۱۰۲۲۵۲

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه بین المللی امام خمینی
دانشکده فنی و مهندسی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

همسانه‌سازی ژن پروتئین بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز۱ عامل مقاومت به برخی از بیماری‌های قارچی در سیب

نگارش:
روح‌الله مالکی

استاد راهنما:
دکتر رامین حسینی

استاد مشاور:
دکتر رحیم حداد

۱۳۸۷ /۷/ ۱۱

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

مرداد ۱۳۸۷

۱۰۲۲۵

دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

دانشکده فنی و مهندسی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

بدینوسیله گواهی می‌شود جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد روح‌الله مالکی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی تحت عنوان "همسانه‌سازی ژن پروتئین بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز۱ عامل مقاومت به برخی از بیماری‌های قارچی در سیب" در تاریخ ۱۳۸۷/۵/۱ با موفقیت برگزار و با نمره ۱۹/۶ و رتبه عالی مورد تایید هیات داوران به شرح ذیل قرار گرفت:

۱- استاد راهنما: دکتر رامین حسینی

۲- استاد مشاور: دکتر رحیم حداد

۳- داور خارجی: دکتر مختار جلالی جواران

٤- داور داخلی: دکتر قاسمعلی گروسی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر امیر حسین بیکی

تحصیلات تکمیلی حوزه آموزشی
دانشگاه بین المللی امام خمینی

تقدیم به

روان پاک

پدرم

تشکر و قدردانی

شکر و سپاس پروردگار یگانه را و درود او بر سرورمان محمد (ص) و تبار پاک او باد.

باز باش ای باب رحمت تا ابد　　بارگاه ما له کفواً احد
باز باش ای باب بر جویای باب　　تا رسد از تو قشور اندر لباب

بدینوسیله از راهنمایی‌های ارزنده و حمایت‌های استاد گرامی جناب آقای دکتر رامین حسینی، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر رحیم حداد، به خاطر بهره‌مندی از تجربیاتشان در انجام پایان‌نامه سپاسگزارم.

از کلیه اساتید محترم گروه، به خاطر زحمات بی‌دریغشان در طول تحصیل اینجانب تشکر می‌نمایم.

از اساتید محترم، آقایان دکتر مختار جلالی جواران، دکتر قاسمعلی گروسی و دکتر امیر حسین بیکی، به خاطر مطالعه دقیق و اظهار نظر بی‌دریغشان در تصحیح مطالب پایان‌نامه، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید محترم، آقایان دکتر مصطفوی و دکتر ضرابی که در تهیه نمونه‌های گیاهی کمک شایانی نمودند، سپاسگزارم.

از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌ها، جناب آقای مهندس سلیمانی و سرکار خانم مهندس قنادنیا به خاطر زحماتشان سپاسگزارم.

همچنین از تمامی دوستان دانشجوی خود به خاطر همراهی، همفکری و زحمات صمیمانه‌شان سپاسگزارم.

چکیده

دیواره سلولی گیاهان، به عنوان اولین سد دفاعی در برابر حمله عوامل بیماریزا عمل می‌کند. پلی‌گالاکتوروناز‌ها جزء آنزیم‌های تغییر دهنده دیواره سلولی گیاهان هستند که توسط عوامل بیماریزای قارچی ترشح می‌شوند و زنجیره‌های هوموگالاکتورونان پکتین دیواره سلولی را تجزیه می‌کنند. در واکنش به محرک‌های زنده و غیر زنده، پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز در گیاهان تولید شده و فعالیت عوامل بیماریزای قارچی را کاهش می‌دهند. پیش از بررسی حاضر، توالی ژنومی یک پروتئین بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز سیب (واریته گلدن دلیشز) که عامل مقاومت به برخی از بیماری‌های قارچی می‌باشد (*Mdpgip1*)، شناسایی شده بود. هدف از این پژوهش همسانه‌سازی ژن *Mdpgip1* در ناقل pTZ19R بود. از آنجائیکه توالی ژنومی این ژن فاقد اینترون بود، ما را قادر ساخت تا جهت تکثیر آن، از آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) که از روی DNA ژنومی طراحی شده بودند استفاده نمائیم. PCR با استفاده از DNA استخراج شده از برگ‌های سیب واریته گلدن دلیشز و آنزیم *pfu* پلیمراز انجام شد. محصول PCR از ژل خالص‌سازی و در ناقل pTZ19R همسانه‌سازی شد. ناقل نوترکیب حاصل از واکنش اتصال، با روش شوک گرمایی به داخل سلول‌های میزبان اشریشیاکولی (*E. coli*) انتقال یافت. کلونی‌های باکتریایی نوترکیب با استفاده از آزمون تفاوت رنگ (سفید- آبی) شناسایی و در نهایت، کلونی‌های نوترکیب بوسیله PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی DNA تایید گردیدند.

