دانشکده‌ی کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

بررسی برخی عوامل موثر بر رویان زایی بدنی در سویا (*Glycine max* L.) با استفاده از روشهای آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی

توسط

رفیعه کشفی

استاد راهنما

دکتر اسماعیل ابراهیمی

اساتید مشاور

دکتر هومن راضی

دکتر زهره حیدریان

دکتر حسن صالحی

خرداد ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحیم

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب رقیعه کشفی دانشجوی رشته مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی اظهار می‌کنم، که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام، همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان‌نامه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: رقیعه کشفی

تاریخ و امضاء ۱۳۹۰/۰۳/۱۶

به نام خدا

بررسی برخی عوامل موثر بر رویان زایی بدنی در سویا (*Glycine max L.*) با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی

به وسیله‌ی

رفیعه کشفی

پایان نامه

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

در رشته‌ی

اصلاح نباتات

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان‌نامه با درجه: **عالی**

دکتر اسماعیل ابراهیمی، استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات (رئیس کمیته) .....

دکتر هومن راضی، استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات .....

دکتر زهره حیدریان، استادیار پژوهشکده زیست فناوری .....

دکتر حسن صالحی، دانشیار بخش علوم باغبانی .....

خرداد ۱۳۹۰

سپاسگزاری

پروردگار را سپاسگزارم، که علم را چون چراغی روشن در مسیر تاریک جهان قرار داد. مسیری که پیمودن هر قدمش رازی از بزرگی او آشکار می‌کند. سپاس که مرا عنایت کردی در روشن نمودن قدمی چند از این مسیر طولانی.

تقدیم به عزیزانی که قلب و روحم از مهربانیشان سرشار است

همسرم

شادی بخش و همراه لحظات زندگیم. کسی که شادی واقعی را با حضورش به من آموخت

پدرم

آموزگار واقعی و دوست شفیقم، مردی که هرچه دارم مدیون اویم

مادرم

او که ریشه دواند تا من رشد کنم، مهربانی که معنای لطافت را به قلبم آموخت

خواهرانم و برادرم

آنان که نقش شادی را بر لوح قلبم کشیدند

شایسته است از استاد راهنمای بزرگوارم؛ **جناب آقای دکتر ابراهیمی** که نه تنها در راه کسب علم و انجام این پایان نامه، بلکه در مسیر زندگی درس‌های زیادی به من آموختند، نهایت قدردانی را داشته باشم، همچنین از اساتید محترم مشاور؛ **جناب آقای دکتر راضی، سرکار خانم دکتر حیدریان** و **جناب آقای دکتر صالحی** که مرا در پیمودن این مسیر و هموار سازی آن یاری رساندند، سپاسگزارم.

چکیده

بررسی برخی عوامل موثر بر رویان زایی بدنی در سویا (*Glycine max* L.) با استفاده از روشهای آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی

به کوشش

رفیعه کشفی

رویان‌زایی بدنی، یک شکل غیرجنسی از تکثیر گیاهان در طبیعت است که خیلی از موارد باززایی جنسی را تقلید می‌کند. در این تحقیق کشت بافت سویا *Glycine max* و رقم ویلیامز انجام شد. بهترین نتیجه برای القای رویان بدنی سطح ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و پس از آن ۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد، این نتیجه به همراه ریزنمونه کوتیلدون نابالغ و از سطح آداکسیال و اندازه بذر ۴-۳ میلی‌متر حاصل شد. علاوه بر این قطعه ای از توالی ژن MONOPTEROS (MP) که در آرابیدوپسیس وجود دارد و در سویا ناشناخته بود از رقم ویلیامز جداسازی و توالی یابی شد. در قسمت آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای اولین بار از تحلیل پروموتر برای فهم کاربرد ناشناخته Monopteros استفاده شد. تعداد رایجی از سیس المنت‌های تنظیمی جیبرلین و Skn-1_motif نتایج ما را در مورد دخیل بودنِ این عامل رونویسی در فاز دوم رویان‌زایی بدنی تائید می‌کند، به این دلیل که افزایش در سطح جیبرلین باعث شروع این مرحله می‌شود. در نتیجه، آنالیز پروموتر عوامل رونویسی حیاتی در رویان‌زایی بدنی و کشف المنت‌های پاسخگوی هورمونیِ فعال روی نواحی پروموتر از این ژن‌ها، شاهدی ارزشمند را برای پیشرفت کشت بافت گیاه ارائه می‌کند. همچنین آنالیز دمین-های این ژن توالی‌یابی شده در سویا با دمین‌های موجود در آرابیدوپسیس به همراه ترسیم درخت فیلوژنی نشاندهنده ی شباهت بالای توالی جدید در سویا با دمین سوم یعنی AUX-IAA در آرابیدوپسیس بود. برای درک بهتر روابط میان این عامل رونویسی و دیگر عوامل رونویسی ترسیم شبکه PPI و نرم‌افزار Pathway Studio برای ساخت، به تصویر کشیدن و آنالیز مسیرهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. پیچیده‌ترین شبکه را روش سوم ایجاد کرد که نشان دهنده اثرات (تنظیم، بیان و اتصال) گسترده میان Monopteros/IAA24 و دیگر فرآیندهای سلولی بود. اثرات تنظیم کننده‌گی این عامل رونویسی روی نمو ریشه، الگوی گل دادن، نمو پروکامبیوم، نمو رویانی، آغازه مریستم، گل دهی، نمو گیاه، تمایز، نمو مریستم و روزت دیده شد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱- پیشگفتار	۲
۱-۲- هدف از این پژوهش	۴
فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین	۵
۲-۱- رویان زایی بدنی	۶
۲-۲- سویا (*Glycine max* L.)	۷
۲-۳- کشت بافت سویا	۸
۲-۳-۱- تاریخچه کشت بافت سویا	۸
۲-۳-۲- تاثیر انواع هورمون در کشت بافت سویا	۱۰
۲-۳-۳- تاثیر اندازه pH در رویان‌زایی بدنی سویا	۱۱
۲-۳-۴- اهمیت اکسین در رویان‌زایی بدنی سویا	۱۲
۲-۳-۵- تاثیر منبع هیدرات کربن در رویان‌زایی بدنی سویا	۱۵
۲-۴- عامل رونویسی	۱۶
۲-۵- ژن MONOPTEROS یا IAA24 و نقش آن	۱۶
۲-۶- ژن MONOPTREROS و نقش آن در تشکیل رویان	۱۹
۲-۷- خانواده AUX/IAA و عملکرد آن	۲۱
۲-۸- ژن Squalene monooxygenase	۲۱
۲-۹- هورمون های گیاهی به ویژه اکسین و نقش آن	۲۲
۲-۱۰- Auxin Response Element (AuxRE) و خانواده ARFها	۲۳
۲-۱۱- بیوانفورماتیک	۲۴
۲-۱۱-۱- اهمیت بیوانفورماتیک گیاهی چیست؟	۲۶
۲-۱۱-۲- ریزآرایه	۲۶
فصل سوم: مواد و روش ها	۲۹
۳-۱- تهیه بذر	۳۰
۳-۱-۱- نحوه کاشت	۳۰

عنوان	صفحه

۳-۲- کشت بافت	۳۲
۳-۲-۱- برداشت غلاف، استریل کردن	۳۲
۳-۲-۲- شکافتن غلاف، شروع کشت	۳۲
۳-۲-۳- کشت بافت، شرایط نگهداری	۳۳
۳-۲-۴- رشد رویان های بدنی	۳۵
۳-۳- آنالیز آماری	۳۵
۳-۴- جداسازی و توالی یابی MONOPTEROS (IAA24 یا MP) از سویا با استفاده از DNA ژنومی	۳۶
۳-۴-۱- استخراج DNA	۳۶
۳-۴-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA	۳۸
۳-۴-۳- طراحی آغازگر	۳۹
۳-۴-۴- تکثیر قطعه DNA مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز	۴۰
۳-۴-۵- الکتروفورز ژل آگارز	۴۱
۳-۴-۶- جداسازی و برش قطعه مورد نظر از روی ژل	۴۱
۳-۴-۷- تعیین توالی نوکلئوتیدی	۴۳
۳-۵- آنالیز های بیوانفورماتیکی	۴۴
۳-۵-۱- بررسی بیان ژن با استفاده از دادههای میکروواری	۴۴
۳-۵-۲- آنالیز آماری دادههای حاصل از آزمایش میکروواری	۴۴
۳-۵-۳- ترسیم شبکه ی ژنی مابین عوامل رونویسی	۴۵
۳-۵-۴- آنالیز پروموتر و پیشبینی سیس المنتهای موجود بر روی آن	۴۵
فصل چهارم: نتایج و بحث	۴۶
۴-۱- واکنش زنجیرهای پلیمراز توسط آغازگرهای اختصاصی	۴۷
۴-۱-۱- جداسازی قطعه مورد نظر از روی ژل	۴۷
۴-۱-۲- ترادف MP در سویا و آرابیدوپسیس	۴۸
۴-۲- بررسی های بیوانفورماتیکی	۴۹
۴-۲-۱- مقایسه نواحی دمین MP در Arabidopsis و در *Glycine max*	۴۹
۴-۲-۲- آنالیز دومین AUX-IAA	۵۴
۴-۲-۳- آنالیز ناحیهی پروموتری ژن MP در Arabidopsis	۵۵
۴-۲-۴- میکروواری و آنالیز آماری	۵۷
۴-۲-۵- ترسیم شبکه ژنی یا PPI	۶۲

عنوان	صفحه
۴-۳- کشت بافت سویا	۶۶
۴-۴- نتایج آماری داده های کشت بافت	۶۷
۴-۴-۱- نتایج آنالیز آماری برای فاز کالوس زایی (X1) و نوع هورمون (a)	۷۱
۴-۴-۲- نتایج آنالیز آماری برای فاز رویان بدنی (X2) و نوع هورمون	۷۵
۴-۴-۳- نتایج آنالیز آماری برای فاز کالوس زایی (X1) و نوع ریزنمونه (b)	۸۱
۴-۴-۴- نتایج آنالیز آماری برای فاز رویان بدنی (X2) و نوع ریزنمونه	۸۳
۴-۴-۵- نتایج آنالیز آماری برای فاز کالوس زایی (X1) و رویان زایی (X2) اندازه بذر برای آماده‌سازی ریزنمونه (c)	۸۶
۴-۵- بهترین نتیجه برای رویان‌زایی در داده های کشت بافت	۸۶
نتیجه‌گیری نهایی	۸۸
نوآوری	۸۷
پیشنهادات	۸۷
فهرست منابع	۸۸
چکیده به زبان انگلیسی	۹۳

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- خصوصیات ژن Monopteros در آرابیدوپسیس ۱۷
جدول ۳-۱- مواد لازم برای استخراج DNA ۳۸
جدول ۳-۲- مواد لازم برای تهیه ۵۰۰ ml بافر استخراج ۳۸
جدول ۳-۳- پرایمر های اختصاصی ژن MP ۳۹
جدول۳-۴- نوع و مقدار مواد مورد نیاز برای تکثیر طول ژن MP برای یک جفت پرایمر ۴۰
جدول ۳-۵- چرخه دمایی واکنش زنجیره ای پلی‌مراز برای تکثیر طول ژن MP ۴۰
جدول۳-۶- مقدار مواد موجود در کیت جداسازی ۴۲
جدول ۳-۷- توزین ویالها و اختلاف آنها ۴۲
جدول ۴–۱- خصوصیات ژن MP در آرابیدوپسیس ۵۲
جدول ۴-۲- جدول ANOVA مربوط به ۱۱ عامل رونویسی ۵۹
جدول ۴–۳- اسامی ۲۸ عامل رونویسی به همراه تبدیل .Accession no آنها ۶۴
جدول ۴-۴- نتایج حاصل از نرم افزار pathway studio برای ژن IAA24 ۶۶
جدول ۴-۵- جدول تجزیه واریانس برای فاکتورهای مورد بررسی و اثر متقابل مابین آنها بر روی جنین زایی ۷۰
جدول ۴-۶- نتایج مقایسه میانگین آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ ۸۰

