

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

بررسی تنش اکسیداتیو سوختگی باکتریایی معمولی در لوبیا

مریم رشیدی فر

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر حسین عسگری

اساتید مشاور:

دکتر سید مهدی علوی

دکتر مهدی برادران فیروزآبادی

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

تابستان 93

تقدیم بہ

ہمہ آنان کہ می خوانند بیشتر بدانند

تشکر و قدردانی:

سایش پرودگار را، که جهان را بر اساس علم و عدل و حکمت آفرید.

نخست از خانواده عزیزم که در فراز و نشیب های زندگی همواره یاری دلسوز و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده اند، صمیمانه قدردانی می نمایم. خالصانه ترین مراتب تشکر خود را محضر اساتید راهنمای گرانقدرم، آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر حسین عسکری که بر انگیزه هایم جامه عمل با امید های طلایی پوشاندند، تقدیم می کنم. بنابر وظیفه خود لازم می دانم از حسن توجه استاد مشاور، جناب آقای دکتر سید مهدی علوی که با حمایت و پشتیبانی بی دریغ و راهنمایی های ارزنده، مراد طول مدت این پروژه یاری نمودند، تشکر نمایم. همچنین از استاد مشاور جناب آقای مهدی برادران و راهنمایی های ارزنده ایشان سپاسگزارم. از داوران محترم، آقایان دکتر قرنجیک و دکتر حیدری که با پیشنهاد های سازنده شان در هر چه بهتر نمودن این پایان نامه کمک کرده اند، صمیمانه سپاسگزارم. همچنین جناب آقای دکتر غلامی که به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی هدایت این جلسه را بر عهده

کرفتد قدردانی می‌نمایم. از مساعدت جناب آقای دکتر مسعود بهار در دانشگاه اصفهان و همکاری مسئولین محترم
ایستگاه ملی تحقیقاتی لوبیای خمین کمال تشکر را دارم. در پایان از کارشناسان و دوستان عزیزم در پژوهشگاه ملی
مهندسی ژنتیک و زیست فناوری خانم هارپاسی، رمضان‌زاده و بهکلاسی‌های مهربانم در دانشکده کشاورزی
شاهرود و سایر عزیزانی که مجال نام بردن از همه آن‌ها نیست کمال تشکر را دارم. موفقیت، سلامت و طول عمر
این عزیزان را از خداوند متعال خواستارم.

تعهدنامه

اینجانب مریم رشیدی‌فر دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه بررسی تنش اکسیداتیو سوختگی باکتریایی معمولی در لوبیا تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر حسین عسگری متعهد می‌شوم.

تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.

مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.

حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آوردن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.

در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ: ۹۳/۶/۳۱

امضای دانشجو:

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده:

گونه‌های فعال اکسیژن، محصول ثانویه اجتناب ناپذیر متابولیسم‌های هوازی (فتوسنتز و تنفس) می‌باشند. پیشتر تصور می‌شد که ROS محصول سمی جانبی متابولیسم‌های هوازی است. اما اخیراً ثابت شده است که گیاهان این مولکول‌ها را به طور فعال تولید می‌کنند که احتمالاً در کنترل فعالیت‌های فیزیولوژی مانند پاسخ به تنش غیر زنده و دفاع در برابر پاتوژن و پیام‌رسانی سیستمیک نقش دارند. بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا با عامل *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) از بیماری‌های مهم لوبیا در اکثر مناطق کشت این محصول به ویژه در نواحی گرم و مرطوب می‌باشد. امروزه در اکثر کشورها به استثنای مناطق خشک خسارت ناشی از این بیماری گاهی به بیش از ۴۰٪ می‌رسد. در این مطالعه به بررسی سطح بیان mRNA برگ‌های آلوده به *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* به منظور تعیین تغییر سطح بیان ژن‌های شرکت‌کننده در تنش اکسایشی شامل NADPH اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکورات پراکسیداز، کاتالاز و مونودئیدروآسکورات پراکسیداز پرداخته شد. نتایج نشان داد که آنزیم NADPH اکسیداز ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش بیان معنی‌دار داشته و ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر بیان خود رسید و در ۴۸ و ۷۲ ساعت روند کاهشی آن مشاهده شد. افزایش بیان آنزیم آسکورات پراکسیداز در ساعت ۲۴ معنی‌دار بوده و در ۷۲ ساعت کاهش آن مشاهده شد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مونودئیدروآسکورات ردوکتاز از ساعت ۱۲ تا ساعت ۷۲ افزایش بیان معنی‌دار داشته‌است. آنزیم کاتالاز در ساعت ۱۲ افزایش بیان معنی‌دار داشته و در ساعت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ بیان آن به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسایشی، بیماری بلایت لوبیا، باکتری زانتوموناس، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت.

فهرست مطالب:

فصل اول - مقدمه و کلیات	۱
۱-۱ سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا	۳
عامل باکتریایی	۴
۲-۱-۱ مکانیسم ایجاد بیماری	۴
۲-۱ تنش اکسایشی	۵
۳-۱ اکسیژن و گونه‌های فعال آن	۶
۱-۳-۱ اثرات تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن بر اجزای سلولی	۹
۲-۳-۱ تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن بر اجزای سلولی	۹
۴-۱ مکانیسم رفتروبی	۱۷
۱-۵ روش‌های اندازه‌گیری تنش اکسایشی	۲۲
فصل دوم - مرور منابع	۲۳
۱-۲ گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به تنش	۲۴
۱-۱-۲ گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به تنش‌های زنده	۲۵
فصل سوم - مواد و روش‌ها	۳۱
۱-۳ وسایل و دستگاه‌ها	۳۲
۲-۳ مواد	۳۲
۳-۳ تیمارها و طرح آزمایشی	۳۲
۴-۳ تهیه مایه تلقیح و مایه‌زنی گیاه میزبان	۳۳
۵-۳ استخراج Total RNA از برگ لوبیا	۳۴

۳-۶	تعیین غلظت RNA استخراجی به روش اسکتروفوتومتری	۳۴
۳-۷	الکتروفورز یل آگارز	۳۵
۳-۸	تیمار RNA با آنزیم DNase	۳۵
۳-۹	واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA)	۳۶
۳-۱۰	واکنش RT-PCR	۳۶
۳-۱۱	طراحی آغازگر	۳۷
۳-۱۲	آماده سازی آغازگر	۳۷
۳-۱۳	واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)	۳۷
	فصل چهارم- نتایج و بحث	۳۹
۴-۱	مایه زنی	۴۰
۴-۲	نتایج الگوی باندی RT-PCR	۴۰
۴-۳	پیشنهادهات	۴۹
	فصل پنجم- منابع	۵۱

فهرست جداول:

- ۱-۱ طبقه بندی زانتوموناس ۴
- ۲-۱ انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های سلولی ۱۴
- ۳-۱ آنزیم‌های رفتروبی و محل تشکیل آن‌ها در سلول گیاهی ۲۰
- ۳-۱ توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های کاندیدا ۳۸
- ۴-۱ تجزیه‌واریناس میزان بیان نسبی ژن NADPH Oxidase در گیاهان شاهد و آلوده ۴۳
- ۴-۲ تجزیه‌واریناس میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در گیاهان شاهد و آلوده ۴۴
- ۴-۳ تجزیه‌واریناس میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان شاهد و آلوده ۴۵
- ۴-۴ تجزیه‌واریناس میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شاهد و آلوده ۴۶
- ۴-۴ تجزیه‌واریناس میزان بیان نسبی ژن مونو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز در گیاهان شاهد و آلوده ۴۷

فهرست شکل‌ها و نمودارها:

- ۱-۱ تنش اکسایشی ۱۰
- ۲-۱ انواع اکسیژن ۱۰
- ۳-۱ نحوه احیای اکسیژن اتمسفری ۱۲
- ۴-۱ تولید گونه‌های فعال اکسیژن فعال در کلروپلاست ۱۵
- ۵-۱ NADPH اکسیداز غشای پلاسمایی ۱۶
- ۶-۱ گونه‌های فعال اکسیژن در پراکسیزوم ۱۶
- ۷-۱ مسیر رفتروبی گونه‌های فعال اکسیژن ۲۱
- ۱-۲ تولید گونه‌های فعال اکسیژن در پاسخ به پاتوژن ۲۹
- ۱-۴ برگ‌های مایه‌زنی شده ۴۱
- ۲-۴ الگوی باندی حاصل از RT-PCR ۴۲
- ۳-۴ مقایسه میانگین اثرات متقابل ۴۸

فصل اول

مقدمه و کلیات

براساس دیدگاه‌های رایج، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ۱ محصول ثانویه اجتناب ناپذیر از متابولیسم-های هوازی (فتوسنتز و تنفس) می‌باشد (آسادا و تاکاهاشی، ۲۰۰۶). دیگر منابع ROS مسیر glycolate oxidase در پراکسی‌زوم ها طی تنفس نوری، NADPH oxidase و Amine oxidase و پراکسیدازهای متصل به دیواره سلولی می‌باشند (دت و همکاران، ۲۰۰۰). بسیاری از تنش‌ها از جمله تنش‌های خشکی، شوری، سرمازدگی، درجه حرارت بالا، فلزات سنگین، اشعه ماوراء بنفش، آلاینده‌های هوا مانند ازن و دی اکسید گوگرد، تنش‌های مکانیکی، فقر عناصر غذایی، حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های نوری سبب شکسته شدن مکانیزم‌های خود تنظیمی در سلول می‌شوند و تولید ROS را افزایش می‌دهند (کازال و همکاران، ۱۹۹۹؛ دت و همکاران، ۲۰۰۰). افزایش تولید ROS در تنش به عنوان علامت تهدید برای سلول به شمار می‌رود. از طرف دیگر تصور می‌شود که ROS به عنوان پیامی برای فعال سازی مکانیسم‌های دفاعی عمل می‌نماید و به عنوان شاخص سلولی در برابر تنش محسوب می‌شود (دسیکین و همکاران، ۲۰۰۱).

از آنجا که درک مکانیسم مقاومت و عکس العمل‌های القا شده گیاه در ایجاد ارقامی با سطح مقاومت بالا به منظور کنترل موثر بیماری ضروری است. ازاینرو در راستای شناسایی این عکس العمل‌های دفاعی، آنالیز بیان ژن‌های القا شده طی تعامل گیاه و بیمارگر موثرترین استراتژی برای کسب دیدگاه مناسب در خصوص حوادثی است که در این فرایند رخ می‌دهد. همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، ROS ها به عنوان یک پیام فعال سازی سیستم دفاعی عمل می‌کنند لذا در این مطالعه میزان بیان RNA برخی ژن‌های فعال در مسیر تنش اکسیداتیو در رقم حساس، بین تیمار و کنترل مقایسه می‌شود. این داده‌ها زمینه را برای درک بهتر مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی باکتری را فراهم می‌کند و اساس مطالعات مولکولی بعدی را در زمینه برهمکنش میزبان باکتری خواهد بود.

۱-۱ سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا

بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا با عامل *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) و *X. a. pv. phaseoli* var *fuscans* (Xapf) از بیماری‌های مهم لوبیا در اکثر مناطق کشت این محصول به ویژه در نواحی گرم و مرطوب می‌باشد (شاد، ۲۰۰۶، شی و همکاران، ۲۰۱۱). بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا در اثر Xap اولین بار توسط بیچ (۱۸۹۲) از نیویورک گزارش شد و امروزه در اکثر کشورها به استثنای مناطق خشک تا بیش از ۴۰٪ خسارت‌زا است (جاکوز، ۲۰۰۵).

در ایران وقوع بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا با عامل Xap و Xapf در مزارع لوبیای شهرستان اراک توسط لک و همکاران (۱۳۷۷) مشاهده و در سال ۱۳۸۱ گزارش گردید (لک و همکاران، ۱۳۸۱) و در سال ۱۳۸۶ به بیماری مهم لوبیا در کشور تبدیل شد. و در حال حاضر در استان‌های مرکزی اراک و لرستان پراکنده شده است. این بیماری سیستمیک می‌باشد (موتلو و همکاران، ۲۰۰۸) و فاکتور اصلی گسترش آن در مسافت طولانی انتقال و کاشت بذر آلوده و در داخل مزرعه به استفاده از سیستم آبیاری بارانی مربوط می‌شود (زمانی و همکاران، ۲۰۱۱ و اخوان و همکاران، ۲۰۱۳). به دلیل اینکه باکتری Xap با بذر منتقل می‌شود و می‌تواند سالیان طولانی در بذر زنده باقی بماند. کنترل این بیماری مشکل است و تاکنون روش شیمیایی مؤثری برای کنترل بیماری توصیه نشده است.

استفاده از بذر سالم، تناوب زراعی، شخم عمیق پس از برداشت محصول و ارقام مقاوم برای کنترل بیماری توصیه شده است، اساس کنترل آن بر استفاده از بذور عاری از باکتری و ارقام مقاوم به بلایت معمولی می‌باشد که البته استفاده از ارقام مقاوم به عنوان روش مبارزه دراز مدت تأکید بسیار شده است. اگرچه استفاده از روش‌های سرولوژیک و واکنش زنجیره‌ای ۲ برای شناسایی پاتوژن در بذر وجود دارد. اما جداسازی از محیط کشت نیمه اختصاصی باکتری روشی رایج برای شناسایی باکتری می‌باشد (پوپوی، ۲۰۱۰).

۱-۱-۱ عامل بیماری

باکتری Xap باکتری گرم منفی، هوازی اجباری به شکل میله‌ای، که توسط تاژک قطبی حرکت می‌کند (الیوسر، ۲۰۰۶). کاتالاز مثبت و اندازه آن $0.75-0.5 \times 2-1.5$ میکرومتر می‌باشد. دمای مناسب برای رشد باکتری $28-30^{\circ}\text{C}$ و حداکثر دمای رشد $35-39^{\circ}\text{C}$ می‌باشد (شاد، ۲۰۰۶؛ جدول ۱-۱). باکتری زانتوموناس در محیط کشت تولید کلنی‌های زرد رنگ می‌کند، رنگ زرد کلنی‌ها بخاطر حضور رنگدانه‌های زانتومونادین متصل به غشا است که احتمالاً باکتری را در مقابل آسیب‌های فتوبیولوژیکی مصون می‌دارد (استار و استفان، ۱۹۶۴).

جدول ۱-۱: طبقه بندی زانتوموناس، شاد و همکاران، ۲۰۰۶

kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Xanthomonadales
Family	Xanthomonadaceae
Genus	Xanthomonas

۲-۱-۱ مکانیسم ایجاد بیماری

در جنس زانتوموناس ژن‌های متعددی یافت شده‌اند که در بیماری‌زایی ۳ و قدرت تهاجمی ۴ باکتری‌های این جنس نقش دارند (آستوا، ۲۰۰۵). از این میان می‌توان به ژن‌های آویروولانس (avr) و ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی و واکنش فوق حساسیت ۵ اشاره نمود. ژن‌های آویروولانس کد کننده گروهی از پروتئین‌ها هستند که مسئول کنترل توانایی باکتری در تحریک واکنش فوق حساسیت در میزبان مقاوم بوده و ممکن است در بیماری‌زایی یا قدرت تهاجمی باکتری در میزبان حساس نیز نقش داشته باشند (بوتنر و بونس، ۲۰۱۰). ژن‌های hrp هم کد کننده پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع ۶^۳ می‌باشند که به عنوان

3. pathogenicity

4. virulence

5. hrp: hypersensitive response and pathogenicity

6. T3SS: Type III Secretion System

مسئول انتقال و تحویل پروتئین‌های موسوم به "پروتئین افکتور" به داخل سلول گیاه میزبان شناخته شده‌اند (هوک، ۱۹۹۸، دارسنوال، ۲۰۰۸). برهم‌کنش این پروتئین‌های ترشحی با پروتئین‌های سلول میزبان منجر به انجام بسیاری از اعمال داخلی سلول میزبان مثل مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، کنترل تنظیم بیان برخی ژن‌ها و برهم زدن سیستم ایمنی میزبان می‌شود. به طور کلی، تنش‌های محیطی سبب افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان می‌شود و گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به این تنش‌ها پاسخ می‌دهند. از آنجا که گسترش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان سبب حفاظت آن‌ها در برابر تنش اکسایشی از طریق مهار جزیی و یا رفتروبی ROS تولید شده می‌شود، لذا با توجه به نقش مهم این آنزیم‌ها درک میزان تغییر فعالیت آنزیم‌های رفتروبی از اهداف این مطالعه می‌باشد.

۲-۱ تنش اکسایشی

تنش نتیجه روند غیر عادی فرآیندهای فیزیولوژیکی است که از تأثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود. در حقیقت مقدار یا شدت نامناسب عوامل فوق است که می‌تواند به طور بالقوه برای موجود زنده مشکل ساز باشد و باعث تنش و بروز آسیب‌های مستقیم و غیر مستقیم در گیاه یا اجزای آن شود (پوپو و زی‌گیلاسکایا، ۲۰۰۷).

واژه "تنش اکسایشی" اولین بار توسط هلموت سیز (۱۹۸۵) به حالتی ناشی از عدم توازن بین تولید و حذف گونه‌های اکسیژن گفته شد (کادنز و سیز، ۱۹۸۵). مطالعات بر روی کاتالاز و پراکسیداز در اوایل قرن ۲۰ آغاز شد و کشف سوپر اکسید دیسموتاز در ۱۹۶۹ توسط مک کورد و فردویچ به درک این حقیقت منجر شد که سلول‌ها دارای سیستم تخصص یافته‌ای برای تبدیل گونه‌های فعال اکسیژن به گونه‌های کمتر فعال می‌باشند (مک کورد و فردویچ، ۱۹۶۹).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در حد طبیعی تولید می‌شوند و منجر به هموستازی و تعادل سلول می‌گردند ولی در شرایط تنش محیطی زنده و غیر زنده، تولید این مولکول‌ها از حالت معمول خارج و به صورت عوامل آسیب رسان سلولی عمل می‌کنند (لوشاک، ۲۰۰۱؛ شکل ۱-۲).

یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه تحت تنش ایجاد می‌شود تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول می‌باشد. کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از تولیدکننده‌های گونه‌های فعال اکسیژن هستند که به تولید سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌پردازند. این گونه‌های اکسیژن سمی و با قدرت واکنش بالا هستند و در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل کنند (اسمیرنف، ۱۹۹۳).

۱-۳ اکسیژن و گونه‌های فعال آن

برای اولین بار مولیکن (۱۹۲۹) به وجود اشکال فعال اکسیژن اشاره کرد و شیله ۸ (۱۹۴۳) نشان داد که اکسیژن در حالت خالص سمی می‌باشد. میکائیلیس ۹ (۱۹۶۲) به این نکته اشاره کرد که غلظت بالای اکسیژن برای سیستم‌های بیولوژیک سمی است و مطالعه‌ی سیستمیک بر روی مکانیسم‌های بیوشیمیایی سمیت اکسیژن به وسیله بین ۱۰ (۱۹۶۴) صورت پذیرفت. اکسیژن نقش تنظیم‌کنندگی و محوری در اکثر فرآیندهای متابولیکی و بیوشیمیایی دارد، ولی درک مکانیسم‌های مرتبط مستلزم دریافت عکس-العمل‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از کمبود یا زیادی اکسیژن از نقطه نظر فعال شدن این عنصر است (برادفورد و سیاو، ۱۹۸۲ و کادنز، ۱۹۸۹؛ شکل ۱-۱).

گونه‌های فعال اکسیژن بر خلاف اکسیژن اتمسفری از میل ترکیبی بالایی در ترکیب با مولکول‌های زیستی برخوردارند. در برخی نقاط کلیدی متابولیسم تنها یک نوع و در برخی نقاط بسیاری از گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند سبب اختلال در متابولیسم شوند. در ادامه به معرفی اکسیژن‌های فعال و برخی از اثرات مخرب این گونه‌های فعال اشاره خواهد شد (شکل ۱-۲).

اکسیژن سه گانه (3O₂)، همان اکسیژن اتمسفری و حالت پایه اکسیژن می‌باشد. در این حالت اکسیژن نسبتاً واکنش ناپذیر است.

7. Mulliken
8. C.W. Sheele
9. Michelis
10. Bean
11. Triplet Oxygen

اکسیژن منفرد (10)12، حالت برانگیخته اکسیژن می‌باشد. در این گونه‌ی اکسیژن الکترونی اضافی نمی‌گردد، بلکه یک الکترون به اوربیتالی با انرژی بالاتر برده می‌شود. تشکیل این گونه‌ی اکسیژن عمدتاً در کلروپلاست و در فتوسیستم ۲ رخ می‌دهد. اکسیژن منفرد بسیار مخرب است. و با اکثر مولکول‌های زیستی واکنش می‌دهد. نیمه عمر آن تقریباً حدود ۳ میکروثانیه می‌باشد.

رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، گونه‌ی فعال اکسیژن نسبتاً واکنش‌پذیر و با نیمه عمر تقریباً ۴-۲ میکروثانیه می‌باشد و نمی‌تواند از غشاهای بیولوژیک عبور کند. این رادیکال به طور پیوسته در طول فتوسنتز در کلروپلاست (گیرنده الکترون متصل به غشاء تیلاکوئید فتوسیستم ۱) تولید می‌شود. گفته می‌شود که سوپراکسید، اولین رادیکالی است که تولید می‌شود و منجر به تولید رادیکال‌های دیگر می‌شود. دیگر مکان‌های تولید این رادیکال در میتوکندری، گلی‌اکسی‌زوم و توسط آنزیم NADPH اکسیداز در دیواره سلولی می‌باشد.

رادیکال پرهیدروکسیل ($HO_2\cdot$)، اکسیدکننده‌ی قوی که با پروتون‌دار شدن رادیکال سوپر اکسید در محیط آبی این رادیکال به دست می‌آید که یک می‌باشد.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، با کاهش تک ظرفیتی رادیکال سوپراکسید بدست می‌آید. این رادیکال تا حدودی واکنش‌پذیر است و نیمه عمر نسبتاً طولانی در حدود ۱ میلی ثانیه دارد. پراکسید هیدروژن با اکسید کردن گروه تیول آنزیم‌ها باعث غیرفعال شدن آنها می‌شود. این رادیکال همچنین قادر است از محل تولید به قسمت‌های دیگر انتشار یابد. محل تولید آن کلروپلاست، میتوکندری، گلی‌اکسی‌زوم و پراکسی‌زوم می‌باشد. از طرفی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با دیسموته کردن رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن تولید می‌کند. بر اساس مطالعات انجام شده H_2O_2 به عنوان مولکول هدایت کننده در گیاهان فعالیت می‌کند. تولید H_2O_2 بر اثر تنش اکسایشی، یکی از اولین پاسخ‌ها به پاتوژن‌ها و مولکول‌های محرک می‌باشد (لامب و دیکسون، ۱۹۹۷). H_2O_2 بیان ژن‌های دفاعی مانند GST ۱۳ و PAL ۱۴ را

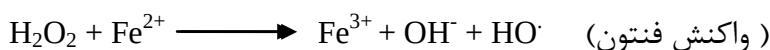
12. Singlet Oxygen

13. glutathione S-transferase

14. phenylalanine ammonia lyase

القا می‌کند. H₂O₂ همچنین MAPKs^{۱۵} که در فعال شدن و انتقال پاسخ‌های سلولی به محرک‌های خارجی نقش دارد را فعال می‌کند (گرنه و همکاران، ۲۰۰۰ و ساموئل و همکاران، ۲۰۰۵). به علاوه بسیاری از مطالعات نشان داده است که H₂O₂ فاکتوری کلیدی در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) در پاسخ به پاتوژن، محرک‌ها و هورمون‌ها می‌باشد.

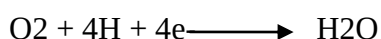
رادیکال هیدروکسیل (OH·)، رادیکال هیدروکسیل سمی‌ترین شکل فعال احیای ناقص اکسیژن است که از میل ترکیبی شدیدی با ماکرومولکول‌های حیاتی سلول برخوردار می‌باشد. نیمه عمر این رادیکال بسیار کم و در حد ۱ نانوثانیه است. از احیای ناقص اکسیژن، رادیکال سوپراکسید در حضور عنصری چند ظرفیتی نظیر آهن با تبادل یک الکترون، به فرم پایدار و اولیه خود بر می‌گردد. ولی در مرحله بعد، این الکترون توسط Fe²⁺ به پراکسید هیدروژن منتقل و با تجزیه آن رادیکال هیدروکسیل به وجود می‌آید که به آن واکنش فنتون^{۱۶} نیز گفته می‌شود. بنابراین رادیکال هیدروکسیل در حضور فلزات چند ظرفیتی نظیر آهن که به عنوان گیرنده و دهنده الکترون عمل می‌کند، تشکیل خواهد شد.



از طرفی رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌توانند به سرعت طبق واکنش هابر- وایز^{۱۷} با هم واکنش داده و رادیکال هیدروکسیل را تولید کنند. این واکنش در حضور عناصر واسطه به خصوص در حضور آهن رخ می‌دهد (جیل و همکاران، ۲۰۱۰).



به طور کلی جهت احیای کامل اکسیژن و تبدیل آن به آب، ۴ الکترون مورد نیاز است. این الکترون‌ها در مسیر اصلی انتقال الکترون یکباره بر روی اکسیژن منتقل و آن را به صورت کامل احیا می‌کند.



15. mitogen-activated protein kinases

16. Fenton Reaction

17. Haber-Weiss

اما هر گاه بنا به دلایلی مسیر اصلی انتقال الکترون مسدود گردد، مسیر فرعی دیگری برای انتقال الکترون فعال می‌شود. در این مسیر بر خلاف مسیر اصلی، الکترون‌ها تک تک بر روی اکسیژن منتقل می‌گردند. در نتیجه این عمل، اکسیژن اتمسفری به‌طور ناقص احیا و با گرفتن ۱، ۲ و ۳ الکترون به ترتیب رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل تشکیل می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۷؛ شکل ۱-۳).

۱-۳-۱ اثرات تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن بر اجزاء سلولی

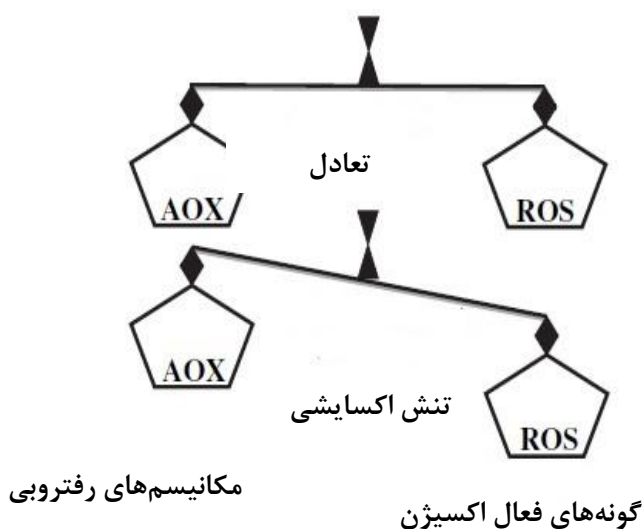
اکسیژن فعال و عواملی که تولید رادیکال‌های اکسیژن می‌کنند، سبب آسیب‌های بی‌شماری به DNA می‌گردد و شامل حذف قسمتی از توالی، جهش، تغییر بازها، شکست رشته DNA و اکسیداسیون دئوکسی-ریبونوکلیک‌ها می‌باشد (توتجا و همکاران، ۲۰۰۱).

رادیکال‌های فعال اکسیژن در مکان‌های ویژه آمینواسید سبب تغییر شکل، تکه تکه کردن زنجیره‌ی پپتیدی، تغییر بارهای الکتریکی و افزایش حساسیت به پروتئولیز می‌شوند. تفاوت در زنجیره پپتیدی اسیدهای آمینه سبب تفاوت در میزان حساسیت آنها به این حملات اکسیداتیو می‌گردد. همچنین تفاوت در فرم‌های مختلف گونه‌های اکسیژن فعال در پتانسیل فعالیت آنها تأثیرگذار است.

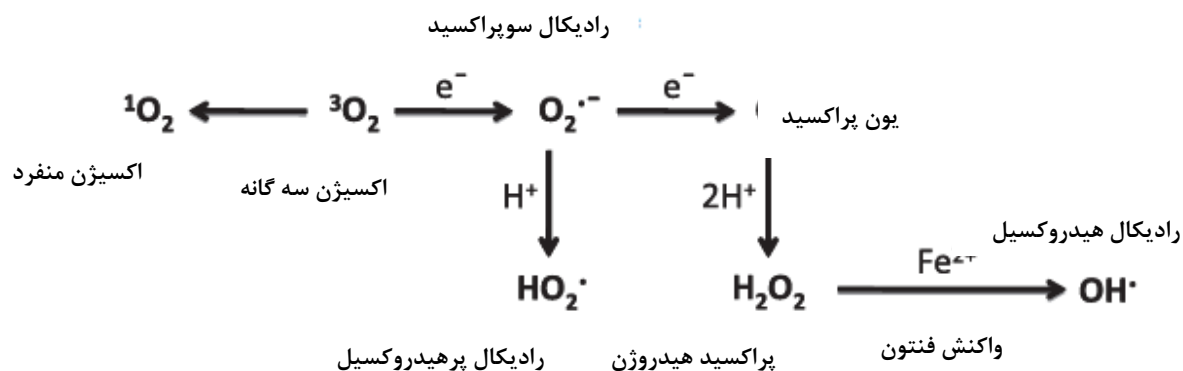
پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی که منجر به افزایش سیالیت و نفوذپذیری و در نهایت شکست و تخریب غشاء و مرگ سلول می‌شود، عمده‌ترین آسیب رادیکال‌های فعال اکسیژن به لیپیدها می‌باشد (مونتیلت و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۳-۲ تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در سلول

گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر در سلول‌های گیاهی دارای منابع تولید بسیاری می‌باشند (جدول ۱-۲).



شکل ۱-۱: تنش اکسایشی : در شرایط طبیعی گونه‌های فعال اکسیژن توسط مکانیسم‌های دفاعی مختلف پاکسازی می‌شوند و تعادلی بین تولید و پاکسازی این گونه‌ها وجود دارد. ممکن است این تعادل توسط فاکتورهای مختلفی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند شوری، خشکی، فلزات سنگین، کمبود مواد غذایی، سموم و علف‌کش‌ها بر هم بخورد که منجر به افزایش ناگهانی سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن درون سلول و آسیب چشمگیر به ساختارهای سلول می‌شود (جیل و توتجا، ۲۰۱۰).



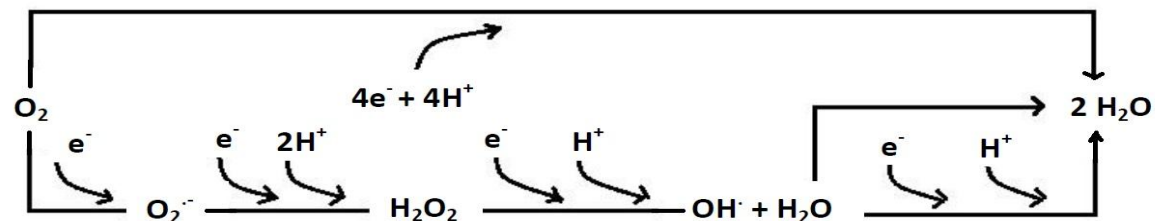
شکل ۱-۲: انواع اکسیژن: اکسیژن سه گانه همان اکسیژن اتمسفری و حالت پایدار اکسیژن می‌باشد و با دریافت یک الکترون به رادیکال سوپراکسید تبدیل می‌شود. رادیکال پرهیدروکسیل که با پروتون‌دار شدن رادیکال سوپر اکسید در محیط آبی این رادیکال حاصل می‌شود. با کاهش تک ظرفیتی یون پراکسید، پراکسید هیدروژن حاصل می‌شود و با دریافت یک الکترون از Fe^{2+} تبدیل به رادیکال هیدروکسیل می‌شود (جیل و توتجا، ۲۰۱۰).

بر اساس دیدگاه های رایج، ROS محصول ثانویه اجتناب ناپذیر ناشی از متابولیسم هوازی (فتوسنتز و تنفس) می باشد (مانو و تاکاهاشی، ۱۹۸۷). گلیکولات اکسیداز در پراکسیزوم ها طی تنفس نوری NADPH oxidase، آمین اکسیداز و پراکسیدازهای متصل به دیواره سلولی نیز از دیگر منابع تولید ROS در سلول می باشند.

کلروپلاست، واکنش مهلر در کلروپلاست به عنوان منبع اولیه ROS در گیاه است. طی این واکنش در اثر جریان الکترون از مراکز Fe-S فتوسیستم I یا احیای فرودکسین به اکسیژن O_2^- تولید می شود که بلافاصله توسط سوپراکسید دیسموتاز کاتالیز می شود (فویر، ۲۰۱۱).

علاوه بر آن در این اندامک در اثر محدودیت تثبیت دی اکسید کربن حین تنش های زیستی و غیر زیستی، تولید ROS تشدید می گردد. در شرایط تنش و حتی تحت غلظت های بالای CO_2 محیطی، نیز فتوسنتز کاهش می یابد که موید این است که دستگاه فتوسنتز صرف نظر از بسته شدن روزنه ها، تحت تاثیر قرار گرفته است (آسادا، ۲۰۰۶). در شرایط تنش کمبود آب روزنه ها در گیاه بسته می شوند و متعاقب آن غلظت CO_2 در بافت مزوفیل کاهش می یابد و به دنبال این وضعیت واکنش های تاریکی فتوسنتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش های روشنایی (ATP و NADPH)، مصرف نمی شوند. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف $NADP^+$ جهت دریافت الکترون کاهش می یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می کند و منجر به شکل گیری رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می گردد (بوچرت و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین در گیاهان C_3 طی محدودیت CO_2 مسیر تنفس نوری فعال می شود که در بخشی از این مسیر H_2O_2 به وسیله آنزیم گلیکولات اکسیداز تولید می شود (پنگ و همکاران، ۲۰۰۸).

میتوکندری، در این اندامک رادیکال یو بی کینون و NADH دهیدروژناز و کمپلکس III تولیدکننده های اصلی رادیکال سوپراکسید می باشد. اگر چه ROS تولیدی در میتوکندری در مقایسه با کلروپلاست کمتر می باشد ولی این رادیکال ها خود از تنظیم کننده های مهم بعضی از فرایندهای سلولی



شکل ۱-۳: نحوه احیای اکسیژن اتمسفری : هر گاه بنا به دلایلی مسیر اصلی انتقال الکترون مسدود گردد، مسیر فرعی دیگری برای انتقال الکترون فعال می‌شود. در این مسیر بر خلاف مسیر اصلی، الکترون‌ها تک تک بر روی اکسیژن منتقل می‌گردند. در نتیجه این عمل، اکسیژن اتمسفری به‌طور ناقص احیا و با گرفتن ۱، ۲ و ۳ الکترون به ترتیب رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل تشکیل می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۷).

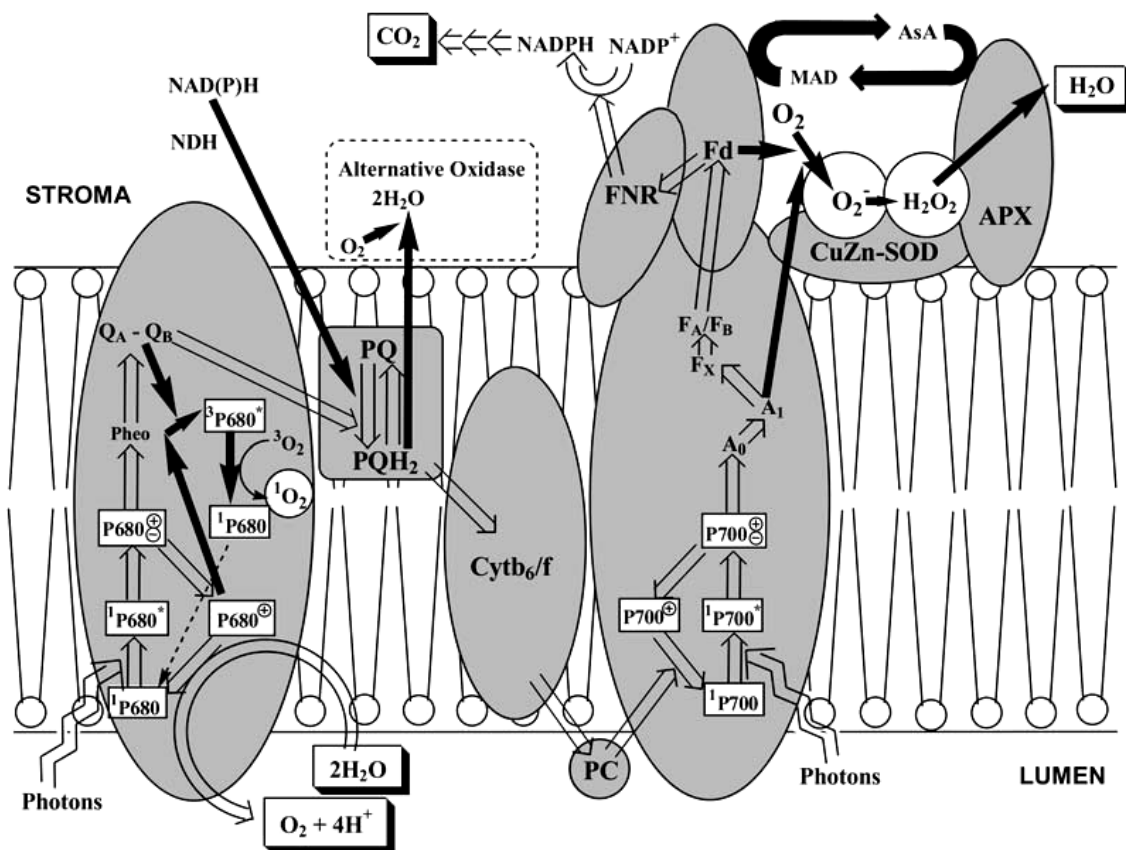
شامل سازگاری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد (بلول و همکاران، ۱۹۹۸).

آپوپلاست، NAHPH Oxidase غشایی و Peroxidase دیواره سلولی از منابع تولید کننده ROS در آپوپلاست می‌باشند. پراکسیدازهای وابسته به pH دیواره سلولی، در حضور احیاکننده‌های رها شده از سلول‌های پاسخ دهنده، منبع H_2O_2 آپوپلاستی به‌شمار می‌آیند. NADPH Oxidase ها به عنوان اکسیداز تنش تنفسی (RBO) اولین بار در نئوتروفیل پستانداران به عنوان کمپلکسی در مسیر از بین بردن پاتوژن شرح داده شد (تورس و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که خانواده Rboh ها در تولید ROS آپوپلاستی هنگام پاسخ‌های دفاعی از جمله پاسخ فوق حساسیت و همچنین محرک‌های رشدی و محیطی غیر زنده و در تنظیم رشد سلولی و توسعه و مرگ سلول‌ها نقش دارند (تورس و همکاران، ۲۰۱۰؛ شکل ۱-۵).

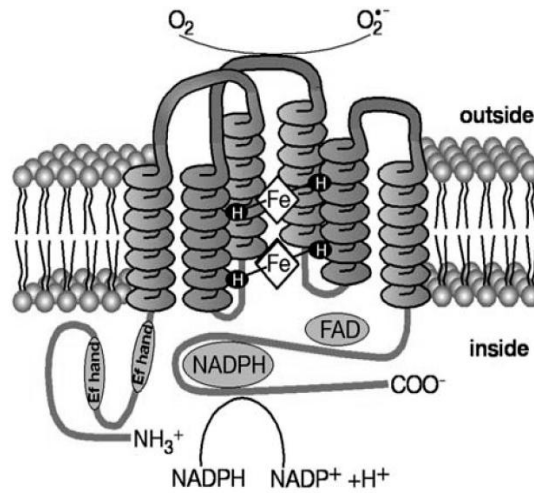
پراکسی‌زوم، این اندامک مکان اصلی تولید پراکسید هیدروژن داخل سلولی است. پراکسید هیدروژن توسط فلاوین اکسیدازها در مسیر تنفسی پراکسی‌زومی تولید می‌شود. زانتین اکسیداز با اکسید کردن زانتین یا هیپوزانتین به اسیداوریک رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌کند. از طرفی در تنفس نوری آنزیم گلیکولات اکسیداز، با انتقال دو الکترون از گلیکولات به اکسیژن تولید H_2O_2 و گلیکواگسالات می‌کند و منبع اصلی تولید پراکسید هیدروژن در این اندامک می‌باشد. بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در پراکسی‌زوم نیز منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌شود (جیل و توتجا، ۲۰۱۰؛ شکل ۱-۶).

جدول ۱-۲: انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های سلولی

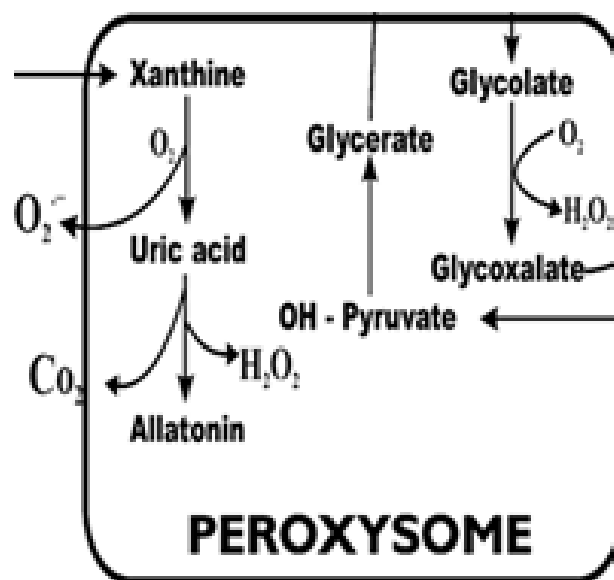
مکانیسم تولید	محل تولید	نوع اکسیژن فعال شده	منبع
کلروفیل برانگیخته	کلروپلاست	O_2^-	آسادا، ۱۹۹۹
زنجیره انتقال الکترون	کلروپلاست	O_2^-	آسادا، ۱۹۹۹
NADPH اکسیداز	غشاء پلاسمایی	O_2^-	گرنث و لوک، ۲۰۰۰
آلترناتیو اکسیداز	میتو کندری	O_2^-	دت، ۲۰۰۰
زنجیره انتقال الکترون	میتو کندری	O_2^-	دت، ۲۰۰۰
اغزالات اکسیداز	آپوپلاست	H ₂ O ₂	دت، ۲۰۰۰
آمین اکسیداز	آپوپلاست	O_2^-	آلن و فلور، ۱۹۹۷
گلی کولات اکسیداز	پراکسی‌زوم	H ₂ O ₂	کورپس و همکاران، ۲۰۰۱
بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب	پراکسی‌زوم	H ₂ O ₂	کورپس و همکاران، ۲۰۰۱
زانتین اکسیداز	پراکسی‌زوم	O_2^-	کورپس و همکاران، ۲۰۰۱



شکل ۴-۱: تولید اکسیژن فعال در کلروپلاست. در فتوسیستم دو تحت شرایطی که دریافت انرژی نورانی و سیستم انتقال الکترون مختل می‌شود مانند بسته شدن روزنه‌ها در شرایط خشکی، کمبود عناصر غذایی، و حضور آلاینده‌ها یا سموم انرژی دریافت شده صرف برانگیخته شدن اکسیژن از فرم سه‌گانه به فرم منفرد می‌شود. در فتوسیستم یک طی واکنش مهلر در اثر جریان الکترون از مراکز Fe-S فتوسیستم I یا احیای فرودکسین رادیکال سوپراکسید تولید شده که بلافاصله به وسیله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن و پس از آن به وسیله آنزیم آسکوربات پراکسیداز به آب تبدیل می‌شود. اختصارات: فتوسیستم I (PSI)، فتوسیستم II (PSII)، فرودکسین (FD)، سیتوکروم (Cyt)، پلاستوکوئینون (PQ)، پلاستوسیانین (PC)، پلاستوکوئینول (PQH)، (آسادا، ۲۰۰۶).



شکل ۱-۵ آنزیم NADPH اکسیداز در غشای پلاسمایی : NADPH اکسیداز موجود در غشاء پلاسمایی رادیکال سوپر اکسیدی که تولید می کند را به فضای آپوپلاستی می فرستد.



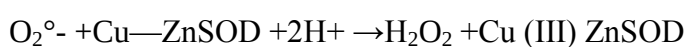
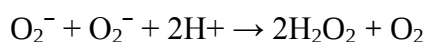
شکل ۱-۶: تولید گونه های فعال اکسیژن در پراکسیزوم: آنزیم گلیکولات اکسیداز در تنفس نوری و بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب سبب تولید گونه های فعال اکسیژن در این اندامک می شود.

۱-۴ مکانیسم رفتروبی

برای مقابله با تنش اکسایشی در گیاهان، سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با کارایی بالا شکل گرفته است که می تواند رادیکال های آزاد اضافی را از میان بردارد و آن ها را خنثی و یا رفتروبی کند. این سیستم دفاعی شامل سازوکارهای آنزیمی و یا غیر آنزیمی است. آنزیم های آن شامل دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربیک پراکسیداز (APOX)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) می باشد. و سیستم غیر آنزیمی شامل اسیدآسکوربیک (ASA) و گلوکاتایون (GS)، آلفاتوکوفرول (ویتامین E) و کارتنوئیدها و برخی ملکول های دیگر است (بلوخین، ۲۰۰۳).

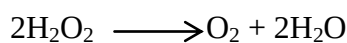
برای تنظیم غلظت ROS توسط مکانیسم های رفتروبی حداقل دو مکانیسم مختلف در سلول های گیاهی ضروری است. اول اینکه بتواند سطوح پایین ROS را برای مقاصد انتقال پیام حفظ نماید و دوم اینکه قادر به برطرف کردن اثرات سمی آن در طی تنش باشد. در مجموع انواع مختلفی از ROS در سلول تولید می شود و تعادل بین سطح پایدار آنها بسیار مهم است. این تعادل به وسیله مکانیسم های رفتروبی حفظ شده و بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه و محرک های متفاوت محیطی، نموی و بیوشیمیایی دارد (امیرصادقی و همکاران، ۲۰۰۷). از آنجا که هدف این پژوهش بررسی بیان در سیستم آنزیمی باشد، لذا به توضیح سیستم غیر آنزیمی در این بخش نمی پردازیم (جدول ۱-۳).

سوپراکسید دیسموتاز (SOD): نقش مهمی در تحمل و ایجاد سد اولیه دفاعی در برابر اثرات سمی افزایش سطوح ROS دارد. این آنزیم رادیکال سوپراکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن دیسموته می کند (احمد و همکاران، ۲۰۰۸) و خطر ایجاد رادیکال خطرناک هیدروکسیل را کاهش می دهد.



این آنزیم بر اساس کوفاکتور آن به سه نوع تقسیم‌بندی شده است. Cu/Zn-SOD که در سیتوسل و کلروپلاست و پراکسی‌زوم گیاهان عالی، Mn-SOD در میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی و پراکسی‌زوم گیاهان، کلروپلاست جلبک کلامیدوموناس رینهاردی ۱۸ و Fe-SOD در اغلب پروکاریوت‌ها، به خصوص در سیانوباکترها به وفور یافت می‌شود و در گیاهان کمتر دیده شده است و در صورت حضور در کلروپلاست قرار دارد (آشر و همکاران، ۲۰۰۲ و میوگا، ۲۰۰۸).

کاتالاز (CAT): آنزیمی هم‌دار می‌باشد که می‌تواند پراکسید هیدروژن را به طور مستقیم به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. این آنزیم جز جدایی‌ناپذیر واکنش سم‌زدایی در شرایط تنش است (گرگ و مانچندا، ۲۰۰۹) و دارای عدد برگشت پذیری ۱۹ بالایی می‌باشد (چنانکه یک مولکول از آن می‌تواند به طور تقریبی ۶ میلیون مولکول پراکسید هیدروژن را در یک دقیقه تجزیه کند). این آنزیم در از بین بردن پراکسید هیدروژن تولیدی در پراکسی‌زوم طی واکنش‌های بتاکسیداسیون اسیدهای چرب، تنفس نوری و کاتابولیسم پورین دارای اهمیت می‌باشد (جیل و توتجا، ۲۰۱۰).

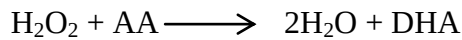


آسکوربات پراکسیداز (APX): آنزیم مهمی در مکانیسم رفتروبی ROS و حفاظت سلول در گیاهان عالی و دیگر ارگانیسم‌ها می‌باشد. APX در از بین بردن پراکسید هیدروژن در چرخه آب-آب ۲۰ و گلوکاتینون ردوکتاز مشارکت دارد و از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند. خانواده آسکوربات پراکسیداز دارای چند ایزوفرم می‌باشد که شامل فرم تیلاکوئیدی (tAPX)، غشای گلی‌اکسی-زوم (gmAPX) و همچنین فرم قابل حل در استرمای کلروپلاست (sAPX) و فرم سیتوزولی (cAPX) است (یوشیمورا و همکاران، ۲۰۰۲). میل ترکیبی APX (با مقادیر میکرو مولار) و CAT (با مقادیر میلی مولار) با پراکسید هیدروژن، نشان دهنده این است که این دو در دو کلاس متفاوت از آنزیم‌های رفتروبی قرار دارند. APX مسئول تعدیل میزان ROS برای پیام‌رسانی و CAT مسئول برطرف کردن زیادی ROS در طی تنش می‌باشد (میتلر، ۲۰۰۲).

18. Chlamydomonas reinhardtii

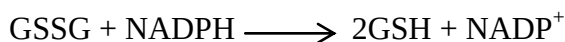
19 Turn over rate

20. Water-Water Cycle



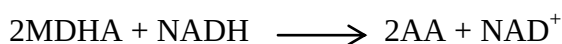
گلوکاتایون ردوکتاز (GR): این آنزیم یک اکسیدوردوکتاز فلاووپروتئین است که در یوکاریوت و پروکاریوت‌ها مشاهده می‌شود. فعالیت داشته و نقش مهمی در سیستم دفاعی در برابر ROS با نگه داشتن گلوکاتایون (GSH) در حالت احیا ایفا می‌کند. این آنزیم غالباً در کلروپلاست قرار دارد، اما میزان کمی از آن در میتوکندری یافت می‌شود.

چرخه آسکوربات-گلوکاتایون برای بازسازی گلوکاتایون احیاء شده نیازمند آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز و NAD(P)H می‌باشد. این آنزیم پیوند دی سولفید گلوکاتایون اکسید شده را طی یک واکنش وابسته به NAD(P)H احیاء کرده و در نتیجه باعث تولید گلوکاتایون احیاء شده (GSH) می‌شود (شکل ۱-۷ ج).



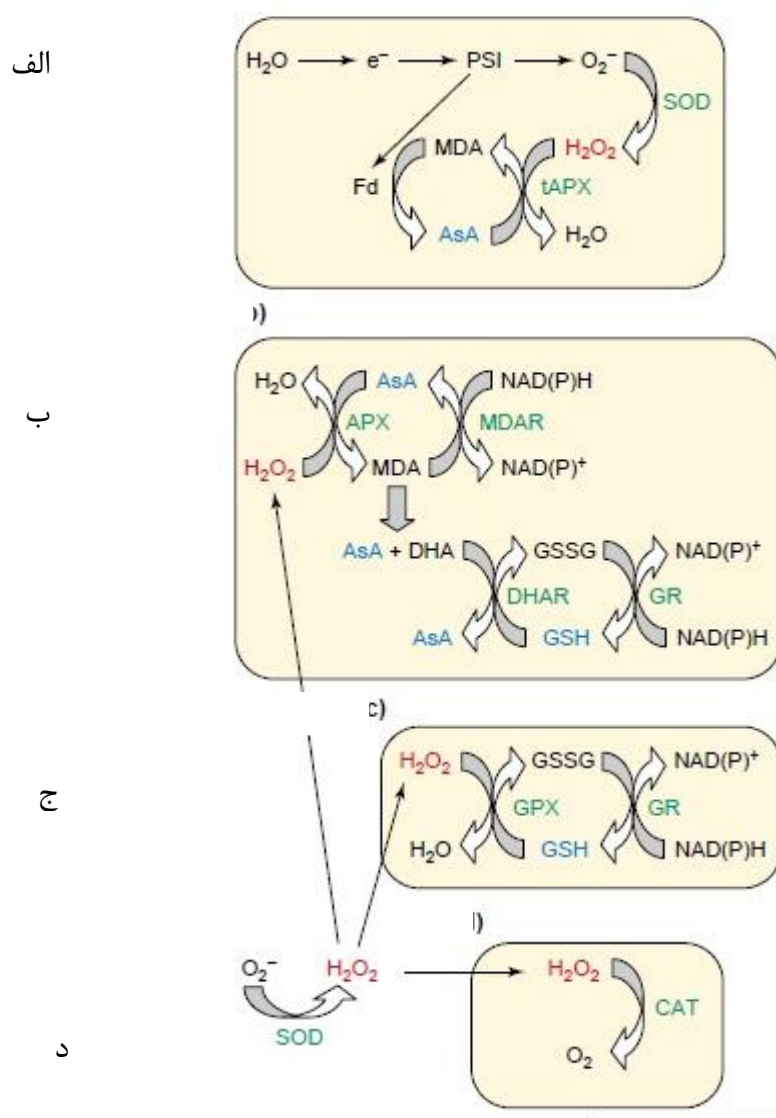
این آنزیم غالباً در کلروپلاست قرار دارد، و میزان کمی از آن در میتوکندری یافت می‌شود.

مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR): یک فلاوین آدنین دینوکلوئوتید است که در کلروپلاست و سیتوسل وجود دارد. در واقع این آنزیم به همراه آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR)، آسکوربات مورد نیاز برای عمل آنزیم آسکوربات پراکسیداز را فراهم می‌کنند. با فعالیت آسکوربات پراکسیداز آسکوربات تبدیل به مونودهیدروآسکوربت می‌شود که با احیاء NAD(P)H از طریق این آنزیم، مونو دهیدرو آسکوربات به آسکوربات تبدیل می‌شود (شکل ۱-۷ ب).



جدول ۱-۳: آنزیم های رفتروبی و محل تشکیل آن ها در سلول گیاهی

واکنش	محل حضور در سلول	آنزیم
$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	پراکسی زوم، گلی اکسی زوم، میتو کندی	کاتالاز
$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	سیتوزول، کلروپلاست، پراکسی زوم و میتو کندی	سوپر اکسید دیسموتاز
$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	سیتوزول، کلروپلاست و میتو کندی	گلوتاتیون ردوکتاز
$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$	سیتوزول، پراکسی زوم، کلروپلاست و میتو کندی	آسکوربات پراکسیداز
$2MDHA + NADH \rightarrow 2AA + NAD^+$	کلروپلاست، میتو کندی و سیتوزول	منو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز
$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$	کلروپلاست، میتو کندی و سیتوزول	دهیدرو آسکوربات ردوکتاز



شکل ۱-۷: مسیر رفتروبی گونه‌های فعال اکسیژن. الف) چرخه آب-آب. ب) چرخه آسکوربات- گلووتاتیون. ج) چرخه گلووتاتیون- پراکسیداز (GPX). د) کاتالاز. سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین سد دفاعی O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می‌کند. سپس آسکوربات- پراکسیداز، گلووتاتیون پراکسیداز و کاتالاز H_2O_2 را سم‌زدایی می‌کنند. برخلاف کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلووتاتیون پراکسیداز به چرخه بازتولید آسکوربات و گلووتاتیون نیاز دارند (الف- ج) این چرخه الکترون مورد نیاز خود را به طور مستقیم از مسیر فتوسنتز (الف) و یا از NAD(P)H (ب-ج) دریافت می‌کنند. اختصارات: دهیدروآسکوربات (DHA)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR)، فردوکسین (FD)، گلووتاتیون ردوکتاز (GR)، گلووتاتیون اکسیدشده (GSSG)، مونودهیدروآسکوربات (MDA)، مونودهیدروآسکوربات- ردوکتاز (MDAR)، فتوسیستم یک (PSI)، آسکوربات پراکسیداز متصل به تیلاکوئید (tAPX) (میتلر، ۲۰۰۲).

۵-۱ روش‌های اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو

تنش اکسیداتیو به عنوان پاسخی برای آسیب سلولی در نظر گرفته می‌شود (سیکا و همکاران، ۱۹۹۵). اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو در سلول‌ها نیازمند روش‌های حساس و قوی برای تشخیص ROS و سنجش کمی و دقیق آن و اندازه‌گیری پاسخ‌های دفاعی سلولی می‌باشد. اندازه‌گیری ROS در موجودات زنده دارای چالش‌های تحلیلی و قابل توجهی می‌باشد چرا که بسیاری از گونه‌های اکسیژن فعال بسیار واکنش‌پذیر بوده و دارای عمر کوتاهی هستند بنابراین تعیین و تشخیص آن‌ها در محیط‌های بیولوژیکی بسیار مشکل است. به دو روش مستقیم (اسپکتروسکوپی تشدید الکترون - اسپین ۲۱) و غیر مستقیم (از طریق اندازه‌گیری میزان بیان ژن و پروتئین‌های درگیر در خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و بررسی ماکرومولکول‌هایی که به وسیله این ترکیبات مورد حمله قرار می‌گیرند مانند لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها) می‌توان میزان گونه‌های اکسیژن فعال را در سلول اندازه‌گیری نمود (شولو و همکاران، ۲۰۰۶). که در این پایان‌نامه به دلیل استفاده از روش اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های درگیر در خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال، صرفاً به معرفی روش‌های مذکور می‌پردازیم.

برای بررسی بیان ژن‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی مانند میکرواری، لکه‌گذاری نورترن، PCR نیمه کمی و کمی، اندازه‌گیری بیان ژن‌ها براساس تعداد (EST)، روش تجزیه و تحلیل پایایی بیان ژن‌ها (SAGE) و روش آرایه‌های مرتب (Tiling array) استفاده نمود. در این پایان‌نامه از روش Semi-qRT-PCR برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد.

²¹ Resonance Spectroscopy Electron-Spin

فصل دوم

مرور منابع

افزایش تولید ROS در طی تنش می تواند علامت تهدیدی برای سلول باشد، اما همچنین تصور می شود که ROS می تواند به عنوان پیامی برای فعال سازی مکانیسم های دفاعی عمل نماید. بنابراین ROS می تواند به عنوان شاخص سلولی برای مطالعه تنش در نظر گرفته شود و نقش یک پیام رسان ثانویه را در مسیر انتقال پیام بازی نماید اگر چه می توان از ROS در سطح پایدار برای تشخیص تنش در سطح درون سلولی استفاده نمود، این سطح باید تحت کنترل بازدارنده های نفوذ ROS قرار گیرد، زیرا تجمع بیش از حد ROS می تواند باعث مرگ سلول گردد (میتلر، ۲۰۰۲).

۲-۱ گونه های فعال اکسیژن و پاسخ به تنش

در حالیکه در شرایط طبیعی رشد مقدار تولید ROS در سلول ها کم می باشد (سطح پایدار پراکسید هیدروژن در کلروپلاست ۰/۵ میلی مولار است) اما در شرایط تنش در اثر شکسته شدن مکانیسم های خود تنظیمی مقدار ROS در سلول افزایش و به سطح پایدار ۵ تا ۱۵ میلی مولار در کلروپلاست می رسد. این تنش ها شامل تنش های خشکی، شوری، سرمازدگی، درجه حرارت بالا، فلزات سنگین، اشعه ماوراء بنفش، آلاینده های هوا مانند ازن و دی اکسید گوگرد، تنش های مکانیکی، کمبود عناصر غذایی، حمله پاتوژن ها و تنش های نوری می باشند. تولید ROS ناشی از این تنش ها در نتیجه مسیرهایی مانند تنفس نوری در دستگاه فتوسنتزی و تنفس میتوکندریایی می باشند. این تنش ها نقطه آغاز تولید فعال ROS توسط NADPH oxidase هستند (نایت، ۲۰۰۱).

میتووا و همکاران (۲۰۰۲) پاسخ سیستم آنتی اکسیدانی کلروپلاستی واریته گوجه فرنگی به نام *Lycopersicon esculentum* (Lem) و گونه وحشی مقاوم به شوری *L. pennellii* (Lpa) برای مقاومت به شوری را مورد مطالعه قرار دادند. افزایش سطوح H_2O_2 و پراکسیداز لیپید غشاء کلروپلاست Lpa مشاهده شد ولی در Lem کاهش یافت. این پاسخ متفاوت این دو گیاه به شوری، مرتبط با فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در کلروپلاست بود.

میتلر و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که در آراییدوپسیس حداقل ۱۵۶ ژن در مدیریت سطوح ROS درگیر هستند. وانگ و همکاران (۲۰۰۱) نقش آنزیم منگنز سوپراکسید دیسموتاز (MnSOD) را در

تحمل برنج به خشکی مورد بررسی قرار دادند. ژن MnSOD از نخود *Pisum sativum* (تحت کنترل تنش اکسایشی توسط پروموتور وادار کننده SWPA2 به کلروپلاست برنج *Oryza sativa* به وسیله آگروباکتریوم برای توسعه مقاومت به خشکی برنج به صورت غیرمستقیم منتقل شد. در گیاهان ترانسژنیک برنج (T1) تحت تنش خشکی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلیکول (PEG) بیان تابعی از ژن MnSOD نخود آشکار شد و گیاه T1 نسبت به گونه وحشی مقاومت بیشتری به تنش اکسایشی القاء شده توسط PEG نشان داد. آنها همچنین اظهار داشتند که SOD یک جزء حیاتی از سیستم مهار ROS در کلروپلاست گیاهی است و بیان MnSOD میتواند تحمل به خشکی در برنج را بهبود بخشد. لین و همکاران (۲۰۰۷) مطالعاتی را بر روی میزان فعالیت ژن آسکوربات پراکسیداز و همچنین شناسایی ژن APX در ریشه بادمجان در شرایط تنش انجام دادند که بافت‌های مختلف بادمجان تغییرات گسترده‌ای در میزان بیان APX با استفاده از Real-Time PCR نشان دادند و میزان APX در ریشه بادمجان افزایش یافت. این محققین توانستند در طی این پژوهش توالی ژن APX را با استفاده از تکنیک Race-PCR شناسایی کنند.

تنش زنده همچون تنش غیر زنده سبب تجمع سریع ROS در بافت‌های گیاهی می‌شود، که نه تنها ورود پاتوژن به گیاه را محدود می‌کند بلکه سبب مرگ سلولی و انتقال پیام در پروسه‌های دفاعی گیاه می‌شود (میتلر و همکاران، ۲۰۱۱). طبق گزارش بارنا و همکاران (۲۰۱۲)، پاتوژن سبب افزایش فعالیت آنتی-اکسیدانی و همچنین کاهش H_2O_2 در بافت گیاهان حساس به پاتوژن در مقایسه با ارقام مقاوم می‌شود که در بخش بعدی به تفصیل به شرح آن خواهیم پرداخت.

۲-۱-۱ گونه‌های فعال اکسیژن و تنش‌های زنده

تولید سریع و موقت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا تنش اکسایشی در فضای آپوپلاستی از اولین پاسخ‌های سلولی است که در برابر ورود پاتوژن رخ می‌دهد (اپل وهرت، ۲۰۰۴). تولید ROS در پاسخ به پاتوژن آپوپلاستی است که در دو مرحله انجام می‌شود (لوین و همکاران، ۱۹۹۴). فاز اول آن غیر اختصاصی و موقتی و در پاسخ به پاتوژن بیماری‌زا است (بولول، ۲۰۰۲) و در اولین دقایق تقابل گیاه و

پاتوژن رخ می‌دهد و فاز دوم ساعت‌ها پس از حمله پاتوژن و به منظور پاسخ دفاعی و فوق حساسیت رخ می‌دهد. اولین گزارش تنش اکسایشی در برابر پاتوژن توسط داک (۱۹۸۳) تحت عنوان ایجاد سوپراکسید را در بافت زگیلی سیب‌زمینی در مواجهه با فیتوفتورا ۲۲ اعلام شده است.

گیاهان سدهای دفاعی مختلفی در برابر پاتوژن ایجاد می‌کنند که سد دفاعی اول، الگوی مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) ۲۳ است. رسپتورهای سلول‌های میزبان طی فعال شدن سیستم دفاعی PAMP را شناسایی می‌کنند که به آن PTI ۲۴ گویند. پاتوژن افکتورهای بیماری‌زایی PTI را مسدود و در این جریان پروتئین‌های دفاعی گیاه این افکتورها را شناسایی و سد دفاعی دوم ETI ۲۵ ایجاد می‌شود. تولید ROS در هر دو سیستم دفاعی شناسایی شده است. جونز و دنگل، (۲۰۰۶)

مطالعات نشان می‌دهد که تولید ROS در پاسخ به آلودگی توسط مکانیسم‌های مختلفی کنترل می‌شود. به عبارت دیگر در شناسایی موفق یک پاتوژن چندین آنزیم دلالت دارند که از آن جمله می‌توان به NAHDPH Oxidase غشایی و پراکسیداز دیواره سلولی اشاره کرد که در اغلب موارد NAHDPH Oxidase نقش بیشتری را ایفا می‌کند (سومیموتو، ۲۰۰۸).

ROS مسئول هماهنگی پاسخ‌های دفاعی گیاه در پی ورود پاتوژن به گیاه می‌باشد. چنانکه حذف یا تنظیم منفی ژن‌های Rboh منجر به نقص در تولید ROS می‌شود. به‌طور مثال دابل موتانت atrbohF و atrbohD در آرابیدوپسیس منجر به کاهش واکنش فوق حساسیت در پاسخ به باکتری گردید (تورس و همکاران، ۲۰۰۲) و خاموش سازی ژن Nbrboh در توتون نه تنها سبب مهار واکنش فوق حساسیت بلکه منجر به تشدید حساسیت در برابر اوومیست غیر بیماری‌زای فیتوفتورا نیز گردید (یوشیوکا و همکاران، ۲۰۰۳).

در زمینه مطالعات تنش اکسایشی در مواجهه با پاتوژن، مندل و همکاران به سنجش فعالیت آنزیمی در ریشه گوجه فرنگی در مواجهه با فوزاریوم پرداخته‌اند. همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در

22. *Phytophthora infestans*

23. Pathogen-associated molecular pattern

24. PAMP triggered immunity

25. Effector triggered immunity

برگ توت‌فرنگی تیمار شده با لکه برگی معمولی ۲۶ انجام شده است.

اگرچه تنش اکسایشی اولیه در آپوپلاست رخ می‌دهد اما ROS تولیدی درون سلول‌های گیاهی مانند کلروپلاست و پراکسی زوم نیز می‌تواند در مکانیسم دفاعی نقش داشته باشد. طبق مطالعاتی که در توتون BY2 انجام شده است نشان می‌دهد که محرک، ROS را در اندامک‌های درون سلول را سریعتر از آپوپلاست القا میکند. سیگنال‌ها ابتدا در ناحیه هسته‌ای و سیتوپلاسمی و سپس شبکه اندوپلاسمی گسترش می‌یابد و پس از آن در محیط اطراف سلول شناسایی می‌شود که نشان می‌دهد که ROS آپوپلاستی با منشا آنزیمی در جهت تقویت ROS درون سلولی فعالیت می‌کند (تورس، ۲۰۱۰). همچنان که در موتانت *Fad7fad8* (سبب نقص در سنتز اسید چرب تری یونیک کلروپلاستی می‌شود) سبب کاهش تجمع ROS در پاسخ به سودوموناس آویروولانت شده است. به عبارت دیگر این کاهش نشان دهنده ارتباط بین سیگنال‌های کلروپلاستی و تولید ROS آپوپلاستی به وسیله NADPH اکسیداز می‌باشد (یانو و همکاران، ۲۰۰۴). به علاوه تنظیم سطوح آسکورات پراکسیداز سیتوزولی که در تنظیم غلظت ROS کلروپلاست ناشی از تنش نوری شرکت دارد، به وسیله *AtrbohD* غشای پلاسمایی، نشان از ارتباط بین ROS کلروپلاستی و آپوپلاستی می‌باشد. تنظیم منفی سیستم آنتی اکسیدان یا رفتروبی نیز می‌تواند در افزایش تجمع ROS نقش داشته باشد (میتلر و همکاران، ۲۰۰۴). کاهش فعالیت آنتی اکسیدان‌ها منجر به تقویت واکنش فوق حساسیت و دفاع در برابر پاتوژن می‌شود (دت و همکاران، ۲۰۰۳). از طرف دیگر مهار یا تاخیر در سنتز ROS و به طور موازی تجمع متابولیت‌ها از ویژگی‌های برجسته تغییرات متابولیکی در فازهای اولیه بیماری در میزبان حساس به عامل قارچی بلاست برنج می‌باشد (پارکر و همکاران، ۲۰۰۹).

طبق مطالعات انجام شده، تنش اکسایشی می‌تواند تاثیر مستقیمی بر پاتوژن داشته و خصوصا با تولید رادیکال هیدروکسیل سبب نابودی پاتوژن شود (لیزکای و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین می‌تواند در ایجاد سد دفاعی خصوصا در مکان تقابل پاتوژن با گلیکوپروتئین دیواره سلولی و یا در تشکیل پلی مرهای سوبرین و لیگنین شرکت کند (هوکلون، ۲۰۰۳). به علاوه ROS عملکرد هدایتی در جهت فعال‌سازی

ژن‌های دفاعی و ایجاد سیستم دفاعی دیگری از طریق احیای فاکتورهای ترجمه و تقابل با دیگر اجزای هدایت کننده مانند کاست فسفوریلاسیون را دارد (مو و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین ROS می‌تواند مشتقات لیپیدی که نقش مولکول‌های هدایتی دارند و یا سبب آسیب غشایی می‌شوند را تولید کند (مونیتل و همکاران، ۲۰۰۵). از دیگر نقش‌های ROS می‌توان به تولید فیتوالکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه به منظور ممانعت از رشد پاتوژن (توما و همکاران، ۲۰۰۳)، و فعالیت در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و HR در جهت کاهش پراکندگی پاتوژن اشاره نمود (مور و همکاران، ۲۰۰۸).

از دیگر ویژگی‌های ROS تقابل با سیگنال‌های دیگر و هورمون‌های گیاهی می‌باشد. ROS چرخه‌های تنظیمی پیچیده‌ای را به همراه کلسیم و آبشار فسفوریلاسیون تشکیل می‌دهد. بسیاری از عملکردهای تنظیمی ROS در سیستم دفاعی گیاه با هورمون‌هایی از قبیل اسید سالیسیلیک و اکسید نیتریک مرتبط می‌باشد (تورس و همکاران، ۲۰۰۶، شکل ۱-۸)

فصل سوم

مواد و روش ها

۴-۱ وسایل و دستگاه ها

اتاقک رشد گیاهی با تنظیم نور، رطوبت و دما، دستگاه Hot block (TECHNE بلژیک)، دستگاه ترمال سایکلر (PeQ Lab)، سانتریفیوژ Kendro، ورتکس کیاژن (Micro spin (FUGE/ VORTEX ایران، ورتکس، هود لامینار (سرو تجهیز سکو ایران)، فریزر ۷۰- (GFL، آلمان)، یخچال (پارس، ایران)، اتوکلاو (ایران تولید، ایران)، ترازو شرکت Mono bloc، آلمان)، دستگاه ژل داک (Vilber، فرانسه)، منبع تغذیه الکتریکی (پایا پژوهش پارس، ایران)، دستگاه اسپکتروفوتومتر Eppendorf (هامبورگ آلمان)، تانک الکتروفورز (پدیده نوژن پارس، ایران).

۴-۲ مواد

آگارز، Tris-base، اسید بوریک، EDTA، اتانول، ایزوپروپانول، کلروفرم، خریداری شده از شرکت Merck، آلمان، مخلوط dNTP (۱۰ mM)، $MgCl_2$ (۵۰ mM) و محلول RNase plus خریداری شده از شرکت سیناژن، ایران، بافر PCR شرکت Thermo Scientific، آنزیم DNase⁺ و بافر، آنزیم Taq DNA polymerase، آنزیم Transcriptase Reverse (RevertAidTM M-MuLV) و بافر، مهارکننده آنزیم RNase (Ribolock)، مارکر وزن مولکولی مخصوص RNA و DNA (۱۰۰ bp) و آب تیمار شده با DEPC و محلول رنگی بارگذاری کننده ۶× (loading dye 6×)، Fermentas (آلمان)، آغازگرهای بالادست و پایین دست (۱۰۰ pM)، تکاپوزیست، ایران)، اتیدیوم بروماید، بذر لوبیا چشم بلبلی، رقم پرستو (موسسه اصلاح بذر دانشکده کشاورزی تهران، ایران). پرلیت و پیت‌موس و کوکوپیت. باکتری عامل بلایت لوبیا (دانشکده کشاورزی اصفهان، ایران).

۴-۲ تیمارها و طرح آزمایشی

آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کامل تصادفی در اتاقک رشد گیاهی انجام شد. گیاهان در گلدان‌های ۱ کیلویی و در خاک (پرلیت و پیت‌موس و کوکوپیت به نسبت مساوی) استریل کاشته شدند. دما (۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد) در محیط داخل اتاقک‌های رشد گیاهی اعمال گردید. هر گلدان

شامل ۱ گیاه بود که هر برگ در هر گیاه به عنوان یک مشاهده و برای هر تیمار ۳ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت.

داده‌های حاصل از کمی کردن باندهای RT-PCR به کمک نرم‌افزار Totallab نسبت به میزان کمی بیان ژن اکتین در همان شرایط نرمال شدند، تجزیه واریانس داده‌های نرمال شده با اکتین به کمک نرم‌افزار MSTAT انجام شد و بر اساس طرح کرت‌های خردشده در قالب بلوک کامل تصادفی انجام شد.

۴-۴ تهیه مایه تلقیح و مایه زنی گیاه میزبان

جهت تهیه استوک باکتری عامل بلایت معمولی لوبیا، کلنی‌های خالص به مدت ۱۶ ساعت، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm در محیط YP (۳ گرم مخمر، ۵ گرم پپتون، حجم نهایی ۱ لیتر) کشت گردید و سپس محیط کشت سانتریفیوژ و زمانی که میزان رسوب به اندازه کافی بود به رسوب حاصل حجم یک به یک به یک محیط YP و گلیسرول ۴۰٪ (V/V) اتوکلاو اضافه گردید. این استوک به منظور تهیه کشت‌های بعدی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد- قرار گرفت.

جهت تهیه مایه تلقیح، سویه مورد نظر در محیط کشت جامد YPGA (۷ گرم کلوز، ۱۵ گرم آگار، ۳ گرم مخمر، ۵ گرم پپتون، حجم نهایی ۱ لیتر) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شد. یک کلنی از کشت جامد این سویه در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YP رشد داده شده و زمانی که کشت سلولی به $OD_{600} = 0.3 (cfu/ml)$ رسید سانتریفیوژ rpm ۷۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و توده سلولی حاصل، مجدداً در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد.

برای تلقیح به لوبیا میزان ۵۰ میکرولیتر از مایه تلقیح به وسیله سرنگ وبا ایجاد خراش در پشت برگ به فضای پارانشیمی تزریق شد. نمونه برداری به ترتیب بعد از ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی صورت گرفته و در ازت مایع نگهداری شده و برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

۴-۵ استخراج Total RNA از برگ لوبیا

ابتدا ۰/۲ تا ۰/۳ گرم از برگ لوبیا با نیتروژن مایع کاملاً سائیده شد و به ویال منتقل گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول RNX به بافت برگی اضافه و خوب با ورتکس مخلوط شد تا محلول شفاف و همگن شود. به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد (دمای آزمایشگاه) نگهداری شد و در این فاصله محتوی ویال چند بار تکان داده شد. کلروفرم (۳۰۰ میکرولیتر) به مخلوط اضافه و تکان داده شد. ویال ها با سرعت ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، فاز رویی برداشته شد و به ویال جدیدی منتقل شد. هم حجم مایع انتقال یافته، ایزوپروپانول اضافه شد. ویال ها در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پس از خارج کردن محلول رویی، رسوب در ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. ویال ها در $750 \times g$ به مدت ۸ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی خارج و رسوب مدتی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا الکل تبخیر شود. رسوب در ۳۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد. نمونه ها به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

۴-۶ تعیین غلظت RNA استخراجی به روش اسپکتروفتومتری

یک میکرولیتر از محلول RNA به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق شد و با دستگاه UV اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان غلظت RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به کمک رابطه زیر قابل محاسبه است.

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \epsilon \times d/1000$$

در این معادله C عبارتست از غلظت RNA، A_{260} بیانگر جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بوده، □ ضریب خاموشی مولی است که این ضریب برای RNA برابر ۴۰ است. مقدار ناخالصی ناشی از حضور DNA یا پروتئین در RNA استخراجی با محاسبه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ قابل ارزیابی است. در نمونه

خالص RNA، میزان این نسبت 0.15 ± 2 می باشد. نسبت محاسبه شده کمتر از این میزان استاندارد نشان دهنده آلودگی با پروتئین است.

۴-۷ الکتروفورز ژل آگارز

بسته به درصد آگارز در ژل و حجم نهایی ژل، مقدار لازم از پودر آگارز توزین و با کمک حرارت در مایکروفر در حجم مناسبی از بافر $(0.5 \times)$ TBE (۲۷ گرم تریس باز، ۱۳/۷۵ گرم اسیدبوریک و ۱۰ میلی لیتر محلول EDTA، pH=۸، $0.5M$) حل شد. پس از شفاف شدن محلول و وقتی دمای محلول به ۵۵-۶۰ درجه رسید محلول از داخل منبع حرارت برداشته شد. به دو طرف یک سینی ژل الکتروفورز خشک و تمیز چسب نواری زده شد و پس از قراردادی شانه در منتهی الیه بالای سینی، محلول آگارز به آرامی در پلیت ریخته شد. پس از حدود ۳۰-۴۵ دقیقه که ژل سفت شد، چسب و شانه به آرامی برداشته شدند. سپس سینی حاوی ژل در داخل تانک الکتروفورز گذاشته شد و تانک به اندازه‌ای از بافر $(0.5 \times)$ TBE پر شد که حدود ۲ میلی متر روی سطح ژل را بپوشانند. به اندازه ۴ میکرولیتر نمونه برداشته شد و به آن ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده افزوده شد و مخلوط به آرامی به درون چاهک منتقل شد. ابتدا ولتاژ روی ۸۸ ولت تنظیم شد تا نمونه از چاهک خارج شود، سپس ولتاژ در حدود ۹۰ تا ۱۰۰ ولت تنظیم شد. وقتی رنگ بروموفنل بلو به اندازه کافی (حدود دو سوم طول ژل) مهاجرت کرد، جریان الکتریسیته قطع شد. ژل در اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی و برای حذف رنگ اضافی در آب مقطر به مدت چند ثانیه قرار داده شد و سپس زیر نور ماوراء بنفش (UV) با استفاده از دستگاه ژل داک بررسی شد.

۴-۸ تیمار RNA با آنزیم DNase

قبل از ساخت cDNA، RNA استخراج شده باید توسط آنزیم DNase تیمار شود. در این مرحله، ابتدا تمامی RNA های استخراج شده را هم غلظت شدند و میزان ۱ میکروگرم از هر کدام از آن‌ها را برداشته، به همراه ۱ میکرولیتر از آنزیم DNaseI و ۱ میکرولیتر از آب تیمار شده با DEPC به حجم ۱۰ میکرولیتر رساندیم و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. یک میکرولیتر از

EDTA (۲۵mM) به محلول افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

۴-۹ آر تی پی سی آر^{۲۷}

واکنش RT-PCR به روش دو مرحله ای صورت گرفت. در این روش، RNA در ابتدا به کمک هگزامر تصادفی به cDNA تبدیل شد. سپس، این بخش از واکنش RT به مخلوط واکنش PCR افزوده می گردد.

۴-۱۰ واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA)

برای تبدیل RNA به cDNA دو Master نیاز است. Master1 که حجم آن ۱۲/۵ میکرولیتر است و در آن mRNA قرار دارد و Master2 با حجم ۷/۵ میکرولیتر، حاوی آنزیم هاست. حجم کل دو Master ۲۰ میکرولیتر می باشد (جدول ۱-۳)

ابتدا محلول RNA استخراجی و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی (Master 1) ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس روی یخ سرد کردیم. این عمل ساختار ثانویه RNA را از بین می برد و برای ساخت cDNA آماده می کند. در مرحله دوم بافر و ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM) و ۱ میکرولیتر آنزیم Reverse transcriptase (200u/μl) اضافه شد. برای جلوگیری از تجزیه RNA میزان ۰/۵ میکرولیتر از مهارکننده RNase (40u/μl) نیز به مخلوط اضافه شد و مخلوط ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و سپس برای پیشبرد واکنش cDNA سازی به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت برای اتمام واکنش و غیر فعال کردن آنزیم نمونه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. برای تشخیص ساخت cDNA و اطمینان از سلامت آن (داشتن طول کامل آن) برای نمونه cDNA سنتز شده PCR گذاشته شد.

۴-۱۱ طراحی آغازگرها

²⁷ . Reverse Transcriptase- PCR

برای طراحی آغازگرها ابتدا باید توالی کامل cDNA ژن مربوطه را داشته باشیم. اما جستجو در پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) در قسمت PubMed نشان داد که توالی بعضی از ژن های مورد نظر ما برای گیاه لوبیا موجود نمی باشد. پس بررسی ایزوزیم های این گیاه در آرکیدوپسیس با جستجو در این سایت و از طریق BLAST انجام گرفت (جدول ۳-۲)

۴-۱۲ آماده سازی آغازگرها

آغازگرها به صورت لیوفیلیزه بودند که با افزودن مقادیر مشخص شده آب مقطر استریل توسط شرکت سازنده به مقدار ۱۰۰ پیکومولار رسانده شده و به عنوان محلول اصلی در نظر گرفته شد. در واکنش PCR از غلظت ۱ پیکومولار از آغازگرها استفاده شد.

۴-۱۳ واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش PCR بر روی محصول RT انجام گرفت. ابتدا برای دست یافتن به دمای Annealing مناسب، از تمامی آغازگرها PCR با گرادیانت دمایی از ۵۰-۶۱ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بدین صورت که در یک ویال استریل ۰/۵ میکرولیتری، مواد زیر به ترتیب اضافه گردید. ۲ میکرولیتر (10×) PCR Buffer، ۱۴/۸ میکرولیتر ddH₂O، ۰/۸ میکرولیتر MgCl₂، ۰/۴ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۰/۲ میکرولیتر Forward Primer (10 pM)، ۰/۲ میکرولیتر Reverse Primer (10 pM)، ۱ میکرولیتر Template (cDNA) اضافه شد و براساس برنامه، مرحله اول (باز شدن دو رشته) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم (باز شدن دو رشته) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و مدت ۴۰ ثانیه، مرحله سوم (سرد شدن و اتصال پرایمر) در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد و مدت ۴۰ ثانیه، مرحله چهارم (مرحله سنتز) دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مدت ۴۰ ثانیه و مرحله پنجم (مرحله تکثیر نهایی) دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مدت ۵ دقیقه واکنش زنجیره ای تکثیر برای بررسی ۵ ژن مورد نظر پس از به دست آوردن دمای بهینه، در ۳۰ سیکل بررسی شد. محصول PCR توسط ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

جدول ۳-۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های کاندیدا

نام ژن	Tm (°C)	توالی پرایمر 3'	5'	طول محصول
CAT	۵۸	CCCTGCCATAGTGGTTCCTGGT	TGGTGATTGTTGTGGTGAGCAC	۱۵۷
SOD	۵۶	AAGCCTTTGAAGAAGCCCAAG	CACAGTAGGTTAGCAGCCAACAAG	۲۳۷
MDAHR	۵۵	GTTGGAGAAGCAGTTGAAATTGG	CGACTGATAGTCACTGATAATCTGG	۲۶۰
APX	۵۲	GGACCGAGGAAGAGTATTCTC	CGCCCTTCTTTAGGAGATAC	۲۰۸
Rboh	۵۲	CAGGACCCACTGGTTACTAAGG	GTTTCCTCTTGTTCTTAACTCCA	۲۲۷
ACT	۶۸	AAGGCATGTCAACCAGCAAGT	GTTTCCTCTTGTTCTTAACTCCA	۱۹۰

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

افزایش موقت گونه‌های فعال اکسیژن در بافت برگ در مواجهه با پاتوژن بیماری‌زا پیشتر گزارش شده است. ما نیز در اینجا افزایش گونه‌های فعال را در ریشه گوجه فرنگی در برابر پاتوژن بیماری‌زای فوزاریوم به وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گزارش کرده‌ایم. همان طور که در فصل اول اشاره شد، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در طول تنش اکسایشی از اولین پاسخ‌های دفاعی القایی در پاسخ به آلودگی با پاتوژن می‌باشد. در این مطالعه در مرحله سه برگچه‌ای آلوده‌سازی گیاه لوبیا با باکتری بلایت معمولی و در گیاهان شاهد با آب انجام شد. پس از آن نمونه‌برداری از برگ در ۵ زمان پس از آلوده‌سازی انجام شد.

۵-۱ مایه زنی

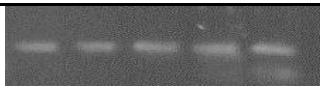
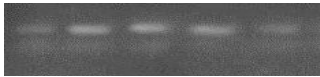
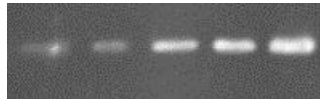
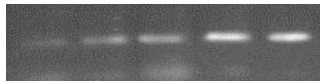
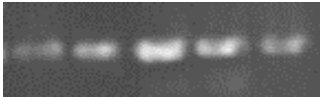
۳ روز پس از مایه زنی هایپرپلازی در محل آلودگی مشاهده شد و در روز هفتم پس از آلوده سازی لکه های سوخته به همراه هاله زرد رنگ تشکیل شد. این لکه ها در روز یازدهم پس از آلوده سازی گسترش یافت و در بعضی نقاط به هم متصل شدند. در برگ‌هایی که از تزریق آب به عنوان شاهد استفاده شد فقط زخم ناشی از خراش تزریق مشاهده شد و گسترش لکه در روزهای بعدی رخ نداد.

۵-۲ نتایج الگوی باندی RT-PCR

ژن همیشه بیان اکتین: طبق الگوی باندی حاصل از واکنش، بیان این ژن رفتار نسبتاً ثابتی داشته است. آنزیم NADPH اکسیداز ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش بیان معنی‌دار داشته و ۲۴ ساعت پس از مایه زنی به حداکثر بیان خود رسید و در ۴۸ و ۷۲ ساعت روند کاهشی آن مشاهده شد. افزایش بیان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ساعت ۲۴ معنی‌دار بوده و در ۷۲ ساعت کاهش آن مشاهده شد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز از ساعت ۱۲ تا ساعت ۷۲ افزایش بیان معنی‌دار داشته‌است. آنزیم کاتالاز در ساعت ۱۲ افزایش بیان معنی‌دار داشته و در ساعت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ بیان آن به طور معنی‌داری کاهش یافته است.



شکل ۴-۱: الف) مایه زنی از پشت برگ‌ها در ۳ یا ۴ محل بسته به اندازه برگ انجام شده است. ب) روز سوم پس از آلوده‌سازی هایپرپلازی رخ داده است. ج) روز هفتم پس از آلوده‌سازی و مشاهده نکروز (سوختگی) و کلروز (رنگ‌پریدگی، د) برگ کنترل با تزریق آب و فقط زخم ناشی از خراش ناشی از تزریق مشاهده می‌شود.

ژن	a	b	c	d	e	bp
اکتین						۱۹۰
NADPH اکسیداز						۲۷۷
کاتالاز						۱۵۷
سوپراکسید دیسموتاز						۳۲۷
مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز						۲۶۰
آسکوربات پراکسیداز						۲۰۸

شکل ۴-۲: الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۰ سیکل) با ۶ پرایمر بر روی ژل آگارز ۱ درصد، طول قطعه a، تیمار برگ ۶ ساعت پس از مایه زنی، b، تیمار برگ ۱۲ ساعت پس از مایه زنی، c، تیمار برگ ۲۴ ساعت پس از مایه زنی، d، تیمار برگ ۴۸ ساعت پس از مایه زنی، تیمار برگ ۷۲ ساعت پس از مایه زنی.

جدول ۴-۱: تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن NADPH Oxidase در گیاهان شاهد و آلوده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۰/۰۰۰۷۶	۲/۸ n.s
غلظت	۱	۰/۱۴۸۴	۵۴۶/۲۷**
خطای اول	۲	۰/۰۰۰۰۱	
زمان	۴	۰/۰۴۸۶	۱۷۹/۰۹**
غلظت × زمان	۴	۰/۰۲۰۹	۷۷/۰۷**
تکرار × زمان	۸	۰/۰۰۰۱۶	۰/۶۲ n.s
خطای دوم	۸	۰/۰۰۰۲۷	
ضریب تغییرات	۲,۶۲		

میزان بیان ژن NADPH Oxidase بین برگ آلوده با عامل بیماری و گیاه شاهد در سطح یک درصد معنی دار شد. همچنین اثر متقابل زمان در عامل بیماری در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۲-۳).

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح و عدم تلقیح (غلظت) در زمان‌های نمونه‌برداری بیان این ژن در گیاهان آلوده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر بیان خود رسید و پس از آن در ساعات ۴۸ و ۷۲ کاهش بیان مشاهده شد. تغییرات بیان این ژن در ساعات ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۱۲ نسبت به شاهد معنی دار بوده است. (شکل ۳-۳، الف).

این نتیجه نشان می‌دهد که افزایش میزان H_2O_2 در برگ آلوده به باکتری می‌تواند از استراتژی‌های دفاعی در برابر پاتوژن مهاجم باشد. چنانکه که در فصل اول گفته شد، این آنزیم منبع تولید مهم گونه‌های فعال اکسیژن سلول می‌باشد مسئول تولیدگونه‌های فعال اکسیژن را در پاسخ به آلودگی در آراییدوپسیس می‌باشد (دسیکان و همکاران، ۲۰۰۱).

جدول ۴-۲: تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن کاتالاز در گیاهان شاهد و آلوده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۰/۰۰۰۴۹	۳/۱۳n.s
غلظت	۱	۰/۰۸۰۰	۵۰۸/۴۷**
خطای اول	۲	۰/۰۰۰۲۵۴	
زمان	۴	۰/۰۱۳۴	۸۵/۲۷**
غلظت × زمان	۴	۰/۰۰۹۶	۶۷/۲۷**
تکرار × زمان	۸	۰/۰۰۰۱۴	۰/۹۴n.s
خطای دوم	۸	۰/۰۰۰۱۵	
ضریب تغییرات	۷,۱۴		

میزان بیان ژن کاتالاز بین برگ آلوده با عامل بیماری و گیاه شاهد در سطح یک درصد معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل زمان در عامل بیماری در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳-۳).

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح و عدم تلقیح (غلظت) در زمان‌های نمونه‌برداری، حداکثر بیان این ژن در ساعت ۱۲ مشاهده شد و پس از آن روند کاهش بیان آن آغاز شد. اگرچه بیان ژن مورد نظر، ساعات ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۱۲ تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۳-۳، ب).

طبق گزارش مندل و همکاران در ریشه گوجه فرنگی آلوده به فوزاریوم، این آنزیم در ریشه گوجه‌فرنگی آلوده با فوزاریوم فعالیت کاتالاز در ساعت ۲۴ به حداکثر بیان خود رسید و سپس روند کاهشی آن گزارش شده است.

جدول ۴-۳: تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان شاهد و آلوده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۰/۰۰۰۱۷	۰/۸۴ n.s
غلظت	۱	۰/۹۸۶۴	۴۷۵۳/۹۹**
خطای اول	۲	۰/۰۰۰۰۵	
زمان	۴	۰/۱۵۴۰	۷۴۲/۳۵**
غلظت × زمان	۴	۰/۱۷۶۲	۸۴۹/۳۷**
تکرار × زمان	۸	۰/۰۰۰۲۱	۱/۰۲ n.s
خطای دوم	۸	۰/۰۰۰۲	
ضریب تغییرات	۵,۴۸		

میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز بین برگ آلوده با عامل بیماری و گیاه شاهد در سطح یک درصد معنی دار شد. همچنین اثر متقابل زمان در عامل بیماری در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۴-۳).

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح و عدم تلقیح (غلظت) در زمان‌های نمونه‌برداری، روند افزایش بیان این ژن در گیاهان آلوده از ساعت ۱۲ آغاز و ۷۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر بیان خود رسیده است. همچنین بیان این ژن ساعات ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۳-۳، ج). آلوده‌سازی برگ‌های توت فرنگی با *Mycosphaerella fragariae* منجر به افزایش فعالیت SOD شده است و ۲ روز پس از آلوده‌سازی فعالیت این آنزیم به حداکثر رسیده است و پس از آن به آرامی کاهش یافته است (احسانی مقدم، ۲۰۰۶) طبق گزارش مندل و همکاران (۲۰۰۸) در ریشه گوجه-فرنگی آلوده به فوزاریوم افزایش بیان این آنزیم ۱۲ ساعت پس از آلوده‌سازی آغاز و تا ۴۸ ساعت پس از آن ادامه داشته و در ساعت ۷۲ تفاوت نسبت به ساعت ۴۸ مشاهده نشده است.

جدول ۴-۴: تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شاهد و آلوده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۰/۰۰۰۳۶	۰/۲۹n.s
غلظت	۱	۴/۱۳۶۶	۳۳۳۶/۰۱**
خطای اول	۲	۰/۰۰۰۱۷	
زمان	۴	۰/۷۲۴۰	۵۸۳/۹۲**
غلظت × زمان	۴	۰/۷۱۱۴	۵۷۳/۷۹**
تکرار × زمان	۸	۰/۰۰۰۱۸	۰/۱۵n.s
خطای دوم	۸	۰/۰۰۱۲	
ضریب تغییرات	۳,۳۹		

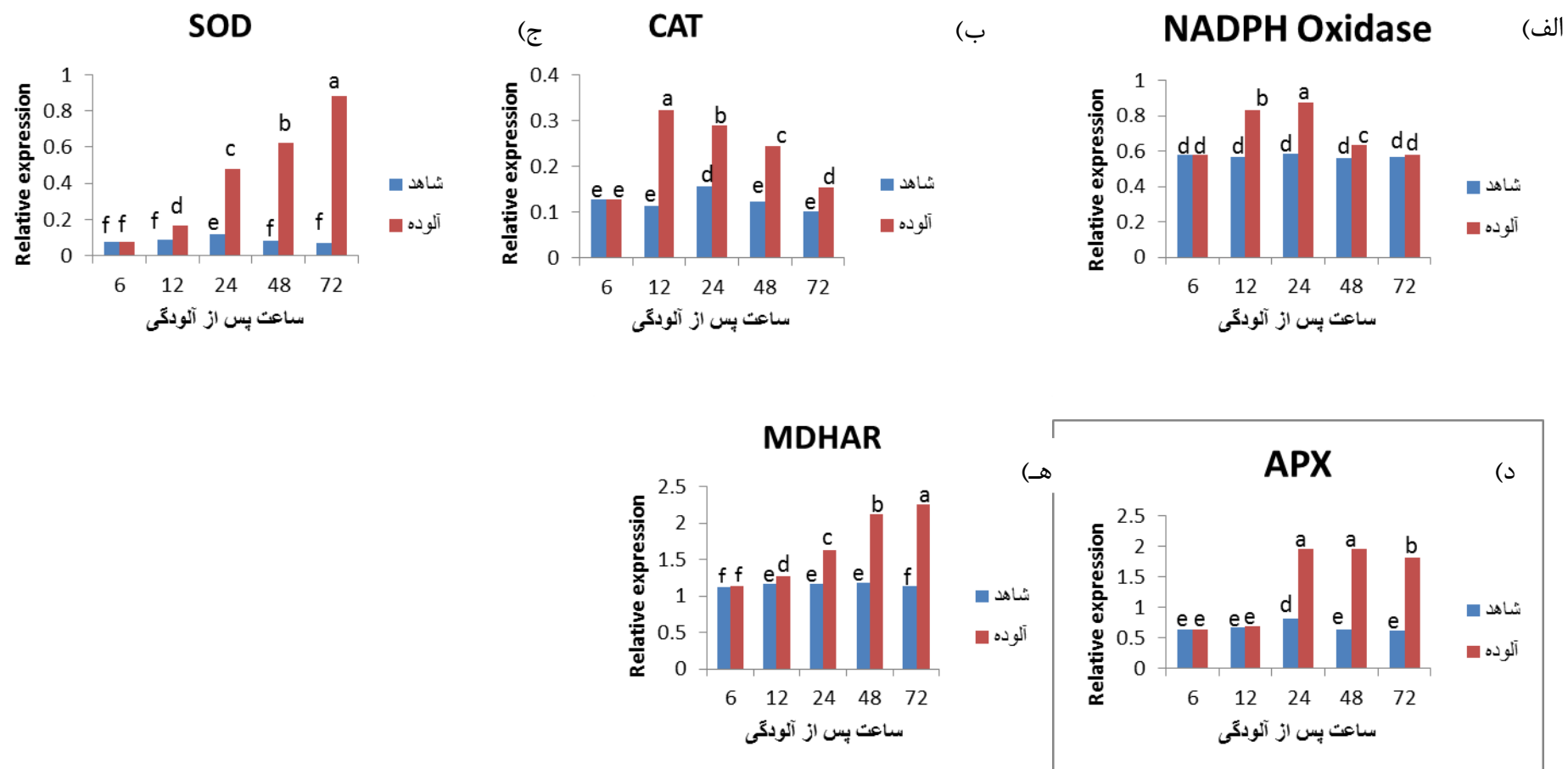
میزان بیان ژن کاتالاز بین برگ آلوده با عامل بیماری و گیاه شاهد در سطح یک درصد معنی دار شد. همچنین اثر متقابل زمان در عامل بیماری در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۳-۵).

بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح و عدم تلقیح (غلظت) در زمان‌های نمونه برداری بیان این ژن در گیاهان آلوده، ۷۲ روند افزایش بیان این ژن از ساعت ۲۴ آغاز و تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر بیان خود رسیده است. همچنین بیان این ژن ساعات ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۱۲ تغییرات معنی داری را نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۳-۳، د). آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه گوجه فرنگی آلوده با فوزاریوم با آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هماهنگ بوده و تا ۴۸ ساعت پس از آلوده سازی بیان آن افزایش یافته است.

جدول ۳-۵: تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز در گیاهان شاهد و آلوده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۲	۰/۰۰۱۸	۹۷,۹n.s
غلظت	۱	۲/۰۸۵۶	۵۳۳/۳**
خطای اول	۲	۰/۰۰۰۴۴	
زمان	۴	۰/۳۷۱۴	۲۰۵۴/۳۵**
غلظت × زمان	۴	۰/۳۶۱۹	۲۰۰۱/۴۵**
تکرار × زمان	۸	۰/۰۰۰۲۰	۱/۱۵n.s
خطای دوم	۸	۰/۰۰۰۱	
ضریب تغییرات	۹,۹۴		

میزان بیان ژن مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز بین برگ آلوده با عامل بیماری و گیاه شاهد در سطح یک درصد معنی دار شد. همچنین اثر متقابل زمان در عامل بیماری در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۳-۶). بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل تلقیح و عدم تلقیح (غلظت) در زمان‌های نمونه‌برداری بیان این ژن در گیاهان آلوده، روند افزایش بیان این ژن از ساعت ۱۲ آغاز و تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر بیان خود رسیده است. همچنین بیان این ژن ساعات ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ تغییرات معنی داری را نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۳-۳، ه).



شکل ۴-۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمار برگی در ۵ زن تنش اکسایشی در مقیاس زمان

پیشنهادهات:

۱. بررسی بیان دیگر ژن‌های خانواده ژن‌های تنش اکسیداتیو:

از آنجا که در این مطالعه به دلیل عدم بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای دیگر آنزیم‌های این خانواده‌های آنزیمی مورد مطالعه، به بررسی بیان دیگر ایزوآنزیم‌ها پرداخته نشده است، بنابراین نمی‌توان نظر قاطعی درباره ارتباط تغییر بیان آنزیم‌های رفتروبی با آنزیم تولید کننده گونه‌های فعال اکسیژن ارائه کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات تکمیلی بیان ایزوآنزیم‌های دیگر نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

۲. بررسی بیان ژن‌های تنش اکسیداتیو با Real Time PCR. از آنجا که این تکنیک میزان بیان ژن‌های مورد نظر را به صورت کمی ارائه می‌دهد، بنابراین انجام آن در مطالعات تکمیلی توصیه می‌شود.

فصل پنجم

منابع

اسفندیاری ع، شکیبا م، محبوب س، آلیاری ه، فیروز آبادی م. ۱۳۸۸. اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه های گندم. مجله دانش کشاورزی، جلد ۱۹، شماره ۲. ص ۱۳۸-۱۲۹.

لک، م. ر، شمس بخش، م و بهار م. ۱۳۸۱. شناسایی باکتری عامل سوختگی برگ و غلاف لوبیا در استان مرکزی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۶. شماره ۱.

Abo-Elyousr K. (2006) Induction of systemic acquired resistance against common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Egypt. J. Phytopathol 34, 41-50.

Akhavan A., Bahar M., Askarian H., Lak M.R., Nazemi A. & Zamani Z. (2013) Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. SpringerPlus 2, 1-9.

Allan A.C. & Fluhr R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. The Plant Cell Online 9, 1559-72.

Amirsadeghi S., Robson C.A. & Vanlerberghe G.C. (2007) The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiologia Plantarum* 129, 253-66.

Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-99.

Asada K. (2000) The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355, 1419-31.

Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391-6.

Astua-Monge G F.-A.J., Bacocina G, Roncoletta J, Carvalho SA, Machado MA (2005) Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 187, 1201-5.

- Barna B., Fodor J., Harrach B., Pogány M. & Király Z. (2012) The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 37-43.
- Bedard K. & Krause K.-H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87, 245-313.
- Blokhina O., Virolainen E. & Fagerstedt K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91, 179-94.
- Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C. & Minibayeva F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three- component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367-76.
- Bolwell G.P., Davies D.R., Gerrish C., Auh C.-K. & Murphy T.M. (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology* 116, 1379-85.
- Borad V. & Sriram S. (2008) Pathogenesis-related proteins for the plant protection. *Asian J. Exp. Sci* 22, 189-69.
- Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M. & Inzé D. (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO journal* 10, 1723.
- Bradford K. & Hsiao T. (1982) Physiological responses to moderate water stress. In: *Physiological plant ecology II* (pp. 263-324. Springer.
- Buchert F. & Forreiter C. (2010) Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF₁CF₀. *FEBS Lett* 584, 147-52.
- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry* 58, 79-110.
- Cadenas E. & Sies H. (1985) Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Advances in enzyme regulation* 23, 217-37.
- Collinge D. & Slusarenko A. (1987) Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9, 389-410.

Corpas F.J., Barroso J.B. & del Río L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in plant science* 6, 145-50.

Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D. & Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57, 779-95.

Dat J.F., Pellinen R., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjärvi J., Inzé D. & Van Breusegem F. (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal* 33, 621-32.

Desikan R., Soheila A.-H., Hancock J.T. & Neill S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127, 159-72.

Do H.M., Hong J.K., Jung H.W., Kim S.H., Ham J.H. & Hwang B.K. (2003) Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 196-205.

Doke N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* 23, 345-57.

Flores-Cruz Z. & Allen C. (2009) *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection. *Molecular plant-microbe interactions* 22, 773-82.

Fourie D., Herselman L. & Mienie C. (2011b) Improvement of common bacterial blight resistance in South African dry bean cultivar teebud. *African Crop Science Journal* 19, 377-86.

Foyer C.H. & Shigeoka S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155, 93-100.

Garg N. & Manchanda G. (2009) ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems* 143, 81-96.

Gill S.S. & Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-30.

Grant J.J. & Loake G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124, 21-30.

Hückelhoven R. & Kogel K.-H. (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216, 891-902.

Hueck C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews* 62, 379-433.

Jacques M.-A., Josi K., Darrasse A. & Samson R. (2005a) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and environmental microbiology* 71, 2008-15.

Jacques M.A., Josi K., Darrasse A. & Samson R. (2005b) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl Environ Microbiol* 71, 2008-15.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5:709–725

Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B. & Mullineaux P.M. (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Current opinion in plant biology* 6, 390-6.

Kim C., Meskauskienė R., Apel K. & Laloi C. (2008) No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO reports* 9, 435-9.

Knight H. & Knight M.R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6, 262-7.

Lak M., Shamsbakhsh M. & Bahar M. (2002) Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. *JWSS-Isfahan University of Technology* 6, 231-43.

Lamb C. & Dixon R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology* 48, 251-75.

Lambeth J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4, 181-9.

Leach J.E. & White F.F. (1996) Bacterial avirulence genes. Annual Review of Phytopathology 34, 153-79.

Lin, K., Lo, H., Lin, Ch. And Chan, T. (2007). Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene from eggplant under flooding stress. Botanical Studies, 48:25-34.

Liszkay A., Kenk B. & Schopfer P. (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. Planta 217, 658-67.

Lopez- Gonzalez M.A., Guerrero J.M., Rojas F. & Delgado F. (2000) Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. Journal of pineal research 28, 73-80.

Love AJ, Yun BW, Laval V, Loake GJ, Milner JJ.(2005). Cauliflower mosaic virus,a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. Plant Physiology 139:935–48

Luis Antonio P., Renato Rodrigues F., Antonio F., Marcos Antonio M. & Dagmar Ruth S.-M. Expression profile of oxidative and antioxidative stress enzymes based on ESTs approach of citrus. Sociedade Brasileira de Genética 30.

Lushchak V.I. (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology.153, 175-90.

Mandal S, Mitra A, Mallick N, (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between Solanum lycopersicum and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Physiol Mol Plant Pathology.72: 56-61.

Mano J., Takahashi M. & Asada K. (1987) Oxygen evolution from hydrogen peroxide in photosystem II: flash-induced catalytic activity of water-oxidizing photosystem II membranes. Biochemistry 26, 2495-501.

McCord J.M. & Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). Journal of Biological chemistry 244, 6049-55.

Mehdy MC. Active oxygen species in plant defense against pathogens.(1994). Plant

Physiologia 105:467–72.

Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M. (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 115: 393-400.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7, 405-10.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9, 490-8.

Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. & Van Breusegem F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science* 16, 300-9.

Montillet J.-L., Chamnongpol S., Rustérucci C., Dat J., Van De Cotte B., Agnel J.-P., Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F. & Triantaphylidès C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138, 1516-26.

Mou Z., Fan W. & Dong X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-44.

Pang C.-H. & Wang B.-S. (2008) Oxidative stress and salt tolerance in plants. In: *Progress in botany* (pp. 231-45. Springer.

Parker D., Beckmann M., Zubair H., Enot D.P., Caracul- Rios Z., Overy D.P., Snowden S., Talbot N.J. & Draper J. (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re- programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal* 59, 723-37.

Popov V. & Zvyagilskaya R. (2007) AN Bach—A revolutionary in politics and science (Commemorating the 150th anniversary of Academician AN Bach). *Biochemistry (Moscow)* 72, 1029-38.

Samuel M.A., Hall H., Krzymowska M., Drzewiecka K., Hennig J. & Ellis B.E. (2005) SIPK signaling controls multiple components of harpin- induced cell death in tobacco. *The*

Plant Journal 42, 406-16.

Sarowar S., Kim E.N., Kim Y.J., Ok S.H., Kim K.D., Hwang B.K. & Shin J.S. (2005) Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Science* 169, 55-63.

Shulaev, V. and D.J. Oliver.(2006). Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. *New Tools for Reactive Oxygen Species Research. Plant Physiology.* 141, 367-372.

Shi C., Navabi A. & Yu1 K. (2011) Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations. *BMC Plant Biology* 11, 52.

Sikka, S., M. Rajasekaran, and W.J. Hellstrom.(1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Androl.* 16, 464-468

Simon- Plas F., Elmayan T. & Blein J.P. (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal* 31, 137-47.

Smirnoff N. (1993) Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 27-58.

Starr M.P. & Stephens W.L. (1964) Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Journal of bacteriology* 87, 293-302.

Sumimoto H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox- family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS journal* 275, 3249-77.

Torres M.A. (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138, 414-29.

Torres M.A. & Dangl J.L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology* 8, 397-403.

Torres M.A., Dangl J.L. & Jones J.D. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 517-22.

Wang F-Z, Wang Q-B, Kwon S-K, Su W-S. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology* 162, 465–472.

Yaeno T., Matsuda O. & Iba K. (2004) Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *The Plant Journal* 40, 931-41.

Yoshioka H., Numata N., Nakajima K., Katou S., Kawakita K., Rowland O., Jones J.D. & Doke N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell Online* 15, 706-18.

Zamani Z., Bahar M., Jacques M.A., Lak M.R. & Akhavan A. (2011a) Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 2371-8.

Zamani Z., Bahar M., Jacques M.A.s., Lak M.R. & Akhavan A. (2011b) Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 2371-8.

Zanatta Z.G., Moura A.B., Maia L.C. & Santos A.S.d. (2007) Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 511-5.

Abstract:

Aerobic metabolisms, including photosynthesis and respiration, used to be considered as the sole sources of reactive oxygen species (ROS) generation. It is known for quite some time that plants actively produce these molecules, which may control many different physiological processes such as abiotic and biotic stress response, and systemic signaling. Common bacterial blight of bean caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap); is a severe and devastating disease in both temperate and tropical production zones. It causes yield losses by about 40%. Cellular responses of bean to Xap based on transcript analysis of enzymes involved in both ROS production and scavenging were analyzed. Inoculated leaves with Xap were used to study the transcript changes of the genes via RT-PCR. NADPH Oxidase and APX inclined significantly at 12 h post inoculation (hpi) followed by a sharp increase at 24 hpi. SOD and MDHAR was continuously rocketed. In contrast, CAT expression showed an enhancement at 12 hpi and a decrease at later stage .

Keywords: Oxidative stress, Bean bacterial blight, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, Antioxidative enzyme.



Shahrood university

Faculty of agriculture

M.Sc

**Study of the oxidative stress of common bacterial blight on
Phaseolous vulgaris**

Maryam Rashidifar

Supervisors:

Naser Farrokhi and Hossein Askari

September, 2014