آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۶، شماره‌های ۲ و ۱، ۷۷-۱۳۷۶

بررسی تغییرات پروتئین کل (Total protein) در برگهای گندم در برابر قارچ *Puccinia striiformis*

Study on the total protein changes in the first leaves of two wheat cultivars infected wiht *Puccinia striiformis*

مهوش بهروزین و عباس شریفی تهرانی
دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

تغییرات مقدار کل پروتئین (Total protein) در برگهای اول دو رقم گندم مقاوم (MV17) و حساس (بولانی) پس از مایه زنی با اوردیوسپورهای نژاد 134E150 عامل بیماری زنگ زرد (*Puccinia striiformis*) با استفاده از روش Bradford (1976) در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۰۰، ۱۴۴ ساعت پس از مایه زنی در شرایط گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در زمان ۷۲ ساعت مقدار کل پروتئین در رقم مقاوم مایه زنی شده بیشترین افزایش را داشته، در حالیکه در رقم حساس مایه زنی شده در زمان ۱۰۰ ساعت مقدار کل پروتئین حداکثر افزایش را نشان داده است. در زمان ۱۴۴ ساعت مقدار کل پروتئین در هر دو تیمار مایه‌زنی شده کاهش یافت.

مقدمه

بطور کلی ابتلا گیاهان به بیماریهایی که عامل آنها انگل های اجباری هستند باعث تغییر در سنتز پروتئین گیاه میشود که در مکانیسم مقاومت دخالت دارد. احتمالا مقاومت و یا مصونیت گیاهان با شدت و مقدار سنتز پروتئین میزبانی که تحت تاثیر عامل بیماریزا قرار گرفته، رابطه مستقیم دارد. گزارشات متعددی وجود دارد که نشان میدهد متابولیسم پروتئین در گیاه میزبان پس از ابتلا تغییر یافته است. بروسن و ون‌هادویگر (Broembsen and Von-Hadwiger, 1972) از آزمایش‌های خود روی ارقام مقاوم و حساس کتان به *Melampsora lini* نتیجه گرفتند که در ترکیب سازگار در روزهای اول آلودگی تغییری در مقدار پروتئین میزبان حساس وجود نداشته در

این مقاله قسمتی از رساله دکتری نگارنده اول میباشد

حالیکه در همان زمان در ترکیب ناسازگار در میزبان مقاوم مقدار کل پروتئین افزایش یافته بود. بوشنل (Bushnell, 1989) از تحقیقات خود نتیجه گرفت که در نسوج برگهای رقم مقاوم گندم مایه‌زنی شده با زنگ سیاه *(Puccinia grminis)* مقدار کل پروتئین ۲۵ تا ۵۰ درصد نسبت به رقم حساس افزایش داشت و نتایج این تحقیق مشخص کرد که سنتز پروتئین در ترکیب سازگار کمتر از ترکیب ناسازگار در روزهای اول بعد از آلودگی است. لوول و همکاران (Lowel, *et al.*, 1966) گزارش دادند که مقدار پروئین کل در برگهای جو مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی *Erysiphe graminis* در رقم مقاوم از همان اوایل آلودگی افزایش داشته، در حالیکه در رقم حساس این افزایش پنج روز بعد از مایه‌زنی اتفاق افتاده است. احمد و همکاران (Ahmed *et al.*, 1995) افزایش مقدار کل پروتئین را در ارقام گندم مقاوم به زنگ قهوه‌ای *Puccinia recondita* تا سه روز بعد از مایه‌زنی و کاهش آنرا بعد از این مدت گزارش دادند در حالیکه در رقم حساس تا سه روز بعد از مایه‌زنی تغییری در مقدار کل پروتئین وجود نداشته و از روز پنجم مقدار کل پروتئین افزایش یافته بود. بروز پروتئینهای جدید در میزبان مقاوم که در برابر حمله عامل بیماریزا سنتز شده و در مکانیسم مقاومت دخالت دارند، گزارش و این پروتئین‌ها را پروتئین وابسته یا PRP (Pathogenesis-Related Protein) نام نهاده‌اند (Isaac, 1992).

روش بررسی

۱- بذور گندم مورد استفاده: در این بررسی از رقم بولانی که بومی ایران بوده و در تمام مراحل رشد دارای حساسیت بسیار شدید در برابر تمام نژادهای زنگ زرد است، و از Mv17 که یک رقم مجارستانی بوده و در برابر نژاد فیزیولوژیک زنگ زرد مورد استفاده در این بررسی از خود مقاومت کامل نشان میداد استفاده شد.

۲- نژاد زنگ زرد مورد استفاده: از نژاد فیزیولوژیک 134E150 زنگ زرد که از منطقه مغان جمع‌آوری و خالص شده و دارای قدرت بیماریزایی شدید بود، در این بررسی استفاده شد.

