

حوزه‌های ساختمانی، عمل و مهندسی ژنهای مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان

محمد رضا قنادها^۱، مهدی زهراوی^۲^۱ دانشگاه تهران، ^۲ بانک ژن گیاهی ملی ایران

چکیده

در گونه‌های گیاهی هزاران ژن مقاومت (R) در برابر عوامل بیماری و ویروسی، باکتریایی، قارچی و نماتدی وجود دارد. ظهور مقاومت دربرهم کنش میزبان و عامل بیماری مستلزم بیان ژن مقاومت (R) در میزبان و ژن غیربیماریزا (Avr) در عامل بیماری می‌باشد. باور براینست که ژنهای مقاومت گیاه را قادر می‌سازند که ژنهای غیربیماریزا را شناسایی کرده، فرآیند انتقال پیام را آغاز نموده و واکنش دفاعی را فعال سازند. رویدادهای انتقال پیام که منجر به ظهور مقاومت می‌شوند عبارتند از جریانه‌های یونی در عرض غشاء سلولی، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی، تغییر حالت فسفوریلاسیون، فعالیت رونویسی از سیستم‌های دفاعی گیاه و مرگ سریع سلولی در موضع آلودگی (واکنش فوق حساسیت). هرچند که پاسخ‌های دفاعی از سوی گیاه در تقابل با عوامل بیماری، متفاوت می‌باشند، اما خصوصیات مشترکی نیز بین آنها وجود دارد. مهمترین ویژگی ژنهای R اینست که این ژنها در گونه‌های مختلف گیاهی که سبب مقاومت اختصاصی در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری می‌شوند، اغلب پروتئین‌هایی با ساختمان مشابه را رمز می‌نمایند. ژنهای R همسانه شده به چهار گروه اصلی تقسیم می‌شوند. یکی از آسانترین، به‌صرفه‌ترین و از لحاظ زیست محیطی ایمن‌ترین راههای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از ارقام مقاوم است و به نژادگران بطور گسترده‌ای بطریقه کلاسیک از ژنهای مقاومت در این زمینه استفاده نموده‌اند. اکنون با دسترسی به ژنهای R همسانه شده، فرصتی برای انتقال ژنهای R جدید به گیاهان از طریق تراریختی ژنتیکی فراهم آمده است. تا زمانیکه این روش‌ها از لحاظ قابلیت اعتماد، انعطاف‌پذیری و هزینه با روشهای اصلاح نباتات کلاسیک قابل مقایسه نباشند و یا برتری نداشته باشند، نمی‌توان انتظار داشت که بطور گسترده مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به ظرفیت قوی این روش‌ها در عبور از موانعی همچون تفاوت گونه‌ای و صف آرای ژنهای R به فرم دلخواه، بنظر می‌رسد که تراریختی در آینده‌ای نزدیک در برنامه‌های اصلاحی وارد شود.

ارتباط بین گیاه و عامل بیماری و اساس ژنتیکی دفاع گیاهی

عوامل بیماری در تهاجم به گیاهان یکی از سه راهبرد ذیل را برمی‌گزینند؛ نکروتروفی^۱، بیوتروفی^۲ و یا همی بیوتروفی^۳. نکروتروفها ابتدا سلول میزبان را می‌کشند و سپس محتوای آن را متابولیزه می‌کنند، برخی از این عوامل بیماری دامنه میزبانی گسترده‌ای را دربرمی‌گیرند و مرگ سلولی اغلب توسط سموم و یا آنزیم‌هایی رخ می‌دهد که سوبسترای بخصوصی را مورد هدف قرار می‌دهند. *Botrytis* و *Pythium* نمونه‌هایی از نکروتروفهای قارچی هستند. سایر نکروتروفها سمومی تولید می‌کنند که میزبان گزینشی^۴ دارند، بطوریکه این سموم فقط روی دامنه محدودی از میزبانهای گیاهی مؤثر می‌باشند. در مورد این گروه از عوامل بیماری، مقاومت گیاهی از طریق حذف و یا تغییر ترکیب مورد هدف سم و یا از طریق سم‌زدایی قابل حصول است. به عنوان مثال ژن *Hm1* در ذرت سبب مقاومت به قارچ لکه برگ‌گی *Cochiobolus carbonum* می‌شود. *Hm1* یک آنزیم ردوکتاز را کد می‌کند که سم HC^۵ حاصل از *C.carbonum* را خنثی می‌سازد.

عوامل بیماری بیوتروف و همی بیوتروف به سلول‌های زنده حمله می‌کنند و سوخت و ساز سلولی را در جهت رشد و تکثیر خود تغییر می‌دهند. تشکیل اشکالی بصورت جزایر سبز رنگ روی برگهای پیر در پیرامون آلودگی بیوتروفی مربوط به قارچهای زنگ و سفیدک پودری نشاندهنده اهمیت زنده نگهداشتن سلولهای میزبان در طی ارتباط نزدیک بین عامل بیماری و گیاه است. بیوتروفها تنها روی یک و یا تعداد محدودی از گونه‌های مربوط بیماری ایجاد می‌نمایند. در مقابل، قارچهای همی بیوتروف از قبیل جنس‌های *Phytophthora* و *Colletotrichum* در مراحل بعدی آلودگی، سلولهای پیرامون را در میزبان می‌کشند. به علت طبیعت اختصاصی عمل کردن عوامل بیماری بیوتروف و همی بیوتروف تعجب آور نیست که تغییر کوچک در هر یک از طرفین (میزبان یا عامل بیماری) سبب برهم خوردن تعادل گردد. ناسازگاری بین عامل بیماری و میزبان اغلب منجر به فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه از قبیل مرگ موضعی سلول میزبان یا واکنش فوق حساسیت (HR) می‌شود.

¹ Necrotrophy² Biotrophy³ Hemibiotrophy⁴ Host-selective toxin⁵ HC-toxin

فرضیه ژن در برابر ژن

در گونه‌های گیاهی هزاران ژن مقاومت (R) در برابر عوامل بیماری ویروسی، باکتریایی، قارچی و نماتدی وجود دارد. هرچند که پاسخ‌های دفاعی از سوی گیاه در تقابل با عوامل بیماری، متفاوت می‌باشند، اما خصوصیات مشترکی نیز بین آنها وجود دارد که مهمترین آنها اینست که عمل ژنهای R به ژنوتیپ عامل بیماری بستگی دارد. عوامل بیماری بطور بالقوه دارای توانایی ایجاد پیامهای گوناگون می‌باشند که بنحوی مشابه تولید آنتی‌ژنها توسط عوامل بیماری پستانداران می‌باشد. برخی از این پیامها توسط بعضی از گیاهان شناسایی می‌شوند. اگر ژن مربوط به بیماری در عامل بیماری پیامی را ایجاد کند که منجر به القاء یک پاسخ دفاعی قوی از سوی ژن R در گیاه گردد در آنصورت به آن ژن غیربیماریزا^۱ (*Avr*) گویند. اما باید توجه داشت که در صورت عدم وجود ژن R در میزبان، ژن *Avr* سبب ایجاد بیماری خواهد شد. عمل اختصاصی ژنهای R در میزبان در برابر ژنهای *Avr* در عامل بیماری نخستین بار توسط فلور کشف شد و متعاقب آن واژه مقاومت ژن در برابر ژن^۲ مطرح گردید. فلور پیشنهاد کرد در گیاه ژنی وجود دارد که در هنگام مواجه با عامل بیماری، پاسخ دفاعی را القاء می‌نماید. اگر این ژن غایب و یا غیرفعال باشد، گیاه نسبت به تهاجم عامل بیماری حساس خواهد بود. اما، ژنهای مقاومت فقط در برابر انواع مشخصی از نژادهای عامل بیماری مؤثر می‌باشند. بنابراین عامل بیماری بایستی دارای ژنی باشد که محصول آن بطور مستقیم و یا غیرمستقیم با فرآورده ژن مقاومت گیاهی برهم‌کنش نشان دهد که این ژنها در عامل بیماری به عنوان ژنهای غیربیماریزا (*Avr*) نامیده شدند، زیرا وجود آنها مانع توسعه عامل بیماری در حضور ژن مقاومت می‌شود. از اینرو گیاهی که دارای یک ژن مقاومت مخصوص باشد فقط در برابر نژادی از عامل بیماری مقاومت نشان می‌دهد که واجد ژن معینی باشد که فرآورده آن باعث برهم‌کنش پاسخ دفاعی شود. اگر عامل بیماری فاقد ژن غیربیماریزایی مناسب باشد، آنگاه هیچگونه پاسخ دفاعی در گیاه رخ نخواهد داد و حتی علیرغم حضور ژنهای مقاومت بالقوه، عامل بیماری گسترش خواهد یافت. مفاهیم ژن مقاومت در گیاه و ژن غیربیماریزایی در عامل بیماری و در نتیجه پاسخ مقاومت، اساس فرضیه ژن در برابر ژن را تشکیل می‌دهد. فرضیه ژن در برابر ژن مکانیسمی را پیشنهاد می‌نماید که فرآورده ژن مقاومت در گیاه از طریق برهم‌کنش با فرآورده ژن غیربیماریزا به حضور آن پی می‌برد. بعلاوه ژن مقاومت باید دارای توانایی انتقال پیام^۳ ناشی از این مکانیسم شناسایی به سیستم دفاعی گیاه باشد که این امر احتمالاً از طریق یک مکانیسم پیام‌رسانی صورت گرفته و منجر به بیان ژنهایی می‌شود که مانع رشد و گسترش عامل بیماری در بافت‌های آلوده می‌شود.

¹ Avirulence² Gene-for-gene relationship³ Signal transduction

مدل ژن در برابر ژن برای اکثر عوامل بیماری بیوتروف از جمله قارچها، ویروسها، باکتری‌ها و نماتدها صدق می‌کند. اعتقاد براینست که خاستگاه هر گونه گیاهی جایی است که در آن بیشترین تنوع ژنتیکی موجود بوده و از اینرو گیاهان همراه با عوامل بیماری تکامل پیدا کرده‌اند. براین اساس برنامه‌های اصلاحی می‌تواند به سمت شناسایی ژرم پلاسما مقاوم در خویشاوندان وحشی گونه‌های زراعی سوق پیدا نماید. به غیر از مدل فلور، چندین مدل ژن در برابر ژن ارائه گردیده است و با ایجاد لاینهای ایزوژن مقاوم و حساس می‌توان تفاوت‌های آزمایشی ناشی از تغییر زمینه ژنتیکی را به حداقل رساند. با استفاده از این گونه برهم‌کنش‌ها اولین ژنهای R و Avr از *Arabidopsis thaliana* جداسازی شد. این گیاه در طی سالهای گذشته به عنوان یک سیستم مدل بنحویستدردهای برای مطالعه برهم‌کنش گیاه-عامل بیماری مورد استفاده قرار گرفته است.

هنگامی که یک ژن Avr و یک ژن R مختص به آن تظاهر می‌یابند پاسخ دفاعی قوی در گیاه القاء می‌شود. وجه مشخصه اکثر برهم‌کنش‌های ژن در برابر ژن، ظهور پاسخ فوق حساسیت (HR) است که در آن سلولهای واقع در مجاورت عامل بیماری دچار مرگ برنامه‌ریزی شده^۱ می‌شوند. این واکنش به عنوان بخشی از پاسخ دفاعی کلی محسوب می‌شود. ویژگی‌های دیگر پاسخ مقاومت عبارتند از تولید متابولیت‌های ضد میکروبی (تحت عنوان فیتوآلکسین‌ها^۲)، تولید آنزیم‌هایی که می‌توانند برای عامل بیماری مضر باشد (مانند کیتینازها^۳ و گلوکانازها^۴) و تقویت دیواره سلولی گیاهی در ناحیه آلوده شده. علاوه بر این پاسخ‌هایی نیز بروز می‌یابند که گمان می‌رود در انتقال پیام دفاعی نقش دارند که از آن جمله می‌توان به جریان Ca^{2+} و سایر جریان‌های یونی، تغییر فسفوریلاسیون پروتئین‌ها، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی^۵ از قبیل سوپراکسیداز و تولید یا آزادسازی اسید سالیسیلیک^۶ اشاره نمود.

باید توجه داشت که بسیاری از پاسخ‌های بیوشیمیایی فوق‌الذکر در غیاب برهم‌کنش ژن در برابر ژن و در برهم‌کنشی که طی آن بیماری توسعه می‌یابد، نیز القاء می‌شوند. پاسخ‌هایی از قبیل بیان کیتیناز و بیوسنتز فیتوآلکسین، نرخ رشد عامل بیماری را کاهش می‌دهند ولی آنرا متوقف نمی‌سازند. برعکس، ژنهای R سبب فعال شدن دامنه وسیعی از پاسخ‌های دفاعی شده و در نتیجه موجب مقاومت مؤثر در برابر عامل بیماری می‌شوند. الیستورهای نژاد-اختصاصی^۷ در اثر بیان ژنهای Avr تولید می‌شوند که باید

¹ Programmed cell death

² Phytoalexin

³ Chitinase

⁴ Glucanase

⁵ Reactive oxygen species

⁶ Salicylic acid

⁷ Race-specific elicitor

بین اینها و الیستورهای نژاد-غیراختصاصی^۱ تمایز قائل شد. الیستورهای نژاد-غیراختصاصی، پاسخ‌هایی از قبیل سنتز فیتوآلکسین‌ها را القاء می‌کنند که بیماری را به حداقل می‌رسانند، اما اینگونه الیستورها در گروه متمایز و متفاوتی از الیستورهای ناشی از ژنهای *Avr* قرار می‌گیرند که سبب القاء پاسخ دفاعی از سوی ژنهای *R* می‌شوند.