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- مقایسه الگوی بیان ژن ها در دو حالت مختلف ۲۸
شکل ۳-۱- اندازه ی غلاف آماده برای برداشت ۳۱
شکل ۳-۲- تصویر سویا های کشت شده در محیط گلخانه ۳۱
شکل ۳-۳- نحوه ی جداسازی ریزنمونه از بذر نابالغ ۳۳
شکل ۳-۴- کوتیلدون نابالغ به همراه هیپوکوتیل، فاقد پوسته ۳۴
شکل ۳-۵- هیپوکوتیل نابالغ به همراه آغازه برگ ۳۴
شکل ۳-۶- استخراج DNA ژنومی سویا. DNA رقم ویلیامز روی ژل آگارز ۳۹
شکل ۳-۷- نواحی اگزونی و اینترونی MP در آرابیدوپسیس ۳۹
شکل ۴-۱- جداسازی توالی ۱۵۲۷ و ۹۵۰ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی. ۴۷
شکل ۴-۲- جداسازی توالی ۱۵۲۷ و ۹۵۰ جفت باز از روی ژل. ۴۸
شکل ۴-۳- توالی یابی قسمتی از ژنوم ژن MP از سویا. ۴۹
شکل ۴-۴- ژن Squalene Monoxygenase در سویا و مشابهت قطعه ای از توالی جدید با آن ۵۰
شکل۴-۵- جایگاه توالی جدید در سویا بر روی کروموزم ۴ ۵۱
شکل۴-۶- دمین‌های موجود در ژن MP در آرابیدوپسیس ۵۱
شکل۴-۷- Align سومین دمین آرابیدوپسیس AUX-IAA با توالی جدید در سویا ۵۳
شکل۴-۸- درخت فیلوژنی سه دمین آرابیدوپسیس ۵۴
شکل۴-۹- پیش‌بینی سیس المنت‌های موجود در رشته مثبت در ناحیه ی فرضی پروموتر ژن MP ۵۷
شکل۴-۱۰- مقادیر بیان ۲۸ عامل رونویسی با روش F-test (ANOVA) در سه فاز رویان‌زایی ۵۸
شکل۴-۱۱- مقادیر بیان ۱۱ عامل رونویسی با بیان متفاوت و معنی‌دار با روش F-test (ANOVA) ۶۰
شکل۴-۱۲- الگوی بیان ۱۱ عامل رونویسی معنی دار در طی مراحل مختلف رویان زایی بدنی ۶۱

شماره و عنوان **صفحه**

شکل۴-۱۳- شبکه ژنی در گیاه آرابیدوپسیس. شبکه ژنی مابین عوامل رونویسی در طی جنبن‌زایی بدنی ۶۵

شکل۴-۱۴- اندازه غلاف سویا آماده برداشت ۶۹

شکل۴-۱۵- تشکیل کالوس رویان‌زا در سطح adaxial ریزنمونه کوتیلدون نابالغ ۷۲

شکل۴-۱۶- ریزنمونه کوتیلدون نابالغ در محیط فاقد هورمون ۷۲

شکل۴-۱۷- وجود کالوس‌های رویان‌زا در ریزنمونه کوتیلدون نابالغ در تماس با محیط MS حاوی سطح هورمون ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. اندازه بذر برای گرفتن ریزنمونه ۴-۳ میلی‌متر ۷۳

شکل۴-۱۸- سوختن ریزنمونه کوتیلدون نابالغ در سطح ۴۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۷۴

شکل۴-۱۹- اولین مرحله ی تمایز و تشکیل رویان بدنی از ریزنمونه ی کوتیلدون نابالغ در ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D . رویان کروی ۷۶

شکل۴-۲۰- تشکیل رویان بدنی از ریزنمونه ی کوتیلدون نابالغ در ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۷۷

شکل۴-۲۱- رشد رویان بدنی از ریزنمونه ی کوتیلدون نابالغ در ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۷۸

شکل۴-۲۲- رشد رویان بدنی از ریزنمونه ی کوتیلدون نابالغ در ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۷۸

شکل۴-۲۳- ریزنمونه هایپوکوتیل و جواب ندادن به انواع محیط هورمونی ۸۲

شکل۴-۲۴- ریزنمونه کوتیلدون نابالغ و ظهور کالوس رویان‌زا از سطح adaxial در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۸۲

