بسم الله الرحمن الرحيم
الشهادتان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش فیزیولوژی گیاهی)

بررسی بیان آنزیم SOD (در سطح mRNA) به روش Real-time PCR در گیاه چای تحت تنش خشکی

از:

نرجس محمدی

استاد راهنما:

دکتر اکبر نورسته نیا

اساتید مشاور:

دکتر محمد مهدی سوهانی

مهندس کوروش فلک‌رو

اسفندماه ۱۳۹۲

۱-۱-چای

از چای در روزگاران قدیم به عنوان دارو برای معالجه‌ی بیماری‌های کلیوی، تب و عفونت‌های مجاری تنفسی استفاده می‌شد. امروزه پس از آب، چای بالاترین میزان مصرف روزانه (یک میلیارد فنجان) را در جهان به خود اختصاص داده است. چای علاوه بر کافئین و پلی‌فنل‌های اکسیدشده دارای کربوهیدرات، پروتئین و ویتامین‌های مختلف است. مصرف چای همراه با شیر و قند مقدار قابل توجهی از کالری مورد نیاز بدن را فراهم می‌کند. از یک فنجان چای، چهار کیلوکالری انرژی به بدن می‌رسد و اگر با یک حبه قند نوشیده شود، انرژی آن به ۲۹ کیلوکالری بالغ می‌شود (Poil and Parola, ۱۹۹۷).

چای دارای ۱٪ تا ۵٪ کافئین است. برگ‌های جوان چای در حدود ۳۰٪ آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنولیک شناخته شده مانند کاتچین‌ها را دارد که اکثر کاتچین‌ها در چای سبز شامل کاتچین (C)، گالوکاتچین (GC)، اپی‌کاتچین (EC)، اپی-گالوکاتچین (EGC)، اپی‌کاتچین-۳-گالیت (ECg)، اپی‌گالوکاتچین-۳-گالیت (EGCg) می‌باشد. (Lin *et al*., ۲۰۰۳; Yao *et al*., ۲۰۰۴; Perva-Uzunalic *et al*., ۲۰۰۶).

در حال حاضر چای در ۵۲ کشور جهان کشت و تولید می‌شود که ده کشور اول تولیدکننده چای در سال ۲۰۰۵ به ترتیب چین، هند، سریلانکا، کنیا، ترکیه، اندونزی، ویتنام، ژاپن، آرژانتین و بنگلادش بودند (Mondal *et al*., ۲۰۰۴; Chen *et al*., ۲۰۰۷a).

کیفیت چای تولیدی در مرحله‌ی اول به نوع و کیفیت برگ سبز چای و سپس مراقبت کامل در تمام مراحل ساخت و رعایت نکات فنی و نوع و کیفیت ماشین آلات بستگی دارد.

۱-۲- تاریخچه و مبدأ چای

اولین بار نام این گیاه در کتاب دارویی نفیسی که در سال ۲۷۳۷ قبل از میلاد، شنونگ امپراطور چین درباره‌ی گیاهان شفابخش نوشت، در زمره‌ی گیاهان آرام‌بخش ثبت شد. در قرن چهارم میلادی در دوره‌ی گیاه‌درمانی نیز در لغت‌نامه‌ها از چای نام برده شده است. آغاز چای‌نوشی از قرن پنجم میلادی ابتدا بین چادرنشین‌ها و قبایل مختلف ساکن در منطقه سیچوان متداول بود. پس از آن، نوشیدن چای بین طبقات اعیان و اشراف و درباریان به تدریج رایج شد (معزی، ۱۳۸۸).

به صورت کلی می‌توان گفت کشت چای از دره‌ی یانگ‌تسه آغاز شد و پس از آن به طرف سواحل اقیانوس آرام و سپس به طرف جزایر ژاپن کشیده شد و پس از آن از سمت جنوب و غرب توسعه یافته و به هندوستان و جزایر اندونزی رسیده است. از حدود قرن ۱۵ کشت چای در اروپا رایج شد و در کشورهایی نظیر انگلستان، فرانسه، هلند، آلمان و کشورهای آمریکای شمالی و روسیه کشت و تولید چای به سرعت گسترش یافت. از اوایل قرن بیستم چایکاری در کشورهای ایران و ترکیه آغاز شد. قبل از سال ۱۲۸۰ هجری شمسی، کشت چای در ایران رواج نداشت. در سال ۱۲۸۰ به علت علاقه دولت وقت ایران به کشت چای

در کشور، به مرحوم حاج محمد میرزا کاشف‌السلطنه‌ی چایکار که در آن زمان ژنرال کنسول ایران در هند بود، مأموریت داده شد تا چگونگی کشت و کار چای و اصول چایسازی را بیاموزد. کاشف‌السلطنه پس از مدت‌ها کار و تلاش، اصول و فنون چایکاری را آموخت. پس از آن با موافقت دولت وقت هند ۲۰۰۰ نهال را به ایران آورد و بعد از مدت‌ها تحقیق و بررسی بهترین محل کشت آن را شهرستان لاهیجان تشخیص داد. پس از آن با مشقات زیاد قطعه زمینی به مساحت حدود ۶ جریب در اطراف لاهیجان و تنکابن را به کشت چای اختصاص داد و خوشبختانه از آن چای معطری به دست آورد. مرحوم کاشف-السلنطه اولین کسی بود که در ایران به کشت این گیاه و تهیه‌ی چای خشک اقدام نمود. وی بار دیگر در سن ۶۵ سالگی عازم هند، ژاپن و چین شد و متخصصینی را به استخدام دولت ایران در آورد تا چایکاری و چایسازی را به ایرانیان بیاموزند (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۷).

۱-۳- پراکنش جغرافیایی چای

هم اکنون کشت چای از مدار ۴۲° عرض شمالی تا ۳۳° عرض جنوبی رواج دارد. طبق بررسی‌های انجام شده پراکنش جغرافیایی و مکان بوته‌های وحشی چای را از ناحیه‌ای بین یونان و شمال هند و چین و شمال‌شرقی گرجستان تعیین نموده-اند. توسعه و گسترش تجاری گیاه چای، با توجه به نوع خاک و نزولات آسمانی، طول روز و ساعت تابش آفتاب و ارتفاع محل از سطح دریا در عرض‌های جغرافیایی مختلف متفاوت است (معزی، ۱۳۸۸).

۱-۴- سطح زیر کشت و تولید چای در ایران

قسمت اعظم ایران را فلاتی خشک تشکیل داده است، ولی در باریکه‌ای از آن که در شمال بین کوههای البرز و دریای خزر وجود دارد، میانگین بارندگی بین ۱۱۵۰ تا ۱۴۳۰ میلی‌متر در سال است. این منطقه که شامل استان‌های گیلان و مازندران است برای کشت و پرورش چای مناسب می‌باشد. بذر اصلی چای ایران از دره‌ی کانگرا واقع در شمال هندوستان آورده شده است. چای در ایران از سطح دریا تا ۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا کاشته می‌شود. سطح زیر کشت چای در ایران در مناطق شمالی کشور در دشت و کوهپایه واقع شده است، به طوری که ۳۹ درصد باغات در دشت احداث شده و بقیه در مناطق کوهپایه‌ای واقع شده‌اند. مناطق اصلی پنجگانه‌ی کشت چای در ایران عبارتند از لاهیجان، لنگرود، رودسر و رشت در استان گیلان و تنکابن در استان مازندران. البته در شهرهای دیگر نیز مانند صومعه‌سرا، فومن، رامسر و چالوس کشت چای انجام می-گیرد، ولی سطح زیر کشت آن‌ها قابل توجه نمی‌باشد.

سطح زیر کشت چای در چند شهر مهم و چایخیز گیلان و مازندران در جدول (۱-۱) مشخص شده است.

