بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

بررسی نقش ژن شبه همومیوسین-۴ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

از:

یعقوب احمدیوسفی

استاد راهنما:

دکتر محمدمهدی سوهانی

استادان مشاور:

دکتر سید اکبر خداپرست

دکتر حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی

اسفند ماه ۱۳۹۱

اگر قابل باشد تقدیم به:

پیشگاه مقدس

حضرت زهرا

(سلام الله علیها)

حمد و سپاس خداوندی را، که فضل و احسانش را در میان آفریدگان پراکنده است و دست جود و سخا بر آنان گشاده. در هر کار که کند سپاسگزارش هستیم و برای ادای حقوق او، از او یاری می جوییم

(خطبه ۹۹، نهج البلاغه)

پس از حمد و سپاس به درگاه حضرت حق، بر خود واجب می دانم از پدر و مادر عزیزم که در نهایت لطف و بزرگواری مرا در پیمودن تمام مراحل زندگیم همراهی و یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری نمایم

از استاد راهنمای محترم **آقای دکتر محمد مهدی سوهانی** به پاس زحمات بی دریغشان کمال تشکر را دارم

از استادان محترم مشاور **آقای دکتر سید اکبر خدا پرست** و **آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده لایجی** که از هیچ کمکی برایم فروگذار نکردند تشکر ویژه دارم.

از اساتید محترم داور آقایان **دکتر حسن حسنی کومله** و **دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد** که زحمت بازخوانی پایان نامه را بر عهده داشتند تشکر می کنم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی **سرکار خانم دکتر المیرا محمدوند** تشکر می کنم.

از مدیر محترم گروه بیوتکنولوژی **آقای دکتر حسن حسنی کومله** تشکر می کنم.

از اعضاء محترم هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی، مسئولین و کارکنان محترم دانشکده کشاورزی تشکر می کنم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه های بیوتکنولوژی و ژنومیکس آقایان **مهندس محمد حسین رضادوست** و **مهندس حسام الدین حسینی** تشکر می کنم.

از دوستان و همکلاسی های خوبم خانم ها و آقایان:

آرمینه حیدریان، مینا خوشبخت، ژاله حکمتی، سیده حمیده کاروانکش، سیده حمیده طاهری، هایزدوست، طاهره فتحی، سیده فاطمه حسنی، مریم جلالی افلاکی، تقی مؤذن زاده، محسن ایمان زاده، علی مبارکی، سید فرزاد مقدسی موسوی و سید یونس میرزایی

بقشه فتاح، خزر ادریسی، فاطمه چمنی، صدیقه نصر رمزی، نیلوفر کرمی، سعیده علی دوست، فرزانه نوروزی، زهرا لچکلی، امین امیر میجانی، محمد حسین رضادوست، امین عابدی، محسن صفایی، فرهاد معصومی، پیمان منبری، مهدی شهریاری، مسعود شریف خواه، کامران امیری نسب و سایر دوستان

تشکر می کنم و برای همه ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم

چکیده فارسی ..... د

چکیده انگلیسی ..... ذ

مقدمه ۱

فصل اول: کلیات و مرور منابع ۴

۱-۱- گیاهان ارتباط خود با سایر موجودات را به شدت تنظیم کرده‌اند ۵

۱-۱-۱- پاسخ به باکتری‌های بیماری‌زا: نمونه ای از تنظیم ارتباط گیاهان با سایر موجودات ۵

۱-۱-۲- هم‌زیستی رایزوبیوم-لگوم به عنوان نمونه‌ای از ارتباط گیاهان با باکتری‌های مفید ۶

۱-۱-۲-۱- تبادل سیگنال‌ها بین گیاه و باکتری در ارتباط اولیه بین دو هم‌زیست ۶

۱-۱-۲-۲- گیاهان توسط اتیلن و سالیسیلیک اسید هم‌زیستی رایزوبیوم‌ها را تنظیم می‌کنند ۷

۱-۲- پاتوژن‌ها موجوداتی هستند که فرایندهای دفاعی گیاه را تعدیل می‌کنند ۸

۱-۳- *Botrytis cinerea* به عنوان یک پاتوسیستم مرجع برای بررسی فرایندهای دفاعی گیاه ۱۱

۱-۳-۱- چرخه بیماری ۱۲

۱-۳-۱-۱- اتصال کنیدی‌ها ۱۲

۱-۳-۱-۲- جوانه‌زنی ۱۲

۱-۳-۱-۳- تمایز ساختارهای بیماری‌زایی بر روی سطح میزبان ۱۳

۱-۳-۱-۴- نفوذ به سطح میزبان ۱۴

۱-۳-۱-۵- کشتن میزبان ۱۴

۱-۳-۲- تشکیل نکروزهای اولیه، واکنش‌های دفاعی در میزبان ۱۷

۱-۳-۳- خاموشی در *B. cinerea* ۱۸

۱-۳-۴- گریز از دفاع شیمیایی ۱۹

۱-۳-۵- گسترش بیماری و نابودی بافت‌ها ۲۰
۱-۴- گیاه آرابیدوپسیس به عنوان یک مدل ژنتیکی ۲۰
۱-۵- سیستم ایمنی در گیاهان ۲۱
۱-۵-۱- PAMPs و DAMPs ۲۵
۱-۵-۲- ادراک PAMPs توسط PRRs ۲۶
۱-۵-۳- انتقال پیام در PTI ۲۸
۱-۶- شبکه انتقال پیام در گیاهان ۳۰
۱-۶-۱- سیگنالینگ اتیلن ۳۱
۱-۶-۲- سیگنالینگ جاسمونیک اسید ۳۴
۱-۶-۳- سیگنالینگ سالیسیلیک اسید ۳۶
۱-۷- ژن‌های شبه هومومیوسین: نمونه‌ای دیگر از عناصر حفاظت‌شده بین گیاهان و جانوران ۴۰
۱-۷-۱- هومومیوسین و ژن‌هایی مشابه به آن در آرابیدوپسیس ۴۰
۱-۷-۲- بالاخانواده شبه استریکتوسیدین‌سینتاز ۴۱
۱-۷-۳- ژن‌های شبه هومومیوسین ۴۲

فصل دوم: مواد و روشها ۴۴
۲-۱- شرایط رشد گیاهان آرابیدوپسیس ۴۵
۲-۱-۱- سرمادهی بذور ۴۵
۲-۱-۲- کشت بذور در خاک اولیه ۴۵
۲-۱-۳- انتقال گیاهچه‌ها به خاک اصلی ۴۵
۲-۱-۴- بذرگیری از گیاهان ۴۵
۲-۲- جهش‌یافته‌هایی که در این پژوهش بررسی شدند ۴۷
۲-۳- شرایط رشد پاتوژن *Botrytis cinerea* ۴۷
۲-۳-۱- جداسازی و خالص‌سازی از گل‌های رز آلوده ۴۷

۲-۳-۲- شرایط رشد و اسپوردهی قارچ ۴۸
۲-۴- زیست‌سنجی توسط *B. cinerea* ۴۸
۲-۴-۱- تلقیح به روش اسپری ۴۸
۲-۳-۱-۱- برداشت اسپورها ۴۸
۲-۴-۱-۲- تنظیم غلظت اسپورها ۴۸
۲-۴-۱-۳- شرایط تلقیح ۵۰
۲-۴-۲- تلقیح قطره‌ای در شرایط زنده ۵۰
۲-۵- آزمایش زخم ۵۰
۲-۶- آنالیز علائم حساسیت پس از تلقیح توسط *B. cinerea* ۵۲
۲-۶-۱- روش کار با نرم‌افزار Image J ۵۲
۲-۶-۲- آنالیز داده‌ها ۵۲
۲-۷- اندازه‌گیری بیومس قارچی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی (qPCR) ۵۴
۲-۸- آنالیز DNA ۵۴
۲-۸-۱- استخراج DNA ژنومی ۵۴
۲-۸-۱-۱- استخراج DNA ژنومی از بافت‌های گیاهی آلوده به قارچ ۵۴
۲-۸-۱-۲- استخراج DNA ژنومی گیاه آرابیدوپسیس ۵۴
۲-۸-۱-۳- استخراج DNA ژنومی قارچ *B. cinerea* ۵۵
۲-۸-۲- تعیین غلظت DNA ۵۶
۲-۸-۳- الکتروفورز ژل آگارز ۵۷
۲-۸-۴- آزمون آغازگرها ۵۷
۲-۸-۴-۱- آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها ۵۸
۲-۸-۴-۲- آزمون کارایی تکثیر ۶۰
۲-۸-۵- واکنش Real-time PCR برای کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده ۶۴

فصل سوم: نتایج و بحث ۶۷

۳-۱- بررسی نقش ژن *HML4* در مقاومت به پاتوژن *B. cinerea* در مرحله نموی ۵ هفتگی ۶۸

۳-۲- بررسی نقش ژن *HML4* در مقاومت به پاتوژن *B. cinerea* در مرحله نموی ۸ هفتگی ۷۱

۳-۳- بررسی نقش ژن *HML4* در مقاومت به پاتوژن *B. cinerea* در شرایط زخم ۷۴

۳-۴- HML4 ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده در ارتباط بین مسیرهای مختلف انتقال پیام در آرابیدوپسیس عمل نماید ۷۹

۳-۵- نقش تنظیمی HML4 به سطح بیان آن وابسته است ۸۰

۳-۶- نقش تنظیمی مثبت و منفی HML4 ممکن است نتیجه میان‌کنش بین مسیرهای مختلف انتقال پیام باشد ۸۱

۳-۷- ارتباط *HML4* با سایر ژن‌های *HML* ۸۳

۳-۸- ژن *HML4* و پیری ۸۴

نتیجه‌گیری کلی ۸۵

پیشنهادها ۸۷

منابع ۸۸

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱ آغازگرهای مستقیم و معکوس قطعه‌ای از ژن Cutinase A مربوط به *B. cinerea* ۵۷
جدول ۲-۲ اجزای واکنش Real-time PCR برای آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها ۵۸
جدول ۲-۳ اجزای واکنش Real-time PCR برای آزمون کارایی تکثیر ۶۱
جدول ۲-۴ اجزای واکنش Real-time PCR برای کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده ۶۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱ مرگ سلول‌ها در اثر آلودگی با *B. cinerea* ۱۵
شکل ۱-۲ گیاه آرابیدوپسیس اکوتیپ Col-0 ..... ۲۱
شکل ۱-۳ سیستم‌های انتقال افکتور در پاتوژن‌های گیاهی ۲۲
شکل ۱-۴ مدل زیگزاگ برای سیستم ایمنی گیاه ۲۴
شکل ۱-۵ ساختار حفاظت شده پروتئین‌های پذیرنده PAMPs در حشرات، پستانداران و گیاهان ۲۶
شکل ۱-۶ شبکه انتقال پیام در آرابیدوپسیس ۳۰
شکل ۱-۷ مسیر بیوسنتز و تنظیم اتیلن ۳۲
شکل ۱-۸ تنظیم منفی پذیرنده‌های اتیلن بر واکنش‌های اتیلن ۳۲
شکل ۱-۹ مسیر انتقال پیام اتیلن ۳۳
شکل ۱-۱۰ بیوسنتز جاسمونات‌ها ۳۴
شکل ۱-۱۱ شمایی از نقش JAs در فرایندهای نمو و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان ۳۵
شکل ۱-۱۲ مدل کمپلکس SCF در سیگنالینگ جاسمونیک اسید ۳۶
شکل ۱-۱۳ بیوسنتز SA ۳۷
شکل ۱-۱۴ مسیر انتقال پیام SA ۳۹
شکل ۱-۱۵ واکنش شیمیایی کاتالیز شده توسط استریکتوسیدین سینتاز ۴۱
شکل ۱-۱۶ شبکه تشابه توالی در آنزیم‌های N6P ۴۲
شکل ۱-۱۷ درخت فیلوژنی در ۳۰ پروتئین SSL ۴۲
شکل ۲-۱ شرایط رشد گیاهان آرابیدوپسیس ۴۶
شکل ۲-۲ گل رز آلوده به *B. cinerea* ۴۹
شکل ۲-۳ براشت و اندازه‌گیری غلظت اسپورهای *B.cinerea* ۴۹
شکل ۲-۴ تلقیح گیاهان آرابیدوپسیس با قارچ *B. cinerea* ۵۱
شکل ۲-۵ تعیین مساحت لکه‌های نکروز توسط نرم افزار Image J ۵۳
شکل ۲-۶ عکس ژل مربوط به DNA ژنومی استخراج شده ۵۶
شکل ۲-۷ پروتوکل اجرای برنامه Real-time PCR در آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها ۵۸
شکل ۲-۸ نمودار تکثیر ژن Cutinase A در آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها ۵۹

شکل ۲-۹ نمودار منحنی ذوب و پیک ذوب در آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها..... ۵۹
شکل ۲-۱۰ عکس ژل مربوط به محصولات Real-time PCR در آزمون اختصاصی عمل نمودن آغازگرها..... ۶۰
شکل ۲-۱۱ پروتوکل اجرای برنامه Real-time PCR در آزمون کارایی تکثیر..... ۶۱
شکل ۲-۱۲ نمودار تکثیر ژن Cutinase A در آزمون کارایی تکثیر ۶۲
شکل ۲-۱۳ نمودار استاندارد در آزمون کارایی تکثیر..... ۶۲
شکل ۲-۱۴ نمودار منحنی ذوب و پیک ذوب در آزمون کارایی تکثیر..... ۶۳
شکل ۲-۱۵ عکس ژل مربوط به محصولات Real-time PCR در آزمون کارایی تکثیر..... ۶۳
شکل ۲-۱۶ پروتوکل اجرای برنامه Real-time PCR برای کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده..... ۶۴
شکل ۲-۱۷ نمودار تکثیر ژن Cutinase A مربوط به استانداردها در کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده..... ۶۵
شکل ۲-۱۸ نمودار تکثیر ژن Cutinase A مربوط به نمونه‌ها و استانداردها در کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده ۶۵
شکل ۲-۱۹ نمودار استاندارد در کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده..... ۶۵
شکل ۲-۲۰ نمودار منحنی ذوب و پیک ذوب در کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده ۶۶
شکل ۲-۲۱ عکس ژل مربوط به محصولات Real-time PCR در کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده..... ۶۶
شکل ۳-۱ رفتار جهش‌یافته‌های سرکوب شده و فرابیان شده در ژن *HML4* در مواجه با *B. cinerea* در مرحله ۵ هفتگی.. ۷۰
شکل ۳-۲ تلقیح گیاهان جهش‌یافته و طبیعی (Col-0) به روش اسپری حساسیت جهش‌یافته‌های سرکوب شده و همچنین فرابیان شده در ژن *HML4*، در مرحله ۵ هفتگی نسبت به *B. cinerea* را تایید می‌کند..... ۷۰
شکل ۳-۳ مقدار SQ در کمیت سنجی میزان DNA قارچ *B. cinerea* در برگ‌های تلقیح شده به روش قطره‌ای در گیاهان جهش‌یافته و طبیعی (Col-0) ۴۸ ساعت پس از تلقیح در مرحله ۵ هفتگی..... ۷۱
شکل ۳-۴ رفتار جهش‌یافته‌های سرکوب شده و فرابیان شده در ژن *HML4* در مواجه با *B. cinerea* در مرحله ۸ هفتگی.. ۷۳
شکل ۳-۵ نسبت نکروزهای ریز محدودشده و نکروزهای ریز پیشرونده در گیاهان جهش‌یافته و طبیعی (Col-0) ۴۸ ساعت پس از تلقیح توسط اسپورهای *B. cinerea* به روش تلقیح قطره‌ای در مرحله نموی ۸ هفتگی..... ۷۴
شکل ۳-۶ تاثیر ژن *HML4* بر مقاومت القایی ناشی از زخم در برابر *B. cinerea*..... ۷۷
شکل ۳-۷ رفتار جهش‌یافته‌های سرکوب شده و فرابیان شده در ژن *HML4* در مواجه با *B. cinerea* در شرایط زخم..... ۷۸
شکل ۳-۸ مدل پیشنهادی برای نقش تنظیمی مثبت و منفی ژن *HML4* در ایمنی گیاه آرابیدوپسیس به پاتوژن *Botrytis cinerea*..... ۸۱

چکیده فارسی

بررسی نقش ژن شبه هومیوسین-۴ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

یعقوب احمدیوسفی

برخی از واکنش‌های دفاعی در گیاهان از یاخته نخستین قبل از جدایی گیاهان و جانوران منشا دارند. ژن شبه هومیوسین-۴ (*HML4*) پروتئینی مشابه با یک پذیرنده در سیستم ایمنی ذاتی مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) (هومیوسین) را در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) کدگذاری می‌کند. *HML4* در خانواده ژنی شبه هومیوسین (*HML*) (یک زیربخش از بالا خانواده شبه استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*) در آرابیدوپسیس) قرار دارد. این خانواده دارای ۴ ژن می‌باشد (*AtSSL4-AtSSL7* یا *HML1-HML4*). بررسی‌های بیوانفورماتیکی شباهت بسیار این ژن‌ها با ناحیه SSL پروتئین هومیوسین در مگس سرکه را تصدیق می‌کنند (بیش از ۸۶٪ شباهت). بر اساس افزایش معنی‌دار بیان این ژن‌ها در پاسخ به سالیسیلیک اسید، متیل‌جاسمونیت، اتیلن، قارچ‌های پاتوژن *Alternaria brassicicola* و *Botrytis cinerea* و ویروس موزاییک خیار، این ژن‌ها احتمالاً در واکنش‌های دفاعی گیاه نقش دارند. در این بررسی‌ها ژن *HML4* پاسخ‌دهنده‌ترین ژن در میان اعضای خانواده می باشد و احتمال دارد اهمیت بیشتری در واکنش‌های دفاعی گیاه داشته باشد. علاوه بر آن *HML4* تنها ژنی از خانواده *HML* می‌باشد که به طور چشم‌گیری در شرایط زخم بیان می‌شود. برای بررسی نقش ژن *HML4* در فرایندهای ایمنی، گیاهان آرابیدوپسیس در شرایط مختلفی از قبیل: سن ۵ هفتگی، سن ۸ هفتگی (ظهور پیری) و شرایط زخم توسط اسپورهای قارچ نکروتروف *B. cinerea* به روش تلقیح قطره‌ای در شرایط زنده مایه‌کوبی شدند. با بررسی مقایسه‌ای مقاومت بین گیاهان جهش‌یافته سرکوب شده در ژن *HML4* (*hml4* و *HML-RNAi5*) و گیاهان جهش-یافته فرابیان شده در ژن *HML4* (*35S::HML4* و *HML-RNAi32*) در شرایط مختلف، الگویی از نقش ژن *HML4* در واکنش‌های دفاعی گیاه حاصل شد. بر اساس این یافته‌ها ژن *HML4* احتمالاً یک عملکرد تنظیمی مثبت و همچنین منفی در واکنش‌های دفاعی گیاه درمقابل پاتوژن *B. cinerea* دارد و سطح بیان *HML4* تعیین‌کننده نقش تنظیمی آن در شرایط متفاوت است. بیان بهینه ژن *HML4* منجربه مقاومت (تنظیم مثبت) و بیان *HML4* فراتر از حد بهینه منجربه حساسیت (تنظیم منفی) در برابر پاتوژن *B. cinerea* می‌گردد. دو عملکرد متضاد *HML4* ممکن است حاصل میان‌کنش‌هایی بین مسیرهای مختلف انتقال پیام باشد که درنهایت مقاومت به پاتوژن‌های نکروتروف همانند *B. cinerea* را تحت‌تاثیر قرار می-دهد. به‌طور خلاصه نقش تنظیمی HML4 در واکنش‌های دفاعی گیاه وابسته به مرحله نموی و دیگر شرایط مانند زخم می-باشد که با تاثیر بر سطح بیان ژن *HML4* منجربه مقاومت یا حساسیت در برابر پاتوژن نکروتروف *B. cinerea* می‌گردد.

کلیدواژه: بوترایتیس سینرآ (*Botrytis cinerea*)، تنظیم مثبت، تنظیم منفی، شبکه انتقال پیام، مقاومت

چکیده انگلیسی

Role Of HEMOMUCIN-LIKE4 Gene In *Arabidopsis thaliana* Defense Responses

Yaghoub Ahmadyousefi

There are Some Important Defense Elements were Already Established in Single Cell Ancestor Before the Separation of Plants and Animals. HEMOMUCIN-LIKE4 (HML4) is an Arabidopsis Protein with Similarity to an Innate Immune Receptor of *Drosophila melanogaster* (HEMOMUCIN). *HML4* Belongs to Hemomucin-Like (*HML*) Gene Family, a Subgroup of Strictosidine Synthase-Like (*SSL*) Superfamily in *Arabidopsis thaliana*, with Four Genes (*AtSSL4-AtSSL7* or *HML1-HML4*). Bioinformatics Analysis Revealed Similarity of *HML* Genes to the *Drosophila* HEMOMUCIN SSL Domain (More Than 86% Similarity). According to Transcriptional Analysis in Response to Salicylic Acid, Methyl Jasmonate, Ethylene, *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* and *Cucumber mosaic virus*, These Genes Presumably Have a Role in Plant Defense Responses. *HML4* is the Most Responsive of the Four Genes and May be More Important in Plant Defense Reactions. Furthermore, *HML4* is the Only Gene From *HML* Genes That is Induced Very Strongly in Wounding Condition. To Investigate Whether *HML4* Gene Has a Role in Plant Immunity, We Drop-Inoculated Arabidopsis Plants with Spores of *B. cinerea* in Different Conditions: 5 Weeks-Old Stage, 8 Weeks-Old Stage (Presence of Senescence) and Wounding Condition. Comparative Resistance of Knockout Mutants (*hml4* and *HML-RNAi5*) and Overexpressed Mutants (*35S::HML4* and *HML-RNAi32*) in Different Conditions Support a Model in Which the *HML4* Gene Has a Positive and Also Negative Regulatory Function in Plant Defense Responses Against *B. cinerea*. Expression Level of *HML4* Determines it's Regulatory Function in Different Conditions. We Showed That Optimal Expression of *HML4* Confers Resistance Against *B. cinerea* (Positive Regulatory) and When the Expression of *HML4* Arises From an Optimal Threshold, Results to Disruption of Defense Response Against *B. cinerea* (Negative Regulatory). Two Opposite Functions of *HML4* May be Result of Interactions Between Different Signaling Pathways That Influence Resistance to Necrotrophic Pathogens Such as *B. cinerea*. Regulatory Function of HML4 Depends on Developmental Stage and Other Conditions Such as Wounding That Influence Expression Level of *HML4* and Confers Resistance or Susceptibility Against Necrotrophic Pathogen *B. cinerea*.

Key Words: *Botrytis cinerea*, Negative regulator, Positive regulator, Resistance, Signal transduction

مقدمه

گیاهان در واکنش به تنش‌های زیستی و غیرزیستی طیفی از واکنش‌های دفاعی را بروز می دهند [Kazan and Schenk, 2007]. در مراحل اولیه ایجاد بیماری، یک واکنش دفاعی در محل هجوم پاتوژن فعال می شود. پس از شناسایی پاتوژن، واکنش‌های آبشاری انتقال پیام فعال می‌گردد که منجر به فعال‌سازی مولکول‌های موثر در ایمنی گیاه نسبت به پاتوژن می‌شود. برخی ترکیبات مانند سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) نقش مهمی در تنظیم واکنش‌های دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن‌ها، آفات و تنش‌های غیرزیستی مانند زخم، دارند [Loake and Grant, 2007; Balbi and Devoto, 2008]. بیان ژن‌های موثر در واکنش‌های دفاعی گیاه در تیمار با این ترکیبات افزایش می‌یابد. سالیسیلیک اسید نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌کند و به طور کلی در فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن‌های بیوتروف و همی-بیوتروف و همچنین ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمیک[1] (SAR) نقش دارد [Grant and Lamb, 2006]. جاسمونیک اسید و ET معمولاً با واکنش‌های دفاعی گیاه در مقابل پاتوژن‌های نکروتروف و حشرات گیاه‌خوار در ارتباط هستند. در مطالعات متعددی مشاهده شده است که غلظت JA در ناحیه آلوده به پاتوژن یا بافت آسیب‌دیده افزایش می‌یابد و کاربرد خارجی JA بیان ژن‌های وابسته به واکنش‌های دفاعی گیاه را تحریک می‌کند [Wasternack, 2007]. تیمار گیاهان با اتیلن یا مشتقات آن و همچنین مهارکننده‌های اتیلن، ارتباط روشن این هورمون فرار گیاهی با واکنش‌های دفاعی گیاه را اثبات کرده است [Beckman et al., 2000]. اگرچه مسیرهای دفاعی SA و JA/ET به صورت آنتاگونیستی عمل می‌کنند اما شواهدی مبنی بر میان‌کنش‌های سینرژیستی این مسیرها نیز گزارش شده است [Beckers and Spoel, 2006; Nie et al., 2012]. این امر حاکی از آن است که ارتباط بین مسیرهای انتقال پیام در گیاهان بسیار پیچیده است. در مطالعات متعددی ثابت شده است که مسیرهای دفاعی JA و ET اغلب به صورت سینرژیستی عمل می‌کنند [Glazebrook, 2005].

هرچند گیاهان از نظر مورفولوژی و فیزیولوژی با حیوانات متفاوت هستند اما برخی از مولکول‌ها و مسیرهای دفاعی آن‌ها مشابه است [Aarts et al., 1998] که نشان می‌دهد برخی از عناصر دفاعی در گیاهان از یاخته نخستین پیش از جدایی گیاهان و جانوران منشا دارند. همومیوسین یک گلیکوپروتئین خارج سلولی است که به عنوان دریافت‌کننده پیام در سیستم ایمنی ذاتی مگس سرکه نقش دارد [Theopold et al., 1996]. با توالی‌یابی ژنوم گیاه آرابیدوپسیس بررسی‌های بیوانفورماتیکی تشابه بسیار زیاد تعدادی از ژن‌های گیاه آرابیدوپسیس با ژن همومیوسین در مگس سرکه را تصدیق کردند. این ژن‌ها به‌صورت پشت‌سرهم تحت عنوان خانواده ژنی شبه همومیوسین[2] (*HML*) در کروموزوم شماره ۳ گیاه آرابیدوپسیس قرار دارند [Fabbri et al., 2000; Sohani et al., 2009]. این خانواده یک زیربخش از بالا خانواده شبه استریکتوسیدین سینتاز

[1] Systemic acquired resistance
[2] Hemomucin-like genes

(*SSL*) می‌باشد که دارای ۴ ژن است (At3g51420, At3g51430, At3g51440, At3g51450). از آنجا که این ژن‌ها شباهت بسیاری به هومومیوسین در مگس سرکه دارند احتمال دارد که در واکنش‌های دفاعی گیاه نقش داشته باشند.

سوهانی و همکاران [Sohani et al., 2009] میزان بیان ژن‌های شبه هومومیوسین را در شرایط زخم، تیمار با ترکیبات فعال‌کننده پیام دفاعی (SA، MJ و ET) و تلقیح گیاهان آرابیدوپسیس با قارچ، باکتری و ویروس، اندازه‌گیری کردند. سه ژن از این خانواده (*HML2-HML4*) در گیاهان سالم بیان اندکی دارند اما در تیمار گیاهان با موارد ذکر شده بیان آن‌ها افزایش معنی‌داری می‌یابد که نشان می‌دهد احتمالاً این ژن‌ها در مکانیسم‌های دفاعی تحریک‌شدنی[۳] در گیاهان نقش دارند. حال‌آنکه بیان ژن *HML1* در سطح بالا و پایه‌ای خود باقی می‌ماند که نشان‌دهنده نقش احتمالی این ژن در واکنش‌های دفاعی پایه‌ای[۴] و یا فرایندهای پایه‌ای در رشد و نمو گیاهان است. از آن‌جا که میزان بیان ژن شبه هومومیوسین-۴ (*HML4*) در هر سه نوع تیمار فوق شدیدتر از دیگر اعضای خانواده افزایش می‌یابد بنابراین، به‌نظر می‌رسد این ژن در فرایند واکنش‌های دفاعی گیاه اهمیت بیش‌تری دارد. علاوه بر آن ژن *HML4* تنها ژنی از خانواده *HML* می‌باشد که به طور چشم‌گیری در شرایط زخم[۵] در موضع زخم‌زنی شده بیان می‌شود [Sohani et al., 2009].

اگرچه بررسی‌های بیوانفورماتیکی [Fabbri et al., 2000; Sohani et al., 2009] و بیان ژنی [Sohani et al., 2009] ژن‌های *HML* نشان‌دهنده نقش احتمالی این ژن‌ها در واکنش‌های دفاعی گیاه است اما برای اثبات این فرضیه نیاز به بررسی هم‌زمان رفتار جهش‌یافته‌های سرکوب شده[۶] و فرابیان شده[۷] در این ژن‌ها در مواجه با پاتوژن‌ها می‌باشد. در این پژوهش نقش ژن شبه هومومیوسین-۴ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس از طریق بررسی مقایسه‌ای مقاومت گیاهان جهش‌یافته سرکوب شده در ژن *HML4* (*hml4* و *HML-RNAi5*) و گیاهان جهش‌یافته فرابیان شده در ژن *HML4* (*35S::HML4* و *HML-RNAi32*) به پاتوژن نکروتروف *Botrytis cinerea* در شرایط مختلف بررسی شد.

از جمله سوال‌هایی که این پژوهش تلاش دارد با همه پیچیدگی و مجهول بودن واکنش‌های دفاعی گیاه به آنها پاسخ دهد: در میان مسیرهای مختلف انتقال پیام که ارتباط آنها با هم شبکه گسترده و پیچیده ای را ایجاد کرده است آیا از کار انداختن ژن *HML4* باعث اخلال در واکنش‌های دفاعی گیاه می‌شود؟ آیا افزایش میزان بیان ژن *HML4* باعث بهبود واکنش‌های دفاعی گیاه خواهد شد؟ آیا بین ژن *HML4* و دیگر اعضای خانواده ارتباط خاصی وجود دارد؟ محل فعالیت ژن *HML4* در کجای مسیرهای انتقال پیام گیاه قرار دارد؟ شناخت بهتر ماهیت واکنش‌های دفاعی گیاه ما را قادر می‌سازد که با الهام از طبیعت پروردگار گامی به سوی برآوردن نیازهای جمعیت رو به فزون بشری برداریم.

---

[3] Inducible defense reactions
[4] Basal defense reactions
[5] Wounding condition
[6] Knokout mutants
[7] Overexpressed mutants

کلیات و مرور منابع

۱-۱- گیاهان ارتباط خود با سایر موجودات را به‌شدت تنظیم کرده‌اند

گیاهان در شرایط رشد طبیعی خود در طبیعت با فشارهای تکاملی بسیاری مواجه هستند. شرایط اقلیم منطقه، تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعدد فشارهایی را بر گیاهان و سایر موجودات اعمال می‌کنند. تنها موجوداتی می‌توانند بقا داشته باشند که در برابر این فشارها واکنش‌هایی را در خود ایجاد کرده باشند که به ابقا موجود کمک می‌کند. تنش‌های زیستی از جمله این فشارها هستند که روند تکامل موجودات و از قبیل گیاهان را تحت تاثیر قرار داده‌اند. از میلیون‌ها سال پیش در محیط پیرامون گیاهان موجودات مختلف تک‌سلولی و پرسلولی و حتی ساختارهای غیرسلولی (ویروس‌ها، ویروئیدها و غیره) وجود داشته‌اند. بنابراین گیاهان مجبور بوده‌اند واکنش‌هایی برای تنظیم ارتباط خود با این موجودات ایجاد کنند. نتیجه این تکامل وجود واکنش‌های پیچیده و بسیار دقیق برای تنظیم ارتباط گیاه با دیگر موجودات است. برای مثال میان‌کنش رایزوبیوم-لگوم یک هم‌زیستی اختصاصی بین گیاه (لگوم) و باکتری‌های مفید (رایزوبیوم) می‌باشد [Stougaard, 2000]. در این هم‌زیستی گیاه شرایطی را برای تکثیر و کلونیزه شدن باکتری‌های رایزوبیوم در اندامی به نام نودول[8] در ریشه‌ها فراهم می‌کند و طبیعتاً این واکنش هم‌زیستی باید در کنترل واکنش‌های گیاه باشد. به نظر می‌رسد گیاهان توسط اتیلن [Kevin et al., 2002] و سالیسیلیک اسید [Mabood and Smith, 2007] استقرار یا عدم‌استقرار نودول‌ها را تنظیم می‌کنند.

۱-۱-۱- پاسخ به باکتری‌های بیماری‌زا: نمونه ای از تنظیم ارتباط گیاهان با سایر موجودات

گیاهان قادر به حرکت نمی‌باشند بنابراین می‌بایست فرایندهای دقیقی برای محافظت از خود در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و علف‌خوارها ایجاد کنند. در گام نخست حضور تنش از طریق پذیرنده‌هایی ادراک می‌شود. برای مثال پروتئین FLS2[9] در گیاه آرابیدوپسیس یک پذیرنده در غشای سلولی برای ادراک حضور باکتری‌های پاتوژن است. FLS2 یک RLK[10] با ۲۸ ناحیه LRRs[11] می‌باشد که در خلال پالایش کردن جهش‌یافته‌های غیرحساس به تیمار فلاژلین شناسایی شد. FLS2

[8] Nodule
[9] Flagellin sensing 2
[10] Receptor-like kinase
[11] Leucine rich repeat

نمونه‌ای از حفاظت پاسخ ایمنی ذاتی در میان گیاهان، جانوران و حشرات به شمار می‌رود [Gomez-Gomez and Boller, 2002]. فلاژلین یک زیرواحد ساختاری از تاژک باکتری‌های حقیقی است که به عنوان یک الیسیتور[۱۲] طیفی از واکنش‌های دفاعی را در گیاهان تحریک می‌کند. پپتیدهای سنتتیک فلاژلین با طول ۱۵ یا ۲۲ آمینو اسید (flg15 و flg22) الیسیتورهایی هستند که واکنش‌هایی از قبیل تجمع کالوز[۱۳] و بیان ژن‌های وابسته به پاتوژن[۱۴] (PR) را در گیاه آرابیدوپسیس تحریک می‌کنند [Gomez-Gomez et al., 1999]. پروتئین کیناز FLS2 با تشخیص flg22 پیام را از طریق آبشاره‌ی پروتئین‌های مپ-کیناز[۱۵] منتقل می‌کند: AtMEKK1 (به عنوان MAPKKK)، AtMKK4a/AtMKK5a (به عنوان MAPKKs) و MPK3/MPK6 (به عنوان MAPKs). درنهایت MAPKs با فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی هدف خود (همانند WRKY29 و FRK1) بیان ژن‌های دفاعی را تنظیم می‌کنند [Asai et al., 2002].

۱-۱-۲- هم‌زیستی رایزوبیوم-لگوم به عنوان نمونه‌ای از ارتباط گیاهان با باکتری‌های مفید

۱-۱-۲-۱- تبادل سیگنال‌ها بین گیاه و باکتری در ارتباط اولیه بین دو هم‌زیست

در هم‌زیستی رایزوبیوم-لگوم نیز حضور باکتری‌های مفید رایزوبیوم از طریق گیرنده هایی در غشای پلاسمایی ادراک می‌شود که سیگنال‌هایی از رایزوبیوم‌ها را تحت عنوان فاکتورهای نود[۱۶] (از لحاظ ساختاری تحت عنوان لیپو-کیتین-الیگوساکاریدها) ادراک می‌کنند [Schultze and Kondorosi, 1998]. فاکتورهای نود نیز با ترکیبات خاصی که از ریشه گیاهان لگوم در منطقه رایزوسفر ترشح می‌شود (به‌طور معمول فلاونوئیدها)، تحریک می‌شوند. سیگنال‌های گیاه (فلاونوئیدها) توسط پروتئین-های Nod D که به غشای سلولی رایزوبیوم‌ها متصل است، شناسایی می‌شوند و به محض فعال شدن پروتئین‌های Nod به توالی Nod Box که در بالادست ژن‌های Nod قرار دارد متصل می‌شوند و رونویسی این ژن‌ها را تحریک می‌کنند که در نهایت منجر به بیوسنتز فاکتورهای نود می‌شود [Loh and Stacey, 2003]. به محض تبادل موفقیت‌آمیز مولکول‌های سیگنال بین دو هم‌زیست، باکتری‌ها در ریشه‌های مویین استقرار می‌یابند و باعث پیچیدگی و تشکیل برجستگی‌های خاص می‌شوند (مراحل اولیه تشکیل یک غده تثبیت‌کننده ازت) [Broughton et al., 2003]. توانایی گیاه در تشخیص باکتری‌های هم‌زیست از باکتری‌های بیماری‌زا به ارتباط مولکول‌های سیگنال بین دو هم‌زیست (لگوم و رایزوبیوم) وابسته است. این تبادل اولیه سیگنال‌ها بسیار اهمیت دارد به‌طوری که در این مرحله، گیاه پاتوژن و هم‌زیست را از یکدیگر تمییز داده و به یکی (هم‌زیست) اجازه نفوذ به ریشه‌های مویین و ایجاد یک هم‌زیستی تثبیت ازت را می‌دهد اما در مورد دیگری (پاتوژن) تحریک آرایه‌ای از

---

[12] Elicitor
[13] Callose accumulation
[14] Pathogen related genes
[15] MAP kinase
[16] Nod factors