنش PCR برای رقت‌های مختلف cDNAs در رقم زرین..... ٦٦

شکل شماره ۳-۱۵. واکنش PCR برای رقت‌های مختلف cDNAs در رقم سرداری ٦٦

شکل شماره ۳-۱٦. الکتروفورز محصول کلنی PCR جهت انتخاب کلنی‌های مثبت ٦۷

شکل شماره ۳–۱۷. الکتروفورز پلاسمیدهای خالص‌سازی شده از کلنی‌های مثبت ٦٨

شکل شماره ۳–۱۸. الکتروفورز محصول PCR از رقت ۰/۰۱ از کلنی‌های مثبت..... ٦٨

شکل شماره ۳–۱۹. واکنش هضم آنزیمی با آنزیم‌های HindIII و EcoRI ٦٨

شکل شماره ۳–۲۰. الگوی بیان ژن Rab17 در رقم سرداری..... ٦٩

شکل شماره ۳–۲۱. الگوی بیان ژن Rab17 در رقم زرین ۷۰

شکل شماره ۳–۲۲. مقایسه‌ی اثر تنش خشکی و آبیاری مجدد بر الگوی بیان ژن Rab17 در دو رقم سرداری ۷۲و زرین ۷۲

شکل ۳–۲۳– مقایسه‌ی اثر تنش خشکی و آبیاری مجدد بر الگوی بیان ژن Rab17 در دو رقم سرداری و زرین گندم ۷۳

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- مقدمه

جمعیت جهان با رشدی معادل ۱/۶ تا ۱/۷ درصد در حال افزایش است و در نتیجه هر سال حدود ۹۰ میلیون نفر به مصرف کنندگان محصولات کشاورزی افزوده می‌شود (استیل و همکاران، ۱۹۹۱). بنابراین برای تأمین مواد غذایی جمعیت رو به رشد جهان، لازم است تولید غله‌ی غذایی جهان تا سال ۲۰۵۰ دو برابر شود (تیلمان و همکاران، ۲۰۰۲). در شرایط محیطی گیاهان غالباً در معرض تنش‌های غیر زیستی از جمله خشکی، گرمای زیاد، یخبندان، شوری، سمیت ناشی از فلزات و عدم تعادل مواد غذایی هستند که گستردگی و عملکرد محصولات را محدود می‌سازند. به طوری‌که، تقریباً ۳۲ درصد از کشت گندم در طول فصل رشد در کشورهای در حال توسعه با انواع مختلفی از تنش خشکی مواجه است (شمسی، ۲۰۱۰).

خشکی یکی از مهم‌ترین تهدیدهای جهانی برای تولید مواد غذایی است. افزایش عملکرد در شرایط کمبود آب به ژنوتیپ‌های متحمل و مدیریت لازم برای حداکثر کردن آب قابل استفاده نیاز دارد (پاسسیورا، ۲۰۰۶). پیشرفته‌ترین روش‌های اصلاح نباتات سنتی به دلیل طبیعت پیچیده‌ی صفات مقاوم به تنش و به دلیل عوامل ناسازگاری که در طول انتقال ژن از گونه‌ی وحشی به رقم زراعی وجود دارد، با مشکل مواجه است. بنابراین، وجود استراتژی‌های جدیدتر برای تکامل گیاهان مقاوم به تنش‌های غیرزیستی ضروری است. چنین استراتژی‌هایی شامل اصلاح مولکولی و مهندسی ژنتیک بر اساس علوم ژنتیک، ژنومیک و فیزیولوژی مولکولی است (هاسگیاوا و همکاران، ۲۰۰۰).

