فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول –کلیات

۱-۱- مقدمه ۶

فصل دوم –بررسی منابع

۲-۱- مقدمه ۹

۲-۲- مکانیسم‌های مقاومت به بیماری در گیاهان ۱۰

۲-۲-۱ شناسایی پاتوژن و انتقال سیگنال به درون گیاه ۱۰

۲-۲-۲ فیتوآلکسین‌ها ۱۲

۲-۲-۳ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی ۱۳

۲-۳ مروری بر ژن‌های مرتبط با مقاومت ۱۵

۲-۳-۱ پروتئین‌های PR-1 ..... ۱۵

۲-۳-۲ کیتینازها ۱۵

۲-۳-۳ پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۷

۲-۳-۴ آنزیم‌های بازدارنده پروتئاز ۱۹

۲-۳-۵ پراکسیداز ۲۰

۲-۳-۶ آنزیم‌های ریبونوکلئاز ۲۱

۲-۳-۷ دفنزین ۲۲

۲-۳-۸ تیونین ۲۴

۲-۳-۹ پروتئین‌های انتقال دهنده چربی ۲۵

۲-۳-۱۰ آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز ۲۶

۲-۴ بیماری سپتوریوز برگی ۲۷

۲-۴-۱ عامل بیماری ۲۸

۲-۴-۲چرخه عامل بیماری ۲۸

۲-۴-۳ علائم بیماری ۳۰

۲-۴-۴ روش‌های کنترل بیماری ۳۱

۲-۴-۵ مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی ۳۱

۲-۴-۶ الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت ۳۳

۲-۵ روش‌های بررسی بیان ژن ۳۴

۲-۵-۱ فن آوری ریز آرایه ۳۴

عنوان	صفحه

۲-۵-۲ RT-PCR ۳۴
۲-۵-۲-۱ Real time RT-PCR ۳۵
۲-۵-۲-۲ RT-PCR نیمه کمی ۳۵
۲-۵-۳ ژن‌های مرجع یا خانه‌دار (Housekeeping gene) ۳۶
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱ مواد گیاهی مورد استفاده ۳۷
۳-۲ کشت و تلقیح گیاه با قارچ(*Mycosphaerella graminicola*) ۳۸
۳-۳ نمونه برداری از برگ گیاهان ۳۸
۳-۴ استخراج RNA ۳۸
۳-۵ تعیین کیفیت و کمیت RNA ۳۹
۳-۵-۱ تعیین کمیت ۳۹
۳-۵-۲ تعیین کیفیت ۳۹
۳-۶ سنتز cDNA رشته اول ۴۰
۳-۷ واکنش RT-PCR نیمه کمی (Semi quantitative RT-PCR) ۴۱
۳-۸ الکتروفورز فراورده های PCR ۴۲
۳-۹ نحوه تعیین تعداد سیکل و دمای اتصال برای هر جفت پرایمر ۴۳
۳-۱۰ کلون و توالی یابی ۴۳
۳-۱۰-۱ تکثیر قطعه مورد نظر و تایید آن بر روی ژل آگارز ۴۳
۳-۱۰-۲ خالص‌سازی فراورده PCR ۴۴
۳-۱۰-۳ کلونینگ ۴۴
۳-۱۰-۴ تهیه competent باکتری *E.coli* ۴۶
۳-۱۰-۵ انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *Ecoli* ۴۶
۳-۱۰-۶ تایید باکتری‌های تراریخت با واکنش PCR ۴۷
۳-۱۰-۷ استخراج پلاسمید ازباکتری *E.coli* ۴۸
۳-۱۰-۸ تایید پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از PCR ۴۹
۳-۱۰-۹ توالی یابی ۴۹
۳-۱۱ آنالیزهای آماری ۵۰
فصل چهارم: نتایج و بحث
۴-۱ تعیین کیفیت RNA ۵۱
۴-۲ تعیین تعداد سیکل و دمای اتصال مربوط به هر جفت پرایمر ۵۲
۴-۳ معرفی ژن‌های مورد بررسی ۵۳

عنوان	صفحه
۴-۴ ژن کیتیناز II	۵۴
۴-۵ ژن پراکسیداز	۵۸
۴-۶ ژن PR-1	۶۲
۴-۷ ژن LTP2	۶۶
۴-۸ ژن کد کننده پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتئاز (PIS)	۷۰
۴-۹ ژن کد کننده پروتئین شبه تئوماتین (TLP)	۷۳
۴-۱۰ ژن s-Like RNase	۷۷
۴-۱۱ تعیین توالی قسمتی از ژن‌ها جهت تایید با استفاده از بانک جهانی ژن	۸۰
۴-۱۱-۱ نتیجه الکتروفورز فراورده Colony PCR	۸۰
۴-۱۱-۲ الکتروفورز فرآورده واکنش PCR پلاسمیدهای استخراج شده	۸۱
۴-۱۱-۳ نتایج حاصل از توالی یابی	۸۲
۴-۱۱-۴- نتایج بلاست نوکلئوتیدی	۸۳
۴-۱۱-۴-۱ ژن پراکسیداز	۸۳
۴-۱۱-۴-۲ ژن کیتیناز II	۸۴
۴-۱۱-۴-۳ ژن PR-1	۸۴
۴-۱۱-۴-۴ ژن LTP2	۸۴
۴-۱۱-۴-۵ ژن کد کننده آنزیم بازدارنده پروتئاز (PIS)	۸۴
۴-۱۱-۴-۶ ژن TLP	۸۴
۴-۱۱-۴-۷ ژن s-Like RNase	۸۴
۴-۱۱-۴-۸ ژن دفنزین (Defensin)	۸۵
۴-۱۱-۵ مقایسه شباهت توالی ژن‌های مورد بررسی برای دو رقم فلات و ونگشوبای	۸۵
۴-۱۱-۶ بررسی بلاست پروتئینی دو ژن LTP و دفنزین	۸۶
۴-۱۱-۶-۱ دفنزین	۸۶
۴-۱۱-۶-۲ LTP2	۸۷
۴-۱۱-۷ ثبت توالی‌های نوکلئوتیدی دو ژن دفنزین و LTP2 در بانک ژن NCBI	۸۸
۴-۱۲ نتیجه گیری کلی	۸۹
۴-۱۳ پیشنهادات	۹۰
پیوست ۱	۹۱
پیوست ۲	۹۲
پیوست ۳	۹۴
پیوست ۴	۹۴
منابع	۱۰۴