جداسازی ژنهای مقاومت

سؤال اینست که ژنهای *R* چه چیزی را رمز می‌کنند؟ بیش از بیست سال پیش یک مدل الیستور-گیرنده برای توجیه برهم‌کنش ژن مقاومت در مقابل ژن *Avr* مطرح شد که در آن ژنهای *Avr* الیستورهایی را رمز می‌کنند که به عنوان لیگاند^۲ برای گیرنده‌هایی^۳ که توسط ژنهای *R* رمز می‌شوند عمل می‌نمایند. این مدل در برخی حالات می‌تواند معتبر باشد ولی نتوانست سبب تسهیل در امر جداسازی ژنهای مقاومت و یا فرآورده‌های آنها شود. موفقیت در جداسازی ژنهای مقاومت موکول شد به زمانی که تکنولوژی همسانه‌سازی ژنهای گیاهی توسعه یافت. شناسایی عناصر متحرک در ذرت در این زمینه بسیار نوید بخش می‌نمود، اما نرخ بالای جهش خودبخودی در ژنهای *R* مورد نظر مانند *Rpl* در ذرت باعث شد که این امید عقیم گذارده شود. اما تلاش در این زمینه مقدمات آشنایی با جهش‌پذیری ژنهای *R* و اهمیت بیولوژیکی آن در ایجاد مقاومت‌های اختصاصی جدید را بنیان نهاد.

اولین ژن *R* که همسانه گردید، *Hm1* در ذرت بود که از لحاظ عمل متفاوت از گروه ژنهای *R* مربوط به *Avr* می‌باشد. *Hm1* سبب ایجاد مقاومت در برابر نژاد شماره یک عامل بیماری قارچی *Cochliobolus carbonum* می‌شود. *Hm1* یک ردوکتاز وابسته به NADPH^۴ را کد می‌کند که قادر است سم قدرتمند تولید شده توسط قارچ مذکور را خنثی نماید. ساختمان و عمل *Hm1* بنحوی است که نمی‌توان آن را در زمره ژنهای *R* قلمداد نمود زیرا نقش سم‌زدایی^۵ *Hm1* در مواردی همچون ژنهای *Avr*، القاء مرگ سلولی فوق حساسیت و سایر ویژگی‌های مربوط به برهم‌کنش ژن در برابر ژن نمی‌گنجد.

با پیشرفت تکنولوژی‌های همسانه‌سازی موضعی^۶ (گام‌زنی کروموزمی^۷) و نشانمند کردن ترانسپوزون هترولوگ^۱، جداسازی ژنهای مقاومت امکان‌پذیر شد و موفقیت‌هایی در این زمینه بدست آمد. فهرستی

¹ Race non-specific elicitor

² Ligand

³ Receptor

⁴ NADPH-dependent reductase

⁵ Toxin-degrading

⁶ Positional cloning

⁷ Chromosome walking

از ژنهای جداسازی شده در جدول ۱ ارائه گردیده است. اولین ژن اختصاصی در گیاه (برای Avr) که جداسازی شد ژن *Pto* بود که سبب مقاومت گوجه فرنگی به *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* می‌شود. این ژن پروتئینی را رمز می‌نماید که شبیه پروتئین‌های کینازی سرین-ترئونین^۱ می‌باشد. نکته جالب اینکه پنج ژن R که پس از *Pto* جداسازی شدند، شباهت زیادی به یکدیگر داشتند ولی شبیه *Pto* نبودند. این ژنها عبارتند از: *RPS2* در آرابیدوپسیس، *N* در تنباکو، *L6* در کتان، و *Cf-9* و *Prf* در گوجه فرنگی که گروه جدیدی را تشکیل دادند. پروتئین‌های رمز شده توسط این گروه جدید دارای حوزه تکرارهای غنی از لوسین^۲ (LRR) هستند. سپس ژنهای *RPM1* در آرابیدوپسیس، *Cf-2* در گوجه فرنگی و *Xa21* در برنج نیز جداسازی شده و مشخص گردید که پروتئین‌هایی با حوزه LRR را رمز می‌کنند (جدول ۱). با استفاده از تجزیه توالی‌ها برخی ویژگی‌های ساختمانی (علاوه بر LRR) مشخص گردیده، اما با جداسازی و تعیین خصوصیات هر ژن R جدید بر پیچیدگی این ویژگی‌های ساختمانی افزوده شده است. اولین و مهمترین ویژگی اینست که ژنهای R در انواع متنوع گونه‌های گیاهی که در برابر دامنه وسیعی از عوامل بیماری ویروسی، باکتریایی و قارچی بطور اختصاصی عمل می‌کنند، پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که شباهت ساختمانی دارند. این شباهت نشاندهنده اینست که مسیرهای بیوشیمیایی مورد استفاده در گیاهان برای ایجاد پاسخ‌های دفاعی از نقطه نظر تکاملی از درجه بالایی حفاظت بالایی برخوردار می‌باشند (بسیار حفاظت شده هستند).

حوزه‌های ساختمانی فرآورده‌های ژنهای مقاومت

الف) کینازهای سرین-ترئونین

با همسانه سازی و تعیین خصوصیت ژن *Pto*، نقش کینازها در انتقال پیام طی مقاومت ژن در برابر ژن مشخص گردید. یکی از مکانیسم‌هایی که در موجودات زنده برای کنترل فعالیت پروتئین‌ها بسیار معمول است تغییر حالت فسفوریلاسیون^۳ می‌باشد که بطور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. تاکنون ۱۱ حوزه فرعی و ۱۵ واحد اسید آمینه غیرمتغیر (ثابت) مربوط به پروتئین‌های کینازی مشخص شده و نواحی محفوظ کینازها که واحدهای سرین-ترئونین را فسفوریله می‌نمایند تعیین گردیده است. توالی اسید آمینه بدست آمده از ژن *Pto* دارای نواحی حفاظت شده مذکور است و مشخص شده است که *Pto* در شرایط درون شیشه‌ای^۴، فعالیت کاتالیتیکی مربوط به پروتئین‌های کینازی را ظاهر می‌سازد.

¹ Heterologous transposon tagging

² Serine-threonine protein kinase

³ Leucine-rich repeat

⁴ Phosphorylation

⁵ *in vitro*

توالی اسید آمینه‌ای *Pto* در انتهای N دارای یک جایگاه بالقوه برای مریستولاسیون^۱ است که یک لنگر غشائی را برای این پروتئین آب دوست^۲ ایجاد می‌نماید.

تکرارهای غنی از لوسین

LRRها تکرارهای متوالی و چندگانه‌ای با طول حدود ۲۴ اسید آمینه می‌باشند. LRRها شامل لوسین و یا سایر اسیدهای آمینه آب‌گریز^۳ هستند که به فواصل منظم واقع شده‌اند و همچنین دارای اسید آمینه پرولین و آسپاراژین به فواصل منظم می‌باشند. ساختمان کریستالی یکی از پروتئین‌های دارای LRR، به نام مهارکننده *Porcin Rnase*، تعیین گردیده است. ساختمان سوم این پروتئین شبیه مشت دست یا فنر پیچ خورده است که هریک از انگشتان جمع شده در حکم یک LRR منفرد می‌باشد. این تکرارها در پروتئین مهارکننده *Porcin Rnase* بطور غیرطبیعی طویل می‌باشند (هر یک ۲۸ تا ۲۹ اسید آمینه) اما چنین تصور می‌شود که حوزه‌های LRR کوتاه‌تر، ساختمانی شبیه زنجیره مارپیچی بتأ^۴ داشته باشند. در هر دو حالت بنظر می‌رسد که عمل اختصاصی LRR بیشتر به اسید آمینه‌های بیرونی و کمتر به واحدهایی که آب‌گریز بوده متکی باشد. در بسیاری از توالی‌های LRR که تاکنون شناسایی شده‌اند، نحوه قرار گرفتن تکرارها با هم همخوانی ندارد، یعنی نمی‌توان به یک LRR مورد توافق دست یافت و در برخی حالات، این افتراق^۵ به حدی است که نمی‌توان LRR مربوطه را واجد ساختمان منظم دانست. علاوه بر این نواحی LRR مفروض در برخی از ژنهای R توسط توالی کوتاهی از اسیدهای آمینه به دو نیم تقسیم شده است و تشکیل ساختمان LRR را غیر ممکن می‌سازد.

مشخص شده است که حوزه‌های LRR در پروتئین‌های مخمر، مگس سرکه، انسان و سایر گونه‌ها در برهم‌کنش پروتئین-پروتئین نقش دارند. بطور مثال می‌توان به برهم‌کنش بین آنزیم و مهارکننده آنزیم (مانند *Rnase* و مهارکننده *Rnase*)، برهم‌کنش بین اجزاء درون سلولی آبشار انتقال پیام (مانند برهم‌کنش بین *ras* و *adenylate cyclase* در مخمر) و پیوند بین هورمونهای پپتیدی و گیرنده‌های غشائی (مانند گیرنده‌های *gonadotropin* و هورمونهای تحریک کننده فولیکول^۶) اشاره نمود.

گیرنده‌های هورمونی مثال جالبی در رابطه با مدل الیستور-گیرنده در مقاومت ژن در برابر ژن می‌باشند و این فرض که LRR به عنوان حوزه اتصال فرآورده ژنهای R با لیگاند عمل می‌کند را تقویت می‌کند. LRRها همچنین در کنش فرآورده‌های ژنهای R با سایر پروتئین‌هایی که در انتقال پیام دفاعی

^۱ Myristoylation

^۲ Hydrophilic

^۳ Hydrophobic

^۴ β -helical array

^۵ Degeneracy

^۶ Follicle

شرکت می‌کنند نقش دارند. از آنجا که فرآورده‌های ژنهای از نوع LRR را می‌توان به چند گروه مجزا تفکیک نمود تعجب آور نخواهد بود که در این گروه‌ها پروتئین‌هایی را بیابیم که از لحاظ عمل کاملاً از یکدیگر متمایز باشند.

اهمیت حوزه‌های LRR در مقاومت از اینجا نشأت می‌گیرد که دیده می‌شود این حوزه‌ها در برخی از ژنهای R، حفاظت شده می‌باشند و بعنوان مثال آللهای موتانت RPS2 و RPM1 فقط به علت تغییر در یک اسید آمینه در ناحیه LRR غیرفعال می‌گردند.

مکانهای اتصال نوکلئوتیدها^۱

توالی‌های اسید آمینه‌ای رمز شده توسط بسیاری از ژنهای LRR، با مکانهای اتصال نوکلئوتیدها (NBS) نیز شباهت نشان می‌دهند (NBSها به نام حلقه‌های P^۲ نیز نامیده می‌شوند). حوزه‌های NBS در بسیاری از پروتئین‌ها با قابلیت اتصال به ATP و GTP مانند زیرواحدهای β مربوط به ATP Synthase، پروتئین‌های ras، عوامل بسط ریبوزومی^۳ و کینازهای adenylylate دیده می‌شوند. ساختمان و عمل حوزه‌های NBS در سایر پروتئین‌ها حتی بیش از LRRها مورد مطالعه قرار گرفته است. این مطالعات شامل تعیین ساختمان کریستالی، تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، کنش پروتئین-لیگاند و تجزیه کینتیکی^۴ پروتئین‌هایی که در یک اسید آمینه از حوزه NBS آنها جایگزینی رخ داده است، می‌باشد. NBS مورد توافق (مشترک)^۵ برخی از پروتئین‌ها بقدری جامع است که نه تنها حلقه P را در بر می‌گیرد (توالی مورد توافق GXXXXGK[T/S]) بلکه حوزه‌های کیناز ۲ و کیناز ۳ که دورتر واقع هستند را نیز در بر می‌گیرد.

وجود حوزه‌های بسیار حفاظت شده NBS در فرآورده برخی از ژنهای R نشان می‌دهد که اتصال نوکلئوتید تری فسفات برای عمل این پروتئین‌ها الزامی است. مشخص شده است که جهش‌های اختصاصی^۶ که واحدهای کلیدی در NBS را تغییر می‌دهند، سبب عدم رویداد واکنش HR توسط ژن RPS2 در آرابیدوپسیس می‌شوند.

اما نقش حوزه‌های NBS در فعال سازی مکانیسم دفاع گیاهی هنوز نامشخص است. بنابراین چالش اصلی در آینده عبارتست از مستند ساختن فرآیند اتصال نوکلئوتید تری فسفات و هیدرولیز احتمالی و مشخص نمودن نقش این فرآیندها در فعالیت فرآورده‌های ژنهای R. به عنوان مثال اتصال

^۱ Nucleotide binding sites

^۲ P-loop

^۳ Ribosomal elongation factor

^۴ Kinetic analysis

^۵ Consensus

^۶ site specific

نوکلئوتید تری فسفات ممکن است باعث تغییر در برهم کنش بین فرآورده ژن R و سایر اعضای دخیل در آبشار انتقال پیام دفاعی^۱ شود. با توجه به انبوه اطلاعات موجود پیرامون حوزه‌های NBS در سایر پروتئین‌ها می‌توان پیشرفت قابل ملاحظه‌ای را در این زمینه انتظار داشت.