تنش آب به شرایطی اتلاق می‌گردد که در آن سلول‌ها و بافت‌ها در وضعیتی قرار گرفته‌اند که آماس آن‌ها کامل نیست. به عبارت ساده‌تر، تنش آب زمانی اتفاق می‌افتد که میزان تعرق بیش از میزان جذب آب باشد. گیاهان با یک سری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که توسط شبکه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود، به خشکی پاسخ می‌دهند (بارتلز و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعه‌ی این پاسخ‌های مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان به تنش غیر زیستی خیلی پیچیده است که تنها به شدت و مدت تنش بستگی ندارد، بلکه به مرحله‌ی تکاملی و ویژگی‌های مرفولوژیکی و آناتومیکی گیاه وابسته است (ریژکی و همکاران، ۲۰۰۲؛ بارتل و همکاران، ۲۰۰۴). به محض درک و شناسایی این تغییرات بیرونی، مسیرهای سیگنالی متفاوت به منظور تبدیل یک تنش بیرونی به پاسخ بیوشیمیایی فعال می‌شود و هر کدام از آن‌ها بیان یک مجموعه از ژن‌های حساس به تنش را تقویت می‌کنند (مسترانجلو و همکاران، ۲۰۰۹).

تنش آب همانند بیشتر تنش‌های محیطی، با تولید انواع اکسیژن واکنش پذیر (ROS) باعث تغییرات در متابولیزم گیاهی از جمله اختلال در غشاء، ممانعت از فتوسنتز و قابلیت متفاوت در جذب مواد غذایی می‌شود، که این تغییرات به نوبه‌ی خود منجر به تغییر در رشد، تکامل و عملکرد گیاه می‌شود. تنش‌های شدید بقای گیاه را تهدید می‌کنند. هر چند، گیاهان مقاوم می‌توانند با تغییراتی در مرفولوژی، آناتومی و فیزیولوژی خود را با شرایط تطبیق دهند. تجمع اسموپروتاکتانت‌ها، فعالیت کانال‌های آبی، تولید چاپرون‌ها، مکانیزهای دفع سوپراکسید، دفع یون‌ها یا تقسیم کردن آن‌ها توسط سیستم‌های سیمپورت و آنتی‌پورت بعضی از فاکتورهایی هستند که مقاومت در برابر شوری، خشکسالی و سرما را تعیین می‌کنند.

هر پاسخ در مقاومت به تنش توسط چندین ژن تنظیم و هماهنگ می‌شود. بیان آن‌ها از طریق مسیرهای انتقال سیگنال وابسته به اسید آبسیزیک و غیر وابسته به اسید آبسیزیک تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از لحاظ عملکردی محصولات این ژن‌ها سنتز کننده اسمولایت‌ها (پرولین- گلایسین، بتائین) (چن و همکاران،۲۰۰۲)، فاکتورهای حفاظت ماکرومولکول‌ها (چاپرون‌ها و پروتئین‌های LEA)، پروتئینازها، پروتئین‌های غشایی (آکواپورین، انتقال دهنده‌ها) و آنزیم‌های سم‌زدا (GST، SOD) هستند. با این وجود ژن‌های مربوط به پروتئین‌های تنظیمی مثل فاکتورهای رونوشت‌برداری (MAPK, cDPK) و پروتئین فسفاتاز در تنش خشکی به خوبی القا می‌شود (ونگ و همکاران، ۲۰۰۳). به طوری‌که، تغییر در پروفایل بیان ژن‌های حساس به خشکی از اجزاء ضروری مکانیزم‌های مقاومت به تنش هستند (هاسکیاوا و و همکاران؛ ۲۰۰۰؛ بلوموالد، ۲۰۰۲؛ شینوزاکی و همکاران، ۲۰۰۳).

با توجه به نتایج این پروژه‌ها و سایر تحقیقات موجود در این زمینه، پژوهشگران علاوه بر شناسایی مکانیسم‌های تحمل، امکان انتخاب بسیاری از ژن‌های مؤثر را برای دستکاری ژنتیکی گیاهان در اختیار خواهند داشت.

پژوهش حاضر به منظور شناسایی بیشتر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی متابولیسم گیاهان القاء شونده در تنش خشکی طراحی گردیده است. با توجه به اینکه گیاهان مورد بررسی شامل گیاه زراعی مقاوم و حساس گندم می‌باشند، لذا شناخت مکانیسم‌های تحمل به خشکی در این ارقام، به منظور ارتقاء مقاومت و تحمل گندم‌های زراعی نسبت به تنش خشکی با توجه به اقلیم کشور، اهمیت می‌یابد.

