دانشکده علــوم

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی (فیزیولوژی)

پاسخهای فیزیولوژیک گیاهچه نخل خرما گونه *Phoenix dactylifera* به تنش های اسمزی و بررسی تعیین جنسیت گیاهچه از طریق مولکولی

توسط :

حسین پاسالاری

استاد راهنما:

دکتر ساسان محسن زاده

تیر ماه ۱۳۸۸

به نام خدا

پاسخهای فیزیولوژیک گیاهچه نخل خرما *Phoenix dactylifera* به تنش های اسمزی و بررسی تعیین جنسیت گیاهچه از طریق مولکولی

به وسیله‌ی:

حسین پاسالاری

پایان نامه

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

در رشته‌ی:

علوم گیاهی (فیزیولوژی)

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر ساسان محسن زاده، استادیار بخش زیست شناسی (رئیس کمیته).....

دکتر علی مرادشاهی، دانشیار بخش زیست شناسی.....

دکتر علی نیازی، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی.....

تیرماه 1388

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم که به هر تار سپید مو و هر چین چهره شان هزاران دین دارم.

و به برادران و خواهران عزیزم.

و به همسر عزیزم، پناهگاه امن و تکیه گاه استوار زندگیم و

تمامی رهپویان علم و معرفت.

سپاسگزاری

به نام آن که هستی، نام از او یافت فلک جنبش، زمین، آرام از او یافت

" نظامی گنجوی"

حمد و سپاس بیکران، خاص پروردگار یکتا و آفریدگار تواناست که به ما قدرت آموختن و اندیشیدن عطا فرمود.
مراتب امتنان و سپاس خویش را محضر استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محسن زاده که این پژوهش، مرهون زحمات، راهنمایی ها، تلاش های بی دریغ و همراهی صمیمانه ایشان است، تقدیم می دارم. از اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر مراد شاهی و آقای دکتر نیازی به پاس راهنمایی های علمی و عملی ایشان سپاسگزارم. همچنین از جناب آقای دکتر حسن محبت کار نماینده محترم تحصیلات تکمیلی، آقای دکتر خلد برین، آقای دکتر خسروی، آقای نیکوکار، و خانم جعفری قدردانی می نمایم. از تمامی دوستان عزیزم که در طی این تحقیق همواره یار و مددکار من بودند بالاخص آقایان کریمی، صیاد نیا، صفاری، مسعودی، و خانم ها بهزادیان، رضاییان، ولی فرد، جوکار، رواحی، قضاوتی، تواضح، شهرتاش و تمام دوستان دوران تحصیلی، خصوصا هم اتاقی های عزیزم، تشکر می نمایم. همچنین از آقای محمد رضا محمودی به پاس کمک های شایان و بی دریغشان در زمینه تجزیه و تحلیل داده های آماری سپاسگزاری می نمایم. در پایان از پدر و مادر بزرگوارم و خواهران، برادران بخصوص داداش عزیزم اسماعیل و خانواده اش و همسر عزیزم که در زمینه پیشرفت و شکوفایی من زحمت کشیدند، صمیمانه تشکر و قدردانی نموده و از خداوند بزرگ آرزوی سلامتی، سعادت و تعالی همه جانبه را برای ایشان، اساتید ارجمند و دانشجویان عزیز خواستارم.

چکیده

پا سخهای فیزیولوژیک گیاهچه نخل خرما گونه *Phoenix dactylifera* به تنش های اسمزی و بررسی تعیین جنسیت گیاهچه از طریق مولکولی

بوسیله‌ی :

حسین پاسالاری

شناسائی پاسخهای فیزیولوژیکی به تنش های اسمزی شوری و خشکی موجب تولید بهتر و بیشتر گیاهان می گردد. دراین پژوهش مقادیر آب نسبی، اسید آمینه پرولین، قند های محلول و پروتئین کل برگ در سه سطح شدت تنش شوری و خشکی در نخل خرما رقم زامردان اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در هر دو نوع تنش تغییرات معنی داری روی داده است. مقدار آب نسبی برگ گیاهچه خرما در تنش شوری حداکثر ۲۴ درصد و در تنش خشکی حداکثر ۴۴ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. مقدار پرولین برگ در تنش شوری حداکثر ۲۴ درصد و در تنش خشکی حداکثر ۱۴ درصد در مقایسه با شاهد افزایش داشت. مقدار قند های محلول به ترتیب در تنش شوری و خشکی حداکثر ۱/۶ و ۱/۲ برابر نسبت به شرایط شاهد افزایش یافت. مقدار پروتئین کل برگ در تنش شوری حداکثر ۲/۳ برابر ولی در تنش خشکی حداکثر ۱/۶ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. مقدار قند های محلول و پروتئین کل برگ در تنش خشکی کاهش چشمگیری داشته است. به طور کلی می توان گفت که رقم زامردان خرما متحمل به تنش شوری در سطح ملایم، متوسط و تا حدودی سطح شدید است، اما به تنش خشکی تنها در سطح ملایم متحمل است و به تنش متوسط خشکی و به خصوص خشکی شدید حساس می باشد.

در گیاهان دوپایه کشت شده برای تولید میوه یا دانه نمی توانیم ماده ها را در مراحل اولیه رشد شناسایی کنیم. در برخی گیاهان دوپایه کروموزومهای جنسی مشخص مانند جانوران دیده نشده است، بعلاوه کروموزومهای جنسی، ژنهای آتوزومی و عوامل متعدد دیگری چون تنشهای محیطی و تعادلات هورمونی نیز در تعدادی از گونه های گیاهی روی جنسیت اثر می گذارند. لذا تعیین جنسیت گیاهچه های بوجود آمده از بذر و یا کشت بافت بایستی برای طراحی گیاهان نر و ماده در نخلستان مشخص گردد. در این تحقیق استفاده از پرایمرهای تصادفی، استخراج DNA، PCR و الکتروفورزمنجر به شناسایی الگوهای باندی متمایز در دو جنس نر و ماده شد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تنش های اسمزی ۱
۱-۲- تنش آبی (water stress) ۲
۱-۳- اثرات تنش آبی بر گیاه ۳
۱-۳-۱- اثرات تنش آبی بر رشد گیاه ۳
۱-۳-۲- اثرات تنش آبی برساختمان گیاه 4
۱-۳- ۳- اثرات تنش آبی در سطح سلولی ۴
۱-۳-۳-۱- تنش آب و تقسیم سلولی ۴
۱-۳-۳-۲- تنش آبی و اتساع سلول ۵
۱-۳-۳-۳- تنش کم آبی و اثر آن بر پروتوپلاسم ۵
۱-۴- تنش خشکی (Drought stress) ۶
۱-۵- تنش خشکی در ایران و جهان ۶
۱-۶- تنش شوری (salinity stress) ۷
۱-۷- پاسخهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان نسبت به تنش های اسمزی ۷
۱-۸- اهمیت مطالعه پاسخهای فیزیولوژیکی و ملکولی گیاهان به تنشهای محیطی ۱۰
۱-۹- مسیرهای انتقال پیام در تنش های غیر زیستی ۱۲
۱-۹-۱- مسیر انتقال پیام وابسته به تنش اسمزی- اکسیداتیو از طریق MAPK (mitogen activated protein kinases) ۱۲
۱-۹-۲- مسیرهای انتقال پیام وابسته به کلسیم ۱۳
۱-۹-۳- مسیرهای انتقال پیام از طریق هورمون ها ۱۳
۱-۱۰- روشهای اعمال تنش های اسمزی در آزمایشگاه ۱۴
۱-۱۱- جنسیت و کروموزومهای جنسی ۱۴
۱-۱۱-۱- تعیین فنوتیپ های جنسی در گروه های گیاهی **۱۵**
۱-۱۱-۲- تنظیم هورمونی جنسیت در گیاهان دوپایه ۲۰
۱-۱۱-۳- ژنهای متصل شده به کروموزومهای جنسی در گیاهان ۲۳
۱-۱۱-۴- مکانیسم های تعیین جنسیت در گیاهان نهاندانه تک پایه ۲۴
۱-۱۲-تیره خرما ۲۵
۱-۱۲-۱- رده بندی علمی نخل خرما **۲۶**
۱-۱۲-۲- مختصری درباره نخل خرما ۲۶
۱-۱۲-۳- تکثیر نخل خرما ۳۲

۱-۱۲-۴- نخل خرمای تراریخت..... ۳۴

عنوان **صفحه**

۱-۱۳- نشانگرهای مولکولی..... ۳۴
1-۱۳-۱- نشانگرهای DNA..... ۳۵
۱-۱۴- هدف از این پروژه..... ۳۸

