

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## تعهدنامه‌ی اصالت اثر و رعایت حقوق دانشگاه

تمامی حقوق مادّی و معنوی مترتب بر نتایج، ابتکارات، اختراعات و نوآوری‌های ناشی از انجام این پژوهش، متعلق به **دانشگاه محقق اردبیلی** می‌باشد. نقل مطلب از این اثر، با رعایت مقررات مربوطه و با ذکر نام دانشگاه محقق اردبیلی، نام استاد راهنما و دانشجو بلامانع است.

اینجانب احمد ملازاده تقی پور دانش‌آموخته‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی به شماره‌ی دانشجویی ۹۰۳۳۴۵۳۱۰۷ که در تاریخ ۹۲/۱۲/۲۰ از پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود تحت عنوان مطالعه‌ی بیان فاکتورهای رونویسی در واکنش به تنش خشکی در برنج دفاع نموده‌ام، متعهد می‌شوم که:

۱) این پایان‌نامه را قبلاً برای دریافت هیچ‌گونه مدرک تحصیلی یا به عنوان هرگونه فعالیت پژوهشی در سایر دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی داخل و خارج از کشور ارائه ننموده‌ام.

۲) مسؤلیت صحّت و سقم تمامی مندرجات پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود را بر عهده می‌گیرم.

۳) این پایان‌نامه، حاصل پژوهش انجام شده توسط اینجانب می‌باشد.

۴) در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و مقررات مربوطه و با رعایت اصل امانتداری علمی، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در متن و فهرست منابع و مأخذ ذکر نموده‌ام.

۵) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده یا هرگونه بهره‌برداری اعم از نشر کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان‌نامه را داشته باشم، از حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی، مجوزهای لازم را اخذ نمایم.

۶) در صورت ارائه‌ی مقاله‌ی مستخرج از این پایان‌نامه در همایش‌ها، کنفرانس‌ها، سمینارها، گردهمایی‌ها و انواع مجلات، نام دانشگاه محقق اردبیلی را در کنار نام نویسندگان (دانشجو و اساتید راهنما و مشاور) ذکر نمایم.

۷) چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن (منجمله ابطال مدرک تحصیلی، طرح شکایت توسط دانشگاه و ...) را می‌پذیرم و دانشگاه محقق اردبیلی را مجاز می‌دانم با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات مربوطه رفتار نماید.

نام و نام خانوادگی دانشجو: احمد ملازاده تقی پور

امضا

تاریخ



دانشکده‌ی علوم کشاورزی  
گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد  
در رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

مطالعه بیان فاکتورهای رونویسی در واکنش به تنش خشکی در برنج

اساتید راهنما:

دکتر ناصر زارع

دکتر علیرضا ترنگ

اساتید مشاور:

دکتر رسول اصغری ذکریا

مهندس رامین صیقلانی

پژوهشگر:

احمد ملازاده تقی پور

زمستان ۱۳۹۲



دانشکده‌ی علوم کشاورزی

گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد  
در رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

**عنوان:**

مطالعه بیان فاکتورهای رونویسی در واکنش به تنش خشکی در برنج

پژوهشگر:

احمد ملازاده تقی پور

ارزیابی و تصویب شده‌ی کمیته‌ی داوران پایان‌نامه با درجه‌ی .....

امضاء	سمت	مرتبه‌ی علمی	نام و نام خانوادگی
	استاد راهنما و رییس کمیته‌ی داوران	استادیار استادیار	دکتر ناصر زارع دکتر علیرضا ترنگ
	استاد مشاور	دانشیار مربی	دکتر رسول اصغری ذکریا مهندس رامین صیقلانی
	داور	استادیار	دکتر سارا دژستان

زمستان ۱۳۹۲

## تقدیم به:

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می‌نمایم به:

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه‌ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف

زندگی‌ام انجام داده‌اند و با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته‌اند.

و همچنین به استادان فرزانه و فرهیخته‌ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نموده و

چراغ راهم بوده‌اند.

## قدردانی و سپاسگذاری

با سپاس از سه وجود مقدس

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا مارو سفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

به خصوص :

از جناب آقای دکتر ناصر زارع استاد راهنمای گرامی که زحمت راهنمایی بنده در تمام دوره تحصیل در مقطع کارشناسی ارشد و دوره پایان نامه را برعهده داشتند سپاسگذاری می‌نمایم. از جناب آقای دکتر علیرضا ترنگ استاد راهنمای گرامی که زحمت راهنمایی بنده را در تمام دوره پایان نامه برعهده داشتند سپاسگذاری می‌نمایم.

از جناب آقای مهندس رامین صیقلانی استاد مشاور بنده که زحمات بسیاری در طول انجام پایان نامه کشیده و با راهنمایی‌های علمی فراوانشان و فراهم نمودن شرایط مناسب جهت انجام پایان‌نامه، بنده را یاری نمودند قدردانی و سپاس گذاری می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر رسول اصغری ذکریا استاد مشاور گرامی سپاس گذاری می‌نمایم. از سرکار خانم دکتر سارا دژستان استاد داور گرامی که زحمت بازخوانی پایان نامه را برعهده داشتند کمال قدردانی و سپاسگذاری را دارم.

از جناب آقای دکتر رضا شیرزادیان نیز به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال سپاسگذاری را دارم.

در پایان از جناب آقایان مهندس پیام پتکی، فرهاد وحیدی، دکتر اسد اسدی آبکنار، دکتر محمد نوروزی، مهندس مسلم پور ابراهیم، مهدی قاسمی، سیامک ذیشان، طاهر دلجوی توحیدی، تقی کاظمی، آرمین نجابت دوست، علی رضائی صیاد، مهدی بخشی پور و سرکار خانم‌ها دکتر سمیه عطایی، مهندس سحر بهلولی، سیده آزاده جوادی و شیرین علی‌پور به دلیل کمک‌های فراوانشان قدردانی و سپاسگذاری می‌نمایم.

نام خانوادگی دانشجو:	ملازاده تقی پور	نام: احمد
عنوان پایان نامه:	مطالعه بیان فاکتورهای رونویسی در واکنش به تنش خشکی در برنج	
اساتید راهنما:	دکتر ناصر زارع، دکتر علیرضا ترنگ	
اساتید مشاور:	دکتر رسول اصغری ذکریا، مهندس رامین صیقلانی	
مقطع تحصیلی:	کارشناسی ارشد	
رشته:	مهندسی کشاورزی	
گرایش:	بیوتکنولوژی کشاورزی	
دانشکده:	علوم کشاورزی	تاریخ دفاع: ۹۲/۱۲/۲۰
چکیده:	تعداد صفحات: ۱۲۹	
<p>در این پژوهش اثر تنش خشکی در مرحله پنجه زنی و مرحله خوشه دهی روی برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و همچنین روی بیان ژن‌های کد کننده فاکتورهای رونویسی AP37، DREB2A، SNAC1 و ZFP252 در ارقام برنج هاشمی (حساس به خشکی)، علی کاظمی (متحمل به خشکی) و ندا (مقاوم به خشکی) در مرحله رویشی و زایشی مورد بررسی قرار گرفت. تنش خشکی از طریق عدم آبیاری اعمال گردید. نتایج تجزیه واریانس در مورد صفات مورفولوژیکی نشان داد که از نظر اکثر صفات مورد ارزیابی تفاوت معنی داری بین ارقام برنج مورد استفاده وجود دارد. صفات طول برگ پرچم، مساحت برگ پرچم و وزن تر بوته به طور معنی داری تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفت. در بین مرحله اعمال تنش خشکی (مرحله رویشی و زایشی) نیز از نظر تعداد پنجه در گیاه و وزن خشک بوته اختلاف معنی داری وجود داشت. رقم ندا با ۲۲/۵۴ گرم دارای بیشترین وزن خوشه در بوته را نشان داد که به طور معنی داری بیشتر از رقم علی کاظمی (۱۸/۷۴ گرم) و رقم هاشمی (۱۳/۴۸ گرم) بود. از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها تفاوت معنی داری بین ارقام برنج مورد استفاده وجود دارد. علاوه بر این، در شرایط تنش خشکی، غلظت پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز به طور معنی داری کاهش یافت. اعمال تنش خشکی در مرحله زایشی موجب افزایش غلظت اسید آمینه پرولین به عنوان یک محافظت کننده اسمزی گردید. نتایج PCR زمان واقعی نشان داد که بیان ژن‌های AP37، ZFP252 و DREB2A در رقم هاشمی در مرحله رویشی و ژن SNAC1 در مرحله زایشی افزایش و بیان AP37 و ZFP252 در مرحله زایشی کاهش یافته است. ولی در رقم ندا بیان ژن‌های SNAC1، ZFP252 تحت تاثیر تنش خشکی در مرحله رویشی افزایش و بیان ژن DREB2A در این مرحله و ژن AP37 در مرحله زایشی کاهش یافته است.</p>		
کلید واژه‌ها: آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، برنج، بیان ژن، تنش خشکی و فاکتورهای رونویسی		

شماره و عنوان مطالب	صفحه
---------------------	------

فصل اول: کلیات پژوهش

۱-۱ مقدمه.....	۲
۱-۲- گیاه‌شناسی برنج.....	۳
۱-۳- تنش خشکی.....	۳
۱-۴- مقاومت به خشکی.....	۴
۱-۵- مکانیسم پاسخ گیاه به شرایط تنش خشکی.....	۴
۱-۶- پاسخ های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه در شرایط تنش خشکی.....	۵
۱-۷- پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه در شرایط تنش خشکی.....	۶
۱-۸- مطالعات ژنتیکی در شرایط تنش خشکی.....	۸
۱-۹- بیان ژن.....	۹
۱-۹-۱- نسخه برداری.....	۹
۱-۹-۱-۱- شروع نسخه برداری با RNA پلی‌مراز I و III.....	۱۴
۱-۹-۱-۲- مهار کننده‌های شروع نسخه برداری یوکاریوتی.....	۱۵
۱-۹-۱-۳- خاتمه تنظیم شده رونویسی.....	۱۵
۱-۹-۲- پردازش RNA.....	۱۶
۱-۹-۳- ترجمه.....	۱۷
۱-۱۰- تنظیم فعالیت فاکتور رونویسی.....	۱۷
۱-۱۱- فاکتورهای رونویسی مرتبط با تنش‌های غیر زیستی.....	۱۸
۱-۱۱-۱- خانواده فاکتورهای رونویس DREB.....	۱۹



۱۹	.....DREB انواع ۱-۱۱-۱
۲۰	.....AP2 خانواده فاکتورهای رونویسی ۱۲-۱
۲۰	.....NAC خانواده فاکتورهای رونویسی ۱۳-۱
۲۱	.....ZFP خانواده فاکتورهای رونویسی ۱۴-۱
۲۲	.....۱۵-۱ روش های اندازه گیری بیان ژن
۲۳	.....۱-۱۵-۱ ریز آرایه
۲۴	.....RNA-۲-۱۵-۱ توالی یابی RNA
۲۴	.....۱۵-۱-۳ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی
۲۴	.....۱۵-۱-۳-۱ برخی مفاهیم اساسی در PCR در زمان واقعی
۲۷	.....۱۵-۱-۳-۲ مقایسه PCR سنتی با PCR در زمان واقعی
۲۸	.....۱۵-۱-۳-۳ PCR متداول
۲۹	.....۱۵-۱-۳-۴ طراحی پرایمرها در PCR در زمان واقعی
۳۱	.....۱۵-۱-۳-۵ اصول نظری و عملی در PCR در زمان واقعی
۳۴	.....۱۵-۱-۳-۶ اجزای سازنده PCR در زمان واقعی و بهینه‌سازی سنجش
۳۵	.....۱۵-۱-۳-۷ گزارشگرهای فلورسنس در زمان واقعی
۳۶	.....۱۶-۱ اهداف پژوهش

## فصل دوم: مواد و روش ها

۳۹	.....۱-۲ مواد و تیمارهای آزمایشی
۳۹	.....۲-۲ کشت بذور و تهیه نشاء
۴۰	.....۳-۲ انتقال نشاءها به گلدان‌های مخصوص کشت
۴۱	.....۴-۲ داشت
۴۱	.....۵-۲ اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی و نمونه برداری