کلمات کلیدی: سیب، پروتئین بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز، پلی‌گالاکتوروناز

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱- ۱ سیب درختی ۲

۱- ۱- ۱ تاریخچه ۲

۱- ۱- ۲ طبقه بندی گیاهی ۲

۱- ۱- ۳ پراکنش سیب در جهان و ایران ۳

۱- ۱- ٤ رقم‌های سیب ۳

۱- ۱- ٤- ۱ رقم‌های سیب ایرانی ۳

۱- ۱- ٤- ۲ رقم‌های سیب خارجی ٤

۱- ۲ بیماری‌های قارچی و سیستم‌های دفاعی گیاهان ٥

۱- ۲- ۱ پلی‌گالاکتوروناز‌ها ۷

۱- ۲- ۲ پلی‌گالاکتوروناز‌ها و الیگوگالاکتورونات‌ها محرک‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه ۸

۱- ۲- ۳ پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز و نقش دفاعی آنها در برابر حمله عوامل بیماری‌زا ۹

۱- ۲- ٤ ساختار و خصوصیات مولکولی پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز ۱۲

۱- ۲- ٥ تکامل خانواده ژنی پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز ۱۳

۱- ۳ همسانه‌سازی ژن‌ها ۱٤

۱- ۳- ۱ ناقلین همسانه‌سازی ۱٥

۱- ۳- ۱- ۱ ناقلین پلازمیدی ۱٦

۱- ٤ دلایل ضرورت انجام تحقیق ۱۹

فصل دوم: بررسی منابع ۲۰

۲- ۱ پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز ۲۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۸

۳- ۱ مواد گیاهی و نمونه برداری ۲۹

۳- ۲ استخراج DNA ۲۹
۳- ۳ تخمین کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۳۱
۳- ۳- ۱ اسپکتروفتومتری DNA ۳۱
۳- ۳- ۲ الکتروفورز ژل آگارز ۳۳
۳- ٤ جداسازی ژن *Mdpgip1* با بهره‌گیری از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۳٤
۳- ٤- ۱ طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن ۳۵
۳- ٤- ۲ نحوه انجام PCR اختصاصی ۳٦
۳- ٤- ۲- ۱ PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلی‌مراز *pfu* ۳۷
۳- ٤- ۲- ۲ PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلی‌مراز تک ۳۸
۳- ۵ بررسی محصولات PCR ۳۹
۳- ۵- ۱ بررسی محصولات PCR بوسیله هضم آنزیمی ۳۹
۳- ٦ خالص‌سازی محصولات PCR از ژل آگارز ٤۱
۳- ۷ هضم آنزیمی محصولات PCR خالص‌سازی شده از ژل ٤۱
۳- ۸ هضم آنزیمی ناقل پلازمیدی و حذف فسفر انتهای ۵' ٤۳
۳- ۹ اتصال ژن *Mdpgip1* به ناقل pTZ19R ٤٦
۳- ۱۰ رشد و تکثیر باکتری *E. coli* ٤۸
۳- ۱۱ محیط‌های کشت باکتریایی ٤۸
۳- ۱۱- ۱ محیط کشت LB ٤۸
۳- ۱۱- ۲ محیط کشت SOB حاوی آگار، آمپی‌سیلین، X- Gal و IPTG جهت انجام آزمون سفید- آبی ٤۹
۳- ۱۱- ۳ محیط کشت SOC ۵۰
۳- ۱۲ ذخیره‌سازی باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت مایع ۵۰
۳- ۱۳ آماده‌سازی سلول‌های مستعد *E. coli* با استفاده از کلرید کلسیم ۵۰
۳- ۱٤ تهیه ذخیره سلول‌های مستعد ۵۲
۳- ۱۵ انتقال پلازمید حاوی ژن به سلول‌های مستعد (*E. coli*) ۵۳
۳- ۱۵ - ۱ تخمین بازده سلول‌های تراریخت با استفاده از کنترل مثبت ۵٤
۳- ۱٦ آزمون سریع کلونی‌های نوترکیب بوسیله PCR ۵٤
۳- ۱۷ استخراج پلازمید با استفاده از محلول قلیایی و SDS ۵۵