تمام مواد مورد استفاده توسط واحد پاتولوژی غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال وبذر در اختیار نگارندگان قرار گرفت.

این بررسی در شرایط گلخانه با دمای ۱+۱۲ درجه سانتیگراد و نور متناوب (۱۶ ساعت روشنایی ۱۰۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی) و رطوبت ۸۰ درصد انجام گرفت.

۳- تکثیر اسپورهای قارچ عامل بیماری: برای تکثیر قارچ عامل بیماری و به منظور دسترسی دایم به اسپورهای زنگ زرد در طول آزمایش، بذر گندم حساس بولانی در جعبه‌های چوبی حاوی خاک زراعی کشت گردید. پس از اینکه ارتفاع گیاهچه‌های گندم به ۳ سانتی‌متر رسید بمنظور جلوگیری از رشد طولی بوته‌ها و برای استحصال راحت تر اسپورهای زنگ هورمون مالیک هیدرازید به مقدار ۰/۲۵ گرم در یک لیتر آب به خاک جعبه‌ها اضافه شد. پس از رشد برگ اول و ظهور برگ دوم، عمل مایه‌زنی با اسپورهای ۲۴ ساعته زنگ زرد (که در یخچال و در

حرارت ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شده بود) صورت گرفت. پس از مایه‌زنی جعبه ها به گلخانه با دمای ۱+۱۲ درجه سانتیگراد منتقل و روی آنها کیسه پلاستیکی بمنظور ایجاد تاریکی و حفظ رطوبت بمدت ۴۸ ساعت کشیده شد.

۴- نحوه مایه زنی و نمونه برداری: برای مایه زنی از روشی که توسط تعدادی از محققان پیشنهاد شده است استفاده گردید (Broers and Lopez-Atilano, 1994; Griffy & Allan, 1988 Roelfs *et al.*, 1992). بدین ترتیب که ابتدا بذر هر رقم بطور جداگانه در لای کاغذهای واتمن مرطوب در داخل تشتکهای پتری وادار به جوانه زنی شد (بمنظور اطمینان از داشتن بوته در گلدان). پس از ظهور جوانه، با در نظر گرفتن ۴ گلدان برای هر تیمار در هر گلدان تعداد ۱۵ عدد بذر گندم رقم مربوطه کاشته شد و گلدانها در گلخانه با حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از رشد برگ اول و ظهور برگ دوم، عمل مایه زنی گیاهچه‌ها با اوردیوسپورهای زنگ صورت گرفت. نحوه مایه زنی بدین ترتیب بود که با استفاده از مه‌پاش سطح برگ کاملا خیس شده و سپس عمل مایه زنی با اوردیوسپورهای ۲۴ ساعته زنگ زرد با استفاده از چوب گوش پاک کن (Cotton swap) صورت گرفت پس از مایه‌زنی مجدداً مه‌پاشی و پس از آن روی گلدانها سرپوش‌های پلی‌اتیلن شفاف که داخل آنها کاملا خیس شده بود قرار داده و گلدانها به گلخانه با دمای ۱+۱۲ درجه سانتیگراد منتقل و روی آنها بمدت ۴۸ ساعت کیسه مشکی کشیده شد. در مورد گلدانهای شاهد تمام عملیات بالا بجز مایه زنی با اسپورهای قارچ انجام گرفت.

نمونه‌برداری در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۰۰ و ۱۴۴ ساعت بعد از مایه‌زنی صورت گرفت. برای نمونه برداری برگهای اول تکرارهای هر تیمار جدا، با هم مخلوط یک گرم توزین و برای عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت.

۵- استخراج پروتئین عصاره برگی: یک گرم نمونه برگی مربوط به زمان و تیمار معین بطور جداگانه در یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم با pH برابر ۷ به همراه مقداری ماسه شسته شده (Sea Sand Acid Washed) در داخل هاون چینی له و عصاره حاصل به لوله اپندرف منتقل و در ۱۳۰۰۰ دور بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به اپندرف جدید منتقل و رسوب حذف شد.

۶- اندازه گیری پروتئینهای کل: برای اندازه گیری مقدار کل پروتئین از روش برادفورد (Bradford, 1976) بشرح زیر استفاده شد:

ابتدا در لوله‌های آزمایش مقدار ۳ میلی‌لیتر معرف برادفورد ریخته و سپس از عصاره تهیه شده از هر تیمار با زمان مشخص مقدار ۵ میکرولیتر به هر لوله اضافه و پس از اختلاط کامل محتویات هر لوله و انتقال آن به کیووت، مقدار جذب در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای صفر کردن دستگاه از لوله‌های شاهد که شامل فقط معرف برادفورد بود، استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد.

جدول ۱- مقایسه مقدار پروتیئن کل (میلی گرم در یک گرم برگ) در زمانهای مختلف در دو رقم گندم حساس و مقاوم به زنگ زرد

Table 1. Comparison of total protein content (mg/g leaf) at different intervals on two wheat cultivars (resistant and susceptible) to *Puccinia striiformis*.