۱-۲- بررسی منابع

۱-۲-۱- تاریخچه، گیاهشناسی و اهمیت گندم

گیاه گندم با نام علمی *Triticum aestivum* از گیاهان زراعی مناطق معتدله است، اما در مناطق متفاوت آب و هوایی نیز کشت می‌شود. حداقل، حداکثر و مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد گندم به ترتیب ۴، ۳۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. گندم گیاهی است متعلق به خانواده پواسه (گرامینه)[1]، زیرخانواده پوئیده[2] و طایفه گندمیان (تریتیسه)[3]. از جمله جنس‌هایی که در طایفه گندمیان قرار می‌گیرند، می‌توان به تریتیکوم، تینوپایرم یا اگروپیرون و آجیلوپس اشاره کرد (کریمی، ۱۳۷۱).

اهمیت اقتصادی گندم چه از نظر تولید و چه از نظر تغذیه در دنیا بیش از سایر محصولات کشاورزی است. تولید گندم در دنیا در درجه اول برای تغذیه انسان و در درجه دوم برای تغذیه پرندگان، حیوانات و مصارف صنعتی می‌باشد. دانه گندم برای تأمین خوراک اصلی انسان، ساقه و کاه آن برای تهیه بستر دام‌ها و همچنین در صنعت کاغذسازی و پوشش سقف ساختمان‌ها و نیز گاهی به عنوان سوخت و حتی خوراک دام‌ها و تقویت زمین‌های زراعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (خدابنده، ۱۳۷۳).

اجداد *Triticum* (*durum, aestivum*) گندم زراعی در ناحیه‌ی مدیترانه اهلی شدند. تولید گندم در این مناطق اکثراً با مقدار آب موجود محدود می‌شود. این گیاه بیشترین سطح زیر کشت و تولید جهانی را دارد. به گزارش FAO (۲۰۰۸) ایران در سال ۲۰۰۳، ۳ درصد از کل زمین‌های زیر کشت گندم جهان را به خود اختصاص داده است. ولی با تولید ۱۵ میلیون تن تنها ۲/۴ درصد کل تولید جهانی گندم را به خود اختصاص داد و این نشان‌گر آن است که متوسط عملکرد گندم در ایران ۱۹ درصد کمتر از میانگین عملکرد جهانی آن بوده است. ارقام مختلف گندم پاسخ‌های گوناگونی نسبت به خشکی نشان می‌دهند. اصولاً گندم مقاومت نسبی به خشکی دارد و نیاز آبی آن نسبت به سایر محصولات زراعی کمتر است. لذا، در مناطق نیمه خشک به طور موفقیت آمیزی کشت می‌شود (کریمی ۱۳۷۱).

گندم از نظر فیزیولوژیکی دارای فتوسنتز C_3 و از نظر ژنتیکی هگزاپلوئید ($2n=6x=42$) می‌باشد (ریچاردز، ۱۹۸۲) و دارای سه ژنوم D، B و A است. مطالعات سیتوژنتیک به همراه بررسی‌های

[1] Poaceae (Gramineae)
[2] Pooideae
[3] Triticeae

بیوشیمیایی و توالی‌یابی DNA توسط دانشمندان مختلف سیر تکاملی گندم هگزاپلوئید را به این صورت حدس زده است که ابتدا ژنوم A از گونه *Triticum monococcum* و ژنوم B احتمالاً از *Aegilops searsi* و یا*Aegilops speltoides* در تلاقی بین گونه‌ای کنار هم آمده و *Triticum dicoccoides* را به وجود آورده‌اند. هر چند منشاء ژنوم B هنوز بطور کامل مشخص نشده است (لوپتون، ۱۹۸۷). گندم تتراپلوئید *T. dicoccoides* در نتیجه تلاقی با (*Aegilops squarrosa (syn. A. tauschii* که دیپلوئید و دهنده ژنوم D می‌باشد، گندم هگزاپلوئید *T. aestivum* را به وجود آورده است. مطالعات زیادی در مورد تحمل اجداد گندم به تنش‌ها صورت گرفته است و گزارش شده است که گیاه *A. squarrosa* بیش از گندم هگزاپلوئید تحمل بیشتری نسبت به تنش‌ها دارد (جان و همکاران، ۱۹۸۴).

