بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

انتقال ژن شبه‌تئوماتین *TLP-3* به گیاه توتون

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

کامران صفوی

اساتید راهنما

دکتر سید رضا زارعی

دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی

۱۳۸۷

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی آقای کامران صفوی

تحت عنوان

انتقال ژن شبه‌تئوماتین *TLP-3* به گیاه توتون

در تاریخ ۱۳۸۷/۱۲/۱۴ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهائی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر سید رضا زارعی
۲- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی
۳- استاد داور	دکتر سیروس قبادی
۴- استاد داور	دکتر امیر مساح
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر فرشید نوربخش

الهی نام تو ما را جواز، شناخت تو ما را امان و لطف تو ما را عیان است. یاد تو چون کنم که تو خود در یادی. الهی هر دلی که نه در طلب توست ویران است پس دلی ده که در کار تو جان بازیم و جانی ده که کار آن جهان سازیم.

از پدر و مادر گرامیم که همچون کوهی استوار و چشمه‌ای فرح بخش مرا در تمام مراحل پر فراز و فرود زندگی یاری رساندند، سپاسگزارم.

از اساتید راهنمای ارجمندم آقای دکتر سید رضا زارعی و آقای دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی به جهت راهنمایی اینجانب در به ثمر رساندن این پایان‌نامه قدردانی می‌نمایم.

از اساتید ارجمند آقای دکتر سیروس قبادی و آقای دکتر امیر مساح که مرا در تصحیح این پایان‌نامه یاری نمودند، سپاسگزارم.

از اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی آقای دکتر مسعود بهار، آقای دکتر آقافخر میرلوحی و آقای دکتر بهرام شریف نبی که در محضرشان کسب علم نمودم، سپاسگزارم.

از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی و بیماری شناسی گیاهی آقایان مهندس محمدی و مهندس اخوان کمال تشکر را دارم.

از خواهران عزیزم که در تمام لحظات زندگی همراه من بودند صمیمانه سپاسگزارم.

خود را ممنون محبت‌های بیدریغ دوستان خوبم طی دوران تحصیل دانسته و بخصوص از خانم‌ها مرضیه افاضل، سهیلا موحدی، غزاله خاکسار، کبری سعیدی و معصومه مصطفی تشکر می‌نمایم.

کامران صفوی

اسفند ۱۳۸۷

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های
ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به
دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فهرست مطالب.....هفت
فهرست شکل‌ها.....دوازده
فهرست جدول‌ها.....چهارده
چکیده ۱

فصل اول: مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع ۶
۲-۱- چگونگی دفاع گیاه در مقابل پاتوژن ۷
۲-۱-۱- سدهای ساختمانی دفاع قبل و بعد از آلودگی ۹
۲-۱-۲- سدهای شیمیایی دفاع قبل و بعد از آلودگی ۹
۲-۲- پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی ۹
۲-۳- شناسایی پروتئین‌های مرتبط با بیماریزائی ۱۰
۲-۴- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماریزائی ۱۱
۲-۵- پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۳
۲-۶- خصوصیات فیزیکو شیمیایی پروتئین‌های شبه تئو ماتین ۱٤
۲-۷- خصوصیات بیولوژیک پروتئین‌های شبه تئو ماتین ۱٤
۲-۷-۱ مزه ۱٤
۲-۷-۲- فعالیت ضد یخ زدگی ۱۵
۲-۷-۳- فعالیت پروتئین‌های شبه تئوماتین به عنوان کنترل کننده فعالیت‌های آنزیمی ۱۵
۲-۷-٤- نقش پروتئین‌های شبه تئوماتین در ایجاد حساسیت ۱۵
۲-۷-۵- فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۵
۲-۸- بررسی چگونگی عمل پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱٦
۲-۹- تنظیم بیان پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۷
۲-۹-۱- تنش شوری و تنش خشکی ۱۷
۲-۹-۲- زخم ۱۷
۲-۹-۳- اسید آبسیزیک و اتیلن ۱۷
۲-۹-٤- سالیسیلات‌ها، متیل جاسمونیت‌ها و سایر الیسیتورها ۱۸
۲-۹-۵- آلودگی میکروبی ۱۸
۲-۱۰- cDNA و ژن‌های شناسایی شده پروتئین‌های شبه تئوماتین ۱۹
۲-۱۱- همسانه سازی ژن ۲۰
۲-۱۲- انتقال ژن ۲۰
۲-۱۳- ناقل‌های مورد استفاده در همسانه سازی و انتقال ژن ۲۱
۲-۱۳-۱- ناقل‌های همسانه سازی ۲۱
۲-۱۳-۲- ناقل‌های بیانی ۲۱
۲-۱۴- تکنیک‌های انتقال ژن ۲۲
۲-۱٤-۱- انتقال ژن به طور مستقیم ۲۲
۲-۱٤-۲- انتقال ژن توسط ناقل ۲۲
۲-۱۵- تراریختی به وسیله اگروباکتریوم ۲۲
۲-۱۶- روش‌های استفاده از اگروباکتریوم به منظور ایجاد تراریختی در سلول‌های گیاهی ۲۳
۲-۱٦-۱- استفاده از ناقلین تلفیقی مشترک ۲۳
۲-۱٦-۲- روش ناقلین دوگانه ۲٤
۲-۱۷- مثال‌هائی از انتقال ژن گروه پنجم پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR-5) ۲۵

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۸
۳-۱- مطالعات زیست- رایانه ۲۸
۳-۱-۱- شناسائی توالی سیگنال پپتید ۲۸
۳-۱-۲- طراحی آغازگرها ۲۹
۳-۱-۳- طراحی آداپتور برای اتصال به ابتدای ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۳۲
۳-۲- کشت بافت یونجه یکساله ۳۳
۳-۲-۱- تهیه محیط کشت پایه MS ۳۳
۳-۲-۲- ضد عفونی بذور یونجه یکساله ۳۳
۳-۲-۳- کشت بذور یونجه یکساله در محیط کشت MS ۳۳
۳-۳- استخراج DNA از یونجه یکساله ۳٤
۳-۴- بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۳۵
۳-۴-۱- روش اسپکتوفتومتری ۳۵
۳-۴-۲- روش ژل الکتروفورز ۳۵
۳-۵- تکثیر ژن *TLP-3* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۵
۳-۵-۱- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR ۳٦
۳-۵-۲- واکنش PCR ۳٦
۳-۵-۳- الکتروفورز محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز ۳۷
۳-۶- آماده سازی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز جهت همسانه سازی ۳۸
۳-٦-۱- خالص سازی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز از ژل ۳۸
۳-٦-۲- اتصال آداپتور به ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۳۹
۳-٦-۳- هضم آنزیمی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز ۳۹
۳-۷- همسانه سازی پلاسمیدهای pSK حاوی قطعات موردنظر در باکتری *Escherichia coli* ٤۰
۳-۷-۱- استخراج پلاسمید pSK از باکتری *E. coli* (استخراج در حجم کوچک) ٤۰
۳-۷-۲- هضم آنزیمی پلاسمید pSK ٤۱
۳-۷-۳- خالص سازی پلاسمید pSK ٤۲
۳-۷-۴- اتصال ژن *TLP-3* به پلاسمید pSK ٤۲
۳-۷-۵- تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* جهت انتقال پلاسمید pSK نوترکیب ٤۳
۳-۷-۶- انتقال پلاسمیدهای pSK نوترکیب به باکتری‌های مستعد *E.coli* XL1-Blue و *E.coli* MC 1061 ..... ٤۳
۳-۸- غربال سازی همسانه‌های *E.coli* XL1-Blue و *E.coli* MC 1061 دارای پلاسمید pSK نوترکیب ٤٤
۳-۸-۱- غربال سازی با انجام Colony PCR ٤٤
۳-۸-۲- غربال سازی از طریق برش آنزیمی ٤٤
۳-۹- توالی‌یابی قطعات همسانه‌سازی شده ٤۵
۳-۱۰- همسانه سازی پلاسمیدهای pBI121 حاوی قطعات موردنظر در باکتری *E. coli* ٤۵
۳-۱۰-۱- استخراج پلاسمید pBI121 از باکتری *E. coli* و هضم آنزیمی آن ٤۵
۳-۱۰-۲- اتصال ژن *TLP-3* به پلاسمید pBI121 (ساخت دستواره) ٤۵
۳-۱۰-۳- تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* جهت انتقال دستواره ٤۵
۳-۱۰-۴- انتقال دستواره به باکتری‌های مستعد *E.coli* XL1-Blue ٤٦
۳-۱۱- غربال سازی همسانه‌های *E.coli* XL1-Blue دارای دستواره ٤٦
۳-۱۲- انتقال دستواره به باکتری‌های مستعد شده *Agrobacterium tumefaciens* GV3850 و *A. tumefaciens* AGLO. ٤٦
۳-۱۳- غربال سازی همسانه‌های اگروباکتریوم دارای دستواره با انجام Colony PCR ٤۷
۳-۱۴- تراریختی گیاه توتون توسط اگروباکتریوم حامل دستواره ٤۷
۳-۱۴-۱- آماده سازی گیاه توتون جهت انتقال دستواره‌های موردنظر ٤۷
۳-۱۴-۲- آماده سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم جهت انتقال دستواره‌های موردنظر ٤۸
۳-۱۴-۳- تراریختی برگ توتون توسط اگروباکتریوم ٤۸
۳-۱۵- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک ٤۹
۳-۱۶- تائید صحت تراریختی گیاهان ٤۹
۳-۱۷- تایید از طریق PCR ٤۹
۳-۱۸- تایید از طریق RT-PCR ۵۰
۳-۱۸-۱- مواد لازم جهت RT-PCR ۵۰
۳-۱۸-۲- استخراج mRNA ۵۰
۳-۱۸-۳- سنتز cDNA ۵۱
۳-۱۸-۴- واکنش PCR ۵۱
۳-۱۹- تائید از طریق Bioassay ۵۲
۳-۱۹-۱- بررسی میکروسکپی ۵۲
۳-۱۹-۲- بررسی گلخانه‌ای ۵۳

فصل چهارم: نتایج و بحث ۵۴
۴-۱- بررسی‌های انجام شده جهت انتخاب ژن *TLP-3* به منظور انتقال به گیاه توتون ٥٤
۴-۲- مطالعات زیست - رایانه ۵۵
۴-۳- کشت بافت یونجه یکساله ۵۷
۴-۴- استخراج DNA از یونجه یکساله ۵۸
۴-۵- تکثیر ژن *TLP-3* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۹
۴-۶- آماده سازی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز جهت همسانه سازی ٦۰
٤-٦-۱- خالص سازی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز از ژل ٦۰
٤-٦-۲- اتصال آداپتور به ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ٦۲
٤-٦-۳- هضم آنزیمی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز ٦۲
۴-۷- همسانه سازی پلاسمیدهای pBluescript SK (pSK) حاوی قطعات موردنظر در باکتری *E. coli* ٦۲
۴-۷-۱- استخراج و هضم آنزیمی پلاسمید pSK ٦۲
۴-۷-۲- اتصال ژن *TLP-3* به پلاسمید pSK ٦۳
٤-۷-۳- انتقال پلاسمیدهای pSK نوترکیب به باکتری‌های مستعد *E.coli* XL1-Blue و *E.coli* MC 1061 ..... ٦۳
٤-۸- غربال سازی (Screening) همسانه‌های دارای پلاسمید pSK نوترکیب ٦٤
٤-۸-۱- غربال سازی با انجام Colony PCR ٦٤
٤-۸-۲- غربال سازی از طریق برش آنزیمی ٦٥
۴-۹- بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات همسانه‌سازی شده ٦٦
۴-۱۰- همسانه سازی پلاسمیدهای pBI121 حاوی قطعات موردنظر در باکتری *E. coli* ٦۷
٤-۱۰-۱- هضم آنزیمی و خالص سازی پلاسمید pBI121 ..... ٦۷
٤-۱۰-۲- اتصال ژن *TLP-3* به پلاسمید pBI121 ..... ٦۸
٤-۱۰-۳- انتقال دستواره به باکتری‌های مستعد شده *E.coli* XL1-Blue ٦۸
۴-۱۱- غربال سازی همسانه‌های باکتری *E.coli* XL1-Blue دارای دستواره ٦۹
٤-۱۱-۱- غربال سازی با انجام Colony PCR ٦۹
٤-۱۱-۲- غربال سازی از طریق برش آنزیمی ۷۰
۴-۱۲- انتقال دستواره به باکتری‌های مستعد شده *Agrobacterium tumefaciens* GV3850 و *A. tumefaciens* AGLO. ۷۱
۴-۱۳- غربال سازی همسانه‌های اگروباکتریوم دارای دستواره با انجام Colony PCR ۷۲
۴-۱۴- تراریختی گیاه توتون توسط اگروباکتریوم حامل دستواره ۷۳
۴-۱۵- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک ۷۷
۴-۱۶- تائید صحت تراریختی گیاهان ۷۷
۴-۱۷- تایید از طریق PCR ۷۸
۴-۱۸- تایید از طریق واکنش RT-PCR ۷۸
۴-۱۹- تائید از طریق Bioassay ۷۹
٤-۱۹-۱- بررسی میکروسکپی ۸۰
٤-۱۹-۲- بررسی گلخانه‌ای ۸۳

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادها ۸۶
۵-۱- نتیجه گیری ۸٦
۵-۲- پیشنهادها ۸۷

پیوست ۸۸

منابع ۹۲

فهرست شکل‌ها

عنوان | صفحه

شکل ۲-۱- ناقل pBluescript II KS(+) همراه با جایگاه‌های برشی ۲۱
شکل ۲-۲- ناقل pBI121 همراه با جایگاه‌های برشی ۲۱
شکل ۲-۳- نحوه عمل *A. tumefaciens* جهت انتقال T-DNA به درون سلول گیاهی ۲۳
شکل ۲-۴- نحوه عمل ناقلین تلفیقی مشترک ۲۴
شکل ۲-۵- نحوه عمل ناقلین دوگانه ۲۵
شکل ۳-۱- شناسائی توالی سیگنال پپتید در پروتئین TLP-3 با استفاده از نرم افزار Signalp ۲۹
شکل ۳-۲- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن *TLP-3* دارای سیگنال پپتید ۳۰
شکل ۳-۳- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۳۰
شکل ۲-۴- بررسی آغازگرهای مربوط به ژن *TLP-3* دارای سیگنال پپتید ۳۱
شکل ۳-۵- بررسی آغازگرهای مربوط به ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۳۲
شکل ۳-۶- نقشه ژنتیکی ناقل pSK و جایگاه ژن *TLP-3* در آن ۴۱
شکل ۳-۷- نقشه ژنتیکی ناقل دوگانه pBI121 و جایگزینی ژن *gus* با ژن *TLP-3* در آن ۴۵
شکل ۴-۱- نقشه ژنتیکی پلاسمید pBI121 و جایگاه آنزیم‌های *Sma* I، *Xba* I، *Bam*H I و *Sac* I روی آن ۵۵
شکل ۴-۲- نقشه ژنتیکی پلاسمید pBluescript SK و جایگاه آنزیم‌های *Sma* I، *Xba* I، *Bam*H I و *Sac* I روی آن ۵۶
شکل ۴-۳- طراحی آداپتور برای ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۵۷
شکل ۴-۴- رشد جوانه یک سانتیمتری حاصل از کشت بذور یونجه یکساله ۵۷
شکل ۴-۵- گیاهچه تشکیل شده در شرایط درون شیشه ۵۸
شکل ۴-۶- نقوش الکتروفورزی DNA استخراج شده از گیاه یونجه یکساله ۵۹
شکل ۴-۷- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR ۶۰
شکل ۴-۸- نقش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای TLP3Ext-F/TLP3Ext-R پس از خالص سازی از ژل ۶۱
شکل ۴-۹- نقش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای TLP3Int-F/TLP3Ext-R پس از خالص سازی از ژل ۶۱
شکل ۴-۱۰- نقوش الکتروفورزی پلاسمیدهای pSK استخراج شده از باکتری *E.coli* ۶۳
شکل ۴-۱۱- نقوش الکتروفورزی پلاسمیدهای هضم شده با آنزیمهای برشی *Sac* I و *Xba* I ۶۳
شکل ۴-۱۲- پرگنه‌های سفید و آبی باکتری‌های *E.coli* MC1061 رشد کرده روی محیط LB حاوی آمپی سیلین، IPTG و X-gal ۶۴
شکل ۴-۱۳- نقوش الکتروفورزی محصولات colony PCR با آغازگرهای اختصاصی ۶۵
شکل ۴-۱۴- نقوش الکتروفورزی قطعات خارج شده از پلاسمیدهای pSK هضم شده با آنزیم‌های برشی *Sac* I و *Xba* I ۶۵
شکل ۴-۱۵- مقایسه توالی قطعه ۹۸۱bp با توالی‌های موجود در GeneBank ۶۶
شکل ۴-۱۶- مقایسه توالی قطعه ۸۹۵bp با توالی‌های موجود در GeneBank ۶۶
شکل ۴-۱۷- نقش الکتروفورزی پلاسمید pBI121 استخراج شده از اگروباکتریوم ۶۷
شکل ۴-۱۸- نقوش الکتروفورزی پلاسمیدهای هضم شده با آنزیم‌های برشی *Sac* I و *Xba* I پس از خالص سازی از ژل ۶۸
شکل ۴-۱۹- پرگنه‌های باکتری *E.coli* XL1-Blue رشد کرده روی محیط LB حاوی کانامایسین ۶۹
شکل ۴-۲۰- نقوش الکتروفورزی محصولات colony PCR با آغازگرهای TLP3ExtF/TLP3ExtR ۷۰
شکل ۴-۲۱- نقوش الکتروفورزی محصولات colony PCR با آغازگرهای TLP3IntF/TLP3ExtR ۷۰
شکل ۴-۲۲- نقوش الکتروفورزی قطعات خارج شده از پلاسمیدهای pBI121 هضم شده با آنزیم‌های برشی *Sac* I و *Xba* I ۷۱
شکل ۴-۲۳- پرگنه‌های باکتری *A. tumefaciens* AGLO رشد کرده روی محیط LB حاوی کانامایسین ۷۲
شکل ۴-۲۴- نقوش الکتروفورزی محصولات colony PCR با آغازگرهای TLP3ExtF/TLP3ExtR ۷۲
شکل ۴-۲۵- نقوش الکتروفورزی محصولات colony PCR با آغازگرهای TLP3IntF/TLP3ExtR ۷۳

شکل ۴-۲۶- کالوس زائی در محیط MS انتخابی حاوی غلظت مناسب آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتوکسیم و هورمون‌های NAA و BAP ۷۴
شکل ۴-۲۷- جوانه‌زائی در محیط MS انتخابی حاوی غلظت مناسب آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتوکسیم و هورمون‌های NAA و BAP ۷۴
شکل ۴-۲۸- تولید گیاهچه در محیط MS انتخابی حاوی غلظت مناسب آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتوکسیم ۷۵
شکل ۴-۲۹- ریشه‌زائی جوانه‌ها در محیط MS انتخابی حاوی غلظت مناسب آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتوکسیم ۷۵
شکل ۴-۳۰- شاهد مثبت: تشکیل کالوس و باززائی گیاه توتون غیرتراریخت در محیط MS حاوی غلظت مناسب هورمونهای NAA و BAP... ۷۶
شکل ۴-۳۱- شاهد منفی: زرد شدن برگهای گیاه توتون غیرتراریخت در محیط MS انتخابی حاوی غلظت مناسب آنتی بیوتیک‌های کانامایسین و سفاتوکسیم و هورمون‌های NAA و BAP ۷۶
شکل ۴-۳۲- گیاهان تراریخت منتقل شده به گلدان ۷۷
شکل ۴-۳۳- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام PCR درگیاهان توتون تراریخت ۷۸
شکل ۴-۳۴- نقوش الکتروفورزی نتایج حاصل از انجام RT-PCR در گیاهان توتون تراریخت ۷۹
شکل ۴-۳۴- تلقیح قارچ *A. alternata* روی برگهای گیاه توتون ۸۰
شکل ۴-۳۵- علائم ایجاد شده توسط قارچ *A. alternata* روی برگهای گیاه توتون ۸۰
شکل ۴-۳۶- نمونه شاهد اسپور آلترناریا ۸۲
شکل ۴-۳۷- اثر پروتئین شبه تئوماتین TLP-3 دارای سیگنال پپتید روی جوانه زنی اسپورهای آلترناریا ۸۲
شکل ۴-۳۸- اثر پروتئین شبه تئوماتین TLP-3 فاقد سیگنال پپتید روی جوانه‌زنی اسپورهای آلترناریا ۸۲
شکل ۴-۳۹- اثر پروتئین شبه تئوماتین TLP-3 دارای سیگنال پپتید روی قارچ آلترناریا ۸۳
شکل ۴-۴۰- اثر پروتئین شبه تئوماتین TLP-3 فاقد سیگنال پپتید روی قارچ آلترناریا ۸۳

فهرست جدول‌ها

عنوان | صفحه

جدول۲-۱- طبقه بندی پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی ۱۳
جدول ۳-۱- توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن *TLP-3* ۳۲
جدول ۳-۲- توالی آداپتور طراحی شده برای ژن *TLP-3* ۳۳
جدول ۳-۳- مواد و مقادیر لازم برای انجام PCR با استفاده از آغازگرهای TLP3Ext-F/TLP3Ext-R ۳۷
جدول ۳-۴- مواد و مقادیر لازم برای انجام PCR با استفاده از آغازگرهای TLP3Int-F/TLP3Ext-R ۳۷
جدول ۳-۵-مواد و مقادیر لازم برای اتصال آداپتور به ژن *TLP-3* فاقد سیگنال پپتید ۳۹
جدول ۳-۶- مواد و مقادیر لازم برای هضم آنزیمی محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز ۴۰
جدول ۳-۷- مواد و مقادیر لازم برای هضم آنزیمی پلاسمید pSK ۴۲
جدول ۳-۸-مواد و مقادیر لازم جهت اتصال ژن *TLP-3* به پلاسمید pSK ۴۲
جدول ۳-۹- مواد ومقادیر لازم در واکنش نسخه برداری معکوس ۵۱
جدول۴-۱- اثر تیمار عصاره گیاهان در جلوگیری از جوانه زنی اسپورهای آلترناریا ۸۱
جدول۴-۲- مقایسه میانگین تیمار عصاره گیاهان در جلوگیری از جوانه زنی اسپورهای آلترناریا ۸۱

چکیده

حفظ شرایط مطلوب رشد و نمو گیاهان، همواره مورد توجه دانش پژوهان قرار داشته است. هر گیاه در طبیعت مورد حمله هزاران میکروارگانیسم قرار می‌گیرد ولی توسط تعداد کمی از آن‌ها بیمار می‌شود. هماهنگی واکنش‌های دفاعی مختلف در مواجه با پاتوژن‌ها منجر به تحریک رونویسی تعدادی زیادی از ژن‌های دفاعی می‌شود. یک دسته مهم از این ژن‌ها، ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری زائی هستند. اهمیت این پروتئین‌ها خصوصاً به دلیل دارا بودن فعالیت ضد میکروبی بر علیه انواع میکروارگانیسم‌ها است. تا کنون ۱۷ گروه از از پروتئین های مرتبط با بیماری زائی در گیاهان تک لپه و دو لپه شناسایی شده است که در گروه پنجم این طبقه بندی، پروتئین‌های شبه تئوماتین قرار می‌گیرند. پروتئین‌های شبه تئوماتینی که دارای توالی سیگنال پپتید در قسمت N ترمینال هستند احتمالاً حالت اسیدی تا خنثی داشته و به سمت خارج سلول هدف گیری می‌شوند، در حالی که اگر این پروتئین‌ها توالی سیگنال پپتید را در قسمت C ترمینال دارا باشند احتمالاً حالت بازی داشته و به سمت واکوئل میل می‌کنند. در راستای دست یابی به گیاهان مقاوم در برابر عوامل بیماری زا، انتقال ژن شبه تئوماتین *TLP-3* که ازگیاه یونجه یکساله گزارش گردیده به گیاه مدل توتون مد نظر قرار گرفت. در ابتدا توالی سیگنال پپتید این ژن با کمک نرم افزار Signalp شناسایی و با توجه به اینکه این توالی در قسمت N ترمینال قرار داشت، طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن مورد نظر توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز به دو شکل با و بدون سیگنال پپتید جهت هدف گیری پروتئین به ترتیب به خارج و داخل سلول انجام شد. در مرحله بعد کشت بافت گیاه یونجه یکساله از طریق کشت بذر بر روی محیط MS صورت گرفت. پس از استخراج DNA از گیاه یونجه یکساله، تکثیر و جداسازی ژن مورد نظر توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز در حضور آنزیم های *Pfu* پلیمراز و *Taq* پلیمراز انجام شد. به منظور سهولت در نگه داری و دسترسی ضروری به ژن *TLP-3*، این ژن به درون ناقل pBluescript II SK plus (pSK) متصل و جهت همسانه سازی به *E. coli* XL1blue و *E. coli* MC1061 منتقل گردید. در ادامه ژن مورد نظر، به درون ناقل pBI121 متصل و به منظور افزایش تعداد پلاسمید های pBI121 حاوی ژن *TLP-3* و همچنین افزایش امکان دستریی به این پلاسمید در مواقع ضروری همسانه سازی آن در *E. coli* XL1blue انجام شد. در انتها جهت انتقال پلاسمید pBI121 حاوی ژن، به گیاه توتون، پلاسمید مذکور به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شد. پس از کشت بافت گیاه توتون بر روی محیط MS، برگ های این گیاه جهت تلقیح با باکتری *A. tumefaciens* حاوی دستواره pBI121 مورد استفاده قرار گرفت. سپس ریز نمونه ها بر روی محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسن و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر سفاتوکسیم قرار گرفتند. جوانه های تولیدی از کالوس ایجاد شده بر روی ریزنمونه‌های حاوی ژن مورد نظر پس از جدا سازی به محیط جدید منتقل شدند. پس از اینکه گیاهان توتون، در شرایط درون شیشه به رشد مناسب رسیدند، به گلدان انتقال یافتند. در این مرحله استخراج DNA از گیاهان تراریخت انجام شد و در ادامه، آزمون PCR، حضور ژن *TLP-3* به دو شکل با و بدون سیگنال پپتید را تائید کرد. همچنین آزمون RT-PCR که بعد از استخراج RNA از این گیاهان انجام شد، سنتز mRNA ژن *TLP-3* به دو شکل با و بدون سیگنال پپتید را تائید نمود. استخراج عصاره گیاهان تراریخت باعث آشکار شدن توان پروتئین TLP-3 در جلوگیری از رشد قارچ *Alternaria alternata*، شد. انجام مطالعات گلخانه ای نیز نمایانگر توان فعالیت ژن دارای سیگنال پپتید در جلوگیری از بیماری زایی قارچ *A. alternata* بود.

کلمات کلیدی: ژن شبه تئوماتین، سیگنال پپتید، *Agrobacterium tumefaciens*، *Alternaria alternata*

فصل اول

مقدمه

گیاهان مختلف دارای ویژگی‌های متنوعی هستند که بسیاری از آنها توسط ژن‌ها کنترل می‌شوند. محققین همواره به دنبال راه‌هائی جهت انتقال ژن‌های مطلوب از منابع گوناگون به گیاهان بوده‌اند. در ابتدا، روش‌های انتخاب طبیعی و اصلاح نباتات که بر مبنای گزینش صحیح آلل‌ها بود، به بهبود یافتن خصوصیات ژنتیکی گیاهان کمک کرد. از سال ۱۹۷۰، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در ابداع ابزارهای لازم برای دستورزی اطلاعات ژنتیکی در گیاهان توسط روش‌های DNA نوترکیب رخ داده است[۸٦]. انتقال ژن یا جذب DNA فرایندی است که طی آن قطعه مشخصی از DNA (معمولاً یک ژن خارجی وارد شده در یک پلاسمید باکتریایی) به درون سلول‌ها وارد می‌شود. گیاهانی که ژن‌های خارجی را از منابع ژنتیکی دیگر با خود حمل می‌کنند و آنها را به صورت پایدار در خود جای داده و بیان می‌نمایند، گیاهان تراریخت نامیده می‌شوند. در سال‌های اخیر، بیوتکنولوژی گیاهی منبعی سرشار از ابداع و خلاقیت بوده و برای مشکلات قدیمی راه حل‌های نوینی فراهم کرده است. ژن‌های گیاهی همسانه سازی می‌شوند، علائم تنظیم کننده ژنتیکی رمز گشائی می‌شوند و ژن‌ها از موجودات کاملاً غیرخویشاوند (خصوصاً باکتری‌ها و ویروس‌ها) برای اعطای صفات زراعی مفید جدید، به گیاهان زراعی منتقل می‌شوند. اولین کاربردهای مهندسی ژنتیک در محصولات کشاورزی، انتقال ژن‌های خارجی با هدف دست‌یابی به گیاهان تراریخت مقاوم به ویروس‌ها، حشرات، علفکش‌ها یا عوامل فساد

پس از برداشت بوده است [۷۸و۴۲]. وجود نگرانی‌هایی در مورد استفاده از گیاهان تراریخت باعث شده است تا بسیاری از کشورها در استفاده از این نوع محصولات با احتیاط بیشتری عمل کنند. امروزه روش‌های مختلفی برای انتقال ژن به گیاهان موجود است که از آن جمله می‌توان به انتقال ژن توسط اگروباکتریوم اشاره نمود. این روش ابتدا درگیاهان دو لپه با هدف دستیابی به گیاهان تراریخت اصلاح شده به کار رفت، ولی در حال حاضر در گیاهان تک لپه مهمی از جمله برنج و گندم نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زائی یا پروتئین های PR[۱] گروهی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در اثر حمله انواع پاتوژن، عوامل تنش‌زای غیر زنده و یا به وسیله کاربرد خارجی برخی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در سلول‌های گیاه تجمع می‌یابند. پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زائی اولین بار در سال ۱۹۷۸ بر اساس جزئیات سرولوژی و توالی یابی، در گیاه توتون گروه بندی شدند که امروزه نیز اساس طبقه بندی آن ها در سایر گیاهان می‌باشد [۹۰]. بر این اساس ،تاکنون ۱۷ گروه از پروتئین های PR در گیاهان مختلف شناسائی شده‌اند که پروتئین‌های مختلفی مانند کیتینازها[۲]، گلوکانازها[۳]، بازدارنده‌های پروتئیناز[۴]، پراکسیدازها[۵] و پروتئین‌های کوچکی مانند دیفنسین[۶] و تیونین[۷] را در بر می‌گیرند. در گروه پنجم از این طبقه بندی، پروتئین‌هایی قرار می‌گیرند که دارای تشابه توالی با پروتئین شیرین مزه تئوماتین[۸] بوده و به آن ها پروتئین‌های شبه تئوماتین[۹] می‌گویند. فعالیت ضد قارچی پروتئی‌های شبه تئوماتین اولین بار در سال ۱۹۹۰ در یکی از پروتئین‌های جدا شده از گیاه ذرت به نام زئوماتین گزارش شده و تا به امروز گزارش‌های متعددی از مکانیزم ضد میکروبی آن ها ذکر شده است [۸۱و۴۰]. به طور معمول، حضور این پروتئین‌ها منجر به از بین رفتن تراکم سلول‌های قارچی شده و منافذی در غشای سلولی قارچ ایجاد می‌کند که سبب افزایش نفوذ آب به سلول و تخریب آن می‌شود [۷۶و۴۰] تحقیقات دیگری نیز، نقش پروتئین‌های شبه تئوماتین را در از بین بردن دیواره سلولی نشان داده‌اند [۱۱۵]. از سوی دیگر در گیاه سیب زمینی مقاوم به *Phytophthora infestans* نوع دیگری از مکانیسم مقاومت گزارش شده است. بدین صورت که پروتئین‌های شبه تئوماتین همراه با فیلامنت‌های اکتین در رسوب سیتوپلاسمی که در محل نفوذ هیف‌های قارچی است تجمع می‌کنند و از نفوذ قارچ جلوگیری می‌نمایند

۱- Pathogenesis-related (PR)-proteins
۲- Chitinases
۳- Glucanases
۴- Proteinase-inhibitor
۵- Peroxidases
۶- Defensin
۷- Thionin
۸- Thaumatin
۹- Thaumatin like protein

[٧٦]. با توجه به اهمیت ژن‌های مذکور و عدم انجام بررسی‌های کافی در ایران، ژن *TLP-3* که ازجمله ژن‌های تولید کننده پروتئین‌های شبه تئوماتین است، انتخاب گردید.

ژن *TLP-3* که دارای خصوصیات مهمی از جمله فعالیت ضد میکروبی می‌باشد، در گیاه یونجه یکساله شناسایی شده است. میزان بیان این ژن تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند تنش شوری، زخم و سطح تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد. هدف‌گیری مسیر حرکت پروتئین TLP-3 همانند اغلب پروتئین‌های پروکاریوتی و یو کاریوتی، توسط سیگنال پپتید انجام می‌شود [٣٧]. فقدان وجود شواهدی مبنی بر انتقال ژن *TLP-3*، منجر به انتخاب گیاه مدل توتون جهت انتقال ژن مذکور شد. همچنین عدم اطلاع ازتوان فعالیت سیگنال پپتید یک گیاه در گیاه دیگر باعث طراحی و انتقال ژن *TLP-3* به دو صورت همراه با سیگنال پپتید وبدون سیگنال پپتید گردید.

فصل دوم

بررسی منابع

زندگی بشر به وجود و سلامتی گیاهان وابسته است. حدود۹۰% غذای انسان از گیاهان تامین می‌شود و بنابراین توجه به حفظ و سلامتی آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است [۲]. بیماری‌های گیاهی، شرایط جوی نامناسب، علف‌های هرز و آفات گوناگون عمده ترین عوامل تقلیل محصول یا نابودی گیاهان به شمار می‌روند [۶]. اهمیت بیماری‌های گیاهی غالباً ناشی از خساراتی است که به گیاهان و محصولات آنها وارد می‌سازند [۲].

هرگاه براثر عوامل زنده بیماری‌زا یا شرایط زیستی، اختلالاتی در فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه بروز کند که موجب کاهش رشد متعارف آن شود، گیاه بیمار می‌شود. بنابراین برای بروز بیماری رابطه متقابل پاتوژن، شرایط جوی و میزبان بسیار مهم است و رابطه آن ها توسط یک مثلث، که مثلث بیماری‌زایی نام دارد، نشان داده می‌شود. در نتیجه، بیماری در گیاه را می‌توان اختلال در وظایف سلول‌ها و بافت‌های گیاه میزبان که در اثر تحریک مداوم یک عامل بیماری‌زا یا یک فاکتور محیطی به وجود آمده و به ظهور علایم منجر می‌شود تعریف کرد [۶].

تا کنون در حدود صد هزار گونه از قارچ‌ها شناسایی شده‌اند که حدود پنجاه گونه باعث ایجاد بیماری در انسان و بالغ بر ده هزار گونه سبب ایجاد بیماری در گیاهان می‌شود [۶]. به طور معمول

یک گونه گیاهی نسبت به تعداد محدودی قارچ بیشترین حساسیت را نشان می‌دهد، همچنین یک گونه قارچی نیز می‌تواند یک یا تعداد کمی از گونه‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار دهد [۸۳].

گیاهان سیستم ایمنی ندارندکه بتواند آنها را محفوظ نگه دارد ولی تکامل همزمان گیاه و پاتوژن و همچنین آرایش دادن مکانیسم‌های دفاعی مختلف توسط گیاهان باعث تبادل اطلاعات مولکولی بین گونه‌های گیاهی و توسعه سیستم مراقبتی در آنها شده است [۲۹و۱۰]. اختلاف بین موفقیت یا شکست در دفاع گیاهی به زمان حمله پاتوژن تا شناسایی آن به وسیله گیاه و فعال کردن سیستم دفاعی بستگی دارد [۲۹]. هنگامی که سیستم دفاعی فعال می‌شود یک گستره بسیار وسیعی از پروتئین‌ها در داخل گیاه تحریک می‌شوند که از این بین می‌توان به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اشاره نمود [۹۸].

گیاهان با ایجاد سدهای دفاعی و همچنین تحریک واکنش‌های دفاعی مکانیسم‌های مراقبتی را ایجاد می‌کنند [۱۴]. از جمله سدهای دفاعی می‌توان به وجود کوتیکول، دیواره سلولی و ترکیبات ضد سمی اشاره کرد. واکنش‌های دفاعی نیز پس از اتصال پاتوژن به اندام‌های هدف و تشخیص سیگنال مولکولی ویژه توسط میزبان آغاز می‌شود[۸۳]. تحریک میزبان باعث راه اندازی شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالی به منظور ایجاد واکنش دفاعی هماهنگ در آن می‌شود. بر این اساس نه تنها بیان ژن‌های مرتبط با واکنش‌های دفاعی تحت تاثیر قرار می‌گیرد بلکه تعداد زیادی از ژن‌های دیگر نیز فعال یا خاموش می‌شوند [۱۱۲]. تشخیص اولیه و به هنگام پاتوژن توسط گیاه در فعال سازی سریع ژن‌های موثر در واکنش‌های دفاعی نقش اساسی ایفا می‌نماید [۳۶].

۲-۱- چگونگی دفاع گیاه در مقابل پاتوژن

مقاومت در گونه‌های گیاهی به میزبان اختصاصی و میزبان غیراختصاصی تقسیم می‌گردد. مقاومت میزبان غیراختصاصی، تمام ارقام یک گیاه را در مقابل یک پارازیت یا پاتوژن خاص دربرمی‌گیرد مقاومت میزبان اختصاصی در اثر برهم کنش مابین میزبان اختصاصی و ژنوتیپ‌های پاتوژن ظهور می‌کند [۳۶]. تغییرات شیمیایی که در خلال تلقیح صورت می‌گیرد نیز در گیاهان غیرمیزبان و ارقام مقاوم میزبان بسیار مشابه است [۸۹].

هر گیاه در طبیعت در معرض حمله هزاران میکروارگانیزم قرار داشته ولی فقط توسط تعداد کمی از آنها بیمار می‌شود. ابتدایی‌ترین واکنش دفاعی دربرابر پاتوژن‌ها باز شدن کانال‌های یونی خاص در سرتاسر غشای پلاسمایی، تولید سریع انواع اکسیژن فعال (AOS)[۱] مانند O_2 و H_2O_2 که به عنوان

۱- Active Oxygen Species

انفجار اکسیژنی شناخته می‌شود و همچنین جذب و دفع فسفر در پروتئین‌های خاص است [۲۴]. این واکنش‌های اولیه پیش نیازی است برای آغاز شبکه سیگنالی که تمام واکنش‌های دفاعی را راه‌اندازی می‌کنند [۳۴]. تولید سریع انواع اکسیژن فعال برای پاتوژن‌ها سمی بوده و فعال سازی واکنش فوق حساسیت (HR)[۱] را در پی خواهد داشت. واکنش فوق حساسیت می‌تواند در ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های بیو تروف[۲] که انرژی خود را از سلول‌های زنده بدست می‌آورند، موثر باشد اما در برابر پاتوژن‌های نکروتروف[۳] که انرژی خود را از سلول‌های مرده بدست می‌آورند نه تنها موثر نیست بلکه به سود آن ها نیز هست [۸۳]. در ادامه‌ی واکنش فوق حساسیت، قسمت های غیر متاثرگیاه برای جلوگیری از آلوده شدن، به توسعه مقاومت می پردازندکه به این پدیده مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)[۴] گویند. در گونه‌های متعددی به وسیله افزایش سیستمیک اسید سالیسیلیک، مقاومت اکتسابی سیستمیک راه اندازی می‌شود [۴۸]. گیاهان می‌توانند بر مبنای نوع عملکرد پاتوژن، مسیر های مقاومت تفکیک شده‌ای را فعال کنند. واکنش‌های وابسته به اسید جاسمونیک و اتیلن به وسیله پاتوژن‌های نکروتروف و واکنش وابسته به اسید سالیسیلیک به وسیله پاتوژن‌های بیوتروف فعال می شود. در ارتباط با همکاری‌های متقابل مسیرهای دفاعی که به واسطه اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک یا اتیلن ایجاد می‌شود پیشنهادات متعددی ارائه شده است [۹۶و۸۵].

واکنش فوق حساسیت، انفجار اکسیژنی و مقاومت اکتسابی سیستمیک در ارتباط با یکدیگر باعث تحریک رونویسی تعداد زیادی از ژن‌های دفاعی می‌شوند. یک دسته وسیع از این ژن‌ها، ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند که به طور کلان هم فعالیت سیستمیک و هم فعالیت موضعی را تحریک می کند [۸۳].

به طور کلی مکانیزم‌های دفاعی گیاهان در مقابل حمله پاتوژن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول مکانیزم‌هایی است که قبل از حمله پاتوژن در گیاه وجود دارند. دسته دوم مکانیزم‌هایی هستند که به صورت عکس العمل پس از عفونت در گیاه به وجود می‌آیند. در هر دو مورد سدهای دفاعی ممکن است فیزیکی و ساختمانی بوده، یا جنبه شیمیایی داشته باشند [۲].

۱- Hypersensitive Reaction
۲- Biotrophic Pathogens
۳- Necrotrophic Pathogens
۴- Systemic Acquired Resistance

۲-۱-۱- سدهای ساختمانی دفاع قبل و بعد از آلودگی

از سدهای دفاعی قبل از حمله پاتوژن می‌توان به وجود موم و کوتیکول در سطح اپیدرم، ساختمان دیواره سلول‌های اپیدرم ، اندازه، محل و شکل روزنه و عدسک‌ها و همچنین وجود سلول‌های با دیواره ضخیم در بافت که در جلوگیری از نفوذ پاتوژن به داخل گیاه و بافت موثرند، اشاره نمود [۲].

بعضی از پاتوژن‌ها ممکن است از خطوط دفاعی اولیه بگذرند ولی قادر به ایجاد بیماری نباشند. بعضی از سدها در نتیجه تغییر بافت یا رسوب برخی مواد در مسیر حرکت پاتوژن به وجود می‌آیند که به آن ها سدهای دفاعی بافتی اطلاق می‌شود. سدهای دفاعی بافتی شامل تشکیل لایه‌های چوب پنبه‌ای، لایه‌های جداشونده، تشکیل تیلوز و صمغ می‌باشند [۳۳و۲].

۲-۱-۲- سدهای شیمیایی دفاع قبل و بعد از آلودگی

در مواد مترشحه از ریشه و اندام‌های هوایی گیاه، گاهی ترکیباتی وجود دارند که قبل از حمله پاتوژن به گیاه از ایجاد آلودگی جلوگیری می‌کنند [۳۳و۲].

سلول‌ها و بافت‌های گیاهی در پاسخ به آسیب ناشی از بیمارگرها و یا عوامل فیزیکی و شیمیایی، بازدارنده‌های زیست شیمیایی ایجاد می‌کنند که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی اشاره نمود [۶].

۲-۲- پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی پروتئین-هایی هستند که تحت شرایط حمله پاتوژنی یا موقعیت‌های مرتبط با آن به وسیله ژنوم گیاه میزبان رمز می‌شوند [۹۷و۷۴]. کشف اولین پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه توتون آلوده با ویروس TMV[۱] صورت گرفت، ولی بعدها پروتئین‌های مشابهی از دیگر گیاهان شامل انواع دولپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها استخراج شد [۹۸و۷۴و۳۴].

پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی در گیاهان سالم در غلظت پائین موجود بوده و بعد از حمله پاتوژن‌هائی مانند ویروس‌ها، ویروئیدها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتودها، حشرات و گیاه خواران وحتی ایجاد زخم بر روی گیاه یا بروز تنش‌های غیر زیستی میزان آن ها به حدود ۱۰درصد پروتئین‌های محلول موجود در برگ می‌رسد [۸۳]. مقدار زیادی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در پاسخ به واکنش فوق حساسیت در گیاهان تولید می‌شوند که البته تجمع این پروتئین‌ها نسبت به واکنش‌های مرتبط با

۱- Tobacco Mosaic Virus