۳- ۱۸ بررسی کلونی‌های نوترکیب ۵۷
۳- ۱۹ توالی‌یابی DNA ۵۷

فصل چهارم: نتایج و بحث ۵۹
٤- ۱ نتایج استخراج DNA ٦۰
٤-۲ جداسازی ژن *Mdpgip1* ٦۱
٤-۲-۱ طراحی آغازگرهای اختصاصی ٦۱
٤-۲-۲ PCR اختصاصی ٦۲
٤- ۳ تایید محصولات PCR با استفاده از هضم آنزیمی ٦٤
٤- ٤ خالص‌سازی محصولات PCR از ژل ٦٥
٤- ٥ هضم آنزیمی ژن *Mdpgip1* و ناقل پلازمیدی ٦٦
٤- ٦ انتقال سازواره تهیه شده به سلول میزبان ٦۷
٤- ۷ تایید کلونی‌های نوترکیب ۷۰
٤- ۷- ۱ شناسایی سریع کلونی‌های نوترکیب ۷۰
٤- ۷- ۲ تایید کلونی‌های نوترکیب بوسیله هضم آنزیمی و PCR ۷۱
٤- ۸ توالی‌یابی DNA ژن همسانه‌سازی شده ۷۲

نتیجه‌گیری نهایی ۷۳
پیشنهادها ۷٤
منابع ۷٥
پیوست‌ها ۸۲

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: خصوصیات پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز منابع گیاهی مختلف ۱۱

جدول ۳- ۱: تفکیک DNA در ژل‌های آگارز ۳۳

جدول ۳- ۲: مشخصات آغازگرهای استفاده شده جهت PCR اختصاصی ژن ۳۵

جدول ۳- ۳: ویژگی‌های موثر در طراحی آغازگر ۳۶

جدول ۳- ٤: مقدار و غلظت ترکیبات PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلی‌مراز *pfu* ۳۷

جدول ۳- ٥: چرخه حرارتی PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلی‌مراز *pfu* ۳۸

جدول ۳- ٦: مقدار و غلظت ترکیبات PCR اختصاصی با استفاده از DNA پلی‌مراز تک ۳۸

جدول ۳- ۷: مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی محصولات PCR ٤۰

جدول ۳- ۸: مقدار و غلظت ترکیبات هضم آنزیمی ژن *Mdpgip1* ٤۲

جدول ۳- ۹: مقدار و غلظت ترکیبات واکنش اتصال ٤۷

جدول ۳- ۱۰: محیط کشت LB ٤۹

جدول ۳- ۱۱: محیط کشت SOB ٤۹

جدول ٤-۱: اندازه‌گیری کمی و کیفی DNA ژنومی سیب گلدن دلیشز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ٦۱

فهرست اشکال

شکل۱- ۱: نقش الیگوساکاریدها و پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز در القاء واکنش‌های دفاعی ۱۰

شکل ۱- ۲: ساختار پروتئین بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز۲ لوبیا (*P. vulgaris*) ۱۲

شکل ۱- ۳: مراحل اساسی یک آزمایش همسانه‌سازی ۱۵

شکل ۱- ٤: ناقل پلازمیدی pUC19 ۱۸

شکل ٤-۱: نمای DNA استخراج شده به روش تغییر یافته لودهی و همکاران ٦۰

شکل ٤- ۲: تکثیر ژن *Mdpgip1* بوسیله تکنیک PCR و دمای اتصال ٦۱ درجه سانتیگراد ٦۳

شکل ٤- ۳: تکثیر ژن *Mdpgip1* بوسیله تکنیک PCR و دمای اتصال ٦۲ درجه سانتیگراد ٦٤

شکل ٤- ٤: تایید محصولات PCR با استفاده از هضم آنزیمی ٦٤

شکل ٤- ٥: الکتروفورز محصولات PCR، جهت خالص‌سازی ژن *Mdpgip1* از ژل آگارز ٦٦

شکل ٤- ٦: ژن *Mdpgip1* پس از خالص‌سازی از ژل آگارز ٦٦

شکل ٤- ۷: ایجاد انتهای چسبنده در ناقل پلازمیدی و محصول PCR ٦۷

شکل ٤- ۸: شناسایی کلونی‌های باکتریایی نوترکیب با استفاده از آزمون سفید- آبی ٦۹

شکل ٤- ۹: کلونی‌های سبز رنگ مشاهده شده در آزمون سفید- آبی ٦۹

شکل ٤- ۱۰: آزمون سریع کلونی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR ۷۰

شکل ٤- ۱۱: تایید کلونی‌های نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی ۷۱

شکل ٤- ۱۲: محصول PCR حاصل از ٥ کلونی نوترکیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۷۲

فهرست پیوست‌ها

پیوست۱: سطح زیر کشت سیب کشور به تفکیک استان در سال ۱۳۸٤ ۸۳

پیوست ۲: میزان تولید و عملکرد سیب کشور به تفکیک استان در سال ۱۳۸٤ ۸٤

پیوست ۳: توالی نوکلئوتیدی DNA ژنومی ژن *Mdpgip1* ۸۵

پیوست ٤: تجزیه و تحلیل مکاهای برشی ژن *Mdpgip1* ۸٦

پیوست ۵: محل قرارگیری آغازگرها ۸۷

پیوست ٦: نقشه ژنتیکی ناقل pTZ19R و مکان‌های برشی روی پلی‌لینکر آن ۸۸

پیوست ۷: نتیجه تعیین توالی ژن *Mdpgip1* ۹۰

پیوست ۸: تطابق توالی نوکلئوتیدی ژن همسانه‌سازی شده با ژن *Mdpgip1* سیب واریته گلدن دلیشز ۹۱

پیوست ۹: مقایسه میزان مشابهت توالی ژن *Mdpgip1* سیب با پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز منابع گیاهی مختلف ۹۲

فصل اول

مقدمه

۱- ۱ سیب درختی

۱- ۱- ۱ تاریخچه

سیب از گونه‌های وحشی موجود در اروپا و آسیا بدست آمده است. در حدود ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح درختان سیب از طریق بذر تکثیر و کشت می‌شدند و ساکنین اطراف دریاچه‌های شمال اروپا و قسمتی از سوئیس از سیب خشک شده به عنوان غذا استفاده می‌کرده اند. حدود ۲۲۵ سال قبل از میلاد مسیح ارقام بسیاری از سیب در رم تکثیر می‌شده ولی آثاری از وجود درختان سیب در ایران بدست نیامده است. سیب از بخش غربی آسیا و جنوب روسیه و اروپا ابتدا به صورت بذر و دانه و سپس پاجوش و پیوند در اروپا و آسیا منتشر شده و پراکندگی در هر دو نیمکره بین ۳۰ تا ۶۰ درجه عرض جغرافیایی محدود می‌گردد (طه نژاد، ۱۳۸۰).

۱- ۱- ۲ طبقه بندی گیاهی

درخت سیب از راسته و خانواده گل‌سرخ[1]، جنس مالوس[2] و گونه دمستیکا[3] بوده و دارای ارقام مختلفی می‌باشد. عدد پایه کروموزومی آن برابر ۱۷ (X=۱۷) و تعداد کروموزوم‌های آن متفاوت (۳٤، ۵۱، ٦۸) است. این گیاه تابع آب و هوای سرد معتدل با نیاز سرمایی متوسط می‌باشد و جهت رشد و نمو خاک‌های رسی شنی حاصلخیز با عمق کافی و pH خنثی را می‌پسندد.

ریشه گیاه با توجه به نوع بافت خاک، واریته و اثرات متقابل عوامل محیطی نبات، می‌تواند تا چندین متر در خاک فرو رود. بیشترین رشد ریشه‌ها، در بهار از زمان باز شدن جوانه‌ها تا خرداد ماه است.

ساقه درخت به سبب حالت خاص، قابلیت انعطاف پذیری و پرورش نهایی به انواع فرم‌ها را دارد. جوانه‌ها در درخت به چند دسته شامل: چوب، گل، انتظار و خفته تقسیم می‌شوند.

گل‌ها در آن منظم و مجتمع دارای ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ به رنگ سفید یا صورتی، ٦- ٤ تخمک و تخمدان بوده و پرچم‌ها زرد رنگ و تعداد آنها مضربی از ۵ می‌باشد (طه نژاد، ۱۳۸۰).

