

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده‌ی علوم کشاورزی

## بررسی بیوانفورماتیکی خانواده‌ی ژنی عوامل رونویسی *WRKY* در گندم

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

غفار خضری

اساتید راهنما

دکتر امیرمحمد ناجی

دکتر زهرا سادات شیر

استاد مشاور

دکتر رضا فتوت

۱۳۹۱



اظهار نامه دانشجو

شماره :

تاریخ

اینجناب غفار خضری دانشجوی کارشناسی ارشد رشته کشاورزی / دکتری رشته ..... (ph.D) / دستیاری تخصصی

بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، گواهی می دهم که پایان نامه / رساله تدوین شده حاضر با

عنوان، " بررسی بیوانفورماتیکی خانوادهی ژنی عوامل رونویسی WRKY در گندم "

به راهنمایی استاد محترم سرکار خانم دکتر / جناب آقای دکتر امیر محمد ناجی ..... توسط شخص اینجناب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن ، مورد تایید است و چنان چه هر زمان، دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان نامه / رساله حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد، مدرک تحصیلی اینجناب را مسترد و ابطال نماید هم چنین اعلام می دارد در صورت بهره گیری از منابع مختلف شامل گزارش های تحقیقاتی ، رساله ، پایان نامه ، کتاب ، مقالات تخصصی و غیره ، به منبع مورد استفاده و پدید آورنده آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج در پایان نامه / رساله حاضر تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجناب و یا سایر افراد به هیچ کجا ارائه نشده است . در تدوین متن پایان نامه / رساله حاضر ، چارچوب (فرمت) مصوب تدوین گزارش های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهایتاً این که ، کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پایان نامه / رساله حاضر ، متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو ( دست نویس ) .....

امضاء دانشجو :

تاریخ :

فرم مذکور بعد از صفحه بسم ... قرار داده شود

## چکیده

تنش‌های زیستی و غیرزیستی مهمترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی مانند گندم می‌باشند. خانواده‌ی ژنی *WRKY* رمزکننده گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخیل می‌باشند. بنابراین شناسایی و مطالعه‌ی این خانواده‌ی ژنی گامی مؤثر در راستای یافتن راهکارهایی هدفمند برای تحمل گیاهان به تنش‌ها خواهد بود. در پژوهش حاضر، اطلاعات مربوط به اعضای خانواده‌ی *WRKY* گندم از پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط مانند plantTFDB، GrainGenes، GramineaTFDB و EMBL جمع‌آوری شد. برای یافتن اعضای جدید، توالی‌های حفظ شده خانواده‌ی *WRKY* برنج در داده‌های پایگاه NCBI (اعم از nr، EST و HTGS) به وسیله ابزار tblastn جستجو شدند. هم‌پوشانی ESTها در پایگاه اطلاعاتی (EST Annotator) TIGR بدست آمد. توالی‌هایی مثل EST و cDNA (فاقد پروتئین) توسط نرم-افزارهای DNASTar، NCBI ORF finder ترجمه شدند. ساختار پروتئینی این خانواده از طریق پایگاه اطلاعاتی PDB و منابع علمی بررسی شد. هم‌ردیفی و آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزارهای MEGA4 و BioEdit انجام گردید. الگوی بیانی این خانواده‌ی ژنی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و EST در پایگاه‌های PLEXdb، GENEVESTGATOR، DDD NCBI و TIGR بررسی شد. هستی‌شناسی و عملکرد ژن‌های *WRKY* در پایگاه AgriGO مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، ۹۵ عضو از خانواده‌ی ژنی *WRKY* در گندم یافت شد. برای ۷۶ عضو پیدا شده ساختار حفظ شده خانواده *WRKY* به طور کامل وجود داشت و برای دیگر اعضا، توالی کامل پروتئین پیدا نشد. ویژگی خاص پروتئین‌های این خانواده وجود پهنه *WRKY* با حدود ۶۰ اسید آمینه است که شامل توالی حفاظت‌شده‌ی *WRKYGQK* در انتهای آمین و ساختار انگشت‌مانند روی در انتهای کربوکسیل (با توالی حفاظت‌شده *Cx7Cx23HxC* یا *Cx4-5Cx22-23HxH*) می‌باشد که برای ایجاد ساختار فضایی ویژه این خانواده و اتصال به DNA ضروری می‌باشند. عوامل رونویسی *WRKY* در گندم همانند سایر گیاهان بر مبنای تعداد پهنه-های *WRKY* و ساختار انگشت‌روی آنها در سه گروه قرار گرفتند که شامل ۱۶ عضو از گروه I، ۳۸ عضو از گروه II و ۲۲ عضو از گروه III بود. در گروه II به ترتیب ۶، ۱۳، ۱۱، ۶ و ۲ عضو در زیرگروه‌های IIa، IIb، IIc، IId و IIe قرار گرفتند. زیرگروه‌های IIIa و IIIb در گروه III نیز به ترتیب دارای ۱۰ و ۱۲ عضو بودند. بررسی دقیق مناطق حفاظت‌شده و آنالیز فیلوژنتیکی مؤید نظریه‌های موجود بود مبنی بر این که گروه I (دارای دو پهنه *WRKY*) قدمت بیشتری نسبت به دیگر گروه‌ها دارد و گروه II این خانواده با از دست دادن پهنه *WRKY* انتهای آمینی گروه I (و حفظ پهنه *WRKY* انتهای کربوکسیل آن) ایجاد و در طی تکامل گسترش پیدا کرده‌اند و گروه III بعد از گروه‌های I و II در پاسخ به تنش‌ها و در راستای سازگاری بیشتر گیاه با شرایط تنشی بوجود آمده‌اند. همچنین در میان زیرگروه‌های II، IIb قرابت ژنتیکی نزدیک‌تری نسبت به گروه I دارد بنابراین احتمالاً این زیرگروه اولین زیرگروه بعد از تکامل گروه I می‌باشد در حالی که شباهت زیرگروه IIa به گروه III بیشتر است و احتمالاً این زیرگروه بعد از زیرگروه‌های دیگر گروه II بوجود آمده است. ۷ عضو از این خانواده، با توجه به بیان افتراقی آنها در پاسخ به تنش خشکی در ارقام حساس و متحمل گندم، به عنوان ژن‌های کاندید در تحمل به خشکی انتخاب شدند که ۴ عضو از آنها مربوط به گروه III می‌باشند. امید است تنظیم بهینه بیان این ژن‌ها، موجب افزایش تحمل به تنش و حفظ و پایداری عملکرد در شرایط تنش شود.

**کلمات کلیدی:** گندم، خانواده‌ی ژنی *WRKY*، تنش خشکی، عوامل رونویسی، آنالیز فیلوژنتیکی، بیوانفورماتیک.

## فهرست مطالب

۱	چکیده
۲	مقدمه
۴	فصل اول: کلیات و بررسی منابع
۵	۱-۱- معرفی گندم
۶	۱-۲- مفهوم تنش
۶	۱-۲-۱- تعریف تنش
۶	۱-۲-۲- انواع تنش های محیطی
۷	۱-۲-۳- تنش خشکی
۹	۱-۲-۴- ژن های موثر در مکانیسم تحمل به تنش خشکی
۹	۱-۳- عوامل رونویسی
۹	۱-۳-۱- تعریف عوامل رونویسی
۱۱	۱-۳-۲- عوامل رونویسی WRKY
۱۴	۱-۳-۳- ساختار عوامل رونویسی WRKY
۱۵	توالی های W
۱۷	نقش عوامل رونویسی WRKY
۲۴	عوامل رونویسی WRKY در سلسله گیاهی
۲۶	۱-۴- بیوانفورماتیک
۲۶	۱-۴-۱- معرفی بیوانفورماتیک:
۲۷	۱-۴-۲- حوزه های علم بیوانفورماتیک:
۲۸	۱-۴-۳- کاربردهای بیوانفورماتیک:

۲۹	۴-۴-۱- پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط
۳۷	<b>فصل دوم: مواد و روش‌ها</b>
۳۸	۱-۲- شناسایی اعضای خانواده‌ی ژنی <i>WRKY</i>
۳۸	۱-۱-۲- شناسایی اعضا با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط
۳۹	۲-۱-۲- Tblastn بر اساس توالی‌های حفظ شده در برنج
۴۲	۳-۱-۲- پیدا کردن ORF و ترجمه توالی‌های بدون پروتئین
۴۴	۲-۲- بررسی ساختار پروتئین
۴۵	۳-۲- طبقه بندی و مطالعات فیلوژنتیک
۴۷	۴-۲- آنالیز بیان
۴۸	۱-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه‌های دارای اطلاعات ریزآرایه
۴۸	۱-۱-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه اطلاعاتی PLEXdb
۴۹	۲-۱-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه اطلاعاتی GENEVESTIGATOR
۵۱	۳-۱-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه اطلاعاتی GEO NCBI
۵۱	۲-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه‌های دارای اطلاعات مربوط به داده‌های EST
۵۱	۱-۲-۴-۲- آنالیز بیان با استفاده از داده‌های EST در پایگاه اطلاعاتی TIGR
۵۳	۲-۲-۴-۲- آنالیز بیان با استفاده از داده‌های EST در پایگاه اطلاعاتی DDD NCBI
۵۵	۵-۲- هستی شناسی خانواده‌ی ژنی <i>WRKY</i> در پایگاه اطلاعاتی AgriGO
۵۶	<b>فصل سوم: نتایج و بحث</b>
۵۷	۱-۳- شناسایی خانواده‌ی ژنی <i>WRKY</i>
۶۲	۲-۳- بررسی ساختار پروتئینی پهنه <i>WRKY</i>
۶۷	۳-۳- بررسی فیلوژنتیکی
۷۷	۴-۳- آنالیز بیان و کاندید شدن ژن‌های موثر در تحمل به تنش خشکی

۷۷	.....	۳-۴-۱- آنالیز بیان در پایگاه‌های دارای اطلاعات EST
۷۷	.....	۳-۴-۲- آنالیز بیان در پایگاه‌های دارای اطلاعات ریز آرایه
۸۴	.....	۳-۵- انتولوژی خانواده‌ی ژنی <i>WRKY</i>
۹۰	.....	۳-۶- جمع‌بندی
۹۲	.....	۳-۷- پیشنهادات
۹۳	.....	پیوست شماره ۷
۹۸	.....	منابع

### فهرست شکل‌ها

۳۸	.....	شکل ۱-۲: اطلاعات مربوط به خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی گندم در پایگاه اطلاعاتی PlantTFDB
۳۹	.....	شکل ۲-۲: توالی‌های موجود در Unigene
۴۱	.....	شکل ۲-۳: هم‌ردیفی توالی پروتئین پهنه <i>WRKY</i> در زیرگروه‌های خانواده ژنی <i>WRKY</i> در برنج
۴۲	.....	شکل ۲-۴: نتیجه Tblastn با استفاده از توالی‌های حفاظت‌شده گیاه برنج بر علیه داده‌های نوکلئوتیدی گندم
۴۲	.....	شکل ۲-۵: پیدا کردن ORF توالی‌های نوکلئوتیدی در نرم افزار DNA STAR
۴۳	.....	شکل ۲-۶: ORF‌های بدست آمده در نرم افزار NCBI ORF finder
۴۴	.....	شکل ۲-۷: نتیجه‌ی همپوشانی در EST Annotator
۴۵	.....	شکل ۲-۸: پایگاه اطلاعاتی PDB
۴۶	.....	شکل ۲-۹: هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی حفاظت‌شده خانواده ژنی <i>WRKY</i> توسط نرم افزار MEGA4
۴۷	.....	شکل ۲-۱۰: مشخص کردن نواحی حفاظت‌شده توسط نرم افزار BioEdit و MEME Program

- شکل ۲-۱۱: پایگاه اطلاعاتی PLEXDB ..... ۴۸
- شکل ۲-۱۲: پایگاه GENEVESTIGATOR ..... ۵۰
- شکل ۲-۱۳: ابزار BLAST در GEO NCBI جهت بدست آوردن الگوی بیانی ریزآرایه‌های موجود ..... ۵۱
- شکل ۲-۱۴: پایگاه اطلاعاتی EST Expression TIGR ..... ۵۲
- شکل ۲-۱۵: انتخاب شرایط (تنش خشکی و کنترل) و بافت‌های مختلف در در EST Expression TIGR برای پیدا کردن ژن‌های دارای تفاوت بیان و تغییرات بیان این ژن‌ها در شرایط تنش خشکی و کنترل ..... ۵۲
- شکل ۲-۱۶: تغییرات بیان ژن‌ها در پایگاه EST Expression TIGR ..... ۵۳
- شکل ۲-۱۷: مقایسه EST‌های بیان شده در شرایط مختلف در DDD NCBI ..... ۵۴
- شکل ۲-۱۸: پایگاه اطلاعاتی AgriGO ..... ۵۵
- شکل ۳-۱: ساختار اولیه پهنه‌ی WRKY ..... ۶۲
- شکل ۳-۲: لوگوی حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی خانواده WRKY در گندم ..... ۶۳
- شکل ۳-۳: تصویر سه‌بعدی از پهنه WRKY ..... ۶۴
- شکل ۳-۴: کمپلکس تشکیل‌دهنده پهنه WRKY و عنصر حفظ‌شده W ..... ۶۴
- شکل ۳-۵: نمای گرافیکی بدست آمده از هم‌ردیفی توالی‌ها بوسیله نرم افزار BioEdit ..... ۷۰
- شکل ۳-۶: توالی‌های توافقی یا حفاظت‌شده بدست آمده از نرم افزار MEME program ..... ۷۱
- شکل ۳-۷: راهنمای گراف‌های پایگاه AgriGO ..... ۸۴
- شکل ۳-۸: شبکه هستی‌شناسی ترکیبات سلولی که موجب تشکیل کمپلکس عوامل رونویسی WRKY می‌شود ..... ۸۶
- شکل ۳-۹: هستی‌شناسی عملکرد مولکولی خانواده ژنی WRKY ..... ۸۷



شکل ۳-۱۰: هستی‌شناسی فرآیندهای زیستی درگیر با خانواده ژنی *WRKY* در گندم..... ۸۸

شکل ۳-۱۱: میزان شرکت فعالیت خانواده ژنی *WRKY* در فرآیندهای مختلف سلولی..... ۸۹

### فهرست جدول ها

جدول ۱-۱: پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط و آدرس URL آنها..... ۳۶

جدول ۳-۱: اعضای خانواده ی ژنی *WRKY*..... ۵۷

جدول ۳-۲: کاوشگرهای ریزآرایه بدست آمده برای ژن‌های خانواده ی ژنی *WRKY*..... ۷۸

جدول ۳-۳: نسبت تغییرات (برابر) بیان ژن های *WRKY* در تنش خشکی بین وارپته های حساس و مقاوم..... ۸۴

### فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱: درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیفی پهنه‌های اعضا *WRKY* در گندم..... ۶۸

نمودار ۳-۲: درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ردیفی پهنه‌های اعضا *WRKY* در گندم (Cutt off: ۴۰)..... ۶۹

خشکی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت و توسعه محصولات کشاورزی از جمله گندم است و منجر به کاهش ۵۰-۹۰ درصدی محصول گندم نسبت به عملکرد تئوریک آن می‌گردد. اما متأسفانه هنوز دانش کافی در مورد مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی حاصل نشده است. در رابطه با صفاتی مثل تحمل به خشکی چندین ژن درگیر هستند بنابراین دستورزی ژنتیکی برای افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی مشکل خواهد بود. مطالعه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های خشکی، شوری و سرما حاکی از وجود چندین سیستم تنظیمی برای بیان ژن در پاسخ به تنش است که برخی وابسته به آبسزیک‌اسید و برخی مستقل از آن می‌باشند. عوامل رونویسی تنظیم‌کننده‌های اصلی هستند که خوشه‌های ژنی را کنترل می‌کنند. یک عامل رونویسی می‌تواند بیان ژنهای هدف متعددی را از طریق اتصال به عناصر سیس راه اندازه‌های آنها تنظیم کند. بنابراین شاید بهترین راه برای ایجاد تحمل به این تنش‌ها (که کنترل پلی ژنی دارند) شناسایی و دستورزی عوامل رونویسی کلیدی باشد. نخستین گام در این راستا، بررسی جامع و هدفمندی جهت شناسایی موثرترین و کلیدی‌ترین ژن‌های درگیر است. نظر به اینکه خانواده *WRKY* گروه بزرگی از فاکتورهای رونویسی را تشکیل می‌دهند که در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در تحمل به تنش‌های محیطی فعالیت می‌کنند، مطالعه این گروه در گندم راهکاری برای اصلاح ملکولی این محصول برای مقاومت به خشکی است، با شناسایی اعضای خانواده‌ی ژنی *WRKY* در گندم، آنالیز آنها از نظر فیلوژنتیکی و بررسی الگوی بیانی آنها با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی می‌توان چندین ژن درگیر در پاسخ به تنش خشکی را نامزد کرده و صرفه‌جویی شگرفی را در وقت و هزینه‌های آزمایشگاهی موجب گردید، امید

است دستورزی و افزایش بیان این ژن‌ها، در بیان سایر ژن‌های درگیر در مقاومت به خشکی تاثیر گذاشته و موجب افزایش تحمل به تنش و حفظ و پایداری عملکرد در شرایط تنش شود.

کلیات

و بررسی منابع

## ۱-۱- معرفی گندم

غلات مهم ترین منابع تأمین کننده غذای بشر می باشند. در بین غلات، گندم از جمله مهم ترین گیاهان زراعی مورد استفاده انسان است. این گیاه در مناطق وسیعی از جهان در محدوده عرض جغرافیایی ۶۷ درجه شمالی تا ۴۵ درجه عرض جنوبی کشت می شود. این قدرت تطابق، موجب گسترش سطح زیرکشت آن در جهان شده است. بیشترین مقدار گندم در جهان در مناطق نیمه خشک (با بارندگی سالانه ۵۰۰-۲۵۰ میلی متر) و نیمه مرطوب (با بارندگی سالانه ۷۰۰-۵۰۰ میلی متر) و مقداری هم در مناطق خشک (با بارندگی سالانه حدود ۲۰۰ میلی متر) تولید می شود (GARCIA, 2003). هزاران سال است که گونه های وحشی خویشاوندان گندم در رویارویی با عوامل نامساعد طبیعی همچنان پیروزمندانه زنجیره حیات خود را در امتداد نظام خلقت جلو می برند. از سال ۱۸۷۰ که اولین تربیتکاله به عنوان یک محصول ساخته بشر، در نتیجه تلاقی چاودار و گندم معمولی در کشور سوئد به دست آمد، برنامه به نژادی گندم برای دستیابی به اهدافی افزون تر، از محدوده برنامه های کلاسیک فراتر رفت و به گنجینه ذخایر ژنتیکی در خویشاوندان وحشی نگاه افکند. این گرایش پس از توسعه فناوری های کشت بافت، مهندسی ژنتیک و تکنیک های پیشرفته ملکولی شتاب بیشتری گرفت. گندم (*Triticum sp.*) متعلق به خانواده *Gramineae* یکی از قدیمی ترین گیاهان اصلی به شمار می رود به طوری که سابقه کشت و کار آن در ناحیه بین النهرین به ده هزار سال پیش می رسد. در این زمان طولانی، انجام تلاقی های بین و میان گونه ای متعدد، فشار انتخاب طبیعی، انجام کشت و کار در مناطق وسیع و انتخاب مصنوعی موجب پایدار شدن تنوع ژنتیکی بسیار وسیعی در این گیاه گردیده است. گندم معمولی یا همان گندم نان به نام *Triticum aestivum* مشهور است و بیشترین میزان کشت را در بین انواع گندم دارد و اهمیت

مطالعه و بررسی بر روی آن با توجه به افزایش جمعیت و تهدیدهای زیستی بیش از گذشته است. گندم نان از تلاقی گندم دیپلوئید اهلی (*Triticum durum*) و گراس وحشی تتراپلوئید (*Aegilops tauschii*) در طی فرآیندهای اصلاحی بوجود آمده و هگزاپلوئید است.

## ۱-۲- مفهوم تنش<sup>۱</sup>

### ۱-۲-۱- تعریف تنش

تنش نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیک بوده و از تأثیر یک و یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود. به عبارت دیگر تنش عبارت است از قرار گرفتن موجود تحت تأثیر شدتی از یک عامل محیطی که کاهش عملکرد و در نتیجه کاهش بازده و ارزش اقتصادی آن می‌شود. موجب افت ظاهری، بازده و یا ارزش آن می‌شود (Andarzian and Ayeneh, 2008).

واژه تنش برای هر عامل محیطی که به طور بالقوه تأثیر نامطلوبی بر موجودات زنده داشته باشد به کار برده می‌شود (Akbari Moghaddam H et al., 2002). در حالت کلی، تنش عبارت است از فشار بیش از حد برخی نیروهای مخالف که سبب می‌شود سیستم‌های طبیعی از عمل طبیعی خود باز داشته شوند. به بیان دیگر تنش عاملی است که پاسخ‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ashraf, 1978).

### ۱-۲-۲- انواع تنش‌های محیطی

به طور کلی تنش‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند:

الف- تنش‌های زنده<sup>۱</sup>: تنش‌های بیولوژیکی شامل حمله آفات و امراض به گیاهان می‌باشد.

---

<sup>1</sup> Stress

ب- تنش های غیرزنده<sup>۲</sup>: تنش های فیزیوشیمیایی به پنج گروه تقسیم می شوند: باد، شیمیایی، تشعشع، آب و دما (Levitt, 1980).

تنش های محیطی در مزرعه عمدتاً به صورت کمبود عواملی نظیر آب، مواد غذایی و حرارت ظاهر می شوند. تنش دارای درجاتی از بسیار خفیف تا شدید بوده و شدت آن با مقدار انرژی که در تغییرات فرآیندها در سیستم زیستی وارد عمل می شود ارتباط پیدا می کند (Blum and Pnuel, 1990).

### ۱-۲-۳- تنش خشکی<sup>۳</sup>

بخش وسیعی از سرزمین های جهان در مناطق خشک و نیمه خشک واقع است که رشد گیاهان به دلیل محدودیت آب و وجود نمک با دشواری های زیادی روبرو می باشد (Dean-Knox et al., 1998). رطوبت کم در بسیاری از موارد بزرگترین فشار و محدودیت را برای تولید گیاهان زراعی وارد می سازد (Baker, 1989; Moustafa et al., 1996; Ashraf and Mehmood, 1990; NeSmith and Ritchie, 1992). خسارات ناشی از خشکی موجب کاهش تولید گیاهی می شود. این کاهش ممکن است بر اثر تاخیر یا عدم استقرار گیاه، تضعیف و یا از میان رفتن گیاهان استقرار یافته، مستعد شدن گیاه نسبت به حمله آفات و امراض، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سوخت و ساز گیاهان، تغییرات در کیفیت دانه، علوفه، الیاف، روغن و سایر محصولات اقتصادی گیاه به وجود آید (Zrust, 1995). از لحاظ کشاورزی خشکی به وضعیتی اطلاق می گردد که میزان و توزیع نزولات به اندازه ای ناچیز باشد که موجب نقصان عملکرد محصول زراعی شود (Baker, 1989; Singh, 1991). با توجه به محدودیت های

---

<sup>1</sup> Biotic stress

<sup>2</sup> Abiotic stress

<sup>3</sup> Drought stress

شدید منابع آبی در اکثر مناطق کشور، در کشور ما تنش خشکی به عنوان مهم‌ترین تنش تاثیر گذار بر گیاهان زراعی معرفی شده است. گیاهان در زمان انتقال از دریا به خشکی طی روند تکاملی با این تنش روبه‌رو شده و سعی بر ایجاد انواع راهکارهای تحمل نسبت به خشکی کردند تا بتوانند از این شرایط به گونه‌ای فرار کنند. اما با توجه به نوسان شرایط محیطی، خشکی هنوز عمده‌ترین محدودیت در تولید محصولات زراعی است، به طوری که بر اساس مطالعات به عمل آمده از بین عوامل مختلف تنش‌زای زنده (بیماری‌ها، آفات، علف‌های هرز و ...) و غیر زنده (خشکی، غرقاب، شوری، گرما، سرما و ...)، خشکی به تنهایی مسبب ۴۵٪ از کاهش عملکرد محصولات زراعی بوده است. سایر پژوهشگران نیز متوسط کاهش عملکرد سالانه در اثر خشکی در جهان را ۱۷٪ ذکر کرده‌اند که تا بیش از ۷۰٪ در سال می‌تواند افزایش یابد. بشر با انجام تحقیقات زیاد روی انواع گیاهان، بعضی از اثرات خشکی را بر روی گیاهان شناخته و به دنبال سازوکارهای تحمل در گیاهان بوده تا شاید بتواند با شناخت آنها و چگونگی اثرشان گامی در جهت حفظ عملکرد گیاهان زراعی در شرایط تنش بردارد، اما هنوز به دلیل وجود تنوع در راهکارها، بسیاری از آنها ناشناخته مانده‌اند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

به دلیل کمی ریزش‌های جوی و نامناسب بودن پراکنش زمانی و مکانی در ایران، کشور ما در زمره کشورهای خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود. از طرف دیگر به دلیل رشد جمعیت، توسعه بهداشت و گسترش بخش‌های کشاورزی و صنعت و مواردی از این دست، پیوسته با افزایش تقاضای آب مواجه بوده و این امر موجب زیاد شدن شکاف میان عرضه و تقاضای این ماده‌ی ارزشمند در آینده خواهد شد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).



## ۱-۲-۴- ژن‌های موثر در مکانیسم تحمل به تنش خشکی

هنگامی که گیاه با تنش خشکی مواجه می‌شود تعداد زیادی ژن برای مقابله با تنش روشن شده یا بیان آنها دستخوش تغییر می‌شود که نتیجه آن تغییر در سطوح پروتئین‌ها و متابولیت‌های سلولی است. ژن‌هایی که تحت شرایط تنش خشکی القا می‌شوند را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم نمود:

۱- ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی با وظایف ساختمانی یا آنزیمی مشخص.

۲- ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی با وظایف شناخته نشده.

۳- ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های تنظیمی.

اولین ژن‌های نامزد برای انتقال به گیاهان به منظور مقابله با تنش، ژن‌هایی تک عملی بودند که پروتئین‌هایی را رمز می‌کردند که دارای یک عمل مشخص بودند از قبیل آنزیم‌های کلیدی در تولید عواملی مانند پرولین، بتاین و بعضی از قندها و آنزیم‌هایی که در سم‌زدایی نقش داشتند. اما به دلیل پیچیده بودن و موثر بودن تعداد زیادی ژن در فرآیند تحمل به تنش خشکی، پژوهشگران در ادامه سعی کردند از ژن‌هایی استفاده کنند که نقش تنظیمی دارند و تحت شرایط تنش بیان می‌شوند از قبیل عوامل رونویسی که می‌توانند در تنظیم بیان چندین ژن دخالت داشته باشند (Ingram and Bartels, 1996).

## ۱-۳-۱- عوامل رونویسی

### ۱-۳-۱- تعریف عوامل رونویسی

در علم بیولوژی و ژنتیک یک عامل رونویسی به پروتئینی گفته می‌شود که به طور اختصاصی به توالی خاصی از DNA متصل می‌شود و موجب تنظیم بیان ژن خاصی می‌شود (Karin, 1990);

(Latchman, 1997). عوامل رونویسی وظیفه خود را یا به تنهایی یا به صورت تعامل با مجموعه‌ای از پروتئین‌ها انجام می‌دهند، عوامل رونویسی با مهار کردن و یا تحریک فعالیت RNA polymeras موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند. یکی از ویژگی‌های عوامل رونویسی داشتن یک یا چند جایگاه اتصالی در مجاورت ژن مورد نظر است که موجب تنظیم بیان آنها می‌شود (Mitchell and Tjian, 1989). پروتئین‌های دیگری مانند فعال‌کننده‌ها، هیستون استیلازها، داستیلازها، کینازها و متیلازها که نقش برجسته‌ای در تنظیم بیان ژن دارند، به دلیل فقدان ناحیه‌ی اتصالی بر روی DNA در گروه عوامل رونویسی قرار نمی‌گیرند (Brivanlou and Darnell Jr, 2002). عوامل رونویسی برای تنظیم بیان ژن‌ها ضروری هستند بنابراین در تمامی موجودات زنده وجود دارند. تعداد عوامل رونویسی در هر موجود زنده بستگی به اندازه‌ی ژنوم آن دارد بنابراین هر اندازه ژنوم بزرگتر باشد به ازای آن تعداد عامل رونویسی بیشتری هم وجود دارد (Nimwegen, 2006). حدود ۲۶۰۰ پروتئین در انسان دارای نواحی اتصالی به DNA می‌باشند که اغلب آنها دارای فعالیت تنظیم بیان ژن هستند (Babu et al., 2004)، بنابراین ۱۰ درصد کل ژن‌های ژنوم انسان عوامل رونویسی را کد می‌کنند که آنها را به یکی از بزرگترین خانواده‌های پروتئینی در انسان تبدیل کرده است (Brivanlou and Darnell Jr, 2002). عوامل رونویسی به فعال‌کننده‌های اطراف ژن یا نواحی راه انداز متصل می‌شوند و موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند. بسته به نوع عامل رونویسی بعد از اتصال عامل رونویسی بیان ژن کم یا زیاد می‌شود.

عوامل رونویسی مکانیسم‌های متفاوتی برای تنظیم بیان ژن دارند که این مکانیسم‌ها شامل موارد زیر می‌باشند:

۱) با اتصال یا عدم اتصال RNA پلیمراز به DNA (۲) استیله کردن یا داستیله کردن پروتئین‌های هیستونی: با استیله شدن پروتئین‌های هیستونی اتصالات DNA با پروتئین‌های هیستونی کم شده بنابراین DNA راحت‌تر در عرض RNA پلیمراز قرار می‌گیرد و این امر موجب افزایش بیان ژن مورد نظر می‌گردد، همچنین با داستیله کردن پروتئین‌های هیستونی موجب مستحکم‌تر شدن اتصالات هیستون‌ها به DNA می‌شود و این امر باعث می‌شود دسترسی RNA پلیمراز به DNA کاملتر شود و بیان ژن مورد نظر کاهش یابد. (۳) اتصال پروتئین‌های فعال‌کننده و بازدارنده به نواحی از DNA و اتصال این پروتئین‌ها به کمپلکس DNA عامل رونویسی که موجب تغییر روند رونویسی می‌شوند بدین صورت که پروتئین‌های فعال‌کننده موجب افزایش بیان و پروتئین‌های بازدارنده موجب کاهش بیان ژن مورد نظر می‌گردند (Xu et al., 1999).

### ۱-۳-۲- عوامل رونویسی WRKY

عوامل رونویسی WRKY از بزرگترین خانواده‌های تنظیم‌کننده رونویسی در گیاهان می‌باشند و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای زیستی شرکت می‌کنند. یافته‌های جدید نشان می‌دهد که پروتئین‌های مربوط به خانواده WRKY اغلب به عنوان فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌هایی در فرآیندهای مهم گیاهی شرکت می‌کنند. عوامل رونویسی WRKY یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های ژنی عوامل رونویسی می‌باشند که در تکامل سلسله گیاهی دچار مضاعف‌شدگی گسترده شده‌اند (Berri et al., 2009; Rushton et al., 2010). در حال حاضر مکانیسم‌های مربوط به تنظیم نسخه‌برداری در حال کشف شدن می‌باشند و عملکردهای مختلف این پروتئین‌ها و اثرات متقابل آنها با دیگر پروتئین‌ها مثل مپ‌کینازها، مپ‌کیناز کیناز، پروتئین‌های ۳-۳-۱۴،

کالمودولین، هیستون داستیلازها، پروتئین‌های مقاومت و دیگر عوامل رونویسی بررسی می‌شوند. ژن‌های مربوط به این خانواده ژنی خود تنظیمی و تنظیم متقابل گسترده‌ای را نشان می‌دهند که این امر رونویسی مجدد آنها را در شبکه‌های پویا فراهم می‌کند (Paul J. Rushton, 2010).

حدود ۱۵ سال از اولین گزارش مربوط به کشف عوامل رونویسی خانواده *WRKY* گذشته است و پیشرفت‌های اساسی از آن زمان تا بحال صورت گرفته است (Ishiguro and Nakamura, 1994); (Rushton et al., 1995). در دو گزارش اولیه مربوط به این مطالعات به طور مشخص روشن نشد که این پروتئین‌های متصل شونده به DNA نقش بالقوه‌ای را در تنظیم بیان ژن دارند یا اینکه این ژن‌ها در طی جوانه زنی بوسیله ساکارز تنظیم می‌شوند (Ishiguro and Nakamura, 1994). در سومین گزارش، ژن‌های *WRKY1*، *WRKY2* و *WRKY3* از گیاه جعفری کشف و به نام *WRKY* مشهور شدند (Rushton et al., 1995). عوامل رونویسی *WRKY* کلیدهای تنظیمی هستند که هم فعالیت‌های تنظیمی مثبت و هم فعالیت‌های تنظیمی منفی دارند (Eulgem and Somssich, 2007). خانواده ژنی *WRKY* یکی از ده خانواده بزرگ ژنی هستند که در گیاهان عالی و تمام اجداد سبز گیاهی کشف شده‌اند (Ulker and Somssich, 2004). این خانواده‌ی ژنی در طی تکامل گسترش پیدا کرده‌اند و احتمالاً همراه با توسعه و تکامل این خانواده‌ی ژنی، این ژن‌ها خود را با پیچیدگی‌های زیاد مکانیسم‌های دفاعی در برابر پاتوژن‌های گیاهی وفق داده‌اند (Eulgem et al., 2000). اخیراً دانشمندان بر نقش‌های دیگر عوامل رونویسی مثل جوانه زنی، پیری و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مثل تنش‌های سرما و خشکی متمرکز شده‌اند. ویژگی خاص عوامل رونویسی *WRKY* در اتصال به DNA وجود پهنه *WRKY* می‌باشد، این پهنه تقریباً