پردیس ارس

گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ی بیوتکنولوژی کشاورزی

گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی

عنوان

انتقال ژن AVP1 به گوجه فرنگی

استاد راهنما

دکتر ابراهیم دورانی علیایی

استاد مشاور

دکتر مصطفی ولی زاده

پژوهشگر

صنم شعرباف کلاقیچی

تابستان ۹۳

بسم الله الرحمن الرحيم

نام خانوادگی دانشجو: شعرباف کلاقیچی
نام : صنم

عنوان پایان نامه :انتقال ژن AVP1 به گوجه فرنگی

استادان راهنما : **دکتر** ابراهیم دورانی علیایی
استادان مشاور : دکتر مصطفی ولی زاده

مقطع تحصیلی : کارشناسی ارشد رشته: مهندسی کشاورزی گرایش : بیو تکنولوژی دانشگاه : پردیس ارس
دانشکده : کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی :تعداد صفحه :

کلید واژه ها : انتقال ژن، گوجه فرنگی، ترا ریخته، avp1، اگروباکتریوم، تحمل به شوری

چکیده :

تنش شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی محسوب شده و از عواملی است که گیاهان را از رسیدن به حاکثر پتانسیل ژنتیکی خود باز می‌دارد. با توجه به افزایش جمعیت و اهمیت امنیت غذایی، پژوهشگران برای غلبه بر این مشکل روش‌های مختلف زراعی و ژنتیکی را به کار گرفته‌اند. یکی از روش‌های کارآمد که اخیرا نیز مورد توجه قرار گرفته است، انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخته متحمل به شوری است. ژن AVP_1 یکی از ژنهایی است که انتقال آن به گیاهانی نظیر توتون، یونجه، برنج و گندم باعث افزایش تحمل این گیاهان به شوری وخشکی گردیده است. گوجه فرنگی، گیاهی است که از جنبه‌های غذایی، اقتصادی و علمی از اهمیت بالایی برخوردار است. گوجه فرنگی در مناطق خشک و نیمه خشک کشورمان کشت می‌گردد. هدف از این تحقیق انتقال ژن پیروفسفاتاز واکوئلی آرابیدوپسیس به گوجه فرنگی رقم ارومیه کم رنگ با استفاده از پلاسمید دوگانه pPZP و از طریق آگروباکتریوم GV3101، در جهت افزایش تحمل آن به شوری است. برای انتقال ژن به این به این رقم از دو نوع ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیلدون، OD_{600} دو دهم، چهار دهم و یک ، استفاده گردید. بهترین باززایی با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون، OD_{600} چهار دهم صورت گرفت. ریزنمونه‌های پیش کشت شده با باکتری تلقیح می‌شوند و در محیط باززایی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین قرار داده می‌شوند. گزینش ریزنمونه‌ها در حضور ۲۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون برای تراریختی گوجه‌فرنگی بهتر از هیپوکوتیلدون بود. برای شاخه‌زایی از ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BAP و برای ریشه زایی از ۲ میلی گرم بر لیتر IBA استفاده گردید. در این آزمایش ۲۵ گیاه تا مرحله ساقه‌دهی تولید شد و ۱۲ گیاه ریشه‌دار شدند. از گیاهان تراریخته احتمالی بعد از ریشه‌زایی، DNA استخراج شده با استفاده از آغازگر ژن پیروفسفاتاز واکوئلی ، تکثیر ژن انتقالی با روش PCR انجام می‌گیرد. در نتیجه PCR ثابت شد که گیاهان تراریخته هستند. گیاهان ریشه‌دار شده برای گلدهی تحت مراقبتهای ویژه در گلخانه قرار گرفتند تا بذردهی صورت گیرد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱-اهمیت گیاهان تراریخته در کشاورزی..... ۴

۱-۲- اهمیت زراعی و غذایی گوجه فرنگی ۴

۱-۳- گیاهشناسی گوجه فرنگی..... ۵

۱-۴- تنش‌های غیر زیستی در گیاهان..... ۶

۱-۵- تنش شوری و خشکی درگیاه ۶

۱-۶- شوری و مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاهان ۸

۱-۶- ۱- نقش آبسیزیک اسید و فاکتورهای رونویسی در تحمل به شوری..... ۹

۱-۶-۲- پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن..... ۱۰

۱-۶-۳-نقش ترکیبات آنتی اکسیدان در تنش شوری ۱۰

۱-۶-۴- نقش ترکیبات اسمز نگه‌داردر تنش شوری..... ۱۲

۱-۶-۵- خارج سازی یونهای سدیم از سیتوپلاسم..... ۱۴

۱-۷- روشهای مقابله با تنش شوری..... ۱۶

۱-۷-۱- روشهای غیرزیستی..... ۱۶

۱-۷-۲-اصلاح گیاهان برای تحمل به شوری ۱۶

۱-۷-۲-۱- انتخاب و اصلاح گیاهان به شوری به روش کلاسیک ۱۶
۱-۷-۲- ۲- استفاده فن‌آوری گیاهان تراریخته در اصلاح گیاهان برای تحمل به شوری ۱۷
۱-۸- مهندسی پمپ‌های یونی در گیاهان برای افزایش تحمل به شوری ۱۸
۱-۹- انتقال ژن گیاهان ۲۲
۱-۹-۱- روشهای کلاسیک انتقال ژن به گیاهان ۲۳
۱-۹-۱-۱- انتقال ژن از طریق هیبریداسیون ۲۳
۱-۹-۱-۲- امتزاج سلول ۲۳
۱-۹-۲- روشهای مدرن انتقال ژن به گیاهان ۲۴
۱-۹-۲-۱- روشهای فیزیکی انتقال ژن ۲۴
۱-۹-۲-۱-۱- انتقال ژن به وسیله جریان الکتریسته ۲۴
۱-۹-۲-۱- ۲- جذب مستقیم DNA ۲۴
۱-۹-۲-۱-۳-تفنگ ژنی ۲۵
۱-۹-۲-۱-۴-ریز تزریقی ۲۶
۱-۹-۲-۲- روش‌های شمیایی انتقال ژن به گیاهان ۲۶
۱-۹-۲-۲-۱- انتقال ژن با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۲۶
۱-۹-۲-۲-۲- کلسیم فسفات ۲۷
۱-۹-۲-۲-۳- الحاق لیپوزوم ۲۷
۱-۹-۲-۳-روشهای زیستی انتقال ژن به گیاهان ۲۸
۱-۱۰- کشت بافت گوجه فرنگی ۳۰
۱-۱۱- عوامل موثر در تراریخته سازی گوجه فرنگی ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد گیاهی ۳۳

۲-۲- باکتری‌ها و پلاسیدها ۳۳

۲-۳-تهیه محیط کشت مایعLB ۳۳

۲-۴- تهیه محیط کشت جامد (LB Agar) ۳۳

۲-۵- تهیه و محیط ذخیره باکتری‌ها ۳۴

۲-۶- تکثیر پلاسمید ۳۴

۲-۷-تهیه باکتری‌های مستعد و تراریخت آن ۳۴

۲-۸- استخراج پلاسمید ازE.coli تراریخته ۳۶

۲-۸-۱- تهیه محلولهای مورد نیاز برای استخراج پلاسمید ۳۶

۲-۸-۲-مراحل استخراج پلاسمید ۳۷

۲-۹- تهیه ژل آگاروز و الکتروفورز پلاسمید برای مشاهده آن ۳۸

۲-۱۰- انتقال پلاسمید حاوی ژن به آگروباکتریوم ۳۹

۲-۱۰-۱- تهیه سلولهای مستعد آگروباکتریوم ۳۹

۲-۱۰-۲- انتقال DNA (پلاسمید مورد نظر) به داخل آگروباکتریوم ۳۹

۲-۱۱- استخراج پلاسمید از آگروباکتریوم ۴۰

۲-۱۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پلاسمید نوترکیب ۴۱

۲-۱۳- تراریخت گوجه فرنگی با ژن به وسیله آگروباکتریوم تومفشینس ۴۲

۲-۱۳-۱-ضد عفونی سطحی بذر ۴۲

۲-۱۳-۲- تهیه ریزنمونه‌های استریل و پیش کشت آنها ۴۲

۲-۱۳-۳- تعیین بهترین ترکیب هورمونی مناسب جهت تراریزش ۴۳
۲-۱۳-۴- آماده سازی کشت باکتریایی جهت هم‌کشتی..... ۴۳
۲-۱۳-۵- تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیلدون با باکتری..... ۴۴
۲-۱۳-۶- گزینش ریزنمونه‌های تراریخته احتمالی ۴۴
۲-۱۵- انتقال گیاهان تراریخته تراریخته احتمالی به خاک..... ۴۶
۲-۱۶- بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی ۴۶
۲-۱۶-۱- استخراج DNA ژنومی از برگ گیاهان تراریخته احتمالی ۴۶
۲-۱۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۷

