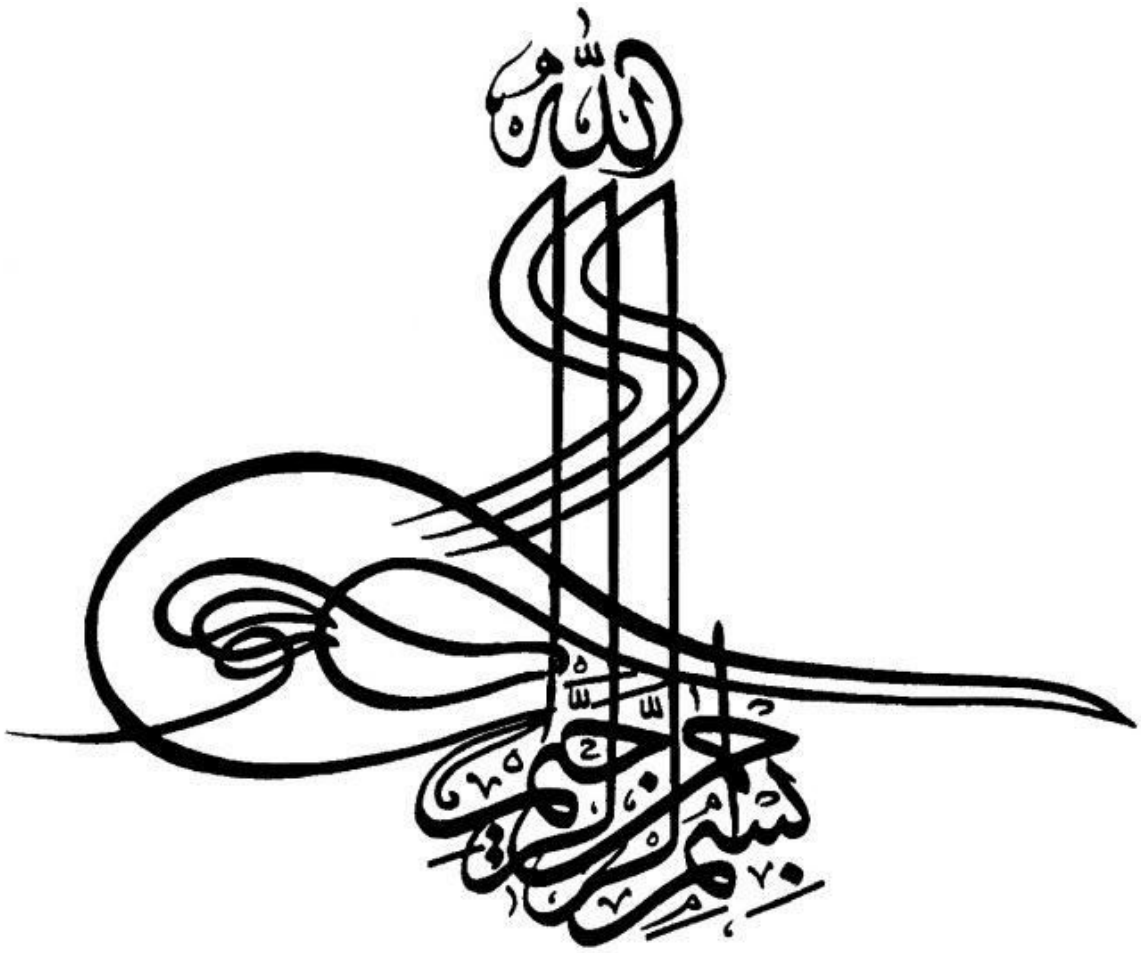
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

بررسی بیان ژن در شرایط سرما در گیاه بنفشه

استاد راهنما:

دکترعلی دلجو

استاد مشاور:

دکتر اصغر میرزایی اصل

پژوهشگر:

سمیه فلاحتیان

بهمن ۱۳۸۹

همه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی‌سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی‌سینا (یا استاد یا اساتید راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

تقدیم به همسر عزیزم

به خاطر همه خوبیهایش

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

بررسی بیان ژن در شرایط سرما در گیاه بنفشه

نام نویسنده: سمیه فلاحتیان

نام استاد/اساتید راهنما: دکتر علی دلجو

نام استاد/اساتید مشاور: دکتر اصغر میرزایی اصل

دانشکده : کشاورزی	**گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**	
رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی	**گرایش تحصیلی: بیوتکنولوژی کشاورزی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب: ۸۸/۸/۲۲	**تاریخ دفاع: ۸۹/۱۱/۲۶**	**تعداد صفحات: ۷۸**

چکیده:

گیاه بنفشه گیاهی زینتی و متعلق به خانواده ویولاسه (Violacea) است که دارای گونه های متعددی می‌باشد. یکی از مهمترین گونه‌های بنفشه، یک گونه دورگ با نام *V.wittrockiana* بوده که به دلیل تحمل بالا به سرما، در سراسر جهان از محبوبیت زیادی برخودار است. به منظور مطالعه الگوی بیان ژن در شرایط دماهای پایین از برگ‌های این گیاه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان نمونه شاهد و دماهای ۵ ، صفر، ۵- و ۱۰- درجه سانتیگراد نمونه برداری شد. با کمک روش نماش افتراقی (Differential Display or RAP- PCR) به بررسی تفاوت بیان ژن‌ها پرداخته شد. روش نمایش افتراقی روشی قدرتمند در جهت بررسی بیان ژن است که در سال ۱۹۹۲ ابداع شد.

استخراج RNA از برگ‌های بنفشه برای هر پنج تیمار دمایی انجام شد. با کمک آنزیم رونویسی معکوس و با استفاده از سه آغازگر اولیگو (اولیگوdTA، اولیگو dTC و اولیگو dTG)، ساخت رشته اول cDNA انجام شد. در مرحله بعد از هشت آغازگر انتخابی با طول ۱۳ نوکلئوتید استفاده گردید. آغازگرهای مورد استفاده شامل، HAP25 ، HAP26 ، HAP27 ، HAP28 ، HAP29 ، HAP30 ، HAP31 و HAP32 بودند که به همراه آغازگرهای اولیگوی مورد استفاده در مرحله ساخت رشته اول cDNA ، در واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف در ساخت رشته دوم cDNA به کار رفتند. جداسازی باندها روی ژل پلی اکریل آمید غیر واسرشت ساز ۱۹ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی انجام شد. رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با استفاده از محلول نیترات نقره انجام گرفت و با کمک اسکنر از روی ژل تصویر برداری شد. نتایج نشان داد که از میان سه آغازگر اولیگو، آغازگر اولیگو dTC بیشترین تعداد باند را تولید کرد. از میان آغازگرهای انتخابی نیز آغازگر انتخابی HAP30 برای مجموع سه آغازگر اولیگو، بیشترین تعداد باند را ایجاد کرد. روندی که برای تعداد باند ایجاد شده روی ژل پلی اکریل آمید مشاهده شد بدین صورت بود که تعداد باندهای تیمار دمایی ۵ درجه سانتیگراد نسبت به دمای شاهد(۲۵ درجه) بیشتر بود اما تعداد باندها در دمای صفر درجه کاهش یافته و در دمای ۵- درجه به حداکثر تعداد خود رسید. در دمای ۱۰- درجه مجدداً تعداد باند نسبت به دمای ۵- درجه کاهش یافت. به نظر می‌رسد بهترین دما از میان دماهای به کار رفته در این تحقیق به عنوان تیمار دمای پایین، از نظر تعداد باند ایجاد شده و برای بررسی تفاوت بیان ژن، دمای ۵- درجه سانتیگراد باشد. در کل برای تیمارهای دمایی اختلاف باندها کاملا مشهود بود.

واژه‌های کلیدی: بنفشه ، تنش سرما، روش نمایش افتراقی، الگوی بیان ژن

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۱

فصل اول : بررسی منابع ۳
۱-۱- مشخصات گیاهشناسی تیره بنفشه ۳
۱-۱-۲- گونه viola tricolor ۳
۱-۱-۳- گونه viola wittrockiana ۴
۱-۲- تنش‌های محیطی ۶
۱-۲-۱- مقاومت به تنش ۶
۱-۲-۲-تنش سرما ۷
۱-۳- آب و هوای سرد و مقاومت به یخبندان در گیاهان ۸
۱-۴- تغییر در بیان ژن در شرایط تنش سرما ۹
۱-۵- ابزارهای ساختاری و متابولیکی در گیاهان در شرایط تنش سرما ۱۰
۱-۵-۱- غشاء پلاسمایی ۱۰
۱-۵-۲- فتوسنتز در شرایط تنش سرما ۱۰
۱-۵-۳- پروتئین‌های ساختاری ۱۱
۱-۵-۴- فاکتورهای رونویسی ۱۳
۱-۵-۵- پروتئین‌های LEA ۱۴
۱-۵-۶- پروتئین‌های COR ۱۵
۱-۵-۷- چاپرون ها ۱۶
۱-۶- بررسی تنظیم کننده‌های ترانس در بیان ژن‌های مسئول مقاومت به سرما ۱۶
۱-۷- القاء سرما و انتقال سیگنال ۱۷
۱-۸- کاربردهای پزشکی و صنعتی از پروتئین‌های مرتبط با شرایط یخبندان ۱۸
۱-۸-۱- محافظت از سلول‌های پستانداران ۱۹
۱-۹- اثرات دما بر روی خصوصیات ظاهری و فیزیولوژیکی بنفشه ۲۰
۱-۱۰- روش‌های مختلف بررسی بیان ژن ۲۱
۱-۱۰-۱- روش دو رگ گیری کاهنده ۲۲
۱-۱۰-۲- روش دورگ گیری کاهنده بازدارنده یا روش اس. اس. اچ ۲۲
۱-۱۰-۳- بررسی بیان ژن با روش SAGE ۲۳
۱-۱۰-۴- cDNA-AFLP ۲۴
۱-۱۰-۵- روش ریز آرایه ۲۶
۱-۱۰-۶- روش نمایش افتراقی ۲۸
۱-۱۰-۷- روش PCR با آغازگر اختیاری RNA ۳۰

۱-۱۰-۸- DDRT با کمک آغازگرهای انتخاب شده SPR ۳۰
۱-۱۰-۹- Targeted Display ۳۱
۱-۱۰-۱۰- نمایش افتراقی بر مبنای RFLP ۳۱
۱-۱۱- برخی از کاربردهای روش نمایش افتراقی در گیاهان ۳۲