ارقام گندم زرین و سرداری به ترتیب به صورت آبی و دیم کاشت می‌شوند. یک بررسی نشان می‌دهد که در پتانسیل اسمزی ۱/۲۲- مگاپاسکال، رقم سرداری با ۷۵ درصد جوانه‌زنی مقاوم‌ترین و زرین با ۱۰ درصد حساس‌ترین رقم نسبت به خشکی در مرحله جوانه‌زنی در بین ارقام مطالعه شده، بوده‌اند (حیدری و حیدری زاده ۱۳۸۱). به علاوه، در مقایسه ۱۱ رقم گندم زراعی و دیم در مزرعه در سال‌های ۷۹ تا ۸۱ رقم سرداری کمترین حساسیت را به تنش نشان داده است (سی و سه مرده و همکاران، ۱۳۸۱)

۱-۳- تنش خشکی

۱-۳-۱- تعریف تنش

انعطاف‌پذیری سیستم‌های فاقد تنش امکان تکامل پاسخ‌ها را به تغییرات محیطی می‌دهد که این تغییرات به طور منظم و قابل پیش بینی در طی چرخه‌ی روزانه و فصلی در حال نوسان است. بنابراین، هر گونه انحراف از یک فاکتور و فرم مطلوب منجر به تنش می‌شود. تنش با فشار یا نوسانات غیر قابل پیش بینی زیاد یک سری الگوهای متابولیکی منظم را تحمیل می‌کند که منجر به صدمه، بیماری یا فیزیولوژی غیر عادی می‌شود. تنش، موقعیت فیزیولوژیکی تغییر یافته ناشی از یک سری عوامل است که تمایل به تغییر تعادل دارند و فشار هر نوع تغییر فیزیولوژیکی و شیمیایی است که با تنش به وجود می‌آید. تنش زمانی اتفاق می‌افتد که عامل ایجاد آن بتواند تغییرات فیزیولوژیکی قابل توجه‌ی را که بر رشد و تولید محصول باعث گردد (گاسپر و همکاران، ۲۰۰۲؛ چیوز و همکاران، ۲۰۰۳؛ ۲۰۰۴؛ هیو و همکاران، ۲۰۰۶).

عوامل تنش‌زا که بر فرایندهای فیزیولوژی مؤثرند، بسیار زیادند، ولی می‌توان آنها را در سه گروه کلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی تقسیم‌بندی کرد. از تنش‌های فیزیکی می‌توان به خشکی، دما، اشعه و غیره اشاره کرد (علیزاده، ۱۳۸۳). تأثیر یک عامل تنش‌زا بر فرایندهای فیزیولوژیکی در یک گونه‌ی گیاهی همواره ثابت نیست. بلکه، به سن اندام گیاهی، وضعیت تکامل اندام و الگوهای محیطی بستگی دارد که همگی از عوامل مؤثر بر حساسیت گیاه نسبت به عوامل تنش‌زا می باشند (علیزاده، ۱۳۸۳).

پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه نسبت به عوامل تنش‌زا به دو گونه است: در یک مورد گیاه مقاومت[1] کرده و با این مکانیسم فعالیت‌های متابولیک را در برخورد با تنش‌های جزئی، بالا نگه می‌دارد (همانند زمانی که تنش وجود ندارد) و برعکس در برخورد با تنش‌های شدید از فعالیت‌های متابولیکی می‌کاهد. مورد دیگر دوری یا اجتناب [2]است که گیاه با کاهش فعالیت‌های متابولیکی و به حالت خواب رفتن از تنش دوری می‌جوید. از مکانیزم‌های فرار می‌توان به تغییراتی در سطح کانوپی/ برگ، آناتومی و تغییر جهت و رنگ اشاره کرد (ترنر، ۱۹۸۶).

چون شرایط تنش‌زا سبب اختلال و تغییر در فرایندهای گیاهی می‌شود، بنابراین ممکن است بعنوان ابزاری برای مطالعه بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه مورد علاقه محققان مورد استفاده قرار گیرد (گراتان و همکاران،۱۹۹۹). تعدادی از راهکارهایی که سبب سازگاری گیاه به تنش‌هایی مثل خشکی، شوری، سرما و گرما می‌شوند، بر رشد و تولید گیاه اثر می‌گذارند. در طی بروز این تنش‌ها گیاه خود را بوسیله‌ی سازکارهای فیزیولوژیک و بیوشیمی سازگار می‌کند (ساراپاکتا و همکاران، ۲۰۰۴).