شکل۴-۲۵- عدم تشکیل کالوس رویان زا از سطح abaxial ریزنمونه ی کوتیلدون نابالغ ۸۳

شکل۴-۲۶- تشکیل ریشه در ریزنمونه کوتیلدون نابالغ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA ۸۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پیشگفتار

سویا یا لوبیای روغنی که به انگلیسی آن را soybean می نامند گیاهی از خانواده Fabaceae با نام علمی *Glycine max* است. سویا یک گیاه یکساله خزنده و متعلق به شمال چین، کره، تایوان و ژاپن می باشد (Gray *et al.*, 2008). سویا، بیشتر برای تولید دانه و تهیه روغن کشت می‌شود.

رویان های بدنی سویا مدل گویایی برای مطالعه فرایند رویان زایی بدنی[1] می باشند. تا مدتها فقدان سیستم باززایی در سویا مانع از کاربرد وسیع فنهای نوین اصلاحی در این گیاه بوده است. با توجه به توانایی تکنیک کشت بافت در تولید گیاهان عاری از بیماری، تولید خارج از فصل و در سطح وسیع و سهولت در انتقال ژن امروزه توجه زیادی به استفاده از این روش برای تکثیر گیاهان شده است. رشد و نمو و فیزیولوژی گیاه توسط چندین هورمون تنظیم می شود. یکی از هورمون‌های مهم در کشت بافت، اکسین است.

اکسین بیش از نیم قرن است که کشف شده است و بیوسنتز، انتقال، پراکندگی و چگونگی فعالیت آن، از زمان کشف آن به طور گسترده‌ای مورد تحقیق قرار گرفت. هنوز هم از مکانیزم مولکولی فعالیت اکسین اطلاعات چندانی در دست نیست. اکسین برای تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی شامل تقسیم سلولی ، توسعه سلولی و تمایز سلولی شناخته شده است. به دلیل اهمیت اکسین در گیاهان، بررسی عوامل رونویسی متاثر از اکسین می‌تواند منجر به افزایش یافته های محققین در مورد تغییرات ژن های عوامل رونویسی در طی یک مسیر ریخت زایی درون شیشه ای باشد.

[1] Somatic embryogenesis

برخی عوامل رونویسی[1] در راستای تشکیل دیواره‌های سلولی مورد نیاز برای رویان های بدنی وارد عمل می شوند. عامل رونویسی، پروتئینی است که به توالی‌های خاصی از DNA پیوند خورده و متعاقبا انتقال اطلاعات ژنتیکی را از DNA به RNA کنترل می نماید. عوامل رونویسی این عملکرد را به تنهایی و یا به همراه پروتئین‌های دیگر به صورت ترکیب انجام می دهند (Naghavi *et al.*, 2007). در نتیجه یافتن ارتباط مابین ژن های عوامل رونویسی می تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد فرایند رویان زایی بدنی در اختیار قرار دهد. عوامل رونویسی توسط تغییر رونوشت ژن‌های مختلف نقش اساسی در تکامل پدیده های گوناگون دارند. با وجود نقش مهم عوامل رونویسی در فرایند رویان زایی بدنی اطلاعات بسیار کمی در این زمینه موجود است.

تکنولوژی بررسی ریزآرایه امکان مطالعه‌ی همزمان هزاران ژن را در یک آزمایش فراهم می کند. کاربردهای آزمایش های ریزآرایه متنوع و در حال افزایش هستند (Shi *et al.*, 2009). یکی از استفاده های گسترده این فن‌آوری استفاده از ریزآرایه برای اندازه‌گیری سطح بیان ژن ها بین دو شرایط مختلف است. پیامد کاربرد این فناوری تعداد بسیار زیادی داده می باشد. بسته به نوع و هدف آزمایش روش‌های آماری متنوعی از قبیل آزمونt، تجزیه کلاستر[2]، تجزیه به مولفه‌های اصلی[3] و آزمون شبکه های عصبی برای تجزیه داده های ریزآرایه استفاده می شود (Naghavi *et al.*, 2007).

تیبود-نیسن و همکاران (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003) از کوتیلدون سویا به عنوان ریزنمونه استفاده کردند و با استفاده از تکنیک میکرواری ژنهای درگیر در فرایند رویان زایی بدنی را خارج کردند و داده های خام مربوط به بیان ۴۹۵ ژن را بدست آوردند. در این تحقیق داده های خام این آزمایش از سایت (www.plantphysiol.org) به صورت آنلاین دریافت شد. از میان همه ی عملکردهای این ۴۹۵ ژن، عوامل رونویسی انتخاب گردید و با استفاده از برنامه blastx ، ۲۸ عامل رونویسی در بین ۴۹۵ ژن مشخص شد. این داده ها شامل سه مرحله زمانی از بیان عوامل رونویسی در فرایند رویان زایی بدنی میباشد. از طریق آنالیز آماری داده های مربوط به این ۲۸ عامل رونویسی، بیشترین میزان تغییرات بیان برای هر یک از آنها مشخص گردید. عامل رونویسی IAA24 برای بررسی بیشتر در مراحل بعدی تحقیق انتخاب شد. علت انتخاب این عامل رونویسی ناشناخته بودن آن در گیاه سویا و تشخیص اهمیت و عملکرد

[1] Transcription factors
[2] Cluster analysis
[3] Principal component analysis

IAA24 در طی فرایند رویان زایی بدنی در سویا بود، چراکه پیش بینی می شد این ژن در رویان زایی بدنی سویا نقش دارد.

در ادامه از نرم افزار Pathway studio برای رسم شبکه و شناسایی ژن های مرتبط با ژن IAA24 استفاده شد. برای این منظور نرم افزارهای زیادی نیز در دسترس می باشد که از آن جمله نرم افزار Pathway Studio می باشد. Pathway Studio نرم افزاری توانمند در تجزیه و تحلیل داده های ریزآرایه می باشد. این نرم افزار قابلیت ترسیم شبکه ی ژنی و تعیین نوع ارتباط مابین ژن های مختلف را در فرایندهای متفاوت دارد.

در شرایط آزمایشگاه بهینه سازی کشت بافت سویا برای رقم ویلیامز به منظور تولید رویان بدنی و جداسازی و شناسایی همولوگ ژن IAA24 از ژنوم سویا انجام گرفت. پروموتر ژن IAA24 (MP) توسط پایگاه اطلاعاتی تعیین و موتیف‌های پروموتر با استفاده از پایگاه PLANTCARE برای آنالیز پروموتر ژن IAA24 شناسایی شد.

۱-۲- هدف از این پژوهش

هدف این تحقیق بررسی برخی عوامل موثر بر رویان زایی بدنی در سویا می باشد. در این راستا نیز یک عامل رونویسی متاثر از اکسین با نام IAA24 که پیش بینی می شود در رویان زایی بدنی دخیل باشد جداسازی می شود. در نهایت آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی این ژن انجام می‌شود.

- بررسی بیان ژن‌های دخیل در رویان‌زایی بدنی، از طریق آنالیز داده‌های میکروواری
- انتخاب یک عامل رونویسی متاثر از اکسین (IAA24) از گیاه آرابیدوپسیس که تا به حال در سویا گزارش نشده و جداسازی همولوگ این عامل رونویسی از سویا
- کشت بافت سویا و بررسی عوامل موثر در تولید رویان بدنی
- ترسیم شبکه‌ی ژنی عامل رونویسی IAA24 و ارتباط آن با فرایندهای سلولی
- آنالیز پروموتر ژن IAA24
- آنالیز دمین‌های موجود در ژن IAA24

فصل دوم

مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱- رویان زایی بدنی[۱]

رویان‌زایی بدنی را می‌توان به این شکل تعریف کرد که از طریق آن سلول‌های بدنی هاپلوید (Haploid) و یا دیپلوید (Diploid) درون گیاهان متفاوتی رشد می‌کنند و این کار از طریق مراحل رویان‌شناسی بدون ترکیب گامت‌ها انجام می‌گیرد (Williams *et al.*, 1986).

در کشت بافت گیاهی آغاز رشد رویان از سلول های بدنی را رویان زایی بدنی گویند. مرحله رویان کروی، قلبی، اژدری شکل از مراحل اصلی رویان زایی بدنی هستند. مراحل مختلف رویان زایی بدنی از نظر ژنتیکی و ژن های دخیل با یکدیگر تفاوت های اساسی دارند (Mashayekhi *et al.*, 1386). رویان زایی بدنی یک فرم پیشرفته از تکثیر بدنی است. رویان بدنی از سلول‌های گیاه از قبیل بافت‌های معمولی گیاه شکل گرفته است که به صورت معمول در نمو رویان دخالت ندارد. هیچ آندوسپرم یا پوشش بذری در اطراف یک رویان بدنی ایجاد نمی‌شود. کاربرد این فرآیند شامل: تکثیر کلونی در مواد گیاهی که به صورت ژنتیکی یکنواخت شده‌اند، از بین بردن ویروس‌ها، فراهم آوردن بافت منبع برای تغییرات ژنتیکی، تولید یک گیاه به طور کامل از یک تک سلول که فتوپلاست نام دارد و تکنولوژی توسعه بذر مصنوعی می‌باشد. سلول‌های منتج شده از بافت منبع مناسب مورد کشت قرار میگیرند تا یک توده از سلول‌های تمایزنیافته با نام پینه را ایجاد کنند. میتوان تخمین زد که تنظیم کننده نمو گیاه در محیط کشت بافت باعث کاهش تولید و در نتیجه کاهش رویان‌های ایجاد شده از پینه میشود. نسبت تنظیم کننده‌های مختلف نمو گیاه و لازم برای کاهش ایجاد پینه یا رویان بر اساس نوع گیاه فرق می-

[۱] Somatic embryogenesis

کند. به نظر میرسد تقسیمات نامتقارن سلولی نیز در نمو رویان‌های بدنی مهم هستند (Loyola-Vargas *et al.*, 2006).

۲-۲- سویا[۱] (***Glycine max* L.**)

جنس Glycine (*Glycine max* (L.) Merril) دارای زیرجنس های زیادی است که شامل گیاهان خزنده چندساله است و در استرالیا، شرق آفریقا و جنوب غربی آسیا یافت می شود. سویا را در اولین مرحله برای تولید دانه و تهیه روغن کشت می نمایند. دانه سویا حاوی حدود ۴۵-۴۰ درصد پروتئین، ۲۰-۱۸ درصد روغن و حدود ۳۰ درصد کربوهیدرات می باشد. ارقام روغنی دارای پروتئین کمتر و روغن بیشتری هستند (Gray *et al*., 2008). لوبیا روغنی گیاهی است روز کوتاه که بیش از هر محصول زراعی دیگر نسبت به طول روز حساسیت نشان می دهد. سویا به عنوان یکی از گونه‌هایی که به شکل وسیعی زراعت می‌شود، منبع مهمی از پروتئین و روغن گیاهی محسوب می‌شود (Gray *et al*., 2008).

سویا رقم *Glycine max* منشا خود را از رویداد اهلی شدن که در سویا ی وحشی *Glycine soja* در چین مرکزی یا جنوبی باستان نزدیک به ۵۰۰۰ سال پیش رخ داده، بدست آورده است. سویا (*Glycine max*)به عنوان دانه ی روغنی غالب در تجارت جهانی است، که حدود ۵۶٪ ازتولید جهانی بذر و دانه های روغنی را در اختیار دارد (Gray *et al*., 2008). سهم این محصول در اقتصاد جهانی فعلی ۴۸.۶ بیلیون دلار و ۱۸.۸ بیلیون دلار تنها در ایالات متحده تخمین زده شده است. تقاضا برای سویا همیشه وجود خواهد داشت و پا بر جا باقی خواهد ماند چراکه این محصول به عنوان مواد تشکیل دهنده در فرمولاسیون مواد غذایی، غذای دام و همچنین محصولات صنعتی استفاده می شود (Gray *et al*., 2008). تقاضا برای استفاده از روغن سویا، یک پروتئین گیاهی جایگزین گوشت، محصولات لبنی سویا و همینطور کنجاله سویا رو با افزایش است. علاوه بر این، سویا به عنوان منبع اولیه برای محصولات ثانویه با ارزش بالا است؛ مانند لیستین، ویتامین ها و آنتی اکسیدانها.

[۱] Soybean