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- کشت بذور و به دست آوردن ریزنمونه‌های استریل ۴۹
۳-۳- هورمون‌های مناسب جهت باززایی..... ۵۰
۳-۴- واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از پرایمر ژن AVP_1 برای تایید حضور این ژن در پلاسمید Ppzp ۵۱
۳-۵- تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیلدون با آگروباکتریوم ۵۲
۳-۵-۱- غلظت سلولهای آگروباکتریوم ۵۲
۳-۵-۲- مدت زمان تلقیح آگروباکتریوم با ریزنمونه‌ها ۵۳
۳-۵-۴- باززایی گیاهان تراریخته حامل ژنAVP_1 ..... ۵۴
۳-۵-۵- ساقه‌زایی و ریشه‌زایی گیاهان تراریخته احتمالی ۵۵
۳-۵-۶- سازگار کردن گیاهان تراریخته به شرایط خارج شیشه ۵۶
۳-۵-۷- انتقال به گلخانه جهت بذرگیری..... ۵۷

۳-۵-۸- بررسی مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی ۵۷

۳-۹- نتیجه‌گیری کلی ۵۸

پیشنهادها ۵۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- نتایج حاصله از تیمارهای هورمونی مورد استفاده جهت باززایی ریز نمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل..... **۵۰**

جدول ۳-۲- نتایج حاصل از بارزایی ریز نمونه ها در محیط انتخابی حاوی کاناماسین و سفوتاکسیم بعد از یک ماه ۵۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ نحوه فعالیت پمپ هیدروژنی پیروفسفاتز واکوئلی (AVP1) و پمپ Na^+/H^+ ۲۰

شکل(۲-۱) مراحل تراریزش گوجه فرنگی با ژن AVP_1 ..... ۴۵

شکل ۳-۱- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پلاسمید نوترکیب حامل ژن AVP_1 ..... ۵۲

شکل ۳-۲ – تراریزش گوجه فرنگی با ژن AVP1 ..... ۵۴

شکل(۳-۴) القاء ریشه زایی از گیاهان تراریخته احتمالی و ادامه رشد آنها در محیط حاوی ۲۵ میلیگرم در لیتر کانامایسین ۵۶

شکل (۳-۵) انتقال گیاه به خاک در گلخانه و سازگاری آن با محیط خارج ۵۶

شکل(۳-۶) نتایج حاصل ازPCRگیاهان تراریخته حاصل از جدا کشت‌های کوتیلدونی با آغازگر اختصاصی ژن AVP1 ..... ۵۷

شکل ۳- ۳رشد طولی شاخساره‌ها و تولید ساقه اصل از آنها در محیط محتوی BAP ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، کانامایسین ۲۵ گرم در لیتر ۵۵

مقدمه

گوجه فرنگی با نام*Laycopersicon esculentum Mill*متعلق به خانواده سولاناسه است (بیدریغ ۱۳۷۸). گوجه فرنگی محصولی مهم در جهان است که نسبت به سطح متوسط نمک در خاک حساس است. کاهش تعداد میوه در هر بوته آن در شوری خاک با هدایت الکتریکی حدود ۹دسی زیمینس بر متر مربع کاهش یافته است. اگر چه دیگر گیاهان خانواده سولاناسه نسبت به شوری تحمل بالاتری دارند ولی انتقال ژنهای جدید از گونهای وحشی به والدین زراعی از طریق روشهای کلاسیک بسیارمشکل است (ویی و همکاران ۲۰۱۲).

تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی، شوری، دماهای بالا و پایین تهدیدی جدی در کشاورزی به حساب می‌آیند. این تنشها منجر به یک سری تغییرات مورفولوژیی، بیولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شوند که اثرات نامطلوب بر رشد و عملکرد گیاه می‌گذارند. کنبود آب و شوری جز عوامل اصلی در کاهش عملکرد اکثر گیاهان زراعی است(پاساپولا و همکاران ۲۰۱۱). تخمین زده می شود ۲۰٪ زمین‌های آبی جهان با رشد تصاعدی شوری خاک مواجه هستند واین عاملی محدود کننده برای کشاورزی در بسیاری از گونه‌های زراعی می‌باشد. بر اساس گزارش سازمان غذا و خواربار کشاورزی (FAO) ۶٪ از کل مساحت جهان معادل ۸۰۰ میلیون هکتار و ۲۰٪ از زمین‌های آبی در دنیا تحت تاثیر شوری بالا قرار دارند (فائو، ۲۰۰۸). احتمال می‌رود در ۲۰ سال آینده با توجه به اثرات مخرب تنش‌های محیطی از میزان زمین‌های زیرکشت کاسته شود(محمد ابراهیم و همکاران۲۰۰۹). شوری خاک از دو طریق گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهد. در حالت اول به دلیل افزایش نمک در خاک گیاه توانایی جذب آب را از دست داده و با تنش آبی مواجه میگردد. در حالت دوم با افزایش نمک در خاک میزان سدیم در سیتوپلاسم تا حد سمیت بالا رفته ودر نتیجه نسبت یونی سدیم به هم می‌خورد و علاوه بر آن با افزایش سدیم در سیتوزول فرایندهای بیوشمیایی را مختل می‌شود (ماتوس و آمتمان ۱۹۹۹).