فصل دوم : مروری بر تحقیقات گذشته

۲-۱- تاریخچه کشت خرما و گیاهان تیره خرما..... ۴۰
۲-۲- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان اسیدآمینه پرولین..... ۴۰
۲-۳- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان کربوهیدراتها..... ۴۱
۲-۴- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان پروتئین ها..... ۴۳
۲-۵- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان آب نسبی و رشد گیاه..... ۴۳
۲-۶- مطالعات انجام شده در زمینه روشهای تعیین جنسیت در گونه های گیاهی دو پایه ۴۴

فصل سوم : مواد و روش ها

۳-۱- تهیه بذر..... ۴۷
۳-۲- آماده سازی و کاشت بذر خرما رقم زامردان در گلدان های مجزای شاهد و تیمار..... ۴۷
۳-۳- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز..... ۴۷
۳-۴- مواد مورد نیاز..... ۴۸
۳-۵- زمان القاء تنش شوری و خشکی و روش آن..... ۴۹
۳-۶- اندازه گیری مقدار آب نسبی RWC (Relative Water Content)..... ۵۰
۳-۷- اندازه گیری مقدار اسید آمینه پرولین آزاد..... ۵۰
۳-۸- اندازه گیری مقدار قندهای محلول..... ۵۰
۳-۸-۱- مواد و محلول های مورد نیاز..... ۵۱
۳-۸-۲- تهیه معرف مس قلیایی (Alkaline copper reagent)..... ۵۱
۳-۸-۲- تهیه محلول آرسنو مولیبدات (Arsenomolybdate)..... ۵۱
۳-۸-۴- روش آزمایش..... ۵۱
۳-۹- اندازه گیری مقدار پروتئین کل..... ۵۲
۳-۱۰- استخراج DNA..... ۵۴
۳-۱۰-۱- مواد استفاده شده..... ۵۴
۳-۱۰-۲- روش کار..... ۵۵
۳-۱۱- پرایمر (آغازگر)..... ۵۶
۳-۱۲- واکنش PCR..... ۵۷
۳-۱۳- الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR..... ۵۸
۳-۱۴- تجزیه و تحلیل آماری داده ها..... ۶۰

فصل چهارم : نتایج

۴-۱- تعیین میزان RWC ۶۱

عنوان **صفحه**

۴-۲- اثر تنش شوری و خشکی بر میزان محتوی پرولین برگ ۶۳
۴-۳- اثر تنش شوری و خشکی بر میزان محتوی کربوهیدرات های برگ ۶۵
۴-۴- اثر تنش شوری و خشکی بر میزان محتوی پروتئین کل برگ ۶۸
۴-۵- استخراج DNA ۷۲
۴-۶- واکنش PCR ۷۳

فصل پنجم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان آب نسبی و رشد گیاه ۷۵
۵-۲- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان اسیدآمینه پرولین ۷۶
۵-۳- اثر تنش خشکی و شوری بر میزان کربوهیدراتها ۷۶
۵-۴- اثر تنش شوری و خشکی بر محتوی پروتئین کل برگ ۷۷
۵-۵- الگوی باندی متمایز ایجاد شده برای تعیین جنسیت در نخل خرما رقم زامردان ۷۷
نتیجه گیری ۷۹
پیشنهادات ۸۱
منابع ۸۲
چکیده انگلیسی ۹۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- تعدادی از گونه های گیاهی دارای کروموزوم جنسی هوموومورفیک یا هتروومورفیک..... ۲۰
جدول۱-۲- اثرات هورمونی بر روی مکانیسمهای تعیین جنسیت..... ۲۲
جدول ۱-۳- یک سری ژنهای مرتبط با کروموزوم های جنسی در گیاهان ۲۳
جدول ۳-۱- بافراستخراج پروتئین ۵۳
جدول۳-۲- ترکیب بافر استخراج DNA ۵۴
جدول ۳-۳- ترکیب بافر TE..... ۵۵
جدول ۳-۴- نام و توالی پرایمرهای تصادفی ده نوکلئوتیدی استفاده شده که ایجاد پلی مورفیسم کرده اند ۵۷
جدول ۳-۵- مواد PCR ۵۸
جدول ۴-۱- میانگین آب نسبی شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم مورد آزمایش ۶۲
جدول ۴-۲- میانگین آب نسبی شرایط شاهد و تنش شوری در رقم مورد آزمایش..... ۶۲
جدول ۴-۳- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش شوری در رقم مورد آزمایش ۶۵
جدول ۴-۴- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم مورد آزمایش.... ۶۵
جدول ۴-۵- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم مورد آزمایش.... ۶۷
جدول ۴-۶- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش شوری در رقم مورد آزمایش ۶۸
جدول ۴-۷- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم مورد آزمایش.... ۷۰
جدول ۴-۸- میانگین جذب نور عصاره برگ خرما شرایط شاهد و تنش شوری در رقم موردآزمایش..... ۷۱
جدول ۴-۹- میانگین مربعات و معنی دار بودن پارامترهای اندازه گیری شده ۷۱
جدول ۴-۱۰- خلاصه محصولات تکثیر RAPD در نخل خرما رقم زامردان ۷۴