لوسین زیپرها^۲

در درون گروه LRR از ژنهای R گروه فرعی دیگری قرار دارد که لوسین‌زیپر (LZ) نامیده می‌شوند. سه ژن *RPM1*، *RPS2* و *Prf* که مسئول مقاومت در برابر *P.syringae* می‌باشند همگی توالی‌هایی را رمز می‌کنند که دارای ناحیه لوسین‌زیپر بین انتهای N و حوزه‌های NBS و LRR می‌باشند (جدول ۱). لوسین‌زیپرها دارای توالی‌های تکراری ۷ واحدی (با توالی مورد توافق XXXYXXL، که Y نشاندهنده واحدهای آب‌گریز) می‌باشند. این توالی‌ها در سایر پروتئین‌ها ساختمان چنبره‌ای^۳ تشکیل می‌دهند و برهم‌کنش پروتئین-پروتئین را میسر می‌سازند. LZها بنا به نقشی که در همو- و هتروداایمریزاسیون^۴ عوامل رونویسی در یوکاریوتها دارند، مشهور می‌باشند که از آن جمله می‌توان میوزین‌ها^۵ و زیرواحدهای β و γ از پروتئین G را نام برد. در مورد این گروه نیز مطالعات زیادی روی سایر پروتئین‌ها به منظور تعیین خصوصیات ساختمانی و عملکردی از قبیل تعیین ساختمان کریستالی صورت گرفته است، با اینحال، در اینجا نیز اطلاعات ما پیرامون نقش این نواحی در عمل ژنهای R محدود است. تحقیقات در حال انجام است تا معلوم شود که آیا فرآورده‌های ژنهای R قابل دایمریزاسیون هستند و یا خیر تا پس از آن سایر پروتئین‌هایی که ممکن است با فرآورده‌های ژنهای R از طریق نواحی LZ کنش نشان دهند، ردیابی شوند.

¹ DeFense Signal transduction cascade

² Leucin Zippers

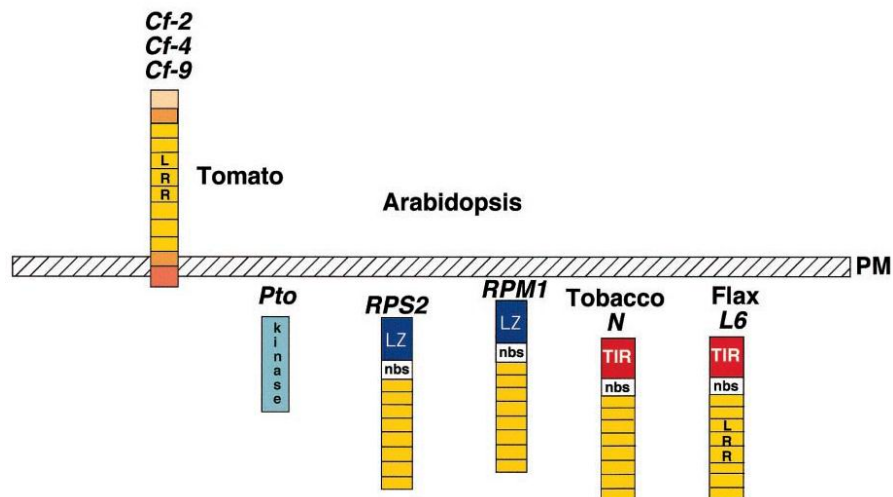
³ Coil-coil

⁴ Homo- and heterodimerization

⁵ Myosins

جدول ۱- ژنهای همسانه شده مقاومت به بیماری در گیاهان

گروه	ژن R	گیاه	عامل بیماری	ژن avr	تیپ آلودگی/اندام مورد تهاجم	ویژگی پیش بینی شده برای پروتئین مقاومت
۱	Hm 1	ذرت	<i>Helminothosporium maydis</i>	-	نکروتروف قارچی/ برگ	آنزیم سم زدا (HC-toxin reductase)
۲	Pto	گوجه فرنگی	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	avrPto	باکتری خارج سلولی/ برگ	پروتئین کینازی سرین-ترونین داخل سلولی
۳a	RPS2	آرابیدوپسیس	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	avrRpt2	باکتری خارج سلولی/ برگ	LZ/NBS/ LRR
	RPM1	آرابیدوپسیس	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>maculicola</i>	avrRpm1 و avrB	باکتری خارج سلولی/ برگ	LZ/NBS/ LRR
	I ₂	گوجه فرنگی	<i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>lycopersicon</i>	-	قارچ نکروتروف/ ریشه و بافت آوندی	LZ/NBS/ LRR
۳b	N	توتون	ویروس موزائیک توتون	-	برگ و آوند آبکش	Toll/NBS/ LRR
	L6	کتان	<i>Melampsora lini</i>	AL6	قارچ بیوتروف زنگ با هیف/ برگ	Toll/NBS/ LRR
	M	کتان	<i>Melampsora lini</i>	AM	بیوتروف با هیف/ برگ	Toll/NBS/ LRR
	RPP5	آرابیدوپسیس	<i>Peronospora parasitica</i>	-	سفیدک دروغی با هیف/ برگ	Toll/NBS/ LRR
۴	Cf-9	گوجه فرنگی	<i>Cladosporium fulvum</i>	avr9	قارچ بیوتروف خارج سلولی بدون هیف/ برگ	LRR
	Cf-2	گوجه فرنگی	<i>Cladosporium fulvum</i>	avr2	قارچ بیوتروف خارج سلولی بدون هیف/ برگ	LRR
	Cf-4	گوجه فرنگی	<i>Cladosporium fulvum</i>	avr4	قارچ بیوتروف خارج سلولی بدون هیف/ برگ	LRR
	Cf-5	گوجه فرنگی	<i>Cladosporium fulvum</i>	avr5	قارچ بیوتروف خارج سلولی بدون هیف/ برگ	LRR
۵	Xa2 1	برنج	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>oryzae</i>	-	باکتری خارج سلولی/ برگ	LRR/پروتئین کینازی



شکل ۱- حوزه‌های ساختمانی پروتئین‌های رمز شده توسط ژنهای مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان و پیش‌بینی محل استقرار آنها

ه) حوزه مشابه گیرنده‌های Toll/Interleukin-1

گروه فرعی دیگری در درون گروه NBS-LRR از ژنهای R قرار دارد و ژنهای این گروه حوزه بزرگی را در انتهای N رمز می‌کنند که شبیه حوزه پیام‌رسانی سیتوپلاسمی پروتئین Toll در مگس سرکه و گیرنده‌های Interleukin-1 در پستانداران می‌باشد. ژنهای N، L6 و RPP5 در این زیرگروه قرار می‌گیرند. علاوه بر شباهت بین توالی‌های N، L6، Toll و IL-IR، مسیرهای بیوشیمیایی که توسط آنها کنترل می‌شود، نیز مشابه می‌باشند. به عنوان مثال IL-IR نسبت به سیتوکین IL-1 واکنش نشان می‌دهد و باعث می‌شود که عامل رونویسی خانواده Rel به نام NF- κ B فعال شود و NF- κ B نیز به نوبه خود در تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی نقش دارد. در پاسخ دفاعی ژن در برابر ژن نیز انفجار اکسیداتیو^۱ بطور وسیعی مشاهده می‌شود. بعلاوه فعالیت NF- κ B تحت تأثیر ترکیبات اسید سالیسیلیک مانند آسپیرین^۲ می‌باشد و اسید سالیسیلیک مولکول پیام‌رسانی پائین دست^۳ مهمی در پاسخ دفاعی گیاه می‌باشد. Dif (یکی دیگر از عوامل رونویسی مربوط به Rel و NF- κ B هر دو در پاسخ ضد میکروبی^۴ میزبان نقش

^۱ Oxidative burst

^۲ Aspirin

^۳ Downstream

^۴ Antimicrobial

دارند. و در پایان اینکه قابلیت *Toll* در آزادسازی عامل رونویسی *Dorsal* وابسته به پروتئین *Pelle* است و *Pelle* یک پروتئین کینازی مشابه فرآورده ژنی *Pto* در گوجه فرنگی می‌باشد.

و) پروتئین‌های LRR خارج سلولی و غیر NBS

ژنهای *cf-2* و *cf-9* گوجه فرنگی فاقد حوزه NBS می‌باشند و گروه سوم را درون گروه LRR از ژنهای R تشکیل می‌دهند (جدول ۱). ژن *cf-9*، ۲۸ نوع LRR را رمز می‌کند. پیش‌بینی می‌شود این LRRها از نوع خارج سلولی باشند (شکل ۱). توالی انتهای N پروتئین *cf-9* در انتقال پیام در عرض غشاء سلولی نقش دارد. بعلاوه این پروتئین در انتهای C دارای حوزه‌ای در عرض غشاء و یک دنباله کوتاه متشکل از ۲۸ اسید آمینه در سیتوپلاسم می‌باشد. LRRهایی که توسط *cf-9* (و همچنین *cf-2*) رمز می‌شوند، بیش از آنکه با گروه NBS-LRR از ژنهای R شباهت داشته باشند، با توالی مورد توافق LRR تطابق دارند و یک واحد حفاظت شده گلیسین^۱ نیز در این LRRها موجود است. این واحد گلیسین همچنین در سایر پروتئین‌هایی که دارای حوزه LRR خارج سلولی می‌باشند، یافت می‌شود. فرآورده ژن *cf-2* بسیار شبیه *cf-9* است که بدیهی به نظر می‌رسد چراکه هر دو ژن مذکور سبب مقاومت اختصاصی در برابر *Cladosporium fulvum* می‌شوند. ۹ نوع از LRRهایی که توسط *cf-2* رمز می‌شوند بسیار شبیه LRRهای *cf-9* هستند که نشان‌دهنده ارتباط^۲ نزدیک دو ژن مذکور است. جالب توجه اینکه معلوم شده است که *cf-2* شامل دو ژن متمایز می‌باشد که فرآورده‌های آنها فقط در ۳ واحد اسید آمینه با هم متفاوت می‌باشند.

ز) گیرنده‌های کینازی در عرض غشاء^۳

آخرین گروه از ژنهای R که در اینجا مد نظر قرار می‌گیرد درحکم پل رابط بین گروه ژنهای R که پروتئین‌های LRR را رمز می‌کنند و آنهایی که پروتئین‌های کینازی را رمز می‌کنند می‌باشد، چراکه در این گروه هر دو حوزه مذکور در یک پروتئین رمز می‌شوند. تنها عضو موجود در این گروه، *Xa21* است. *Xa21* تنها ژن شناخته شده گیاهان تک لپه‌ای است که توالی آن گزارش شده است. *Xa21* یک گیرنده کینازی را رمز می‌کند که ناحیه LRR آن در انتهای N (با توجه به شباهت آن با پروتئین‌های شناخته شده) احتمالاً در خارج سلول قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد که حوزه LRR خارجی از طریق ناحیه‌ای که در عرض غشاء قرار می‌گیرد به حوزه کینازی که در داخل سیتوپلاسم قرار دارد متصل می‌شود. مقایسه پروتئین رمز شده توسط *Xa21* و پروتئین رمز شده توسط *Pto* و *Prf* در گوجه فرنگی

¹ Glycine

² Relatedness

³ Transmembrane receptor kinases

جالب است (جدول ۱). *Pto* (که یک کیناز را رمز می‌کند) و *Prf* (که یک پروتئین NBS-LRR را رمز می‌کند)، هر دو برای مقاومت در برابر عامل غیربیماری‌زای *P. s. tomato* که ژن *avrPto* را بیان می‌کند، لازم می‌باشند. شباهت بین این دو پروتئین و *Xa21* نشان می‌دهد که پروتئین‌های *Pto* و *Prf* در دریافت و انتقال پیام عامل بیماری بصورت تنگاتنگی با یکدیگر کنش نشان می‌دهند. این روند در قالب یک مدل فرضی ارائه شده است (شکل ۲). نمونه‌های *Pto*، *Prf* و *Xa21* نشان می‌دهند که برای فرآورده‌های ژنی *RPS2*، *cf-9* و سایر ژنهای R واجد ناحیه LRR، احتمالاً پروتئین‌های کینازی متناظر که از لحاظ عمل نیز با اهمیت باشند، وجود دارد.

شباهت بین فرآورده ژنهای R با سایر پروتئین‌های گیاهی

شباهت بین فرآورده ژنهای R و سایر پروتئین‌های گیاهی می‌تواند به عنوان سرنخی برای پی بردن به نقش این پروتئین‌ها در انتقال پیام دفاعی باشد. برای مثال، حوزه کینازی در *Pto* و *Xa21* بسیار شبیه گیرنده کینازی *S* در جنس *Brassica* می‌باشند. پروتئین *SRK* در خودناسازگاری گرده-کلاله نقش دارد که سیستمی کاملاً شبیه فرآیند شناسایی-پاسخ توسط فرآورده ژنهای R است. حوزه خارج سلولی پروتئین *SRK*، به نوبه خود بسیار شبیه گلیکوپروتئین متصل به *S* (*SLG*)^۱ است و بنابراین به نظر می‌رسد که این دو پروتئین بطور فیزیکی با یکدیگر و با پیام مختص گرده کنش نشان می‌دهند. *Cf-2* و *Cf-9* از این لحاظ که فاقد حوزه پیام‌رسانی هستند بسیار شبیه *SLG* می‌باشند و پیشنهاد شده است که *Cf-9* و *Cf-2* به منظور ایجاد پاسخ دفاعی احتمالاً با یک گیرنده کینازی LRR یا سایر پروتئین‌ها برهم‌کنش نشان می‌دهند. این پروتئین‌ها در آینده شناسایی خواهند شد زیرا ژنهای اضافی که برای عمل *cf-9* در گوجه فرنگی ضروری می‌باشند از طریق تجزیه جهش^۲ مشخص شده‌اند.

شباهت جالبی نیز بین فرآورده‌های ژنهای R و سایر پروتئین‌هایی که با مولکولهای حاصل از عامل بیماری^۳ برهم‌کنش نشان می‌دهند، وجود دارد. ژن *PR5K* در آراییدوپسیس یک پروتئین کینازی را کد می‌کند که در عرض غشاء قرار می‌گیرد و حوزه کینازی در آن مشابه *Pto*، *Xa21* و حوزه خارج سلولی آن مشابه یک پروتئین ضد قارچی مرتبط با بیماری‌زایی^۴ (پروتئین PR) به نام *PR5* می‌باشد. *PR5K* نیز مانند *SLG* و *SRK* احتمالاً با پروتئین‌های هدف مشترک و یا مربوط به هم برهم‌کنش نشان می‌دهند. سیستم مشابه دیگر، شباهت زیاد بین LRRهای *Cf-9* و *Cf-2* و پروتئین‌های مهار کننده

^۱ S-linked glycoprotein

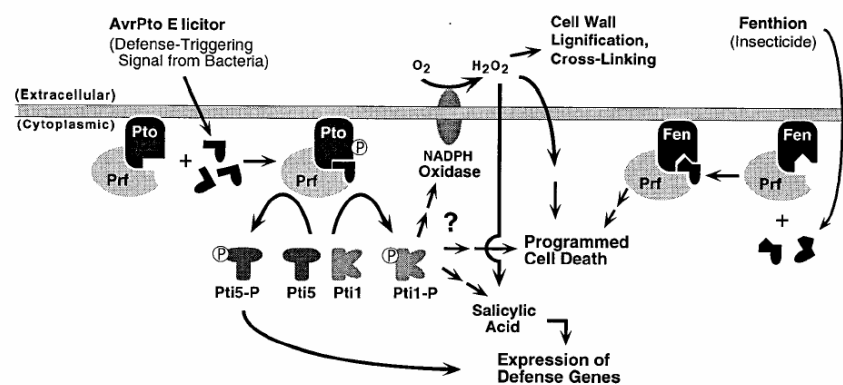
^۲ Mutational analysis

^۳ Pathogen-derived molecules

^۴ Pathogen-related protein

پلی‌گالاکتوروناز^۱ (PGIPs) است. پلی‌گالاکتورونازهای قارچی عوامل بیماری‌زایی هستند که هموگالاکتورونان‌ها^۲ را در دیواره سلول گیاهی هیدرولیز می‌کنند. به همین ترتیب در گیاهان نیز پروتئین‌هایی وجود دارند که عمل پلی‌گالاکتورونازها را متوقف می‌کنند که به آنها PGIP گویند. در حقیقت PGIPها گیرنده‌های با میل ترکیبی بالا^۳ هستند که پلی‌گالاکتورونازهای قارچی را مهار می‌کنند. پیشنهاد شده است که PGIPها در پیام دفاعی نقش دارند، زیرا فرآورده‌های خرد شده حدواسط الیگوگالاکتوروناید^۴ (با زنجیره‌ای به طول ۱۰ تا ۱۴ واحد) که در نتیجه مهار ناقص پلی‌گالاکتوروناز قارچی تجمع می‌یابند می‌تواند به عنوان ترکیبات القاء کننده دفاع عمل نمایند.

شباهت بین بسیاری از فرآورده‌های ژنهای R و پروتئین‌هایی با عمل ناشناخته از قبیل شباهت بین گیرنده کینازی LRR با *TMK1* و *RLK5* نیز می‌تواند به عنوان راهنمایی ما را در جهت درک بهتر عمل ژنهای R رهنمون سازد. به عنوان مثال کشف برهم‌کنش بین *RLK5* و پروتئین فسفاتازی به نام *KAPP* می‌تواند نشانه‌ای از این باشد که پروتئین فسفاتازها هم در انتقال پیام دفاعی نقش دارند.



شکل ۲- مدل فرضی انتقال پیام توسط ژنهای مقاومت. در این مدل فرآورده ژنهای Pto و Prf در سمت داخلی غشاء پلاسمایی به یکدیگر متصل می‌شوند. Pto پس از اتصال الیستور *avrPto* فسفوریله می‌شود و سپس دومین کیناز در آبشار کینازی، به نام *Pti1*، را فسفوریله می‌کند و سپس بطور مستقیم یا غیرمستقیم اجزاء حدواسط مسیر انتقال پیام، مانند کمپلکس آنزیمی NADPH-اکسیداز (ایجاد کننده انفجار اکسیداتیو) و رهاسازی اسید سالیسیلیک، را فعال می‌نماید. این عوامل واکنشهای دفاعی از قبیل

¹ Polygalacturonase inhibitor protein

² Homogalacturonan

³ High affinity

⁴ Oligogalacturonide

اتصال دیواره سلولی و بیان ژنهای دفاعی مانند بتا-۱،۳-گلوکاناز و فیل آلانین آمونیا-لیاز را القاء می‌کند. واکنشهای دیگر عبارتند از فعال شدن کانالهای یونی و رویداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (HR). مسیر انتقال پیام دیگر مستقیماً از *Pto* به شروع شده و به سمت فعالسازی عامل رونویسی *Pti5* و در نتیجه بیان ژنهای دفاعی منتهی می‌شود. *Fen* بعنوان همولوگ *Pto* در دریافت لیگاند متفاوتی (حشره کش فنتیون) نقش دارد و آبشار انتقال پیام متفاوتی (اما در عین حال دارای برخی موارد مشترک) را فعال می‌نماید. این مدل یکی از بسیار مدل مفروض پیشنهاد شده می‌باشد و مدلهای دیگری که برای فعالیت سایر فرآورده‌های ژنهای R پیشنهاد شده‌اند از بسیاری لحاظ متفاوت می‌باشند.

ژنهای مقاومت و انتقال پیام دفاعی

برهم‌کنش *P.syringae* و گوجه فرنگی از طریق *avrPto* با *Pto* و *Prf* نمونه‌ای از برهم‌کنش ژن در برابر ژن است که بهتر از سایر موارد بررسی شده است و می‌تواند سرنخ‌هایی از طبیعت انتقال پیام دفاع گیاهی را در اختیار ما قرار دهد. یکی از این سرنخ‌ها، شناسایی ژن *Fen* است که شبیه ژن *Pto* بوده و باعث حساسیت به حشره‌کشی به نام فنتیون^۱ می‌شود. وقتی ژن *Pto* گوجه فرنگی برای اولین بار از خویشاوند وحشی گوجه فرنگی، *Lycopersicon pimpinellifolium*، به ارقام زراعی انتقال یافت، صفت ثانوی حساسیت به حشره‌کشی فنتیون نیز به درون ارقام مذکور منتقل شد. این صفت با ژن مذکور پیوستگی کامل نشان می‌داد، اما با مطالعاتی که از طریق جهش انجام شد معلوم گردید که عمل ژن *Pto* (یعنی مقاومت اختصاصی نسبت به *avrPto*) متمایز از حساسیت به فنتیون است. پس از همسانسازی ژن *Pto* مشخص گردید که این ژن عضوی از یک خانواده چندژنی می‌باشد و اعضای این خانواده بسیار به هم نزدیک می‌باشند. توالی اسیدآمینه‌ای *Fen* دارای ۸۷٪ شباهت با *Pto* می‌باشد و شناسایی *Fen* به عنوان یک همولوگ برای *Pto* این سؤال را بوجود می‌آورد که نقش سایر همولوگ‌های *Pto* در این خانواده ژنی چیست؟

اهمیت این مطالعه هنگامی آشکار شد که یک ژن از نوع LZ-NBS-LRR به نام *Prf* شناسایی گردید. نکته مهم این بود که حضور *Prf* به همراه *Pto* کینازی برای مقاومت به *P.syringae* بیان‌کننده *avrPto* الزامی می‌باشد (جدول ۱). در حقیقت معلوم شد که *Prf* هم برای مقاومت اختصاصی به *avrPto* و هم برای حساسیت به فنتیون ضروری است. می‌توان یک مدل خطی برای انتقال پیام دفاعی در نظر گرفت که در آن یک پروتئین LRR (به عنوان گیرنده پیام غیربیماریزایی) در بالادست مسیر تولید پیام کینازی قرار دارد. اما عمل اختصاصی *Prf*، *Pto* و *Fen* (در اینحالت، تمایز بین پیام *avrPto* و فنتیون) توسط پروتئین‌های کینازی متمایزی انجام می‌شود و نه توسط پروتئین LRR. یک مدل محتمل‌تر

¹ Fenthion

برای این سیستم اینست که فرض شود *Prf* با هریک پروتئین‌های *Pto* و *Fen* بطور فیزیکی برهم‌کنش نشان داده و کمپلکس‌های گیرنده‌ای با لیگاند اختصاصی متفاوت تشکیل می‌دهد. این مدل در شکل ۲ ارائه شده است.

علاوه بر ژن *Pto*، یک پروتئین کینازی ثانوی از نوع سرین-ترونین به نام *PtiI* در پاسخ دفاعی در برابر *avrPto* شرکت دارد. طبق مطالعات انجام شده *Pti* به عنوان سوبسترای برای اتوفسفوریلاسیون و فسفوریلاسیون توسط *Pto* عمل می‌نماید، اما *Pto* سوبسترای فسفوریلاسیون توسط *PtiI* نمی‌باشد. بنابراین *PtiI* در آبشار پروتئین کینازی، در پائین دست قرار دارد (شکل ۲). بین *Fen* و *PtiI* هیچگونه فسفوریلاسیونی مشاهده نمی‌شود که نشان‌دهنده اینست که *PtiI* بخشی از آبشار کینازی بوده و به انتقال پیام *avrPto-Pto* اختصاص دارد. مشاهده شد که بیان *PtiI* در توتون تراریخت، واکنش فوق حساسیت گیاهان مذکور را در پاسخ به *P.syringae* شدت می‌بخشد، بنابراین نقش *PtiI* در دفاع محتمل به نظر می‌رسد. این یافته نه تنها شاهدهی مستدل از انتقال پیام توسط آبشار کینازی در پاسخ‌های دفاعی مربوطه است، بلکه بیانگر اینست که آبشار کینازی ممکن است در سایر سیستم‌های ژن در برابر ژن نیز عمل نماید.

تعدادی از آلل‌های موتانت *Pto* جداسازی شده است. سطح مقاومتی که این آلل‌ها به گیاه اعطاء می‌کنند حدواسط آنچه که در گیاهان *Pto/Pto* و گیاهانی که کاملاً فاقد ژن *Pto* هستند، می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده طبیعت کمی پاسخ دفاعی ایجاد شده توسط بسیاری از سیستم‌های ژن در برابر ژن است. سایر سیستم‌های بیولوژیکی که از آبشار پروتئین‌های کینازی استفاده می‌نمایند نیز قابلیت مشابهی را در تغییر شدت پیام انتقالی نشان می‌دهند. شدت پاسخ دفاعی توسط بسیاری از اجزاء دخیل در یک سیستم دفاعی منفرد ژن در برابر ژن قابل تغییر است و تعیین خصوصیات اینگونه ژنها که تغییر دهنده شدت مقاومت هستند، حوزه مهمی در تحقیقات آینده خواهد بود.

با مطالعه سیستم *avrPto-Pto* مشخص شده است که پروتئین‌هایی که با *Pto* برهم‌کنش نشان می‌دهند به عوامل رونویسی شباهت دارند و از این طریق اطلاعات بیشتری پیرامون فرآیند انتقال پیام دفاعی بدست آمده است. پروتئین‌های *Pti4*، *Pti5* و *Pti6* که با *Pto* برهم‌کنش نشان می‌دهند به عنوان عوامل رونویسی در توتون به جعبه ^۱PR در توالی DNA متصل می‌شوند که ناحیه‌ای حفاظت شده در پروموتور بسیاری از ژنهای مربوط به پروتئین‌های PR است. بیان پروتئین‌های PR یک پاسخ معمول در کنش گیاهان با دامنه وسیعی از میکروبها می‌باشد که برهم‌کنش بین *avrPto* و *Pto* را نیز در برمی‌گیرد. اتصال به توالی در مورد *Pti5* و *Pti6* تأیید گردیده است. شناسایی این عوامل رونویسی مفروض در

^۱ PR-Box

وهله اول نشاندهنده وجود ارتباط مستقیم بین درک (دریافت) عامل غیربیماریزا و بیان جزئی از پاسخ دفاعی گیاه می‌باشد (شکل ۲).

ژنهای غیربیماریزا و تولید لیگاند

اکنون این سؤال مطرح می‌شود که لیگاندهایی که سبب ایجاد واکنش HR می‌شوند چه هستند؟ اولین ژن *Avr* بیش از دو دهه پیش همسانه گردید و از آن موقع تا کنون تعداد زیادی از ژنهای *Avr* همسانه گردیده است. در اکثر موارد، اطلاعات چندانی پیرامون نقش بیوشیمیایی این ژنها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و توالی اسید آمینه‌ای رمز شده توسط آنها بدست نیامده است، اما مطالعه دقیق تعداد محدودی از فرآورده‌های ژنهای R اطلاعات جالبی را درباره زیست‌شناسی عامل بیماری و اساس مولکولی بیماریزایی حاصل نموده است. یکی از اصول مورد تأیید در این زمینه اینست که پروتئین رمز شده توسط ژنهای *Avr* به عنوان لیگاندی برای القاء پاسخ دفاعی عمل می‌نمایند، بویژه دو گروه از پروتئین‌های غیربیماریزا در این رابطه بطور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند از جمله، پروتئین پوششی ویروس موزائیک توتون، TMV، (که باعث القاء مقاومت در توتونهایی که ژن *N* را بیان می‌کنند، می‌شود، *Avr9* و پپتیدهای مشابه در *C. fluvum* (که از طریق بیان *Cf-9* و ژنهای R مشابه در گوجه فرنگی قابل شناسایی می‌باشند). در مورد ساختمان و عمل پروتئین‌های پوششی TMV اطلاعات جالب توجهی بدست آمده است، اما گیرنده متناظر آنها در گیاه هنوز شناسایی نشده است. *Avr9* از این جهت مورد توجه است که الیستور آن جداسازی شده و ژن R مربوطه نیز همسانه گردیده است. الیستور *Avr9* یک پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای است که از طریق تسهیم^۱ فرآورده بزرگ *Avr9* حاصل می‌شود. هم لاین‌های مقاوم گوجه فرنگی و هم لاین‌های فاقد *Cf-9* هر دو، مکانهایی با میل ترکیبی بالا را برای اتصال الیستور *Avr9* بیان می‌نمایند.

ژنهای *Avr* بطور غیرمستقیم نیز در تولید الیستورهای اختصاصی ژنهای R نقش دارند. به عنوان مثال، نژادهایی از که *P. s. tomato* که ژن *avrD* را بیان می‌کنند، خانواده‌ای از الیستورها را تولید می‌کنند که از لحاظ شیمیایی مشابه بوده و ترکیباتی آلی با وزن مولکولی پائین می‌باشند که به نام سرینگولید^۲ نامیده می‌شوند. ژن *avrD* یک الیستور پروتئینی را رمز نمی‌نماید، اما در عوض آنزیمی را رمز می‌کند که در سنتز سرینگولید نقش دارد. یکی از اهداف تحقیقاتی آینده در سیستم *avrD* و سایر سیستم‌های ژن در برابر ژن مورد مطالعه، عبارتست از بررسی برهم‌کنش فیزیکی بین الیستورهای نژاد-اختصاصی و گیرنده‌های متناظر آنها.

^۱ Cleavage

^۲ Syringolide

اصطلاح ژن در برابر ژن، بر جور شدن اختصاصی ژنهای *Avr* و *R* دلالت دارد، اما بدین معنی نیست که برای هر ژن *Avr* الزاما یک ژن *R* وجود دارد. بطور مثال فرآورده ژنهای *Pto* و *Prf* که از لحاظ بیوشیمیایی کاملاً متمایز از یکدیگر هستند (ولی در مسیر مشابهی سنتز می‌شوند)، تنها نمونه‌ای از موارد متعددی است که چندین ژن *R* در شناسایی یک ژنوتیپ *Avr* نقش دارند. یک مثال دیگر در این رابطه مکان ژنی *Cf-2* می‌باشد. در اینحالت دو ژن متمایز *R* نقش مشابهی را ایفاء می‌کنند. مورد دیگر حالتی است که یک ژن *R* سبب مقاومت اختصاصی گندم به دو لیگاند متفاوت می‌شود. ژن *PRM1* در آرابیدوپسیس سبب مقاومت به *P.syringae* با ژن *avrB* یا *avrRpm1* می‌شود. مشخص شده است که خصوصیات این دو ژن *Avr* کاملاً متفاوت از یکدیگر می‌باشد. هرچند که ساختمان مولکولی دو ژن *Avr* مذکور هنوز تعیین نگردیده است، اما معلوم شده که ژن *avrB* الیستورهای را رمز می‌کند که متمایز از الیستورهای رمز شده توسط *avrRpm1* می‌باشد؛ در سویا گیاهانی شناسایی شده‌اند که به عوامل بیماری بیان کننده *avrB* مقاوم، ولی در برابر عوامل بیماری بیان کننده *avrRpm1* حساس می‌باشند و بالعکس. همانطور که در بالا نیز اشاره شد، وجود اختصاصیت در برابر چندین لیگاند برای ژن *Prf* نیز گزارش شده است.

در رابطه با گیرنده‌های بالقوه برای الیستورهای حاصل از ژنهای *Avr*، محل استقرار الیستور و مکان فرآورده ژن *R* را نیز باید مد نظر قرار داد. به عنوان مثال *C.fluvm* در خارج از سلول رشد می‌کند در صورتیکه *TMV* در درون سیتوپلاسم سلول گیاهی تکثیر می‌شود. بنابراین استقرار پروتئین *Cf-9* در خارج از سلول و قرار گرفتن فرآورده ژن *N* در داخل سلول منطقی به نظر می‌رسد. اما *P.syringae* pv *tomato* و *P.syringae* pv *maculicola* عوامل بیماری باکتریایی خارج سلولی هستند، با این وجود توالی ژنهای *Pto*، *Prf*، *RPS2* و *RPM1* نشان می‌دهد که فرآورده‌های آنها از نوع سیتوپلاسمی می‌باشند. برای توجیه این تناقض می‌توان فرض کرد فرآورده ژن *Avr* در اینحالت به داخل سلول گیاهی ترشح می‌شود. ژن *Xa21* در برنج یک گیرنده کینازی را کد می‌کند که در عرض غشاء قرار می‌گیرد (جدول ۱) و بنابراین جالب است که مشخص شود آیا پیام غیربیماری‌زایی حاصل از *X.campestris* pv *oryzae* از طریق سیستم ترشح نوع سوم^۱، که مورد استفاده عوامل بیماری باکتریایی مربوطه می‌باشد، به درون سلول گیاهی انتقال می‌یابد و یا خیر.

اگر فقدان ژن *Avr* با کاهش شایستگی در عامل بیماری همراه باشد، در اینصورت ژن مذکور همواره مورد هدف مقاومت گیاه به بیماری خواهد بود (همانطور که در بالا اشاره شد)، برخی از ژنهای *Avr* ممکن است حذف شوند بدون اینکه اثر سوئی برای عامل بیماری مترتب بر فقدان آنها باشد، اما در مقابل برخی دیگر از ژنهای *Avr* نیز در ایجاد بیماری توسط عامل بیماری در گیاهی که فاقد مقاومت

¹ Type III secretion apparatus

است نقش دارند. عدم تولید الیستور توسط عامل بیماری بر وضعیت کشاورزی تأثیرگذار است: با تغییر ساختار جمعیت عامل بیماری به نفع افرادی که دارای قابلیت ایجاد بیماری می‌باشند، اثر ژنهای مقاومت (R) در جلوگیری از بیماری خنثی می‌شود، به عبارت دیگر عامل بیماری به منظور بی تأثیر نمودن نقش ژنهای مقاومت در پی ایجاد بیماریزایی برمی‌آید. یکی از مکانیسم‌ها به منظور حذف ویژگی عدم بیماریزایی (و ایجاد بیماریزایی)، تغییر در ساختمان الیستور است بنحوی که گیرنده گیاهی نتواند با آن پیوند برقرار نماید. پروتئین پوششی TMV نمونه‌ای از ژنهای *Avr* است که وجود آن برای بیماریزایی الزامی است. اشکال متفاوتی از این پروتئین مشاهده شده است که با تغییر در یک اسید آمینه، خاصیت عدم بیماریزایی از بین رفته و پروتئین‌های مذکور قابلیت بیماریزایی پیدا کرده‌اند. پدیده از بین رفتن خاصیت عدم بیماریزایی و ایجاد قابلیت بیماریزایی در پپتید مربوط به *C. fluvium* نیز مشاهده شده است. در مورد سایر ژنهای *Avr* باکتریایی و قارچی، از بین رفتن کامل خاصیت عدم بیماریزایی از طریق نوتریبی ژنی^۱، جایگزینی ترانسپوزون‌های مخفی^۲، حذف کروموزومی و یا حذف پلاسمیدهای خارج کروموزومی صورت می‌گیرد. یک مثال جالب در رابطه با تکامل ژنهای *Avr*، خانواده *avrBs3* از ژنهای *Avr* باکتریایی است. این ژنها، تکرارهای ۳۴ اسید آمینه‌ای بسیار مشابهی با تعداد تکرار متفاوت را رمز می‌نمایند. تعداد تکرارها و یا توالی هر یک از تکرارها به تنهایی سبب از بین رفتن خاصیت عدم بیماریزایی نمی‌شود، ولی آللهای *Avr* جدیدی را ایجاد می‌کند که قبلاً در مقاومت اختصاصی گیاه ناشناخته بودند.

رویدادهای پائین دست در انتقال پیام دفاعی

اکنون این سؤال مطرح است که پس از آنکه عامل بیماری پیام القاء کننده دفاع را تولید کرد و گیاه آن را دریافت نمود، چه وقایعی رخ می‌دهد؟ و به عبارت دیگر رویدادهای پائین دست پس از دریافت پیام چه هستند؟ در حقیقت برهم‌کنش ژن در برابر ژن باعث القاء یکسری از پاسخ‌ها، از قبیل فعال شدن پروتئین‌های کینازی، تحریک انفجار اکسیداتیو و القاء جریان‌های یونی در غشاء سلول می‌گردد. این قبیل رویدادها و سایر وقایع به نوبه خود پاسخ‌های دفاعی همچون اتصال دیواره سلولی^۳ و بیان ژنهای مربوط به دفاع را موجب می‌شوند. در مورد ژنهای *Xa21* و *Prf-Pto* به نظر می‌رسد که پروتئین‌های کینازی بلافاصله در پی شناسایی عامل بیماری فعال می‌شوند. اما پیامهایی که توسط سایر فرآورده‌های ژنهای R ایجاد می‌شود و اجزاء پائین دست که این پیام را دریافت می‌نمایند، هنوز شناخته نشده‌اند.

¹ Gene rearrangement

² CryPtic transposon

³ Cell wall cross-linking

روشهای گوناگون بیوشیمیایی، ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی در تشریح روند انتقال پیام دفاعی می‌توانند سودمند واقع گردند. اهمیت وقایع پائین دست از قبیل انفجار اکسیداتیو پژوهشگران را به تمرکز بر روی اجزاء سلولی که این وقایع را به انجام می‌رسانند رهنمون ساخته است. اما مشاهده اینکه یک محرک بیوشیمیایی می‌تواند باعث القاء پاسخ دفاعی شود، الزام وجود آن محرک را برای فرآیند مربوطه اثبات نمی‌نماید. به عنوان مثال اتیلن سبب القاء بیان ژن PR می‌شود، اما برای ظهور مقاومت مؤثر به بیماری از نوع ژن در برابر ژن، داشتن قابلیت پاسخ به اتیلن الزامی نیست. روش همسانه سازی برهم‌کنشی^۱ که در آن از یک پروتئین برای شناسایی پروتئین دیگری که با آن بطور فیزیکی برهم‌کنش نشان می‌دهد و در نتیجه شناسایی ژن متناظر آن استفاده می‌شود، مسیری نوید بخش برای پژوهش در این زمینه است زیرا از این طریق می‌توان نقش فیزیکی و مستقیم اجزاء سیستم ژن در برابر ژن را مشخص نمود. اما این نیز مهم است که نقش زیست‌شناختی اجزاء دخیل در انتقال پیام از قبیل *Pti* نیز مشخص شود. این کار از طریق فرونشانی آنتی‌سنس^۲ یا فرایبانی تراریختی^۳ ژن مربوط به ترکیب مورد نظر قابل انجام است. تجزیه و تحلیل جهش روش بسیار قابل اطمینانی برای شناسایی ژنهایی است که احتمال می‌رود در کنترل وقایع پائین دست طی مسیر ژن در برابر ژن دخیل باشند. مطالعه مکانهای ژنی کمی که مقاومت ژن در برابر ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند نیز در پیشرفت این زمینه نقش دارند. یکی از اجزاء دخیل در انتقال پیام دفاعی که شایان توجه ویژه است، اسید سالیسیلیک می‌باشد. اسید سالیسیلیک از واسطه‌های کلیدی در انتقال پیام است که سبب مقاومت اکتسابی سیستمیک^۴ می‌شود؛ فرآیندی که طی آن آلودگی موضعی باعث تشدید مقاومت بصورت کمی چه در مکان آلودگی و چه در بافت‌های دور از منطقه آلوده شده می‌گردد. اسید سالیسیلیک واسطه مهمی در پاسخ‌های دفاعی است و در مقاومت ژن در برابر ژن علیه بیماری نقش کلیدی دارد.

اکنون این سؤال مطرح است که هنگام آلودگی گیاه توسط عوامل بیماری گوناگون با ژنهای *Avr* متفاوت، آیا پاسخ‌های پائین دست یکسان هستند و یا متفاوت می‌باشند؟ بررسی ظاهری بافت‌های آلوده شده نشان می‌دهد که ارتباط ژن در برابر ژن در موارد مختلف ممکن است پاسخ‌های مقاومت متفاوتی را سبب شود. با مطالعه سطح بیان ژن القاء شده در گیاه آرابیدوپسیس و از طریق استفاده از سیستم ایزوژنیک که در آن گیاهان دارای *RPM1* و/یا *RPS2* با *P.syringae* pv *maculicola* بیان‌کننده *avrRpm1* و/یا *avrRpt2* آلوده شدند، این امر به اثبات رسید. هم در زمان ظهور واکنش HR و هم در RNA پیامبر PRهای القاء شده تفاوت‌هایی مشاهده شد. نکته جالب این بود که مشاهده شد حضور یک

¹ Intraction-cloning

² Anti-sense suppression

³ Transgenic overexpression

⁴ Systemic Acquired Resistance

عامل بیماری مانع پاسخ دفاعی گیاه ناشی از آلودگی توسط عامل بیماری دیگر می‌شود. این تداخل به دز عامل بیماری بستگی داشت و با تغییر غلظت نسبی دز عامل بیماری از بین می‌رفت. به نظر نمی‌رسد که الیسیتورهای *avrRpm1* و *avrRpt2* با گیرنده یکسانی پیوند برقرار کنند، زیرا این الیسیتورها در برابر ژنهای R متفاوتی اختصاصیت نشان می‌دهند و پاسخ‌های دفاعی متفاوتی را القاء می‌کنند. اما ممکن است این الیسیتورها برای اجزاء مشابهی از گیرنده‌های هتروژن که واحدهای فرعی چندگانه دارند^۱ و یا اجزاء پائین دست مسیر بیوشیمیایی پیام به رقابت پردازند. فرض دیگر اینست که فرآورده‌های دو ژن *Avr* مذکور آنزیمهایی هستند که در تغییر ترکیبات الیسیتور نهایی به رقابت می‌پردازند.

علاوه بر مطالعه مکانیسم‌هایی که منجر به القاء پاسخ‌های دفاعی می‌شود، درک اینکه گیاهان چگونه مانع گسترش بیش از حد پاسخ‌های مذکور می‌شوند نیز اهمیت دارد. یکی از راههای بررسی این موضوع عبارتست از مطالعه موتانت‌های دارای زخمهای مشابه علائم بیماری^۲. در این گیاهان موتانت، بدون اینکه عامل بیماری حضور داشته باشد و یا در حضور ساپروفیت‌های که بطور طبیعی سبب بیماری نمی‌شوند زخمهایی شبیه اثر بیماری بوجود می‌آید. انواع زیادی از اینگونه زخم‌های ژنتیکی وجود دارد که می‌تواند سبب بروز فنوتیپ‌هایی شبیه زخمهای ناشی از بیماری شود. انتظار این بود که با مطالعه برخی از این موتانت‌ها، ژنهای مهم در توسعه بیماری و مقاومت مشخص شوند، اما نتایجی که تاکنون از این طریق بدست آمده در بسیاری موارد با نتایج مطالعات مربوط به ژنهای R دخیل در دفاع همپوشانی داشته است. به عنوان مثال برای نشانمند کردن *Ls1* در ذرت، ژنی که در ایجاد محدودیت برای مرگ برنامه‌ریزی سلول یا عدم رویداد آن نقش دارد، از موتاژن ترانسپوزونی استفاده شده است. در گیاهانی که از لحاظ این ژن جهش‌یافته بودند، بافت‌های مرده‌ای بطور پراکنده ظاهر گردید که گسترش یافته و بتدریج تمام برگ را فرا می‌گرفت. انجام تجزیه و تحلیل پیرامون این قبیل ژنها بایستی به درک بهتر مکانیسم‌های هموستاتیک که شدت و گسترش پاسخ‌های دفاعی را محدود می‌کنند منجر گردد.

خانواده ژنهای مقاومت و ایجاد مقاومت‌های اختصاصی جدید

ژنهای R چگونه بوجود می‌آیند؟ اکثر ژنهای R علیرغم شباهت زیاد در مواردی از قبیل نواحی کد کننده LRR در سطح DNA، بسیار متفاوت از یکدیگر می‌باشند. با اینحال برای ژنهای همسانه شده خانواده‌های ژنی شناسایی شده است که چندین ژن با توالی مشابه را در برمی‌گیرند. اعضای این خانواده ژنی در ژنوم یک لاین گیاهی ممکن است به شدت پیوسته، کاملاً ناپیوسته یا به هر دو صورت پیوسته و ناپیوسته باشند. این موضوع چندان عجیب نیست چراکه در مطالعات ژنتیک کلاسیک موارد بسیاری

¹ Heterogenous multisubunit receptors

² Disease lesion mimic mutants

مشاهده شده است که ژنهای R بصورت خوشه‌های ژنی اغلب سبب مقاومت به نژادهای متفاوت از یک گونه بیماری می‌شوند.

محتمل‌ترین منبع ایجاد مقاومت‌های اختصاصی جدید، چه در مورد ژنهای پیوسته و چه در مورد ژنهای ناپیوسته ولی مرتبط به یکدیگر، پدیده‌های مضاعف شدن و در پی آن رویداد افتراق^۱ می‌باشد. به عنوان مثال در مورد مکان ژنی *Rpi* در ذرت، وقوع کراسینگ اوور نامساوی در درون خوشه‌هایی از توالی‌های مشابه، ظهور آللهای جدید ژن R را سرعت می‌بخشد. در خوشه M از ژنهای R در کتان نیز تبدلات نامساوی توالی‌های رمز کننده LRR در بین و درون ژنهای M مجاور مشاهده شده است. جالب توجه اینکه نوترکیبی و ایجاد مقاومت‌های اختصاصی جدید در گیاهان شبیه مکانیسم‌های ایجاد تنوع ایمنولوژیکی در پستانداران می‌باشد. شایان ذکر است که نوترکیبی همچنین ممکن است سبب ایجاد اختصاصیت‌های غیربیماریزا^۲ در عامل بیماری شود، چنانچه در مورد خانواده *avrBs3* از *Xanthomonas* مشاهده شده است. یک مکانیسم دیگر که ممکن است در ایجاد تنوع در مقاومت نقش داشته باشد پردازش گوناگون^۳ نسخه‌های رونویسی شده^۴ از ژن R است.

طبق شواهد موجود، در گونه‌های متفاوت نه فقط توالی DNA مربوط به ژنهای R بسیار مشابه و حفاظت شده هستند. بلکه عمل مقاومت اختصاصی نسبت به ژن *Avr* مربوط نیز حفاظت شده می‌باشد. به عنوان مثال می‌توان به تحقیقات مربوط به عامل بیماری *X.campestris* بیان کننده *avrRxv* اشاره نمود که برای اولین بار از عامل بیماری گوجه فرنگی *X.c.resicatoria* جداسازی شد. مشاهده شد *avrRxv* همسانه شده، در سایر نژادهای *X.campestris* که ابتدائاً روی گیاهانی دیگر مانند کلم و ذرت بیماریزا بودند، بیان می‌شود که این نشاندهنده حضور مقاومت اختصاصی مربوطه در این گونه‌های گیاهی است. موارد زیادی از این گونه مقاومت اختصاصی در برابر ژن *Avr* یکسان، از سوی گونه‌های گیاهی متفاوت مشاهده شده است که از آن جمله می‌توان به ژنهای *avrRpt2*، *avrRpm1* و *avrPto* (ژنهای *Avr* که ژنهای R متناظر آنها همسانه شده است) اشاره نمود. وجود مقاومت مشابه بین آرابیدوپسیس و گیاهان زراعی عمده مانند سویا نشان می‌دهد که آرابیدوپسیس می‌تواند به عنوان منبع ژنهای R برای گیاهان مذکور بکار رود، اما این موضوع تاکنون بطور کامل مورد بهره‌برداری قرار نگرفته است. به نظر می‌رسد که اساس مولکولی شباهت بین انواع مقاومت از لحاظ نحوه عمل، ریشه در شباهت ساختمانی ژنهای R مربوطه دارد هرچند که این موضوع نیز بطور تجربی و در عمل به اثبات نرسیده است.

¹ Divergence

² Avirulence specificities

³ Alternative splicing

⁴ Transcript

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی^۱

گیاهان عالی در جریان تکامل و سازگاری با فشار عوامل بیماری در محیط، دیوار سلولی ضخیمی متشکل از سلولز^۲، پکتین^۳، لگنین^۴ و غیره توسعه داده‌اند که به عنوان مانع فیزیکی در برابر عوامل بیماری مهاجم عمل می‌نماید. دومین مکانیسم دفاعی در گیاهان عبارتست از تولید متابولیت‌های ثانویه (مانند فنولیک‌ها^۵، آلکالوئیدها^۶ و ساپونین‌ها^۷) که بخشی از دفاع شیمیایی را تشکیل می‌دهند. اما واکنش دفاعی دیگری نیز وجود دارد که بسیار پیچیده‌تر است و عبارت از فعال شدن آشناری از ژنهای دخیل در برهم‌کنش گیاه-عامل بیماری می‌باشد. برخی از واکنش‌های دفاعی القاء شونده عبارتند از تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی^۸ (ROS)، فیتوالکسین‌ها^۹، اجزاء دیواره سلولی^{۱۰} (کالوس^{۱۱}) و پروتئین‌های غنی از هیدروکسیل پرولین^{۱۲} و غیره) و گروه دیگری از پروتئین‌ها که تحت عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) نامیده می‌شوند. مطالعات گسترده‌ای که در زمینه واکنش فوق حساسیت گیاه توتون آلوده به ویروس موزائیک^{۱۳} (TMV) انجام گرفت منجر به کشف پروتئین‌های PR گردید. این پروتئین‌ها برای اولین بار به عنوان پروتئین‌های القاء شونده از عصاره برگ گیاهانی که در برابر TMV واکنش فوق حساسیت نشان داده بودند استخراج گردید. سپس مشخص گردید که پروتئین‌های مذکور فقط به آلودگی ویروسی اختصاص ندارند، بلکه در حضور بسیاری از عوامل بیماری قارچی و باکتریایی و خصوصا در گیاهانی که واکنش فوق حساسیت نشان می‌دهند مشاهده می‌شوند. این پروتئین‌ها اکثرا دارای وزن مولکولی پائینی بوده و ترجیحا در pH پائین استخراج می‌شوند. پروتئین‌های مذکور در برابر پروتئولیز^{۱۴} مقاوم بوده و اغلب در داخل سلول‌های برگ حضور دارند. اصطلاح پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بصورت PR مخفف گردید و به مفهوم پروتئین‌هایی است که توسط گیاه میزبان رمز می‌شوند اما فقط در حضور عامل بیماری یا وضعیت‌های مربوط القاء می‌شوند. منظور از عامل بیماری یا

¹ Pathogenesis-related proteins

² Cellulose

³ Pectin

⁴ Lignin

⁵ Phenolics

⁶ Alkaloids

⁷ Saponins

⁸ Reactive oxygen species

⁹ Phytoalexins

¹⁰ Cell wall components

¹¹ Callose

¹² Hydroxyproline-rich proteins

¹³ Tobacco mosaic virus

¹⁴ Proteolysis

وضعیت‌های مربوط تمام انواع عوامل بیماری و حتی تهاجم انگلی توسط حشرات، نماتدها و سایر فرمهای عالی جانوران است. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که پروتئین‌های PR حتی در حضور قارچها و باکتری‌های غیربیماریزا و سودمند نیز القاء می‌شوند. تنش‌ها و اختلالات غیرزنده در چارچوب این تعریف نمی‌گنجد هرچند که علائم غیرعفونی از قبیل کلروسیس^۱ و نکروسیس^۲ ناشی از سموم اغلب توسط پروتئین‌های PR معینی القاء می‌شوند. پروتئین‌های PR همچنین تحت تنش‌های محیطی، توسط الیستینورهای شیمیایی و در مراحل تکوینی متفاوت گیاه نیز القاء می‌شوند. معیار اصلی برای اینکه پروتئینی در زمره پروتئین‌های PR قرار گیرد اینست که آن پروتئین باید نوظهور^۳ بوده و در صورت آلودگی القاء گردد و مانع پیشرفت عامل بیماری (اما نه الزاماً در تمام شرایط بیماریزایی) شود. این حقیقت که پروتئین‌های PR فقط در شرایط بیماری القاء می‌شوند نشان دهنده نقش آنها در دفاع گیاهی است (هرچند که آن را ثابت نمی‌کند).

آلودگی موضعی در گیاه یا واکنش فوق حساسیت در گیاه می‌تواند منجر به کسب مقاومت سیستمیک نسبت به آلودگی بعدی ناشی از عامل بیماری متفاوتی شود. این نوع مقاومت اکتسابی سیستمیک^۴ (SAR) به القاء پروتئین‌های PR در بافت‌های گیاهی نسبت داده می‌شود که دور از موضع آلودگی می‌باشند. شرایط دیگری که پروتئین‌های PR القاء می‌شوند عبارت از بکار بردن مواد شیمیایی با تأثیری مشابه عامل بیماری، و ایجاد زخم می‌باشد. مشاهده شده است که بکار بردن اسید سالیسیلیک (که یک واسط ضروری در مسیرهای پیام رسانی است) منجر به تجمع پروتئین‌های PR در توتون می‌شود. ایجاد زخم بصورت مکانیکی یا در اثر تغذیه حشرات از بافت گیاه نیز منجر به تجمع پروتئین‌های PR می‌شود.

گروه بندی پروتئین‌های PR

پروتئین‌های PR در مجموع به ۱۷ گروه تقسیم می‌شوند. گروه بندی که در گذشته انجام گرفت مختص به توتون و گوجه فرنگی بود، اما سیستم طبقه بندی فعلی پروتئین‌های PR سایر گونه‌های گیاهی را نیز در بر می‌گیرد. به خانواده‌های مختلف شماره‌های متفاوتی اختصاص داده می‌شود و اعضاء درون یک خانواده با حروف از یکدیگر متمایز می‌گردند. برای تعیین اینکه یک پروتئین PR به کدام گروه تعلق دارد لازم است که هم در سطح اسید نوکلئیک و هم در سطح پروتئین اطلاعاتی کسب شود.

¹ Chlorosis

² Necrosis

³ Novel

⁴ Systemic acquired resistance

همین مطلب در مورد پروتئین‌های مرتبط با تنش^۱ که در چارچوب تعریف پروتئین‌های PR قرار می‌گیرند نیز صادق است.

خانواده PR-1

خانواده PR-1 رایجترین گروه پروتئین‌ها بوده و در شرایط آلودگی به میزان زیادی القاء شده بطوریکه مقدار آنها تا ۱ الی ۲ درصد پروتئین کل برگ می‌رسد. این پروتئین‌ها که از تمام گونه‌های گیاهی مورد مطالعه استخراج شده‌اند بطور معمول به اندازه ۱۶۰ اسید آمینه طول دارند. خانواده PR-1 در توتون متشکل از سه پلی پپتید اسیدی (PR-1a, PR-1b و PR-1c) است که توالی آنها بیش از ۹۰٪ به یکدیگر شباهت دارند می‌باشد. PR-1ها شامل دو گروه اسیدی و بازی می‌باشند و شباهت بین توالی این دو گروه حدود ۶۵٪ است. ژنهای PR-1 اسیدی فاقد اینترون هستند و پروتئین‌های رمز شده توسط آنها در pH اسیدی (pH=۳) محلول می‌باشند. PR-1های اسیدی اغلب در فضای خارج سلولی و عناصر آوند چوبی گیاهان آلوده شده با TMV یافت می‌شوند اما در واکوئل برخی از سلولهای برگ مشاهده نشده‌اند. پروتئین‌های PR-1 بازی هم در فضای خارج سلولی و هم در واکوئل گیاهان یافت می‌شوند.

بتا-۱،۳-گلوکانازها^۲ (خانواده PR-2)

خانواده PR-2 شامل بتا-۱،۳-گلوکانازها می‌شود که بطور گسترده‌ای در بین گونه‌های گیاهی توزیع شده‌اند. چندین پروتئین PR با فعالیت بتا-۱،۳-گلوکاناز در توتون شناسایی شده‌اند که بر اساس شباهت بین توالی‌هایشان به چهار گروه تقسیم می‌شوند. گروه I دارای چندین ایزوفرم^۳ بازی مربوط می‌باشند که اغلب در واکوئل‌ها تجمع می‌یابند. در مقابل، گروه II (PR-2a, PR-2b و PR-2c) و گروه III (PR-2d) اسیدی بوده و به درون فضای خارج سلولی ترشح می‌شوند. در گروه چهارم نیز یک گلوکاناز مختص بساک^۴ قرار دارد.

کیتینازها^۵ (خانواده‌های PR-3, PR-4, PR-8 و PR-11)

خانواده‌های PR-3, PR-4, PR-8 و PR-11 عمدتاً متشکل از کیتینازها و پروتئین‌های مرتبط می‌باشند. کیتینازها لینکاژهای بتا-۱،۴ بین باقیمانده‌های N-acetylglucosamine در کیتین^۶ را هیدرولیز

¹ Stress-related proteins

² β-1,3-Glucanase

³ Isoforms

⁴ Anther-specific

⁵ Chitinase

⁶ Chitin

می‌کنند. کیتین پلی ساکارید ساختمانی دیواره سلولی بسیاری از قارچها و همچنین کوتیکول حشرات و سلول تخم نماتدها می‌باشد. کیتینازها اولین پروتئین‌های القاء شونده توسط عامل بیماری بودند که شناسایی شدند و بیش از سایر گروه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مشخص شده است که ترکیب کیتیناز و بتا-۱،۳-گلوکاناز (در مقایسه با هر یک از دو آنزیم به تنهایی) علیه بسیاری از قارچها مؤثرتر است. اما برخی از کیتینازها ضد قارچی^۱ نیستند. به عنوان مثال گروه کیتینازهای IIa توتون ضد قارچی نمی‌باشند. اما اعضاء گروه I ضدقارچهای قدرتمندی هستند. مقاومت *Lr35* در برابر زنگ برگ گندم به میزان بالای کیتیناز و فعالیت بتا-۱،۳-گلوکاناز ناشی از دفاع فوق حساسیت نسبت داده می‌شود.

پروتئین‌های شبه تاماتین^۲ (خانواده PR-5)

توالی پروتئین‌های PR-5 یا شبه تاماتین (TLPs) دارای شباهت زیادی با یکدیگر بوده و با پروتئین شیرین مزه تاماتین در میوه درختچه‌های *Thaumatococcus daniellii* غرب آفریقا ارتباط ایمنولوژیکی^۳ دارند. TLPها اغلب در برگهای گیاهان جوان سالم یافت نمی‌شوند، اما در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده به سرعت تا مقادیر زیادی تجمع می‌یابند. این پروتئین‌ها معمولاً بسیار محلول بوده، تا pH بسیار پائین پایدار باقی مانده و در برابر پروتئولیز مقاوم می‌باشند. TLPهای خارج سلولی همیشه اسیدی هستند در صورتیکه TLPهای واکوئلی، بازی می‌باشند. مانند سایر پروتئین‌های PR دو گروه از TLPها موجود است. گروه بزرگتر شامل پروتئین‌هایی با اندازه حدود ۲۳kDa تا ۲۶kDa می‌باشد و اعضاء گروه کوچکتر دارای اندازه‌ای در حدود ۱۶kDa تا ۱۷kDa می‌باشند. بطور مثال در برنج دو نوع TLP وجود دارد؛ یکی TLP از نوع ۱۶kDa است که توسط *Pseudomonas syringae* القاء می‌شود و دیگری TLP از نوع ۲۴kDa و ۲۵kDa است که یک یا دو روز پس از آلودگی توسط *Rhizoctonia solani* القاء می‌شود. گرچه بسیاری از TLPها ضد قارچی هستند، اما فعالیت ضد قارچی آنها بسته به جنس قارچ متغیر می‌باشد. TLPها در غلظت بالا غشاء سلولی قارچ را تجزیه می‌کنند ولی در غلظت پائین بر نفوذپذیری غشاء تأثیر می‌گذارند که منجر به تراوش اجزاء سلولی و یا جذب سایر ترکیبات ضد قارچی می‌شود. TLPها در پاسخ به آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی القاء می‌شوند. TLPها همچنین در شرایط تنش غیربیماری مانند تنش اسمزی و توسط هورمون‌ها و مولکول‌های پیام مانند آبسسیک اسید^۴ (ABA)، اتیلن^۱، سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید^۲ (JA) و همچنین با ایجاد زخم القاء می‌شوند.

^۱ Antifungal

^۲ Thaumatin-like proteins

^۳ Immunological relationship

^۴ Abscissic acid

مهارکننده‌های پروتیناز^۳ (خانواده PR-6)

مهارکننده‌های پروتیناز (PIs) پروتئین‌های دفاعی پایداری هستند که در بذره‌ای تحت تنظیم تکوینی^۴ و همچنین در برگ‌ها در پی تهاجم آفات یا عوامل بیماری یافت می‌شوند. گرچه بیش از ۱۰ زیرگروه نامربوط مهارکننده پروتیناز در گیاهان شناسایی شده‌اند، اما فقط برخی از آنها نقش دفاعی در گیاهان بر عهده دارند. خانواده PR-6 متشکل از PIهایی است که دارای نقش دفاعی در گیاهان می‌باشند. عوامل بیماری و آفات مهاجم به بافت‌های گیاهان به یک سری از پروتینازها به عنوان عوامل بیماریزایی^۵ متکی می‌باشند. این پروتینازها به چهار گروه پروتینازهای سرینی^۶، پروتینازهای سیستئینی^۷، پروتینازهای آسپاراتیک^۸ و پروتینازهای فلزی^۹ تقسیم می‌شوند. گیاهان بطور موازی ژن‌هایی را رمز می‌کنند که این پروتینازها را غیرفعال می‌سازد و از اینرو باعث کاهش توانایی عامل بیماری یا آفت در هضم پروتئین‌های میزبان شده و آنها را با کمبود منبع نیتروژن مواجه می‌سازند.

پراکسیدازها^{۱۰} (خانواده PR-9)

پراکسیدازها آنزیم‌های کلیدی در فرآیند تشکیل دیواره سلولی می‌باشند. باور بر اینست که پراکسیدازهای خارج سلولی یا متصل به دیواره سلولی^{۱۱} از طریق تشکیل موانع دیواره سلولی^{۱۲} از نفوذ و گسترش عوامل بیماری جلوگیری می‌کنند. افزایش فعالیت پراکسیداز با مقاومت گیاهان به عوامل بیماری گوناگون همبستگی دارد. در مقابل، فعالیت پراکسیداز در حالت حساسیت گیاه به تأخیر افتاده و یا اصلاً القاء نمی‌شود و در نتیجه عامل بیماری فرصت می‌یابد که در میزبان گسترش یابد. پراکسیدازها علاوه بر نقشی که در تقویت دیواره سلولی دارند، در تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) نیز

¹ Ethylene

² Jasmonic acid

³ Proteinase inhibitor

⁴ Developmentally regulated

⁵ Virulence factor

⁶ Serine-proteinase

⁷ Cysteine-proteinase

⁸ Aspartic-proteinase

⁹ Metallo-proteinase

¹⁰ Peroxidase

¹¹ Wall-bound

¹² Cell wall barrier

نقش دارند. گونه‌های اکسیژن واکنشی هم در حکم سم برای عامل بیماری می‌باشند و هم به عنوان پیغامبر^۱ عمل کرده و پاسخ دفاعی گیاه را فعال می‌سازند.

دفنسین‌ها^۲، تیونین‌ها^۳، پروتئین‌های ناقل لیپید^۴ و اکسالات اکسیدازها^۵ (خانواده‌های PR-، PR-12، PR-14، PR-15 و PR-16)

دفنسین‌ها (PR-12)، تیونین‌ها (PR-13)، پروتئین‌های ناقل لیپید (LTP، PR-14) و اکسالات اکسیدازها و پروتئین‌های مرتبط (PR-15 و PR-16) همگی پپتیدهایی هستند که فعالیت ضد میکروبی دارند. اکسالات اکسیدازهای (OxO) گندم و جو بطور گسترده‌ای مطالعه شده‌اند. این ژنهای برای اولین بار در دیواره سلولی بذرها در حال جوانه زدن شناسایی شدند و سپس معلوم شد که در اثر تهاجم قارچی القاء می‌شوند. هرچند که مکانیسم دقیق فعالیت ضد میکروبی این آنزیم هنوز بخوبی درک نشده است، اما به نظر می‌رسد که این آنزیمها در تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) نقش دارند. تیونین‌ها، دفنسنین‌ها و پروتئین‌های ناقل لیپید، پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین می‌باشند. نقش بیولوژیکی تیونین‌ها به عنوان ژنهای دفاعی بخوبی شناخته نشده است. مشاهده شده است که در گیاهان تراریخته با افزایش تیونین‌ها و ویسکوتوکسین‌ها^۶، مقاومت به عوامل بیماری افزایش یافته است. دفنسنین‌ها از لحاظ ساختمانی متمایز از تیونین‌ها می‌باشند. برخی از دفنسنین‌ها بر ریخت‌زایی^۷ تأثیر می‌گذارند و سبب ایجاد انشعابات^۸ در هیف قارچ می‌شوند، در صورتیکه برخی دیگر از رشد هیف جلوگیری می‌کنند. بنظر می‌رسد که دفنسنین‌ها از طریق القاء جذب سریع Ca^{++} و دفع K^{+} در غشاء سلولی قارچ عمل می‌نمایند. پروتئین‌های ناقل لیپید، پلی‌پپتیدهای طولی هستند که به درون دیواره سلولی یا سایر سطوحی که در معرض عامل بیماری می‌باشند ترشح شده و در آنجا تجمع می‌یابند. علت نامگذاری این پروتئین‌ها به عنوان ناقل لیپید توانایی آنها در القاء انتقال دامنه وسیعی از لیپیدها در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) است. نقش ضد میکروبی LTP‌ها در برابر *R.solani* و *T.viride* از طریق بیان این پروتئین‌ها در توتون و آرابیدوپسیس تراریخته به اثبات رسیده است.

¹ Messenger

² Defensin

³ Thionin

⁴ Lipid transfer proteins

⁵ Oxalate oxidase

⁶ Viscotoxin

⁷ Morphogenesis

⁸ Branching

مهندسی مقاومت به بیماری‌ها

به نژادگران سالهای زیادی از خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی به عنوان منبع ژنهای جدید استفاده نموده و در اینکار تبحر یافته‌اند. اکنون با دسترسی به ژنهای R همسانه شده، امکان جدیدی برای انتقال ژنهای R جدید به گیاهان از طریق تراریختی ژنتیکی فراهم آمده است. تا زمانیکه این روش‌ها از لحاظ قابلیت اعتماد، انعطاف‌پذیری و هزینه با روشهای اصلاح نباتات سنتی قابل مقایسه نباشند و یا برتری نداشته باشند، نمی‌توان انتظار داشت که بطور گسترده مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به ظرفیت قوی این روش‌ها در عبور از موانعی همچون تفاوت گونه‌ای و صف آرایشی ژنهای R به فرم دلخواه، بنظر می‌رسد که تراریختی در آینده‌ای نزدیک در برنامه‌های اصلاحی وارد شود.

برای اینکه بتوان از ژنهای R در تراریختی گیاهان استفاده کرد، باید ابتدا آنها را همسانه نمود. یکی از روشهای جداسازی ژنهای R مورد نظر، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است. هرچند که توالی ژنهای مندرج در جدول ۱ بسیار متفاوت بنظر می‌رسند، اما نواحی کوچکی با مشابهت زیاد را می‌توان در توالی‌های اسید آمینه مربوطه شناسایی نمود. در برخی از آزمایشگاه‌ها از آغازگرهای PCR که بر اساس این نواحی بسیار حفاظت شده طراحی شده‌اند به منظور شناسایی ژنهای R استفاده می‌شود. از آغازگرهای مبتنی بر توالی‌های بسیار حفاظت شده بین *RPS2* و *N* به منظور شناسایی برخی از فرآورده‌های PCR از جمله ژنی که دارای پیوستگی بسیار شدیدی با *Gro1* در سیب زمینی است، استفاده شده است. نتایج این تحقیق بویژه از این لحاظ جالب توجه است که ژن *Gro1* نژاد-اختصاصی است که مقاومت در برابر عامل بیماری نماتد سیب زمینی را رمز می‌نماید و هیچ نوع ژن R مربوط به نماتد تاکنون همسانه نگردیده است. اما در حال حاضر نمی‌توان با استفاده از اطلاعات مربوط به توالی اسیدهای آمینه، پیرامون اختصاصیت ژن *Avr* مربوط به همولوگ یک ژن R اظهار نظر نمود. بررسی لینکاژ ژنتیکی یک ناحیه DNA با مکان ژنی که فنوتیپ مقاومت مربوطه را رمز می‌نماید در درجه اول اهمیت قرار دارد، اما ژنهای R اغلب بصورت دستجات بسیار نزدیک به هم^۱ وجود دارند. بنابراین تنها هنگامی می‌توان با اطمینان بیان نمود که یک ژن R، اختصاصیت مفروض را رمز می‌نماید که ژن مربوطه به یک ژنوتیپ حساس منتقل شود و فنوتیپ مقاوم ظاهر گردد (تکمیل عملکردی^۲).

گرچه تکنیک PCR که در فوق اشاره گردید روش بسیار مهمی در جداسازی ژنهای R جدید می‌باشد، اما تمامی ژنهای R تأیید شده که تا کنون همسانه گردیده‌اند، با استفاده از روش‌های

¹ Tight clusters

² Functional complementation

همسانه‌سازی موضعی^۱ و یا از طریق نشانمند کردن توسط ترانسپوزون‌ها^۲ جداسازی شده‌اند. گرچه روش‌های مذکور از لحاظ تکنیکی مشکل می‌باشند، اما پروتکل‌ها و منابع بیولوژیکی در این زمینه رو به بهبود می‌باشند. با کسب دانش بیشتر، سایر روش‌های همسانه‌سازی برای ژنهای R امکان پذیر خواهد شد. یکی از روشهای استاندارد در بیولوژی مولکولی که هم اکنون قابل بکارگیری است عبارتست از غربالگری کتابخانه‌های ژنومی یا cDNA با استفاده از توالی ژنهای R به عنوان کاوشگر^۳. همچنین می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی‌ها برای ژنهای R اختصاصی کلونهایی را از ژنهای همولوگ جداسازی نمود. راه دیگر، جستجوی کامپیوتری پایگاه داده‌ها به منظور شناسایی کلون‌های واجد توالی‌های نشانمند بیان شده و دارای شباهت با ژنهای R شناخته شده می‌باشد و همسانه‌سازی بیان^۴ (تکمیل عملکردی از طریق تراریختی موقت^۵ با کتابخانه‌های ژنومی یا cDNA تصادفی) نیز احتمال دارد امکان پذیر باشد. تمام روش‌های فوق‌الذکر مزایا و معایب مخصوص به خود را دارند، اما برای اینکه همسانه سازی ژنهای R بصورت امری روزمره و معمول درآید لازم است توانایی ما در انجام این روش‌ها بهبود یابد.

یکی از اهداف مهم مهندسی گیاهان در جهت بهبود مقاومت به بیماری، انتقال مقاومت بین گونه‌ها از طریق تراریختی ژنتیکی توسط ژن R بوده است. اینکار با انتقال ژن *Pto* به توتون انجام گرفت. بدیهی است برای اینکه فرآورده ژن R بتواند در گیاه جدید عمل نماید لازم است که با سایر اجزاء دخیل در مکانیسم دفاعی گیاه سازگار باشد. بنابراین نمی‌توان انتظار داشت که انتقال ژنهای R بین گونه‌ها در همه حالات سبب ایجاد مقاومت گردد. به عنوان مثال انتقال *Pro* و *Rfs2* بین گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس منجر به افزایش مقاومت نگردید. گوجه فرنگی و توتون دارای خویشاوندی نزدیکی هستند و علاوه بر انتقال موفقیت آمیز مقاومت ناشی از *Pto* به توتون، حالت عکس آن نیز صادق بوده است بطوریکه مقاومت به ویروس ناشی از *N* در توتون با موفقیت به گوجه فرنگی منتقل گردید.

یکی از موارد استفاده سهل و معمول از ژنهای R عبارتست از تراریختی ارقام مربوط به یک گونه. در حقیقت افزودن مقاومت به گیاهی از گونه مشابه در برخی از حالات با موفقیت توأم بوده است. براساس تاریخچه طولانی موفقیت در افزودن ژنهای R از طریق روشهای سنتی اصلاح نباتات، انتقال ژنهای R به گونه مشابه احتمالا در اکثر حالات موفقیت آمیز خواهد بود. اما، همانطور که در فوق اشاره گردید، استفاده از تراریختی ژنتیکی به منظور صف آرای ژنهای R تنها وقتی نسبت به اصلاح نباتات

¹ Positional cloning

² Transposon tagging

³ Probe

⁴ Expression cloning

⁵ Transient transformation

سنتی قابل ترجیح خواهد بود که به مقدار قابل توجهی سبب صرفه جویی در زمان، کار و تلاش و هزینه گردد و یا به عنوان وسیله‌ای برای اجتناب از ایجاد اختلال در ژنوتیپ‌های توسعه یافته و مطلوب تجاری مد نظر قرار گیرد. هیجان انگیزترین موضوع در زمینه مهندسی مقاومت به بیماری، ایجاد ژنهای R جدید در آزمایشگاه است. این امر در مورد ژنهای بسیار مشابه *Pto* و *Fen* به انجام رسیده و از طریق تعویض حوزه‌ها، ژنهایی با اختصاصیت لیگاندی متضاد حاصل شده است. با کسب دانش بیشتر پیرامون اساس مولکولی شناسایی عامل بیماری و در پی آن، فعال شدن آبشارهای دفاعی راهبردهای معقولتری رواج خواهد یافت. چالش اصلی در اینحالت ایجاد مقاومت اختصاصی جدید نیست بلکه تولید ژنهای R است که بتوانند دامنه وسیعی از ژنوتیپ‌های عامل بیماری را شناسایی نمایند. ژنهای R جدید باید بتوانند درصد بالایی از افراد را در جمعیت عامل بیماری شناسایی نمایند و باید به سمت صفات پایدار عامل بیماری هدف گیری شوند، یعنی صفاتی که حتی در صورت وجود گزینش شدید برای ایزوله‌هایی که غیربیماریزایی نشان نمی‌دهند (ایزوله‌هایی که بیماریزا هستند) حاضر باقی می‌مانند.

در زمینه استفاده از ژنهای R به منظور مهندسی دامنه وسیع‌تر و پایدارتر مقاومت به بیماری دو راهبرد اساسی وجود دارد؛ یکی شناسایی صفاتی از عامل بیماری است که در ایجاد بیماریزایی سهم می‌باشند و در پی آن، تمرکز بر روی همسانه سازی یا طراحی ژنهای R که بر اساس این صفات، قابلیت شناسایی را به گیاه اعطاء می‌نمایند. راهبرد دیگر که پیچیده‌تر است عبارتست از ایجاد گیاهانی که ژن *Avr* عامل بیماری (مانند *Avr9*) را تحت کنترل یک پروموتور هترولوگ القاء شونده در اثر بیماری^۱ بیان می‌کنند. اگر گیاه نیز حامل ژن R مربوطه (مانند *Cf-9*) باشد، در ناحیه‌ای که ژن *Avr* بیان گردیده است واکنش بروز خواهد نمود. این راهبرد بصورت تجربی به اثبات رسیده است و دارای چندین مزیت می‌باشد. اول اینکه اختصاصیت عامل بیماری بسیار گسترده است (مقاومت در برابر هر عامل بیماری که سبب بیان پروموتور انتخابی می‌شود، مؤثر است). دوم اینکه پاسخ دفاعی چند عاملی ناشی از ژنهای R مؤثرتر از بیان یک ژن دفاعی منفرد مانند کیتیناز است. سوم اینکه از لحاظ تئوری، دفاع فقط در بافت‌های آلوده تظاهر می‌یابد. این نکته یک چالش لاینحل است ولی لازم است از یک پروموتور مختص آلودگی^۲ که شدیداً تحت تنظیم است، استفاده شود وگرنه پاسخ دفاعی در بافت نامناسب و یا در مرحله تکوینی نامناسب تظاهر خواهد یافت.

همچنانکه ژنهای R جدیداً طراحی شده، رها گردیده و وارد مزرعه می‌شوند ضروری است راهبردهای قدیمی‌تر اصلاح نباتات و رهاسازی ارقام که موجب افزایش پایداری کنترل بیماری می‌شود مد نظر قرار گیرند. از جمله این روشها می‌توان به هرمی کردن چندین ژن R مختص یک عامل بیماری

¹ Heterologous, infection-inducible promoter

² Infection-specific promoter

(به منظور بهره‌برداری از این واقعیت که احتمال وجود تمامی ژنهای *Avr* مربوطه در عامل بیماری بطور همزمان اندک است)، رهاسازی ارقامی با ژنهای R متفاوت در فصول کشت متناوب، یا کشت مخلوط بذور مقاوم و حساس یا لحاظ کردن کرتهای حساس بطوریکه ژنوتیپ‌های غیربیماریزا در جمعیت عامل بیماری، نسبت به استرین‌های بیماریزا غالب باقی بمانند، اشاره نمود.

منابع مورد استفاده:

1. Alfano, J.R., and Colher, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell* 8, 1683-1698.
2. Crute, IR., and Pink, D.A.C. (1996). Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell* 8, 1747-1755.
3. Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
4. Delaney, T.P., Uknes, S., Vernoolj, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
5. De Wit, P.J.G.M. (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 391-418.
6. Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant MOI. Biol.* 41, 339-367.
7. Dixon, R.A., Harrison, M.J., and Lamb, C.J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501.
8. Gabriel, D., and Rolfe, B. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 6602-6606.
9. 365-391.
10. Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
11. Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24, 447-463.
12. Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell* 8, 1711-1722.
13. Lamb, C.J. (1994). Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell* 76, 419-422.
14. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease response. *Cell* 79, 583-593.
15. Micheltore, R. (1995). Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 393-427.
16. Ryals, J., Lawton, K.A., Delaney, T.P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., and Weymann, K. (1995). Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4202-4205.
17. Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
18. Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D.G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667.
19. Walton, J.D. (1996). Host-selective toxins: Agents of compatibility. *Plant Cell* 8, 1723-1733.