۱-۳-۲- تعریف تنش خشکی

تنش آب به شرایطی اتلاق می‌گردد که در آن سلول‌ها و بافت‌ها در وضعیتی قرار گرفته‌اند که آماس آن‌ها کامل نیست. به عبارت ساده‌تر تنش آب زمانی اتفاق می‌افتد که میزان تعرق بیش از میزان جذب آب باشد. خشکی متداول‌ترین تنش غیر زیستی است که گستردگی و عملکرد گندم دوروم را در محیط مدیترانه‌ای محدود می‌کند. مدت‌ها اصلاح گیاهان برای ایجاد مقاومت و یا تحمل تنش خشکی امری مهم برای افزایش عملکرد محصولات در محیط‌های خشک بود. مقاومت به خشکی یک صفت پلی‌ژنیک است که با وراثت پذیری پایین و تأثیر متقابل و شدید ژنوتیپ و محیط مشخص می‌شود. تنش آب با کاهش پتانسیل آب سلولی و تجمع اسید آبسیزیک منجر به سازماندهی مجدد متابولیزم سلولی و بیان ژن می‌شود و به گیاه اجازه می‌دهد که خود را با تنش سازگار کند (مسترآنجلو و همکاران، ۲۰۰۹).

[1] Tolerance
[2] Avoidance

آگاهی از پاسخ‌های مولکولی و بیوشیمیایی گیاه در پاسخ به تنش خشکی برای درک کامل سازوکارهای مقاومت گیاهان نسبت به شرایط کم‌آبی ضروری است (ردی و همکاران، ۲۰۰۳؛ شاو و همکاران، ۲۰۰۵؛ ۲۰۰۵؛ ۲۰۰۶؛ جالیل و همکاران، ۲۰۰۶). مقاومت به تنش مستلزم تغییرات دقیق در بیوشیمیایی سلول است. به نظر می‌رسد که این امر نتیجه‌ی تجمع مواد محلول سازگار و پروتئین‌های خاص باشد که می‌تواند به سرعت با تنش اسمزی القا شود (شاو و همکاران، ۲۰۰۵؛ ۲۰۰۶). پاسخ‌های فیزیولوژیک متعدد گیاهان نسبت به تنش آبی به طور کلی با شدت تنش و طول مدت تنش متفاوت است (شاو و همکاران، ۲۰۰۵؛ ۲۰۰۶؛ ۲۰۰۶؛ ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۸؛ ۲۰۰۸). تنش آبی رشد گیاه را در سطوح مختلف از سلول تا کل جامعه تحت تأثیر قرار می‌دهد (کلوم و همکاران، ۲۰۰۱؛ بلومولد و همکاران، ۲۰۰۴).

کمیت و کیفیت رشد گیاه به میزان تقسیم سلولی و تمایز بستگی دارد و تمام این وقایع با تنش آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (کوریا و همکاران، ۲۰۰۱؛ کابوسلی و همکاران، ۲۰۰۲). اچ‌اسیوک (۱۹۷۳) به این نتیجه رسید که تنش آبی بیشتر از بزرگ شدن سلول ممانعت می‌کند تا اینکه از تقسیم سلولی جلوگیری کند. این امر رشد گیاه را که ناشی از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مثل فتوسنتز، تنفس، جذب یون، کربوهیدرات، متابولیسم مواد غذایی و هورمون است، کاهش می‌دهد (چایتانیا و همکاران، ۲۰۰۳؛ بات و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-٤- تنش خشکی در ایران و جهان

تنش خشکی رشد و عملکرد گیاهان را بیش از سایر تنش‌های محیطی محدود می‌کند (زو و همکاران ۲۰۰۲). تقریباً ۳۲ درصد از کشت گندم در طول فصل رشد در کشورهای در حال توسعه با انواع مختلفی از تنش خشکی مواجه است (شمسی، ۲۰۱۰). تنش خشکی مهم ترین عاملی است که عملکرد گیاهان را در ایران محدود می‌کند. کشور ایران با متوسط بارندگی ۲۵۰ میلی‌متر در سال در زمره‌ی مناطق خشک جهان طبقه بندی می‌شود. از حدود ۱۶۴۰۰۰۰ کیلومتر مربع مساحت ایران ۱۲۰۰۰۰۰ کیلومتر مربع یا بیشتر از دو سوم مساحت آن دارای آب و هوای خشک می‌باشد. تحت این شرایط تقریباً تمام جنبه‌های رشدی و فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان از جمله گندم تحت تأثیر کمبود آب قرار گرفته و میزان عملکرد محصول کاهش می‌یابد (جودی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۵- پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان به تنش خشکی