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۴
۲-۱- ماده گیاهی ۳۴
۲-۱-۱- کشت بذور ۳۴
۲-۲- مراحل مختلف نمایش افتراقی ۳۵
۲-۲-۱- تهیه محلول‌های لازم جهت استخراج ۳۵
۲-۲-۲- استخراج RNA به کمک محلول RNX-Plus ۳۵
۲-۲-۳- تعیین کمیت RNA ۳۷
۲-۲-۴- آغازگرهای اولیگوی مورد استفاده ۳۹
۲-۲-۵- ساخت cDNA ۴۰
۲-۲-۶- تعیین تکثیر cDNA دورشته ای ۴۲
۲-۳- جداسازی و رنگ آمیزی قطعات تکثیر شده ۴۳
۲-۳-۱- آماده کردن دستگاه الکتروفورز عمودی ۴۳
۲-۳-۲- ژل پلی اکریل آمید ۴۴
۲-۳-۳- نحوه کار با دستگاه الکتروفورز عمودی ۴۵
۲-۴- رنگ آمیزی نیترات نقره ۴۶

فصل سوم: نتایج و بحث ۴۸
۳-۱- بهینه سازی استخراج RNA ۴۸
۳-۲- بهینه سازی شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۹
۳-۳- تغییرات الگوی بیان ژن ۵۰
۳-۳-۱- بررسی میزان کارایی آغازگرهای اولیگوی مورد استفاده ۵۱
۳-۳-۲- بررسی میزان کارایی آغازگرهای انتخابی مورد استفاده ۵۲
۳-۳-۳- مقایسه آغازگرهای انتخابی برای سه آغازگر اولیگو نوکلئوتید ۵۴
۳-۳-۴- مقایسه اولگوی بیان ژن در بین تیمارهای دمایی ۵۶
۳-۴- نتیجه گیری نهایی ۶۹
۳-۵- پیشنهادات ۶۹
فهرست منابع ۷۰

جدول ۲-۱- مواد مورد استفاده و مقادیر آن برای تهیه یک لیتر بافر 5x TBE ۳۷
جدول ۲-۲- تهیه ژل آگارز با بافر TBE ۳۸
جدول ۲-۳- نام و توالی آغازگرهای اولیگوی مورد استفاده ۳۹
جدول ۲-۴- نام و توالی آغازگرهای انتخابی ۳۹
جدول ۲-۵-مواد مورد استفاده و مقادیر آن‌ها جهت ساخت رشته اول cDNA ۴۰
جدول ۲-۶- مواد مورد استفاده و مقادیر آن‌ها جهت ساخت رشته دوم cDNA و واکنش PCR ۴۱
جدول ۲-۷- برنامه PCR ۴۲
جدول ۲-۸- مواد مورد استفاده و مقادیر آن‌ها جهت تهیه یک لیتر بافر 5x TAE ۴۲
جدول ۲-۹- تهیه ژل آگارز ۲ درصد ۴۳
جدول ۲-۱۰- تهیه ژل پلی اکریل آمید ۱۹درصد به مقدار ۲۵ میلی لیتر ۴۴

شکل ۳-۱- استخراج RNA از گیاه بنفشه ۴۹
شکل ۳-۲- محصول PCR بر روی ژل آگارز ۵۰
شکل ۳-۳- مقایسه کارایی سه نوع اولیگو dT برای۵ تیمار دمایی ۵۲
شکل ۳-۴- تعداد باند تولید شده با اولیگو dTA در هریک از آغازگر های انتخابی برای نمونه‌های cDNA از همه تیمارهای دمایی ۵۳
شکل ۳-۵-تعداد باند تولید شده با اولیگو dTC در هریک از آغازگر های انتخابی برای نمونه‌های cDNA از همه تیمارهای دمایی ۵۴
شکل ۳-۶- تعداد باند تولید شده با اولیگو dTG در هریک از آغازگر های انتخابی برای نمونه‌های cDNA از همه تیمارهای دمایی ۵۴
شکل ۳-۷- تعداد باند تولید شده با هر سه نوع اولیگو در آغازگرهای انتخابی برای نمونه‌های cDNA از همه تیمارهای دمایی..... ۵۵
شکل ۳-۸-الگوی بیان ژنی تیمارهای دمایی برای اولیگو dTA ۵۶
شکل ۳-۹-الگوی بیان ژنی تیمارهای دمایی برای اولیگو dTC ۵۷
شکل ۳-۱۰-الگوی بیان ژنی تیمارهای دمایی برای اولیگو dTG ۵۷
شکل ۳-۱۱- تعداد باندهای تیمارهای مختلف دمایی برای هر سه اولیگو ۵۸
شکل ۳-۱۲- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTA با آغازگر ۳ و ۴ ..... ۶۰
شکل ۳-۱۳- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTA با آغازگر۵ و ۶ ..... ۶۱
شکل ۳-۱۴- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTC با آغازگر ۱ و ۲ ..... ۶۲
شکل ۳-۱۵- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTC با آغازگر ۳ و ۴ ..... ۶۳
شکل ۳-۱۶- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTC با آغازگر ۵ و ۶ ..... ۶۴
شکل ۳-۱۷- ژل پلی اکریل آمیدمحصول PCR ترکیب اولیگو dTC با آغازگر ۷ و ۸ ..... ۶۵
شکل ۳-۱۸- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTG با آغازگر ۳ و ۴ ..... ۶۶
شکل ۳-۱۹- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTG با آغازگر ۵ و۶ ..... ۶۷
شکل ۳-۲۰- ژل پلی اکریل آمید محصول PCR ترکیب اولیگو dTG با آغازگر ۷ و ۸ ..... ۶۸

مقدمه

گیاه زینتی بنفشه متعلق به خانواده ویولاسه (Violaceae) است. این خانواده دارای جنس‌ها و گونه‌های متعددی می‌باشد. از جمله گونه‌های دورگ بنفشه *V.wittrockiana* است که به دلیل تنوع در رنگ، دوران گلدهی طولانی و سازگاری قابل توجه آن با آب و هوای سرد در سراسر جهان مورد توجه است. با توجه به استفاده جهانی از این گیاه به عنوان گیاه زینتی فصول سرما برای ایجاد چشم اندازهای زیبا در شهرها و مناطق مسکونی به دلیل مقاومت بالای آن به شرایط سرما، بررسی بیان ژن‌های بنفشه در شرایط تنش سرما می‌تواند منجر به شناسایی مکانیسم مربوط به مقاومت در این گیاه باشد. با شناسایی توالی‌ها و مکانیسم‌های مربوط به مقاومت در یک گیاه مقاوم، می‌توان برای انتقال این توالی‌ها به گیاهانی که این قابلیت را ندارند، برنامه ریزی کرد و از این طریق محدودیت‌هایی که به دلیل عدم مقاومت این گونه گیاهان برای کشت آن‌ها وجود دارد، تا حد زیادی رفع می‌شود. لویت[1] در سال ۱۹۷۲ هر عامل محیطی را که باعث ایجاد صدمه به یک موجود زنده شود، تنش نامید. همچنین در سال ۱۹۸۰ لویت تنش‌های محیطی را به دو گروه تنش زیستی و تنش غیر زیستی تقسیم کرد. برای مثال عوامل زنده‌ای مانند باکتری‌ها که می‌توانند به یک گیاه صدمه وارد کنند در گروه تنش زیستی قرار دارند و عاملی مانند تنش سرما که می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود در گروه تنش‌های غیر زیستی قرار می‌گیرد. در مورد مقاومت به سرما، گیاهان در دامنه خیلی حساس تا بسیار مقاوم دسته بندی می‌شوند. مقاومت به سرما به عنوان ظرفیت بالای یک گیاه برای ادامه حیات در شرایط سرمای محیط تعریف می‌شود. وقتی که یک گیاه مقاوم به سرما است در واقع عملکردهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متفاوتی نسبت به گیاهان حساس دارد و تغییر در عملکردهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه به تغییر در سطوح بیان ژن‌ها در شرایط تنش سرما برمی‌گردد. به فرض در بسیاری از گیاهان مقاوم به سرما در شرایط تنش سرما، میزان بعضی از ترکیبات محلول در سلول مانند قندها به شدت افزایش می‌یابد. در این شرایط میزان آنزیم‌هایی که در جهت مسیرهای متابولیکی تولید این گونه ترکیبات محلول مورد نیاز هستند، به شدت در گیاه بالا می‌رود. نقشی که این قندها در مکانیسم مقاومت به سرما دارند بدین صورت است که در واقع انحلال این مواد در سلول باعث افزایش پتانسیل اسمزی سلول شده و باعث کاهش نقطه انجماد سیتوپلاسمی می‌شود (کولت[2]،۲۰۰۷). تخمین زده شده که در شرایط تنش سرما بیان نزدیک به ۱۰ درصد از کل ژن‌های یک گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

[1] Levitt
[2] Quellet

در مورد گیاه بنفشه، تاثیرات مستقیم دما روی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و متابولیکی در تحقیقات زیادی اثبات شده است. در تحقیقی که توسط پیرسون[1] و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام شد مشخص شد که با افزایش دما سایز گل‌های گیاه بنفشه رو به کاهش می‌گذارد و بهترین دامنه دمایی برای رشد آن در گلخانه دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد است. در تحقیقی دیگر مشخص شد غلظت قندهای ساکارز و گلوکز در دماهای بالای ۳۰ درجه سانتیگراد در بنفشه کاهش می‌یابد (ناتارجان[2]، ۲۰۰۵). برای بررسی بیان ژن‌ها روش‌های مختلفی ابداع شده است. از جمله مهمترین این روش‌ها که در تحقیقات به طور گسترده مورد استفاده گرفته روش نمایش افتراقی است. این روش یکی از کارآمدترین روش‌ها در زمینه بیان ژن است که در سال ۱۹۹۲ به وسیله لیانگ[3] و پادری[4] ابداع شده است. از جمله مزیت‌های این روش عبارتند از:

۱- به طور همزمان تعداد زیادی نمونه را می‌توان با یکدیگر مقایسه کرد.

۲- به مقادیر بسیار کم RNA حساس است و امکان بررسی ژن‌های با مقادیر اندک را به طور کامل فراهم می‌کند.

۳- برای استفاده از این روش نیازی به داشتن اطلاعات در مورد ژن‌های یک موجود و ساختار ژنتیکی آن نیست.

۴- روش نسبتاً سریعی بوده و بر پایه روش‌های ساده و پایدار بنا شده است (لیانگ و پادری،۲۰۰۲).

در این روش ابتدا از نمونه مورد نظر RNA استخراج می‌شود. از روی RNA با واکنش رونویسی معکوس و با کمک آغازگرهای اولیگو dT، رشته اول cDNA ساخته می‌شود. در مرحله بعد با ترکیبی از آغازگرهای اولیگو و آغازگرهای انتخابی، واکنش PCR برای سنتز cDNA دو رشته ای انجام می‌شود. در نهایت محصولات PCR روی ژل پلی اکریل آمید با استفاده از الکتروفورز عمودی الکتروفورزمی‌شوند تا الگوی باندی ایجاد شده برای هر نمونه با نمونه دیگر مقایسه شود.

در این تحقیق با کمک روش نمایش افتراقی به بررسی تفاوت بیان ژن در دماهای پایین نسبت به دمای ۲۵ درجه پرداخته شده است.

[1] Pearson
[2] Natarjan
[3] Liang
[4] Pardee

بررسی منابع

۱-۱- مشخصات گیاهشناسی خانواده بنفشه

خانواده بنفشه (Violaceae) دارای گیاهانی یکساله یا چند ساله، گاهی بالارونده، برگ‌های متناوب، ساده، بدون دندانه یا دندانه دار و یا لوب دار است. گوشوارک ساده (بدون دندانه) یا دندانه دار، گاهی رشد کرده و برگ مانند می‌شود. گل‌ها منفرد یا مجتمع در گل آذین خوشه یا سنبله، نرماده یا تک جنسی، گاهی خودبارور[1] ، دمگل معمولا دارای برگه می‌باشد. کاسبرگ‌ها ۵ تایی، در قاعده توسعه یافته و زایده‌ای را تشکیل می‌دهند. گلبرگ‌ها ۵ تایی، نامساوی، گلبرگ‌های پایینی گاهی بزرگتر از بقیه است. پرچم‌ها ۵ تایی (به ندرت بیشتر)، میله گاهی بسیار کوتاه، بساک پهن، گاهی به هم پیوسته و به صورت حلقه ای در اطراف تخمدان می‌باشد. تخمدان فوقانی، معمولاً دارای سه حجره، خامه گاهی در انتها متورم و کلاله بشکل های مختلف است. تخمک معمولاً به تعداد زیاد وجود دارد و میوه آن کپسول می‌باشد (خاتم ساز[2]،۱۳۶۹).

۱-۱-۲-گونه ی *Viola tricolor*

از اصلی ترین گونه‌های بنفشه، گونه‌ی *Viola tricolor* است. این گونه از بنفشه به طور معمول بومی اروپاست و به عنوان گیاهی با دوره‌ی رشدی محدود و یا یکساله شناخته شده است. گونه‌ی *V.tricolor* به عنوان جد بسیاری از گونه های دیگر بنفشه که از نوع دو رگ هستند، به حساب می‌آید. اصطلاحی که برای بنفشه‌های دورگ به کار می‌رود اصطلاح پنزی[3] است . این گیاهان کوچک و خزنده هستند و ارتفاع آن‌ها غالباً از ۱۵ سانتی متر تجاوز نمی‌کند. گل‌ها نیز کوچک بوده و حدود ۱/۵ سانتی متر قطر دارند. این گونه در خاک‌های اسیدی یا نرمال رشد می‌کند. شرایط نیمه سایه برای رشد آن مناسب بوده و بهترین زمان رشد آن از آوریل تا سپتامبر می‌باشد. گل‌های آن دو جنسی و خودگشن بوده و به رنگ‌های زرد، بنفش، آبی و یا سفید دیده می‌شوند. در زمینه‌ی طب، گونه‌های بنفشه و بخصوص گونه‌ی *V.tricolor* سابقه‌ی تاریخی وسیعی در درمان بیماری‌های گوناگونی مانند صرع، تنگی نفس و آسم، بیماری‌های پوستی و به خصوص اگزما دارند. همچنین به دلیل داشتن خاصیت خلط آور، در درمان بیماری‌های مربوط به قفسه‌ی سینه همچون برونشیت و سیاه سرفه مورد استفاده‌ی گسترده‌ای داشته است. این گیاه همچنین خاصیت ادرار آور فوق العاده‌ای دارد که در درمان بیماری‌های مربوط به مثانه و یا

[1] Clestogaous
[2] Khatamsaz
[3] Pansy

رماتیسم هم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صنعت نیز از این گونه برای تهیه‌ی رنگ‌های زرد، سبز و سبز- آبی استفاده می‌شده است (ویکیپدیا)[1].

امروزه نیز بنفشه ها به خاطر داشتن ترکیبی با نام سیکلوتید[2] در علوم پزشکی بسیار مورد توجه هستند. سیکلوتیدها بزرگترین گروه شناخته شده از پروتئین‌های خطی هستند. ساختار این پروتئین‌های کوچک گیاهی که شامل حدود ۳۰ اسید آمینه است، دارای دو بخش است، یک اسکلت پپتیدی مدور و یک گره‌ی سیستینی. گیاهان تیره‌ی ویولاسه منبع بسیار غنی از سیکلوتیدها هستند که از آن در سیستم دفاعی خود بهره می‌برند و این ترکیب نقش یک حشره کش طبیعی را بازی می‌کند. اما علاوه بر این نقش، اثبات شده که آن‌ها خواص فوق العاده‌ای چون آنتی توکسیک بودن را دارا بوده و همچنین ضد عوامل میکروبی و ضد HIV هستند. به دلیل خاصیت آنتی سیتوتوکسیک سیکلوتیدها، امروزه از آنها در درمان سرطان استفاده می‌شود (هرمن[3] و همکاران،۲۰۰۸).

۱-۱- ۳-گونه ی *Viola witrrockiana*

این گونه از اهمیت فوق العاده ای در سراسر جهان برخوردار است. محبوبیت این گیاه به دلیل تنوع در رنگ، دوران گلدهی طولانی و سازگاری قابل توجه آن با آب و هوای سرد است. در حال حاضر این گونه از گیاه در بازارهای جهانی متقاضی زیادی دارد، زیرا در تمامی ماه‌های پاییز و زمستان و در شرایطی که غالب گیاهان تزئینی نمی‌توانند زنده بمانند، قادر است که چشم انداز فوق العاده زیبایی برای شهرها و مناطق مسکونی ایجاد کند (بایلی[4]،۱۹۹۸). مطالعات زیادی در باره‌ی کشت، وراثت و دورگ گیری در بنفشه‌ها انجام شده است. هرچند اطلاعات بسیار کمی در مورد کالوس‌زایی این گیاه وجود دارد. بابر[5] و کلب هوشان[6] در سال ۱۹۹۱ موفق شدند تا از ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون گونه ی *V.tricolor* کالوس به دست آورند، اما باز زایی از اندام‌های هوایی این گیاه تاکنون موفق نبوده است.

---

[1] Wikipedia
[2] cyclotid
[3] Herrmann
[4] Bailey
[5] Babber
[6] Kulbhushan

پنزی‌ها جز بزرگترین گروه از گل‌های باغی هستند. گونه‌ای که از دورگ گیری *V.tricolor* با دیگر گونه‌های Viola بد ست آمده است، گونه ی *V.wittrockiana* نام دارد. این دورگ‌ها نیز یکساله بوده و ارتفاع آن‌ها به بیش از ۳۰ سانتی متر می‌رسد. این گونه‌های دورگ نسبت به والدین خود گل‌های بزرگتری و با رنگ‌های متنوع دارند که در تمام طول زمستان زنده و سرحال باقی می‌ماند.

طبقه بندی فیلوژنتیکی این گیاه به این صورت است:

سلسله: گیاهان

رده: Magnoliposida

راسته: Violales

خانواده:Violaceae

جنس:*Viola*

گونه:*V. wittrockiana*

۱-۲-تنش‌های محیطی

نیروهای خارجی ممکن است موجب ایجاد نیروهای داخلی در جسم شده، جسم را تحت تنگنا یا تنش قرار دهد و در نهایت موجب تغییرات قابل برگشت یا غیر قابل برگشت در اندازه، شکل و ابعاد جسم شوند. در موجودات زنده، تنش به معنی انحراف معنی دار از شرایط اپتیمم برای زندگی تعریف می‌شود. لویت[1] در سال ۱۹۷۲، هر عامل محیطی را که باعث ایجاد صدمه یا خسارت در موجود زنده شود تنش نامید .

در موجودات زنده اگرچه ممکن است صدمه حاصل از تنش در ابتدای امر قابل برگشت باشد ولی با گذشت زمان می‌تواند به صدمه غیر قابل برگشت تبدیل شود و بنابراین مدت زمانی که یک موجود زنده در شرایط تنش قرار می‌گیرد، فاکتور بسیار مهمی است. در مورد گیاهان نیز کلیه‌ی عوامل محیطی مانند بارندگی، درجه حرارت، رطوبت، نور، باد، رطوبت خاک، مواد غذایی و گازها بسته به مقدارشان می‌توانند رشد و نمو گیاهان را به شدت تحت تاثیر قرار دهند (هینریچز[2]،۱۹۸۷).

لویت در سال ۱۹۸۰ تنش‌های محیطی را به دو دسته تقسیم کرد:

۱) تنش‌های زیستی

۲)تنش‌های غیر زیستی

تنش‌های زیستی شامل حمله‌ی آفات و عوامل بیماریزا به گیاهان و همچنین رقابت با علف-های هرز می‌شود. تنش‌های غیر زیستی نیز شامل آسیب‌های مکانیکی به گیاه، شرایط آب و هوا، وضعیت خاک و مواد غذایی و آلودگی هوا می‌باشد.

۱-۲-۱- مقاومت به تنش

عوامل ایجاد کننده تنش چه عوامل محیطی و چه عوامل بیولوژیکی باعث تغییر و اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهی می‌شوند (هیل[3] و ارکارت[4]،۱۹۸۷). توانایی گیاهان از نظر اینکه در حضور این تنش‌ها تا چه حدی می‌توانند بقای خود را حفظ کنند و یا به چه اندازه رشد کنند را مقاومت به تنش می‌نامند. در گیاهان، تنش به عنوان یک فاکتور بازدارنده رشد تلقی می‌شود. توانایی گیاهان در مقاومت به صدمات ناشی از تنش‌های مختلف متفاوت است. این مقاومت‌ها

[1] Levitt
[2] Heinrichs
[3] Hale
[4] Orcutt

می‌توانند به دو صورت اجتناب و تحمل تنش طبقه بندی شوند. یک گیاه معمولاً می‌تواند از طریق ایجاد موانع فیزیکی یا متابولیکی از بروز تنش اجتناب و متابولیسم عادی و سیکل زندگی خود را ادامه دهد. گیاه در حالت تحمل تنش می‌تواند تغییرات یا صدماتی را که در اثر تنش به وجود می‌آیند تحمل نموده، یا آن‌ها را به حداقل برساند. در این حالت به گیاه تنش وارد می‌شود لیکن خسارت وارد شده کمتر از مقدار قابل انتظار است. برخی از گیاهان قبل از اتفاق تنش، رشد رویشی خود را به اتمام رسانده، وارد مرحله زایشی می‌شوند و یا به عبارت دیگر از تنش فرار می‌کنند. تنش‌ها باعث بسیاری از مشکلات زراعی و اجتماعی، بخصوص در توسعه کشورها می‌شوند. طبق آمار، تنها حدود ۱۰ درصد کل زمین‌های قابل کشت دنیا ممکن است بدون تنش باشند. خسارت سرما و یخ زدگی در ایالات متحده آمریکا سالانه حدود ۳ تا ۴ درصد می‌باشد و در برخی از جاهای دیگر نظیر برزیل و نیمکره جنوبی حدود ۵ درصد می‌باشد.

۱-۲-۲- تنش سرما

به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل محدودکننده‌ی گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری تنش سرما باشد.

لویت در سال ۱۹۸۰ گیاهان را بر اساس واکنش آن‌ها به تنش سرما به شش دسته طبقه بندی کرد:

۱- حساس به سرما، حساس به دماهای سرد بالای صفر

۲- حساس به سرما، حساس به دماهای در محدوده صفر و یا حساس به یخبندان‌های کوتاه

۳- کمی مقاوم، زنده ماندن در دمای انجماد تا نزدیک دمای ۵- درجه ی سانتیگراد.

۴- نیمه مقاوم، زنده ماندن در دماهای انجماد در محدوده ی ۵- تا ۱۰- درجه‌ی سانتیگراد.

۵- بسیار مقاوم، زنده ماندن در دماهای انجماد در محدوده ۱۰- تا ۲۰- در جه‌ی سانتیگراد.

۶- خیلی زیاد مقاوم، گونه‌های با حداکثر مقاومت به یخ زدگی که تحمل سرماهای بسیار شدید را دارند.

تنش سرما را می‌توان در فرآیندهای مختلف گیاهی از قبیل جوانه زنی، رشد، فتوسنتز، مقدار میوه، عملکرد و کیفیت میوه اندازه گیری و مطالعه نمود. اثر تنش سرما در فرآیندهای جوانه زنی، رشد، فتوسنتز، تشکیل میوه، عملکرد و کیفیت میوه می‌تواند دارای اهمیت اقتصادی بوده، قابل اندازه گیری باشد. نظیر تنش گرما، اثرات تنش سرما و تغییرات ناشی از وقوع تنش، در سطح سلولی

بروز می‌کند که بازتاب آن در سطوح اندام‌ها گیاهی مشاهده می‌شود. حساسیت فعالیت‌های مختلف سلولی به دما یکسان نیست. حد کشنده دما از مشخصات خاص یک گونه است که بسته به اندام و بافت تغییر می‌کند. در مورد خسارت اصلی ناشی از تنش سرما در سطح غشاهای اندامک‌ها و غشاء سلولی، تقریباً اتفاق نظر وجود دارد (لیونز[1] و همکاران،۱۹۷۹؛ کریستانسن[2]،۱۹۸۲). وقتی دما به حد آستانه برسد، ساختارهای سلولی و فعالیت و فعالیت‌های آن ممکن است به طور ناگهانی آسیب ببینند، به طوری که پروتوپلاسم بلافاصله از بین می‌رود و در اثر خسارت وارده به غشاها و اختلال در تامین انرژی ممکن است مرگ سلولی وقوع یابد. بررسی واکنش‌های سلولی در مقابله با سرما، پدیده‌هایی نظیر از دست دادن فشار تورژسانس، برهم خوردن تعادل یونی غشاء سیتوپلاسمی ، کاهش جریان سیتوپلاسمی و اختلال کلی در اندام‌ها را نشان می‌دهد.

۱-۳- آب و هوای سرد و مقاومت به یخبندان در گیاهان

مقاومت به سرما به عنوان ظرفیت بالای یک گیاه برای زنده ماندن در شرایط یخبندان و دماهای پایین تعریف می‌شود. در طول زمان‌ها وفصولی که دما پایین است، تعدادی زیادی از عملکردهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان تغییر می‌کند. این تغییرات عمدتاً از طریق تفاوت در سطوح بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد. این تغییرات از زمان پایین آمدن دما در پاییز و یخبندان زمستان و تا زمانی که در بهار مجدداً دمای هوا بالا رود، در گیاه وجود خواهد داشت. مقاومت به یخبندان در گیاهان یک فرایند پیچیده است که یک صفت کمی[3] محسوب می‌شود، یعنی تحت تاثیر چندین ژن می‌باشد. بعضی از گونه‌ها و یا حتی واریته‌های درون گونه مقاومت بیشتری به یخبندان و سرما از خود نشان می‌دهند و در مقابل بعضی دیگر از گونه‌های یک جنس ممکن است حتی در دماهای بالاتر از صفر نیز آسیب‌های برگشت ناپذیری را متحمل شوند. در دماهای پایین در فضای اپوپلاستیک[4] بلورهای یخ تشکیل می‌شود و بنابراین آب از درون سیتوپلاسم به فضای خارج سلول کشیده می‌شود. برای جلوگیری از مواجه شدن سلول‌های زنده با کمبود شدید آب در این مواقع به عنوان یک مکانیسم ابتدایی، سلول‌ها مولکول‌های آلی با وزن کم مثل پرولین، قندها و گلیسین بتائین را در خود مجتمع می‌کنند. دماهای پایین بیان یکسری

[1] Lyons
[2] Christiansen
[3] Quantitative character
[4] apoplastic

ژن‌هایی را در گیاه تحریک می‌کند که مسئول ساخت آنزیم‌هایی هستند که در مسیرهای تولید این ترکیبات ساده مورد نیاز می‌باشند. از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که اثبات شده در شرایط تنش سرما مقدار آن‌ها افزایش می‌یابد عبارتند از: تتا- ۱- پرولین ۵- کربوکسیلاز سینتتاز، فسفو اتانول آمین متیل ترانسفراز، بتائین آلدئید دهیدروژناز، ساکارز سنتاز، گالکتینول سینتاز و بعضی آنزیم‌های دیگر. یکسری ژن با عنوان تنظیم کننده‌ی CBF [1] کشف شده که بیان همه‌ی آن‌ها با همدیگر، ترکیبات محلول سازگاری را در سلول افزایش می‌دهد که با بالاتر بردن پتانسیل اسمزی سلول، باعث کاهش نقطه‌ی انجماد سیتوپلاسمی می‌شود. این ویژگی اخیر یعنی کاهش نقطه‌ی انجماد سیتوپلاسمی از تشکیل بلورهای آسیب رسان یخ که باعث تخریب ساختارهای سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود، جلوگیری می‌کند. وجود این ترکیبات محلول همچنین باعث می‌شود که مقاومت غشاء سلولی و پروتئین‌های درون سلولی در چرخه‌های انجماد و ذوب شدگی افزایش یابد. یکی از روش‌هایی که امروزه برای افزایش مقاومت به سرما و یخبندان در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است، اصلاح ژنتیکی مقاومت به سرما از طریق دورگ گیری با گونه‌ها و واریته‌هایی است که مقاومت بالایی را به سرما نشان می‌دهند. بدین ترتیب امکان تجمع ژن‌های مقاومت در یک جمعیت گیاهی افزایش می‌یابد. برای دستکاری‌های ژنتیکی در جهت بهبود مقاومت به سرما، شناخت مکانیسم‌های مربوط به آن در گیاهان مختلف، امری بدیهی است (کولت،۲۰۰۷).

۱-۴- تغییر در بیان ژن در شرایط تنش سرما

دماهای پایین باعث تغییر در بیان ژن‌ها می‌شود (ناکاشیما[2] و یاماگوچی شینوزاکی[3]،۲۰۰۶). تخمین زده شده که در شرایط تنش سرما بیان نزدیک به ۱۰ درصد از کل ژن‌های یک گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. تغییراتی که در سطوح بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد منجر به تغییرات مهم متابولیکی و ساختاری در سطح سلول می‌شود. بسیاری از ژن‌های درگیر در مقاومت به سرما شناخته شده‌اند و اثبات شده که پاسخ‌های سلول به تنش سرما در نتیجه‌ی القاء تغییرات در بیان یک مجموعه از ژن‌ها اتفاق می‌افتد. در آنالیز EST [4] یا همان توالی‌های بیان شده‌ی برچسب دار، مشخص شده که توالی‌های بیان شده در شرایط تنش سرما در دوگیاه گندم و آرابیدوپسیس که از نظر فیلوژنتیکی با

[1] C-box binding factor
[2] Nakashima
[3] Yamaguchi Shinozaki
[4] expressed sequence tags

فاصله ی زیادی از هم قرار دارند، دارای تشابهات بالایی می‌باشد (هود[1] و همکاران،۲۰۰۶). حدود ۴۴ درصد از تعداد ۲۶۳۷ ژن مرتبط با تنش که در گیاه گندم کشف شده است، دارای مشابهت زیادی با توالی ژن‌های مرتبط با تنش در آرابیدوبسیس می‌باشد.

۱-۵- ابزارهای ساختاری و متابولیکی در گیاهان در شرایط تنش سرما

۱- ۵-۱- غشاء پلاسمایی:

غشاء پلاسمایی به عنوان اولین جایگاهی از سلول است که می‌تواند مورد آسیب شدید، در شرایط تنش سرما، قرار بگیرد. به خصوص در مورد چربی‌های غشاء پلاسمایی اثبات شده که در دماهای پائین نسبت چربی‌های اشباع به چربی‌های غیر اشباع تغییر می‌کند. در واقع در گیاهانی که مقاومت بالای به دماهای پایین نشان می‌دهند، با تنزل دما میزان چربی‌های غیراشباع رو به افزایش می‌گذارد تا غشاء سلول بتواند حالت سیالیت خود را تحت این شرایط حفظ کند. این گیاهان از نظر ژنتیکی قادرند که آنزیم‌های مورد نیاز برای یک چنین عکس العمل‌هایی را تولید کنند و اگر گیاهی چنین قابلیتی را نداشته باشد غشاء آن در شرایط سرما، از حالت مایع کریستالی به یک حالت ژل مانند تبدیل می‌شود که باعث آسیب به سلول می‌شود. علاوه برچربی‌ها، پروتئین‌های غشاء نیز تغییراتی را در شرایط تنش سرما متحمل می‌شوند که به وسیله‌ی تکنیک‌هایی مانند پروتئومیکس[2] اثبات شده است(اوموراً[3] و همکاران،۲۰۰۶). مشخص شده که در شرایط یخبندان پروتئین‌هایی مثل دهیدرین‌ها[4] و لیپوکالین‌ها[5] در غشاء پلاسمایی تجمع می‌یابند که تایید می‌کند این پروتئین‌ها نقش محافظت کننده برای مولکول‌ها و ساختارهای سلولی دارند.

۱-۵-۲- فتوسنتز در شرایط تنش سرما

در گیاهان دیده شده که در تنش‌های محیطی و از جمله تنش سرما، بافت‌های فتوسنتزی ظرفیت و کارآمدی فتوسنتزی خود را نسبت به شرایط تعدیل می‌کنند (انسیمنگر[6] و همکاران،۲۰۰۶). این از طریق تعدیل کردن مولکول‌های دریافت کننده‌ی نور که ترکیبی از

[1] Houde
[2] proteomics
[3] Uemura
[4] dehydrin
[5] lipocalin
[6] Ensminger