به نظر محققین یکی از راههای غلبه بر مشکل شوری خاک در جهت افزایش تحمل گیاهان به شوری آنها استفاده از مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاهان می‌باشد(محمد ابراهیم و همکاران۲۰۰۹). برای تولید

گیاهان مقاوم به شوری از ابزار ها و روشهای مختلفی استفاده شده است. از آن جمله می‌توان به اهلی کردن گیاهان هالوفیت وحشی، اصلاح گیاهان از طریق روشهای اصلاحی سنتی، استفاده از گزینش درون شیشه‌ای، جمع کردن صفات فیزیولوژیکی در یک گونه، هیبریداسیون بین گونه‌ای، استفاده از گزینش مبتنی بر نشانگر و توسعه گیاهان تراریخته اشاره کرد (فلاور و همکاران۲۰۰۴).

یکی از راهبردهای موثر در این زمینه مهندسی پمپ‌های یونی مستقر در غشای واکوئلی می باشد. فعالیت این پمپ‌ها در غشاء تنوپلاستی موجب تجمع یون‌های پروتون در داخل واکوئل می‌گردد. سپس این پروتون‌ها توسط آنتی‌پورترهای تنوپلاستی با یونهای Na^+سیتوپلاسمی مبادله می‌شوند. این کار موجب جایدهی یونهای سدیم در واکوئل شده و بدین ترتیب آنرا از دسترس آنزیم‌های سیتوپلاسمی دور نگه می دارند(گاکسیلو و همکاران ۱۹۹۹). از جمله پمپ‌های یونی مستقر در غشای واکوئلی پمپ پیروفسفاتاز هیدروژنی[1] است که در تحمل گیاهان به شوری نقش اساسی ایفا می‌کند. فعالیت تورژسانس سلولی به فعالیت پمپ هیدروژنی بستگی دارد و حفظ شیب الکتروشمیایی در سراسر غشاء اجازه انتقال فعال یونهای ثانویه، اسیدهای آلی، قندها و سایر ترکیبات را می‌دهد. تجمع این املاح برای حفظ تعادل آبی گیاه مورد نیاز است (باهاسکاران و همکاران ۲۰۱۱ محمد ابراهیم و همکاران ۲۰۰۹). پمپ‌ها و آنتی پورترهای یونی مستقر در غشای سلولی و واکوئلی یکی از کاندیداهای مناسب برای افزایش بیان در گیاهان در جهت افزایش تحمل گیاهان به شوری و خشکی است.گاکسیلو و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کرده‌اند که افزایش بیان AVP_1 در گیاه آرابیدوپسیس منجر به افزایش تحمل گیاه در برابر شوری و خشکی می‌گردد. آنها نتیجه گرفتند که تحمل گیاهان تراریخته به شوری به دلیل افزایش تجمع سدیم در واکوئل و صفت تحمل به خشکی به دلیل افزایش ظرفیت تنظیم اسمزی گیاهان گیاهان تراریخته می‌شود. استفاده از راه اندازهای قوی و دائمی مانندراه‌انداز۳۵s، میزان بیان این پمپ‌ها را در غشاء واکوئل افزایش داده و بدین ترتیب موجب افزایش تحمل آن به شوری و خشکی می‌شود. پمپ پیروفسفاتاز موجود در غشاء واکوئل با پروتونه کردن داخل واکوئل شرایط را برای تعویض پروتونها با یونهای سدیم فراهم می‌کند.

[1]-H^+- pheroposhatase

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱-اهمیت گیاهان تراریخته در کشاورزی

جمعیت جهان به سرعت در حال افزایش است این در حالی است که محصولات غذایی به دلیل تنش‌های غیر زیستی در حال کاهش هستند و این تنش‌ها تهدیدی جدی برای صنعت کشاورزی محسوب می‌شوند(ماهاجان و ساموئل، ۲۰۰۵). افزایش رو به افزون جمعیت در دنیا باعث افزایش تقاضا برای مواد غذایی می شود. متاسفانه وسعت زمینهای زیر کشت جهان به موازات افزایش جمعیت به دلایل اقلیمی قابل افزایش نیست. بنابراین منحصرترین راه برای تامین غذای جمعیت در حال افزایش، بالا بردن عملکرد گیاهان زراعی است. فن‌آوری تولید گیاهان تراریخته یک راهکار حیاتی برای افزایش عملکرد محصولات زراعی می باشد(چن و سنگ۲۰۱۱). گیاهان تراریخته ازلحاظ افزایش عملکرد با مدیریت محصول در کاهش استفاده از حشره کشها و کاهش خسارت پس از برداشت خیلی بهتر عمل می کنند(تریت و باکر،۲۰۱۱). بیوتکنولوژی مدرن به سرعت با تکنولوژی‌های جدید سازگار گردیده است و گیاهان تراریخته جزء سازگارترین فن‌آوری‌ها در تاریخ کشاورزی به حساب می آیند.

بر اساس تازه‌ترین گزارش وضعیت جهانی محصولات تراریخته تجاری که توسط سرویس بین المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی(ISAAA) منتشر شده در سال ۲۰۱۲ افزایش افزایش بی سابقه در کشت محصولات تراریخته اتفاق افتاد و از ۱.۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ تا ۱۷۰ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۲ حاصل شد، این مسئله نشان میدهد که محصولات تراریخته سریعترین فناوری پذیرفته شده در تاریخ کشاورزی به دلیل مزایای این نوع محصولات است. ارزش جهانی بذرهای تراریخته در سال ۲۰۱۲ به تنهایی ۱۵ میلیارد دلار تخمین زده شده است.آمریکا بیشترین سطح زیر کشت گیاهان تراریخته را دارد . پنبه و ذرت مقاوم به آفت بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند (WWW.ISAAA).

۱-۲- اهمیت زراعی و غذایی گوجه فرنگی

مقدار ویتامین و مواد معدنی در گوجه فرنگی از همه میوه‌ها و صیفی‌جات بیشتر است و دانه‌های گوجه فرنگی دارای نوعی روغن هستند که برای تهیه مارگارین، سالاد انواع صابون بکار می رود. (ریگ ۱۹۸۸).

گوجه فرنگی حدودا دارای ۸۰٪ آب است و بقیه آن را پروتئین، چربی، قندهای مختلف از جمله گلوکز، فرکتوز، ویتامین A، C ،K، ویتامین هایB، اسید فولیک، ویتامین E و اسیدآمینه‌های ضروری تشکیل می‌دهد گوجه فرنگی همچنین حاوی املاح معدنی کلسیم،فسفر، آهن، سدیم، پتاسیم، منیزیم، مس، منگنز، کبالت، روی، آرسنیک و ید است. این گیاه همچنین سرشار از فیبر و فاقد کلسترول است(هابسون و دیویس، ۱۹۷۱).تعدادی از تحقیقات نشان داده لیکوپن موجود در گوجه فرنگی بخصوص در حالت پخته، در جلوگیری از ابتلا به سرطان پروستات، سر و گردن و بیماریهای مخرب اعصاب موثر است(زوهانگ و همکاران، ۲۰۰۹). بعلاوه تحقیقات نشان می دهد مصرف گوجه فرنگی باعث کاهش ریسک ابتلا به سرطان سینه، سر و گردن و بیماریهای مخرب اعصاب می شود(زوهانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

گوجه فرنگی علاوه بر اینکه یکی از مهم ترین گونه‌های زراعی است، در تحقیقات علمی به عنوان یک گیاه مدل بسیار برای در آزمایشات مولکولی و فیزیولوژیکی می‌باشد (مک کورمیک و همکاران ۱۹۸۶). مهمترین مزایای گوجه فرنگی به عنوان گیاه مدل، سهولت کشت آن تحت شرایط محیطی مختلف، چرخه زندگی کوتاه، خودباروری بالا، هموزیگوتی، عدم حساسیت به فتوپریود، سهولت کنترل گرده افشانی، پتانسیل تولید محصول بالا، امکان دورگ گیری با گونه‌های دیپلوئید وحشی، ژنوم نسبتا کوچک، قابلیت تکثیر غیر جنسی و قدرت باززایی خوب از بخشهای مختلف گیاه می‌باشند (ریک و یودر۱۹۹۸).

۱-۳- گیاهشناسی گوجه فرنگی

گوجه فرنگی *EsculentumLycopersicon* متعلق به خانواده سولاناسه است. گیاهی دیپلوئید (2n=24) دارای گل دوجنسه و خود گرده افشان می باشد(بیدریغ، ۱۳۷۸). گوجه فرنگی بیشتر در مناطق گرمسیری توزیع جغرافیایی دارد. مرکز تنوع آن پرو بوده و در سایر مناطق دنیا تنوع ژنتیکی کمتری دارد(بیدریغ، ۱۳۷۸).

۱-۴- تنش‌های غیر زیستی در گیاهان

تنش نتیجه روند غیر عادی فرایندهای فیزیولوژیکی است که در اثر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود(گرهام، ۱۹۹۵). در واقع مقدار و شدت نامناسب عوامل فوق است که می‌تواند برای موجود زنده ایجاد مشکل کند و باعث تنش و بروز آسیب‌های مستقیم و غیر مستقم در گیاه یا اجزای آن می‌شود. به این عوامل محدود کننده زیستی و محیطی، به اصطلاح تنش می‌گویند و آن را به دو دسته تنش‌های زیستی و غیر زیستی تقسیم می‌کنند (تایز و زایگر،۲۰۱۰).

گیاهان در شرایط طبیعی و زراعی به طور دائم در معرض عوامل تنش‌زا هستند. بعضی از عوامل محیطی مانند دمای هوا ممکن است به مدت چند دقیقه برای گیاهان باعث تنش شود، در صورتی که تنش ناشی از اثر سایر عوامل محیطی مانند رطوبت خاک ممکن است روزها تا هفته‌ها طول بکشد (لامبرز و همکاران،۲۰۰۸).

جمعیت جهان به سرعت در حال افزایش است این در حالی است که محصولات غذایی به علت تنش‌های غیر زیستی در حال کاهش هستند و این تنش‌ها تهدیدی جدی برای صنعت کشاورزی محسوب می شوند (ماهاجان و ساموئل،۲۰۰۵). آمار و ارقام نشان می دهند که فقط ۱۰ درصد از زمین‌های زراعی دنیا را می‌توان جزء مناطق عاری از تنش به حساب آورد. حدود ۲۰ درصد از اراضی دنیا تحت تاثیر نوعی از تنش‌های مرتبط با کنبود مواد معدنی، ۲۶ در صد تحت تنش خشکی و ۱۵ در صد تحت تنش سرما و تنش شوری قرار گرفته‌اند (لنر، ۱۹۹۹).

۱-۵- تنش شوری و خشکی درگیاه

تنش شوری و خشکی یکی از مهمترین تنشهای غیر زیستی بوده و از عوامل مهم محدود کننده تولید محصولات کشاورزی در تاریخ بشر می‌باشد. تمدنهای بسیاری در اثر عدم اعمال مدیریت صحیح در امر آبیاری و در نتیجه در اثر تجمع نمک‌ها در سطح خاک ویا عدم توانایی در بهبود مقاومت گیاه در برابر شوری و خشکی نابود شده‌اند (شانون، ۱۹۸۵).اگرچه شوری یک مشکل عمده برای کشاورزی درمناطق خشک و نیمه خشک جهان محسوب می‌شود، اما این تهدید در دیگرمناطق نیزمشاهده می‌شود این دشمن زیست محیطی باعث می‌شود عملکرد محصول به طور قابل توجهی کاهش یابد و از این رو بهره‌وری محصول بسیارکم است. با این حال برای مبارزه با این

خطر، مدتهاپیش، دو راهبرد کلیدی برای استفاده اززمینهای شور، مورد استفاده قرار گرفته است ، اصلاح خاکهای شور وتولید محصولات متحمل به نمک در خاکهای شور است(اشرف، ۶۱۹۸).

ازنمک های محلولی که سهم زیادی در شور شدن خاک دارند می توان به کاتیونهای سدیم، منیزیم، کلسیم و آنیونهای کلر، سولفات، بیکربنات و گاهی کربنات اشاره کرد در این میان غلظت بالای سدیم رایج ترین علت شوری مناطق مختلف دنیا است (اشرف و همکاران ۲۰۰۸). خاک شور به خاکی اطلاق می‌شود که با سطوح سمی از نمک‌های کلرید و سولفات سدیم برای گیاه همراه است. هدایت الکتریکی (EC)[1]خاک شور بیشتر از ۴ دسی زیمنس بر متر می باشد. این سطح شوری حدودا برابر با ۴۰ میلی مولار کلرید سدیم است (مارشنر، ۱۹۹۵). شوری خاک برای رشد گیاه محدودیت ایجاد می کند. این به واسطه ایجاد سوء تغذیه در اثر کم شدن جذب فسفر، پتاسیم، نیترات و کلسیم، سمیت یون‌های CL^- , $SO4^{2-}$وNa^+برای سلول و تنش اسمزی حاصل از این یون‌ها در خاک رخ می دهد (زیو، ۲۰۰۲). تحت شرایط شوری، یونهایی مانند Na^+و CL^-به درون لایه آب اطراف پروتئین‌ها نفوذ کرده و در واکنش‌های غیر کووالانت بین آمینو اسیدهای پروتئین، اختلال ایجاد می‌کند. این عمل باعث تغییر ساختار فضایی و از دست رفتن عملکرد پروتئین‌ها می‌شوددر شرایط تنش شوری مسمومیت یونی، تنش اسمزی و سوء تغذیه ممکن است منجر به بر هم خوردن تعادل متابولیک سلول شده و در نتیجه آن تنش اکسیداتیو رخ دهد (زیو،۲۰۰۱). از یکسو، تنش اسمزی تحت شرایط شوری باعث آبگیری بافت‌هایگیاهی می‌شود وبه این دلیل آن را خشکی فیزیولوژیک هم می نامند. از سوی دیگر، مسمومیت یونی در اثر تجمع یون‌های خاص به ویژه سدیم ایجاد می‌گردد که موجب اختلال در واکنش‌های متابولیک گیاه می‌شوند (سوبارو و جانسن، ۱۹۹۹).

زمانی که گیاه در معرض شوری قرار می‌گیرد سدیم زیادی در برگها و ساقه‌ها جمع می‌شود تجمع سدیم داخل برگ‌ها و ساقه‌ها منجر به یکسری از مشکلات مسائل اسمزی و متابولیکی می‌گردد (اورتلی،۱۹۶۸). سمیت متابولیکی سدیم به خاطر توانایی این یون در رقابت با پتاسیم برای اتصال به آنزیمهای سلولی است. بیش از ۵۰ آنزیم بوسیله پتاسیم فعال می‌شوند و سدیم نمی‌تواند این نقش را ایفا کند (بهاندال و ملیک، ۱۹۹۸). همچنین پتاسیم در سنتز پروتئین‌ها نقش دارد و افزایش میزان سدیم موجب

[1]- Electrical Conductivity

اختلال در سنتز پروتئین می‌شود(بلاها و همکاران ۲۰۰۰). اگر مقدار زیادی سدیم وارد گیاه شود در نهایت در برگ‌ها به مقدار بحرانی خواهد رسید و در اثر رسیدگی زودرس، ظرفیت فتوسنتزی کاهش می‌یابد و موجب بازدارندگی رشد گیاه می‌شود (مونس،۱۹۹۳).

۱-۶- شوری و مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاهان

پاسخ گیاهان به تنش شوری بسیار پیچیده است. این پاسخ از غلظت نمک، نوع یونها، عوامل مختلف محیطی و مرحله رشد و نموی گیاه تاثیر می‌پذیرد (سوبارو و جانسن، ۱۹۹۹). تحمل به شوری را می توان ادامه رشد گیاه در محیط حاوی کلرید سدیم و یا ترکیبی از مخلوط نمک‌ها تعریف کرد. اجتناب از نمک به صورت‌های مختلف انجام می شود. به عنوان مثال تاخیر در جوانه زنی و یا بلوغ تا فراهم شدن شرایط مطلوب، ممانعت از تجمع نمک در داخل و ترشح آن از طریق اندامک‌هایی نظیر غده و پرزهای نمکی و یا ذخیره در برگهای پیر اشاره کرد (احمد و همکاران،۱۹۹۲). علاوه بر آن، در شرایط شوری کم و ملایم گیاهان با افزایش غلظت مواد محلول، فشار اسمزی خود را حفظ می‌کنند(سوبارو و جانسن، ۱۹۹۹).

تحقیقات به عمل آمده نشان می دهد که تحمل به شوری در گیاهان به وسیله چند ژن کنترل می‌شود (فلاورز، ۲۰۰۴). در مقایسه با روش مرسوم که تحمل شوری ژنوتیپ‌ها را بر اساس معیارهای منفرد ارزیابی می کنند، ولی موفقیت های زیادی به وسیله استفاده از مطالعه همزمان معیارهای زراعی در مراحل مختلف رشدی به دست آمده‌اند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۴).

گیاهان می‌توانند در سطح سلولی و در سطح گیاه کامل به تنش شوری پاسخ دهند. پیام تنش در ابتدا به وسیله گیرنده‌های غشاء (گیرنده‌های جفتی پروتئین G، کانال‌های یونی، گیرنده‌هایی مثل کیناز یا هیستیدین کیناز) دریافت می شود که این باعث تولید پیام‌های ثانویه مانند Ca^{2+}، اینوزیتول فسفات، ROS و آبسیزیک اسید (ABA) می‌گردد. سپس، این پیام‌های تنش وارد هسته شده و باعث القاء پاسخ ژنهای تنش می‌گردد. تولیدات این ژنها در نهایت منجر به سازگاری گیاه در برابر تنش می‌شود. به طور کلی محصول این

ژنها مانند پروتئین‌های LEA[1] ، آنتی‌اکسیدان‌ها، چاپرون‌ها و آنزیم‌های سم زدا به طور مستقیم و یا مانند فاکتورهای رونویسی، آنزیم‌های متابولیسمی PI، بطور غیر مستقیم از سلولها محافظت می‌کنند. به طور کلی عبور پیام تنش نیاز به هماهنگی دقیق همه مولکول‌های پیام دهنده دارد (زیونگ و همکاران، ۲۰۰۲). مسیرهای مختلفی در تحمل به شوری در گیاه دخیل است. مکانیسم‌های تنظیم رونویسی زیادی را در مسیر انتقال پیام برای پاسخ بهتنش پیشنهاد شده است (سکی و همکاران، ۲۰۰۲). مولکول‌های کوچکی مانند گلایسین بتائین، پرولین، کلسیم، ROSها، آبسیزیک اسید و پمپ‌های یونی مختلفی در فرایند تحمل به شوری نقش مهمی را ایفا می کنند. درهر حال مطالعات نقش کلسیم متصل به پروتئین، فاکتورهای رونویسی و آنزیم‌ها مثل پروتئین کیناز، هلیکاز را در تحمل به تنش شوری مشخص شده است (تیوتجا، ۲۰۰۴).

در زیر به برخی از عوامل دخیل در تحمل به شوری پرداخته می‌شود :

۱-۶- ۱- نقش آبسیزیک اسید و فاکتورهای رونویسی در تحمل به شوری

آبسیزیک اسید هورمونی است که رشد و نمو گیاه را تنظیم می‌کند و در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (چینوسامی و همکاران، ۲۰۰۴). القاء تنش شوری باعث فعالیت ژنهای سنتز کننده آبسیزیک اسید می‌شود (چینوسامی و همکاران، ۲۰۰۴). در القاء تنش اسمزی به وسیله شوری دو مسیر انتقال پیام برای پاسخگویی ژنهای تنش وجود دارد که یکی وابسته به آبسیزیک اسید و دیگری غیر وابسته به آبسیزیک اسید است (شینوزاکی و همکاران، ۱۹۹۷). به عنوان مثال القاء تنش شوری باعث ایجاد تنظیم مثبت در رونویسی DNA هلیکاز ۴۵ نخود (PDH45) شده است که این مسیر وابسته به آبسیزیک اسید است در صورتی که پروتئین‌های CBL[2] و CIPK[3] (هر دو حسگرهای کلسیم) از نخود از طریق مسیر غیر وابسته به آبسیزیک اسید انجام می‌گیرد(ماهاجان و همکاران، ۲۰۰۶). به طور کلی مسیرهای وابسته به آبسیزیک اسید در بیان ژن‌های تنش اسمزی در گیر هستند.

[1]- Late Embryogenesis Abundant Proteins
[2]-calcineurin B-like protein
[3]-CBL Ineracting Protein Kinases

۱-۶-۲- پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن[1]

پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن یک گروه ویژه از پروتئین کینازهای سرین/ترئونین می‌باشند. که گیاه نقش مرکزی در انتقال پیام‌های داخل و خارج سلولی از جمله انتقال پیام تنش در مسیر ایفا می‌کند. به طور عمومی این عوامل دارای عملکرد آبشاری می‌باشد به طوری که MAPKتوسط MAPKکیناز، فسفریله و فعال شده و آن نیز به نوبه خود توسط MAPKK کیناز فعال شده و تولید MAPKKK می‌کند. این سه کیناز با همدیگر در ارتباط بوده و با هم گیرنده‌های کینازی خارج سلولی نامیده می‌شود. نقشMAP کیناز در پاسخ به تنش شوری در چندین گیاه گزارش شده است (سانان میشرا و همکاران،۲۰۰۶). افزایش فعالیت کینازی در پروتوپلاست تنباکو تحت تنش شوری مشاهده شد. مشاهده شده است که اسید سالیسیلیک، بیان پروتئین کیناز را القاءمی کند (سانانمیشرا و همکاران،۲۰۰۶).

۱-۶-۳-نقش ترکیبات آنتی اکسیدان در تنش شوری

قرار گرفتن گیاه در شرایط نامساعد محیطی مانند تنش خشکی، شوری، گرما، سرما، کمبود مواد غذایی، نور شدید و آلودگی هوا باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در آنها می‌شود (سمیرنوف، ۱۹۹۸). یکی از مکانیسم‌های مهم تحمل به تنش شوری بسته شدن روزنه‌ها می‌باشد که متعاقب آن میزان دسترسی گیاه به دی اکسید کربن کاهش می‌یابد. این امر باعث کاهش سرعت واکنش‌های تاریکی فتوسنتز (چرخه کالوین) شده و به خاطر عدم مصرف NADPH، نسبت NADPH به $NADP^+$ در سلول افزایش می‌یابد. در این حالت، به جای $NADP^+$ اکسیژن به عنوان گیرنده الکترون عمل کرده و باعث تولید آنیون سوپر اکسید(O_2^-) می‌گردد، که به واکنش مهار پراکسیداز معروف است. علاوه بر آن در محل کمپلکس‌های برداشت نور در اثر انتقال انرژی از کلروفیل تهییج شده به اکسیژن، اکسیژن منفرد[2] (اکسیژن مولکولی طبیعی در حالت

[1]-Mitogen-Activated Protein Kinase
[2]- O2