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۲-۱ چرخه عامل بیماری ۳۰
شکل ۳-۱ پلاسمید pJET ۴۴
شکل ۴-۱ الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد RNA استخراج شده از برگ ۵۱
شکل ۴-۲ نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده RT-PCR ژن پراکسیداز با ۲۷ سیکل، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ۵۲
شکل ۴-۳ الگوی بیان ژن کیتیناز طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۵۶
شکل ۴-۴ مقایسه روند تغییر بیان ژن کیتیناز تحت تنش بیماری در دو رقم فلات و ونگشوبای ۵۷
شکل ۴-۵ الگوی بیان ژن پراکسیداز در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۶۰
شکل ۴-۶ مقایسه روند تغییر بیان ژن پراکسیداز تحت تنش در دو رقم فلات و ونگشوبای ۶۱
شکل ۴-۷ الگوی بیان ژن PR-1 در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۶۴
شکل ۴-۸ مقایسه روند تغییر بیان ژن PR-1 تحت تنش بیماری در دو رقم فلات و ونگشوبای ۶۵
شکل ۴-۹ نمونه‌ای از الکتروفورز RT-PCR مربوط به ژن LTP در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی ۶۷
شکل ۴-۱۰ الگوی بیان ژن LTP2 در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۶۸
شکل ۴-۱۱ مقایسه روند تغییر بیان ژن LTP2 تحت تنش در دو رقم فلات و ونگشوبای ۶۹
شکل ۴-۱۲ الگوی بیان ژن PIS در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۷۱
شکل۴-۱۳ مقایسه روند تغییرات بیان ژنPIS تحت تنش در دو رقم فلات و ونگشوبای ۷۲
. شکل ۴-۱۴ نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده RT-PCR مربوط به افزایش بیان ژن TLP ۷۴
شکل ۴-۱۵ الگوی بیان ژن TLP در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۷۵
شکل ۴-۱۶ مقایسه روند تغییرات بیان ژن TLP تحت تنش بیماری در دو رقم فلات و ونگشوبای ۷۶
شکل ۴-۱۷ الگوی بیان ژن s-Like RNase در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی ۷۸
شکل ۴-۱۸ روند تغییرات بیان ژن s-Like RNase تحت تنش در دو رقم فلات و ونگشوبای ۷۹
شکل ۴-۱۹ نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده Colony PCR سه ژن کیتیناز، PR-1 و TLP ۸۰
. شکل ۴-۲۰ نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده PCR پلاسمیدهای استخراج شده ۸۱
شکل ۴-۲۱ نمایی از بلاست نوکلئوتیدی سایت NCBI ۸۳
شکل ۴-۲۲ تصویری از بررسی شباهت توالی نوکلئوتیدی دو رقم فلات و ونگشوبای در محیط نرم افزار Vector NTI10 ۸۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱ طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی ۱۴
جدول ۳-۱ اجزاء واکنش سنتز cDNA در مرحله اول ۴۰
جدول ۳-۲ اجزا واکنش سنتز cDNA در مرحله سوم ۴۰
جدول ۳-۳ اجزاء واکنش RT-PCR ۴۱
. جدول ۳-۴ برنامه حرارتی PCR ۴۱
جدول ۳-۵ لیست پرایمرهای مورد استفاده ۴۲
جدول ۳-۶ اجزای واکنش Ligation در مرحله اول ۴۵
جدول ۳-۷ اجزای واکنش Ligation در مرحله سوم ۴۵
جدول۳-۸ اجزاء واکنش Colony PCR ۴۷
جدول ۳-۹ توالی پرایمر مورد استفاده در Colony PCR ۴۸
جدول ۳-۱۰ برنامه حرارتیColony PCR ۴۸
جدول ۴-۱ تعداد سیکل و دمای اتصال مناسب مربوط به هر ژن ۵۲
جدول۴-۲ توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر ژن پس از حذف پلاسمید ۸۲

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه:

با توجه به نقش حیاتی و استراتژیک کشاورزی در استقلال کشور و رسالت سنگینی که این بخش در پیشبرد توسعه ملی و تامین نیازهای انسانی جامعه ایفا می‌کند برنامه ریزی و توجه به منبع غذایی و تصمیم‌گیری مناسب برای به حداکثر رساندن تولیدات زراعی از یکسو و پایداری تولید از سوی دیگر ضرورتی اجتناب ناپذیر است (باقری و همکاران، ۱۳۸۱).

در بین محصولات کشاورزی، گندم (*Triticum aestivum*) اولین و مهم‌ترین محصول (غله) ایران و جهان می‌باشد و از آغاز خلقت انسان و زیست وی روی کره زمین تا کنون مهم‌ترین نقش را در زندگی او داشته و این نقش با زندگی اجتماعی انسان‌ها اهمیت بیشتری پیدا کرده است (خدابنده، ۱۳۷۹). گندم شاید اولین گیاه زراعی باشد که اهلی شده و توسط انسان کشت گردیده است. این فرایند احتمالا ابتدا در خاور نزدیک و میانه بین ۱۲۰۰۰ تا ۱۸۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح شروع شده است. غرب و شمال غرب ایران به عنوان غنی‌ترین گستره در بر گیرنده اجداد گندم زراعی و جزء اولین مراکز تنوع برای گندم و خویشاوندان آن است (راشد محصل و حسینی، ۱۳۷۶). این گیاه امروزه به مقدار زیاد و در مساحت وسیعی از زمین‌های کشاورزی دنیا کشت گردیده و محصول کافی تولید می‌نماید. سطح زیر کشت گندم در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار می‌باشد. سطحی که از سطح کشت تک تک گیاهان زراعی و همچنین غلات دیگر بیشتر است و در حدود ۲۲٪ سطح زیر کشت کلیه غلات و غذای قریب به ۳۵ درصد مردم جهان را تشکیل می‌دهد.

این گیاه سرمادوست بوده و در تمام ماه‌های سال و مناطق با عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۵۰ درجه عرض شمالی و ۲۵ تا۴۰ درجه عرض جنوبی قابل کشت و برداشت می‌باشد (فانی، ۱۳۸۷). اهمیت اقتصادی گندم چه از نظر تغذیه و چه از نظر تولید در دنیا بیش از سایر محصولات کشاورزی می‌باشد و حتی در مناطقی که به علت متغیر بودن شرایط اقلیمی امکان تولید گیاه دیگری نباشد می‌توان گندم تولید نمود. تولید گندم در دنیا در درجه اول برای تغذیه انسان و در درجه دوم برای تغذیه پرندگان و حیوانات و مصارف صنعتی می‌باشد. آردی که از گندم حاصل می‌شود حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد انرژی غذایی را تأمین می‌نماید (خدابنده، ۱۳۷۹). با افزایش جمعیت جهان، اهمیت غلات به خصوص گندم به عنوان منبع تامین کننده غذای مورد نیاز انسان رو به فزونی است. لذا ایجاب می‌نماید که بیشترین توجه به مطالعه و پژوهش در مورد این محصول استراتژیک به عمل آید تا با توجه به استعداد سرشاری که کشور وسیع ایران در خصوص تنوع آب و هوایی دارا می‌باشد بتوان نسبت به افزایش تولید و نیل به خود کفایی پایدار قدم‌های موثری برداشت (فانی، ۱۳۸۷).

یکی از عوامل مهم کاهش دهنده عملکرد گندم، بیماری‌ها و آفات می‌باشد. بر اساس آمار منتشر شده توسط سازمان خواربار جهانی، آفات و بیماری‌های گیاهی همه ساله منجر به کاهش ۳۵ درصد از تولیدات گندم می‌شود (اخوت،۱۳۸۷). بیماری‌های مهم گندم شامل بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها می‌باشند. برخی از بیماری‌ها مهم گندم و عوامل ایجاد کننده آن‌ها در پیوست شماره ۱ آورده شده است. یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی گندم، بیماری سپتوریوز برگی (*Septoria tritici* Leaf Blotch (STB)) می‌باشد که بوسیله قارچ (*Mycosphaerella graminicola*) ایجاد می‌شود.

قارچ عامل بیماری، ابتدا در سال ۱۸۴۲ توسط دسمازیرس در فرانسه گزارش شد. در سال ۱۹۸۲ کاهش جهانی محصول گندم در اثر بیماری‌های ناشی از سپتوریا ۹ میلیون تن برآورد گردید. میزان کاهش محصول در اثر این بیماری ۳۱٪ تا ۵۳٪ در آلودگی‌های شدید گزارش شده است (کیا و ترابی، ۱۳۸۷). رطوبت و بارندگی زیاد و دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد باعث گسترش این بیماری خواهد شد (آدهیکاری وهمکاران، ۲۰۰۳). این پاتوژن از طریق روزنه‌ها وارد برگ شده و بعد از آن هیف‌های قارچ در بین سلول‌ها رشد می‌کند (آدهیکاری وهمکاران، ۲۰۰۷). علائم این بیماری در ابتدا بصورت لکه‌های زرد روشن و بعد به رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز ظاهر می‌شود.

روش‌های مورد استفاده برای کنترل این بیماری مواردی از قبیل: استفاده از بذر عاری از بیماری، زیر خاک کردن بقایای گیاهی، ایجاد تناوب زراعی ۳-۲ ساله، ایجاد و استفاده از ارقام مقاوم به STB و استفاده از سموم شیمیایی از قبیل نوآریمول، تیوفانات متیل، بنومیل و پروکلوراز می‌باشد (صادقی، ۱۳۸۸).

اصلاح گندم برای مقاومت و استفاده از ارقام مقاوم به این بیماری تنها روش اقتصادی برای کنترل این بیماری در بیشتر نقاط جهان می‌باشد (آدهیکاری و همکاران،۲۰۰۷). اگر چه ارزیابی‌های فنوتیپی در اصلاح گندم برای مقاومت به STB موفقیت آمیز است اما نیازمند زمان و منابع ژنتیکی کافی می‌باشد. همچنین بیان مقاومت به میزان زیادی به شرایط محیطی وابسته است، بنابراین شناخت سیستم‌های مقاومت و ژن‌های مرتبط با آن یک ابزار مفید برای انتخاب است.

بر اساس گزارشات بررسی شده ۱۵ ژن (Stb1-Stb15) ایجاد کننده مقاومت بـه سـپتوریوزبرگی (STB) در گنـدم شناخته شده است (رامان و همکاران، ۲۰۰۹). شناسایی این ژن‌ها و انتقال از طریق مهندسی ژنتیک مـی‌توانـد در ایجاد ارقام مقاوم موثر باشد اما متاسفانه ارقام دارای مقاومت تک ژنی بعد از مدتی مقاومت خود را بـه علـت تغییـر فراوانی نژاد قارچ در مزرعه از دست می‌دهند (چارتراین و همکاران،۲۰۰۵).

مطالعات انجام شده جهت شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به سـپتوریوز برگـی از طریـق تکنیـک cDNA AFLP نشان می‌دهد که در طول پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افـزایش مـی‌یابـد (آدهیکاری و همکاران،۲۰۰۷). این بدان معنی است که در ایجاد مقاومت پایدار تعداد زیادی ژن موثر خواهند بـود لذا جهت بررسی و شناخت دقیق این ژن‌هـا و تعیـین ژن‌هـای مـوثر در ایجـاد مقاومـت بـه منظـور دسـتیابی بـه سیستم‌های مقاومت پایدار لازم است الگوی بیان این ژن‌ها هر کدام به طور جداگانه مطالعه گـردد، زیـرا میـزان و زمان ظهور ژن از عوامل تاثیر یک ژن در ایجاد مقاومت هستند.

هدف از این تحقیق، مطالعه الگوی تظاهر تعدادی از ژن‌های دفاعی در گیـاه گنـدم در زمـان‌هـای مختلـف بعـد از آلودگی به بیماری سپتوریوز برگی است که به منظور تعیین اثرات آن‌ها در ایجاد مقاومت، الگوی تظـاهر آن‌هـا در واریته حساس و مقاوم با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی بررسی خواهد شد و الگوی بیـان ایـن ژن‌هـا در دو رقم مورد مقایسه قرار خواهد گرفت.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱:مقدمه:

یکی از مشکلات بزرگ تولید محصولات کشاورزی، بیماری‌های گیاهی می‌باشند که از گذشته دور همواره بر کمیت و کیفیت تغذیه انسان‌ها اثر گذار بوده و باعث خسارات اقتصادی، زیست– محیطی و سیاسی- اجتماعی فراوانی شده‌اند (سعیدی، ۱۳۸۵). نابودی محصول سیب زمینی ایرلند در اثر بیماری سفیدک دروغین در سال‌های ۱۸۴۵ و ۱۸۴۶ و پیامدهای آن از قبیل قحطی عمومی، مرگ صدها هزار نفر و مهاجرت حدود یک و نیم میلیون ایرلندی به آمریکا، باعث افزایش اهمیت بیماری‌های گیاهی و توجه بیشتر به عوامل آن شد (آگریوس، ۲۰۰۵).

طبق یک تخمین محافظه‌کارانه، هم اکنون بیماری‌ها، حشرات و علف‌های هرز در سطح جهانی سالانه بین ۳۱ تا ۴۲ درصد محصولات کشاورزی را نابود و یا از تولید آن‌ها جلوگیری می‌کنند. میزان خسارت معمولا در کشورهای پیشرفته پایین‌تر است و در کشورهای در حال پیشرفت که نیاز غذایی بیشتری دارند بالاتر است (آگریوس، ۲۰۰۵). مواردی از قبیل: جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا، تناوب زراعی، عملیات به‌زراعی، استفاده از سموم شیمیایی، کنترل بیولوژیکی، روش‌های فیزیکی و ایجاد ارقام مقاوم از طریق اصلاح نباتات از استراتژی‌های کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشند (آهون‌منش، ۱۳۷۹).

ده‌ها هزار بیماری وجود دارد که به گیاهان اهلی در سراسر جهان صدمه می‌زنند. هر یک از بیمارگرها نیز در هر جا ممکن است از یک واریته و یا صدها گونه گیاه متفاوت را آلوده کند. اگر چه گیاهان مورد حمله پاتوژن، ممکن است به میزان کم یا زیادی صدمه ببینند ولی معمولا با استفاده از مکانیسم‌های دفاعی مختلف از رشد، تکثیر و گسترش پاتوژن جلوگیری کرده و معمولا با رشد مطلوب و تولید محصول قابل توجهی به زندگی ادامه می‌دهند (ایزد پناه، ۱۳۸۹).

۲-۲ مکانیسم‌های مقاومت به بیماری در گیاهان:

دفاع گیاه در برابر پاتوژن‌ها ترکیب پیچیده‌ای از خصوصیات ساختاری گیاه و واکنش‌های بیوشیمیایی القاء شده می‌باشد. خصوصیات ساختاری میزبان اولین خط دفاعی گیاهان در مقابله با پاتوژن‌ها می‌باشد. برخی ساختارهای دفاعی حتی قبل از تماس با پاتوژن موجود هستند. چنین ساختارهایی عبارتند از: نوع و مقدار موم و کوتیکول، ویژگی‌های ساختمانی سلول‌های بشره، اندازه، محل و شکل روزنه‌ها، عدسک‌ها و وجود بافت‌هایی در سطح گیاه که با سلول‌های ضخیم خود مانع پیشرفت بیمارگر می‌شوند. علی رغم وجود ساختارهای دفاعی سطحی یا داخلی از پیش موجود، بسیاری از بیمارگرها قادر هستند به گیاهان میزبان خود نفوذ کرده و درجات مختلف آلودگی را ایجاد کنند. گیاهان حتی بعد از عبور پاتوژن از ساختارهای دفاعی، معمولا ساختارهای دفاعی دیگری از جمله ساختارهای دفاعی بافتی، ساختارهای دفاعی سلولی و واکنش دفاعی سیتوپلاسمی را ایجاد می‌کنند (آگریوس، ۲۰۰۵).

با وجود آنکه خصوصیات ساختمانی یک گیاه درجات متفاوتی از مقاومت در برابر بیمارگرهای مختلف را تامین می‌کنند، شواهد روز افزون نشان می‌دهد که مقاومت یک گیاه در برابر پاتوژن، ارتباط چندانی با خصوصیات ساختمانی آن نداشته و بیشتر به مواد تولید شده توسط سلول‌های آن قبل و یا بعد از آلودگی مربوط می‌شود و این نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی با طبیعت شیمیایی نیز در ایجاد مقاومت علیه بیماری‌ها موثر می‌باشند (ایزد پناه، ۱۳۸۹).

۲-۲-۱شناسایی پاتوژن و انتقال سیگنال به درون گیاه:

شناسایی هر چه سریع‌تر بیمارگر توسط گیاه چنانچه گیاه بخواهد با بسیج کردن دفاع‌های ساختاری و بیوشیمیایی در دسترس، از خود در برابر پاتوژن حفاظت نماید بسیار مهم است.

ساده‌ترین مدل شناسایی عوامل بیماریزا به وسیله گیاه بر اساس بر هم‌کنش الیسیتورها با گیرنده‌های گیاه و تظاهر این بر هم‌کنش به صورت شناسایی عامل بیماری و به تبع آن یک پاسخ دفاعی می‌باشد. این الیسیتورها اغلب ترکیباتی با وزن مولکولی پایین می‌باشند که به دو نوع عمومی و اختصاصی تقسیم می‌شوند.

الیسیتورهای غیر اختصاصی شامل زهرابه‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب، پپتیدها و آنزیم‌های خارج سلولی میکروبی از قبیل پروتئازها و پکتینازها می‌باشد. در ترکیب‌های متعدد میزبان-بیمارگر، برخی از مواد تراوش شده توسط بیمارگر از جمله محصولات ژن‌های avr به عنوان الیسیتورهای اختصاصی پاتوژن در شناسایی بوسیله میزبان‌های خاص عمل می‌کنند (همتی، ۲۰۰۹). ظهور مقاومت در بر هم‌کنش میزبان و عامل بیماری مستلزم بیان ژن غیر بیماریزا (avr) در عامل بیماری و ژن مقاومت (R) در میزبان می‌باشد. این مقاومت ژن برای ژن مبنا و اساس سیستم دفاعی برانگیخته شده در گیاهان است (ایزد پناه، ۱۳۸۹). این استراتژی اولین بار توسط فلور (۱۹۹۵) پیشنهاد شد و در نهایت پیشروی پاتوژن و یا القای مقاومت در گیاه را تعیین می‌کند و شامل مسیرهای مولکولی و هورمونی متعددی است که اطلاعات زیادی از آن‌ها در دست نیست. این نظریه در ساده‌ترین شکل بیان می‌کند که گیاهان دارای یک ژن مقاومت غالب (R) هستند که بطور اختصاصی پاتوژنی را که دارای ژن

مغلوب غیر بیماریزای (avr) متناظر با آن است، شناسایی می‌کنند. طبق این نظریه وقتی گیاهی به پاتوژنی مقاوم است پاتوژن، غیر بیماریزا و بر هم‌کنش آن‌ها ناسازگاری نام می‌گیرد در مقابل وقتی گیاهی حساس است پاتوژن آن بیماریزا و بر هم‌کنش آن‌ها سازگاری نامیده می‌شود. تاکنون ۲۰ ژن R با شناسایی اختصاصی برای ژن‌های avr مشخص از هفت گونه مختلف گیاهی شامل دو لپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها جدا شده که در برابر باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و شته‌ها مؤثرند (آگریوس، ۲۰۰۵).

محل گیرنده‌های گیاهی که مسئول شناسایی الیسیتورهای پاتوژن هستند، عموما مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد محل تعدادی از آن‌ها که مورد بررسی قرار گرفته‌اند در بیرون یا در سطح غشاء سیتوپلاسمی بوده در حالیکه بقیه آن‌ها درون سلولی هستند. گیرنده‌های گیاهی را می‌توان بر حسب مشخصات ساختمانی به گروه‌های مختلفی از جمله، پروتئین کینازهای گیرنده مانند پروتئین‌های شبه کینازی (Receptor-Like Kinase) با نام اختصاری RLK، گیرنده‌های هیستیدین کینازی و گیرنده‌های دارای چندین ناحیه تراغشائی تقسیم کرد همچنین گیاهان دارای یک سیستم تشخیص برای الیسیتورهای غیر اختصاصی، به نام PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) می‌باشند. این مولکول‌ها رسپتورهایی با پیوستگی بالا هستند که در غشاء پلاسمایی قرار گرفته‌اند (ایزد پناه، ۱۳۸۹).

وقتی که الیسیتورهای مشتق شده از بیمارگر توسط گیاه میزبان شناسایی گردید، مجموعه‌ای از علامت‌های اخطاری به سوی پروتئین‌های سلولی و ژن‌های هسته میزبان ارسال می‌شود. برخی از مواد علامت دهنده و جریان انتقال علامت درون سلولی بوده ولی در بسیاری از موارد، علامت‌ها به صورت سیستمیک به اکثر تا تمامی قسمت‌های گیاه منتقل می‌شود. مولکول‌های علامت دهنده به طور دقیق مشخص نیست. متداول‌ترین این انتقال دهنده سیگنال‌ها شامل پروتئین کینازهای مختلف، یون‌های کلسیم، فسفریلازها، ATPaseها، آب اکسیژنه (H_2O_2)، اتیلن و ترکیبات دیگر هستند. انتقال سیستمیک علامت که منجر به مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌گردد، توسط سالیسیلیک اسید، اولیگو گالاکتورونیدهای که از دیواره سلولی گیاهان آزاد می‌شوند، جاسمونیک اسید، سیستمین، اسیدهای چرب، اتیلن و مواد دیگر صورت می‌پذیرد (آگریوس، ۲۰۰۵).

یکی از رویدادهایی که در انتقال پیام نقش دارد، مرگ سریع سلولی یا واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive reaction) می‌باشد. واکنش فوق حساسیت که به اختصار HR گفته می‌شود یک دفاع القاء شده سلولی در گیاه میزبان در محل آلودگی با پاتوژن است. در واکنش فوق حساسیت به محض برقراری تماس پاتوژن با سلول زنده، مواد صمغ مانندی سیتوپلاسم سلول میزبان را در بر می‌گیرد. سلول مورد تهاجم شروع به تجزیه شدن می‌کند و در چنین شرایطی عامل بیماریزا دیگر قادر به ادامه رشد و خروج از چنین سلول‌هایی نبوده و تهاجم بیشتر آن متوقف می‌شود (آگریوس، ۲۰۰۵). معمولا تفاوتی از نظر نحوه رخنه پاتوژن در گیاه حساس و مقاوم وجود ندارد. با وجود این در بسیاری از ارقام مقاوم، سلول‌های آلوده بعد از آلودگی به سرعت آب خود را از دست داده، قهوه‌ای شده و می‌میرند در حالیکه سلول‌های ارقام حساس مدت زمان بیشتری زنده می‌مانند. در ارقام مقاوم تغییرات فیزیولوژیکی متعددی در سلول‌های آلوده و سلول‌های مجاور آن‌ها بروز می‌کند در حالیکه چنین تغییراتی در سلول‌های ارقام حساس بوجود نیامده و یا با تاخیر رخ می‌دهد (سعیدی، ۱۳۸۵).

اولین پاسخ سلول‌های گیاهی در واکنش HR، تغییر در نفوذ پذیری غشاء سلولی می‌باشد که منجر به ورود یون-های Ca^{2+} و خروج یون‌های $K+$ و CL^- می‌شود که این عمل باعث کنترل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌ها خواهد شد که این تغییر در فسفریلاسیون پروتئین‌ها به نظر می‌رسد به عنوان یک سیگنال برای اکسیژن‌های فعال مانند آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و انواع نیتروژن فعال مانند نیتریک اکسید در فضای خارج سلولی و رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل که بوسیله NADPH اکسیداز قرار گرفته در غشاء پلاسمایی و یا پراکسیدازهای آپوپلاستی کاتالیز می‌شوند عمل می‌کند (اودجاکووا و هادجیوانوا، ۲۰۰۱). علاوه بر اینکه گونه‌های فعال اکسیژن به عنوان انتقال دهنده سیگنال عمل می‌کنند می‌توانند از طریق اکسید کردن ترکیبات فنولی به مواد سمی‌تر کینونی و ترکیبات شبه‌لیگنینی نیز در واکنش‌های دفاعی نقش داشته باشند (ایزد پناه، ۱۳۸۹).

فعال شدن شبکه انتقال سیگنال پس از شناسایی پاتوژن موجب ایجاد تغییرات زیادی در فعالیت ژن‌های دفاعی که در پائین دست ژن‌های R قرار دارند و عموماً توسط این سیگنال‌ها بیان می‌شوند، می‌گردد.

به این ترتیب، ژن‌هایی که در بروز مقاومت با پاتوژن‌ها در گیاهان نقش دارند شامل دو گروه ژن می‌باشند: اول ژن‌های R که پروتئین‌های کد شده توسط این گروه از ژن‌ها موجب تشخیص پاتوژن توسط گیاه شده و در مسیرهای انتقال سیگنال دخالت دارند و دوم ژن‌های مرتبط با دفاع که محصول این ژن‌ها، پروتئین‌هایی هستند که مستقیماً در نابودی پاتوژن نقش دارند گرچه در بسیاری موارد دیده شده که این ژن‌ها بطور مستمر بیان می‌شوند ولی بیان این ژن‌ها به مقدار زیادی در اثر حمله پاتوژن افزایش می‌یابد. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR پروتئین‌ها) اشاره کرد.

۲-۲-۲ فیتوآلکسین‌ها:

فیتوآلکسین‌ها ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی کم هستند. این ترکیبات بر خلاف ترکیبات فنلی عادی (موادی از قبیل اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و اسید اسکوپولتین) که در گیاهان سالم هم وجود دارند به مقدار قابل توجه فقط بعد از تحریک‌های ناشی از عوامل بیماریزای گیاهی یا زخم‌های ناشی از عوامل فیزیکی و شیمیایی بوجود می‌آیند. این پروتئین‌ها یکی از ترکیبات مهم تولید شده در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید می‌باشند. فیتوآلکسین‌ها معمولا بوسیله سلول‌های سالم مجاور سلول‌های مرده و آسیب دیده تولید می‌شوند. بیشتر فیتوآلکسین‌های شناخته شده برای بیمارگرهای قارچی سمی می‌باشند اما بعضی برای باکتری‌ها، نماتدها و بعضی از موجودات دیگر نیز سمی هستند (آگریوس، ۲۰۰۵). ظاهرا تولید فیتوآلکسین‌ها در گیاهان حساس به بیمارگر در اثر تولید مواد سرکوب کننده توسط بیمارگر متوقف می‌شوند که به نظر می‌رسد سرکوب کننده‌ها نیز از انواع گلوکان‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا زهرهای ترشح شده توسط بیمارگر باشند (الهی نیا، ۱۳۷۲).

۲-۲-۳ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (Pathogenesis related protein):

گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی از طریق بیان ژن‌های خاص و سنتز پروتئین‌های متعدد از خود دفاع می‌کنند. در بین این پروتئین‌های القائی یک گروه پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی وجود دارد که در اثر حمله پاتوژن یا شرایط مشابه در میزبان تولید می‌شوند. این پروتئین‌های دفاعی از تکثیر و توزیع پاتوژن جلوگیری می‌کنند (سعیدی، ۱۳۸۵). این پروتئین‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۰ از بافت‌های تنباکو آلوده شده با ویروس موزائیک تنباکو (TMV) جداسازی شدند و هم اکنون در تعداد زیادی گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای یافت شده است (ولازهان و همکاران، ۱۹۹۹). این پروتئین‌ها مولکول‌های کوچکی در حدود ۴۳-۶ کیلو دالتون می‌باشند و در pHهای پایین (pHکمتر از۳) پایدار هستند و نسبت به پروتئازها دارای مقاومت بالایی می‌باشند (ادروا و همکاران، ۲۰۰۵).

ثابت شده است PR پروتئین‌ها در همه اندام‌های گیاهی شامل برگ، ساقه، ریشه و گل‌ها وجود دارند که البته میزان آن‌ها در برگ بیشتر می‌باشد و حدود ۱۰-۵ درصد کل پروتئین‌های برگ را تشکیل می‌دهند که در بافت اپیدرمی و مزوفیلی برگ و در ناحیه برش اتصال دمبرگ به ساقه و بافت آوندی ساقه و دمبرگ قرار دارند.

بر اساس شباهت خصوصیات بیوشیمیایی، توالی آمینواسیدی و توالی نوکلئوتیدی ایزوفرم‌هایی از PR پروتئین‌ها یافت شده است که ممکن است همواره در گیاهان نیز یافت شوند که در این حالت به آن‌ها پروتئین‌های شبه مرتبط با بیماریزایی گفته می‌شود. در بسیاری از گیاهان تجمع این گروه از پروتئین‌ها در اندام‌های تولید مثلی و ذخیره‌ای (مانند بذر) مشاهده شده است (ادروا و همکاران، ۲۰۰۵). در سال ۱۹۸۷ بر اساس تکنیک‌های مولکولی و مولکولی-ژنتیکی، ۵ گروه اصلی PR پروتئین در گیاه تنباکو شناسایی شد و با مطالعه پروتئین‌های مشابه در گیاه گوجه فرنگی تقسیم بندی آن‌ها به ۱۱ گروه افزایش یافت و در حال حاضر تعداد زیادی از این پروتئین‌ها شناسایی و بر اساس ساختار اولیه، ارتباط سرولوژیکی، توالی آمینواسیدی و فعالیت بیولوژیکی به ۱۷گروه طبقه بندی شده‌اندکه در جدول ۲-۱ آورده شده است (ون لون و ون استرین، ۱۹۹۹).

معمولا هر گروه از پروتئین‌ها شامل دو زیرگروه اسیدی و بازی می‌باشند. زیر گروه بازی در واکوئل سلول‌ها و زیر گروه اسیدی در فضای خارج سلولی ترشح می‌شود (سلیترنیکوف، ۲۰۰۱). معیارهای مورد استفاده برای طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی عبارتند از: ۱- بیان پروتئین‌ها باید توسط پاتوژن در بافت‌هایی که به طور طبیعی پروتئین را تولید نمی‌کنند القاء شود. ۲- بیان پروتئین‌ها باید حداقل در یک نوع بر هم‌کنش پاتوژن-میزبان در آزمایشگاه‌های مختلف به اثبات رسیده باشد (ون لون و ون‌استرین، ۱۹۹۹).

برای نامگذاری و قرار دادن یک پروتئین جدید در گروه خاصی از پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی لازم است اطلاعات در هر دو سطح نوکلئیک اسید و پروتئین جمع آوری شود (سعیدی، ۱۳۸۵ و ادروا و همکاران، ۲۰۰۵).

جدول ۲-۱: طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی

خانواده	خصوصیات	مکان هدف	نوع گیاه
PR-1	Antifungal	ناشناخته	Tobacco PR-1a
PR-2	b-1,3-Glucanase	b-1,3-Glucan	Tobacco PR-2
PR-3	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)	Chitin	Tobacco P, Q
PR-4	Chitinase class I,I	Chitin	Tobacco "R"
PR-5	Thaumatin-like	Membrane	Tobacco S
PR-6	Proteinase-inhibito	گزارش نشده	Tomato Inhibitor I
PR-7	Endoproteinase	گزارش نشده	Tomato P6g
PR-8	Chitinase class III	Chitin	Cucumber chitinase
PR-9	Peroxidase	گزارش نشده	Tobacco"lignin-forming peroxidase"
PR-10	Ribonuclease-like	گزارش نشده	Parsley "PR1
PR-11	Chitinase class I	Membrane	Tobacco class V chitinase
PR-12	Defensin	Membrane	Radish Rs-AFP3
PR-13	Thionin	Membrane	*Arabidopsis* THI2.1
PR-14	Lipid-transfer protein	گزارش نشده	Barley LTP4
PR-15	Oxalate oxidase	گزارش نشده	Barely Oxoa (germin)
PR-16	Oxalate oxidase-like	گزارش نشده	Barely OXOLP
PR-17	ناشناخته	گزارش نشده	Tabacco PRp27

۲-۳ مروری بر ژن‌های مرتبط با مقاومت

۲-۳-۱ پروتئین‌های PR-1:

پروتئین‌های PR-1 اولین PR پروتئین‌هایی می‌باشند که در سال ۱۹۷۰ توسط ون‌لون و ون‌کامن از برگ‌های تنباکو آلوده شده با ویروس موزائیک تنباکو یافت شدند. این پروتئین‌ها ۱۴ تا ۱۶ کیلو دالتون وزن داشته و به میزان فراوان در هنگام آلودگی در بافت‌ها تجمع می‌یابند و در حدود ۱ تا ۲ درصد پروتئین‌های برگ را تشکیل می‌دهند. بنابراین بیان ژن‌های PR-1 می‌تواند به عنوان معیاری برای فعالیت پاسخ دفاعی گیاه در نظر گرفته شود در مورد عملکرد و فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌های PR-1 اطلاعات کمی در دسترس است. مشخص شده است که در قسمت انتهایی C این پروتئین‌ها، ۱۰ تا ۱۶ سیستئین به صورت ثابت وجود دارد و پروتئین‌های PR-1 بوسیله این ناحیه غنی از سیستئین با مکان‌های هدف خود باند می‌شوند (بوچل و لینتورست، ۱۹۹۹).

فعالیت این پروتئین‌ها در مکانیسم دفاعی گیاه ابتدا در آلودگی‌های ویروسی کشف شد. بعد از آن مطالعات زیادی در زمینه فعالیت آن‌ها در دفاع گیاه صورت گرفته است، به طور مثال، جوستن و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که پروتئین‌های PR-1 در گوجه فرنگی در هنگام آلودگی با *Cladosporium fulvum* به میزان فراوانی بیان شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شوند. همچنین الکساندر و همکاران در سال ۱۹۹۳ گزارش کردند که گیاهان ترانسژن شده تنباکو که پروتئین *PR-1a* را تولید می‌کنند دارای مقاومت بالایی نسبت به دو پاتوژن قارچی oomycete می‌باشند. نیدرمن و همکاران (۱۹۹۵) نیز گزارش نمودند که پروتئین‌های PR-1 جدا شده از گوجه فرنگی و تنباکو دارای فعالیت علیه *Phythopthora infestans* می‌باشند.

آگراوال و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که در اثر آلودگی برنج با بیماری قارچی بلاست، دو ژن *osPR1b* و *osPR1a* متعلق به گروه PR-1 القاء و باعث ایجاد مقاومت به این بیماری می‌شود. اسکولتیس و همکاران (۲۰۰۳) نیز نشان دادند که پروتئین‌های *PR-1b* بازی در گیاه جو در مکانیسم‌های ایجاد مقاومت نسبت به بیماری سفیدک پودری دخیل می‌باشد و تجمع این پروتئین‌ها باعث بهبود مقاومت علیه این بیماری خواهد شد.

همچنین گرین و فلور (۱۹۹۵) نشان دادند که این پروتئین‌ها در اثر تابش اشعه uv نیز تجمع می‌یابند و مشخص کردند تجمع آن‌ها در ۱۰ساعت تابش مداوم قابل تشخیص است.

۲-۳-۲ کیتیناز (PR-3، PR-4، PR-8 و PR-11)

کیتین یک پلیمر می‌باشد که از طریق پیوند بتا ۴,۱ به N-acetylglucosamine اتصال یافته است. این پلیمر به عنوان یک ترکیب ساختاری تقریبا در همه موجودات وجود دارد. به طور طبیعی با دیگر مواد از قبیل پلی‌ساکارید و پروتئین ترکیبات پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهد.

آنزیم کیتیناز (poly[1,4-(N-acetyl-B-D) glucosaminide]glycanhydrolase) باند B-1,4-glycosid را در کیتین هیدرولیز می‌کند (پونجا و زانگ،۱۹۹۳). این آنزیم‌ها بر اساس فعالیتشان به اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز تقسیم می‌شوند. اندوکیتینازها به طور تصادفی پپتیدهای گلیکوسید داخلی را تجزیه کرده و الیگومرهای کیتین را

تولید می‌کنند. اگزوکیتینازها انتهای زنجیره کیتین را تجزیه کرده و تولید مونومرهای N-acetyl می‌کند (نیوهاس و همکاران ۱۹۹۶).

این آنزیم‌ها اولین بار در سال ۱۹۱۱ توسط برنارد معرفی شدند. بر اساس برخی از مشاهدات و مطالعات از جمله القاء و افزایش بیان ژن‌های کیتیناز در طی واکنش فوق حساسیت و بافت‌های آلوده شده با پاتوژن حدس زده می شود که کیتینازها در دفاع گیاه نقش دارند.کیتینازها از رشد هیف‌های قارچ جلوگیری می‌کنند. همچنین با داشتن فعالیت لیزوزیمی می‌توانند پپتیدوگلیکان (peptidoglycan) موجود در دیواره سلولی باکتری را هیدرولیز کرده و مانع از رشد آن‌ها شوند (پونجا و زانگ، ۱۹۹۳).

علاوه بر نقش آن‌ها در دفاع گیاه مشخص شده است که این آنزیم‌ها در مراحل ویژه‌ای از نمو گیاه و پروسه‌های فیزیولوژیکی مهم گیاهی از قبیل نمو جنین سوماتیکی، سنتز اتیلن، پروسه رسیدگی میوه و جوانه زنی دانه دخیل می‌باشند. کیتینازهای گیاهی دارای وزن مولکولی در حدود ۲۵ تا ۳۶ کیلو دالتون می‌باشند و هر دو نوع بازی و اسیدی آن‌ها شناخته شده است (پونجا و زانگ، ۱۹۹۳).

بر اساس توالی آمینو اسیدی این پروتئین‌ها به ۷ کلاس تقسیم می‌شوند.کیتینازهای کلاس Ia، Ib، II، IV ، V، VI VIIبه عنوان PR-3، کلاس III به عنوان PR-8 و کلاس I و II به عنوان PR-11 طبقه بندی می‌شوند. ثابت شده است که همه انواع آن‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی هستند اما از لحاظ نوع سوبسترا و فعالیت متفاوتند به طور مثال کیتینازهای اسیدی (کلاس II و III) جدا شده از تنباکو یا نخود دارای فعالیت ضد قارچی کمتری نسبت به کیتینازهای بازی (کلاس I) می‌باشند. بنابراین همه کیتینازها دارای فعالیت ضد قارچی کافی نیستند (پونجا و زانگ ،۱۹۹۳).

مطالعات متعددی نقش این آنزیم‌ها را در دفاع گیاه به اثبات رسانده است به عنوان مثال کاروسو و همکاران (۲۰۰۱) چهار پروتئین (wheatwin1 تا wheatwin4) متعلق به گروه PR -4 را از دانه‌های گندم جدا کردند و نشان دادند که این پروتئین‌ها دارای فعالیت ضد قارچی علیه قارچهایی از قبیل *Botrytis cinerea*، *Fusarium culmurum*، *Fusarium graminearum* می‌باشند. همچنین الداچ و همکاران (۲۰۰۱) با انتقال ژن کیتیناز از گیاه جو به گندم، گیاهان تراریختی ایجاد کردند که مقاومت نسبتا بالایی نسبت به بیماری سفیدک پودری نشان دادند. کایروباکاران و ساکتیول (۲۰۰۷) یک ژن کیتیناز (متعلق به گروه I کیتیناز) را از ژنوم جو جدا سازی و درون باکتری *E.coli* کلون کردند و مشخص شد که پروتئین تولیدی از این ژن دارای وزن ۳۵ کیلو دالتون می‌باشد و از رشد قارچهای :*Botrytis cinerea*، *Pestalotia thea*، *Bipolaris oryzae*، *Alternaria sp*، *Curvularia lunata* و *Rizoctonia solani* جلوگیری می‌کند.

پاک و همکاران (۲۰۰۹) ژنی به نام *ogchitIV* (متعلق به گروه PR-3 و گروه IV کیتینازها) را از برنج وحشی (*Oryza grandiglumis*) جداسازی و به گیاه آرابیدوپسیس انتقال دادند. گیاهان ترانسژن شده آرابیدوپسیس مقاومت متوسطی نسبت به *Botrytis cinerea* نشان دادند.

لی و همکاران (۲۰۰۹) ژن جدیدی از گروه PR-4 به نام *LrPR4* را از زنبق (*Lycoris radiata*) جداسازی نمودند و بعد از کلون در باکتری *E.coli* مشخص کردند که پروتئین تولیدی از این ژن از رشد قارچ *Magnaporthe grisea* جلوگیری می‌کند.

کیتینازهای آپوپلاستی در مراحل اولیه دفاع علیه پاتوژن موثر می‌باشند و از طریق تجزیه دیواره سلولی قارچ منجر به تولید الیگومرهای کیتین شده که این مولکول‌ها توسط رسپتورهایی از قبیل PAMP شناسایی شده و با انتقال اطلاعات و فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی از ورود هیف‌های قارچ به فضای درون سلولی جلوگیری می‌کند (تایرا و همکاران، ۲۰۰۵) ولی کیتینازهای واکوئلی دارای اثرات ثانویه بوده و از طریق هضم کیتین منجر به لیز شدن سلولی و مانع رشد قارچ درون میزبان خواهند شد (ولازهان و همکاران، ۱۹۹۹).

۲-۳-۳ پروتئین‌های شبه تئوماتین ((Thaumatin-like protein(TLP)، PR-5

پروتئین‌های PR-5 دسته‌ای از پروتئین‌های سبک وزن (۱۵ تا ۳۰ کیلودالتون) می‌باشند که در شرایط مناسب تا سطوح بالا (۱ تا ۱۲درصد کل پروتئین) در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابند. بررسی‌های اولیه نشان داد که توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های PR-5 مشابه پروتئین‌های شیرین مزه تئوماتین موجود در میوه گیاهان قطبی جنس *Thaumatococcus* می‌باشد. پروتئین‌های تئوماتین در بسیاری از کشورها به صورت طعم دهنده و شیرین کننده غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد و این در حالی است که هیچ کدام از اعضای خانواده پروتئین‌های شبه تئوماتین مزه شیرین ندارند (ولازهان و همکاران، ۱۹۹۹).

پروتئین‌های شبه تئوماتین دارای وزن مولکولی ۳۰-۱۵ کیلو دالتون می‌باشند و بر اساس وزن مولکولی به دو گروه عمده ۲۶-۲۲ کیلو دالتون (۲۲۹-۲۰۱ آمینو اسید) و ۱۸-۱۵ کیلو دالتون (۱۵۱-۱۴۸ آمینو اسید) طبقه‌بندی می‌شوند. این پروتئین‌ها ۱۶ سیستئین در توالی خود دارند که منجر به تشکیل ۸ باند دی‌سولفید می‌شود. تشکیل صحیح این باندها برای تاخوردن و فعالیت ضد قارچی این پروتئین‌ها لازم می‌باشد (هو و ردی، ۱۹۹۷).

تولید پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاهان مختلف و در پاسخ به آلودگی‌های میکروبی به میزان زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است. مشخص شده است این پروتئین‌ها از طریق روش‌هایی از قبیل: غیر فعال شدن پروتئازها، ریبوزوم‌ها، هضم دیواره سلولی و پروتئین‌ها، تداخل در تکثیر و کاهش نفوذ بیمارگر، جلوگیری از رشد و شاخه شاخه شدن هیف‌های قارچ، هضم اسپور و یا کاهش جوانه‌زنی اسپور از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کند (ولازهان و همکاران، ۱۹۹۹).

مطالعات نشان داده است که این پروتئین‌ها فعالیت بتا ۱ و ۳ گلوکانازی داشته و باعث تجزیه بتا ۱ و ۳ گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ شده و مانع سنتز دیواره سلولی می‌شود (لیو و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین این پروتئین‌ها دارای فعالیت بازدارندگی آنزیم زیلاناز (Xylanase) می‌باشند. آنزیم‌های زیلاناز در تشکیل زیلان، به عنوان یکی از ترکیبات پلی‌ساکاریدی مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچی، نقش دارند. بنابراین پروتئین‌های TLP با استفاده از فعالیت بازدارندگی که دارند از سنتز دیواره سلولی قارچی جلوگیری کرده و منجر به ایجاد مقاومت در گیاه می‌شوند (فیرنس و همکاران، ۲۰۰۷).

اولین مدرک مبنی بر وجود فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاهان با شناسایی زئوماتین در بذر ذرت بدست آمد. این پروتئین توانست از رشد قارچ‌های *Candida albicans*، *Neurospora crassa* و *Trichoderma reesei* در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند (روبرت و همکاران، ۱۹۹۰).

با مقایسه خاصیت ضد قارچی زئوماتین ذرت با اسموتین (شکل بازی واکوئلی) و PR-S (شکل خارج سلولی اسیدی) از گیاه توتون روی قارچ *Cercospora beticola* مشخص شد که توانایی پروتئین‌های شبه تئوماتین مختلف در جلوگیری از رشد گونه‌های مختلف قارچ متفاوت می‌باشد (ویگرس و همکاران، ۱۹۹۱). مطالعات مشابه در مورد پروتئین‌های شبه تئوماتین *AP24* و *NP24* بدست آمده از توتون آلوده به TMV هم نشان داد که این پروتئین‌ها باعث تجزیه اسپورانژیوم قارچ *Phytophthora infestans* می‌شوند (ولوشوک و همکاران، ۱۹۹۱).

رودریگو و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که *P23* یک پروتئین از گروه ۵ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی با وزن ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد که در گیاه گوجه فرنگی آلوده شده با ویروئید اگزوکوتریس مرکبات تولید می‌شود. اندازه گیری‌های آزمایشگاهی نشان داد که این پروتئین از رشد چندین قارچ بیماریزا از قبیل *Trichothecium roseum*، *Fusarium oxysporium*، *colletotrichum coccodes*، *phytophthora citrophtora* جلوگیری می‌کند. همچنین ژن کد کننده این پروتئین توسط فاگوآگا و همکاران (۲۰۰۱) به گیاه آناناس (*Citrus cinensis*) انتقال داده شد و مشخص شد که تولید این پروتئین باعث افزایش مقاومت در برابر پاتوژن *Phytophthora citrophthora* خواهد شد.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط لین و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد نشان داده شد که ۴ ژن کد کننده پروتئین TLP در گیاهچه‌های یولاف آلوده شده با بیماری زنگ ساقه (*Puccinia graminis*) به میزان زیادی بیان می‌شود و میزان بیان آن در گیاهان آلوده شده با نژاد ناسازگار بیماری بالاتر از حالت سازگار بود.

سعیدی (۱۳۸۵) دو cDNA (tlp-3 و tlp-4) مربوط به پروتئین‌های شبه تئوماتین را در گیاه یونجه یکساله ردیابی نمود و بعد از جداسازی، ژن‌های این دو پروتئین را داخل باکتری *E.coli* کلون کرد و مشخص شد که پروتئین‌های تولیدی توسط این دو ژن از رشد قارچ‌های بیماریزا از قبیل *Rizoctonia solani*، *Altenaria alternate* و *Fusarium graminearum* جلوگیری می‌کند.

اولین بار لینتورست و همکاران در سال ۱۹۸۹، با بیان ژن کد کننده پروتئین PR-S در توتون، گیاهان تراریختی تولید کردند که این پروتئین را به طور دائمی و به مقدار زیاد تولید می‌کردند. با مشاهده خاصیت ضد قارچی زئوماتین، اسموتین و پروتئین‌های شبه تئوماتین علیه قارچ‌هایی نظیر *P.infestans*، *C.albicans*، *N.crassa* و *T.reesei* در شرایط آزمایشگاهی، تلاش برای تولید گیاهان تراریخت بیان کننده این پروتئین‌ها نیز آغاز گردید. از اقدامات دیگر می‌توان به تولید گیاهان سیب زمینی تراریخت بیان کننده ژن اسموتین توتون و *PA13* سیب زمینی اشاره نمود. گیاهان تراریخت ایجاد شده در توسعه علائم بیماری با قارچ *P.infestans* تاخیر نشان می‌دادند (زو و همکاران، ۱۹۹۶). همچنین مکینتوش و همکاران (۲۰۰۷) یک ژن tlp جدا شده از جو را به گندم انتقال دادند. گیاهان تراریخت بدست آمده در هر دو شرایط گلخانه و مزرعه در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت مقاومت بالایی نسبت به بلایت فوزاریومی (Fusarium head blight) نشان دادند. صفوی و همکاران (۲۰۱۱) نیز با انتقال یک ژن کد کننده پروتئین شبه تئوماتین با نام *TLP-3* از گیاه یونجه یکساله به گیاه تنباکو، گیاهان تراریختی ایجاد نمودند که مقاومت بالایی نسبت به قارچ *Alternaria alternate* نشان دادند.

تعدادی از ژن‌های پروتئین‌های شبه تئوماتین با تنش‌های زیستی مانند افزایش اسید آبسزیک، اسید سالسیلیک، خشکی، شوری و سرما القاء می‌شوند. به طور مثال، سه پروتئین شبه تئوماتین با نام‌های *PA13* و *PA81* در سیب

زمینی شناسایی شده‌اند که مقدار هر سه در اثر تیمار با اسید آبسزیک، حرارت پایین و NacL در سلول‌های این گیاه افزایش می‌یابد (ولازهان و همکاران، ۱۹۹۹).
اولین بار خاصیت ضد سرمایی این پروتئین‌ها در برگ‌های چاودار زمستانه مشاهده شد. تجمع پروتئین‌های شبه تئوماتین در بخش خارج سلولی در برخی از ارقام چاودار زمستانه، بادام زمینی، سیب زمینی و جو باعث مقاومت این گیاهان به سرما می‌شوند. این پروتئین‌ها از رشد کریستال‌های یخ در بخش خارج سلولی گیاهان در طی دوران سرما جلوگیری می‌کنند (هاچنگ و همکاران، ۲۰۰۳).

۲-۳-۴ پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتئاز (Protease inhibitors (PIS)):

این پروتئین‌ها اولین بار توسط گرین و ریان کشف شدند و در سال ۱۹۹۴ PIS به عنوان خانواده ۶ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی معرفی شد (گرین و ریان، ۱۹۷۲). این بازدارنده‌ها، پروتئین‌هایی هستند که در بافت‌های گیاهی هم به عنوان تنظیم کننده‌های نمو و هم در پاسخ به حمله حشرات و پاتوژن‌ها بیان می‌شوند (هیتز و همکاران، ۱۹۹۹).
نقش این پروتئین‌ها در محافظت و دفاع گیاه علیه پاتوژن‌ها و بیماری‌های گیاهی ابتدا در سال ۱۹۴۷ زمانی که میکل و استندیش مشاهده کردند که لارو حشرات به صورت نرمال در سویا نمی‌توانند رشد یابند مورد توجه قرار گرفت. بعد از آن ایشان نوع دیگری بازدارنده به نام بازدارنده تریپسین را در سویا یافتند که دارای اثرات سمی بر روی لارو سوسک پودری بود (لاورنس و کاندال، ۲۰۰۲). این پروتئین‌ها اولین بار از دانه‌های سه خانواده لگومینوز، گرامینه و سولاناسه بدست آمدند اما امروزه این پروتئین‌ها با توانایی دفاعی در خانواده‌های گیاهی مختلف یافت شده‌اند.
علاوه بر فعالیت این پروتئین‌ها در مکانیسم دفاعی گیاه مشخص شده که این پروتئین‌ها در تعدادی از پروسه‌های فیزیولوژیکی در نمو گیاه از جمله تنظیم پروتئازها در طی خواب بذر و انتقال پروتئین‌های ذخیره‌ای درگیر می‌باشند (هیتز و همکاران، ۱۹۹۹). پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی معمولا پروتئازهایی را ترشح می‌کنند که معمولا برای رشد لازم نبوده اما برای تجاوز لازم می‌باشد و در مراحل ویژه‌ای از سیکل آلودگی فعالیت می‌کنند. در مقابل گیاهان نیز پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که با این آنزیم‌ها باند شده و از فعالیت آن‌ها از طریق کاهش دادن توانایی پاتوژن در: ۱- استفاده از آنزیم لایتیک مورد نیاز برای بیماریزایی ۲- کاهش توانایی آن‌ها در کامل کردن سیکل تقسیم ۳- کاهش توانایی آن‌ها در بدست آوردن مواد غذایی از طریق هضم پروتئین‌های میزبان و محدودیت در ترشح تعدادی از آمینواسیدها ، در دفاع گیاه نقش دارند (حبیب و فضیلی، ۲۰۰۷).
این پروتئین‌ها به ۴ کلاس آنزیمی پروتئولیتیکی تقسیم می‌شوند که عبارتند از ۱- بازدارنده پروتئیناز سرین (خانواده سرپین) که دو گروه مهم از این خانواده، بازدارنده پروتئیناز باومن بیرک (Bowman-Birk inhibitor) و کونیتز (Kunitz) می‌باشد. ۲- بازدارنده پروتئیناز سیستئین (Cystein proteinase inhibitor) ۳- بازدارنده متالو پروتئیناز (Metallo proteinase inhibitor) ۴- بازدارنده آسپارتیل پروتئیناز (Aspartyl Proteinase inhibitor). (هیتز و همکاران، ۱۹۹۹ و حبیب و فضیلی ، ۲۰۰۷).

بر اساس گزارشات مختلف اثبات می‌شود که ژن‌های بازدارنده پروتئیناز در هنگام آلودگی با میکرو ارگانیسم‌های مختلف القاء می‌شوند. اولین بار پنگ و بلک گزارش کردند که بازدارنده‌های تریپسین و چیموتریپسین در برگ‌های گوجه فرنگی آلوده شده با *Phytophthora infestans* تجمع می‌یابد که این بیان در ارقام مقاوم خیلی قوی‌تر از ارقام حساس می‌باشد. (پنگ و بلنک، ۱۹۷۴). همچنین لوریتو و همکاران (۱۹۹۴) مشخص کردند که PISها از طریق جلوگیری از تریپسین مورد نیاز برای سنتز کیتین، سنتز کیتین را در دیواره سلولی قارچی بلوکه می‌کند .و یا طی مطالعه‌ای بازدارنده‌های تریپسینی از جو بدست آمده‌اند که دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی قارچ‌های فیلامنتوس و باکتری‌های گرم مثبت بودند (لاورنس و کاندال، ۲۰۰۲).

دانیوسکی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که بازدارنده‌های تریپسین گندم سیاه از پروتئازهای *B.cinerea* جلوگیری می‌کند. در مطالعه‌ای دیگر، راشد و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از RT-PCR نیمه‌کمی نشان دادند که میزان بیان ۶ ژن کد کننده آنزیم بازدارنده پروتئاز در ریشه گیاه سویا در اثر آلودگی با نماتد سیست سویا، به میزان زیادی بیان شده و منجر به ایجاد مقاومت خواهد شد.

۲-۳-۵ پراکسیداز (PR-9):

پراکسیدازهای گیاهی گلیکوپروتئین‌هایی می‌باشند که در ساختمانشان گروه هِم به کار رفته است. این آنزیم‌ها برای اکسید کردن انواع مختلف سوبستراهای آلی و غیر آلی از قبیل سیتوکروم c، نیترات، اسید آسکوربیک و ایندول آمین از H_2O_2 یا O_2 استفاده می‌کنند و بر اساس نقطه ایزوالکتریک به عنوان ترکیبات خنثی، اسیدی و بازی شناخته می‌شوند (یوشیدا وهمکاران، ۲۰۰۳). مشخص شده است که این آنزیم‌ها در پروسه‌های فیزیولوژیکی مختلفی از قبیل متابولیسم اکسین، بیوسنتز اتیلن، تشکیل لیگنین، تنفس، پروسه های واسطه نوری، رشد و پیری در گیاه نقش دارند (چیتور و همکاران، ۱۹۹۹).

مکان‌های کاتالیز کننده پراکسیدازهای گیاهی که رنج وسیعی از سوبستراها را کاتالیز می‌کند اغلب ثابت و یکسان می‌باشد بنابراین تفاوت در واکنش پذیری در نتیجه خصوصیات دیگر آنزیم می‌باشد (چیتور و همکاران، ۱۹۹۹).

پراکسیدازها آنزیم‌های کلیدی در پروسه ساخت دیواره سلولی می‌باشند که این پروسه‌ها شامل اکسید شدن فنول، اکسید شدن الکل‌های هیدروکسیل آمین، لیگنینی شدن و سوبری شدن می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت پراکسیدازها به صورت غیر مستقیم در دفاع گیاه موثر هستند. در واقع با باند شدن به دیواره سلولی یا خارج سلولی باعث افزایش مقاومت سد دیواره سلولی شده و از ورود و گسترش پاتوژن جلوگیری می‌کند (یوشیدا و همکاران،۲۰۰۳). در تعدادی از واکنش‌های پاتوژن-گیاه تجمع لیگنین و ترکیبات فنولی با مقاومت گیاه در ارتباط می‌باشد به طور مثال در رقم prelude-sr-5 علیه قارچ *Puccinia graminis* مرتبط با لیگنینی شدن سریع سلول‌های میزبان سوراخ شده می‌باشد. همچنین در گیاه گوجه فرنگی آلوده شده با قارچ *Verticilium albo-atrum* رسوب لیگنین و سوبرین در ایزولاین‌های مقاوم بیشتر از ایزولاین‌های حساس می‌باشد (چیتور و همکاران، ۱۹۹۹).