- ۶-۲- اعمال تنش خشکی در مرحله زایشی و نمونه برداری..... ۴۲
- ۷-۲- بررسی صفات مورفولوژیکی مرتبط با تنش خشکی..... ۴۳
- ۸-۲- اندازه گیری مقدار رنگیزه های فتوسنتزی..... ۴۳
- ۹-۲- سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت..... ۴۴
- ۱-۹-۲- تهیه عصاره آنزیمی..... ۴۴
- ۲-۹-۲- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز..... ۴۴
- ۳-۹-۲- سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز..... ۴۵
- ۴-۹-۲- سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز..... ۴۶
- ۱-۴-۹-۲- عصاره آنزیمی جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز..... ۴۶
- ۲-۴-۹-۲- مخلوط واکنش جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز..... ۴۷
- ۱۰-۲- اندازه گیری غلظت پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )..... ۴۷
- ۱۱-۲- اندازه گیری غلظت اسید آمینه پرولین..... ۴۸
- ۱۲-۲- تعیین غلظت پروتئین کل..... ۴۸
- ۱۳-۲- محاسبات آماری..... ۴۹
- ۱۴-۲- بیان ژن..... ۴۹
- ۱-۱۴-۲- تعیین ژن های کد کننده فاکتورهای رونویسی مورد نظر..... ۴۹
- ۲-۱۴-۲- طراحی پرایمر..... ۴۹
- ۳-۱۴-۲- تهیه آب DEPC..... ۵۱
- ۴-۱۴-۲- استخراج RNA..... ۵۱
- ۵-۱۴-۲- تعیین کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز..... ۵۳
- ۱-۵-۱۴-۲- تهیه بافر  $50 \times TAE$ ..... ۵۳
- ۲-۵-۱۴-۲- تهیه رنگ Dye..... ۵۳

- ۵۳.....۲-۱۴-۵-۳-تهیه ژل آکارز ۱ درصد.....
- ۵۴.....۲-۱۴-۶-تعیین غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از دستگاه NanoDrop.....
- ۵۴.....۲-۱۴-۷-ساخت cDNA.....
- ۵۴.....۲-۱۴-۷-۱-یکسان سازی غلظت نمونه‌های RNA.....
- ۵۵.....۲-۱۴-۷-۲-تهیه مخلوط پایه cDNA.....
- ۵۵.....۲-۱۴-۸-PCR متداول برای بهینه سازی شرایط واکنش.....
- ۵۵.....۲-۱۴-۸-۱-گرادیان دمایی برای بدست آوردن دمای آنالینگ پرایمرها.....
- ۵۶.....۲-۱۴-۸-۲-بهینه‌سازی شرایط مخلوط واکنش، شرایط زمانی و چرخه‌ای.....
- ۵۷.....۲-۱۴-۹-PCR در زمان واقعی.....
- ۵۷.....۲-۱۴-۹-۱-اجزای واکنش PCR کمی و مخلوط پایه مورد استفاده.....
- ۵۷.....۲-۱۴-۹-۲-رسم منحنی استاندارد برای تمامی ژن‌ها.....
- ۵۹.....۲-۱۴-۹-۳-رقیق‌سازی نمونه‌ها و انجام واکنش.....
- ۵۹.....۲-۱۴-۹-۴-چرخه‌های حرارتی PCR کمی.....
- ۶۰.....۲-۱۴-۹-۵-روش مورد استفاده برای تعیین کمیت بیان ژن.....

### فصل سوم: نتایج و بحث

- ۶۳.....۳-۱-صفات مورفولوژیکی.....
- ۶۵.....۳-۱-۱-نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در ارقام مختلف برنج.....
- ۶۵.....۳-۱-۲-نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در شرایط تنش و بدون تنش خشکی.....
- ۶۶.....۳-۱-۳-نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در مراحل مختلف نموی.....
- ۶۷.....۳-۱-۴-بررسی اثرات متقابل بر روی برخی صفات مورفولوژیکی برنج.....
- ۷۰.....۳-۲-صفات فیزیولوژیکی.....
- ۷۱.....۳-۲-۱-نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در ارقام مختلف برنج.....

- ۷۱-۲-۲-۳- نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در مراحل مختلف نموی.....
- ۷۲-۳-۲-۳- بررسی اثرات متقابل بر روی برخی صفات فیزیولوژیکی برنج.....
- ۷۵-۳-۳- صفات بیوشیمیایی.....
- ۷۷-۱-۳-۳- نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در ارقام مختلف برنج.....
- ۷۷-۲-۳-۳- نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در شرایط تنش و بدون تنش خشکی.....
- ۷۸-۳-۳-۳- نتایج حاصل از صفات مورد بررسی در مراحل مختلف نموی.....
- ۷۹-۴-۳-۳- بررسی اثرات متقابل بر روی برخی صفات بیوشیمیایی برنج.....
- ۸۱-۴-۳- بیان ژنهای کد کننده برخی از فاکتورهای رونویسی.....
- ۸۱-۱-۴-۳- استخراج RNA.....
- ۸۲-۲-۴-۳- تعیین کیفیت cDNA و دمای اتصال پرایمرها.....
- ۸۳-۳-۴-۳- نتایج حاصل از رسم منحنی‌های استاندارد برای تمامی ژن‌ها.....
- ۸۷-۴-۴-۳- نمودارهای تکثیر در ژن‌های مختلف.....
- ۸۹-۵-۴-۳- منحنی‌های ذوب.....
- ۹۲-۶-۴-۳- نتایج حاصل از بیان ژن‌های هدف توسط نرم افزار REST.....
- ۹۲-۱-۶-۴-۳- تغییرات بیان در رقم هاشمی در مرحله رویشی.....
- ۹۴-۲-۶-۴-۳- تغییرات بیان در رقم ندا در مرحله رویشی.....
- ۹۶-۳-۶-۴-۳- تغییرات بیان در رقم هاشمی در مرحله زایشی یا خوشه دهی.....
- ۹۸-۴-۶-۴-۳- تغییرات بیان در رقم ندا در مرحله زایشی یا خوشه دهی.....
- ۹۹-۵-۳- نتیجه‌گیری.....
- ۱۰۱-۶-۳- پیشنهادها.....

## فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول	صفحه
جدول ۲-۱: توالی پرایمرهای طراحی شده و مشخصات آنها.....	۵۰
جدول ۲-۲: اجزای تشکیل دهنده مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر.....	۵۷
جدول ۲-۳: خصوصیات چرخه‌های حرارتی.....	۵۹
جدول ۳-۱: تجزیه واریانس صفات مختلف مورفولوژیکی در ارقام برنج تحت تنش خشکی در مراحل مختلف نمو.....	۶۴
جدول ۳-۲: میانگین صفات مورد بررسی در ارقام مختلف برنج.....	۶۵
جدول ۳-۳: میانگین صفات مورد بررسی در شرایط تنش و بدون تنش خشکی.....	۶۶
جدول ۳-۴: میانگین صفات مورد بررسی در مراحل مختلف نمو گیاه برنج.....	۶۷
جدول ۳-۵: تاثیر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی ارقام برنج.....	۶۷
جدول ۳-۶: تاثیر مرحله اعمال تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی ارقام برنج.....	۶۸
جدول ۳-۷: تاثیر تنش خشکی در مراحل نمو مختلف بر صفات مورفولوژیکی برنج.....	۶۸
جدول ۳-۸: میانگین تاثیر تنش خشکی بر تعداد پنجه در بوته ارقام مختلف برنج در مراحل مختلف نمو.....	۶۹
جدول ۳-۹: تجزیه واریانس صفات مختلف فیزیولوژیکی در ارقام برنج تحت تنش خشکی در مراحل مختلف نمو.....	۷۰
جدول ۳-۱۰: میانگین صفات مورد بررسی در ارقام مختلف برنج.....	۷۱
جدول ۳-۱۱: میانگین صفات مورد بررسی در مراحل مختلف نمو گیاه برنج.....	۷۱
جدول ۳-۱۲: تاثیر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیکی ارقام برنج.....	۷۲

- جدول ۳-۱۳: تاثیر مرحله اعمال تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیکی ارقام برنج..... ۷۳
- جدول ۳-۱۴: تاثیر تنش خشکی در مراحل نموی مختلف بر صفات فیزیولوژیکی برنج..... ۷۳
- جدول ۳-۱۵: میانگین تاثیر تنش خشکی بر غلظت کلروفیل b ارقام مختلف برنج در مراحل مختلف نموی..... ۷۴
- جدول ۳-۱۶: تجزیه واریانس برخی صفات بیوشیمیایی در ارقام برنج تحت تنش خشکی در مراحل مختلف نموی..... ۷۶
- جدول ۳-۱۷: میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مختلف برنج..... ۷۷
- جدول ۳-۱۸: میانگین صفات مورد بررسی در شرایط تنش و بدون تنش خشکی..... ۷۸
- جدول ۳-۱۹: میانگین محتوی پراکسید هیدروژن در مراحل مختلف نموی گیاه برنج..... ۷۸
- جدول ۳-۲۰: تاثیر تنش خشکی بر صفات بیوشیمیایی ارقام برنج..... ۷۹
- جدول ۳-۲۱: تاثیر تنش خشکی در مراحل نموی مختلف بر غلظت پرولین در برنج..... ۸۰
- جدول ۳-۲۲: خصوصیات منحنی‌های استاندارد برای ژن‌های مختلف..... ۸۴
- جدول ۳-۲۳: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد و خطای استاندارد تمامی ژن‌ها در رقم هاشمی و مرحله رویشی..... ۹۳
- جدول ۳-۲۴: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد و خطای استاندارد تمامی ژن‌ها در رقم ندا و مرحله رویشی..... ۹۵
- جدول ۳-۲۵: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد و خطای استاندارد تمامی ژن‌ها در رقم هاشمی در مرحله زایشی..... ۹۷
- جدول ۳-۲۶: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد و خطای استاندارد تمامی ژن‌ها در رقم ندا در مرحله زایشی..... ۹۸

## فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل	صفحه
شکل ۱-۱: پروموتور و عناصر آغازگر در برخی از ژن‌های ساختاری یوکاریوتیک (گلیک و همکاران، ۲۰۱۰).....	۱۰
شکل ۱-۲: نمایی شماتیک از رونویسی در موجودات یوکاریوتیک (هایز و همکاران، ۲۰۱۰).....	۱۱
شکل ۱-۳: اتصال TBP به جعبه TATA صفحه‌ای را تشکیل می‌دهد که کمپلکس می‌تواند بر روی آن چیدمان یابد.....	۱۲
شکل ۱-۴: نمایی شماتیک از پردازش RNA.....	۱۷
شکل ۱-۵: ساختار ثانویه سنجاق سر.....	۳۱
شکل ۱-۶: ساختار ثانویه پرایمر دایمر خودی.....	۳۱
شکل ۱-۷: ساختار ثانویه دایمر متقابل.....	۳۱
شکل ۱-۸: نمایی از چهار فاز خط پایه، نمایی، خطی و کفه در Real time PCR.....	۳۳
شکل ۲-۱: تصویری از نشاءهای برنج کشت شده در جعبه‌های نشاء در گلخانه.....	۴۰
شکل ۲-۲: تصویری از نشاءهای برنج کشت شده در گلدان.....	۴۰
شکل ۲-۳: گیاهان در مرحله رویشی در شرایط بدون تنش خشکی (ردیف بالا) و تنش خشکی (ردیف پایین) از سمت چپ به ترتیب رقم هاشمی (حساس)، علی کاظمی (متحمل) و ندا (مقاوم).....	۴۱
شکل ۲-۴: گیاهان در مرحله زایشی در شرایط بدون تنش خشکی (ردیف بالا) و تنش خشکی (ردیف پایین) از سمت چپ به ترتیب رقم هاشمی (حساس)، علی کاظمی (متحمل) و ندا (مقاوم).....	۴۲
شکل ۳-۱: تصویری از RNA های نامناسب بر روی ژل آگارز ۱ درصد.....	۸۱
شکل ۳-۲: تصویری از نمونه‌های RNA مناسب بر روی ژل آگارز ۱ درصد.....	۸۱
شکل ۳-۳: تصویر باندهای حاصل از پرایمر AP37 در ردیف بالا و DREB2A در ردیف پایین.....	۸۲

- شکل ۳-۴: تصویر باندهای حاصل از پرایمر SNAC1 در ردیف بالا و DREB2A در ردیف پایین ۸۳
- شکل ۳-۵: منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های مختلف ۱ به ۱۰ برای ژن 18s rRNA..... ۸۴
- شکل ۳-۶: منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های مختلف ۱ به ۲ برای ژن AP37..... ۸۵
- شکل ۳-۷: منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های مختلف ۱ به ۲ برای ژن DREB2A..... ۸۵
- شکل ۳-۸: منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های مختلف ۱ به ۲ برای ژن SNAC1..... ۸۶
- شکل ۳-۹: منحنی استاندارد حاصل از رقت‌های مختلف ۱ به ۲ برای ژن ZFP252..... ۸۶
- شکل ۳-۱۰: نمودار تکثیر ژن 18s rRNA در تمامی نمونه‌های cDNA..... ۸۷
- شکل ۳-۱۱: نمودار تکثیر ژن AP37 در تمامی نمونه‌های cDNA..... ۸۷
- شکل ۳-۱۲: نمودار تکثیر ژن DREB2A در تمامی نمونه‌های cDNA..... ۸۸
- شکل ۳-۱۳: نمودار تکثیر ژن SNAC1 در تمامی نمونه‌های cDNA..... ۸۸
- شکل ۳-۱۴: نمودار تکثیر ژن ZFP252 در تمامی نمونه‌های cDNA..... ۸۹
- شکل ۳-۱۵: منحنی ذوب ژن 18s rRNA..... ۸۹
- شکل ۳-۱۶: منحنی ذوب ژن AP37..... ۹۰
- شکل ۳-۱۷: منحنی ذوب ژن DREB2A..... ۹۰
- شکل ۳-۱۸: منحنی ذوب ژن SNAC1..... ۹۱
- شکل ۳-۱۹: منحنی ذوب ژن ZFP252..... ۹۱
- شکل ۳-۲۰: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد در تمامی ژن‌ها در رقم هاشمی در مرحله رویشی..... ۹۳
- شکل ۳-۲۱: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد در تمامی ژن‌ها در رقم ندا در مرحله رویشی..... ۹۵
- شکل ۳-۲۲: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد در تمامی ژن‌ها در رقم هاشمی در مرحله زایشی..... ۹۷



شکل ۳-۲۳: نسبت بیان ژن در نمونه‌های تنش یافته نسبت به نمونه‌های شاهد در تمامی ژن‌ها در رقم

ندا در مرحله زایشی.....۹۸

# فصل اول

## کلیات پژوهش

## ۱-۱- مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین غلات و اقلام غذایی جهان است. نیمی از جمعیت جهان، به برنج به عنوان یک غذای اصلی وابسته هستند. کشت این محصول در چین و هندوستان سابقه هفت هزار ساله داشته و اعتقاد بر این است که منشاء *Oryza sativa* متداول‌ترین گونه برنج، قاره آسیا است. برنج محصول عمده مناطق گرمسیری و مرطوب می‌باشد و در منطقه‌ای کشت می‌شود که مقدار بارندگی سالانه حداقل ۱۰۰۰ میلی‌متر باشد (نور محمدی و همکاران، ۱۳۸۳). همچنین برنج در طی تکامل به صورت یک گیاه کاملاً وابسته به آب تکامل یافته و در نتیجه سازگاری‌های نسبتاً پایینی در برابر شرایط کمبود آب داشته و به شدت به تنش خشکی حساس است (لافیته و همکاران، ۲۰۰۴). برنج گیاهی است که بیشترین نیاز آبی را در بین غلات دارد، این گیاه تا رسیدگی فیزیولوژیک دانه‌ها به حدود ۸ الی ۲۰ هزار متر مکعب و برای تولید یک کیلوگرم ماده خشک به ۷۰۰ لیتر آب نیاز دارد (کریمی، ۱۳۷۰). اگرچه وارته‌های مقاوم به تنش به وسیله روش‌های مرسوم اصلاحی توسعه داده شده‌اند. لیکن این روش‌ها نیازمند زمان طولانی برای آزمون و ارزیابی محصول تولیدی می‌باشند. در حال حاضر بیوتکنولوژی مدرن برای حل کردن مشکلات اصلاحی مقاومت به تنش‌ها یک ضرورت محسوب می‌شود (شان وو و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به اهمیت فاکتورهای رونویسی در واکنش گیاه برنج به خشکی، بررسی میزان بیان ژن‌های کدکننده این فاکتورها در واکنش به تنش خشکی و شناسایی برخی از فاکتورهای رونویسی مرتبط با تنش خشکی می‌تواند در افزایش اطلاعات ما درباره پاسخ این گیاه به تنش خشکی و همچنین اصلاح گیاهان برنج مقاوم یا متحمل به تنش خشکی مفید باشد.

## ۱-۲- گیاه‌شناسی برنج

برنج گیاهی دیپلوئید ( $2n=2x=24$ ) است. برنج زراعی دارای سه زیر گونه به نام‌های هندی<sup>۱</sup>، ژاپنی<sup>۲</sup> و جاوه‌ای<sup>۳</sup> می‌باشد که هر یک دارای خصوصیات مورفولوژیکی خاصی هستند. برنج دارای سیستم ریشه‌ای کم عمقی است که بیشتر در منطقه ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متری لایه فوقانی خاک متمرکز است. برگ برنج از پهنک و غلاف تشکیل شده است و طول پهنک از پائین بوته به طرف بالا افزایش می‌یابد و معمولاً اندازه آن بین ۵۰ تا ۶۰ سانتیمتر و عرض آن در حدود ۱/۵ تا ۲ سانتیمتر می‌باشد. ساقه برنج توخالی، افراشته، استوانه‌ای شکل و نرم می‌باشد و تعداد میان‌گره‌های آن از ۱۰ تا ۲۰ عدد متغییر است. وارپته‌های زودرس معمولاً میان‌گره‌های کمتری نسبت به وارپته‌های دیررس داشته و سرعت رشد ساقه هایشان سریعتر می‌باشد. گل آذین برنج از نوع خوشه‌ای<sup>۴</sup> است. دانه برنج از نقطه نظر گیاه‌شناسی میوه‌ای که آن را گندمه<sup>۵</sup> می‌نامند. گندمه در درون پوسته‌ای که به نحوی آزاد به آن چسبیده محصور بوده و در زیر پوسته پریکاپ قهوه‌ای رنگی قرار دارد، که شامل لایه‌های سبوس<sup>۶</sup> بوده و از لحاظ چربی، پروتئین، نمک‌های معدنی و ویتامین‌ها غنی می‌باشد. در زیر سبوس لایه کم رنگ تری با همان ترکیب وجود دارد که جلا<sup>۷</sup> نامیده می‌شود (نور محمدی و همکاران، ۱۳۸۳).

## ۱-۳- تنش خشکی<sup>۸</sup>

خشکی در واقع یک رویداد هواشناختی است که با عدم وقوع بارندگی در یک دوره زمانی همراه باشد. اما از دیدگاه کشاورزی، خشکی عبارت است از ناکافی بودن مقدار و توزیع آب قابل استفاده در طی دوره رشد گیاه که این امر موجب کاهش بروز توان کامل ژنتیکی گیاه می‌گردد (میترا، ۲۰۰۱). خشکی مهمترین عامل محدود کننده تولید و ثبات در محصول برنج در ۴۰ میلیون هکتار از اراضی زیر کشت برنج در آسیا

- 1- *Oryza sativa var indica*
- 2- *Oryza sativa var japonica*
- 3- *Oryza sativa var javanica*
- 4- Panicle
- 5- Criopsis
- 6- Bran
- 7- Polish
- 8- Drought stress