دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی الگوی بیان ژنهای کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز در گیاه نخود آلوده به بیماری برق زدگی

رحیم افضل

استاد راهنما

دکتر سید حسن مرعشی

اساتید مشاور

دکتر نسرین مشتاقی

دکتر حمید رضا کاوسی

خرداد۱۳۹۰

تصویب نامه

این پایان نامه با عنوان « بررسی الگوی بیان ژنهای کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز در گیاه نخود آلوده به بیماری برق زدگی »

توسط « رحیم افضل » در تاریخ ۹۰/۳/۲۵ با نمره و درجه ارزشیابی در حضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

تاریخ دفاع ۹۰/۳/۲۵ نمره و درجه ارزشیابی

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	دکتر سیدحسن مرعشی	دانشیار	استاد راهنما	
۲	دکتر نسرین مشتاقی	استادیار	مشاور	
۳	دکتر حمیدرضا کاوسی	استادیار	مشاور	
۴	دکتر فرج الله شهریاری	دانشیار	مدعو	
۵	دکتر سعید ملک زاده	استادیار	مدعو	
۶	امین میرشمسی کاخکی	استادیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه: بررسی الگوی بیان ژنهای کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز در گیاه نخود آلوده به بیماری برق زدگی

اینجانب رحیم افضل دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر سید حسن مرعشی متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

آنزیم های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز جزء پروتئین های قابل القاء هستند که در پاسخ به عوامل بیماری زا توسط گیاه سنتز می شوند. در این تحقیق، بیان ژن ایزوفرم های اسیدی و بازی این دو آنزیم در سطح مولکولی در گیاه نخود زراعی مورد مطالعه قرار گرفت. سطح تظاهر این ژن ها در نمونه های تیمار شده و شاهد، در ژنوتیپ نخود حساسMCC403 و ژنوتیپ مقاوم MCC496 نسبت به آلودگی به نژاد ۶ قارچ عامل برق زدگی(*Ascochyta rabiei*) در صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با استفاده از روش ارزیابی نیمه کمی RT-PCR بررسی شد. نتایج حاکی از افزایش بیان ایزو فرم اسیدی هر دو ژن کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز پس از آلودگی بود. هردو ژن مذکور در ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح حداکثر بیان را در ژنوتیپ مقاوم نشان دادند این در حالی است که در ژنوتیپ حساس در ساعات اولیه بعد از آلودگی تظاهر دو ایزوفرم اسیدی به حداکثرمی رسید و تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی سطح بیان در هردو ژنوتیپ به کمترین سطح تظاهر می رسید. ایزو فرم بازی کیتیناز در ژنوتیپ حساس به میزان بیشتری بیان شده و ایزوفرم بازی بتا- ۱و۳گلوکاناز تظاهر پیدا نکرد. در کل می توان نتیجه گرفت که احتمالا ایزوفرم های اسیدی به خصوص ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز در اعطای مقاومت نسبت به بیماری برق زدگی نخود نقش بیشتری دارد و به نظر می رسد که این دو ایزوفرم اسیدی تاثیر سینرژیستی در القای مقاومت داشته باشند.

کلید واژه ها: پروتئین های مرتبط با پاتوژن، کیتیناز، بتا-۱و۳ گلوکاناز ، برق زدگی نخود، RT-PCR.

سپاسگزاری

پروردگار عالم را سپاس و ستایش می گویم که این توانایی را به من عطا فرمود تا بتوانم تحصیلات مقدماتی و تکمیلی خود را در جوار بارگاه امام رضا به انجام برسانم. بر خود لازم می دانم از استاد محترم، جناب آقای دکتر سید حسن مرعشی که با بزرگواری خویش، راهنمایی اینجانب را بر عهده گرفتند، تشکر و قدردانی کنم.

از اساتید مشاور محترم، خانم دکتر مشتاقی و دکتر کاوسی که در تمام مراحل انجام این پژوهش مرا یاری رساندند، و اساتید مدعو، آقایان دکتر شهریاری و ملک زاده که زحمت تصحیح و داوری این رساله را متقبل شدند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از آقای دکتر امین میرشمسی نماینده تحصیلات تکمیلی به خاطر همکاری ایشان در برگزاری جلسه دفاع پایان نامه سپاسگزارم.

از تکنیسین آزمایشگاه خانم بوستانی که نهایت همکاری را درانجام این تحقیق داشتند و از همه اساتید و دانشجویان گروه به خاطر کمک هایی برای انجام این تحقیق داشتند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

و در نهایت از پدر و مادرم به خاطر تمامی زحماتی که در دوران پر فراز و نشیب زندگی ام متحمل شده‌اند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

فهرست مطالب

فصل ۱ مقدمه

مقدمه ۱

فصل ۲ بررسی منابع

۲-۱- نخود زراعی..... ۳
۲-۲- بیماری برق زدگی نخود..... ۴
۲-۳- مکانیسم های دفاعی گیاهان..... ۶
۲-۳-۱- سیستم های دفاعی قبل از آلودگی در گیاه نخود..... ۷
۲-۳-۲- مقاومت اکتسابی سیستمیک..... ۸
۲-۴- مکانیسم های دفاعی القاء شونده توسط پاتوژن..... ۸
۲-۵ - پروتئین های مرتبط با پاتوژن..... ۹
۲-۵-۱- القاء PRپروتئین ها..... ۱۳
۲-۵-۲- کارکردهای احتمالی PRپروتئین ها در گیاهان..... ۱۵
۲-۶- خانواده PR-2..... ۱۶
۲-۶-۱- بتا ۱و۳ گلوکانازهای گیاهی..... ۱۶
۲-۶-۲- طبقه بندی بتا۱و۳ گلوکانازهای گیاهی..... ۱۸
۲-۶-۳- وظایف احتمالی بتا ۱و۳ گلوکانازها در مکانیسم دفاعی گیاهان..... ۱۹
۲-۶-۴- القاء بتا ۱و۳ گلوکانازها..... ۲۰
۲-۶-۵- ممانعت از رشد قارچی و تولید محرک ها..... ۲۱

۲-۶-۶- نقش سن گیاه در مقاومت به پاتوژن..... ۲۲
۲-۶-۷- بررسی بیان ژن‌های بتا۱و۳گلوکاناز در گیاهان تراریخته..... ۲۳
۲-۷- پروتئین PR-3 ..... ۲۴
۲-۷-۱- کیتینازهای گیاهی..... ۲۴
۲-۷-۲- طبقه بندی کیتینازها..... ۲۵
۲-۷-۳- ویژگی های بیوشیمیایی کیتینازها..... ۲۷
۲-۷-۴- نقش کیتینازها..... ۲۷
۲-۷-۵- گیاهان تراریخته با ژن های کیتیناز..... ۲۹
۲-۸- بررسی الگوی بیان ژن..... ۳۰
۲-۸-۱- نسخه برداری معکوسRT-PCR ۳۱
۲-۸-۲- RT-PCR استاندارد ۳۲
۲-۸-۳- RT-PCR نیمه کمی..... ۳۲
۲-۸-۴- سنجش کمی بیان ژن یا Real-Time RT-PCR..... ۳۳
۲-۸-۵- آنالیز بیان ژن های بتا-۱و۳ گلوکاناز و کیتیناز..... ۳۵

فصل ۳ مواد روش

۳-۱- مواد گیاهی و شرایط رشد..... ۳۷
۳-۲- آماده سازی نمونه‌ی قارچ و تهیه سوسپانسیون اسپور..... ۳۷
۳-۲-۱- تلقیح گیاهان نخود با پاتوژن قارچی ۳۹
۳-۳- تهیه نمونه های گیاهی..... ۳۹
۳-۳-۱- استخراج RNA..... ۴۰

۳-۳-۲-اعمال تیمار DNase ۴۰
۳-۳-۳- تعیین غلظت RNA ۴۰
۳-۳-۴- سنتز رشته مکمل cDNA ۴۱
۳-۳-۵- نانو دراپ نمونه های cDNA سنتز شده ۴۱
۳-۳-۶- طراحی آغازگرها ۴۱
۳-۳-۷- بهینه نمودن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی نمونه‌های استخراج شده DNA ۴۳
۳-۳-۸- یکسان‌سازی cDNAی با استفاده از یوبی کوئیتین ۴۳
۳-۳-۹- یافتن تعداد سیکل مناسب برای تکثیر خطی در واکنش PCR ۴۴
۳-۳-۱۰- تکثیر ژن‌های اختصاصی ۴۵
۳-۳-۱۱- آنالیز ژل الکتروفورز ۴۵

فصل ۴ نتایج و بحث

۴-۱- نتایج کشت و تلقیح قارچ *Ascochyta rabiei* ۴۷
۴- ۲- نتایج استخراج DNA ۴۷
۴-۳- نتایج تست آغازگرها ۴۸
۴-۴- نتایج استخراج RNA ۴۸
۴-۵- نتایج یکسان سازی cDNAی با استفاده از یوبی کوئیتین ۴۹
۴-۶- نتایج RT-PCR ژن های اختصاصی ۵۰
۴-۶-۱- بررسی بیان ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز ۵۱
۴-۶-۲- بررسی بیان ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز ۵۲

۴-۶-۳- بررسی بیان ایزوفرم بازی ژن کیتیناز.....۵۳

۴-۶-۴- بررسی بیان ایزوفرم بازی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز.....۵۴

۴-۷- بحث.....۵۴

فصل ۵ نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- نتیجه گیری کلی ۵۹

۵-۲- پیشنهادات ۶۰

پیوست ها ۶۱

منابع ۷۴

فهرست شکل ها

شکل ۲-۱ نسبت تنش های زیستی وغیر زیستی در میزان تحقیقات انجام شده برای ایجاد مقاومت در نخود..... ۴

شکل ۲-۲ چرخه زندگی قارچ *Ascochyta rabiei* ۶

شکل۲-۳ ساختار مولکولیP14a از اعضای خانواده PR-1 گوجه فرنگی..... ۱۱

شکل۲-۴ تولید محرک های مشتق شده از پاتوژن و تحریک دیگر PRپروتئین ها ۱۴

شکل۲-۵ ساختار سه بعدی بتا-۱و۳ گلوکاناز جو ایزوزایم GII..... ۱۷

شکل ۳-۱ قارچ *Ascochyta rabiei* رشد کرده در محیط کشت CDA..... ۳۸

شکل ۳-۲ برگ های نخود آلوده به بیماری برق زدگی نخود..... ۳۹

شکل ۴-۱ باندهای DNA ژنومی استخراج شده از گیاه نخود زراعی با روش CTAB در ژل ۱/۲ درصد آگارز..... ۴۸

شکل ۴-۲ واکنش PCR انجام گرفته در ۲۸ چرخه با استفاده از نمونه های DNA ژنومی نخود زراعی و آغازگرهای..... ۴۸

شکل۴- ۳ باندهای RNA ریبوزومی با کیفیت مطلوب و استخراج شده با کیت ترایزول RNA- x plus سیناژن..... ۴۹

شکل ۴-۴ یوبی کویتین یکسان شده در ۱۲ نمونه مورد مطالعه، چاهک های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶، به ترتیب نشان دهنده..... ۵۰

شکل ۴-۵ الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز در گیاهان نخود طی ۲۴ چرخه تکثیر..... ۵۱

شکل ۴-۶ الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز در گیاهان نخود طی ۲۴ چرخه تکثیر..... ۵۲

شکل ۴-۷ الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ایزوفرم بازی ژن کیتیناز در گیاهان نخود طی ۲۸ چرخه تکثیر..... ۵۲

شکل۴- ۸ الگوی بیان ژن های a) ایزوفرم اسیدی ژن کیتیناز، b) ایزوفرم اسیدی ژن بتا-۱و۳ گلوکاناز، c) ایزوفرم بازی ژن کیتیناز در ژنوتیپ های حساس و مقاوم نخود بعد از آلودگی با قارچ *A. rabiei* ۵۵

فهرست جداول

جدول۲- ۱ خانواده هایPR پروتئین های شناخته شده..... ۱۰

جدول۳-۱ نوع و کد ژن های مورد استفاده ۴۲

جدول۳-۲ توالی پرایمرهای ژنهای اختصاصی و ژن خانه دار ۴۲

جدول ۳-۳ غلظت و حجم بهینه اجزای واکنش PCR..... ۴۴

فهرست علائم و اختصارات

CBD	chitin-binding domain	دومین متصل شونده به کتین
CDA	Chickpea Dextrose Agar	کشت جامد عصاره نخود
CDB	Chickpea Dextrose Broth	محیط کشت مایع عصاره نخود
PR	Pathogen related	پروتئین های مرتبط به پاتوژن
SAR	Systemic Acquired Resistance	مقاومت اکتسابی سیستمیک

فهرست پیوستها

پیوست۱ دستورالعمل استفاده از هموسایتومتر و نحوه شمارش اسپورها.....۶۲

پیوست ۲ طرز تهیه محیط کشت جامد نخود.....۶۳

پیوست ۳ مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت RNX^{TM}-Plus سیناژن.....۶۴

پیوست ۴ استخراج DNA.....۶۵

پیوست ۵ سنتز رشته اول cDNA.....۶۷

پیوست۶ اسامی لاتین ۶۹

فصل ۱

مقدمه

بیماری‌ها یکی از مهمترین عوامل زیستی بازدارنده تولید حبوبات در دنیا به شمار می روند. این عوامل روی کمیت و کیفیت محصولات اثر گذاشته و خسارت سنگینی را به کشاورزان وارد می سازند. تمامی گونه های مهم زراعی حبوبات از جمله نخود، عدس، لوبیا، لوبیا چشم بلبلی، باقلا و غیره توسط قارچ ها مورد حمله قرار گرفته و خسارت می بینند. وقوع و میزان خسارت این عوامل تا حد زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی است. کشاورزان برای مقابله با خسارت ناشی از پاتوژن های قارچی، از سموم شمیایی استفاده می کنند که این سموم شیمیایی علاوه بر خطرات زیست محیطی، بسیار هزینه بر و پر زحمت می باشند. استفاده از ارقام مقاوم از جمله راهبردهای مدیریت بیماری های گیاهی است که مطالعات زیادی برروی آنها توسط اصلاح کنندگان نباتات انجام می شود. تحقیق در زمینه راهبرد های مهندسی ژنتیک برای مقابله با قارچ ها بسیار با ارزش است زیرا می تواند جایگزین مناسبی برای قارچ کش ها باشد که اکنون کاربرد آنها خسارت زیادی به محیط زیست وارد می کنند. ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری های قارچی یک زمینه در حال رشد در مهندسی ژنتیک می باشد و تولید گیاهان مقاوم به بیماریهای قارچی شامل یک سری مراحل می باشد. اولین مرحله در تولید گیاهان مقاوم، شناسایی ژنوتیپ هایی از گیاهان است که مقاومت خاصی را نسبت به عامل بیماری از خود نشان می دهند. در مرحله بعد شناسایی ژن های عامل مقاومت می باشد سپس این ژنها را با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک به گیاه

مورد نظر انتقال می دهند. به گزینی برای شناسایی ژن های کاندیدا را می توان از طریق استعمال عوامل بیماری زا در محیط کشت شناسایی کرد. تاکنون تعداد زیادی از ژن های گیاهی که در تولید پروتئین های ضد میکروبی نقش دارند، شناسایی شده اند. اکثر این ژنها در پاسخ به آلودگی و یا در مواجهه پاتوژن ها در سطح نسخه برداری فعال می شوند. فرآورده های این ژن ها شامل آنزیم های هیدرولیتیک نظیر پروتئین های مرتبط با بیماریزایی[1] مانندکیتیناز و گلوکونازها و غیره می باشند. آنزیم های هیدرولیزکننده نظیر کیتیناز و گلوکاناز موجب تخریب دیواره سلولی قارچها می شوند. گیاهان تراریخته شده با این ژن ها مقاومت بیشتری نسبت به گیاه شاهد نشان داده اند(یاماموتو و همکاران، ۲۰۰۰). ژن های تولید کننده این پروتئین ها در برخی گیاهان از جمله نخود قابل القاء بوده و سبب القاء پاسخ های اختصاصی میزبان شده و بنابراین گیاه می تواند در برابر پاتوژن پایداری کند. تعدادی از این پروتئین ها دارای ایزوفرم های مختلفی هستند از آنجا که همه ایزوفرم های این نوع از ژن ها فعال نبوده و فعالیت یک ژن نیز لزوما منجر به ساخت آنزیم های هیدرولیز کننده نمی شود، به نظر می رسد با دانستن الگوی بیان این ژن ها می توان مقاومت گیاهان را به بیماری ها افزایش داد.

در مطالعه حاضر تغییرات الگوی بیان ژن ایزوفرم های اسیدی و بازی ژن های کیتیناز و بتا-۱و۳ گلوکاناز در زمانهای مختلف پس از آلودگی با قارچ بیماری برق زدگی ، در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به بیماری برق زدگی بررسی شده است تا واکنش گیاه به آلودگی قارچی مورد ارزیابی قرار گرفته و نقش هر کدام از این ژن ها در ایجاد مقاومت به بیماری، مشخص شود.

[1] Pathogensis related protein

فصل دوم

بررسی منابع

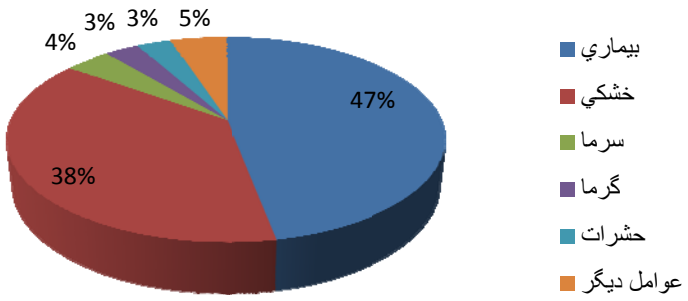
۲-۱- نخود زراعی

نخود زراعی(*Cicer arietinum* L.) گیاهی خود گشن، دیپلوئید (2n=2x=16)، یکساله و با ژنوم هاپلوئید کوچک (738 Mbp) است(آروموقانتان و ارل، ۱۹۹۱). این گیاه در مناطق خشک و نیمه خشک جهان کشت می شود. نخود زراعی در بین حبوبات دارای مقام سوم جهانی و مقام اول در نواحی مدیترانه و جنوب آسیا است. این گیاه به لحاظ تثبیت ازت توسط باکتریهای ریزوبیوم موجود در گره های ریشه آن و میزان پروتئین بذرهایش نقش مهمی در تناوب زراعی با محصولات دیگر از جمله غلات دارد. اصلی ترین کشور های تولید کننده نخود در جهان به ترتیب هند، پاکستان، ترکیه، ایران و استرالیا هستند(قان و همکاران، ۲۰۰۵). سطح زیر کشت نخود در ایران ۵۶۰ هزار هکتار و تولید سالیانه آن در حدود ۲۰۸ هزار تن است. بعلاوه بنظر می رسد که این گیاه نسبت به دیگر حبوبات، سازگاری بیشتری با شرایط اقلیمی کشور دارد و باتوجه به محدودیت های موجود در تامین پروتئین های حیوانی، می تواند بخشی از پروتئین مورد نیاز را تامین نماید. اما میانگین عملکرد نخود در ایران که حدود ۳۷۲ کیلوگرم در هکتار است نسبت به میانگین عملکرد جهانی که حدود ۸۸۰ کیلوگرم در هکتار است بسیار پایین است (فائو، ۲۰۰۹). بذر نخود محتوی ۳۰-۲۰ درصد پروتئین، تقریبا ۴۰ درصد کربوهیدرات و تنها ۶-۳ درصد

روغن می باشد(قیل و همکاران، ۱۹۹۶) و علاوه بر آن نخود منبع خوبی برای کلسیم، منیزیم، پتاسیم، فسفر، آهن، روی و منگنز می باشد(ایبریکسی و همکاران، ۲۰۰۳).

۲-۲- بیماری برق زدگی نخود

بیماریهای گیاهی از عوامل کاهش عملکرد نخود زراعی هستند بخصوص بیماری های قارچی نظیر برق زدگی و پژمردگی فوزاریومی که اثرات مخرب زیادی بر نخود دارند به گونه ای که تمام اندام های گیاه از قبیل ریشه، ساقه، برگ، گل و غلاف گیاه را مورد حمله قرار می دهند (باقری و همکاران، ۱۳۷۶). انجام پژوهش های تحقیقاتی در زمینه مقاومت به بیماری ها در گیاه نخود نسبت به سایر تنش های از اهمیت بیشتری برخورداراست(شکل ۲-۱)(کانونی و همکاران، ۲۰۱۱). در بین بیماریهای قارچی، بیماری برق زدگی نخود یا *Ascochyta blight* یکی از مهمترین بیماری های نخود (*Cicer arientinum*) است، که عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrnsse می باشد (مندن و همکاران، ۱۹۷۵). این بیماری مهمترین عامل محدود کننده کشت زمستانه نخود است (شکوهی فر و همکاران، ۱۳۸۵) شیوع و شدت این بیماری به شرایط آب و هوایی بستگی دارد و شرایط محیطی مناسب برای رشد نخود برای رشد عامل بیماری زا نیز مناسب است.



شکل ۲-۱ نسبت تنش های زیستی وغیر زیستی در میزان تحقیقات انجام شده برای ایجاد مقاومت در نخود