جدول ۱-۱: سطح زیر کشت چای در مناطق مختلف چایکاری ایران

منطقه	سطح زیر کشت به هکتار	درصد
رودسر	۸۷۳۹	۲۷/۳۰
لاهیجان	۷۹۴۰	۲۴/۸۰
لنگرود	۵۶۹۷	۱۷/۸۰
رشت	۵۴۲۹	۱۶/۶۰
تنکابن	۴۲۲۱	۱۳/۲۰
جمع کل	۳۲۰۲۶	۱۰۰

منبع:سازمان چای کشور

طبق آمار FAO در سال ۲۰۰۳، کل سطح زیر کشت چای در جهان ۲۳۵۲۸۲۳ هکتار بوده که میزان تولید چای از این سطح برابر ۳۰۹۹۷۹۸ تن می‌باشد. ایران با دارا بودن ۳۱۴۵۵ هکتار سطح زیر کشت چای و ۵۱۱۶۰ تن تولید، ۱/۶۵ درصد از کل تولید جهان را به خود اختصاص می‌دهد (حسن پور، ۱۳۷۷).

ایران با جمعیتی حدود یک درصد از جمعیت کل جهان حدود ۴/۵ درصد از مصرف کل چای را به خود اختصاص داده است، این در حالی است که ایران در گروه مصرف‌کنندگان عمده‌ی چای در جهان قرار دارد و مصرف سرانه در ایران چهار بار بیشتر از مصرف سرانه در جهان است و به همین دلیل جزء کشورهای عمده‌ی وارد کننده‌ی چای نیز قرار دارد (معزی، ۱۳۸۸).

۱-۵- گیاه‌شناسی چای

نام علمی چای *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze می‌باشد که به ترتیب معرف جنس و گونه‌ی آن است. (L.) به نام لینه گیاهشناس معروف که اولین بار چای را نامگذاری نمود و O. kuntze نام شخصی است که دو نام ذکر شده برای چای سیاه و سبز را با هم ادغام نمود (مشتاقی، ۱۳۸۸).

تیره‌ی چای *Camelliaceae* دارای ۱۸ جنس و ۲۴۰ گونه است که از این میان ۸۲ گونه مربوط به جنس *Camellia* می‌باشد. این۸۲ گونه در ۱۲ بخش طبقه‌بندی شده‌اند.

Theeae یکی از بخش‌هاست که شامل ۵ گونه است. ۳ گونه‌ی مهم آن عبارتند از:

C. sinensis, C. taliensis, C. irrawadiensis که از این میان *C. sinensis* مهمترین گونه می‌باشد (Prince and Pakers, ۲۰۰۱).

چای گیاهی دولپه و همیشه سبز است که در طبیعت به صورت وحشی نیز موجود بوده و ارتفاع آن با توجه به انواع مختلف به ۶ تا ۷ متر و گاهی نیز تا ۱۲ متر می‌رسد. چای دارای ۲n=۳۰ کروموزوم می‌باشد (Devarumaath *et al.*, ۲۰۰۲).

ویژگی‌های مروفولوژیکی گیاهان به عنوان اولین شاخص تعیین‌کننده اختلافات ژنتیکی است. که این ویژگی‌ها حاصل تأثیر هر دو عامل محیطی و ژنوتیپی آن‌ها است. برای تعیین تفاوت در چای با استفاده از داده‌های مرفولوژیکی از خصوصیات مرفولوژیکی نظیر برگ، ساقه، گل، میوه و محصول استفاده می‌شود (Chen *et al.*, ۲۰۰۵a; Thomas *et al.*, ۲۰۰۰). در جدول ۱-۲ به برخی از این ویژگی‌ها اشاره شده است.

جدول ۱-۲ تنوع مرفولوژیکی در چای

Morphological characteristic	Score				
	1	2	3	4	5
Leave shape	Ovate	Oblong	Elliptic	Lancelate	Other
Leave pose	Erect (<35°)	Semi-erect (35° - 75°)	Horizontal (76° -90°)	Drooping (>90°)	
Leaf base shape	Attenuate	Rounded	Blunt	Other	
Leaf colour	Light green	Green	Grayed-green	Grayed-yellow	Yellow-green
Serrula form	Regularly acute	Regularly blunt	Irregularly acute	Irregularly blunt	
Flower colour	White	Cream	White with red purple (pinkish) tinge	Purple (pink) to purple-violet	Other
The splitting of style	Geniculation (free for greater part of their length)	Ascending (free for about half their length)	United for greater part of the length, the free part short, more or less horizontal		
Bud hairiness	Absent	Few	Mediate	A lot	Plenty

(chen *et al.*, ۲۰۰۵a; Dan, ۲۰۰۶).

برگ چای که از نظر اقتصادی و بهره‌برداری قسمت اصلی این گیاه را تشکیل می‌دهد، همیشه‌سبز است و معمولاً دارای شکل کشیده، نوک تیز و حاشیه‌ی آن دارای دندانه‌های ریز بوده و به طور متناوب در اطراف شاخه‌ها قرار گرفته‌اند. برگ‌های جوان پوشیده از کرک‌های سفید، ولی برگ‌های مسن، صاف و براق و بدون کرک می‌باشند. کرک‌ها در چای موجب افزایش کیفیت و مرغوبیت می‌شوند، زیرا این کرک‌ها مواد شیمیایی حاصل از شیره‌ی سلولی را در خود ذخیره کرده و در هنگام دم کردن به صورت محلول در آب در می‌آیند. جوانه‌های باز نشده حداکثر کرک‌ها را دارند. این جوانه‌ها پس از خشک شدن در چای مصرفی، قسمت اصلی رزین[1] چای را به وجود می‌آورند که به کیفیت و مرغوبیت چای می‌افزاید.

گل‌های چای، سفید، معطر، به طور خوشه‌ای و مجتمع یا تک گل در زاویه‌ی برگ‌ها ظاهر می‌شوند و دارای ۷-۵ گلبرگ، ۷-۵ کاسبرگ و تعداد زیادی پرچم است (۲۰۰-۲۰۰). تخمدان دارای ۴-۲ حجره بوده که در هر کدام ۴-۱ بذر کروی به رنگ قهوه‌ای تیره تشکیل می‌شود. میوه‌ی چای از ۲ یا چند برچه تشکیل شده که به هم پیوسته است و پس از رشد کامل شکفته شده و بذرها را آزاد می‌سازد. به همین جهت به میوه‌ی چای کپسول گفته می‌شود. گل‌های چای عموماً دگرگشن بوده و در صورت خودگشنی که احتمال آن بسیار کم است، بذر تولید نشده و در صورت تولید بذر، قدرت جوانه‌زنی بسیار ضعیفی داشته و بوته‌های حاصل از این گونه، جوانه‌های بسیار ضعیفی خواهند بود (معزی، ۱۳۸۸).

ریشه‌ی چای سطحی و افشان بوده و نسبت به شرایط فیزیکی خاک از خود حساسیت نشان می‌دهد. چای به طور مداوم رشد و نمو نمی‌کند، بلکه به طور متناوب رشد کرده و به خواب می‌رود. دوره‌های خواب این گیاه متناسب با آب‌وهوا و حاصلخیزی خاک ممکن است حتی ماه‌ها به طول انجامد. زمان برداشت و طول مدت بهره‌برداری از چای بستگی به عوامل مختلف از قبیل سن بوته‌های چای، آب‌وهوا، محل کاشت و نوع بوته‌ی چای دارد. برداشت محصول از بوته‌های چای از سال دوم و گاهی سال سوم آغاز می‌شود و از سال‌های سوم به بعد مقدار محصول به تدریج افزایش می‌یابد. برداشت چای در باغات ایران از حدود اوایل اردیبهشت ماه شروع شده و تا اواسط مهر یا اوایل آبان ادامه می‌یابد. در طول این مدت، سه چین شامل بهاره، تابستانه و پاییزه انجام می‌گیرد. (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۷؛ جمال‌امیدی، ۱۳۸۰).

۱-۶- ترکیبات اصلی چای

کیفیت و ارزش اقتصادی چای، به کمیت موادی بستگی دارد که محتویات سلول‌ها و ساختمان برگ سبز و غنچه‌ی مورد استفاده در فرآوری چای را تشکیل می‌دهند. محتویات درون سلول‌های برگ سبز از آب و مواد جامد پر شده است. بیش از ۷۵٪ وزن برگ‌ها را آب تشکیل می‌دهد. میزان آب موجود در برگ سبز چای برحسب فصل، میزان بارندگی، ساعات تابش نور آفتاب و بالاخره نوع عملیات زراعی به خصوص نحوه‌ی هرس سالیانه و مقدار کود شیمیایی متغیر است. پس از چند روز بارش

[1] Robscense

باران متوالی، میزان رطوبت درونی به ۸۰٪ و در مواقع آفتابی به ۷۵٪ می‌رسد. بدین ترتیب مقدار رطوبت برگ سبز چای در فصول مختلف دوره‌ی برداشت، یکسان نخواهد بود. در اولین برداشت محصول بهاره، معمولاً برگ‌ها ترد، آبدار و لطیف‌تر از محصول سایر فصول سال می‌باشند.

متوسط مواد جامد در طول دوره‌ی برداشت محصول در برگ‌های مرغوب ۲۲/۵٪ می‌باشد. بدیهی است در برگ‌های نامرغوب، درصد مواد جامد بیشتر و میزان آب آن کمتر خواهد بود. مواد جامد از دو سری مواد محلول و نامحلول در آب داغ تشکیل یافته است. مواد جامد محلول که میزان آن برحسب مرغوبیت و نژاد بوته‌ی چای در نوسان می‌باشد شامل پلی‌فنل‌ها، کافئین، قندها، مواد صمغی، اسیدهای آمینه و مواد کانی یا خاکستر و میزان آن بین ۴۵ تا ۴۸٪ است. اسیدهای آلی و مواد مولد عطر چای[۱] نیز جزء مواد محلول و مواد پروتئینی، چربی‌ها، کلروفیل و رنگدانه‌ها، پکتین، نشاسته، سلولز و لیگنین جزء مواد غیر محلول محسوب می‌شوند. میزان مواد غیر محلول برگ سبز چای اغلب بین ۵۲ تا ۵۵٪ است. اگرچه میزان بعضی از این ترکیبات مثل ترکیبات معطر چای در برداشت‌های مختلف (بهاره، تابستانه و پاییزه) و حتی کلون‌های (ارقام تکثیر یافته رویشی) مختلف می‌تواند بسیار متفاوت باشد (Norastehnia and Ghorbani, ۲۰۱۳a , b).

۱-۷- تقسیم بندی زراعی چای

انواع چای را با توجه به ظاهر برگ، کمیت، کیفیت آن، مقاومت به سرما و خشکی به سه نژاد عمده چینی، آسامی، کامبوجی و چای دورگه تقسیم‌بندی نموده اند.

۱-۷-۱- نژاد چینی

این بوته دارای شاخه‌های زیاد بوده و ارتفاع آن حدود ۲/۵ تا ۲/۷۵ متر می‌رسد. به آسانی بدون بذر به وسیله قلمه‌زدن و خوابانیدن نکثیر می‌شود. بوته‌های این نژاد در یک سالگی گل می‌دهد و تقریبا" در ۱۲ ماه بعد بذر تولید می‌کنند. این بوته‌ها بیشتر دگرگشن هستند. این بوته‌ها دارای برگ‌های کوچک و ناصاف با رویه‌ی نرم و لطیف و فاقد نوک می‌باشند. برگ‌ها دارای طولی در حدود ۳۷ تا ۶۲ میلی‌متر بوده و عمود بر ساقه قرار دارند. اندازه جوانه‌های آنها کوچک‌تر از نوع آسامی است. کمیت این بوته‌ها پایین ولی کیفیت آن‌ها بالا است و چای دم کرده آن خوش عطر و کم رنگ است. دارای مقاومت زیادی به سرما و خشکی هستند و به همین جهت در کشورهای چین، ژاپن، ایران و ترکیه و کشور های مشترک المنافع کشت می‌شوند (اخوت، وکیلی، ۱۳۷۷).

۱.Essential oil

۱-۷-۲- نژاد آسامی

این نژاد به ۵ رقم تقسیم‌بندی می‌شود که شامل: آسامی برگ روشن، آسامی برگ تیره، چای برمه، چای مانیپور و چای لوشایی می‌باشد. برگ‌های این نژاد بزرگ، براق و بسیار لطیف بوده و قسمت انتهایی آن فاقد دندانه است. این بوته‌ها دارای ارتفاع کمی بوده و به صورت تک‌ساقه می‌باشد. عموما به آسانی به وسیله بذر تکثیر نمی‌شوند و تا دو سالگی گل نمی‌دهند. محصول تولید شده از این نژاد بسیار فراوان بوده و کیفیت آن نیز خوب می‌باشد چای تولید شده از آن پررنگ‌تر می‌باشد. این نژاد مخصوص مناطقی با آب و هوای گرمسیری بوده و در برخی کشورهای آفریقایی (کنیا) و شمال شرقی هندوستان (آسام) کشت می‌شود (اخوت، وکیلی، ۱۳۷۷).

۱-۷-۳ -نژاد کامبوجی

این نژاد از نظر مقاومت و کیفیت و کمیت محصول حد واسط بین نژاد چینی و آسامی است. این نژاد دارای بوته‌های کوچکی است برگ‌های آن زبر، صاف، براق، فاقد نوک بوده و برگ‌ها به صورت عمود بر ساقه‌ها قرار داشته، دراز، پیچ خورده و رو به بالا می‌باشند که در فصل پاییز تا اندازه‌ایی قرمز رنگ می‌گردند (اخوت، وکیلی، ۱۳۷۷)

۱-۷-۴- نژاد دورگه

نژاد دورگه از ترکیب نژادهای دیگر بوته‌های چای بدست می‌آید. تأثیر چای آسامی در چای دورگه این است که کیفیت (رنگ دهی) آن را بالا می‌برد ولی باعث کاهش مقاومت آن شده و از عطردهی آن می‌کاهد. اغلب بوته‌های چای ایران، دورگه می‌باشند (اخوت، وکیلی، ۱۳۷۷).

۱-۸ -آب‌وهوا و اقلیم‌شناسی

چای گیاهی است مخصوص مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و تقریباً در هر جایی که هوای گرم و مرطوب داشته باشد می‌روید. این گیاه را می‌توان از ۲ متر پایین‌تر از سطح دریاهای آزاد جهان تا ارتفاع ۲۰۰۰ متری کشت کرد. چای می‌تواند تا درجه حرارت $-5^{\circ}C$ را تحمل نماید. از لحاظ طول روز، بوته‌های چای باید حداقل روزانه یک ساعت در معرض نور قرار گیرند و در کمتر از این مدت به علت افزایش هورمون‌های بازدارنده‌ی رشد در گیاه، برگ جدید تولید نخواهد شد.

بوته‌ی چای در اغلب خاک‌ها می‌روید. مناسب‌ترین خاک برای کشت چای، خاک‌های شنی-رسی که دارای هوموس کافیست می‌باشد. این خاک‌ها باعث می‌شوند که آب اضافی اطراف ریشه‌ی گیاه جمع نشود، زیرا رطوبت زیاد خاک برای گیاه چای مضر است و باعث پوسیدگی ریشه و از بین رفتن گیاه می‌شود. هم‌چنین وجود هوموس باعث می‌شود که رطوبت کافی در اختیار گیاه قرار گیرد و از خشک شدن آن جلوگیری نماید. مناطقی که قبلاً جنگل بودند و به تازگی زیر کشت چای رفته‌اند مناسب-

ترین و بهترین خاک برای رشد چای به شمار می‌روند، زیرا خاک این مناطق از نظر زراعی دارای بهترین کیفیت بوده و از لحاظ مواد غذایی نیز بسیار غنی هستند.

چای گیاهی است که نیاز فراوان به عناصری چون منگنز، آهن و آلومینیوم دارد. به علت حلالیت بیشتر این عناصر در محیط-های اسیدی، گیاه چای این عناصر را تنها در محیط‌های اسیدی می‌تواند جذب کند، به این دلیل چای گیاهی اسیددوست است و رشد و نمو آن فقط در خاک‌های اسیدی امکان‌پذیر است.

مناسب‌ترین pH برای خزانه‌ی چای بین ۴/۵ تا ۵/۵ است، ولی بوته‌های بارده pH =۶/۵ را ترجیح می‌دهند. خاک قلیایی برای این گیاه مضر بوده و باعث نابودی آن می‌شود. استان گیلان به دلیل ریزش باران‌های مداوم، دارای خاک‌های اسیدی است و از این لحاظ برای کشت چای مناسب می‌باشد. با این حال گیلان از نظر آب و هوا جزء مناطق کاملاً مستعد برای کشت چای محسوب نمی‌شود، چون مقدار بارندگی به خصوص در فصول بهار و تابستان که فصل برداشت چای است به مقدار کافی نبوده یا دارای پراکنش غیر یکنواخت و نامناسب است و در نتیجه بر اثر کم آبی و خشکی، نه تنها عملکرد بوته‌ها به طور معنی داری کاهش می‌یابد (مسعودیان و همکاران، ۱۳۹۲) بلکه اغلب بوته‌ها با خطر سوختن مواجه می‌شوند (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۷؛ حسن‌پور، ۱۳۷۷).

در مزارع بدون شیب و دشت در صورت بارندگی و رطوبت زیاد، خاک باید دارای زهکشی مناسبی باشد ولی در مزارع شیب‌دار و کوهستانی به علت خروج آب از ارتفاع به طرف پایین احتیاج به زهکشی نیست. چای تولید شده در چنین مزارعی دارای کیفیت بهتری از لحاظ طعم و عطر نسبت به مزارع کم ارتفاع و دشت است، ولی از لحاظ کمیت، مقدار محصول تولید شده دراین مزارع کمتر از مزارع دشت می‌باشد.

هر هکتار باغ چای روزانه معادل ۲۵ تن آب (معادل ۲/۵میلی‌متر باران) در هوای مساعد نیاز دارد (اخوت، وکیلی, ۱۳۷۷).

۱-۹- تنش‌های گیاهی

عملکرد و تولید گیاهان و نیز امنیت غذایی در جهان توسط موانع محیطی به شکل فاکتورهای تنش زنده (آفات،بیماری‌ها، و علف‌های هرز و ...) و غیرزنده (خشکی، شوری، ...) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به طوری که در بسیاری از گیاهان باغی و زراعی متوسط عملکردگیاهان ۱۰ ٪ تا ۲۰٪ کمتر از پتانسیل واقعی آن گزارش شده است (Mahajan & tuteja, ۲۰۰۵). تنش به عنوان نیروی فیزیکی و یا شیمیایی اعمال شده در واحد سطح است (Gaspar *et al.*, ۲۰۰۲).

لزوماً هر تغییر و انحراف یک فاکتور از حالت اپتیمم نشان‌دهنده استرس نیست، بلکه تنش به عنوان یک محدودیت و یا یک تغییر غیر قابل پیش‌بینی در متابولیسم است. که می‌تواند در نتیجه عوامل زیستی و یا غیر زیستی رخ دهد.

کاربردی‌ترین تعریف تنش بیولوژیکی به معنی نیرو یا شرایط ناسازگاری است که باعث مهار عملکردهای نرمال سیستم‌های بیولوژیکی از جمله گیاهان می‌شود (Jones *et al* ., ۱۹۸۹).

گیاهان غالباً در معرض تنش‌های بسیاری مانند خشکسالی، دمای پایین، شوری، جاری‌شدن سیل، گرما، استرس اکسیداتیو، مسمومیت با فلزات سنگین و ... هستند.

خشکی یکی از تنش‌های محیطی است که بر اکثر مراحل رشد گیاه، ساختار اندام‌ها و فعالیت آن‌ها آثار زیانباری وارد می‌کند. میزان خسارت ناشی از کمبود آب در گیاهان به گونه گیاهی، ژنوتیپ، مدت زمان قرارگیری در معرض تنش و شدت کمبود آب، سن و مرحله نموی گیاه و ویژگی‌های ذاتی خاک بستگی دارد (Sanchez, ۲۰۰۱).

۱-۹-۱- تنش خشکی

واژه خشکی یک اصطلاح هواشناسی بوده و بیان‌گر دوره‌ای است که در آن مقدار بارندگی کمتر از مقدار تبخیر و تعرق بالقوه شود. چون کمبود باران باعث تنش کمبود آب خواهد شد، لذا واژه تنش خشکی[۱] برای مواردی که تنش در اثر عدم وقوع بارندگی مفید ایجاد شده است بکار می‌رود و بعبارت دیگر، در این حالت تنش کمبود آب به طور طبیعی مد نظر است. اگر گیاه به طور مصنوعی تحت شرایط تنش رطوبتی قرار گیرد در این صورت واژه تنش کمبود آب بکار برده می‌شود. چنانچه در اثر خشکی هوا، رطوبت داخلی گیاه به کمتر از ۵۰٪ مقدار عادی خود برسد در این صورت گیاه دچار آبکشیدگی[۲] شده و چنانچه رطوبت داخلی گیاه کمتر از مقدار عادی ولی بالاتر از ۵۰٪ باشد پسآبیدگی[۳] گویند. در حدود یک سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه‌اند و نیمی از این اراضی دارای بارندگی سالیانه کمتر از ۲۵۰ میلیمتر می‌باشند که یک چهارم تبخیر و تعرق بالقوه این مناطق است. به طور کلی مناطق خشک و نیمه خشک جهان در محدوده‌های بین عرض‌های جغرافیایی ۱۵ تا ۳۰ درجه شمالی و جنوبی قرار گرفته‌اند و وسعتی در حدود ۴۴/۷ میلیون کیلومتر مربع را شامل می‌شوند. حدود ۳۹٪ از این مساحت جزء مناطق خشک محسوب می‌گردد که قسمت عمده آن برای زراعت مساعد نیست در مناطق خشک و نیمه خشک علاوه بر میزان بارندگی کم، توزیع بارندگی از فصلی تا فصل دیگر و از سالی به سال دیگر متغیر بوده و بنابراین پیش‌بینی میزان و توزیع آن بسیار مشکل است. در کشور ما نیز به جز سواحل دریای خزر و قسمت‌های کوچکی از شمال‌غربی کشور بقیه مناطق تماماً جزء نقاط خشک و نیمه خشک محسوب می‌گردند و این در حالی است که مناطق خشک کشورمان نسبت به مناطق نیمه‌خشک آن، از وسعت بیشتری برخوردار است (خوشخویی، ۱۳۷۱).

---

۱. Drought stress
۲. Water deficit stress
۳. Evaporative dehydration

خشکی یک تنش چند بعدی است که گیاهان را در سطوح مختلف سازمانی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Blum, ۱۹۹۶). در سطح گیاه پاسخ به تنش خشکی پیچیده است، زیرا بازتابی از تلفیق اثرات تنش و پاسخ‌های مربوطه در تمام سطوح پائین سازمانی، در فضا و زمان است. Siddique و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که خشکی به عنوان مهم‌ترین فاکتور کنترل کننده عملکرد محصولات، تقریبا" روی کلیه فرایندهای رشد گیاه تأثیرگذار است (Siddique, ۲۰۰۱). اخیرا"نتایج تحقیقات نشان داده است که علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر کمبود آب در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسیداتیو نیز از عوامل مهم محدود کننده رشد و تولیدات گیاهی هستند که در اثر عدم وجود شرایط مناسب ایجاد می‌شود. بیشترین صدمه در گیاهان به وسیله در معرض تنش بودن با صدمه اکسیداتیو در سطح سلول، همراه است (Allen, ۲۰۰۱). در شرایط تنش کمبود آب روزنه‌ها در گیاه بسته می‌شوند و متعاقب آن غلظت CO_2 در بافت مزوفیل کاهش می‌یابد و به دنبال این وضعیت واکنش‌های تاریکی فتوسنتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش‌های روشنایی، که شامل ATP، NADPH است، مصرف نمی‌شود. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف $NADP^+$ جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می‌کند و منجر به شکل‌گیری رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، پر اکسیدهیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می گردد (Sairam *et al.*, ۲۰۰۰). فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن [۱](ROS) ممکن است سبب بروز صدماتی هم‌چون اکسید شدن لیپیدها، (در نتیجه منجر به تغییر ساختار غشاء و در نتیجه از هم‌پاشیدگی یکپارچگی آن می‌شود)، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروههای سولفیدریل (SH-)، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، بی‌رنگ شدن ویا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای و هم‌چنین حمله مداوم به مولکولهای آلی مثل DNA و در نتیجه اختلال در رشته‌های DNA گردد(Mittler *et al.*, ۲۰۰۲). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دیسموتاز[۲] (SOD) ، کاتالاز[۳] (CAT) آسکوربات پر اکسیداز[۴] (APX) و گلوتاتیون‌ردوکتاز[۵] (GR) است و سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها ، مانیتول‌ها و پلی‌فنل‌ها) می‌باشد (Prochazkova *et al.*, ۲۰۰۱). تعدد و کثرت سیستم‌های دفاعی به این خاطر است که انواع اکسیژن‌های واکنش زا (ROS) در سلول‌ها و بخش‌های زیر سلولی مختلف تولید می‌شوند و هم‌چنین در خاصیت‌هایی چون توانایی انتشار،

۱. Reactive Oxygen Speices (ROS)
۲. superoxide dismutase (sod)
۳. Catalase
٤. Ascorbate peroxidase (APX)
٥. Glutathione Redctase (GR)

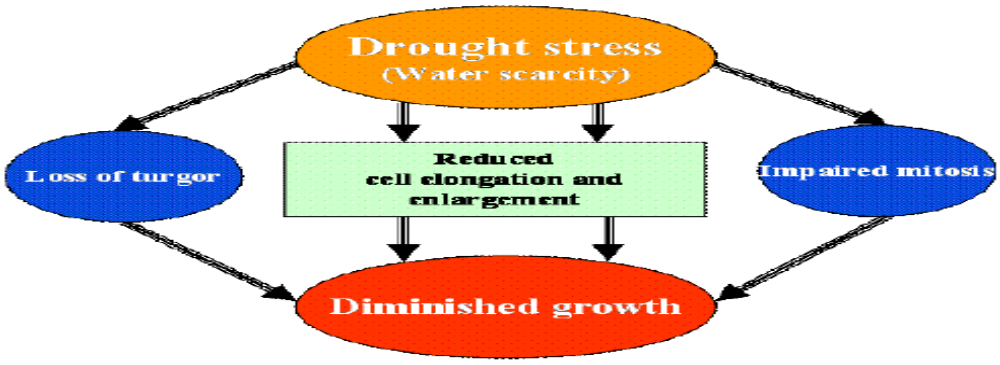
حلالیت و گرایش به وارد واکنش شدن با مولکول های بیولوژیک مختلف، متفاوت هستند. بنابراین به مجموعه‌ای بهم پیوسته از مولکول‌های دفاعی برای عمل در تمام بخش‌های سلول برای غیرفعال‌کردن رادیکال‌ها به همان سرعتی که آن‌ها شکل می گیرند، نیاز است.

تحقیقات مختلف نشان داده‌است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتزکننده وجود دارد (sairam *et al.*, ۲۰۰۰). محققین نشان داده‌اند که غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درشرایط تنش دو برابر شده و لذا باعث افزایش مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند و از طرفی تنش خشکی نیز میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می دهد (Sairam *et al* ۲۰۰۱).

۱-۱۰- اثرات فیزیولوژیکی تنش خشکی بر گیاهان

بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد که تنش ناشی از کمبود آب سبب کاهش رشد، کاهش سطح برگ، کاهش وزن تر و خشک، کاهش فتوسنتز، تخریب غشای سلولی، تخریب و کاهش پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تجمع اسیدهای آمینه، کاهش تشدیدکننده‌های رشد، آسیب به رنگریزه‌ها و پلاستیدها، کاهش کلروفیل می‌گردد. به طور کلی کاهش محتوای آب بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش خشکی باعث محدودشدن رشد گیاه و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی می‌گردد (Levitt, ۱۹۸۰).

زمانی که این خشکی شدیدتر شود باعث اختلال در متابولیسم و ساختار سلول و در نهایت توقف واکنش کاتالیزی آنزیم‌ها می‌شود. پیامد این روند اختلال در متابولیسم و در نهایت مرگ گیاه خواهد بود (jaleel *et al.*, ۲۰۰۸).



شکل ۱-۱ نحوه اثرگذاری تنش خشکی بر گیاهان

در گیاهان درک بهتر تغییرات مرفوآناتومیکی و فیزیولوژیکی در مقاومت به تنش خشکی می‌تواند برای انتخاب و یا ایجاد انواع جدیدی از محصولات با بهره‌وری بهتر تحت شرایط تنش آب مؤثر باشد.

۱-۱۱ -تغییرات مرفولوژیکی ایجاد شده در گیاهان تحت تنش خشکی:

در ریشه تولید سیستم ریشه‌ای منشعب تحت استرس خشکی در بالا بردن وزن خشک گیاه بسیار مهم است و در گونه‌های گیاهی مختلف تفاوت‌های زیادی در تولید ریشه مشاهده شده است. یک سیستم ریشه ای مناسب می‌تواند یک امتیاز برای حفاظت از رشدگیاه در مرحله رشد محصول باشد و باعث استخراج آب از لایه سطحی و کم‌عمق خاک که به آسانی ممکن است تحت اثر تبخیر از بین برود شود (johansen *et al.*, ۱۹۹۲). افزایش رشد ریشه در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی مختلف در گیاهان رخ می‌دهد. زمانی که جذب آب کم شود توسعه برگ اولین فرایندی است که تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ممانعت در توسعه برگ باعث کاهش در مصرف کربوهیدرات‌ها و انرژی شده و بخش بیشتری از مواد فتوسنتزی تولید شده می‌توانند به سمت ریشه هدایت شوند که تضمین‌کننده رشد بیشتر ریشه است.

کاهش در ارتفاع بوته همراه با کاهش در بزرگ‌شدن سلول و پیری بیشتر برگ‌ها درگونه *A.esculentus* تحت تنش خشکی مشاهده شد (Bhatt & Srinivasa Rao, ۲۰۰۵).

توسعه سطح برگ برای فتوسنتز و تولید ماده خشک بسیار مهم است. تنش آبی عمدتاً باعث کاهش رشد برگ در بسیاری از گونه‌ها از جمله صنوبر (wullschleger *et al.*, ۲۰۰۵) ، سویا (Zhang *et al.*, ۲۰۰۴) شد.

از طرفی دیگر تنش خشکی می‌تواند باعث کاهش تولید بیومس دربرگ خشک و تازه شود (Faroog *et al.*, ۲۰۰۹).

۱-۱۲- اثرات استرس خشکی روی ترکیبات پیگمانی

رنگدانه های فتوسنتزی به طور عمده در گیاهان برای به دام انداختن نور و تبدیل آن به انرژی نقش اساسی دارند. هر دو کلرفیل a و b تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند (Farooq *et al.*, ۲۰۰۹). با این حال کاروتنوئیدها دارای نقش حمایتی از گیاهان در برابر تنش می‌باشند.

کاروتنوئیدها یک گروه بزرگ از مولکول‌های ایزوپرنوئیدی هستند که به وسیله هر دو گروه از ارگانیزم‌های فتوسنتزکننده و غیر فتوسنتزکننده سنتز می‌شوند. آنها درگروه کاروتن‌های هیدروکربنی مانند لیکوپن‌ها، β-کاروتن قرار می‌گیرند.

۱-۱۳- تولید ROS درگیاهان و پاسخ گیاهان

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در هر دو حالت تنش‌زا و شرایط بدون تنش در سلول‌ها تولید می‌شود. غلظت‌های بالای ROS منجربه سمیت در گیاهان می‌شود در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر باعث ایجاد سیگنال‌های سازگاری در گیاه می‌شود. این مطلب نشان می‌دهد که ROS تنها به عنوان یک محصول سمی تولید شده در طی تنش نیست بلکه به عنوان یک مولکول سیگنالی هم می‌تواند عمل کند. بنابراین کنترل و بررسی تغییرات سطوح ROS در گیاهان بسیار مهم بوده و ممکن است در توضیح فرایندهای پیچیده مانند مکانیزم‌های تحمل بسیار مهم باشد.

گیاهان سیستم‌های دفاعی بسیار توسعه یافته‌ای علیه ROS دارند. در شرایط بدون تنش بین دو حالت تشکیل و حذف O_2^- تعادل وجود دارد. بنابراین سیستم‌های دفاعی با افزایش تشکیل ROS در شرایط تنشی ظاهر می‌شوند. گیاهان با افزایش سیستم‌های دفاع آنزیمی و غیرآنزیمی به مقادیر افزایش‌یافته ROS پاسخ می‌دهند (Smirnoff, ۱۹۹۳; Zhu, ۲۰۰۱). اما مکانیزم‌های درگیر در این عمل هنوز به طور کامل شناسایی نشده اند.

۱-۱۳-۱ -منابع تولید ROS در گیاهان

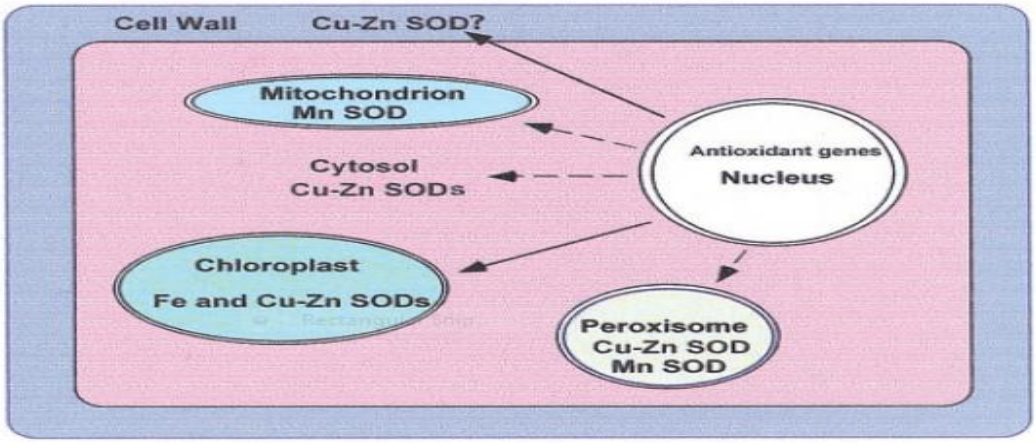
O_2^- در هر جایگاهی که زنجیر ه انتقال الکترون وجود دارد تولید می شود. از این‌رو فعال‌شدن O_2 ممکن است در بخش‌های مختلف سلولی رخ می‌دهد. چندین منبع تولید ROS در گیاهان وجود دارد. برخی از شایع‌ترین منابع تولید در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست است. منابع دیگرتولیدکننده شامل واکنش‌های نوری در پراکسی‌زوم و دیواره سلولی، پراکسیدازها است. در این میان کلروپلاست به عنوان اصلی‌ترین منبع تولید ROS در گیاهان به شمار می‌رود (Elstner, ۱۹۸۲; Foyer *et al.*, ۱۹۹۴).

۱-۱۳-۲ -انواع سوپراکسید دیسموتازها (SODs)

در درون سلول اولین خط دفاعی علیه ROS سوپراکسید دیسموتازها (SOD) هستند. غشاهای فسفولیپدی نسبت به o_2^- ناتراوا هستند (Asade, ۱۹۸۷). بنابراین ضروری است که در جایگاه‌هایی که این ترکیبات تشکیل می‌شوند SOD برای حذف آنها حضورداشته باشد. براساس کوفاکتورهای فلزی در طبقه‌بندی، آنزیم SOD را در ۴ گروه طبقه‌بندی می‌کنند که شامل Fe-SOD، Mn-SOD و Cu-Zn SOD وNi-SOD می‌باشند. این ایزوفرم‌ها در جایگاه‌های مختلف سلول قرار دارند. Fe-SOD در کلروپلاست و Mn-SOD در میتوکندری و پراکسیدازها و Cu/Zn-SOD در کلروپلاست، سیتوسل، فضاهای خارج سلولی حضور دارند. چهارمین ایزوفرم SOD دارای Ni در جایگاه فعال خود است که به عنوان Ni-SOD نامیده می‌شود و در چندین نوع از باکترهای موجود در خاک نیز دیده شده است (Bannister *et al.*, ۱۹۸۷; Bowler *et al.*, ۱۹۹۲). و هم‌چنین در سیانوباکترها دیده شده است اما هنوز در گیاهان گزارش نشده است. مقایسه توالی آمینواسیدی این ۳ ایزوفرم نشان می‌دهد که فرم‌های Mn-SOD وFe- SOD به گونه‌های اجدادی SODs نزدیک‌تر می‌باشند و این آنزیم‌ها شاید از نیای یکسان نشئت گرفته باشند در حالی که توالی Cu/Zn-SODs شباهتی به دو فرم قبل ندارد و شاید به صورت جداگانه در یوکاریوت‌ها تکامل یافته باشند. در حالی که فقط یک نوع از SOD در بیشتر ارگانیزم‌ها یافت شده است اما در گیاهان فرم‌های مختلفی وجود دارد که توسط بیش از یک ژن کد می‌شوند.که نتیجه آن دفاع آنتی‌اکسیدانی چندگانه در گیاهان نسبت به دیگر موجودات است. مطالعات متعدد نشان می‌دهد افزایش تحمل استرس.با افزایش تولید SOD کلروپلاستی همراه است (Abreu *et al.*, ۲۰۰۱).

Mn-SOD به یکی از دو فرم همودایمر و یا هموتترامر با یک اتم Mn در هر زیر واحد می‌باشد. این آنزیم بوسیله سیانید پتاسیم مهار نمی‌شود و هم‌چنین بوسیله پراکسید هیدروژن غیرفعال نمی‌شود ودر هر دو گروه یوکاریوت و پروکاریوت حضور دارد.Mn- SOD در گیاهان تقریبا نزدیک به ۶۵٪ تشابه توالی با یکدیگر دارند و این آنزیم تشابه زیادی با Mn-SOD باکتری‌ها دارند. (Bowler *et al.*, ۱۹۹۴) . گرچه Mn-SOD به عنوان یک آنزیم میتوکندریایی موجود در یوکاریوت‌ها است اما SOD حاوی منگنز در پراکسیزوم‌ها نیز وجود دارند (Arshad Jamal *et al.*, ۲۰۰۵).

پاسخ مثبت Mn-SOD به تنش شوری (Gomez *et al.*, ۲۰۰۴; Hernandez *et al.*, ۱۹۹۳, ۱۹۹۵) استرس سرما (Vyas *et al.*, ۲۰۰۵) و استرس خشکی (Wu *et al.*, ۲۰۰۸) گزارش شده است.



شکل ۱-۲ ایزوفرم‌های SOD و محل قرارگیری آن‌ها

۱-۱۴ -بیان ژن‌ها در تنش

پاسخ‌های پیچیده گیاهان به تنش‌های غیرزیستی با بیان ژن‌های متعدد و مسیرهای مولکولی و بیوشیمیایی گوناگون همراه است. بسیاری از این ژن‌ها به صورت مشترک در تنش‌های مختلف بیان می‌شود. به عنوان مثال بسیاری از ژن‌های دخیل در تنش شوری در تنش خشکی و سرما هم بیان می‌شود که بیان‌گر وجود مکانیزم‌های مشابه در پاسخ به این تنش است. ژن-هایی که تحت تأثیر تنش‌ها القا می‌شود در نهایت پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که برخی از آن‌ها از سلول‌های گیاهی در برابر تنش‌ها محافظت می‌کنند. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) یا چاپرون‌ها، پروتئین‌های LAF محافظ‌های اسمزی، پروتئین‌های ضد یخ، آنزیم‌های سم‌زدا و پروتئین‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد اشاره کرد. گروهی از پروتئین‌های تولیدی نیز مثل انواع CDPK[۱], MAPK[۲] فسفولیپازها و فاکتورهای رونویسی در انتقال پیام و کنترل رونویسی نقش دارند. دسته دیگر این پروتئین‌ها هم در جذب آب و یون‌ها و انتقال آن‌ها فعالیت می‌کنند که

۱ Calcium-dependent protein kinases
۲ Mitogen-actived protein (MAP) kinases

شامل انواع کانال‌ها و ناقل‌های یونی و آکواپورین‌ها هستند (Shinozaki *et al*., ۲۰۰۰; Hasegawa *et al*., ۲۰۰۰).

تفاوت در بیان ژن‌ها در همه مراحل رشد موجودات زنده رخ می‌دهد. شناخت این تفاوت‌ها به شناسایی نقش ژن‌ها و فرایندهای مولکولی که در شرایط گوناگون درون سیستم‌های بیولوژیک رخ می‌دهد منجر می‌شود (Moody, ۲۰۰۱).

روش‌های متفاوتی برای درک چگونگی و تفاوت تظاهر ژن‌ها در شرایط مختلف وجود دارد. از جمله این روش‌ها به نورترن بلات[۱] (Callard *et al*., ۱۹۹۴) کتابخانه EST[۲] (Adams *et al* ., ۱۹۹۱) تجزیه ترتیبی تظاهر ژن[۳] و بیان افتراقی[۴] درPCR (Liang and Pardee , ۱۹۹۲) اشاره کرد.

Real time PCR -۱۵-۱

Real-time PCR روشی با حساسیت بالا برای سنجش مقادیر اندک رونوشت‌های یک ژن و کمی‌سازی کوچک‌ترین تغییراتی است که در بیان آن رخ می‌دهد. و به طور گسترده برای بررسی ریزآرایه، تعیین خاصیت پاتوژن، تعیین خاصیت سرطان، یافتن تعداد کپی ترانس‌ژنیک و مطالعات دارو درمانی استفاده می‌شود. این روش می‌تواند با حداقل اسیدنوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیاد تعیین کند. به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی را دارد. در این روش امکان تشخیص بسط PCR در مرحله اول واکنش وجود دارد در حالی که تشخیص در PCR معمولی درمرحله نهایی واکنش می‌باشد. مراحل اجرای این روش نیز نسبت به سایر تکنیک‌ها آسان‌تر است. در این روش یک مولکول گزارش‌گر فلورسنت برای مشاهده پیشرفت PCR به کار می‌رود. در واقع میزان نشر متناسب با میزان محصول تولید شده در هر چرخه افزایش می‌یابد. مولکول‌های گزارشگر فلورسنت یا همان SYBER GREEN رنگ‌هایی هستند که به DNA در رشته متصل باند می‌شوند ویا مثل Man probes Tag به صورت شناساگر توالی‌های خاص می‌باشند. از آنجایی که رنگ‌های گروه نخست قابلیت اتصال به تمام قطعات DNA دو رشته‌ای موجود در واکنش موجود در واکنش PCR مانند DNA اصلی، پرایمردایمر را دارند، این روش را سنجش غیراختصاصی نیز می‌نامند. در واقع سایبرگرین بین محصولات مختلف PCR تمایزی قائل نمی‌شود. بالعکس در گروه دوم انواع شناساگرها براساس توالی بخش داخلی قطعه اصلی در حال سنتز در واکنش PCR طراحی می‌شوند. بنابراین به طور اختصاصی محصولات مورد نظر را ردیابی می‌کنند (Shipley, ۲۰۰۶; Bollmann *et al*., ۲۰۱۲)

تحلیل داده‌ها در Real-time PCR به دو صورت مطلق و نسبی امکان‌پذیر است. در روش مطلق تعداد نسخه‌های ابتدایی رونوشت یک ژن با استفاده از منحنی استاندارد و در روش نسبی تغییرات بیان ژن هدف در نمونه تیمارشده نسبت به نمونه-های کنترل و یا زمان صفر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در اندازه‌گیری نسبی میزان بیان ژن مورد نظر را نسبت به ژن‌های

۱. Northern bloting.
۲. Expressed sequence tag.
۳. Serial analysis of gene expression (SAGE)
٤. Differential display reverse transcription PCR (DDRT PCR).

ساختاری سلول تحت عنوان Housekeeping gene می‌سنجند. از جمله ژن‌های ساختاری سلول می‌توان به β-Actin و GAPDH اشاره کرد. در اکثرموارد نیز تعیین میزان تغییر در بیان ژن برای بررسی موضوع مورد مطالعه کفایت می‌کند. و نیازی به دانستن دقیق رونوشت‌های ژن وجود ندارد (Livak and Schmittgen, ۲۰۰۱). یکی از نکات مهم در Real-time PCR استانداردسازی داده و اطلاعات است. که به منظور کاهش تفاوت‌های غیر واقعی در نتایج انجام می‌شود در حقیقت استاندارد سازی برای دستیابی به کمیت‌سنجی دقیق از سطح بیان ژن‌ها مخصوصاً درصورت کوچک بودن اختلاف بیان ژن یا در بررسی بیان یک ژن در بافت‌های مختلف، ضروری می‌باشد. و هدف استانداردسازی اصلاح خطای ناشی از مراحل مختلف اجرای آزمایش شامل اختلاف در مقدار نمونه اولیه مراحل استخراج RNA، تغییر پایداری RNA و تجزیه آن، تفاوت غلظت RNA در نمونه‌های مختلف، سنتز cDNA، کیفیت، خلوص و کارایی واکنش رونویسی معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است .(Gue *et al*., ۲۰۰۹; Jain *et al*., ۲۰۰۶) در میان انواع روش‌های استاندارد سازی استفاده از کنترل داخلی یا ژن‌های مرجع برای استاندارد سازی داده‌ها در رابطه با بررسی mRNA بهترین روش است. این ژن‌ها در همه بافت‌ها بیان می‌شوند و سطح بیان ژن‌ها در شرایط آزمایشی متفاوت و در حالات مختلف یک بافت تغییر نمی‌کند. معمولا ژن‌های ساختاری خانه‌دار به عنوان ژن‌های مرجع انتخاب می‌شوند که به طور دائم رونویسی می‌شوند و محصول آن‌ها برای حفظ حیات سلول مورد نیاز است. نسبت میزان رونویسی RNA هدف به میزان رونویسی یک RNA مرجع داخلی تعیین کننده میزان بیان ژن مورد نظر است. مقدار استاندارد شده این نسبت با استفاده از روش ΔΔCT برای نمونه‌ها محاسبه می‌شود (Livak; Huggett *et al*., ۲۰۰۶; Jain *et al*., ۲۰۰۹).

