

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 with *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 اوردیوسپوره‌های 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 گلخانه‌ای 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 انگل‌های اجباری هستند باعث تغییر در سنتز پروتئین گیاه میشود که در مکانیسم مقاومت دخالت دارد. احتمالاً 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.

حالی که 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 graminis*) 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 پروتئین کل در برگهای جو مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی *Erysiphe graminis* در رقم مقاوم از همان اوایل آلودگی افزایش داشته، در حالی که 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 حالی که 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 و بذر در اختیار نگارندگان قرار گرفت.

این بررسی در شرایط گلخانه با دمای 12 ± 1 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 داریم به اسپورهای زنگ زرد در طول آزمایش، بذور 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 جعبه‌ها به گلخانه با دمای ۱۲+۱ درجه سانتیگراد منتقل و روی آنها کیسه پلاستیکی بمنظور ایجاد تاریکی و حفظ رطوبت بمدت ۴۸ ساعت کشیده شد.

۴- نحوه مایه‌زنی و نمونه برداری: برای مایه‌زنی 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 مایه‌زنی گیاهچه‌ها با اوردیوسپوره‌های زنگ صورت گرفت. نحوه مایه‌زنی بدین ترتیب بود که با استفاده از مه‌پاش سطح برگ کاملاً خیس شده و سپس عمل مایه‌زنی با اوردیوسپوره‌های ۲۴ ساعته زنگ زرد با استفاده از چوب‌گوش پاک‌کن (Cotton swap) صورت گرفت پس از مایه‌زنی مجدداً مه‌پاشی و پس از آن روی گلدانها سرپوش‌های پلی‌اتیلن شفاف که داخل آنها کاملاً خیس شده بود قرار داده و گلدانها به گلخانه با دمای ۱۲+۱ درجه سانتیگراد منتقل و روی آنها بمدت ۴۸ ساعت کیسه مشکی کشیده شد. در مورد گلدانهای شاهد تمام عملیات بالا بجز مایه‌زنی با اسپوره‌های 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 برگ: 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- اندازه‌گیری پروتئینهای کل: برای اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین از روش برادفورد (Bradford, 1976) بشرح زیر استفاده شد:

ابتدا در لوله‌های آزمایش مقدار ۳ میلی لیتر 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 کیبوت، 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 پروتئین 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 inoculation (hr)	Bolani (1)		Mv17 (2)	
	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*

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

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

* اختلاف در سطح ۰.۵٪ معنی دار است

** اختلاف در سطح ۰.۱٪ 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 مایه زنی، بین تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود دارد و تیمار مقاوم مایه زنی شده دارای بیشترین مقدار پروتئین بوده و خود را از تیمار حساس مایه زنی شده و تیمارهای شاهد