بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

جداسازی، بیان و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی آنزیم بتا۱و۳-گلوکاناز از یونجه یکساله

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی

نیره نوابی

اساتید راهنما:

دکتر سید رضا زارعی

دکتر بهرام شریف نبی

۱۳۸۶

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی خانم نیره نوابی

تحت عنوان

جداسازی، بیان و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی آنزیم بتا۱و۳-گلوکاناز از یونجه یکساله

در تاریخ ۱۳۸۶/۲/۳۱ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر سید رضا زارعی
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر بهرام شریف نبی
۳- استاد مشاور پایان نامه	مهندس احد یامچی
۴- استاد داور	دکتر مسعود بهار
۵- استاد داور	دکتر آقافخر میرلوحی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده دکتر بهرام شریف نبی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این

پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... شش
چکیده.. ..... ۱
فصل اول: مقدمه و بررسی منابع ۲
۱-۱- اهمیت واهداف ۲
۱-۲- گیاه شناسی یونجه یکساله ۳
۱-۳- بیماریهای گیاهی ۴
۱-۴- دفاع گیاه ۵
۱-۴-۱- دفاع ساختمانی ۵
۱-۴-۲- دفاع بیوشیمیائی ۵
۱-۵- دفاع بیوشیمیائی از پیش موجود ۵
۱-۶- دفاع بیوشیمیائی برانگیخته شده از بیمارگر مهاجم ۶
۱-۷- شناسایی عوامل بیماریزا و القاء مقاومت ۶
۱-۸- مکانیزم مقاومت القاء شده فوق حساسیت ۸
۱-۹- پاسخ دفاعی سیستمیک (SAR) و ارتباط آن با بیان پروتئین های PR ۱۰
۱-۱۰- ترکیبات فنلی و فیتوالکسینها ۱۱
۱-۱۱- پروتئین های دفاعی ۱۱
۱-۱۱-۱- گروه اول پروتئین های PR ۱۵
۱-۱۱-۲- گروه دوم پروتئین های PR ۱۶
۱-۱۱-۳- گروه سوم پروتئین های PR ۱۷
۱-۱۱-۴- گروه چهارم پروتئین های PR ۱۷
۱-۱۱-۵- گروه پنجم پروتئین های PR ۱۸
۱-۱۱-۶- گروه ششم پروتئین های PR ۱۸
۱-۱۱-۷- گروه هفتم پروتئین های PR ۱۹
۱-۱۱-۸- گروه هشتم پروتئین های PR ۱۹
۱- ۱۱-۹- گروه نهم پروتئین های PR ۱۹
۱-۱۱-۱۰- گروه دهم پروتئین های PR ۲۰

۱-۱۱-۱۱- گروه یازدهم پروتئین های PR ۲۰
۱-۱۱-۱۲- گروه دوازدهم پروتئین های PR ۲۰
۱-۱۱-۱۳ -گروه سیزدهم پروتئین های PR ۲۱
۱-۱۱-۱۴- گروه چهاردهم پروتئین های PR ۲۱
۱-۱۲- ایزوفرمهای بتا ۱و۳-گلوکاناز ۲۲
۱-۱۳- فعالیت ضد قارچی بتا ۱ و ۳- گلوکاناز در آزمایشگاه ۲۲
۱-۱۴- باز دارنده های بتا گلوکاناز ۲۴
۱-۱۵- تأثیر شرایط محیطی روی پایداری بتا گلوکاناز ۲۵
۱-۱۶- تولید گیاهان تراریخت ۲۵
۱-۱۶-۱- بذرک ۲۵
۱-۱۶-۲- توتون ۲۵
۱-۱۶-۳- هویج ۲۶
۱-۱۶-۴- گوجه فرنگی ۲۶
۱-۱۷- جدا سازی بتا ۱و۳- گلوکاناز از گیاهان وبررسی اثر ضد قارچی آنها ۲۷
۱-۱۸- خاصیت آلرژی آنزیم بتا ۱و۳-گلوکاناز ۲۷
۱-۱۹- دیدگاه ها و اهداف پروژه ۲۸
فصل دوم: مواد و روشها..... ۳۲
۲-۱- کاشت گیاه یونجه یکساله (*Medicago truncatula*) ۳۲
۲-۲- استخراج DNA ژنومی ۳۲
۲-۲-۱- بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۳۳
۲-۳- طراحی آغازگرها ۳۴
۲-۴- تکثیر قطعات مورد نظر توسط PCR ۳۵
۲-۴-۱- تکثیر قطعات مورد نظر با آنزیم *Taq* پلیمراز ۳۵
۲-۴- ۲- تکثیر قطعات مورد نظر توسط PCR با آنزیم *Pfu* ۳۷
۲-۵- خالص سازی قطعات تکثیر شده از روی ژل ۳۸
۲-۶- استخراج پلاسمید PET21c از باکتری *E. coli* ۳۹
۲-۷- واکنش همسانه سازی ۴۲
۲-۷-۱- برش پلاسمید PET21c به وسیله آنزیم *NdeI* ۴۲
۲-۷-۲- ایجاد انتهای صاف در انتهای پلاسمید برش یافته ۴۳

۲-۷-۳- واکنش اضافه کردن نوکلئوتید تیمیدین تری فسفات به انتهای ´۳ پلاسمید ۴۳
۲-۷-۴- حذف گروه فسفات انتهای برش یافته PET21c ۴۴
۲-۷-۵- واکنش اتصال قطعات DNA هدف به T-vector ۴۵
۲-۸- تهیه سلولهای مستعد باکتری *E. coli* MC1061 ..... ۴۶
۲-۹- انتقال پلاسمید محتوی قطعه DNA مورد نظر به باکتریهای مستعد شده *E.coli* ۴۸
۲-۱۰- تأیید وجود قطعه DNA مورد نظر در پلاسمید و باکتری *E. coli* ۴۸
۲-۱۰-۱- تأیید از طریق PCR و با آغازگرهای Med-32، Med-23 و Med-6 ..... ۴۸
۲-۱۰-۲- تأئید وجود قطعات DNA از طریق برش بوسیلهٔ آنزیم های *Xba* I و *EcoR* I ۴۹
۲-۱۱-تعیین جهت قطعات همسانه شده ۵۰
۲-۱۲- بیان ژن ۵۱
۲-۱۲-۱-تهیه سلولهای مستعد *E.coli* BL21 ..... ۵۱
۲-۱۲-۲- انتقال پلاسمید حاوی قطعه DNA نوکلئوتیدی به باکتری مستعد شده BL 21 ..... ۵۲
۲-۱۲-۳-القاء پروتئین ۵۲
۲-۱۳- تائید پروتئین القاء شده ۵۳
۲-۱۳-۱- الکتروفورز SDS-PAGE ۵۳
۲-۱۳-۲ رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE ۵۴
۲-۱۳-۳- رنگ زدایی ژل ۵۵
۲-۱۴- شکستن دیواره باکتریائی با کمک اولترا سوند ۵۵
۲-۱۵- تا کردن پروتئین تراریخت از اجسام نامحلول ۵۵
۲-۱۶- بررسی خاصیت ضد قارچی پروتئین های تولید شده ۵۶
۲-۱۶-۱- بررسی میزان جوانه زنی اسپور ۵۶
۲-۱۶-۲- تاثیر پروتئینهابر رشد هیف قارچهای *Alternara* و *Fusarium* ۵۶

فصل سوم : نتایج و بحث ۵۸

۴-۱- روش های زیست رایانه ۵۹
۳-۲- تائیدات مولکولی مراحل انجام کار ۶۳
۳-۲-۱- استخراج DNA ژنومی ۶۳
۳-۲-۲- تکثیر قطعه DNA مورد نظر با آنزیم تک پلی مراز ۶۴
۳-۲-۳- تکثیر قطعه DNA مورد نظر با آنزیم *Pfu* ۶۵

۳-۲-۴- استخراج پلاسمید pet21c ۶۶
۳-۲-۵-برش پلاسمید از سایت برشی Nde1 به منظور تهیه وکتور ۶۶
۳-۲-۶- تأیید وجود DNA در پلاسمیدهای T-vector ۶۸
۳-۲-۷- تائید وجود دی.ان.ا در پلاسمید همسانه سازی ۶۹
۳-۲-۸- مشخص کردن جهت اتصال قطعات در وکتور ۷۰
۳-۲-۹- ترانسفورم نمودن پلاسمیدهای همسانه سازی شده در باکتری Bl21 ..... ۷۱
۳-۲-۱۰- تائید بیان پروتئین در باکتری BL21 ..... ۷۴
۳-۲-۱۱- تشخیص شکل پروتئین در باکتری ۷۶
۳-۳- بررسی خاصیت ضد قارچ پروتئین های Med-6 ، Med-۲۳ و Med-۳۲ ..... ۷۷
۳-۳-۱- تاثیر پروتئین ها بر جوانه زنی اسپور قارچ *Fusarium* ۷۸
۳-۳-۲- تاثیر پروتئین ها بر جوانه زنی اسپور قارچ *Alternaria* ۸۲
۳-۴-۱- تاثیر پروتئین ها بر رشد هیف قارچ *Alternaria* ۸۶
۳-۴-۲- تاثیر پروتئین ها بر رشد هیف قارچ *Fusarium* ۸۷

فصل چهارم : نتیجه گیری وپیشنهادها..... ۸۸
۴-۱- نتایج ۸۸
۴-۲- پیشنهادها ۸۹
منابع ۹۰
چکیده انگلیسی ۱۰۰

چکیده

پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (Pathogenesis-related protein) ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماریزا یا تنشهای محیطی تولید می شوند این پروتئینها بر اساس توالی آمینواسیدی، تفاوت های سرولوژیکی و تفاوت در فعالیت آنزیمی به ۱۷ خانواده طبقه بندی شده اند. از میان پروتئین های مرتبط با بیماریزایی، بتا۱ و ۳- گلوکاناز وکیتینازها بیشتر مطالعه شده اند علت این امر این است که بتا۱و۳-گلوکانازها با شکستن باندهای بتا ۱و۳-گلوکان و کیتینازها با شکستن باندهای ۱و۴-N- استیل گلوکزآمین به طور مستقیم دیواره سلولی قارچها را هیدرولیز و از رشد قارچ جلوگیری می کنند. هدف از این تحقیق، بیان فراوان و بررسی فعالیت فیزیولوژیک پروتئینهای بتا۱و۳-گلوکاناز در یونجه یکساله می باشد تاکنون بتا۱و۳-گلوکانازهای زیادی در گیاهان مختلف شناسایی شده وخاصیت ضد قارچ آنها آزمایش شده است. در مطالعه ای که واتسون و همکاران روی یونجه یکساله انجام دادند سیصد و چهار پروتئین با تکنیک انگشت نگاری جرمی پپتید (peptide mass finger printing) شناسایی شد. در بین این پروتئین ها یک بتا ۱و۳ -گلوکاناز با شماره BF650622 ثبت شد ولی تاکنون فعالیت بیولوژیکی آن بررسی نشده است. در این تحقیق با همردیف سازی ژن های بتا ۱و۳-گلوکاناز یونجه چند ساله و نخود روی ژنوم یونجه یکساله سه چارچوب خواندن با شباهت بالای ۵۰٪ و دارا بودن رمز شروع و پایان شناسایی و جداسازی شد سپس قطعات به ناقل PET21c منتقل و در باکتری *E.coli* BL21 بیان شد. با تکنیک SDS-PAGE مشخص شد که این پروتئین ها بصورت اجسام نا محلول تولید شده اند. خاصیت ضد قارچی این پروتئین ها پس از تا شدن و به دست آوردن ساختار فضایی صحیح روی قارچ های *Alternaria alternata* و *Fusarium graminearum* آزمایش شد. نتایج این آزمون پس از تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS در سطح ۵٪ معنی دار بود.

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- اهمیت واهداف:

گیاهان در دوران زندگی خود با تعداد زیادی عوامل بیماریزا و تنشهای مختلف روبرو می شوند که از این میان قارچها بیشترین خسارت را وارد می کنند. گیاه در برابر این عوامل، ترکیبی از پاسخهای از پیش تشکیل شده را برای مقابله با این عوامل به کار می برد. علاوه بر این بسیاری از عوامل بیماریزا که بر این موانع غلبه می کنند با یک پاسخ القایی نیز روبرو می شوند که منجر به تولید متابولیت های ضد میکروبی شامل فیتوالکسین[۱] ها و پروتئین های دفاعی مانند پروتئین های مرتبط با بیماریزائی[۲] (PR پروتئین ها) توسط میزبان می شوند [۲۲و۲۶] .

پروتئین های PR ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماریزا یا تنشهای محیطی تولید می شوند. در حال حاضر ۱۷ خانواده از این پروتئین ها شناسایی شده است (جدول ۱-۱) [۸۳]. از آنجا که دیواره سلولی بسیاری از قارچهای بیماریزا به طور عمده از کیتین و بتا گلوکان تشکیل شده است [۲، ۳ و۸۷] از میانPR پروتئین ها ، پروتئین های گروه ۲ (بتا۱ و ۳- گلوکاناز[۳]) و گروه ۳ (کیتیناز[۴]) بیشتر

۱-Phytoalexin

۲-Pathogenesis-related protein (PR -protein)

۳-β-1,3 glucanase

۴-Chitinase

مطالعه شده اند [۸۷] . این دو پروتئین یا به طور مستقیم دیواره سلولی قارچها را هیدرولیز واز رشد قارچ جلوگیری می کنند و یا الیسیتورهایی[۲] از دیواره سلولی قارچ به وسیله عمل آنزیمی خود آزاد می کنند که این الیسیتورها به نوبه خود پاسخ های دفاعی مختلف از جمله مقاومت اکتسابی عمومی[۳] (SAR) را در گیاهان القاء و در نتیجه مقاومت گیاهان در برابر حمله قارچ را افزایش می دهند [۱۵، ۴۵ و ۴۶] .

۱-۲- گیاه شناسی یونجه یکساله

یونجه یکساله *Medicago truncatula* گیاهی از شاخه *Magnoliophyta*، رده *Magnoliopsida*، راسته *Fabales*، خانواده *Fabaceae*، زیر خانواده *Faboideae*، جنس *Medicago* و گونه *truncatula* است [۸۸].

گیاهان جنس *Medicago* پایا و گلدار هستند و به نام کلی Medick یا Burclover نامیده می شوند. خانواده های این جنس اعضای کمی دارند، خزنده هستند و طول آنها بین ۱۰ تا ۱۰۰ سانتی متر متغیر است.

طبق نظر لسینز[۴] (۱۹۷۹) یونجه های امروزی از گونه های پایای اواخر دوره ترشیاری[۵] مشتق شده اند. یونجه *Medicago truncatula* یا barrel medick یکی از گونه های جنس *Medicago* و یک لگوم کوچک با طول ۱۰ تا ۶۰ سانتی مترمخصوص مناطق مدیترانه است. این گیاه همچنین به فراوانی در استرالیا به صورت یک گیاه علوفه ای در غالب سیستم کشت مخلوط[۶] کشت می شود. اعضای این گونه یکسا له، دیپلوئید و خودگشن با ژنوم کوچک هستند (هر کروموزوم ۰/۴۹تا ۰/۵۷ پیکو گرم می باشد). برگهای این گیاه به صورت سه بر گچه ای است که هر بر گچه ۲-۱ سانتی متر طول دارد. گلهای آن زرد رنگ و به صورت منفرد یا خوشه های کوچک دو تا ۵ تایی است و میوه آن در غلاف های کوچک خاردار تشکیل می شود. تولید مثل این گیاه سریع است و همچنین انتقال ژن به آن به سهولت انجام می شود. همچنین قسمت اعظم ژنوم این گیاه توالی یابی شده است [۳۳ و ۸۸] .

گیاه یونجه یکساله همچنین دارای همزیستی با باکتری های تثبیت کننده ازت از جمله *Sinorhizobium*

۱-Elicitor

۲-Systemic acquired resistance (SAR)

۳- Lesins

۴-Tertiary

۵- Ley- farming system

meliloti و همچنین قارچ های مایکوریزا است (ویژگی که آرابیدوپسیس[1] فاقد آن است). این خصوصیات باعث شده که *M. truncatula* به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات لگوم ها انتخاب شود. این گیاه در طیف وسیعی از خاکها و شرایط محیطی رشد می کند. گونه های خودگشن *M. truncatula* که در اطراف مناطق مدیترانه ای یافت می شوند مقاومت خوبی نسبت به خشکی و شوری دارند. شکل ۱-۱ تصویری از گیاه یونجه یکساله را نشان می دهد [۸ و۲۳]

شکل ۱-۱- تصویر گیاه یونجه یکساله

۱-۳- بیماریهای گیاهی:

بیماریهای گیاهی بر اساس نوع عامل بیماریزاکه بیماری را به وجود می آورد به دو دسته کلی تقسیم می شوند:

۱-*Arabidopsis*

۱- بیماریهای واگیردار که در اثر قارچها، پروکاریوتها، ویروسها، ویروئیدها، نماتـدها، پروتوزوآهـا و گیاهـان عالی انگل ایجاد می شوند.

۲-بیماریهای غیرواگیر یا غیرزنده که در اثرکمبود یا افزایش بیش از حد مواد غذایی و سایر عوامل مـورد نیـاز رشد ایجاد میشوند [۳].

۱-۴- دفاع گیاه

سیستم های دفاعی گیاه شامل دو نوع دفاع ساختمانی و دفاع بیوشیمیائی است [۳ و ۲] .

۱-۴-۱- دفاع ساختمانی

دفاع ساختمانی شامل تمامی موانع فیزیکی موجود در گیاه است که به نحوی مانع از رشـد و پیـشروی عوامـل بیماریزا می شوند و شامل دو دسته هستند:

- ساختارهای دفاعی از پیش موجود در گیاه میزبان

- ساختارهای دفاعی که در واکنش به عوامل بیماریزا در گیاه مورد حمله ایجاد می شوند [۳] .

۱-۴-۲- دفاع بیوشیمیائی

علاوه بر دفاع ساختمانی عامل دیگری باعث مصونیت یا مقاومت میشودکه به نام دفاع بیوشیمیائی شـناخته مـی شود [۳ و ۲] .

دفاع بیوشیمیائی شامل دو دسته می شود:

- دفاع بیوشیمیائی از پیش موجود

- دفاع بیوشیمیائی برانگیخته شده از بیمارگر مهاجم [۳] .

۱-۵- دفاع بیوشیمیائی از پیش موجود

این نوع دفاع شامل آزاد شدن بازدارنده ها در محیط توسط گیاه، دفاع ناشی از فقدان عوامل ضروری (فقـدان

شناخت بین میزبان و بیمارگر، فقدان گیرنده ها و مواضع حساس به سم[1] و فقدان مواد ضروری برای عامل بیمارگر) و همچنین تولید مواد بازدارنده موجود در سلولهای گیاه قبل از آلودگی مثل انواع ترکیبات فنلی می شود [۱، ۲ و ۳].

۱-۶- دفاع بیوشیمیائی برانگیخته شده از بیمارگر مهاجم

این نوع دفاع که بعد از حمله عوامل بیماریزا در گیاه ایجاد می شود شامل موارد زیر می باشد [۳، ۲۲ و ۵۵] :

- واکنش فوق حساسیت[2]
- تولید پروتئین های مرتبط با بیماریزائی (PR پروتئین ها)
- افزایش ترکیبات فنلی مانند فیتوالکسین ها
- تشکیل زمینه های مقاومت در برابر آنزیم های بیمارگر
- خنثی شدن آنزیم های بیمارگر
- آزاد شدن سیانورهای ضدقارچی از ترکیبات پیچیده غیرسمی
- خنثی سازی زهرابه های بیمارگر
- مقاومت اکتسابی عمومی (SAR)

۱-۷- شناسایی عوامل بیماریزا و القاء مقاومت

ساده ترین مدل شناسایی عوامل بیماریزا به وسیله گیاه بر اساس برهمکنش الیسیتورها با گیرنده های گیاه[3] و تظاهر این برهمکنش به صورت شناسایی عامل بیماری وبه تبع آن یک پاسخ دفاعی می باشد. این شناسایی به دو نوع شناسایی عمومی و شناسایی اختصاصی تقسیم می شود.

۱-Toxin

۲-Hypersensitive reaction (HR)

۳-Receptor

شناسایی عمومی به وسیله انواع مختلفی از الیسیتورهای مشتق شده از عوامل بیماریزا مانند ترکیبات کربوهیدراتی دیواره سلولی قارچها، آنزیم های میکروبی، پلی پپتیدها، پروتئین ها و لیپیدها القا می شود [۲۲ و ۲۶].

شناسایی اختصاصی میزبان مربوط به برهمکنش محصول ژنهای مقاومت[۱] گیاه (R-genes) با پروتئینهای غیر بیماریزای[۲] (Avr) عامل بیماریزا می باشد [۵۴] .

شناسایی الیسیتورهای آزاد شده از عامل بیماریزا توسط گیرنده های سطح سلول (محصول ژنهای مقاومت) سبب تحریک سیستم دفاعی و رونویسی از ژنهای دفاعی می شود. این مقاومت «ژن برای ژن»[۳] مبنا و اساس سیستم دفاعی برانگیخته شده درگیاهان است. این استراتژی اولین بار توسط فلور (Flor-۱۹۵۵) پیشنهاد شد که براساس آن وقتی گیاه دارای ژن مقاومت و عامل بیماریزا دارای ژن غیر بیماریزائی باشد واکنش آن دو ناسازگار(عدم بیماری) است. از سوی دیگر زمانی که گیاه دارای ژن مقاومت نباشد و یا عامل بیماریزا دارای ژن غیر بیماریزائی باشد واکنش آن دو سازگار (بیماری) است. در واکنش گیاه- عامل بیماریزا احتمالاً بیش از یک ترکیب اختصاصی ازژنهای *Avr* و *R* همزمان با هم عمل می کنند [۱۷، ۲۲ و ۵۴] .

با حمله عوامل بیماریزا به گیاه، الیسیتورهایی آزاد می شود که با تشخیص این الیسیتورها بوسیله گیرنده های گیاه، مسیر سیگنالی از قبیلMAPK[۴] شروع می شود. اولین مرحله در انتقال سیگنال ،تولید سیگنال های خارج سلولی و عبور آنها از خلال غشاء به داخل سلول است که این امر باعث تجمع سیگنال های داخل سلولی و در نتیجه القاء واکنشهای آبشاری فسفریلاسیون/ دفسفوریلاسیون می شود که در این مرحله MAPK باعث فسفریلاسیون گذرا و موقت پروتئین های وابسته به هسته، سیتوسول و غشاء سلولی می شود.

۱-Resistant genes

۲- Avirulent

۳-Gene for gene

۴-Mithogen activated protein kinase

در نهایت فعالیت پیاپی ترکیبات انتقال دهنده سیگنالها به صورت آبشاری باعث بیان ژنهای حفاظتی و دفاعی گیاه مانند پروتئین های PR، گلوتاتیون S-ترانسفراز[1] (GST)، پراکسیداز، بازدارنده پروتئینازها[2] و تولید متابولیتهای ثانویه ضد میکروبی می شود که سرانجام منجر به بروز مقاومت به عوامل بیماریزا می شود [۱۷ و ۵۴] .

شواهد نشان می دهد که گیاهان قبل از تنظیم ژنهای *R*، هورمونهایی از قبیل اتیلن، اسید سالیسیلیک ، اسید جازمونیک را سنتز می کنند که نقش فیزیولوژیکی این هورمونها در مقاومت گیاهی توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۵۶] .

۱-۸- مکانیزم مقاومت القاء شده فوق حساسیت

یکی از سریعترین پاسخ های دفاعی گیاه در برابر حمله عوامل بیماریزا افزایش سریع اکسیژن نوزاد[3] (ROS) است که به عنوان انفجار اکسیداتیو شناخته می شود. در آلودگی عوامل بیماریزا یک انفجار اولیه در هر دو گیاه مقاوم و حساس اتفاق می افتد ولی در گیاه مقاوم یک انفجار ثانویه چند ساعت بعد رخ می دهد. این مکانیزم دفاعی اخیر چندین ساعت تا چندین روز به دنبال انفجار اولیه ادامه می یابد و اغلب شامل پاسخ فوق حساسیت می گردد [۲۲، ۲۶ و ۵۵] . پاسخ فوق حساسیت باعث مرگ سریع سلولهای میزبان در محل حمله عوامل بیماریزا و القاء موانع ساختمانی و بیوشیمیایی می شود. با رخنه عامل بیماریزا به سلولهای بشره گیاه، سلولهای آلوده به سرعت آب خود را از دست می دهند، قهوه ای شده و سپس می میرند [۱] . به دنبال مرگ سلول آلوده شده، تغییرات فیزیولوژیکی دیگری شامل تغییر در نفوذپذیری غشاهای سلولی، افزایش تنفس، تجمع و اکسایش ترکیبات فنلی، تولید فایتوالکسینها، سنتز پروتئین های دفاعی و تولید اکسیژن نوزاد در

---

۱ - Glutatiun S-transfrase

۲ -Proteinase inhibitor

۳ -Reactive oxygen Species

سلولهای مجاور اتفاق می افتد که باعث مرگ یک حلقه از سلولهای مجاور و تشکیل حلقه نکروزه می گردد و سرانجام رشد عوامل بیماریزا در میان ترکیبات ضد میکروبی و لکه نکروزه محدود می شود این پاسخ موضعی اغلب باعث ایجاد مقاومت غیراختصاصی سیستمیک SAR می شود که یک محافظت در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزاها به وجود می آورد [۲۲، ۲۶ و ۵۵] .

اولین پاسخ سلولهای گیاهی در واکنش HR، تغییر در نفوذپذیری غشاء سلولی است که ورود یونهای Ca^{2+} و Mg^{2+} و خروج یونهای K^{+} و Cl^{-} باعث کنترل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئینها می شود. این تغییر در فسفریلاسیون پروتئینها به نظر می رسد که به عنوان یک سیگنال برای تولید ROS مانند آنیون سوپراکسید (O_2^{-}) پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و انواع نیتروژن فعال مانند نیتریک اکسید (NO) در فضای خارج سلولی عمل می کند [۲۲ و ۷۲] .

اکسیژن نوزاد در دفاع گیاه به چند طریق عمل می کند. برای مثال H_2O_2 در طی HR نه تنها اثر ضد میکروبی مستقیم دارد بلکه با تحریک چوبی شدن[۱] دیواره سلولی، باعث تقویت این دیواره در برابر عوامل بیماریزا می شوند. همچنین H_2O_2 و NO تولید شده در طی HR ، بیان ژنهای مربوط به دفاع مانند فنیل آلانین آمونیا لاز[۲] (PAL)، ژنهای PR پروتئین و گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) را القاء می کنند [۲۱، ۲۲ و ۷۲] .

سایر ترکیبات موثر در تولید سیگنال در طی HR فسفولیپازها[۳] هستند که با اتصال به اسیدهای چرب غیراشباع غشاء، باعث آزاد شدن اسید جاسمونیک، متیل جاسمونات[۴] و مولکولهای مشابه می شود. اخیراً مشخص شده که جاسمونات ها، اتیلن و سالیسیلیک اسید تولید شده در این مسیر باعث تنظیم بیان ژنهای مربوط به پاسخ دفاعی در گیاهان می شود [۵۶ و ۷۲] .

---

۱ -Lignification

۲-Phenyl alanine amonia lyase

۳-Phospho lipase

۴ - Metyl jasmonate

۱-۹- پاسخ دفاعی سیستمیک (SAR) و ارتباط آن با بیان پروتئین های PR

در طی HR، پروتئین های مربوط به بیماریزائی (PR_S) نیزتولید می شوند. طبق تعریف PR_S پروتئین هایی هستند که توسط میزبان سنتز می شوند و تولید آنها در شرایط تنش یا حمله عوامل بیماریزاها تحریک می شود. این پروتئین ها معمولا به طور سیستمیک در گیاه تولید می شوند و سبب پدیده SAR می شوند. در نتیجه آلودگی های بعدی بوسیله قارچها، باکتری و ویروس ها کنترل می شود [۱۵، ۲۱ و ۵۵] .

فعالیت HR در واقع به عنوان یک ماشه شروع کننده برای پاسخ SAR است. SAR با افزایش مولکولهای سیگنال اسید سالیسیلیک (SA) ارتباط دارد. اسید سالیسیلیک در آغاز به طور موضعی و سپس به طور سیستمیک در سرتاسر گیاه انباشته می شود و باعث بیان ژنهای دفاعی مانند *PR* در بافتهای غیرآلوده حتی خیلی دورتر از محل آلودگی می شود [۱۵ و۷۲] .

درگیاه مدل آرابیدوپسیس در طی SAR واکنش مقاومت سیستمیک وابسته به افزایش SA، باعث بیان ژنهای PR گروه ۱،۲و۵ می شود. در حالی که القاء پاسخ های دفاعی مستقل از SA از طریق مسیر انتقال سیگنالی جازمونیک اسید و اتیلن باعث القاء یک زیرمجموعه متفاوت از ژنهای PR شامل PDF[1] (PR12) و تایونین[۲] Thi (PR-13) می شود و بنابراین محصول این ژنها به عنوان نشانگر SAR معرفی می شوند [۷۸].

۱-۱۰- ترکیبات فنلی و فیتوالکسینها

فیتوالکسین ها ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی کم هستند که به مقدار قابل توجه و فقط بعد از تحریکهای ناشی از عوامل بیماریزای گیاهی و یا زخمهای ناشی از عوامل فیزیکی و شیمیایی در گیاهان ایجاد می شوند. فیتوالکسین ها معمولا به وسیله سلولهای سالم که مجاور سلولهای مرده و آسیب دیده هستند تولید میشوند [۱، ۲ و۸۶] .

۱-Defensin

۲-Thionin

تولید فیتوالکسین ها در پاسخ به وجود الیسیتورها آغاز می گردد. بیشتر این الیسیتورها موادی مانند گلوکان ها، کیتوزان، گلیکو پروتئین ها و پلی ساکاریدهایی با وزن مولکولی بالا هستند که اجزاء دیواره سلولی قارچها را تشکیل می دهند و اکثرآنها غیر اختصاصی هستند. اما بعضی از الیسیتورها نیز توسط سلولهای گیاهی در واکنش به آلودگی ایجاد شده و یا بعد از تخریب قسمتی از دیواره سلول گیاهی توسط آنزیم های بیمارگر، آزاد می شوند [۱ و ۸۶]

ظاهراً تولید فیتوالکسین ها در گیاهان حساس به بیمارگر، در اثر تولید مواد سرکوب کننده[۱] توسط بیمارگر متوقف می شود که به نظر می رسد سرکوب کننده ها نیز از انواع گلوکانها، گلیکوپروتئینها و یا یکی از زهرهای ترشح شده توسط بیمارگر باشند [۱] .

۱-۱۱- پروتئین های دفاعی

پروتئینهای PR اولین بار در سال ۱۹۸۰ به عنوان ترکیبات پروتئینی جدید القاء شده به وسیله ویروس موازئیک توتون در واکنش فوق حساسیت مشاهده شدند. در آزمایشی، عصاره پروتئینی برگهای توتون آلوده به TMV روی ژل آکریل آمید بارگذاری و چهار باند اضافی نسبت به عصاره پروتئینی برگهای سالم مشاهده شد که به عنوان ترکیب پروتئینی جدید I ، II ، III ، IV بر اساس محل آنها بر روی ژل نام گذاری شدند. به زودی مشخص شد که نه تنها ویروس ها، بلکه قارچها و باکتریها نیز قادر به القاء ترکیبات پروتئینی جدید در گونه های گیاهی مختلف می باشند [۱۵] . این ترکیبات، پروتئینهایی هستند که توسط گیاه میزبان در پاسخ به حمله با توژن ها یا شرایط مشابه تولید می شوند اصطلاح« شرایط مشابه » اشاره به انواع تنش هائی دارد که با تقلید اثر عوامل بیماریزا موجب القاء برخی جنبه های دفاعی گیاه می گردد [۱۰، ۱۵ و ۲۰].

PR پروتئینها بر خلاف ترکیبات مستحکم کننده دیواره سلولی و فایتوالکسین ها نه فقط به صورت محلی بلکه به صورت سیستمیک هم در گیاه تولید می شوند که این به نوبه خود یکی از مکانیزمهای ایجاد مقاومت

---

۱ - Supperssor