دانشکده علوم کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بررسی نقش ژن شبه هومومیوسین ۳ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

از:

سعیده علیدوست

استاد راهنما:

دکتر محمدمهدی سوهانی

استاد مشاور:

دکتر سید اکبر خداپرست

اسفند ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی در کشاورزی

(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

بررسی نقش ژن شبه هومومیوسین ۳ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)

از:

سعیده علیدوست

استاد راهنما:

دکتر محمدمهدی سوهانی

استاد مشاور:

دکتر سید اکبر خداپرست

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

وجود پر مهر پدر و مادرم

سپاسگزاری

حمد و سپاس پروردگار را که نعمت هستی و هدایت و فرصتی برای زیستن و اندیشیدن عنایت فرمود، از گنجینهٔ علم لایزالش بخشید و حضور و عنایتش را رهگشای امور ساخت.

سپاس از پدر و مادرم که در تمام مراحل زندگی قدم به قدم همراهم بوده اند و همهٔ هستیم را مدیون وجود این دو عزیز هستم. پس از آن سپاسگزار اساتیدی هستم که در سال‌های تحصیلم و به ویژه برای به انجام رساندن تحقیق حاضر از حضورشان علم آموختم. از استاد راهنمای محترم جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی و استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر سید اکبر خداپرست به پاس کمک‌ها، راهنمایی‌ها، و صبوریشان در به انجام رساندن پایان نامه سپاسگزارم.

از اساتید محترم داور جناب آقای دکتر شیرزادیان و جناب آقای دکتر اعلمی که زحمت بازخوانی و داوری پایان‌نامه را بر عهده داشتند، از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر محیطی و مدیر محترم گروه بیوتکنولوژی جناب آقای دکتر سید حسن حسنی کومله سپاسگزارم. از راهنمایی‌های آقای مهندس یعقوب احمدیوسفی و آقای دکتر هاشم پور در پیشبرد پایان نامه سپاسگزارم. همین طور از کلیه پرسنل محترم دانشکده کشاورزی، به ویژه جناب آقای مهندس حسین رضادوست، بابت زحماتشان سپاسگزارم.

از هم کلاسی‌ها و دوستان خوبم در مجموعه کشاورزی خانم‌ها و آقایان مهندس زهرا کچلکی، سمیه بهادر، فهیمه آروندی، لیلا رومانی، فرناز نوروزی، سارا فتاحیان، عقیق معتمد، حمیرا عشقی، پیمان نبری، فرهاد معصومی، محسن صفایی، نوید احمدی نسب، معصومه کنفی، نجمه فاضلی، خانم دکتر سعیده ارحامه فلاح شمسی، آقای دکتر امین عابدی و دوستان ورودی ۸۹ و ۹۱ بیوتکنولوژی کشاورزی سپاسگزارم و برای همه آرزوی موفقیت دارم.

فهرست مطالب

چکیده فارسی..... د
چکیده انگلیسی..... ذ
مقدمه..... ۱
فصل اول: کلیات و مرور منابع..... ۴
۱-۱- تقابل گیاهان و پاتوژن‌ها..... ۵
۱-۲- ژنتیک معکوس روشی برای مطالعه عملکرد ژن‌های دفاعی..... ۵
۱-۲-۱- معرفی گیاه آرابیدوپسیس..... ۵
۱-۳- دسته بندی پاتوژن‌های گیاهی بر اساس سبک زندگی..... ۶
۱-۳-۱- معرفی پاتوژن قارچی *Alternaria brassicicola*..... ۶
۱-۳-۲- پاتوسیستم قارچ-گیاه، آلترناریا-آرابیدوپسیس..... ۸
۱-۴- عوامل موثر بر بیماری زایی یک پاتوژن..... ۹
۱-۵- مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌ها..... ۱۰
۱-۵-۱- مکانیسم‌های قبل از حمله پاتوژن..... ۱۱
۱-۵-۲- مکانیسم‌های پس از حمله پاتوژن..... ۱۲
۱-۵-۳- ایمنی PTI و ETI..... ۱۶
۱-۵-۳-۱- مقاومت سیستمیک اکتسابی..... ۱۸
۱-۶- سیگنالینگ دفاع در برابر نکروتروف‌ها..... ۱۹
۱-۶-۱- الیسیتورهای غیراختصاصی پاسخ‌های دفاعی..... ۱۹
۱-۶-۲- الیسیتورهای اختصاصی پاسخ‌های دفاعی..... ۱۹
۱-۶-۳-نقش هورمون‌ها در دفاع علیه پاتوژن‌ها..... ۲۰
۱-۶-۳-۱- سیگنالینگ سالیسیلیک اسید در برابر *Alternaria brassicicola*..... ۲۱
۱-۶-۳-۲- سیگنالینگ جاسمونیک اسید در برابر *Alternaria brassicicola*..... ۲۲
۱-۶-۳-۳- سیگنالینگ اتیلن در برابر *Alternaria brassicicola*..... ۲۲
۱-۶-۳-۴- سیگنالینگ تولید کامالکسین در برابر *Alternaria brassicicola*..... ۲۴
۱-۷- آنزیم استریکتوسیدین‌سینتاز (SS)..... ۲۶
۱-۷-۱- خانواده‌ی ژنی شبه هومیوسین (*HML*) یا شبه استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*)..... ۲۷
۱-۷-۲-نقش احتمالی خانواده‌ی ژنی شبه هومیوسین (*HML*) در واکنش های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس..... ۲۸
۱-۷-۳- پاسخگویی ژن‌های *HML1-4* به تیمارهای زیستی و غیرزیستی..... ۲۹
۱-۷-۴- واکنش جهش‌یافته *hml-4*، در برابر پاتوژن قارچی نکروتروف *Botrytis cinerea*..... ۳۰
فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۳۱
۲-۱- کشت گیاه آرابیدوپسیس..... ۳۲
۲-۱-۱- ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش..... ۳۲
۲-۱-۲- تست ترکیب خاکی مناسب برای کشت آرابیدوپسیس..... ۳۲
۲-۱-۳- روش کشت گیاه آرابیدوپسیس..... ۳۳

۲-۲- اندازه‌گیری مقدار بیوماس قارچ *Alternaria brassicicola* در ژنوتیپ‌های آرابیدوپسیس ۳۵
۲-۲-۱- تهیه محیط کشت PSA (Potato sucrose agar) ۳۵
۲-۲-۲- کشت قارچ ۳۵
۲-۲-۳- مایه‌زنی قارچ ۳۵
۲-۲-۴- تست شمارش اسپور ۳۸
۲-۲-۵- تست Real-time PCR ۳۸
۲-۲-۵-۱- نمونه‌گیری ۳۸
۲-۲-۵-۲- استخراج DNAی قارچ *A. brassicicola* و گیاه *Arabidopsis thaliana* ۳۹
۲-۲-۵-۳- بررسی کارایی تکثیر آغازگرها ۳۹
۲-۲-۵-۴- خالص‌سازی محصول Real-time PCR ۴۱
۲-۲-۵-۵- تهیه‌ی سری‌های رقت ۴۱
۲-۲-۵-۶- واکنش Real-time PCR ۴۲
۲-۳- آنالیز علائم فیزیولوژیک حساسیت پس از مایه‌زنی قارچ *A. brassicicola* ۴۶
۲-۳-۱- روش کار با نرم‌افزار Image J ۴۶
۲-۳-۲- اندازه‌گیری کلروفیل ۴۸
۲-۳-۳- اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز ۴۹
۲-۳-۳-۱- تهیه بافر استخراج ۴۹
۲-۳-۳-۲- استخراج آنزیم‌ها ۴۹
۲-۳-۳-۳- تهیه بافرهای سنجش ۴۹
۲-۳-۳-۴- تعیین فعالیت آنزیم ۵۰
۲-۴- آنالیز داده‌ها ۵۰
فصل سوم: نتایج و بحث ۵۱
۳-۱- بررسی نقش ژن *HML-3* در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس ۵۲
۳-۱-۱- خاموشی ژن *HML-3* سبب افزایش رشد قارچ *A. brassicicola* در برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس می‌شود ۵۲
۳-۱-۲- خاموشی ژن *HML-3* مانع از کاهش کلروفیل، افزایش لکه نکروز و افزایش پراکسیداز می‌شود ۵۶
نتیجه‌گیری کلی ۶۴
پیشنهادها ۶۶
منابع ۶۸

فهرست جداول

جدول ۲-۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای کمیت سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده..... ۴۲
جدول ۲-۲- اجزای واکنش Real-time PCR..... ۴۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- علائم لکه سیاه قارچ *A. brassicicola* بر روی گیاه خردل سفید..... ۷
شکل ۱-۲- تصویری از کندی قارچ نکروتروف *A. brassicicola* و تجمع کالوس و تشکیل زایده سلولی پس از مایه‌زنی قارچ..... ۸
شکل ۱-۳- نمونه‌ای از پاتوسیستم قارچ-گیاه *Arabidopsis thaliana* و *Alternaria brassicicola*..... ۹
شکل ۱-۴- مکانیسم‌های دفاع القایی..... ۱۵
شکل ۱-۵- مقاومت PTI و ETI در سلول‌های گیاهی..... ۱۷
شکل ۱-۶- مدل زیگزاک تکامل ایمنی ذاتی..... ۱۸
شکل ۱-۷- نقش هورمون‌های مختلف در تنظیم مثبت و منفی مقاومت گیاه به پاتوژن‌های مختلف بیوتروف و نکروتروف..... ۲۳
شکل ۱-۸- فرمول ساختاری کامالکسین..... ۲۴
شکل ۱-۹- سیگنالینگ دفاع در برابر *Alternaria brassicicola*..... ۲۵
شکل ۱-۱۰- واکنش شیمیایی کاتالیز شده توسط استریکتوسیدین سینتاز..... ۲۶
شکل ۲-۱- مقایسه چهار ترکیب خاکی برای کشت آرابیدوپسیس..... ۳۳
شکل ۲-۲- کشت در خاک اولیه؛ پیت ماس و ورمی‌کمپوست (۱:۱)..... ۳۴
شکل ۲-۳- زمان انتقال گیاهچه‌ها به خاک اصلی..... ۳۴
شکل ۲-۴- کشت در خاک اصلی؛ پیت ماس، ورمی‌کمپوست، ورمیکولیت و پرلایت (۲:۲:۱:۱)..... ۳۵
شکل ۲-۵- گیاهچه‌های آرابیدوپسیس، در مرحله ۵ هفتگی..... ۳۶
شکل ۲-۶- برداشت و اندازه‌گیری غلظت اسپورها..... ۳۷
شکل ۲-۷- تأمین رطوبت صد درصد پس از مایه‌زنی گیاهان آرابیدوپسیس با قارچ *A. brassicicola*..... ۳۷
شکل ۲-۸- دیسک برگی به قطر ۶ میلی متر از برگ‌های *A. thaliana*..... ۳۸
شکل ۲-۹- عکس ژل DNAی ژنومی استخراج شده..... ۳۹
شکل ۲-۱۰- منحنی تکثیر مربوط به بررسی کارایی تکثیر آغازگرها، شامل نمونه‌های DNA قارچ و آغازگر قارچ و DNA گیاه و آغازگر قارچ..... ۴۰
شکل ۲-۱۱- عکس ژل محصولات Real-time PCR..... ۴۰
شکل ۲-۱۲- نمودار تکثیر ژن *Alternaria* sp. 5.8S rRNA مربوط به استانداردها در کمیت سنجی DNAی قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری سه روز پس از مایه‌زنی انجام شد..... ۴۱
شکل ۲-۱۳- نمودار تکثیر ژن *Alternaria* sp. 5.8S rRNA مربوط به استانداردها در کمیت سنجی DNA قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس ؛ نمونه‌گیری هفت روز پس از مایه‌زنی انجام شد..... ۴۲
شکل ۲-۱۴- پروتکل اجرای برنامه Real-time PCR..... ۴۳
شکل ۲-۱۵- نمودار تکثیر ژن *Alternaria* sp. 5.8S rRNA مربوط به نمونه‌ها و استانداردها در کمیت سنجیDNAی قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری سه روز پس از مایه‌زنی انجام شد..... ۴۳
شکل ۲-۱۶- نمودار استاندارد در کمیت‌سنجی DNA قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری سه روز پس از مایه‌زنی انجام شد..... ۴۴
شکل ۲-۱۷- پیک ذوب (Melt peak) در کمیت‌سنجی DNA قارچ در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری سه روز پس از مایه‌زنی انجام شد..... ۴۴

شکل ۲-۱۸- نمودار تکثیر ژن *Alternaria* sp 5.8S rRNA مربوط به نمونه‌ها و استانداردها در کمیت‌سنجی DNA قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری هفت روز پس از مایه‌زنی انجام شد.....۴۵
شکل۲-۱۹- نمودار استاندارد در کمیت‌سنجی DNAی قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری هفت روز پس از مایه‌زنی انجام شد.....۴۵
شکل۲-۲۰- نمودار پیک ذوب (Melt peak) در کمیت‌سنجی DNA قارچ آلترناریا در برگ‌های آلوده گیاه آرابیدوپسیس؛ نمونه‌گیری هفت روز پس از مایه‌زنی انجام شد.....۴۶
شکل ۲-۲۱-تعیین قطر لکه‌های نکروز توسط نرم افزار Image J.....۴۸
شکل۳-۱- لکه‌های نکروز روز هفتم پس از مایه‌زنی قارچ *A. brassicicola* بدون ایجاد زخم در برگ های آرابیدوپسیس.....۵۸
شکل۳-۲- علائم نکروز بر روی برگ‌های گیاه جهش‌یافته *hml-3* پس از مایه‌زنی گیاه آرابیدوپسیس با قارچ *A. brassicicola*..... ۵۹
شکل۳-۳- لکه‌های نکروز، روز سوم پس از مایه‌زنی قارچ *A. brassicicola* با ایجاد زخم در برگ‌های آرابیدوپسیس.....۵۹
شکل ۳-۴- لکه‌های نکروز در برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس هفت روز پس از مایه‌زنی قارچ *A. brassicicola* با ایجاد زخم.....۶۱

چکیده فارسی

بررسی نقش ژن شبه هومیوسین ۳ در واکنش‌های دفاعی گیاه آرابیدوپسیس

سعیده علیدوست

آنزیم گیاهی استریکتوسیدین سینتاز (SS)، یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز آلکالوئید گیاهی است. همولوگ دمین پروتئینی استریکتوسیدین سینتاز در ارگانیسم‌های مختلفی یافت شده است. یک گروه چهارتایی از ژن‌های شبه استریکتوسیدین‌سینتاز در آرابیدوپسیس یافت شده‌اند که به‌سبب شباهت به هومیوسین، یک میوسین سطح سلولی دروزوفیلا با نام شبه هومیوسین (*HML*) نیز نامیده می‌شوند. مطالعات بیانی نشان داده است ژن‌های *Hml1-HML4* به تیمارهای الیسیتور و پاتوژن‌های قارچی و ویروسی پاسخ می‌دهند. الگوهای تظاهر ژن *HML-3* نقش احتمالی آن در عملکردهای مرتبط با مسیر سالیسیلیک اسید و واکنش در برابر ویروس و قارچ *Alternaria brassicicola* را آشکار نموده است. در این آزمایش نقش ژن (*Hml-3*) در سیستم دفاعی گیاه آرابیدوپسیس در برابر پاتوژن ناسازگار قارچی *A. brassicicola* با روش Real-time PCR بیشتر مورد مطالعه قرار گرفت. بیوماس قارچ *A. brassicicola*، سه روز پس از مایه‌زنی گیاهان، در جهش‌یافته ناک‌اوت ژن *HML-3* در مقایسه با ژنوتیپ وحشی گیاه آرابیدوبسیس (Col-0) به طور معنی‌داری بیشتر بوده است. این امر نشان دهنده حساسیت بیشتر این ژنوتیپ و نقش احتمالی این ژن در مقاومت به پاتوژن مذکور در گیاه آرابیدوپسیس است. علاوه بر این ژن *HML-3* یک ژن پاسخگو به پیری، شوری و UV-B است. مایه‌زنی قارچ *A. brassicioala* با ایجاد زخم سبب راه‌اندازی مسیر مرگ سلولی در Col-0 می‌شود. در حالیکه این پاسخ در جهش‌یافته *hml-3* کمتر مشاهده شد.

کلیدواژه ها: استریکتوسیدین‌سینتاز، آرابیدوپسیس، هومیوسین، *Alternaria brassicicola*، پیری

چکیده انگلیسی

Role of *HEMOMUCIN-LIKE3* gene in *Arabidopsis thaliana* defense responses

Saeedeh Alidoust

The plant enzyme Strictosidine synthase (SS) is a key enzyme in plant alkaloid biosynthesis. The homologous of the Strictosidine synthase protein domain have been found in different organisms. A group of four Strictosidine synthase-like genes has been found in *Arabidopsis*, also known as hemomucin-like (*HML*) genes, due to their similarities to the hemomucin. Hemomucin is a *Drosophila* surface mucin. Gene expression studies have shown that *Hml1-HML4* genes response to elicitors, fungal and viral pathogen treatments. A member of the gene family, *HML-3*, gene expression profiles have revealed the possible roles of the gene in SA- pathway related functions and virus and *Alternaria brassicicola* interactions. *A. brassicicola* has incompatible interaction with *Arabidopsis* plants. In this experiment the role of *Hml-3* gene in defense system of *Arabidopsis* plants challenged with *A. brassicicola* has been further revealed using Real-time PCR. The fungal biomass in *HML-3* knockout line (*hml-3*) has been significantly more than wild type plant Col-0 3 day post inoculation. This indicates the greater sensitivity of the genotype and the possible role of the gene in *Arabidopsis* resistance to the pathogen *A. brassicicola*. In addition *hml-3* is a gene responsible for senescence and UV-B and salt stress. Wounding can intensify pathogen stress and set up senescence and cell death pathways in Col-0. *Arabidopsis* incoculation with *A. brassicicola* can trigger cell death in Col-0. While it was observed that the response is reduced in *hml-3* mutant.

Key words: strictosidine synthase, hemomucin, *Alternaria brassicicola*, senescence

مقدمه

با وجود تفاوت مورفولوژی و فیزیولوژی در گیاهان و حیوانات، برخی از مولکول‌ها و مسیرهای دفاعی آنها مشابه است [Aarts et al., 1998]. این امر نشان می‌دهد که برخی از عناصر دفاعی در گیاهان از یاخته نخستین پیش از جدایی گیاهان و جانوران منشأ دارند. فابری و همکاران [Fabbri et al., 2000] شواهدی برای وجود یک خانواده ژنی جدید با شباهت به آنزیم گیاهی استریکتوسیدین سینتاز (SS)، یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز آلکالوئید گیاهی ارائه دادند [Fehlbaum et al., 1994]. به نظر می‌رسد که دو عضو از این خانواده در مگس سرکه و احتمالاً در سایر حشرات وجود دارد: یکی بر روی سطح سلول و دیگری در همولنف. در آرابیدوپسیس، ژن‌های شبه-استریکتوسیدین سینتاز (*SSL*) یک خانواده‌ی چندژنی را تشکیل می‌دهد که احتمالاً به عنوان ترکیبات ضدتغذیه‌ای و ضدباکتریایی عمل می‌کنند [Fabbri et al., 2000]. حشرات و گیاهان می‌توانند در دفاع ذاتیشان بر مولکول‌های مشابهی تکیه کنند [Fehlbaum et al., 1994]. اعضاء *SSL* آرابیدوپسیس در گروه‌های مختلف قرار می‌گیرند. یک گروه از آنها بیشتر شبیه به همومیوسین دروزوفیلا است تا سایر ژن‌های گیاهی [Kutchan, 1995] و به‌همین دلیل به نام شبه همومیوسین (*HML1-HML4*) نامگذاری شدند. همومیوسین، یک میوسین سطح سلولی مگس سرکه است که احتمالاً در القاء مولکول‌های افکتور ضدباکتریایی پس از اتصال به یک لکتین حلزون A *Helix pomatia* (hemagglutinin) دخیل است [Theopold, 1996].

لاین‌های RNAi مربوط به این خانواده‌ی ژنی کاهش مصرف سکولوگانین یک پیش‌ساز استریکتوسیدین در سایر گونه‌ها را نشان می‌دهد و نقشی را برای این کلاس پروتئینی در متابولیسم سکولوگانین پیشنهاد می‌کند. احتمالاً پروتئین‌های SSL آرابیدوپسیس فاقد فعالیت استریکتوسیدین سینتازی هستند. ژن‌های این خانواده‌ی ژنی در سه تیمار سالیسیلیک‌اسید، اشعه‌ی UV و شوری تظاهر یافتند [Kibble et al., 2009]. سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن هرکدام در تنظیم مقاومت پایه‌ای در برابر پاتوژن‌های مختلف نقش دارند. این سه سیگنال نقش‌های مهمی را در مقاومت القایی هم ایفا می‌کنند [Ton et al., 2002]. همچنین مطالعات بیانی نشان داده است که این ژن‌ها به تیمار پاتوژن‌های قارچی و ویروسی پاسخ می‌دهند. الگوهای تظاهر ژن *HML-3* نقش احتمالی آن را در عملکردهای مرتبط با مسیر سالیسیلیک اسید و واکنش در برابر ویروس CMV و قارچ *Alternaria brassicicola* آشکار نموده است [Sohani et al, 2009].

همولوژی توالی می‌تواند در پیش‌بینی عملکرد کلی ژن مفید باشد، اما به تنهایی نمی‌تواند عملکرد دقیق یک ژن را تعیین کند [Sessions et al., 2002]. بر این اساس نیاز به بررسی بیشتر در جهش‌یافته ژن مورد نظر و یا در الگوی تظاهر ژن است. در این آزمایش نقش ژن *HML-3* در سیستم دفاعی گیاه آرابیدوپسیس در برابر پاتوژن ناسازگار قارچی *A. brassicicola*

بیشتر مورد مطالعه قرار گرفت. ژنوتیپ وحشی گیاه آرابیدوپسیس (Col-0) به عنوان یک ژنوتیپ مقاوم و شاهد [Thomma et al., 1999; van Wees et al., 2003] و جهش‌یافته ناک‌اوت ژن *HML-3* (*hml-3*) تحت چالش قارچ *A. brassicicola* قرار گرفتند و حساسیت آنها نسبت به این قارچ بررسی و مقایسه شد. هدف ابتدایی این آزمایش بررسی نقش ژن *hml-3* در برابر پاتوژن قارچی *A. brassicicola* بوده است. با توجه به بررسی‌های فیزیولوژیکی انجام شده جنبه‌های دیگری از عملکرد این ژن نیز آشکار شده است.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۲-۱- تقابل گیاهان و پاتوژن‌ها

گیاهان در معرض حمله‌ی طیف وسیعی از پاتوژن‌های میکروبی و حشرات گیاه‌خوار قرار دارند، اما به سبب ثابت بودن، قادر به فرار از شرایط محیطی نمی‌باشند. آنها در پاسخ، مکانیسم‌های دفاعی متعددی را نشان می‌دهند. فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی می‌تواند اثرات زیان‌آور برای رشد گیاه داشته باشد. بنابراین تنظیم مناسب واکنش‌های دفاعی برای سلامت گیاهان مهم است [Glazebrook, 2005]. گیاهان طی تکامل مکانیسم‌های دقیق و ماهرانه‌ای را برای مقابله با این استرس‌ها و سازماندهی دفاع و یا تحمل، ایجاد نموده‌اند. این مکانیسم‌ها شامل برنامه‌ریزی مجدد و پیچیده در سلول‌های گیاهی است. این امر بر تغییرات عمده‌ی تظاهر ژن، تولید پروتئین و دامنه‌ای از ترکیبات مختلف دفاعی و همچنین سیگنالینگ تکیه دارد. مسیرهای سیگنالینگ موافق با یکدیگر و یا در تضاد با هم برهم‌کنش دارند و امکان تنظیم دقیق پاسخ به عوامل استرس‌زایی که گیاه با آن مواجه می‌شود را فراهم می‌سازد [Jones and Dangl, 2006; Koornneef and Pieterse, 2008].

۱-۲- ژنتیک معکوس روشی برای مطالعه عملکرد ژن‌های دفاعی

رمزگشایی توالی ژنوم *Arabidopsis thaliana*، فرصت تعیین عملکرد تقریباً ۲۷۰۰۰ ژن کدکننده پروتئین را فراهم نمود [The *Arabidopsis* genome iniative, 2000]. هدف نهایی از تحقیقات ژنوم در گیاه مدل و گل‌دار *Arabidopsis thaliana* شناسایی همه ژن‌ها و درک عملکرد آنها است. به منظور تعیین عملکرد ژن‌های تعیین توالی شده می‌توان منابع گسترده‌ای از جهش‌یافته‌های ناک‌اوت[1] ژن را در معرض انواع مختلفی از آزمایش‌های ژنتیک معکوس قرار داد [Parinov and Sundaresan, 2000]. ژنتیک معکوس یک روش مناسب برای تعیین ارتباط ژن‌ها با فنوتیپ است [Ajjawi et al., 2000].

۱-۲-۱- معرفی گیاه آرابیدوپسیس

Arabidopsis thaliana به خانواده‌ی براسیکاسه[2] تعلق دارد و دارای چندین صفت مهم است که آن را به یک ارگانیسم مدل مهم تبدیل نموده است [Katam et al. 2011]. این گیاه گل‌دهنده، یک سیستم مدل مهم برای شناسایی ژن‌ها و تعیین عملکرد آنهاست. ژنوم آرابیدوپسیس حاوی ۲۵۴۹۸ ژن کدکننده‌ی پروتئین از ۱۱۰۰۰ خانواده با تنوع عملکردی مشابه

1. Knockout

2. Brassicaceae

Drosophila و *Caenorhabditis elegans* دیگر یوکاریوت‌های چندسلولی توالی‌یابی شده است [The *Arabidopsis* genome iniative, 2000]. ژنوم هسته‌ای *A. thaliana* به عنوان یک گیاه گل‌دار کوچک است و به طور قابل توجهی DNAی تکراری و پراکنده‌ی کمی دارد. این صفات انواع مختلف آزمایشات را در زمینه ژنتیک مولکولی تسهیل و امکان کلونینگ آسان بسیاری از ژن‌های *Arabidopsis* را فراهم می‌کند. دانسته‌های زیست‌شناختی ما در زمینه‌ی *A. thaliana* در حال گسترش سریع است و برای درک بهتر سیستم‌های زیستی در گیاهان زراعی و سایر گیاهان دارای اهمیت اساسی است [Meyerowitz and Somerville, 1994].

۱-۳- دسته‌بندی پاتوژن‌های گیاهی بر اساس سبک زندگی

پاتوژن‌های گیاهی بر اساس سبک زندگی‌شان اغلب به دو گروه بیوتروف و نکروتروف تقسیم می‌شوند. بیوتروف‌ها از بافت زنده میزبان تغذیه می‌کنند، در حالی که نکروتروف‌ها بافت میزبان را می‌کشند و از بقایا تغذیه می‌کنند. برخی از پاتوژن‌ها بسته به شرایط یا مراحل سیکل زندگی‌شان هم به صورت بیوتروف و هم به صورت نکروتروف رفتار می‌کنند. چنین پاتوژن‌هایی همی-بیوتروف نام دارند. بسیاری از قارچ‌هایی که عموماً نکروتروف تصور می‌شوند ممکن است در واقع همی‌بیوتروف باشند و در ابتدای فرآیند آلودگی مرحله بیوتروف داشته باشند. مکانیسم‌های مولکولی در زمینه فعال‌سازی واکنش‌های دفاعی گیاه بسیار پیچیده است [Glazebrook, 2005] و دفاع در برابر نکروتروف‌ها و بیوتروف‌ها مکانیسم‌های مختلفی را به کار می‌گیرد [Mukherjee et al., 2009].

۱-۳-۱- معرفی پاتوژن قارچی *Alternaria brassicicola*

بسیاری از گونه‌های نکروتروف دامنه میزبانی بسیار محدود دارند که تنها یک یا تعداد کمی از گونه‌های گیاهی مرتبط را آلوده می‌کند. بیماری‌های ناشی از چنین پاتوژن‌هایی به تولید سموم انتخابی برای میزبان (HSTs) [۳] مرتبط است. این سموم اختصاصی سویه‌اند و برای بیماری‌زایی بر روی میزبان طبیعی مورد نیازند. به طور مثال گونه‌ها و فنوتیپ‌های مختلف *Alternaria*، این توکسین‌ها را بر روی سطح میزبان سازگار و نه گونه‌های غیر مرتبط ترشح می‌کنند. مقاومت به نکروتروف‌های میزبان-اختصاصی منعکس‌کننده ایمنی ناشی از افکتور (ETI)[۴] است [Friesen, 2008].

3. Host specific toxin

4. Effector triggerd immunity

جنس آلترناریا قارچی است که از بسیاری از گونه‌های ساپروفیت و اندوفیت تشکیل شده است، اما بیشتر به این دلیل شناخته شده است که دربرگیرنده‌ی بسیاری از پاتوژن‌های گیاهی معروف و مخرب است. بسیاری از گونه‌های بیماری‌زای آلترناریا، تولیدکننده‌ی سم نیرومندی هستند، که شیوه زندگی نکروتروفی آنها را تسهیل می‌کند. نکروتروف‌ها باید سلول‌های میزبان را قبل از کلونیزاسیون بکشند. درنتیجه سمومی ترشح می‌کنند تا مرگ سلول میزبان را از طریق تحریک مسیرهای آپوپتوزی برنامه‌ریزی شده یا به‌طور مستقیم با آسیب سلول و ایجاد نکروز تسهیل کند [Lawrence et al., 2008]. بیماری‌های ناشی از آلترناریا از رایج‌ترین بیماری‌ها در بسیاری از انواع گیاهان در سراسر جهان است. آلترناریا ابتدا برگ‌ها، ساقه‌ها، گل‌ها و میوه‌های گیاهان یک‌ساله به‌ویژه سبزیجات و گیاهان زینتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین بر بخش‌هایی از درختانی مثل مرکبات و سیب اثر می‌گذارد. لکه‌های برگی ناشی از آلترناریا عموماً قهوه‌ای تیره تا سیاه است و اغلب در حال بزرگ شدن هستند و معمولاً به صورت حلقه‌های مرکزی در می‌آیند. معمولاً ابتدا برگ‌های جوان‌تر مورد حمله قرار می‌گیرند، اما بیماری پیشرفت می‌کند و سبب می‌شود برگ‌های آلوده وارد شرایط زردی یا پیری شوند، خشک و پژمرده شوند و بیافتند [Agrios, 1988]. قارچ *Alternaria brassicicola* عامل بیماری لکه سیاه[5] گیاهان براسیکاسه است (شکل ۱-۱) و قابلیت آلوده کردن گیاه آرابیدوپسیس را دارد. این قارچ توکسین‌های اختصاصی میزبان به نام AB-toxin تولید می‌کند. AB-toxin تنها از اسپورهای در حال جوانه‌زنی و بر روی برگ‌های میزبان آزاد می‌شود (شکل ۱-۲) [Oka et al., 2005; Lazniewska et al., 2010; Mukherjee et al., 2009]. در طول آلودگی میزبان، *A. brassicicola* در معرض سطوح بالایی از ترکیبات دفاعی غیرمیکروبی همچون فیتوالکسین‌های ایندولی و محصولات شکستن گلیکوزینولات قرار می‌گیرد [Sellam et al., 2007].

شکل ۱-۱- علائم لکه سیاه قارچ *A. brassicicola* بر روی گیاه خردل سفید[6] [Lawrence et al., 2008].

5. Black spot

6. Cultivated mustard

شکل ۱-۲- تصویری از کندی قارچ نکروتروف *A. brassicicola* و تجمع کالوس و تشکیل زایده سلولی پس از مایه‌زنی قارچ [Lazniewska et al., 2010]

۱-۳-۲- پاتوسیستم قارچ-گیاه آلترناریا و آرابیدوپسیس

پاتوسیستم گیاه *Arabidopsis thaliana* و قارچ *Alternaria brassicicola* به طور گسترده‌ای برای مطالعه اثرات متقابل گیاه-پاتوژن در طی مرحله رویشی، مورد استفاده قرار گرفته است [Pochon et al., 2012]. اثر متقابل آرابیدوپسیس و قارچ *A. brassicicola* مدلی برای بیماری‌های ناشی از نکروتروف‌ها ارائه می‌دهد. قارچ *A. brassicicola*، عامل بیماری لکه-سیاه کروسیفره است و قابلیت آلوده‌کردن آرابیدوپسیس را دارد. اکوتایپ‌ها و زمینه‌های ژنتیکی مختلف، تنوع در حساسیت به این پاتوژن را نشان می‌دهد [Mukherjee et al., 2009]. آلودگی اکثر اکوتایپ‌ها، از جمله لاین Col-0 با این پاتوژن به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. گیاهان نوع وحشی آرابیدوپسیس (Col-0)، بسیار به آلودگی با *A. brassicicola* مقاومند [Thomma et al., 1999b]. به طور کلی مایه‌زنی Col-0 با *A. brassicicola* پاسخ‌های فوق‌حساسیت ایجاد می-کند و منجر به ایجاد زخمی می‌شود که فراتر از منطقه آلودگی گسترش نمی‌یابد [Mukherjee et al., 2009; Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999b; van Wees et al., 2003] (شکل ۱-۳).