گیاهان برخلاف جانوران زمانی که در معرض شرایط نامساعد محیطی قرار می‌گیرند، قادر به حرکت نمی‌باشند. در عوض با فعال سازی مجموعه متنوعی از سیستم‌های فیزیولوژیک، متابولیکی و دفاعی امکان بقا و رشد خود را فراهم می‌سازند (چیوز و همکاران، ۲۰۰۳). عکس العمل گیاهان به تنش خشکی به ماهیت کمبود آب وابسته است و می‌تواند به صورت‌های زیر باشد (شریعت و همکاران، ۱۳۸۵):

۱- پاسخ‌های فیزیولوژیکی به تنش‌های کوتاه مدت (پاسخ کوتاه مدت)

۲- تطابق غیر قابل توارث با سطح مشخصی از تنش خشکی (پاسخ میان مدت)

۳- تطابق قابل توارث با خشکی (پاسخ بلند مدت)

پاسخ کوتاه مدت به تنش آب با کاهش حداکثر جذب CO_2 همراه است. از جمله واکنش‌های میان مدت به خشکی، تنظیم اسمزی بوسیله تجمع نمک‌های آلی و پاسخ بلند مدت به خشکی شامل الگوهای ژنتیکی می‌باشد. بعضی از این تغییرات فیزیولوژیک که با تنش آبی القا می‌شوند، عبارتند از: افزایش در میزان اسید آبسیزیک، بسته شدن روزنه‌ها، افزایش اسمولاریته سلول، تشکیل غشاء سلولی فشرده‌تر به دلیل پوشاندن سلول‌های کوچکتر و کوتیکول ضخیم‌تر که موجب کاهش تبخیر آب از سلول‌های اپیدرم می‌شود. بعلاوه موم‌های روی سطح کوتیکول برگ از هدر رفتن آب برگ جلوگیری می‌نماید. ریشه‌های طویل‌تر برای جذب بیشتر آب و برگ‌های کوچک‌تر به منظور کاهش تبخیر و تعرق از دیگر موارد هستند (تایز و همکاران، ۲۰۰۲) که بیشتر این تغییرات فیزیولوژیکی نیاز به رونوشت‌برداری از ژن‌های خاص دارند (واو و همکاران، ۲۰۰۰). افزایش مقدار اسید آبسیزیک به بسته شدن روزنه‌ها بستگی دارد، تا از کاهش بیشتر آب ممانعت کند. به نظر می‌رسد که پاسخ‌های فیزیولوژیکی در گیاهان همانند حفظ تورژسانس نتیجه‌ی تحریک برنامه‌های ژنتیکی باشد که توسط هورمون‌ها به ویژه اسید آبسیزیک (برناکچیانا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کامینگ و همکاران، ۲۰۰۷) تجمع طولانی مدت مولکول‌های حفاظتی و بسته شدن روزنه‌های برگ انجام می‌شود (براردروب و همکاران، ۲۰۰۳).

در طی بروز تنش خشکی به علت بالا رفتن غلظت املاح محلول در محیط ریشه و در نتیجه افزایش پتانسیل اسمزی خاک از جذب عناصر غذایی تا حد زیادی کاسته می‌شود. در صورت بالا رفتن pHمحلول خاک، جذب عناصر کم مصرف بیشتر از سایر عناصر دچار اختلال می‌شود (بابائیان و همکاران، ۱۳۸۹). آقائی سربرزه (۱۹۹۵) در بررسی ارتباط بین عنصر روی با شاخص‌های تحمل به خشکی در گندم نشان داد که عنصر روی تحمل به خشکی را در ارقام مختلف گندم نان و دوروم افزایش می‌دهد.