فهرست اشکال و نمودارها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- چرخه تعیین جنسیت ژنتیکی سرخس *Ceratopteris* ۱۷
شکل ۱-۲- تصاویری از درختان خرما ۲۸
شکل ۱-۳- تصاویری از میوه های خرما در مراحل تکاملی ۳۱
شکل ۴-۱- میانگین مقدار آب نسبی برگ گیاهچه خرما در شرایط شاهد و سه سطح تنش شوری، هر عدد میانگین سه تکرار است ۶۱
شکل ۴-۲- میانگین مقدار آب نسبی برگ گیاهچه خرما در شرایط شاهد و سه سطح تنش خشکی، هر عدد میانگین سه تکرار است ۶۲
شکل ۴-۳- مقدار پرولین آزاد برگ گیاهچه خرما در شرایط شاهد و سه سطح تنش شوری، اعداد، میانگین سه تکرار است ۶۳
شکل ۴-۴- مقدار پرولین آزاد برگ در شرایط شاهد و سه سطح تنش خشکی، اعداد، میانگین های ۳ تکرار هستند ۶۴
شکل۴-۵- منحنی استاندار غلظت و جذب نور پرولین ۶۴
شکل۴-۶- تغییرات مقدار قند های محلول برگ در شرایط شاهد و سه سطح تنش شوری، اعداد، میانگین های ۳ تکرار هستند ۶۶
شکل ۴-۷- تغییرات مقدار قند های محلول برگ در شرایط شاهد و سه سطح تنش خشکی، اعداد، میانگین های ۳ تکرار هستند ۶۶
شکل۴-۸- منحنی استاندارد غلظت و جذب نور گلوکز ۶۷
شکل۴-۹- تغییرات مقدار پروتئین کل برگ در شرایط شاهد و سه سطح تنش شوری، اعداد، میانگین های ۳ تکرار هستند ۶۹
شکل۴-۱۰- تغییرات مقدار پروتئین کل برگ در شرایط شاهد و سه سطح تنش خشکی، اعداد، میانگین های ۳ تکرار هستند ۶۹
شکل ۴-۱۱- منحنی استاندار غلظت و جذب نور آلبومین ۷۰
شکل ۴-۱۲- ژل الکتروفورز DNA استخراج شده از برگ خرما رقم زامردان، به ترتیب از چپ به راست دو مورد جنس نر و دو مورد جنس ماده ۷۲
شکل ۴-۱۳- الگوی نواری ایجاد شده با پرایمر OPB-7 در پنج نمونه جنس نر و ماده. از راست به چپ، مارکرbp-۱۰۰، نر ۱تا ۵، ماده ۱تا ۵ و مارکرbp-۱۰۰. ، نوار حدود bp-۵۲۰ مشخص شده با پیکان در نمونه های نر موجود است ولی در نمونه های ماده دیده نمی شود ۷۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تنش های اسمزی

تنش های اسمزی جزئی از تنش های غیر زیستی (محیطی) است که همه ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور تحمیل می کند. اهمیت مطالعه در این زمینه پهنه وسیعی از حاصلخیزترین مناطق تولیدی کشور ما و قسمت عمده محصولات اقتصادی مهم کشور از جمله خرما همه ساله در معرض تهدید تنش های اسمزی از جمله تنش خشکی، شوری و کم آبی قرار دارند.

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 و شوری که اثرات متعددی بر رشد و میزان تولید گیاهان دارند (Sakuma et al. 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 چون خشکی و شوری 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 یا کم آبی 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 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 et al. 2002).

۱-۲- تنش آبی (water stress)

آب، ملکول مهمی برای تمامی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان بوده و بین ۸۰ تا ۹۰ درصد بیوماس گیاهان علفی را تشکیل می دهد. اهمیت آب در رشد و نمو گیاهان بر کسی پوشیده نیست و مشاهداتی نظیر پژمرده شدن و مرگ گیاهان در نتیجه کمبود آب، اهمیت آبیاری در کشاورزی و احتیاج مبرم گیاهان به آب را نشان می دهد (ابراهیم زاده، ۱۳۷۲).

تنش آبی نه تنها در اثر کمبود آب، که در اثر تنش هایی همچون دمای پایین یا شوری نیز حاصل می شود. همه این تنش ها واجد یک اثر منفی بر روی تولید و عملکرد گیاه می باشند که این خود، حوزه تحقیقاتی وسیعی را برای بهبود عملکرد گیاهی می طلبد. آب به دو صورت در سلول وجود دارد. آب آزاد، که ۹۵ درصد کل آب موجود در سلول را تشکیل می دهد و آبی است که به عنوان حلال یا محیط پراکنده کننده سیستم کلوئیدی در سلول وجود دارد و آب موجود در واکوئل ها را نیز شامل می شود و آب پیوسته، که ۴ تا ۵ درصد کل آب سلول را

تشکیل می دهد. این آب با اتصال سستی از طریق پیوند هیدروژنی و سایر پیوندها بـه مولکـول های پروتئینی متصل می شود. این بخش شامل آب غیر متحرک کـه در بـین سـاختمان هـای رشته ای ماکرومولکولی نیز وجود دارد، می شود (مجد، ۱۳۸۰).

تنش آبی موجب تغییرات زیادی در انواع و مقادیر کربوهیـدرات هـای گیـاه مـی شـود. بـا افزایش تنش آبی در برگ ها، میزان نشاسته کاهش یافته و معمولاً مقدار قند افزایش پیـدا مـی کند. گیاهان برای سازگار شدن با شرایط کم آبی، روش های گوناگونی را توسعه داده اند. جنبه های ژنتیک مولکولی، امکان پاسخ مناسب و سازگاری با این تنش را به آن ها داده است. اثـرات متقابل بین گیاه و محیط، بستگی به شدت و مدت زمان دوره کم آبی و نیز مرحله نمـو گیـاه و مرفولوژی و آناتومی گیاه دارد. تمامی موجودات زنـده از بـاکتری هـا گرفتـه تـا یوکـاریوت هـا، برخوردار از یک سری حسگرها (گیرنده های تنش)، واسطه های انتقال دهنـده پیـام و تنظـیم کننده هایی هستند که امکان پاسخ و سازگاری با تغییـرات آب قابـل دسـترس را بـرای آن هـا فراهم ساخته است. تنش عبارت است از هر نوع عامل محیطی (خارجی) که بر موجود زنده اثـر می گذارد. اثرگذاری تنش ها ممکن است از چند دقیقه (مانند دمای هوا) تا روزهـا و هفتـه هـا (مانند رطوبت خاک) یا حتی ماه ها به طول انجامد. پاسخ های گیاه نیز به تنش به دو نوع کلی تقسیم می شود، پاسخ های کوتاه مدت، که معمولاً فیزیولوژیکی و پاسخ های بلنـد مـدت، کـه معمولاً مولکولی است. تنش آبی یکی از معمول ترین تنش هاست، که سـه نـوع تـنش خـشکی (Drought stress)، تنش شوری (salinity stress) و تنش سرما (cold stress) نیز روی آن اثر می گذارند. اگر چه این تنش ها به اشکال مختلف اعمال می شوند، ولی اثرات مشابهی بر میزان آب گیاه دارند و با کاهش آب در سلول های گیاهی، رشد و نمو گیاه را تحت تـأثیر قـرار می دهند (Sakuma et al. 2002).

۱-۳- اثرات تنش آبی بر گیاه

۱-۳-۱- اثرات تنش آبی بر رشد گیاه

تنش آب بر هر یک از جنبه های رشد موثر بوده و موجب تغییرات آناتومی، مورفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی می گردد (علیزاده، ۱۳۸۵). واضح اسـت کـه تـنش طـولانی آب موجـب کاهش اندازه گیاه می شود. گرچه کاهش آماس سلول مهمترین عامل کوچک ماندن اندازه گیاه است ولی تنش کم آبی تقریباً بر هر فرایندی از گیـاه مـوثر بـوده و عـلاوه برآمـاس بـر عوامـل دیگری نیز دخالت دارند. کمبود آب انحرافی در متابولیسم گیاه از الگوی طبیعی خود القاء مـی کند. فرایندهای آنزیمی محتملاً بطور مستقیم با پتانسیل آب کنترل می شود و کمبـود آب بـه

مقدار چند بار (bar) موجب تغییر متابولیسم کربوهیدراتها و ازت می شود. یکی از صدمات کم آبی افزایش آنزیم های proteolytic و تجزیه پروتئین است که باعث ایجاد مواد سمی در گیاه می گردد (لارچر، ۱۳۷۶).

اثر احتمالی دیگر مختل نمودن ساختمان ظریف سلول و منحرف نمودن مواد غذایی از مسیر متابولیکی طبیعی خود می باشد. همچنین کده بندی(compartmentation) به واسطه اختلال در عملکرد غشاء کاهش می یابد (علیزاده، ۱۳۸۵). معمولاً اثر تنش آب بر رشد گیاه تصاعدی است. مثلاً با بسته شدن روزنه ها میزان فتوسنتز تقلیل پیدا کرده و تامین دی اکسید کربن نیز کاهش می یابد. تنش آب همچنین توانایی پروتوپلاسم را برای عمل فتوسنتز کاهش داده و کاهش فتوسنتز باعث می شود جابجایی کربوهیدراتها و مواد تنظیم کننده رشد تقلیل یافته و اختلال در متابولیسم ازت نیز به کاهش آماس و رشد می افزاید (Wibe and Wihrheim, 1982). با افزایش تنش کربوهیدراتها و پروتئین ها هیدرولیز شده و مقدار قندهای قابل حل و ترکیبات ازتی افزایش می یابند.

۱-۳-۲- اثرات تنش آبی بر ساختمان گیاه

به خوبی شناخته شده است که گیاهانی که در معرض تنش کم آبی قرار دارند نه تنها اندازه شان کاهش می یابد بلکه خصوصیات ساختمانی و بخصوص برگ های آنها نیز تغییر می کند. سطح برگ، اندازه سلولها و حجم فضاهای بین سلولی معمولاً کاهش پیدا می کند ولی مقدار کوتین، کرک ها، تعداد رگبرگ ها، روزنه ها و ضخامت لایه های پارانشیمی برگ ها افزایش می یابد. نتیجه این وضعیت ضخامت نسبتاً زیاد، چرمی شدن و کوتینی شدن شاخ و برگ است که از خصایص گیاهان مقاوم به خشکی می باشد (علیزاده، ۱۳۸۵).

۱-۳-۳- اثرات تنش آبی در سطح سلولی: به طور کلی وضعیت آب در گیاه به وسیله تنش آب سلول کنترل می گردد.

۱-۳-۳-۱- تنش آب و تقسیم سلولی

از مهمترین اثرات کمبود آب در بافت های مریستمی بر روی فعالیت های سازندگی از قبیل ساختن DNA و RNA و مواد جداره سلول می باشد. کم آبی باعث کاهش RNA و DNA می گرددکه منجر به کاهش پروتئین سازی می شود. حساسیت منطقه مریستمی نسبت به تنش آب بین گونه های مختلف متفاوت است. (علیزاده، ۱۳۸۵).

۱-۳-۳-۲- تنش آبی و اتساع سلول

کاهش آماس باعث تقلیل نمو سلول می شود که به نوبه خود موجب کاهش نمو برگ، شاخه و ریشه ها می گردد.

Gauch و Wadleigh نشان داده اند که بین کاهش آماس و کاهش نمو اندام های گیاه رابطه نزدیکی بر قرار است (Wadleigh and Gauch, 1948). Boyer گزارش نموده است که اگر پتانسیل آب برگ به کمتر از بار برسد نمو برگ های آفتابگردان متوقف می شود (Boyer, 1968). گسترش سلول فرایندی است که از فشار تورژسانس ناشی می شود که به کم آبی حساس است. گسترش سلول بوسیله فرمول زیر بیان می شود: $GR= m(\psi p-y)$.

با کم آبی نه تنها فشار آماسی و قابلیت گسترش دیواره کاهش می یابند، بلکه y (آستانه تحریک) افزایش می یابد. در شرایط عادی قابلیت گسترش دیواره (m) خیلی بزرگ و محلول دیواره سلولی کمی اسیدی است. تنش کم آبی از طریق ممانعت از انتقال پروتون در عرض غشاء پلاسمایی به درون دیواره سلولی موجب افزایش PH شده و قابلیت گسترش دیواره کاهش می یابد (Taize and Ziger, 2002).

۱-۳-۳-۳- تنش کم آبی و اثر آن بر پروتوپلاسم

اغلب اثرات تنش آب، بجز آنهایی که مستقیماً از طریق کاهش آماس وارد عمل می شوند، بستگی به از دست دادن آب پروتوپلاسم دارد. خارج ساختن قسمتی از آب اطراف مولکول پروتئین باعث تغییر ترکیب آن می گردد که بر نفوذ پذیری، درجه سیالی بودن و فعالیت های آنزیمی آن موثر است (Wibe and Wihrheim, 1982).

محققین دو مرحله را در از دست دادن آب مشخص کرده اند: مرحله واکنش، که مرحله اولیه برخورد گیاه با تنش است، و مرحله جبران یا سخت شدن که در صورتی اتفاق می افتدکه طول مدت تنش آب از چندین روز تجاوز نماید.

از خصوصیات مرحله اول می توان کاهش لزوجت پروتوپلاسم، افزایش نفوذ پذیری نسبت به آب، اوره و گلیسرین، تجزیه پروتئین ها و افزایش تنفس را نام برد. اگر تنش ادامه یابد مرحله جبران بروز می کند که از خصوصیات آن افزایش لزوجت به مقدار بیش از حد اولیه، کاهش نفوذ پذیری نسبت به آب و اوره و کاهش فرایند های فیزیولوژیکی از قبیل تنفس می باشد. اگر گیاه قبل از صدمات حاصله از پژمردگی دائم آبیاری شود این فرایندها برگشت نموده و شرایط گیاه به وضعیت طبیعی خود می رسد، ولی در بعضی موارد رسیدن به شرایط اولیه امکان پذیر نمی باشد و گیاه از بین می رود (Wibe and Wihrheim, 1982).

۱-۴- تنش خشکی (Drought stress)

تنش به عنوان عامل بیرونی که اثر سوء بر رشد و نمو گیاه دارد شناخته شده است (Taiz and Zeiger, 2002). اما از دیدگاه فیزیولوژی گیاهی تنش خشکی در طبیعت می تواند به چند طریق اتفاق بیافتد (Basra and Basra, 1997) که شامل موارد زیر است:

۱- رطوبت کم خاک که محدود کننده ذخیره آبی ریشه ها می باشد.

۲- رطوبت کم هوا که موجب تعرق بیشتر برگها می شود.

۳- دمای بالا که باعث افزایش تنفس و صدمه وارد شدن به سیستم متابولیسمی و ساختمان مولکولی می گردد.

۴- تشعشع زیاد خورشید موجب اثرات سوء نور خورشید و اکسیداسیون نوری می گردد.

۵ - خشک شدن خاک که سختی خاک را افزایش داده و بر رشد ریشه ها موثر است.

۶ - در اثر خشک شدن لایه روئی خاک که بیشترین مواد مواد معدنی را دارا می باشد مواد غذایی در دسترس گیاه کم می شود.

۷- با کم شدن آب خاک غلظت نمکهای خاک افزایش یافته و موجب تنش اسمزی و سمیت می گردد.

۱-۵- تنش خشکی در ایران و جهان

مشکل خشکی در سراسر جهان بخصوص کشورهای فقیر موجب صدمه جدی به کشاورزی در این کشورها و کمبود غذای قابل دسترس مردم گردیده است. آمار افزایش جمعیت و محدودیت زمینهای مناسب کشاورزی، پرداختن به موضوع افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی را به منظور پایدار نمودن میزان محصول و تامین غذای مورد نیاز بسیاری از مردم جهان ضروری ساخته است (Baker, 1989). کشور ایران با توجه به متوسط نزولات آسمانی سالیانه که حدود ۲۴۰ میلی متر از نظر اقلیم شناسی در شمار مناطق خشک جهان به حساب می آید. قسمتهایی از نقاط ایران مانند مناطق شمالی دارای بارندگی کافی بوده و قسمتهایی نیز جزء مناطق خشک است. با در نظر گرفتن پایین بودن میزان بارندگی، بالا بودن مقدار تبخیر و تعرق گیاهان و محدودیت منابع آبی، مسئله خشکی جزء مهمترین مشکلات کشاورزی و منابع طبیعی کشور ما محسوب می گردد (عبدمیشانی، ۱۳۶۶).

۱-۶- تنش شوری (salinity stress)

مشخصه زیستگاههای شور مقدار زیاد نمکهای محلول است. در سطح زمین، خاکهای شور تحت شرایط اقلیمی مرطوب و خشک یافت می شوند. در طی فصل رشد، پس از تبخیر و تعرق آب، نمکها در کنوپی گیاه تجمع پیدا می کنند. بعد از اینکه برگها و سایر بخشهای گیاه از بین رفتند و ریزش نمودند نمکهای آنها توسط باران شسته شده و به خاک باز می گردد. شوری خاک در مناطق خشک که در آن تبخیر از سطح خاک بیش از مقدار آبی است که سالانه بصورت بارندگی وارد خاک می شود، تا حدود زیادی افزایش می یابد. خاکهای شور در مناطق مرطوب بطور غالب دارای NaCL هستند. شوری خاک به دلیل جلو گیری از جذب آب و عناصر به درون گیاه یکی از مهمترین محدودیت های رشد گیاهان زراعی محسوب می شود و به عنوان مشکل بزرگ کشاورزی، بالاخص در کشاورزی آبی در منابع گزارش شده است. شوری در گیاهان منجر به ارائه مقالات زیادی شده است اما با این حال فقط تعداد محدودی واریته مقاوم به شوری ایجاد یا اصلاح شده است. از روی بررسی دلایل عدم موفقیت در ایجاد ژنوتیپ های مقاوم به شوری می توان مشخص کرد که شوری خاک هنوز یک مشکل بزرک کشاورزی در مقیاس جهانی محسوب می شود. افزایش نمک در خاک باعث ایجاد مشکلات فراوانی برای مردم جهان خصوصاً در نواحی خشک و نیمه خشک مثل کشور ما ایران که محصولات کشاورزی از طریق آبیاری رشد می کنند شده است. بررسی شده است که از ۳۴۳ میلیون هکتار از خاک های شور در دنیا، آسیا دارای بیشترین مساحت اراضی شور می باشد. در خاکشناسی و زراعت، شوری را بر حسب هدایت الکتریکی عصاره اشباع (Ece) بیان می کنند. چنانچه مقدار هدایت الکتریکی عصاره اشباع محلول خاک از چهار دسی زیمنس بیشتر باشد آن خاک را خاک شور می نامند. مقدار ECe از رابطه زیر حاصل می شود. L.F متوسط نسبت آبشویی از منطقه ریشه است که برای خاک های مختلف متفاوت است و ECw میزان نسبی آب (عصاره اشباع معادل ۱۰۰ درصد آب) را نشان می دهد (لارچر، ۱۳۷۶).

$$ECe = \frac{ECw}{2.2LF}$$

۱-۷- پاسخهای فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان نسبت به تنش های اسمزی

پاسخ های فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش های اسمزی 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 قـرار مـی دهنـد، مـی باشـد. اولین مرحله در شروع پاسخهای مولکولی دریافت پیام تنش و فرستادن اطلاعـات دربـاره آن از طریق یک مسیر آبشاری انتقال پیام می باشد (Knight and Knight, 2001). ایـن مـسیر در نهایت به تغییرات فیزیولوژیکی نظیر بسته شدن روزنه ها و یا بیان برخـی ژنهـا و در نتیجـه تغییر فرآیندهای سلولی و مولکولی منجر می گـردد (Knight and Knight, 2001). چـون 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 et al. 2000).

مسیر انتقال پیام در پاسخ به تنش های محیطی ترکیبات و پروتئین های زیـادی را شـامل می شود (Seki et al. 2003). تحت شرایط تنش نه تنها ژنهـایی بـا محـصولات متـابولیکی برای حفاظت سلول در برابر کمبود آب بیان می شوند بلکه ژنهایی برای تولیـد محـصولات لازم در مسیر های آبشاری انتقال پیام تحت این تنش ها تنظیم و القـا مـی شـوند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

در مطالعات اخیر برروی پاسخ های مولکولی گیاهان ژن های بسیاری شـناخته شـده انـد. این ژنهای القا شونده تحت تنش براساس نقش محصولاتی که کد می کنند به دو دسته تقـسیم می شوند:

۱-گروه اول شامل پروتئین های عملکردی (Functional) اسـت کـه احتمـالاً در تحمـل بـه 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 قنـدها، بتـائین، پرولین و غیره) می شوند.
- پروتئین هایی که از ماکرومولکولها و غشاء ها در سلولها محافظت می کنند ماننـد اسـمتین، پروتئین 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 آسـیب دیـده طـی از دسـت رفـتن آب سـلولی (ماننـد یوبیکوئیتین) (Bray, 1993).
- آنزیمهای سم زدا (GST، کاتالاز، سوپر اکسیداز دسموتاز و غیره)

۲- گروه دوم شامل پروتئین های تنظیمی است که عوامل پروتئینی درگیـر در تنظـیم آبـشار انتقال پیام هستند که احتمالاً 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 et al. 2001) که 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 ا ند.

ازجمله ژنهای القا شونده در مسیر غیر وابسته به ABA، Kin1, rd29A(LTi78,COr78)، COr6.6 (Kin 2)، 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 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 کاملاً 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).