1- Rosaceae
2- Malus
3- Domestica

۱- ۱- ۳ پراکنش سیب در جهان و ایران

مناطق عمده تولید کننده سیب جهان بین عرض های شمالی و جنوبی ۳۰ تا ٦۰ درجه قرار گرفته است. سیب به ترتیب در کشورهای اروپای غربی، آمریکا، اروپای شرقی، کانادا، ژاپن، استرالیا و آرژانتین کشت و تولید می‌شود. در ایران تا سال ۱۳٤۰ سیب به میزان بسیار کم تولید و بیشتر جنبه تفننی و محلی داشته است. اما پس از آن جهشی ناگهانی رخ داده که به دلیل وارد کردن بذر و نهال سیب و کاشت ارقام معروف مانند رد دلیشز[1] و گلدن دلیشز[2] از کشورهای دیگر بوده است (شناسه تصویری سیب، ۱۳۷۸).

جداول مربوط به سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد سیب کشور در سال ۱۳۸٤ در پیوست ۱ و ۲ نشان داده شده است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۵).

۱- ۱- ٤ رقم‌های سیب

رقم‌های سیب به دو دسته رقم‌های ایرانی و خارجی تقسیم می‌شوند، که در ادامه مهمترین آنها به اختصار تشریح می‌شود.

۱- ۱- ٤- ۱ رقم‌های سیب ایرانی

مهمترین ارقام سیب ایرانی شامل موارد زیر است (شناسه تصویری سیب، ۱۳۷۸):

سیب گلاب: دم میوه بلند، باریک و رنگ پوست آن سبز زیتونی و معطر می‌باشد. سیب گلاب به دلیل زودرسی و کیفیت خوب معروف است و در دشت‌های شهریار، قزوین، کرج و شاهرود گسترش دارد.

سیب گلشاهی: میوه این رقم کروی، رنگ سرخ تا سبز دارد و درختانش زود به گل و میوه می‌نشینند. مرکز تولید این سیب دره کنگ نزدیک وکیل آباد مشهد است در این دره درختان پیوندی هنوز پس از ۹۰ سال باردهی اقتصادی دارند.

سیب شفیع آبادی: دارای رنگ مخلوط سرخ و سفید و شکل گرد و کمی کشیده و منظم می‌باشد. دارای پوستی صاف، شیرین و قدری کم آب است. در مناطق کرج، شهریار و اصفهان گسترش دارد.

1- Red delicious
2- Golden delicious

سیب عباسی مشهد: این رقم از نظر مزه شیرین تر از گلدن دلیشز می‌باشد و با این که سیب های رد و گلدن از دامنه کشت آن کاسته است اما هنوز هم قسمت مهمی از سیب‌های پاییزه و زمستانه کشور از این رقم می‌باشد. این نوع سیب دارای دو زیر رقم به نام‌های عباسی دراز و عباسی گرد است و در دره خرو نیشابور که از مهمترین نواحی میوه خیز خراسان است، گسترش دارد.

سیب اوغاز شیروان: دره اوغاز در شیروان از بهترین نقاط برای پرورش این سیب است و گونه شیخ احمد یوسفی که از زیر رقم های سیب اوغاز می‌باشد از ارقام معروف بشمار می رود که متاسفانه به علت رقابت با گلدن، مانند سایر ارقام بومی و نیز عدم رسیدگی‌های بهزراعی و حساسیت شدید به شپشک واوی، رو به زوال است.

۱- ۱- ٤- ۲ رقم‌های سیب خارجی

مهمترین ارقام سیب خارجی که در ایران رواج دارد عبارتند از:

رد دلیشز[1] و گلدن دلیشز[2]: اصل این دو رقم از آمریکا، میوه آنها متوسط، گرد و کشیده، گوشت سفت، آبدار، خوش طعم، معطر و شیرین است. مدت گلدهی تا رسیدن آن ۱٤٥- ۱٤۰ روز است و درخت آن دارای ارتفاع متوسطی است. عمر انباری میوه رقم رد دلیشز زیاد نیست و زود پژمرده می‌شود. این ارقام در ارتفاعات دماوند، سمیرم، طالقان، آذربایجان شرقی و غربی ایران گسترش دارند. هر کدام از این ارقام دارای نژادهای جدید است که در ایران کشت می‌شود.

سیب گرانی اسمیت[3]: مبدا این رقم از جنوب استرالیا بوده که رقم جدیدی برای ایرانیان است. عقیده بر این است که والدین این واریته *Malus domestica* و *Malus sylvestris* باشند. این سیب به سیب سبز هم معروف است و رنگ پوست آن سبز خالدار می‌باشد. میوه آن کرمی مایل به سبز، ترش مزه، آبدار و دیررس است. سیب گرنی اسمیت از سیب‌های دیگر ترش‌تر است و نسبت به دیگر سیب‌های سبز بافت سخت‌تری دارد. این سیب جهت رسیدگی میوه به ساعت‌های سرمای زمستانه کمتر و فصل رشد طولانی‌تری نیاز دارد، بنابراین در مناطق معتدل رشد بهتری از خود نشان می‌دهد. این سیب به دلیل ترشی زیاد مورد استقبال ایرانیان قرار نگرفته است.

1- Red delicious
2- Golden delicius
3- Granny smith

۱- ۲ بیماری‌های قارچی و سیستم‌های دفاعی گیاهان

قارچ‌ها جزء سلول‌های فاقد کلروفیل و دارای هسته مشخص هستند. آنها نمی‌توانند از دی‌اکسید کربن هوا استفاده نمایند و مانند گیاهان سبزینه‌دار مواد غذایی خود را بسازند، به همین دلیل به طرق مرده خواری[1]، انگلی[2]، همزیستی[3] و گوشت خواری[4] در طبیعت به سر می‌برند. از ۱۰۰،۰۰۰ گونه قارچ شناخته شده بیشتر آنها ساپروفیت بوده و روی مواد مرده و بی جان فعالیت می‌نمایند، از این رو در تجزیه مواد آلی گیاهی و حیوانی دخالت دارند. حدود ۵۰ گونه باعث ایجاد بیماری‌های انسانی و در همین حدود هم در حیوانات بیماری‌های پوستی به وجود می‌آورند. بیش از ۸،۰۰۰ گونه قارچ در گیاهان باعث ایجاد بیماری می‌شوند. تمام گیاهان مورد حمله قارچ‌ها قرار می‌گیرند و هر یک از قارچ‌های انگلی می‌توانند یک یا چند گیاه را آلوده نمایند. برخی فقط در صورتی می‌توانند رشد و تکثیر یابند که در تمام طول زندگی خود با گیاهان میزبانشان در تماس باشند (انگل اجباری) و برخی دیگر فقط در قسمتی از دوره زندگی خود به گیاه میزبان احتیاج دارند، اما قادرند زندگی خود را در محیط کشت مصنوعی نیز تکمیل نمایند و تعدادی نیز روی مواد آلی و مرده و یا در گیاه زنده رشد و تکثیر می‌یابند که گروه اخیر را انگل اختیاری می‌نامند (عدالت، ۱۳۸۱).

با توجه به اهمیت گیاهان و نقش مهمی که خصوصا در تامین غذای انسان و حیوان دارند، کوشش برای افزایش تولید و حفظ آنها از آفات و بیماریها اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. هر گیاه، در طول دوره رشدی خود مورد حمله تقریبا یکصد نوع مختلف عامل بیماری‌زا[5] قرار می‌گیرد، ولی همه آنها قادر به ایجاد بیماری در گیاه نیستند. گیاهان کم و بیش خساراتی را متحمل می‌شوند و بسیاری از آنها جان سالم به در برده و رشد عادی گیاه ادامه می‌یابد (بهداد، ۱۳۷۷).

مکانیسم‌های دفاعی گیاه، در برابر عوامل بیماری‌زا را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: دسته اول شامل مکانیسم‌هایی است که قبل از حمله عوامل بیماری‌زا در گیاه وجود دارند و دسته دوم، مکانیسم‌هایی هستند که به صورت عکس العمل پس از عفونت در گیاه به وجود می‌آیند. در هر دو مورد سدهای دفاعی ممکن است فیزیکی یا ساختمانی بوده و یا جنبه شیمیایی داشته باشند (بهداد، ۱۳۷۷).

1- Saprophytism
2- Parasitism
3- Symbiotism
4- Carnivorism
5- pathogen

دیواره سلولی اولین سدی است که سلول‌های گیاهی از آن در مقابل حمله عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کنند (د لورنزو و فراری[1]، ۲۰۰۲). بیشتر عوامل بیماری‌زای گیاهی برای موفقیت در تشکیل کلونی در بافت گیاه، آنزیم‌هایی ترشح می‌کنند که این آنزیم‌ها می‌توانند پلیمرهای دیواره سلولی را تجزیه کنند (اسکوئر و همکاران[2]، ۲۰۰۰). این پلیمرها به عنوان سوبسترا[3] برای آنزیم‌های متعددی که توسط عوامل بیماری‌زای میکروبی ترشح می‌شوند، عمل کرده و برای این عوامل بیماری‌زا باعث تولید غذا می‌شوند (دی اویدیئو و همکاران[4]، ۲۰۰۴). آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی به خصوص برای آن دسته از عوامل بیماری‌زای قارچی که ساختمان‌های نفوذی مخصوص ندارند و برای عوامل بیماری‌زای نکروتروفیک[5] در طی مراحل نهایی جریان گسترش بیماری بسیار مهم هستند (د لورنزو و فراری، ۲۰۰۲).

پکتین[6] یک ترکیب پیچیده پلی‌ساکاریدی است که در دیواره سلولی گیاهان دولپه‌ای و تک لپه‌ای‌های غیر گرامینه وجود دارد. محل تجمع این ترکیب تیغه میانی است که باعث کنار هم نگه‌داشتن سلول‌های گیاهی در مجاورت یکدیگر می‌شود (اسکوئر وهمکاران، ۲۰۰۰). عوامل بیماری‌زای گیاهی هنگامی که با دیواره‌های سلول گیاهی روبه‌رو می‌شوند اولین آنزیم‌هایی که ترشح می‌کنند یک دسته از پکتینازها[7] شامل پلی‌گالاکتوروناز‌ها[8]، پکتین لیازها[9]، پکتات لیازها[10] و پکتین استرازها[11] می‌باشند که به منظور حمله به نواحی هوموگالاکتورونان[12] دیواره سلولی، بیان می‌شوند. در این میان پلی‌گالاکتوروناز‌ها جزء اولین گلیکانازهای[13] ترشح شده بوده و میزان آنها از همه بیشتر است، در ضمن آنها نقش اصلی را در بیماری‌زایی بر عهده دارند (اسکوئر وهمکاران، ۲۰۰۰).

پروتئین‌های بازدارنده پلی‌گالاکتوروناز[14]، در دیواره سلولی بسیاری از گیاهان وجود داشته و قادرند تشکیل کلنی‌های قارچی را محدود کنند. این کار با کند کردن فعالیت هیدرولیتیکی

1- De Lorenzo and Ferrari
2- Esquerre *et al*
3- Substrate
4- D' Ovidio *et al*
5- Necrotrophic
6- Pectin
7- Pectinases
8- Polygalacturonases
9- Pectin lyases
10- Pectate liases
11- Pectinesterases
12- Homogalacturonane
13- Glicanases
14- Polygalacturonase inhibiting proteins

اندوپلی‌گالاکتوروناز‌ها[1] و تجمع مناسب الیگوگالاکتورونیدها[2] (محرک پاسخ‌های دفاعی مختلف گیاه) انجام می‌شود (زارع مهرجردی و همکاران، ۱۳۸٤).

۱- ۲- ۱ پلی‌گالاکتوروناز‌ها

پلی‌گالاکتوروناز‌ها بوسیله عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و نماتودها ترشح می‌شوند. پلی‌گالاکتوروناز‌هایی که زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونات[3] را به طور تصادفی می‌شکنند و به الیگوگالاکتورونات[4] تبدیل می‌کنند، به اندوگالاکتوروناز‌ها[5] معروفند و آنهایی که زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونات را به طور انتهایی می‌شکنند و محصولات مونومریک (گالاکتورونیک اسید) ایجاد می‌کنند، به اگزوپلی‌گالاکتوروناز معروفند. اندوپلی‌گالاکتوروناز‌ها مناطق استری نشده هوموگالاکتورونان‌های[6] پکتین دیواره سلولی را تخریب می‌کنند. تخریب و تکه تکه کردن هوموگالاکتورونان توسط اندوپلی‌گالاکتوروناز‌ها منجر به تشکیل الیگوگالاکتورونیدها[7] می‌شود.

