بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده علوم زراعی

**پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته‌ی گیاهپزشکی گرایش بیماری‌شناسی**

# بررسی مولکولی مقاومت غیر میزبانی گندم رقم دریا در برابر بیماری سفیدک سطحی جو *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

**استادان راهنما**

**دکتر ولی الله بابایی زاد**

**دکتر صفر علی مهدیان**

**استاد مشاور**

**مهندس سید محمد علوی**

**تهیه و تنظیم**

**علی رضائی**

**بهمن ۱۳۹۳**

منّت خدای را عزو جل که طاعتش موجب قربتست و به شکر اندرش مزید نعمت هر نفسی که فرو می رود ممدّ حیاتست و چون بر می آید مفرّح ذات پس در هر نفسی دو نعمت موجودست و بر هر نعمت شکری واجب.

به پاس راهنمایی های بی دریغ استادان گران مایه جناب آقای دکتر ولی الله بابایی زاد، جناب آقای دکتر صفرعلی مهدیان ،جناب آقای مهندس محمد علوی ، جناب آقای مهندس حمیدرضا هاشمی و پرفسور حشمت الله رحیمیان که در راهنمایی اینجانب از هیچ کوششی دریغ ننمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر دهستانی و جناب آقای دکتر شریف که زحمت داوری پایان نامه را بر عهده داشتند متشکرم. از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی، جناب آقای دکتر عباسی که برگزاری جلسه دفاع را بر عهده داشتند تشکر می نمایم.

هم چنین از کارشناسان محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به ویژه جناب آقای مهندس رضائیان که با اینجانب نهایت همکاری را داشتند، تشکر می نمایم.

بر خود لازم می دانم از مدیریت، کارشناسان و پرسنل محترم پژهشکده برنج ومرکبات طبرستان که این پژوهش با حمایت و پشتیبانی آن ها صورت گرفته است، کمال تشکر را داشته باشم.

از دوستان خوبم به خصوص آقایان مهندس امین محمدی پورفرد، مهندس محمد سیاری، مهندس رحیم لو، مهندس حیدری نژاد، مهندس مرادی و دیگر دوستان که با همفکری و مساعدات خود، مرا در تکمیل این پژوهش یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در پایان تلاش خالصانه همه ی سرورانی را که یاریم دادند و از لطفشان مستفیض گشته ام را ارج می نهم و از خداوند منان تمنای بهروزی برای ایشان دارم.

تقدیم به پدر، مادر و خانواده

عزیزم که در تمامی مراحل

زندگی پشتیبان بنده بوده‌اند.

## چکیده

مقاومت غیرمیزبانی توسط تمام گونه‌های یگ گیاه به همه ژنوتیپ‌های گوناگون یک بیمارگر غیرسازگار نشان داده می‌شود و نسبت به مقاومت میزبانی قوی‌تر و پایدارتر است. وجود این سیستم دفاعی بیان کننده این است که چرا گیاهان نسبت به طیف وسیعی از بیمارگر های قوی ایمن و به طور عادی سالم می مانند. مقاومت غیر میزبانی شامل تیپ I و تیپ II است. در تیپ۱مقاومت غیر میزبانی تنها فاز pre-haustorial عمل می‌کند در حالی که در فاز post-haustorial هوستوریوم‌های تشکیل شده بوسیله اپرسوریوم‌هایی که در حصار پاپیلا قرار گرفته‌اند دستخوش HR می شوند. در این بررسی فراوانی رونوشت‌های نه ژن مرتبط با مقاومت در گندم رقم دریا تلقیح شده با قارچ غیر میزبان سفیدک سطحی جو با عامل *Blumeria graminis* f.sp *hordei* با استفاده از تکنیک qRT-PCR و در ساعات ۰، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن‌ها مورد بررسی شامل *PR3, PR2, PR5, NH1, PR1-2, PR9, Peroxidase, Lipase, LTP, MLO* که در مقاومت میزبانی نیز از نقش مهمی برخوردارند مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور بذور گندم ضد عفونی و پس از جوانه زنی در خاک گلدان کاشته سپس گیاهچه‌ها با قارچ سفیدک سطحی جو تلقیح شدند و در ساعات مختلف پس از تلقیح استخراج RNA از نمونه‌ها انجام شد. همچنین از رنگ‌آمیزی DAB برای ردیابی نقاط آلوده به بیماری روی برگ استفاده شد. نتایج بخش میکروسکوپی نشان داد که اسپورهای قارچ سفیدک سطحی (*Bgh* ) قادر به نفوذ به برگ گندم رقم دریا نبودند که دلیل آن فراوانی ایجاد فرم‌های واکنشگر اکسیژن(ROS) در تعامل غیر میزبانی رقم دریا و قارچ *Bgh* بود. پاسخ‌های دفاعی گیاه غیر میزبان شامل تشکیل پاپیلا و ایجاد واکنش فوق حساسیت (HR) از نفوذ قارچ جلوگیری کردند. میانگین درصد اسپورهایی که با تشکیل پاپیلا متوقف شدند ۵۳.۹۵ درصد کل اسپورها بود و اسپورهایی که با HR روبرو و متوقف شدند ۴۰.۲۵ درصد کل اسپورها بود. تعدادی از اسپورها نیز موفق به جوانه زدن نشدندکه ۶.۱۶ درصد کل اسپورها را شامل می شدند. نتیجه این بررسی حاکی از تراکم بالای ترکیبات ROS در سلول های برگ گندم بود که نشان می‌دهد که گونه های فعال اکسیژن نقش مهمی در جلوگیری از کلونیزه کردن و توسعه *Bgh* روی گندم رقم دریا از طریق القای مرگ سلولی و تشکیل پاپیلا ایفا می‌کند و در نتیجه مقاومت غیر میزبانی گندم رقم دریا در برابر *Bgh* تیپ ۲ مقاومت غیر میزبانی است. نتایج این تحقیق در بخش بیان ژن نیز نشان دهنده بیان بالای ژن‌های *PR9, PR5, PR1-2, PAL, LTP,* در مقاومت غیر میزبانی گندم است به طوری که حداکثر بیان ژن‌های *PR1-2, PR5, PR9* در ۲۴ ساعت پس از تلقیح بوده است. از سوی دیگر بیان ژن‌های *PR2,NH1* در ساعات مختلف بعد از آلودگی نسبت به کنترل با کاهش زیادی همراه

بود و نتایج نشان دهنده سرکوب شدن بیان این ژن‌ها در مقاومت غیر میزبانی گندم است. همچنین بیان نشدن ژن *PR3* در مقاومت غیر میزبانی اثبات کننده این است که قارچ در عبور از دیواره سلولی ناتوان بوده است. در بیان سایر ژن‌ها نیز تغییرات اندک اما پر اهمیتی اتفاق افتاده است. با استناد به تصاویر میکروسکوپ فاز معکوس می‌توان گفت که مقاومت غیر میزبانی گندم در برابر سفیدک سطحی جو مربوط به تیپII مقاومت غیر میزبانی است.

**واژه‌های کلیدی**: بیان ژن، مقاومت غیرمیزبانی، گندم، PR protein، Real-time PCR.

## فهرست مطالب

**عنوان** صفحه


۱- فصل اول: مقدمه و کلیات ..... ۲
۱-۱- مقدمه ..... ۲
۱-۲- کلیات ..... ۴
۱-۲-۱ الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر که راه اندازهای سیستم دفاعی هستند ..... ۶
۱-۲-۲-پیوند بین مقاومت غیر میزبانی و مقاومت ژن برای ژن ..... ۷
۱-۲-۳- انتقال سیگنال در طول پاسخ دفاعی ..... ۷
۱-۲-۴- فازهای قبل و بعد از تشکیل هاستوریوم در مقاومت غیر میزبانی ..... ۸
۱-۲-۵- مقاومت قبل از تشکیل هاستوریوم در برابر نفوذ بیمارگر غیر میزبان موثر است ..... ۸
۱-۲-۶- نقش ژنهای R در مرحله پس از تشکیل هاستوریوم ..... ۹
۱-۲-۷- ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک حصار در برابر بیمارگر خارج سلولی ..... ۱۰
۱-۲-۸- درک بیمارگر به وسیله مکانوسنسورهای گیاه ..... ۱۱
۱-۲-۹- سنتز کالوس به عنوان رابط بین دیواره سلولی وغشاء پلاسمایی ..... ۱۲
۱-۲-۱۰- کینازهای مرتبط با دیواره در گیر در زنجیره غشاء پلاسمایی دیواره سلولی ..... ۱۲
۱-۲-۱۱- نقش ATP و ADP خارج سلولی در سیگنالینگ ..... ۱۳
۱-۲-۱۲- AGP سیگنال‌های مولکولی در ماتریکس خارج سلولی ..... ۱۴
۱-۲-۱۳- موتیف‌های RGD در اتصال با غشاء پلاسمایی و دیواره سلولی ..... ۱۴
۱-۲-۱۴- کینازهای گیرنده لکتین ..... ۱۶
۱-۲-۱۵- Lipid rafts یا $DRM_S$ به عنوان سکوی سیگنالی ..... ۱۷
۱-۲-۱۶- سیتواسکلتون و رفت وآمد وزیکول‌ها در آرایش دیواره سلولی ..... ۱۹
۱-۲-۱۷- انفجار اکسیداتیو در فضای آپوپلاست محدود کننده ورود و رشد بیمارگر غیر میزبان ..... ۲۳
۱-۲-۱۸- نقش تنظیم کننده‌های مرگ سلولی در مقاومت غیر میزبانی ..... ۲۵
۲- فصل دوم: بررسی منابع ..... ۲۹
۲-۱- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ..... ۲۹
۲-۲-۱- ژن‌های کد کننده پروتئین های مرتبط با بیماری زایی (PR) ..... ۳۲
۲-۲-۲- بیان ژن ..... ۴۶
۲-۲-۳- آنالیز بیان ژن و روش‌های بررسی بیان ژن مبتنی بر PCR ..... ۴۷
۲-۲-۴- تعریف و مفهوم Real-time PCR ..... ۴۸
۲-۲-۵- استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت DNA مانند SYBR Green ..... ۴۹

۲-۲-۶- مزایای روش Real-time PCR ..... ۴۹
۲-۲-۷- روش بررسی کمی بیان ژن یا Quantitative real-time PCR ..... ۵۰
۲-۲-۸- آنالیز کمی mRNA با استفاده از Real-Time PCR ..... ۵۱
۲-۲-۹- تعیین کمیت نسبی ..... ۵۱
۲-۲-۱۰- کمیت نسبی نرمال شده در برابر توده‌ی واحد ..... ۵۲
۳- فصل سوم: مواد و روش‌ها ..... ۵۵
۳-۱- تهیه رقم مورد نظر و عامل بیماری ..... ۵۵
۳-۲-رنگ آمیزی DAB(3,3'-Diaminobenzidine) ..... ۵۶
۳-۳- طراحی پرایمر ..... ۵۷
۳-۴- استخراج RNA ..... ۵۸
۳-۴-۱- استخراج RNA با روش ترایزول ..... ۵۸
۳-۴-۲- بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ..... ۵۹
۳-۵- تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNase ..... ۶۰
۳-۶- سنتز رشته ای اول cDNA از RNA کل ..... ۶۰
۳-۷- بهینه‌سازی شرایط واکنش Real- Time PCR ..... ۶۱
۳-۸- کنترل آلودگی Real- Time PCR ..... ۶۲
۳-۹- چرخه‌های حرارتی Real- Time PCR ..... ۶۲
۴- فصل چهارم: نتایج ..... ۶۴
۴-۱- سنتز cDNA از RNA کل ..... ۶۴
۴-۲- نتایج میکروسکوپی ..... ۶۶
۴-۳- نتایج آنالیز Real-timePCR ..... ۶۸
۴-۳-۱- ژن *Actin* ..... ۶۸
۴-۴- نمودارهای منحنی تکثیر ..... ۷۹
۵-فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادها ..... ۸۲
۵-۱-بحث و نتیجه گیری ..... ۸۲
۵-۲- پیشنهادات ..... ۸۴
۶- فصل ششم: منابع مورد استفاده ..... ۸۶

## فهرست شکل‌ها

**عنوان** صفحه


شکل۱-۱: طرح شماتیک lipid rafts و اجزاء مختلف آن (Sunil *et al.*,2004).....۱۸

شکل۱-۲: طرح شماتیک تیپ I مقاومت غیر میزبانی.....۲۲

شکل۱-۳: طرح شماتیک تیپ II مقاومت غیر میزبانی.....۲۴

شکل۲-۱- پروتئین *MLO* و ساختار آن .....۴۴

شکل۳-۱- برگ‌های ۷ روزه گندم جهت رنگ آمیزی DAB و انجام بررسی میکروسکوپی شرایط نگهداری گیاهچه های گندم در گلخانه به منظور بررسی میکروسکوپی .....۵۵

شکل۳-۲-گیاهچه‌های ۷ روزه گندم که در شرایط کنترل شده دمای شب ۱۵ درجه، روز ۲۲ درجه و رطوبت نسبی ۶۰ درصد در growth chamber به منظور بررسی مولکولی .....۵۸

شکل۴-۱- تفکیک باندهای RNA بر روی ژل آگارز ( برای اندازه‌گیری اندازه باند از Ladder mix استفاده شد). .....۶۴

شکل۴-۲- تایید ساخت cDNA با استفاده از پرایمرهای Actinکه قطعه‌ای به طول ۱۵۰ bpرا تکثیر می‌کند ۶۴

شکل۴-۳- محصول PCR حاصل از تکثیر cDNA مربوط به ژنهای*LTP*، *MLO*، *Actin* بر روی ژل آگارز ۳ درصد قابل مشاهده گردید. .....۶۵

شکل۴-۴- محصول PCR ژنهای *NH1,PR2,PR5* بر روی ژل آگاروز ۳درصد.....۶۵

شکل۴-۵- محصول PCR حاصل از تکثیر cDNA مربوط به ژن‌های *PR9,Lipase,PAL,PR1* بر روی ژل آگارز ۳ درصد قابل مشاهده است.....۶۶

شکل۴-۶- (A)مراحل پرورش گیاهچه در شرایط کنترل شده گلخانه.....۶۷

شکل۴-۷- پیک منحنی ذوب ژن *Actin* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است .....۶۸

شکل۴-۸- نمودار بیان ژن*NH1* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است.....۶۹

شکل ۴-۹- پیک منحنی ذوب ژن *NH1* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۶۹

شکل ۴-۱۰- نمودار بیان ژن*PR1-2* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است. .....۷۰

شکل ۴-۱۱- پیک منحنی ذوب ژن *PR1-2* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۰

شکل۴-۱۲- نمودار بیان ژن*PR2* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ*Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است.....۷۱
شکل۴-۱۳- پیک منحنی ذوب ژن *PR2* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۱
شکل۴-۱۴- پیک منحنی ذوب ژن *PR3* که نشان دهنده بیان نشدن این ژن در واکنش گندم به قارچ *Bgh*..۷۲
شکل۴-۱۵- نمودار بیان ژن*PR5* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است.....۷۳
شکل۴-۱۶- پیک منحنی ذوب ژن *PR5* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۳
شکل۴-۱۷- نمودار بیان ژن *PR9* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است. .....۷۴
شکل۴-۱۸- پیک منحنی ذوب ژن *PR9* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۴
شکل۴-۱۹- نمودار بیان ژن *PAL* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است. .....۷۵
شکل۴-۲۰- پیک منحنی ذوب ژن *PAL* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۵
شکل۴-۲۱- نمودار بیان ژن *LIPASE* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است. .....۷۶
شکل۴-۲۲- پیک منحنی ذوب ژن *LIPASE* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۶
شکل۴-۲۵- نمودار بیان ژن*LTP* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ*Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است.....۷۷
شکل۴-۲۶-پیک منحنی ذوب ژن *LTP* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است. .....۷۸
شکل۴-۲۷- نمودار بیان ژن *MLO* گندم در ساعات ۰،۶،۱۲،۲۴،۳۶ پس از آلودگی با قارچ *Bgh* که به ترتیب ساعت از ۰ تا ۴ شماره گذاری شده است. .....۷۸
شکل۴-۲۸- پیک منحنی ذوب ژن *MLO* که به صورت تک پیک در تصویر قابل مشاهده است.....۷۹
شکل۴-۲۹- منحنی تکثیر *NH1, PR2, PR5* .....۷۹
شکل ۴-۳۰- منحنی تکثیر *PR1-2, MLO, LTP*.....۸۰
شکل۴-۳۱- منحنی تکثیر *LIPASE, POX, PAL*.....۸۰

## فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ۱-۱: لیست برخی از ژن‌ها که در مقاومت غیر میزبانی نقش دارند.(Uma *et al*.,2011) ..... ۲۰

جدول۳-۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در qRT- PCR ..... ۵۷

جدول۳-۲- مواد بکار رفته و مقادیر آن در تیمار با آنزیم DNase I ..... ۶۰

جدول۳-۳- مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA..... ۶۱

جدول۳-۴- شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های Real-time PCR در حجم 25 میکرولیتر ..... ۶۱

جدول۳-۵- چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ۶۲

# فصل ۱

# مقدمه

# ۱- فصل اول: مقدمه و کلیات

## ۱-۱- مقدمه

گندم نان *Triticum aestivum* یکی از مهمترین محصولات زراعی جهان بوده که به همراه ذرت و برنج تقریبا غذای اصلی (۹۵٪) از مردم جهان را تشکیل می‌دهد (Akhtar *et al*., 2011). قارچ سفیدک پودری گندم با عامل ( *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*( *syn. Erysiphe graminis DC* f.sp. *tritici* یکی از بیمارگرهای مخرب گندم در سراسر جهان می‌باشد بدین نحو که با تشکیل هاستوریوم در سطح گیاه از سلول‌های گیاه تغذیه می‌کند (*Both and Spanu, 2004*). این قارچ از شاخه Ascomycota و راسته Erysiphales است و برای تغذیه به بافت زنده گیاه وابسته است و به ندرت میزبان خود را می‌کشد. به علت اینکه برای رشد و تکثیر نیازمند گیاه زنده است به این قارچ بیمارگر بیوتروف اجباری می‌گویند ( Both and Spanu, 2004 ;Oberhaensli *et al*., 2011). خسارت این بیماری در حالت هجوم خفیف ۱۳٪ تا ۳۴ ٪ برآورد شده است این در حالی است که در هجوم شدید این بیماری ۵۰٪ تا ۱۰۰٪ محصول را از بین می‌برد (*Alam et al., 2013; Li et al., 2011; Zhang et al., 2008*). ممکن است علایم این بیماری در مدت زمان کمی بعد از حمله ظاهر شود و به طور معمول برگ‌ها را آلوده می‌کند ولی ممکن است در تمام اندام‌های هوایی توسعه پیدا کند(*Piarulli et al., 2012*). این قارچ در سطح میزبان مستقر می‌شود و با تشکیل هوستوریوم‌های داخل سلولی به سلول‌های گیاه نفوذ می‌کند.

از مشخصات این قارچ رنگ سفید و کرکی اسپورها یا کلونی میسلیوم و کنیدی است که با پیشرفت بیماری این رنگ به قهوه‌ای-خاکستری تبدیل می‌شود بافت گیاه مورد هجوم با این جوش‌ها زرد شده و کم‌کم قهوه‌ای رنگ می‌شوند(*Agrios, 2005*). خسارت حقیقی سفیدک پودری بستگی به زمان شروع اپیدمی و شدت آن دارد. این بیماری در مناطقی که عرض جغرافیایی بالایی داشته و در آن غلات به تناوب کشت می‌شوند، بسیار مخرب است. اگرچه سفیدک پودری گندم به عنوان یک بیماری خسارت‌زا در آفریقا، آسیا،

استرالیا، اروپا و در سرتاسر آمریکا شناخته شده است (Miller and Pollard, 1976) با این حال خسارت شدید این بیماری در مناطق ساحلی و نیمه قاره‌ای ایجاد می‌شود. اما این بیماری در مناطق گرم خشک نیز اهمیت پیدا کرده است و این به دلیل تغییر در شیوه‌های کاشت همچون آبیاری، کشت گیاهانی با ژنتیک یکسان در سطح گسترده، استفاده از تنظیم کننده‌های رشد همچون Chlormequat و افزایش استفاده از کودهای ازت برای مثال در کشورهایی همچون چین (Roelfs , 1977) ، روسیه(Basova, 1987)، جنوب و غرب آسیا وشمال و شرق آفریقا (Saari and Wilcoxson,1974) است.

در حمله بیمارگر به گیاه میزبان، دو حالت مقاومت میزبانی در گیاه ظاهر می‌شود که مقاومت کمی (پرژنی) و یا کیفی (ژن اختصاصی) نامیده می‌شود. مقاومت کمی توسط تعداد زیادی ژن ایجاد می‌شود و نسبت به مقاومت کیفی پایدارتر است و گیاهانی که در برابر بیمارگر از این مقاومت برخوردارند به صورت رضایت بخش از خود دفاع می‌کنند. اما در مقاومت کیفی گیاه میزبان به ازای هر بیمارگر که قادر به حمله به آن است دارای یک ژن یا تعداد معدودی ژن مقاومت است و بیمارگر نیز حامل ژن‌های متقابل ناپرآزاری برای هر ژن مقاومت در گیاه است(Agrios, 2005). گیاهان با طیف وسیعی از بیمارگرهای میکروبی روبرو می‌شوند اگر هر بیمارگری هر گیاهی را آلوده کند گیاهان برای زنده ماندن کار مشکلی خواهند داشت. مقاومت در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها به وسیله بیشتر گونه‌های گیاهی به عنوان مقاومت غیر میزبانی شناخته می‌شود که در طبیعت معمول‌تر است و مقاومت پایدارتری را به گیاه اعطا می‌کند(Heath, 2000). گیاهان برای مقابله با عوامل بیماریزا از طیف وسیعی از مکانیسم‌ها استفاده می‌کنند. نتیجه برهمکنش گیاه و عامل بیماریزا، القای بیان ژن‌های درگیر در مقاومت و در نتیجه کاهش خسارت وارده است ( Harrison and Lamb, 1994).

## ۱-۲- کلیات

گیاهان با طیف وسیعی از بیمارگر روبرو می‌شوند. در طول تکامل، گیاهان راه و روش‌هایی برای دوری گزیدن از بیشتر بیمارگرها را به وسیله ویژگی‌های تشخیصی که در سطح خود دارند را آموخته‌اند ( Burdon and Thrall, 2009; Dodds and Rathjen, 2010 ). از اینرو جستجو برای درک جزئیات در داخل گیاه،

ویژگی‌های شناختی و پاسخ‌های بعدی برای تلاش آلودگی غیر اختصاصی به وسیله بیمارگر جالب خواهد بود. مقاومت در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای میکروبی به وسیله بیشتر گونه‌های گیاهی به عنوان مقاومت غیر میزبانی شناخته می‌شود که در طبیعت معمول‌تر است و مقاومت پایدارتری را به گیاه اعطا می‌کند(Heath, 2000). مقالات مروری در مورد مقاومت غیر میزبانی به طور عمده بر موضوعاتی همچون: انواع متفاوت مقاومت غیرمیزبانی (Mysore and Ryu, 2004) الگوهای مولکولی در ارتباط با بیمارگر[1](PAMPs) مبنایی برای شناسایی بیمارگرهای سازگار نشده (Nuernberger and Lipka, 2005)، سفیدک سطحی در آرابیدوپسیس(Ellis, 2006) مفاهیم تکامل مولکولی( Schulze-Lefert and Panstruga, 2011) و موانع مختلف در طول یک مقامت غیر میزبانی تمرکز کرده‌اند.

مقاومت غیر میزبانی، مقاومت عمومی به بیمارگر غیراختصاصی است که بر مبنای ایجاد واکنش فوق حساسیت[2] (HR) به دو تیپ طبقه بندی می‌شود(Mysore and Ryu, 2004) تیپ یک مقاومت غیر میزبانی خیلی معمول‌تر و بدون ایجاد علائم قابل مشاهده است. در این تیپ بیمارگر غیرسازگار در غلبه بر دفاع از پیش موجود و پاسخ‌های دفاعی القای الیسیتورهای گیاه همچون ضخیم شدن دیواره سلولی، انباشته شدن فیتوالکسین‌ها، دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاه شکست می‌خورد. از طرف دیگر تیپ دوم مقاومت غیر میزبانی در ارتباط با مرگ سریع موضعی HR است. در این تیپ بیمارگر ناسازگار در غلبه بر پاسخ‌های دفاعی فعال شده توسط القاء الیستور و دفاع از پیش موجود موفق می‌شود و این عمل را با تولید آنزیم‌های سم‌زدا انجام می‌دهد. الیسیتورهای اختصاصی بیمارگر به وسیله سیستم نظارتی گیاه شناخته می‌شوند و دفاع گیاه را برای انجام واکنش فوق حساسیت HR فعال می‌کند. گونه‌های گیاهی یکسان می‌توانند هر دو تیپ از مقاومت غیر میزبانی را نشان دهند(Peart *et al*., 2002) و یک بیمارگر می‌تواند محرک تیپ‌های مختلف مقاومت غیر میزبانی در گونه‌های گیاهی مختلف باشد (Lu *et al*, 2001).

1 Pathogen associated molecular pattern

۲ hypersensitive response

در طول تعامل‌های غیرمیزبانی، یک بیمارگر بالقوه به وسیله الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر که یکسان هستند و فعال کننده مسیرهای سیگنالی و پاسخ‌های دفاعی قابل القا هستند شناسایی می‌شود. موانع ساختاری قابل القا مثل پاپیلا رشد بیشتر بیمارگر را محدود می‌کنند و ترکیباب ضد میکروب برای ایجاد پاپیلا به وسیله تردد وزیکول‌ها باعث سازماندهی مجدد سیتواسکلتون و همچنین ایجاد تنوع پروتئین-های دیواره سلولی مثل آرابینوگالاکتان (AGPs[۱] )، سنتز سلولز و کینازهای مرتبط با دیواره[۲] (WAK) می‌شوند و پتانسیل میانجیگری در تعامل بین دیواره سلولی و غشاء پلاسمایی در طول تهاجم بیمارگر را دارند. این موضوع اشاره به این دارد که مولکول‌های واسط بین دیوار سلولی و غشاء پلاسمایی نه فقط نقش ساختاری در حوزه خارج سلولی دارند بلکه یک نقش تعیین‌کننده و حیاتی در سیگنالینگ در حوزه سیتوپلاسمی دارند که به موجب آن ارتباطات بین سیتوپلاسم و آپوپلاسم را برقرار می‌کند.

شناسایی یک غیرخودی کلید فعال‌سازی مکانیسم دفاع طبیعی در پاسخ به حملات میکروبی است. گیاهان در برابر حمله بیمارگر به وسیله پاسخ‌های دفاعی متعددی که خود توسط دو شاخه اصلی از سیستم ایمنی فعال می‌شوند استقامت می‌کنند (Jones and Dangl, 2006). شاخه اول عبارت است از رسپتورهای شناساگر بین غشایی PRRs[۳] که از طریق شناسایی الگوهای مولکولی خارج سلولی بیمارگر، فعال کننده پاسخ‌های دفاعی گیاه هستند و معمولا برای انواع متفاوت بیمارگرها عمل می‌کنند. یک بیمارگر موفق اولین خط از خطوط دفاعی را با افزایش بیماری‌زایی افکتورهای خود شکست می‌دهد. افکتورهای بیمارگر (فاکتور-های بیماری‌زایی) اختصاصا به وسیله ژن‌های R مرتبط با مقاومت و در دومین خط از خطوط دفاعی سیستم ایمنی گیاه شناخته می‌شوند.

۱ arabinogalactan proteins

۲ wall associated kinase

۳ Pattern recognition receptors

### ۱-۲-۱ الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر که راه اندازهای سیستم دفاعی هستند

وقتی یک بیمارگر بالقوه بر لایه‌های دفاعی یک گیاه غیر میزبان غلبه می‌کند این حمله در غشاء پلاسمایی سلول گیاهی شناسایی می‌شود. شناسایی بیمارگر در گیاهان غیر میزبان در ارتباط با الگوهای مولکولی بیمارگر و همچنین در ارتباط با الیسیتورهای خارجی و کلی مطرح است (GomezGomez and Boller , 2002; Montesano *et al*., 2003; Nurnberger *et al*.,2004) شناسایی الگوهای مولکولی بیمارگر به وسیله گیرنده‌های شناساگر الگوهای مولکولی باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی چندگانه همچون الگوهای مولکولی بیمارگر که راه اندازهای مصونیت[۱] (PTI) هستند می‌شود که در ارتباط با مقاومت پایه‌ای یا مقاومت غیرمیزبانی است. مقاومت پایه‌ای در نگاه اول PTI به اضافه افکتورهای راه انداز ایمنی با قدرت پایین(ETI[۲])، منهای افکتورهای راه انداز حساسیت(ETS) [۳] هستند (Jones and Dangl, 2006; Hoefle and Huckelhoven, 2008; Zhou and Chai 2008; Nicaise *et al*., 2009) ترانسگلوتامیناز دیواره سلولی فیتوفترا(TGase)، لیپوپلی ساکارید(LPS) و قطعات N-terminal 22-mer از فلاژلین باکتری‌های خانواده Eubacteriaceae (flg22) و یک پروتئین شوک سرد القا شونده و باند شده با (RNP-1) (Felix and Boller, 2003) و مواد تولید شده از فروپاشی دیواره سلولی گیاهی(endogenous elicitors)که احتمالا با تجزیه آنزیمی دیواره سلولی آزاد می‌شوند از الیسیتورهای عمومی هستند. دوگانگی بین PTI و ETI اکنون نامشخص است. با توجه به راه انداز، رسپتور و شرایط محیطی مولکول‌های متفاوت مسیرهای سیگنالی متفاوت را فعال می‌کنند (Thomma *et al*., 2011) اکنون PTI به روشنی شناخته شده اما گیرنده‌های شناساگر الگوهای مولکولی جدید برای تهیه ابزارهای مفید در مهندسی ژنتیک که بتوانند مقاومت نسبت به طیف وسیعی از بیمارگرها را به گیاه اعطا کند مفید خواهد بود (Zipfel and Robatzek, 2010).

۱ PAMP-triggered immunity

۲ effector-triggered Immunity

۳ effector-triggered susceptibility

### ۱-۲-۲-پیوند بین مقاومت غیر میزبانی و مقاومت ژن برای ژن

ژن‌های چندگانه R موجود در گیاهان غیرمیزبان ممکن است به طور همزمان تولیدات ژن‌های غیر بیماری‌زایی (avr) را برای فعال کردن سیستم نظارتی گیاه فعال کنند. ژن‌های avr[۱] بیمارگر باکتریایی که کلون شده، قبلا به وسیله ژن‌های R ناشناخته در گیاه غیر میزبان شناخته شده (Whalen *et al*., 1988; Kobayashi *et al*., 1989) بودند. این موضوع صحت این فرضیه که مقاومت غیرمیزبانی همچنین به وسیله مقاومت ژن برای ژن تعیین می‌شود را افزایش می‌دهد(Kobayashi *et al*., 1997).

بیمارگر باکتریایی *Pseudomonas phaseolicola* توانایی درک گیاهان غیرمیزبان و تحویل افکتورهای خود به گیاه از طریق سیستم ترشحی تیپ سوم را دارند. غیاب ژن‌های R شناخته شده در گیاهان باعث حساسیت به بیمارگرهای غیر میزبان نشده است. ژن‌های R مرتبط با مقاومت مطمئنا در تعامل غیر میزبانی، دیگر مکانیسم‌ها و به علاوه در شناسایی ژن برای ژن، شرکت دارند. هنوز این موضوع که تا چه حد PAMP یا سیستم شناسایی ژن برای ژن در مقاومت غیر میزبانی درگیر است در حال بررسی است. افزایش مدارک ثابت کننده ارتباط قوی، مکانیسم مقاومت پایه‌ای مثل مقاومت غیر میزبانی، با مقاومت مرتبط با ژن‌های R است (Wang *et al*., 2011).

### ۱-۲-۳- انتقال سیگنال در طول پاسخ دفاعی

هورمون‌های SA, JA, ET تنها در گونه‌های مقاوم به بیماری با اهمیت نیست بلکه برای حفظ مقاومت غیرمیزبانی در تعامل‌های غیر میزبانی بین گیاه و بیمارگر تعیین کننده است. پاسخ‌های مختلف آرابیدوپسیس موتانت شده در برابر بیمارگرهای غیرمیزبان مختلف نشان می‌دهد که نیاز به بررسی موشکافانه‌ای برای درک صحیح نقش هورمون‌ها در این شکل از مقاومت است.

۱ avirulence gene

### ۱-۲-۴- فازهای قبل و بعد از تشکیل هاستوریوم در مقاومت غیر میزبانی

مقاومت غیر میزبانی در طول تعامل گیاه و بیمارگر از دو طریق عمل می‌کند. تلاش برای نفوذ به دیواره در اکثریت نقاط آلوده بوسیله اپرسوریوم، از طریق تشکیل پاپیلاهایی که به وسیله آلودگی القا شده‌اند بی نتیجه می‌ماند( Assaad *et al*., 2004; Collins *et al*., 2003).

در تیپ۱مقاومت غیر میزبانی تنها فاز pre-haustorial عمل می‌کند در حالی که در فاز post-haustorial هوستوریوم‌های تشکیل شده بوسیله اپرسوریوم‌هایی که در حصار پاپیلا قرار گرفته‌اند دستخوش HR می شوند. در تیپ۲ مقاومت غیر میزبانی فاز post-haustorial نقش مهمی بازی می‌کند. تفاوت بزرگ بین ژن های R مرتبط با مقاومت و تیپ یک مقاومت غیرمیزبانی در این است که در اولی تشکیل مقاومت در فاز post-haustorial اتفاق می‌افتد در حالی که در دومی عمدتا در فاز pre-haustorial اتفاق می‌افتد که به احتمال زیاد با HR مرتبط نمی‌باشد(Ellis, 2006).

### ۱-۲-۵- مقاومت قبل از تشکیل هاستوریوم در برابر نفوذ بیمارگر غیر میزبان موثر است

مکانیسم‌های دفاعی مرتبط با دیواره در فاز Pre-haustorial در مقاومت غیر میزبانی نقش عمده دفاعی در برابر نفوذ دارند. بیشتر بیمارگرهای غیرمیزبان برای نفوذ به دیواره ناکام می‌مانند زیرا ویژگی اصلی مقاومت به نفوذ تشکیل پاپیلا و ساختارهای دیواره سلولی است که تشکیل دهنده سدهای فیزیکی و شیمیایی برای نفوذ به سلول است (Schmelzer, 2002) (شکل ۱). یکی از پاسخ‌های زودهنگام گیاهان در برابر نفوذ، جابجایی سریع سیتوزول و ترکیبات زیر سلولی به نقاط آلوده است( Lipka and Panstruga, 2005; Takemoto and Hardham, 2004). به نظر می‌رسد حداقل دو وزیکول مرتبط با SNARE[۱] در ارتباط با مسیرهای exocytosis در ترشح ترکیبات ضد میکروبی در فضای آپوپلاستی به طور مستقیم یا

[۱] soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor