بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه خوارزمی

دانشکده علوم زیستی

رساله جهت اخذ درجه دکتری

زیست شناسی- فیزیولوژی گیاهی

عنوان:

ارزیابی فیزیولوژیکی و مطالعه ترانسکریپتوم گیاه نخود (*Cicer arientinum* L.) در واکنش به تنش خشکی انتهای فصل

استادان راهنما:

آقای دکتر رمضانعلی خاوری نژاد
آقای دکتر جواد مظفری

استادان مشاور:

خانم دکتر فرزانه نجفی
آقای دکتر فواد مرادی

دانشجو:

معصومه پوراسماعیل

زمستان ۱۳۹۱

تقدیم به تبسم سبز خدا.....پدر و مادرم

تقدیم به تبلور عینی اخلاص..... همسرم

تقدیم به تجسم باران احساس..... علیرضای عزیزم

چکیده

تنش خشکی یکی از چالش های اصلی تولید نخود بوده و بررسی واکنش ژنوتیپ های مختلف به تغییرات رطوبت و تعیین صفات مرتبط با تحمل خشکی یکی از اجزاء اصلی برنامه های اصلاحی این گیاه به شمار می رود. این پژوهش به منظور ارزیابی فیزیولوژیک و درک بهتر اساس مولکولی تحمل خشکی در گیاه نخود تیپ کابلی به اجرا در آمد. ابتدا واکنش ژنوتیپ های مختلف در مواجهه با شیب تنش خشکی اعمال شده از طریق سیستم آبیاری بارانی تک شاخه ای در مزرعه بررسی شد و ۶ ژنوتیپ متحمل براساس شاخص های مبتنی بر عملکرد انتخاب شدند. در مرحله بعدی ژنوتیپ های منتخب همراه با لاین های متحمل و حساس در شرایط کنترل شده کشت شدند و پس از گلدهی در معرض سه تیمار مختلف آبیاری مطلوب (۸۵-۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، تنش متوسط(۵۵-۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش شدید(۲۵-۳۰ درصد ظرفیت زراعی) قرار گرفتند. واکنش ژنوتیپ های مختلف نخود در مواجهه با تنش بسیار متنوع بود. مکانسیم فرار از خشکی یک از مکانسیم های دخیل در تحمل ژنوتیپ های نخود شناخته شد. همه ژنوتیپ ها مکانیسم اجتناب از طریق کاهش هدایت روزنه ای را نشان دادند اما حساسیت دستگاه روزنه ای ژنوتیپ حساس بیشتر از سایر ژنوتیپ ها بود. تعدیل اسمزی به عنوان مکانیسمی برای تحمل خشکی در گیاه نخود شناخته شد. پرولین و گلیسین بتائین به عنوان یک اسمولیت عام در همه ژنوتیپ ها در اثر تنش افزایش یافتند، درحالی که از نظرکربوهیدرات های محلول تنوع بسیاری در میان ژنوتیپ ها مشاهده شد. سطح پرولین در ژنوتیپ حساس بالاتر از بقیه ژنوتیپ ها بود بنابراین پرولین به عنوان یک نشانه از سطح تنش در گیاه نخود می تواند در نظر گرفته شود. آنالیزهای بیان ژن با استفاده از روش cDNA-AFLP برای شناسایی ژن های القاء شده در واکنش به خشکی، نشان داد که الاستیسیته بالاتر دیواره سلولی، بیان بالاتر ایزوفلاون ها، حفظ ساختار و عملکرد پروتئین ها توسط بیان بیشتر چپرون های میتوکندریایی، مرگ

سلولی برنامه ریزی شده و تحرک مجدد مواد غذایی از برگ ها به سمت دانه ها، درک بهتر و سریع تر تنش، ترارسانی علامت بهتر و در نتیجه آن تنظیم رونویسی و ترجمه از جمله مکانیسم هایی است که اختلاف بین ژنوتیپ های متحمل و حساس را با یکدیگر مشخص می سازند.

واژه های کلیدی: تنش خشکی، نخود کابلی، ترانسکریپتوم، شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، بیان ژن، cDNA-AFLP، RNA

فهرست مطالب صفحه

چکیده فارسی

فصل اول- مقدمه

۱-۱- تنش خشکی و اثرات آن بر گیاه ۱

۱-۲- استراتژی های گیاه در مواجهه با تنش خشکی ۳

۱-۳- مسیر پاسخ گیاه در مواجهه با تنش ۷

۱- ۴- معیارهای انتخاب ژنوتیپ متحمل ۱۲

۱-۴-۱- صفات آگرونومیکی موثر در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی ۱۴

۱-۴-۲- صفات فیزیولوژیکی موثر در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی ۱۵

۱-۴-۳- صفات مورفولوژیکی موثر در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی ۲۱

۱-۴-۴- جنبه‌های بیوشیمیایی موثر در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی ۲۴

۱-۴-۴-۱- تاثیر تنش خشکی بر پروفیل پروتئین ۲۴

۱-۴-۴-۲- تاثیر تنش خشکی بر سیستم آنتی اکسیدان ۲۶

۱-۴-۴-۳- ممانعت از پر اکسیداسیون لیپیدها ۳۳

۱-۴-۴-۴- تعدیل اسمزی و نقش اسمولیت ها ی مختلف در پاسخ تنش ۳۴

۱-۵- شناسایی و تعیین عمل ژن های مرتبط با تحمل تنش ۳۹

۱-۶- کاربرد تکنیک cDNA-AFLP برای انگشت نگاری mRNA ۴۱

۱-۷- مراحل روش cDNA -AFLP ۴۵

۱-۸- ضرورت انجام تحقیق ۴۹

۱-۹- اهداف پژوهش ۵۱

فصل دوم- مواد و روشها

۲-۱- آزمایش اول: ارزیابی مزرعه ای تحمل خشکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود ۵۲

۲-۱-۱- نحوه انجام کشت و اعمال تیمارهای تنش ۵۲

۲-۱-۲- نحوه ارزیابی و یادداشت برداری صفات ۵۵

۲-۱-۳- تعیین شاخص‌های مبتنی بر عملکرد ۵۶

۲-۱-۴- تعیین کارایی مصرف آب ژنوتیپ ها ۵۷

۲-۲- آزمایش دوم: بررسی پاسخ فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود در مواجهه با تنش خشکی ۵۷

۲-۲-۱- مواد گیاهی و شرایط آزمایش ۵۷

۲-۲-۲- نحوه اعمال تنش خشکی ۵۹

۲-۲-۳- ارزیابی صفات و یادداشت برداری‌ها ۶۰

۲-۳-آزمایش سوم: بررسی پاسخ بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود در مواجهه با تنش خشکی ۶۴

۲-۳-۱- مواد گیاهی و شرایط آزمایش ۶۴

۲-۳-۲- بررسی پروفیل پروتئین برگ ۶۴

۲-۳-۲-۱ -استخراج پروتئین ۶۴

فهرست مطالب صفحه

۲-۳-۲-۲ -اندازه گیری میزان پروتئین ۶۵
۲-۳-۲-۳- الکتروفورز SDS-PAGE ۶۶
۲-۳-۳- بررسی میزان پراکسیده شدن لیپیدها ۷۳
۲-۳-۴- سنجش آنزیم های آنتی اکسیدان ۷۵
۲-۳-۵- سنجش میزان پرولین ۷۹
۲-۳-۶- سنجش کربوهیدرات ها ۸۱
۲-۳-۷- سنجش میزان گلیسین بتائین ۸۳
۲-۴- آزمایش چهارم: مطالعه ترانسکریپتوم در ژنوتیپ های حساس و متحمل گیاه نخود در تنش خشکی
۲-۴-۱- مواد گیاهی و شرایط آزمایش ۸۵
۲-۴-۲- استخراج Total RNA ۸۵
۲-۴-۳- بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده ۸۶
۲-۴-۴- تیمار DNase برای دستیابی به total RNA فاقد DNA ۸۷
۲-۴-۵- تهیه First strand cDNA ۸۸
۲-۴-۶- تهیه Second strand cDNA ۸۸
۲-۴-۷- انجام تکنیک AFLP ۸۹
۲-۴-۸- بررسی توالی قطعات جدا شده از ژل با پایگاه اطلاعاتی ۹۸
۲-۵- آنالیزهای آماری ۹۹
فصل سوم- نتایج
۳- ۱- نتایج آرمایش اول: ارزیابی مزرعه ای تحمل خشکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود ۹۹
۳-۱-۱- مقایسه میانگین صفا ت زراعی بررسی شده در ژنوتیپ های مختلف ۹۹
۳-۱-۲- نتایج آمارتوصیفی ۱۱۲
۳-۱-۳- تجزیه همبستگی ۱۱۲
۳-۱-۴- رگرسیون گام به گام ۱۱۹
۳-۱-۵- تعیین درجه تحمل خشکی ژنوتیپ‌ها ۱۲۰
۳-۱-۶-گروه بندی نمونه‌ها براساس کارایی مصرف آب ۱۲۶
۳- ۲- نتایج آزمایش دوم: بررسی پاسخ فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود در مواجهه با تنش خشکی ۱۲۸
۳-۲-۱- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در ژنوتیپ های مختلف ۱۲۸
۳-۲-۱-۱- صفات اگرونومیک ۱۲۹
۳-۲-۱-۲- صفات فیزیولوژیک ۱۴۰
۳-۲-۲- همبستگی ساده صفات در تیمار های مختلف ۱۶۰
۳-۲-۳- نتایج مربوط به پارامترهای آمار توصیفی صفات مورد بررسی ۱۶۶

فهرست مطالب | صفحه

۳-۲-۴- بررسی نقش تعدیل اسمزی درتحمل خشکی در ژنوتیپ های مورد بررسی ۱۶۸
۳-۳- نتایج آزمایش سوم: بررسی پاسخ بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود در مواجهه با تنش خشکی ۱۷۰
۳-۳-۱- مقایسه تاثیر تنش خشکی بر صفات بیوشیمیایی مورد بررسی در ژنوتیپ‌های مختلف ۱۷۰
۳-۳-۲- تاثیر تنش خشکی بر پروفیل پروتئین در ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۱۸۷
۳-۴- نتایج آزمایش چهارم: شناسایی ژن های القاء شونده در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل گیاه نخود تحت تنش خشکی ۱۹۲
۳-۴-۱- تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ۱۹۲
۳-۴-۲- تعیین صحت واکنش ساخت cDNAی دو رشته‌ای ۱۹۳
۳-۴-۳- تایید واکنش مرحله پیش تکثیر ۱۹۳
۳-۴-۴- تکثیر انتخابی ۱۹۴
۳-۴-۵- نتایج تجزیه cDNA-AFLP ۱۹۶
۳-۴-۶- توالی یابی و شناسایی قطعات cDNA ۱۹۷
۳-۴-۷- گروه بندی قطعات مشتق از رونوشت بر اساس کارکرد پروتئین های کد شده ۲۲۹

فصل چهارم- بحث و تفسیر نتایج

۴-۱- ارزیابی مزرعه ای تحمل خشکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود ۲۲۹
۴-۱-۱- تاثیر تنش خشکی بر صفات آگرونومیکی مورد بررسی ۲۲۹
۴-۱-۲- تفسیر نتایج آمارتوصیفی ۲۳۲
۴-۱-۳- تفسیر نتایج مربوط به تجزیه همبستگی و رگرسیون گام به گام ۲۳۳
۴-۱-۴- تفسیر نتایج مربوط به شاخص های تحمل ۲۳۵
۴-۲- پاسخ فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های مختلف نخود در مواجهه با تنش خشکی ۲۳۶
۴-۲-۱- تفسیر نتایج مربوط به آمار توصیفی صفات مورد بررسی تحت تاثیر تنش خشکی ۲۳۶
۴-۲-۲- تفسیر نتایج مربوط به تاثیر تنش خشکی بر صفات آگرونومیکی مورد بررسی ۲۳۷
۴-۲-۳- تفسیر نتایج مربوط به نقش صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی در تحمل خشکی ژنوتیپ‌های نخود ۲۳۹
۴-۲-۴-تفسیر نتایج مربوط به مقایسه جداول همبستگی در سه تیمار مورد بررسی ۲۴۸
۴-۳- پاسخ بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود در مواجهه با تنش خشکی ۲۵۰
۴-۳-۱- تفسیر اثر خشکی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپید ۲۵۰
۴-۳-۲-تفسیر اثر خشکی بر محتوای اسمولیت ها ۲۵۳
۴-۳-۳- تفسیر اثر خشکی بر پروفیل پروتئین ها ۲۵۶
۴-۴- مطالعه ترانسکریپتوم ژنوتیپ‌های حساس و متحمل گیاه نخود تحت تنش خشکی ۲۶۰
۴-۴-۱- نقش ژن های احتمالی دخیل در پاسخ گیاه نخود به خشکی ۲۶۰
۴-۴-۱-۱- ژن های دخیل در متابولیسم ماکرومولکول ها ۲۶۰
۴-۴-۱-۲- ژن های دخیل در بیوسنتز پروتئین ها ۲۶۹

فهرست مطالب | صفحه

۴-۴-۱-۳- ژن های دخیل در فراهم سازی انرژی ۲۷۰
۴-۴-۱-۴- ژن های دخیل در نقل و انتقال سلولی ۲۷۱
۴-۴-۱-۵- ژن های دخیل در تقسیم سلولی ۲۷۳
۴-۴-۱-۶- ژن های دخیل در ترارسانی علامت ۲۷۴
۴-۴-۱-۷- ژن های دخیل در تنظیم رونویسی ۲۷۴
نتیجه گیری کلی ۲۷۶
پیشنهادات ۲۷۸
منابع مورد استفاده ۲۷۹
چکیده انگلیسی ۲۹۰

تشکر و قدرانی

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت...هر نفسی که فرو میرود ممد حیات است و چون بر می آید مفرح ذات...پس در هر نفس دو نعمت موجود است و بر هر نعمتی شکری واجب...

از دست و زبان که برآید کز عهده ی شکرش به در آید؟

خداوندا تو را سپاس که بر من منت نهاده توفیق قدم گذاشتن در راهی را عطا نمودی که برآیندش پی بردن به عظمت خلقت و ذات بی منتهای پروردگار عالمیان است و در این راه افتخار آشنایی با کسانی را بر من ارزانی داشتی که هریک سرچشمه نور و معرفت بوده و گذر از این گذرگاه را هموار نمودند. حال که توفیق اتمام این رساله به من داده شد برخود لازم می دانم از تمامی عزیزانی که مرا در راه انجام این مهم یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

از استاد ارجمند، جناب آقای دکتر رمضانعلی خاوری نژاد که از مساعدت های بی دریغ و راهنمایی های ارزنده شان در دوران تحصیل مقاطع کارشناسی ارشد و دکتری بهره مند بوده و همواره شاگردی ایشان یکی از با ارزش ترین افتخارات زندگی من به شمار می رود، تشکر می نمایم.

از استاد ارجمند، جناب آقای دکتر جواد مظفری که بر من منت گذاشته و راهنمایی این رساله را پذیرفتند و انجام این رساله مرهون زحمات بی دریغ ایشان است کمال تشکر را دارم.

از اساتید گرامی سرکار خانم دکتر فرزانه نجفی و جناب آقای دکتر فواد مرادی که در تمامی مراحل انجام تحقیق راهنمایی های ارزنده شان راهگشای بنده بوده و موجبات پیشرفت این تحقیق را فراهم نمودند سپاسگزارم. از اساتید گرامی جناب آقای دکتر قهرمان نژاد، جناب آقای دکتر آئریان، سرکار خانم دکتر سلطانی و جناب آقای دکتر مستوفی که زحمت داوری این رساله را عهده دار بودند تشکر

می کنم. از جناب آقای دکترمهدی اکبری و موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی به پاس مساعدت و پیاده سازی سیستم آبیاری کمال تشکر را دارم.

از دوستان بسیار عزیزم، خانم ها شکیبا شاهمرادی، ویدا قطبی، صنم صفایی، فهیمه جامی، مریم تاتاری، دکتر لیلا مسلم خانی، دکتر راحله رهباریان، دکتراکرم اسدی و دکترحلیمه حسن پور به پاس همفکری ها و مساعدت های بی دریغشان متشکرم. از کلیه همکارانم در بانک ژن گیاهی ملی ایران، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر و تمامی عزیزانی که به نحوی اینجانب را در اجرای این رساله همراهی و کمک نموده اند تشکر می نمایم.

در پایان از پدر و مادر عزیزم، همسر فداکارم و پسر نازنینم به دلیل تمامی زحماتی که در طی مراحل تحصیل بنده بر دوش آنها سنگینی نموده عذرخواهی و قدردانی می نمایم و این رساله را به آنها تقدیم می کنم که زیستن معنای حضور آنها است.

معصومه پوراسماعیل
زمستان ۱۳۹۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تنش خشکی و اثرات آن بر گیاه

خشکی به صورت دوره زمانی که در طول آن کمبود آب، رشد و عملکرد محصول را تحت تاثیر قرار می دهد تعریف می شود. چنین کمبود رطوبتی ممکن است از طریق کاهش میزان آب در دسترس یا از طریق افزایش تقاضا حاصل شود. خشکسالی و تنش ناشی از آن مهم ترین و رایج ترین تنش‌های محیطی است که تولیدات کشاورزی را با محدودیت مواجه ساخته و بازده استفاده از مناطق خشک را کاهش می دهد. خشکی مشکل عمده زراعت دیم در جهان است. کشاورزی در زمین‌های حاشیه ای در نواحی بیابانی و نیمه بیابانی به بارندگی وابسته است. شدت و دوره زمانی که این مناطق با خشکی روبرو می شوند در طول زمان و بین نواحی آب و هوایی متفاوت متغیر است. مناطق بیابانی و نیمه بیابانی در معرض تنش خشکی حدود ۶ بیلیون هکتار از زمین‌ها را تشکیل می دهند. از حدود ۱۴۷۴ میلیون هکتار اراضی کشاورزی در سرتا سر جهان، ۱۲۴۷ میلیون هکتار را اراضی دیم تشکیل می دهند، بنابراین حدود ۸۴٪ زمین‌های زراعی جهان را اراضی دیم تشکیل می دهند (Kumar, ۲۰۰۵).

خشکی عملکرد محصولات زراعی را از طریق ممانعت از بروز پتانسیل ژنتیکی کامل آنها محدود می کند. اثرات خشکی روی گیاهان پیچیده و متغیر است و به وسیله فاکتورهای دیگر بیش تر تشدید می شود. بیان علائم و نشانه‌های القاء شده با خشکی ظاهرا غیر قابل پیش بینی است. زیرا این علائم به اثرات گرما، بیماریها، آفات و کمبودهای تغذیه ای شباهت دارند. اثرات خشکی بر روی یک گیاه به وسیله نوع خاک، الگوی ریشه دهی، تراکم گیاه و پاتوژن‌های ریشه تحت تاثیر قرار می گیرد (Boyer, ۱۹۹۶). الگوی ریزش باران و پراکنش آن، شدت باد، میزان تبخیر، گونه گیاه و مرحله رشدی گیاه نیز از جمله عوامل موثر بر شدت اثرات القاء شده با خشکی می باشند (Werry *et al.*, ۱۹۹۴).

تنش خشکی موجب ایجاد صدمه به فیزیولوژی سلول و تخریب عملکرد متابولیکی می شود. برداشت آب از غشاها ساختمان غشا دو لایه ای را تخریب کرده و موجب ایجاد خلل و فرج در غشاء می شود. بعلاوه،

موجب تغییر مکان پروتئین های غشاء و در نتیجه از بین رفتن تمامیت غشاء و انتخاب پذیری آن و موجب تخریب کده های سلولی و از بین رفتن فعالیت آنزیم ها می شود. علاوه بر صدمات غشایی پروتئین های سیتوزولی و اندامک ها ممکن است فعالیت شان کاهش یافته و یا حتی دناتوره شوند. غلظت بالای الکترولیت های سلولی به واسطه دهیدراتاسیون پروتوپلاسم موجب تخریب متابولیسم سلولی شود(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵). دهیدراتاسیون موجب کاهش حجم سلول و افزایش ویسکوزیته محتوای سلولی شده و لذا امکان برهم کنش پروتئین- پروتئین را افزایش داده و موجب انباشتگی و دناتوره شدن آنها می شود. در نتیجه تنش خشکی تغییرات زیادی در سلول رخ می دهد، از جمله تغییر سطح بیان ژن های LEA و دهیدرین ها، سنتز چپرون های مولکولی که مانع تخریب پروتئین های همراهشان می شوند، فعال سازی آنزیم های دخیل در حفاظت و برداشتROS ها و پروتئینازهایی که عملشان برداشت پروتئین های دناتوره شده و آسیب دیده است(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵).

اثرات فیزیولوژیکی دیگر تنش خشکی روی گیاه کاهش رشد رویشی خصوصا رشد بخش هوایی است. کاهش فعالیت کینازهای وابسته به سایکلین موجب کند تر شدن تقسیم سلول ها و ممانعت از رشد می شود. کاهش رشد یک مزیت غیر مستقیم برای گیاه محسوب می شود. رشد برگ معمولا حساس تر از رشد ریشه است. کاهش توسعه برگ از طریق کاهش تعرق برای گیاه سودمند است. برخی از گیاهان از جمله پنبه در مواجهه با تنش پیری و ریزش برگ های مسن را تسریع می کنند. این پدیده تحت عنوان تعدیل سطح برگ مطرح است اما در مورد ریشه برعکس است و رشد نسبی ریشه افزایش می یابد که ظرفیت سیستم ریشه ای را برای استخراج آب بیشتر از لایه های عمیق تر خاک فراهم می کند(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵).

بسته شدن روزنه در پاسخ به تنش خشکی یکی دیگر از اثرات تنش بر روی گیاه است. این پدیده در آغاز موجب کاهش سرعت فتوسنتز می شود. تنش های خشکی شدید از طریق کاهش فعالیت Rubisco

موجب محدودشدن فتوسنتز می شود. به علاوه در شرایط تنش فعالیت زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی نیز به وسیله محدودیت دسترسی CO_2 در گیاه و فتوسیستم II کاهش می یابد. از آنجایی که کارایی فتوشیمیایی پس از قرار دادن برگ های گیاه در محیط غنی از CO_2 به حالت نرمال برمی گردد، لذا کاهش سرعت فتوسنتز در تنش در آغاز به دلیل کمبود غلظت CO_2 داخلی می باشد. کاهش زیاد CO_2 درون سلولی موجب می شود که الکترون ها در زنجیره انتقال الکترون در اختیار O_2 قرار گیرند که موجب ایجاد ROSها می شود(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵).

۱-۲- استراتژی های گیاه در مواجهه با تنش خشکی

به طور کلی خشکی کاهش قابلیت دسترسی آب در خاک است که به صورت کاهش پتانسیل شیمیایی آب تعریف شده و حرکت آب بین سیستم گیاه و خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کاهش پتانسیل آب یا به عبارتی کاهش انرژی آزاد آب جذب آب توسط گیاه را مشکل می‌سازد و در این زمان گیاه پاسخ‌هایی را از خود بروز می‌دهد که به گیاه کمک می کنند تا از کمبود آب اجتناب کرده و با وجود کاهش پتانسیل آب به جذب آب از خاک ادامه دهد و یا کاهش محتوای آب بافت را تحمل کند (Verslues *et al.*, ۲۰۰۶). لذا وقتی که گیاه با تنش خشکی مواجه می‌شود، یکی از سه استراتژی فرار، اجتناب یا تحمل را می‌تواند در پیش بگیرد:

۱) فرار از خشکی:

فرار یک پدیده فنولوژیکی است که به وسیله بلوغ زودرس به انجام می‌رسد و به موجب آن گیاه می‌تواند یا چرخه زندگی اش را در فصل مرطوب و قبل از مواجه شدن با خشکی به اتمام برساند و یا در زمان کافی بودن رطوبت خاک تولیدمثل کند.

۲) اجتناب از خشکی

در اغلب موارد پاسخ اولیه گیاه اجتناب از پتانسیل آبی پایین است . اجتناب یک سازش فیزیولوژیکی است و حالتی است که گیاه با به حداکثر رساندن جذب آب و به حداقل رساندن اتلاف آب با خشکی

مقابله می‌کند و مکانیسم اصلی آن تجمع مواد محلول و سخت شدن دیواره سلول است . جریان آب بین درون و برون سلول گیاهی بستگی به گرادیان پتانسیل آبی بین سلول و محیط اطرافش دارد و برای جذب آب توسط سلول باید آن سلول پتانسیل آبی پایین‌تری نسبت به منبع آب داشته باشد. تجمع مواد محلول اضافی در پاسخ به پتانسیل آبی پایین تعدیل اسمزی نام دارد. تعدیل اسمزی به تجمع فعال مواد محلول در پاسخ به پتانسیل‌های آبی پایین گفته می‌شود. تعدیل اسمزی با تجمع مواد محلول سازگار صورت می‌پذیرد و یک فاکتور مهم در تحمل خشکی است و مهندسی افزایش سنتز محلول‌های سازگار کننده یک رویکرد برای افزایش تحمل تنش های غیر زنده در گیاهان است. تنها مشکل موجود در این رابطه این است که تجمع افزایش یافته محلول‌های سازگار می‌تواند باعث افزایش مصرف انرژی گیاه شود و در مواقعی که تنش شدید باشد و محتوای آب خاک خیلی کاهش یافته باشد اثر کمی در جذب آب دارد(Verslues *et al.*, ۲۰۰۶).

در خصوص تنش‌های آبی متوسط و یا تنش آبی با دوره زمانی محدود تر، مکانیسم‌های اجتناب به تنهایی برا ی حفظ عملکرد گیاه کافی هستند، در چنین شرایط تغییراتی نظیر افزایش رشد ریشه و کاهش هدایت روزنه‌ای موجب افزایش عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند. این واکنش به دلیل کاهش جذب CO_2 توسط روزنه ها موجب کاهش فتوسنتز و تغییر جهت مصرف منابع به رشد ریشه به جای تخصیص به رشد بافت‌های تولید مثلی و فتوسنتز می‌باشد. تغییر در رشد ریشه برای به حداکثر رساندن جذب آب از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. اما با افزایش شدت تنش و یا افزایش دوره زمانی تاثیر گذاری آن، مکانیسم‌های اجتناب ذکر شده به تنهایی نمی‌توانند در حفظ تعادل میان جذب آب و از دست دادن آن به گیاه کمک کنند و لذا در این شرایط مکانیسم‌های دیگری برای حفظ عملکرد گیاه مورد نیاز است (Verslues *et al.*, ۲۰۰۶).

۳) تحمل خشکی

با افزایش شدت کاهش میزان پتانسیل آبی گیاه ، اجتناب از دهیدراتاسیون برای گیاه مشکل بوده و در این حالت مکانیسم‌های تحمل اهمیت پیدا می‌کنند. بنابراین تحمل ، توانایی یک گیاه برای حفظ اعمال طبیعی اش حتی با وجود پتانسیل آب بافت پایین می‌باشد در این حالت گیاه با کاهش محتوای آب محیط به رشد خود ادامه می‌دهد و صدمات ناشی از خشکی را می‌تواند تحمل کند. یک مثال بسیار واضح از تحمل دهیدراتاسیون در گیاهان متحمل، ورود گیاه به یک مرحله خفتگی متابولیکی با دهیدراته شدن است که بسیار شبیه به خفتگی دانه می‌باشد. در سطح مولکولی خفتگی بذر، تحمل یخ زدگی، خفتگی مرحله رویشی در گیاهان متحمل و پاسخ‌های دهیدراتاسیون در گونه‌هایی که تحمل کمتری دارند بسیار شبیه است . اگرچه اغلب مزوفیت‌ها (از جمله گیاهان زراعی) دارای توانایی ورود به فاز خفتگی نیستند تا بتوانند به صورت کامل خشک شدگی(desication) را تحمل کنند و بنابراین نمی‌توانند وضعیتی که در آن ۵۰ درصد و یا کمی بیشتر از ۵۰ درصد از محتوای آب شان را از دست می‌دهند به حالت طبیعی برگردند، اما این گیاهان درجات کمتری از فقدان آب را تحمل می‌کنند در حالی که فعالیت‌های متابولیکی شان را حفظ می‌کنند(Verslues *et al.*, ۲۰۰۶).

اغلب مکانیسم‌های تحمل دهیدراتاسیون مطالعه شده تا به امروز اساسا به حفظ ساختمان سلولی از اثرات سوء دهیدراتاسیون کمک می‌کنند. اغلب پروتئین‌های حفاظتی نظیر دهیدرین‌ها،پروتئین‌های LEA(Late Embryogenesis Abundant)در پاسخ به کاهش محتوای آب تجمع می‌یابند. اگرچه عمل بسیاری از این پروتئین‌ها شناخته نشده است اما آنها به عنوان چپرون برای حفظ پروتئین‌ها و ساختمان عمل می کنند (Ennajeh *et al.*, ۲۰۰۹). محلول‌های سازگارکننده نیز از ساختمان غشاءو پروتئین‌ها محافظت می‌کنند و جنبه دیگر تحمل دهیدراتاسیون، کنترل سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا محدود نمودن صدمات حاصله از آنها است (Verslues *et al.*, ۲۰۰۶).

اگرچه از زمانی که لویت (Levitt, ۱۹۷۲) اصطلاح اجتناب و تحمل پتانسیل آبی پایین را بیان نمود ، دانش ما از مکانیسم‌ها و حوادث مولکولی و سلولی گیاه در معرض پتانسیل آبی پایین بیشتر شده است اما برخی از حوادث مولکولی آغاز شده به وسیله پتانسیل آبی پایین مشخصا و مطلقا در هیچ یک از این دو دسته به تنهایی قرار نمی‌گیرند. به عنوان مثال تجمع محلول‌های سازگار کننده نظیر پرولین که از طریق افزایش محتوای محلول سلول و بنابراین حفظ محتوای آب بالاتر در اجتناب از دهیدراتاسیون نقش دارد، در زمان مشابه تجمع آن از طریق حفاظت پروتئین‌ها و ساختمان غشاء و تنظیم حالت ردوکس و یا عمل به عنوان جاروب کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در تحمل دهیدراتاسیون نقش دارد. به همین شکل، پروتئین های دهیدرین علاوه بر نقشی که در حفظ ساختمان سلولی(تحمل دهیدراتاسیون) دارند، می‌توانند به عنوان پروتئین‌های هیدروفیل عمل کرده ، به آب متصل می‌شوند و بنابراین در حفظ آب (اجتناب از دهیدراتاسیون) نقش دارند(Verslues *et al.*, ۲۰۰۶).

با در نظر گرفتن اعمال تداخلی (overlap)پاسخ‌های گیاه در مواجهه با پتانسیل آبی پایین، این مسئله شگفت آور نیست که این پاسخ‌ها به وسیله شبکه تنظیم کننده پیچیده‌ای کنترل شوند. این شبکه هم به محرک‌های خارجی نظیر کاهش تورگر یا کاهش محتوای آب و محرک‌های داخلی نظیر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و هورمون‌ها پاسخ می‌دهند. تعریف لغوی اجتناب و تحمل نخستین بار در سال ۱۹۷۲ توسط لویت (Levitt, ۱۹۷۲) ارائه شد. بر اساس نظر لویت، در پتانسیل آبی پایین اجتناب از تنش موجب تعادل بین جذب آب و از دست دادن آن می شود به عبارتی تنش در خارج بافت گیاهی حفظ می شود. اگر بافت گیاهی کاهش پتانسیل آب را تجربه کند تنش داخلی شده و پاسخ هایی اتفاق می افتد که علی رغم کاهش پتانسیل آب بافت موجب حفظ محتوای آب آن(اجتناب از دهیدراتاسیون) یا تحمل محتوای آب کاهش یافته(تحمل دهیدراتاسیون) می شود.

متاسفانه هر سه استراتژی فرار، اجتناب و تحمل دارای معایبی هستند. ژنوتیپی که دوره رشد کوتاهی دارد معمولا دارای محصول کم تری نسبت به ژنوتیپ دیگری با دوره رشد معمولی می‌باشد. مکانیزم‌هایی که باعث تحمل به خشکی از طریق کاهش هدررفتن آب می‌شوند (مانند بسته شدن روزنه‌ها و کاهش سطح برگ) معمولا منجر به کاهش جذب دی اکسید کربن می گردند. تنظیم اسمزی با حفظ آماس گیاه، تحمل به خشکی را افزایش می‌دهد اما افزایش غلظت مواد محلول که تنظیم اسمزی را موجب می‌شود می تواند علاوه بر انرژی لازم برای تنظیم اسمزی اثرات نامطلوبی نیز درپی داشته باشد. درنتیجه، سازگاری گیاه باید ضمن حفظ تولید محصول مناسب، منعکس کننده تعادل میان فرار، اجتناب و تحمل به خشکی باشد.

۱-۳- مسیر پاسخ گیاه در مواجهه با تنش

۱-۳-۱- درک سلولی تنش:

پاسخ به تنش خشکی با درک تنش توسط گیاه آغاز می‌شود، که سپس موجب فعال سازی مسیرهای ترارسانی پیام برای انتقال اطلاعات به درون یک سلول خاص و یا سرتاسر گیاه می‌شود و هم زمان با آن تغییرات در بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد و پاسخ‌های سازشی گیاه، مشتمل بر سازش‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای تغییر رشد و نمو اتفاق می‌افتد(Wang and Bughrara, ۲۰۰۷). در این مرحله یک پیام فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی تبدیل می شود. مکانیسم های شناسایی و درک تنش شامل کاهش یا از دست رفتن تورگر، تغییر در حجم سلول یا سطح غشاء، از دست رفتن کشش غشاء، تغییر در محتوای محلول ها، تغییر در ارتباط دیواره با غشاء و یا برهم کنش های پروتئین با لیگاند است(Bray, ۱۹۹۷).

۱-۳-۲- مسیر ترارسانی پیام تنش

پس از درک تنش به وسیله گیرنده‌های موجود در غشای سلول گیاهی، این علامت سپس حوادث پایین دستی را راه اندازی می کند. در ابتدا موجب فعال سازی فسفولیپاز C و هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ۴

و ۵ دی فسفات و ایجاد اینوزیتول تری فسفات و دی ایسیل گلیسرول می شود (Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵). از طرف دیگر به دنبال تنش سطوح کلسیم درون سیتوزولی، از طریق حرکت یون های کلسیم از آپوپلاست و یا از طریق رها شدن منابع کلسیم درون سلولی به وسیله پیامبرهای ثانویه نظیر اینوزیتول فسفات ها وROS ها، افزایش پیدا می کند. تغییر سطح کلسیم درون سلولی به وسیله پروتئین های متصل شونده به کلسیم(حس گرهای کلسیم) درک می شود. این حس گرها هیچ نوع فعالیت آنزیمی ندارند و تنها آرایش فضایی شان با تغییر غلظت کلسیم تغییر می کند. تغییر آرایش فضایی این حس گرها موجب می شود تا آنها با پروتئین های دیگری از جمله ترکیبات پیام رسان پایین دست نظیر کینازها و فسفاتازها برهم کنش داشته باشند. آبشارهای فسفریلاسیون راه اندازی شده توسط این حس گرها، ژن های پاسخ دهنده به تنش یا فاکتورهای رونویسی کنترل کننده این ژن ها را مورد هدف قرار می دهند. فرآورده های این ژن های القاء شده با تنش سرانجام پاسخ های فیزیولوژیکی را راه اندازی می کنندکه موجب سازش گیاه شده و به زنده ماندن گیاه و فائق آمدن بر شرایط نامساعد کمک می کنند. بنابراین در پاسخ گیاه به تنش هم پاسخ تک تک سلول ها و هم پاسخ سینرژیدی کل گیاه اهمیت پیدا می کند(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵).

بعلاوه، تنش ها موجب تغییر بیان ژن و ایجاد هورمون هایی نظیر ABA، سالیسیلیک اسید و اتیلن می شوند که ممکن است پیام های اولیه را تکثیر نموده و دور دومی از ترارسانی را آغاز کنند. مولکول های کمکی دیگری هم از طریق تغییر یا آرایش مجدد ترکیبات ترارسانی ممکن است در ترارسانی نقش داشته باشند.ترارسانی تنش خشکی(شکل ۱-۱)، سه پارامتر ایجاد تعادل یونی و اسمزی مجدد برای حفظ هوموستازی سلول،کنترل و ترمیم صدمات ناشی از تنش از طریق سیگنال های سمیت زدایی و ترارسانی برای متناسب و موزون ساختن تقسیم سلول برای برطرف نمودن نیازهای گیاه تحت تنش را شامل می شود(Mahajan and Tuteja, ۲۰۰۵).