پلی‌گالاکتوروناز‌ها به وسیله خانواده‌های چندژنی که اندازه‌هایشان با هم متفاوت و نیز دارای اثرات اختصاصی هستند، رمز می‌شوند. برای مثال، عوامل بیماری‌زایی مانند *Sclerotinia sp.* و *Botrytis cinerea* که دارای شش ژن رمز کننده اندوپلی‌گالاکتوروناز هستند، به دسته بزرگی از گونه‌های گیاهی حمله می‌کنند و قدرت بیشتری در بیماری‌زایی دارند، در حالی که عوامل بیماری‌زا با دامنه میزبانی محدود، مانند *Colletotrichum lindemuthianum* دارای ژن‌های رمز کننده اندو پلی‌گالاکتوروناز کمتری هستند (اسکوئر و همکاران، ۲۰۰۰).

اندوپلی‌گالاکتوروناز‌ها و آنزیم‌هایی که شبکه پکتینی را تجزیه می‌کنند، هسته مرکزی مشابهی شامل رشته‌های موازی دارند که به صورت مارپیچ راست گرد بتا[8] شکل گرفته است. شکل خمیدگی مارپیچ بتا، باعث پایداری این آنزیم در محیط خارج سلولی می‌شود و این امر باعث می‌شود که این آنزیم‌ها به طور مداوم و به میزان کافی وجود داشته باشند.

ژن‌هایی که پلی‌گالاکتوروناز‌ها را رمز می‌کنند در خانواده‌هایی قرار می‌گیرند که اعضایشان درجه بالایی از چندشکلی را نشان می‌دهند. چندگانگی ایزوفرم‌های پلی‌گالاکتوروناز‌ها منعکس کننده

1- Endo-Polygalacturonases
2- Oligogalacturonides
3- Polygalacturonate
4- Oligogalacturonate
5- Endo-Galacturonase
6- Homogalacturonan
7- Oligogalacturonides
8- β-helix

پیچیدگی مولکول پکتین در دیواره سلولی گیاهی و حضور آنزیم‌های توانا برای شکستن اسکلت ساختمانی هوموگالاکتورونان است. آرایش پلی‌گالاکتورونازها با طیف وسیعی از نحوه عمل، سوبسترای اختصاصی و pH برای عوامل بیماری‌زای قارچی مفید است و به عوامل بیماری‌زای مختلف اجازه تهاجم در شرایط متفاوت را می‌دهد و باعث حفظ عمل بیماری‌زایی قارچ می‌شود (گوماتی و گانامانیکام[1]، ۲۰۰٤).

۱- ۲- ۲ پلی‌گالاکتورونازها و الیگوگالاکتورونات‌ها محرک‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه

پلی‌گالاکتورونازها نحوه عمل متفاوتی روی سوبسترای پکتیکی دارند. اندوپلی‌گالاکتورونازها با حمله به دیواره سلول‌های گیاهی، زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونات را به صورت تصادفی به زنجیره‌های کوچک الیگوگالاکتورونات تجزیه می‌کنند. الیگوگالاکتورونات‌های تولید شده محرک فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه هستند و حتی در غلظت خیلی کم (در حد نانومول) نیز، به طور کارآمدی توانایی القاء سیستم دفاعی گیاهان برای پاسخ به عوامل بیماری‌زا و محرک‌هایشان را دارند. آنها بعد از مدت کوتاهی توسط اندوپلی‌گالاکتورونازها به قطعات کوچکتر تبدیل می‌شوند که فعالیت تحریک کنندگی کمی دارند یا اصلا فعالیت تحریک کنندگی ندارند. اندوپلی‌گالاکتورونازهای قارچی هنگامی که وارد بافت‌های گیاهی می‌شوند، برای پاسخ‌های دفاعی گیاه مثل تجمع فیتوالکسین‌ها[2]، سنتز لیگنین، اتیلن، بازدارنده پروتئیناز۱[3] و محصولات بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز[4] نقش محرک را ایفا می‌کنند (گوماتی و گانامانیکام، ۲۰۰٤).

فعالیت تحریک کنندگی الیگوگالاکتورونیدها در بسیاری از گیاهان دولپه‌ای گزارش شده ولی برای گیاهان تک لپه‌ای گزارشی وجود ندارد که احتمالا به دلیل محتوای بسیار پایین پلی‌ساکاریدهای پکتیکی در دیواره سلولی تک لپه‌ای‌ها است (گوماتی و گانامانیکام، ۲۰۰٤).

1- Gomathi and Gnanamanickam
2- Phytoalexin
3- Proteinase inhibitor1
4- β-1,3 Glucanase