میزان تغییرات نسبی بیان ژن $= ۲^{\Delta\Delta ct}$

$\Delta\Delta Ct=((\Delta CT\ treated)-(\Delta CTuntreated)$

$\Delta CT=(CT_{target\ gene})-(CT_{refrence\ gene})$

۱-۱۶- مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱۶-۱- بررسی اثر تنش خشکی بر محتوای پرولین

غلظت پرولین در گیاهان در شرایط بدون تنش کمتر از ۵ درصد مجموع کل اسید آمینه‌ها می‌باشد. در بسیاری از گیاهان تحت تنش خشکی میزان آن افزایش چشم‌گیر می‌یابد. این افزایش غلظت یک مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش محسوب می‌شود. در بیشتر گونه‌ها ذخیره پرولین به عنوان معیار سنجش تحمل تنش به حساب می‌آید که البته این موضوع وابسته به گونه است.(Ashraf *et al*., ۲۰۰۷) .

تحقیقات نشان می‌دهد، تیمار پرولین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز شده که در تحمل تنش خشکی *Laurus nobilis* L. مؤثر است (Aktas *et al.*, ۲۰۰۷). ذخیره پرولین تأمین کننده انرژی مورد نیاز برای رشد و زنده ماندن گیاه در هنگام وقوع تنش است (Chandrashekar *et al.*, ۱۹۹۶). پرولین نقش جاروب کننده رادیکال‌های آزاد و نقش اسمولیت برعهده دارد (Jaleel *et al.*, ۲۰۰۷) با توجه به اهمیت انباشت پرولین درگیاه تحت تنش خشکی تقریبا تمام منابع بررسی شده مبنی بر افزایش مقدار آن بوده است که به چند مورد اشاره می‌شود. Upadayaya و همکاران (۲۰۰۴) افزایش ۲۵ درصدی مقدار پرولین در نهال‌های چای تحت تنش خشکی مشاهده کردند. نتایج مشابهی هم توسط Handique (۱۹۹۰) و مسعودیان و همکاران (۱۳۹۰) گزارش شده است. Chen و همکاران (۲۰۱۰) بیشترین مقدار اسید آمینه آزاد در تیمار ۱۰ روز خشکی نهال‌های چای مشاهده کردند که به تدریج با افزایش روزهای تنش به ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز از مقدار آن کاسته شد.

القا ذخیره پرولین به وسیله ساخته شدن آن از مسیر گلوتامات توسط آنزیم‌های گلوتامیل کیناز، گلوتامیل فسفات ردوکتاز و دلتا پیرولین ۵ کربوکسیلات ردوکتاز در اطلسی (Girija *et al.*, ۲۰۰۲)، گوجه فرنگی (Fujita *et al.*, ۲۰۰۳) و آفتابگردان(Manivannan *et al.*, ۲۰۰۷) گزارش شده است. دومین دلیل افزایش پرولین کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر تجزیه آن مثلاً پرولین اکسیداز می‌باشد که این امر در گوجه فرنگی (Fujita *et al.*, ۲۰۰۳)، آفتابگردان (Manivannan *et al.*, ۲۰۰۷) گزارش شده است. افزایش پرولین در گیاهان دیگر از جمله سیب زمینی (Masoudi- ۲۰۱۱ Sadaghiani *et al.*, در تیمار خشکی گزارش شده است. انباشت زیاد اسمولیت‌ها در گیاهان ترانس ژنی موجب اختلال در رشد در شرایط عدم تنش می‌شود.

۱-۱۶-۲- بررسی اثر تنش خشکی بر محتوای MDA

پژوهش‌ها نشان می‌دهد به تدریج با شدت یافتن تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه تقلیل یافته و سطح MDA در سلول افزایش می‌یابد. این امر به ذخیره H_2O_2 در سلول و افزایش پراکسیدسیون لیپیدهای غشایی منتهی می‌شود. افزایش MDA با مکانیسم فیدبک منفی مهار بیشتر فعالیت‌های آنزیمی را موجب می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا موجب تخریب فراساختارهای فتوسنتزی و تنفسی شده این موضوع به عنوان یک عامل فیزیولوژیک در جهت کاهش محصولات کشاورزی در طی تنش خشکی به حساب می‌آید (Bal *et al.*, ۲۰۰۶).

Jeyaramraja معتقد است ذخیره آهن کاتالیتک در تنش شدید دلیل دیگری برای پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. نتایج فوق با گزارشات Herna´ndez و همکاران (۲۰۰۶) مغایرت داشت. آنها کاهش حدود ۵۰ درصدی در حجم MDA در تیمار ۱۹ روز خشکی نهال چای گزارش کردند و علت کاهش MDA، افزایش سنتز کتچین‌های کوئینون با

قابلیت آنتی‌اکسیدانی فراوان ذکر کردند. هم‌چنین سطح بالایی از پراکسیداسیون لیپیدی به دنبال تنش خشکی در *Cowpea* دیده شد (Nair *et al.*, ۲۰۰۸). در ژنوتیپ‌های مختلف گندم هم، افزایش حجم MDA در تنش خشکی گزارش شده است (Gallea *et al.*, ۲۰۰۹).

۱-۱۶-۳-بررسی اثر تنش خشکی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی

کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی سازگاری ایجاد شده در گیاه تحت تنش است که احتمال آسیب به ماشین فتوسنتزی را با کم کردن تشکیل AOS تقلیل می‌دهد (Kranner *et al.*, ۲۰۰۲). نخست به بررسی اثر تنش آب بر محتوای رنگدانه‌ای گیاه چای پرداخته و در ادامه به موارد مشابه در سایر گیاهان اشاره می‌شود.

Jeyaramraja و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه بر روی تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی در دو سطح تنش خشکی (ملایم و شدید) در گیاه چای به این نتیجه رسیدند که مقدار کلروفیل و بتا کاروتن در هر دو سطح تنش نسبت به شاهد کاهش یافت و با افزایش یافتن شدت تنش، کاهش شدیدتر (۹۱درصد) شد، که این حالت با توقف کامل فتوسنتز درگیاه همراه بود. این یافته‌ها با تحقیقات Upadayaya و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. آنها کاهش ۴۲ درصدی کلروفیل و ۵۱/۹۶ درصدی کاروتنوئیدها را در نهال‌های چای در معرض تنش خشکی مشاهده کردند. علت کاهش رنگیزه‌ها را می‌توان به القا تجزیه شدن و یا مهار سنتز آنها نسبت داد. تخریب شدید رنگیزه‌ها در تنش خشکی معمولاً با افزایش فرایندهای فتواکسیداتیو در کلروپلاست همراه است .(Munné-Bosch *et al.*, ۲۰۰۴) کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان دیگر از جمله: در ژنوتیپ‌های مختلف گندم (Gallea *et al.*, ۲۰۰۹)، در شرایط تنش خشکی گزارش شده است.

گزارشات Chen و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر عدم تغییر میزان کلروفیل و کاروتنوئید در نهال‌های چای در تیمارهای مختلف خشکی بود. که با نتایج مسعودیه صدقیانی و همکاران (۲۰۱۱) برروی سیب زمینی مطابقت داشت. در تحقیق انجام شده توسط Munne´-Bosch و همکاران (۲۰۰۹) که به مطالعه بیان ۱۳ ژن کد کننده آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها که در سنتزکلروفیل، کاروتنوئید، توکوفرول، آبسزیک اسید نقش دارند، در گیاه *Creticus cistus* پرداخته بودند؛ نتایج آنها بیان کرد که با کاهش ۲۵ درصدی حجم نسبی آب برگ در بیان ژن و سنتز متابولیت‌های مربوطه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. این در حالی است که نتایج حاصل از تحقیقات Sairam و همکاران (۲۰۰۰) و (۲۰۰۱) نشان داده است که ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی گندم که تحت شرایط تنش رطوبتی از میزان کاروتنوئیدها و کلروفیل بالاتری برخوردار هستند، همچنین فعالیت بیشتری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در مقایسه با ارقام حساس تحت شرایط تنش رطوبتی از خود نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت شرایط تنش رطوبتی در ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی گندم، موجب حفظ مقادیر بالاتر کاروتنوئید و کلروفیل در این ارقام می‌گردد.