Time after	Bolani (1)		Mv17 (2)	
inoculation (hr)	uninoculated	inoculated	uninoculated	inoculated
24	A 0.5±0a*	D 0.5±0a*	A 0.44±0a*	B 0.47±0a*
48	A 1.44±0.4c	A 1.3±0.4b	A 1.23±0.4c	A 1.1±0.4c
72	B 1.68±0.07c**	B 1.74±0.76b**	A 0.97±0.07b**	C 2.40±0.07c**
100	B 1.07±0.12b**	D 2.85±0.012c**	A 0.6±0.012a**	C 1.29±0.02a**
144	AB 0.97±0.08b*	A 0.46±0.08a*	C 0.72±0.0.8a*	B 0.6±0.08b*

1- رقم حساس به نژاد *P. striiformis* 134E150

2- رقم مقاوم به نژاد *P. striiformis* 134E150

* اختلاف در سطح ۵٪ معنی دار است

** اختلاف در سطح ۱٪ معنی دار است

- ارقامی که در هر ستون عمودی (زمانها) با یکدیگر اختلاف دارند با حروف کوچک و ارقامی که در هر ردیف افقی (تیمارها) با یکدیگر اختلاف دارند با حروف بزرگ نشان داده شده است.

± انحراف معیار

(1) Susceptible to race 134E150 *Puccinia striiformis*

(2) Resistant to race 134E150 *Puccinia striiformis*

* Significant at 5% level

** Significant at 1% level

Differences between vertical columns showed by small letters and differences between horizontal columns showed by capital letters

± Standard deviation of the mean

نتیجه و بحث

جدول ۱ میانگین مقادیر پروتئین اندازه گیری شده در یک گرم برگ بر حسب میلی گرم در تیمارهای گندم مقاوم و حساس مایه زنی شده و نشده، در زمانهای مختلف و گروه بندی آنها را به روش دانکن نشان میدهد. همانطور که جدول نشان میدهد، در زمان ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی، بین تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دلود و تیمار مقاوم مایه زنی شده دارای بیشترین مقدار پروتئین بوده و خود را از تیمار حساس مایه زنی شده و تیمارهای شاهد

(مقاوم و حساس بدون مایه زنی) کاملا جداکرده است. تیمار حساس مایه زنی شده و شاهد آن (بولانی بدون مایه زنی) در یک گروه قرار گرفتند. در رقم مقاوم شاهد (بدون مایه زنی) مقدار پروتئین کل در زمانهای ۷۲ و ۱۰۰ ساعت بعد از مایه‌زنی نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. در زمان ۱۴۴ ساعت مقدار پروتئین در تیمار مقاوم Mv17 و تیمار حساس مایه زنی شده کاهش یافته و حتی این مقدار کمتر از تیمارهای گروه شاهد بود. افزایش سنتز پروتئین در اوایل آلودگی بمقدار بیشتر و سریع تر در رقم مقاوم مایه‌زنی شده، ارتباط آن را با مقاومت رقم مقاوم Mv17 نشان میدهد. این یافته با نتیجه تحقیقات تعدادی از محققان مطابقت داشته و آنها را تائید میکند. پاتی کوسکی و همکاران (Patykowski *et al.*, 1983) و فلوت و همکاران (Flott *et al.*, 1989) گزارش داده اند که افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارتباط با افزایش مقدار کل پروتئین در رقم مقاوم میباشد. یاماموتو (Yamamoto, 1995) گزارش داده که سنتز پروتئین بمقدار بیشتر و سریع‌تر در ارقام مقاوم، بیانگر مقاومت است و افزایش آن روی رشد عامل بیماری بعد از مایه زنی در گیاه مقاوم دخالت دارد. کلارک و همکاران (Clark *et al.*, 1995) از تحقیقات خود نتیجه گرفته اند که مقاومت لاین‌های ایزوژنیک جو در برابر بیماری سفیدک سطحی نیازمند سنتز بیشتر RNA و ترجمه آن است. به عقیده این محققان تحرک ژنهای مسئول مقاومت نتیجه یک یا چند اخطار بین میزبان و پارازیت است که منجر به افزایش سنتز mRNA و ترجمه آن و تولید پروتئین جدید میشود. با توجه به اینکه در رقم مقاوم Mv17 افزایش کل پروتیئن وجود دارد میتوان نتیجه گرفت که افزایش آن در پاسخ به فاکتورهای تشخیص اختصاصی بین میزبان و عامل بیماری است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری، واحد پاتولوژی غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و بخش بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و سپاسگزاری میشود.

نشانی نگارندگان: دکتر مهوش بهروزین، تهران موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵ و دکتر عباس شریفی تهرانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران- کرج، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس