فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.14382.1358

کاربرد الکتروفورز دوبعدی در شناسایی منابع مقاومت و حساسیت بیماری زنگ زرد (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* West.) در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

Application of Two-dimensional Electrophoresis to Identify the Resistance and Sensitivity Sources of Yellow Rust Disease (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* West.) in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)

مهدی کاکایی*

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۴

چکیده

بیماری زنگ زرد گندم ازجمله تنش‌های زیستی است که همه‌ساله کشاورزان زیادی را متحمل خسارت می‌نماید. مطالعه حاضر برای بررسی پاسخ پروتئینی گیاه گندم در حضور و عدم حضور بیماری زنگ زرد با کمک روش الکتروفورز دوبعدی صورت پذیرفت. شاخص‌های مقاومت نسبی شامل تیپ آلودگی، شدت بیماری، ضریب آلودگی، سطح زیر منحنی توسعه بیماری و نرخ آلودگی ظاهری ازجمله شاخص‌هایی هستند که برای شناسایی مقاومت یا حساسیت ارقام مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند در این مطالعه، ابتدا شاخص‌های مذکور برای ۱۴ رقم گندم نان طی سه قرائت ۷ روزه به‌دست آمدند. ارقام با استفاده از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر شاخص‌های مقاومت، به سه گروه حساس، مقاوم و نیمه‌مقاوم تقسیم، دو رقم پیشگام و شهریار به‌ترتیب به‌عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام شناخته شدند. تغییرات در الگوی بیان پروتئین‌ها با استفاده از روش الکتروفورز دوبعدی در دو رقم مذکور موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد، که از مجموع ۴۴۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر، ۲۷ لکه پروتئینی، تغییر بیان نشان دادند. از کل پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار، ۱۷ لکه دچار افزایش بیان و ۱۰ لکه دچار کاهش بیان شدند. به‌طورکلی، نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که تفاوت در الگوی پروتئوم دو رقم مقاوم و حساس گندم می‌تواند تغییر در میزان بیان آنزیم‌ها و پروتئین‌های درگیر در مقاومت را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین محلول، بیماری، حساسیت، مقاومت نسبی

*: استادیار اصلاح‌نباتات بخش کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران (Email: M_Kakaei@pnu.ac.ir)

مقدمه

بیماری زنگ زرد گندم *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های غلات و ازجمله تنش‌های زیستی است *اخوت* (Ekhvat, 2003) که آسیب جدی به ارقام حساس وارد کرده و مبارزه جدی و اصولی را طلب می‌کند. استفاده از مقاومت و ارقام مقاوم، اساسی‌ترین راه مبارزه با این بیماری است *زهراوی* و همکاران (Zahravi *et al.*, 2011). مقاومت نسبی در مزرعه از طریق اندازه‌گیری شاخص‌هایی مانند شدت بیماری *پارلیولیت* (Parlevliet, 1988)، سطح زیر منحنی توسعه بیماری *ویلکاکسون* و همکاران (Wilcoxson *et al*., 1975)، نرخ آلودگی *برویرس* و همکاران (Broers *et al*., 1996) و ضریب آلودگی *پاتان و پارک* (Pathan and Park, 2006) قابل ارزیابی است (زهراوی و همکاران ۱۳۹۱). شدت بیماری (نسبتی از برگ است که به زنگ آلوده شده)، یکی از معیارهایی است که توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تحقیقی *علی* و همکاران (Ali *et al*., 2007)، زنگ‌زدگی تدریجی را از طریق ارزیابی مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری AUDPC، نرخ آلودگی و شدت آلودگی نهایی مورد مطالعه قرار دادند. سطح مقاومت نسبی در مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های اصلاحی را می‌توان در قالب زنگ‌زدگی تدریجی مطالعه کرد که از طریق کاهش AUDPC، نرخ آلودگی و شدت آلودگی نهایی سبب کاهش توسعه اپیدمی در طول فصل می‌شود (*علی* و همکاران، 2007؛ *برویرس* و همکاران، 1996). اما مقاومت نسبی که فقط یک‌بار در طول فصل ارزیابی شود را می‌توان از طریق ضریب آلودگی و متوسط ضریب آلودگی تعیین کرد (*پاتان* و *پارک*، 2006). ضریب آلودگی رایج‌ترین معیاری است که توسط پژوهشگران گوناگون به‌منظور ارزیابی زنگ زرد مورد استفاده قرار می‌گیرد *شاه* و همکاران (Shah *et al*., 2003). در تحقیقی زهراوی و همکاران (۱۳۹۱)، نشان دادند که تمام اجزای مقاومت نسبی به نوبه خود دارای اهمیت هستند و AUDPC دارای رابطه خوبی با سایر اجزای مقاومت بود که می‌تواند به‌عنوان معیار مناسبی برای برآورد مقاومت نسبی به کار رود.

نتیجه برهمکنش گیاه با عوامل بیماری‌زا، القا بیان ژن‌ها و سپس پروتئین‌های درگیر در مقاومت و در نتیجه کاهش زخم و آسیب توسط بیمارگر می‌باشد. با شناخت پروتئین‌های مؤثر در ایجاد تحمل و مقاومت در گیاه نسبت به تنش، می‌توان در مراحل آتی اقدام به شناسایی ژن‌های کدکننده آن نمود تا در تحقیقات مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان متحمل در برابر بیماری مورداستفاده قرار گیرد. چندین گروه پروتئین دفاعی در گیاهان مشخص شده است *باویرس* (Bowers, 1980). این پروتئین‌ها پس از واردآمدن آسیب به گیاه یا در واکنش به حمله آفات در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابند. برخی از پروتئین‌های دفاعی گیاهی فقط به‌صورت موضعی در محل زخم تولید می‌شوند، درحالی‌که واکنش‌های سیستمیک دیگری منجر به توزیع و تجمع این پروتئین‌ها در سرتاسر گیاه می‌شود *کافی و مهدوی‌دامغانی* (Kafie and Mahdavi-Damghani, 2007). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی یا PRPها دسته‌ای از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند که در اثر حمله پاتوژن‌ها و یا مواد مرتبط با بیمارگر در گیاه تولید می‌شوند. این پروتئین‌ها به‌صورت موضعی و سیستمیک در گیاه و در نتیجه برهمکنش‌های سازگار جزئی و ناسازگار ایجاد می‌گردند *گده‌کهریز* و *پارموون* (Gade-Kahriz and Parmoon, 2015). تولید PRPها از جمله راهکارهای مهم گیاهان برای مقابله با بیماری است که میزان آن‌ها در پاسخ به تنش یا حمله بیمارگرها به میزان زیادی افزایش می‌یابد *وان‌لوون* و همکاران (Van loon *et al*., 2006). با استفاده از پروتئومیکس می‌توان هزاران پروتئین متفاوت را جداسازی و اطلاعاتی نظیر نقطه ایزوالکتریک پروتئین، وزن مولکولی و مقدار هر پروتئین را تعیین نمود. *امینی* و *احسانپور* (Amini and Ehsanpour, 2009)، این تکنیک تنها روش توانمندی است که قادر به شناسایی و تعیین تغییرات پس از ترجمه ژنوم است. هم‌چنین ابزاری مناسب جهت مطالعه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌ها است *زیوای* و *دی واینی* (Zivy and de Vienne, 2000). پروتئین‌ها نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاهان به تنش ایفا می‌کنند چرا که در تغییرات ساختاری و هم تغییرات متابولیکی گیاه نقش دارند *ولیزاده‌کامران* و همکاران (Valizadeh-Kamran *et al*., 2015). *برنباوم* (Berenbaum, 1995) اثبات نمود که متابولیت‌های اولیه نیز بر ترجیح و عملکرد آفات و بیماری‌ها روی گیاهان اثر می‌گذارند. به عبارت دیگر نسبت اسیدهای آمینه خاص و پروتئین‌ها را می‌توان یک فاکتور دفاعی در نظر گرفت *گرین* و *ریان* (Green and Ryan, 1972). زهراوی و همکاران (۱۳۹۱)، در ارزیابی مزرعه‌ای مقاومت نسبی و روابط بین اجزای مقاومت به بیماری زنگ زرد، ژرم‌پلاسم گندم نان را به دو گروه حساس و دارای مقاومت نسبی دسته‌بندی نمودند. با اتخاذ سیاست‌های نوین در بخش کشاورزی در توسعه و کاربرد روش‌های کنترل تلفیقی بیماری‌ها، ترویج روش‌هایی مانند کاربرد ارقام مقاوم، همچنین، گرایش عمومی جامعه به تهیه محصولات کشاورزی با به‌کارگیری حداقل سموم و کودهای شیمیایی می‌توان توسعه ارقام مقاوم را از استراتژی‌های راهبردی دانست. این مطالعه با

هدف کلی بررسی شاخص‌های مقاومت نسبی برخی ارقام گندم نان و شناسایی ارقام با مقاومت نسبی بالاتر به‌منظور استفاده کاربردی از آن‌ها در برنامه‌های مدیریت بیماری زنگ زرد انجام گرفت. هم‌چنین در این مطالعه از تکنیک الکتروفورز دوبعدی جهت مقایسه پروتئین‌های بیان شده استفاده گردید که به‌عنوان منابع مقاوم و حساس به زنگ زرد در ارقام مقاوم و حساس به این بیماری در گندم نان می‌باشند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورداستفاده

مقاومت ۱۴ رقم گندم تهیه شده از مرکز تحقیقات همدان با اسامی بزوستایا، پیشگام، سایسون، گاسکوژن، شاهپسند، میهن، امید، نوید، بک‌کراس روشن زمستانه، زارع، سرخ تخم، شهریار، توس و الوند به بیماری زنگ زرد موردارزیابی قرار گرفت. ارزیابی مقاومت در مزرعه دانشگاه پیام‌نور اسدآباد در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ انجام گرفت. آزمایش به‌صورت طرح بلوک تصادفی با سه تکرار انجام شد. کشت بذور ارقام مورد مطالعه به‌صورت کرت‌هایی ردیفی با طول و عرض ۲ × ۲ و فاصله ۱/۵ متر بین کرت‌ها صورت گرفت.

مقایسه میزان حساسیت یا مقاومت ارقام موردمطالعه بر اساس شاخص‌ها

واکنش ارقام مختلف روی برگ پرچم در سه نوبت هفت روزه یادداشت‌برداری شد. تیپ آلودگی یا IT (IT1، IT2 و IT3 به‌ترتیب مربوط به سه نوبت یادداشت‌برداری) براساس مقیاس تغییریافته کاب، *پیترسون* و همکاران (Peterson *et al*., 1948) (جدول ۱) به ثبت رسید. بر اساس این مقیاس O نشان‌دهنده مصون، R فقدان جوش و وجود برخی نواحی نکروتیک، MR جوش‌های کوچک با اسپورزایی، کلروزیس و نکروزیس مختصر، MR-MS جوش‌های کوچک تا متوسط با اسپورزایی متوسط تا سنگین با احتمال مشاهده مقداری کلروزیس، MS جوش‌های متوسط با اسپورزایی متوسط با احتمال وجود مقداری کلروزیس و در نهایت S نشان‌دهنده جوش‌های بزرگ با اسپورزایی فراوان بودند.

جدول ۱: شاخص‌های تیپ آلودگی و ضرایب آلودگی و علائم اختصاری آن‌ها براساس مقیاس تغییریافته کاب (*پترسون* و همکاران، 1948)

Table 1: Infection type and Coefficient of Infection and their abbreviated signs based on the modified Cobb scale (Peterson *et al.*, 1948)

ردیف Row	علائم اختصاری Abbreviated signs	تیپ آلودگی Infection type	ضریب آلودگی Coefficient of Infection
1	O	مصون Safe	0
2	R	فقدان جوش و وجود برخی نواحی نکروتیک The absence of boils and the presence of some necrotic areas	0.2
3	MR	جوش‌های کوچک با اسپورزایی، کلروزیس و یا نکروزیس مختصر Small sores with abbrevated sporulation, chlorosis or necrosis	0.4
4	MR-MS	جوش‌های کوچک تا متوسط با اسپورزایی متوسط تا سنگین با احتمال مشاهده مقداری کلروزیس Small to medium sores with moderate sporulation and the possibility of observing some chlorosis	0.6
5	MS	جوش‌های متوسط با اسپورزایی متوسط و احتمال وجود مقداری کلروزیس Medium sores with moderate sporulation and the possibility of observing some chlorosis	0.8
6	S	جوش‌های بزرگ با اسپورزایی فراوان Large sores with plenty of sporulation	1

شدت بیماری (DS1، DS2 و DS3) به‌ترتیب مربوط به نوبت یادداشت‌برداری) نیز با استفاده از محاسبه درصدی از سطح برگ که به‌وسیله زنگ زرد پوشیده شده به ثبت رسید *رویلفس* و *بیوشنیل* (Roelfs and Bushnell, 1985).

سطح زیر منحنی توسعه بیماری یا AUDPC با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد *میلوس* و *لاین* (Milus and Line, 1986):

$$AUDPC = \left[\sum_{i=1}^{k} 1/2\left(x_{i+1} + x_i\right)\right]\left(t_{i+1} - t_i\right)$$

که در آن k، t و x به‌ترتیب عبارت از تعداد دفعات قرائت آلودگی، تاریخ قرائت و درصد بیماری هستند. AUDPC1، AUDPC2 و AUDPC3 به‌ترتیب سطح زیر منحنی بین تاریخ یادداشت‌برداری اول و دوم، دوم و سوم و کل می‌باشند (زهراوی و همکاران، ۱۳۹۱).

ضریب آلودگی یا CI (CI1، CI2 و CI3 به‌ترتیب مربوط به سه نوبت یادداشت‌برداری) براساس مقیاس *استوبس* و همکاران (Stubbs *et al.*, 1986) و حاصلضرب شدت بیماری در تیپ آلودگی به‌دست آمد (زهراوی و همکاران، ۱۳۹۱).

نرخ آلودگی ظاهری یا r نیز از رابطه زیر به‌دست آمد *واندرپلانک* (Vanderplank, 1963):

$$r = \frac{2.3}{t_2 - t_1} \log_{10} \frac{x_2(1-x_1)}{x_1(1-x_2)}$$

که r1، r2 و r3 به‌ترتیب نرخ آلودگی ظاهری برای نوبت اول و دوم، دوم و سوم، اول و سوم یادداشت‌برداری نیز به‌دست آمد (زهراوی و همکاران، ۱۳۹۱).

بررسی و مقایسه الگوی پروتئینی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم مورد مطالعه

به‌منظور بررسی میزان و نوع بیان پروتئین‌ها در رقم مقاوم پیشگام و رقم حساس شهریار مطالعات الکتروفورز دوبعدی صورت گرفت. بافت‌های سبز بخش‌های هوایی در هر دو رقم به‌طور هم‌زمان برداشت و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۵ گرم از هر نمونه برگی در هاون چینی در حضور نیتروژن مایع، به‌طور کامل آسیاب شد و پودر یکنواختی حاصل گردید. استخراج پروتئین از بافت برگ براساس روش *دامراول* و همکاران (Damerval *et al.*, 1986) با اندکی تغییر انجام شد. ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر حاصل، به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل شد. پنج برابر حجم نمونه گیاهی محلول استخراج تری کلرواستیک اسید ده درصد، در استونی که قبلاً در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس سرد شده بود، به پودر حاصله اضافه گردید و بافت له شده چندین بار ورتکس (تکانده) گردید. سپس به‌مدت یک ساعت در ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. نمونه‌های پروتئینی به سانتریفیوژ یخچال‌دار منتقل و در دمای سانتریفیوژ (۴ درجه سلسیوس) به مدت ۱۵ دقیقه با دور g×۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با دقت دور ریخته شد و به رسوب باقی‌مانده در میکروتیوب، محلول شستشو (۵۰ میلی‌لیتر استون به‌علاوه ۰/۱۵ گرم DTT) اضافه گردید. مواد باقی‌مانده در میکروتیوب به شکل سوسپانسیون درآمد. سپس میکروتیوب‌های حاوی پروتئین به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند تا پروتئین‌های موجود در میکروتیوب (که مجدد سانتریفیوژ شده‌اند) به‌طور کامل رسوب کنند. در نهایت، نمونه‌های پروتئینی در دمای ۴- درجه سلسیوس خشک شد. به‌منظور تعیین بهینه pH مورد نیاز، از استریپ‌هایی با pH خطی ۷-۴ استفاده شد. سپس، میزان ۳۶۰ میکرولیتر از محلول متورم‌سازی (شامل اوره، CHAPS، برموفنل بلو، آب دیونیزه) به همراه ۰/۸ میلی‌گرم پروتئین در سینی متورم‌سازی قرار گرفت. IPG Buffer و DTT بلافاصله قبل از استفاده به محلول متورم‌سازی اضافه شدند و ژل نواری (Strip IPG) روی محلول حاوی پروتئین قرار گرفت. پس از آماده‌شدن دستگاه، ژل متورم‌شده در محل مربوطه در تانک الکتروفورز دستگاه مولتی‌فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس (Amersham Bioscience) قرار گرفت و برنامه آن به‌صورت گرادینت تنظیم گردید. در این مطالعه جهت الکتروفورز یک ژل ۱۸ سانتی‌متری با pH دامنه ۴ تا ۷، به‌طور متوسط نیاز به ۵۹ هزار ولت ساعت بود. این انرژی طی شش مرحله (جدول ۲) تأمین گردید. سپس، نوار IPG طی دو مرحله در محلول متعادل‌کننده قرار داده شد. این محلول (شامل گلیسرول ۳۰٪، اوره ۶ مولار، تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷، SDS ۴٪، DTT ۱٪، برموفنول‌بلو ۰/۰۰۲٪) به دو قسمت مساوی ۵ میلی‌لیتری تقسیم و در لوله آزمایش درپوش‌دار ریخته شد. نوارهای IPG در محلول متعادل‌سازی اول که حاوی DTT ۱٪ بود گذاشته و به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس محلول اول کاملاً دور ریخته شد و نوارها با آب مقطر دوبار تقطیر شسته شدند. بعد از این مرحله، نوارها در محلول دوم متعادل‌سازی (حاوی یدواستامید ۵٪ وزنی/حجمی به‌جای DTT) و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. ژل‌ها پس از آماده شدن با دستگاه اسکنر مدل Image Scanner III ساخت شرکت فارماسیا با فرمت Tiff اسکن و ذخیره شدند. مقایسات برای دو رقم مقاوم پیشگام و حساس شهریار انجام گرفت. برای بررسی کمّی و کیفی لکه‌های پروتئینی بیان شده در ژل‌های دوبعدی اسکن شده، از نرم‌افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.2 (Gene Bio, Geneva, Switzerland) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از انتخاب لکه‌ها روی ژل‌ها در نرم‌افزار، لکه‌ها به‌طور اتوماتیک در ژل‌های مختلف با هم جفت شدند. سپس تفاوت‌های بین لکه‌های دو تیمار متفاوت با

استفاده از مقایسه درصد حجمی لکه‌ها و آزمون آماری T-test توسط نرم‌افزار محاسبه شد. هم‌چنین به‌منظور تعیین میزان کاهش و یا افزایش بیان پروتئین‌ها در دو رقم، میانگین درصد حجمی هر لکه در رقم مقاوم به میانگین درصد حجمی همان لکه در رقم حساس تقسیم و به‌عنوان شاخص تغییرات بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲: برنامه الکتروفورز IEF برگ گندم نسبت به زنگ زرد گندم

Table 2: IEF electrophoresis program of wheat leaf against wheat yellow rust

ردیف Row	مراحل Stage	ولتاژ (ولت) Voltage (V)	زمان (ساعت) Time (h)	توان (وات) Power (w)	جریان (میلی‌آمپر) Current (mA)
1	Gradiant	500	1	5	2
2	Stop	500	1	5	2
3	Gradiant	3000	1	5	2
4	Stop	3000	2	5	2
5	Gradiant	8000	4	5	2
6	Stop	8000	3	5	2

ایزو الکتریک فوکوسینگ

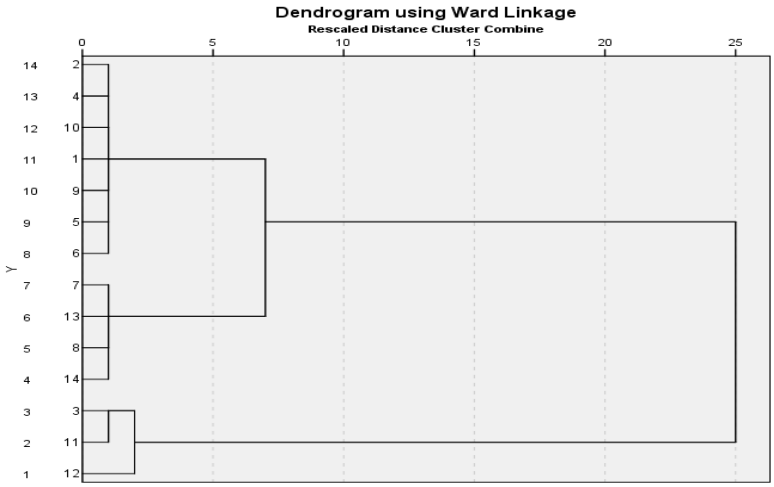
IEF: Isoelectric focusing

نتایج

مقایسه میزان حساسیت یا مقاومت ارقام مورد مطالعه بر اساس شاخص‌ها

تجزیه آماری نتایج حاصل از بررسی مقاومت یا حساسیت ۱۴ رقم گندم نان نسبت به زنگ زرد نشان داد که بین ارقام از نظر تیپ آلودگی، شدت بیماری، ضریب آلودگی و سطح زیر منحنی توسعه بیماری طی سه مرحله قرائت در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). ارقام موردمطالعه از نظر نرخ آلودگی ظاهری طی قرائت سوم دارای اختلاف معنی‌دار بودند. اما در قرائت اول و دوم هیچ اختلاف معنی‌داری از این نظر مشاهده نشد. بر این اساس، رقم شهریار از نظر تیپ آلودگی طی مرحله قرائت اول دارای بیش‌ترین مقدار و ارقام بزوستایا، پیشگام، گاسکوژن، بک‌کراس روشن زمستانه و زارع دارای کم‌ترین مقدار بودند. رقم شهریار هم‌چنین در قرائت‌های دوم و سوم، بیش‌ترین مقدار را از نظر تیپ آلودگی دارا بود و رقم پیشگام در قرائت دوم و ارقام پیشگام و گاسکوژن در قرائت سوم دارای کم‌ترین مقدار بودند (جدول ۴). ارقام مورد مطالعه گندم از نظر شدت بیماری نیز دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بر این اساس، رقم شهریار طی قرائت اول دارای بیش‌ترین مقدار و ارقام پیشگام، گاسکوژن، بک‌کراس روشن زمستانه و زارع دارای کم‌ترین مقادیر شدت بیماری بودند. طی مراحل قرائت دوم و سوم نیز به‌ترتیب رقم شهریار بیش‌ترین مقدار و ارقام پیشگام و گاسکوژن کم‌ترین مقادیر را دارا بودند (جدول ۴). یک اختلاف معنی‌دار در ارقام موردمطالعه از نظر ضریب آلودگی نیز مشاهده گردید که براساس آن، مانند سایر شاخص‌ها طی قرائت اول رقم شهریار دارای بیش‌ترین مقدار و ارقام پیشگام، گاسکوژن، بک‌کراس روشن زمستانه و زارع دارای کم‌ترین مقادیر بودند. طی قرائت‌های دوم و سوم نیز، ژنوتیپ‌ها از نظر ضریب آلودگی دارای اختلاف معنی‌دار بودند. همان‌طورکه از جدول ۳ مشاهده می‌شود، رقم شهریار طی این دو مرحله قرائت، دارای بیش‌ترین مقدار و ارقام بزوستایا، پیشگام، گاسکوژن و زارع دارای کم‌ترین مقادیر بودند. با توجه به جدول ۲، ارقام موردمطالعه از نظر سطح زیر منحنی توسعه بیماری دارای اختلاف معنی‌دار بودند. براساس جدول ۳، مانند سایر شاخص‌ها رقم شهریار طی سه مرحله قرائت دارای بیش‌ترین مقدار و ارقام پیشگام، گاسکوژن و زارع دارای کم‌ترین مقادیر بودند. نرخ آلودگی نیز که در بین ارقام مورد مطالعه فقط طی قرائت سوم دارای اختلاف معنی‌دار بود، در رقم شهریار دارای بیش‌ترین مقدار و در رقم سرخ‌تخم دارای کم‌ترین مقادیر بود.

به‌طورکلی، براساس نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای شاخص‌های مقاومت نسبی ۱۴ رقم گندم موردمطالعه، ارقام گندم در سه سطح مقاومتی به‌صورت زیر دسته‌بندی شدند: ارقام سایسون، سرخ‌تخم و شهریار در گروه ارقام حساس، ارقام امید، توس، نوید، الوند در گروه ارقام نیمه‌مقاوم و سایر ارقام به‌عنوان ارقام مقاوم شناخته شدند (شکل ۱). این دسته‌بندی در فاصله ۵ صورت گرفت. در این بین، ارقام شهریار و پیشگام به‌ترتیب به‌عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم شناخته شدند.



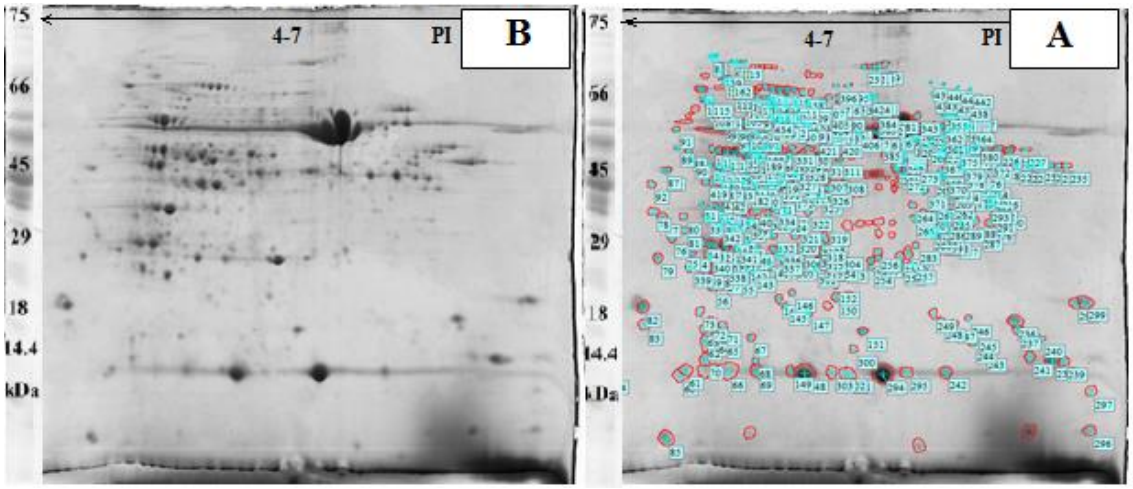
شکل ۱: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۴ رقم گندم مورد مطالعه براساس شاخص‌های مقاومت نسبی نسبت به زنگ زرد گندم

Fig. 1: The dendrogram of cluster analysis of 14 wheat cultivars studied based on the moderate resistance to wheat yellow rust

بررسی و مقایسه الگوی پروتئینی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم موردمطالعه

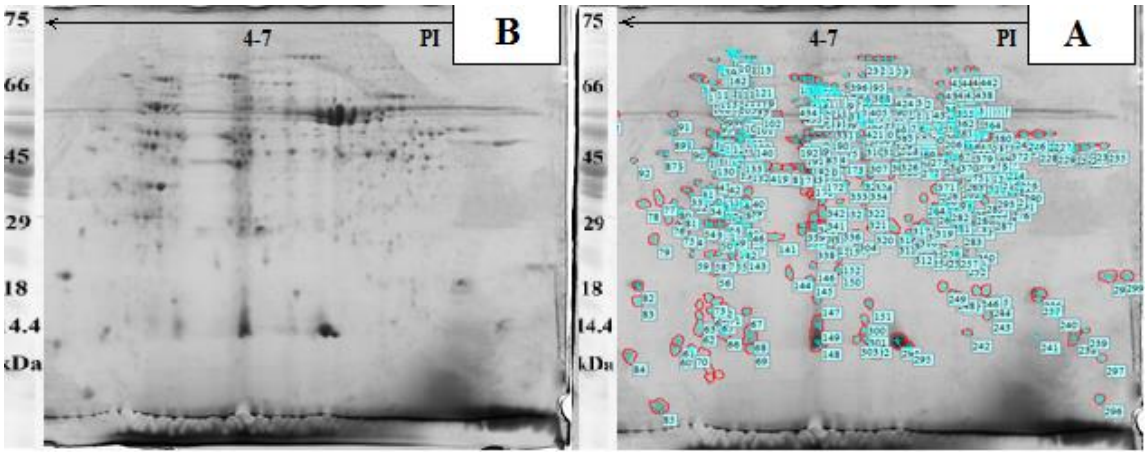
در این مطالعه، تغییرات در بیان پروتئین‌های دو رقم حساس شهریار و مقاوم پیشگام گندم نسبت به زنگ زرد که براساس شاخص‌های مقاومت نسبی و نسبت به سایر ارقام موردمطالعه حساس و مقاوم شناخته شدند، با استفاده از ژل‌های الکتروفورز دوبعدی بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه آماری نشان داد، که از مجموع ۴۴۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر، ۲۷ لکه پروتئینی، تغییر بیان نشان دارند (جدول ۵). از کل پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار، ۱۷ لکه دچار افزایش بیان و ۱۰ لکه دچار کاهش بیان شدند (شکل‌های ۲ و ۳).

همان‌طورکه در شکل‌های ۲ و ۳ قابل مشاهده است و نیز براساس جدول ۵، بیشتر لکه‌های پروتئینی پس از آلودگی به زنگ دچار افزایش بیان شده‌اند. هرچه این نسبت بزرگ‌تر از یک باشد، نشان‌دهنده افزایش بیان آن لکه پروتئینی نسبت به رقم دیگر و هرچه این شاخص کوچک‌تر از یک باشد به معنای کاهش بیان لکه مورد نظر است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، در مرحله‌ای که زنگ زرد گندم بیش‌ترین خسارت را به رقم حساس شهریار وارد نموده، پروتئین‌ها در برگ رقم مقاوم نسبت به رقم حساس افزایش یافته است که می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که در واقع در رقم مقاوم با بیان بیشتر برخی پروتئین‌ها سعی در حفاظت از گیاه در برابر این بیماری بوده است و شاید علت مقاومت رقم پیشگام بیان همین پروتئین‌ها باشد که به مقدار بیشتری نسبت به رقم حساس شهریار بیان شده‌اند. البته توالی‌یابی این لکه‌های پروتئینی برای صحه گذاشتن این ادعا لازم می‌باشد.



شکل ۲: الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی از برگ گندم رقم حساس شهریار، A) ژل قبل از آنالیز با نرم‌افزار ملانی و B) ژل بعد از آنالیز

Fig. 2: The pattern obtained from two-dimensional electrophoresis of extracted proteins from wheat leaves of susceptible cultivar of Shahriar, A) Gel before analysis with Melanie software, and B) Gel after analysis



شکل ۳: الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی از برگ گندم رقم مقاوم پیشگام، A) ژل قبل از آنالیز با نرم‌افزار ملانی و B) ژل بعداز آنالیز

Fig. 3: A pattern of two-dimensional electrophoresis of extracellular proteins from wheat leaves of resistant cultivar of Pishgam, A) Pre-analysis gel with Melanie software, and B) Post-analysis gel

جدول ۳: تجزیه واریانس شاخص‌های مقاومت به زنگ زرد گندم در ۱۴ رقم گندم مورد مطالعه

Table 3: Analysis of variance of wheat yellow rust resistance indices in studied 14 wheat cultivars

شاخص‌ها Indicators	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	F	سطح معنی‌داری Significant level
IT1	13	4.814	10.212	0.000
IT2	13	8.215	14.377	0.000
IT3	13	13.059	27.288	0.000
DS1	13	1753.846	13.043	0.000
DS2	13	212.679	15.320	0.000
DS3	13	4324.945	56.194	0.000
CI1	13	0.193	10.212	0.000
CI2	13	0.329	14.377	0.000
CI3	13	0.521	28.952	0.000
AUDPC1	13	118483.413	14.983	0.000
AUDPC2	13	182997.837	31.652	0.000
AUDPC3	13	591716.731	22.589	0.000
R1	13	0	1.247	0.273
R2	13	0	1.203	0.302
R3	13	0	2.195	0.022

جدول ۴: مقایسه میانگین شاخص‌های مقاومت به زنگ زرد گندم در ۱۴ رقم گندم موردمطالعه

Table 4: Comparison of Wheat Yellow Rust Resistance Indices in studied 14 wheat cultivars

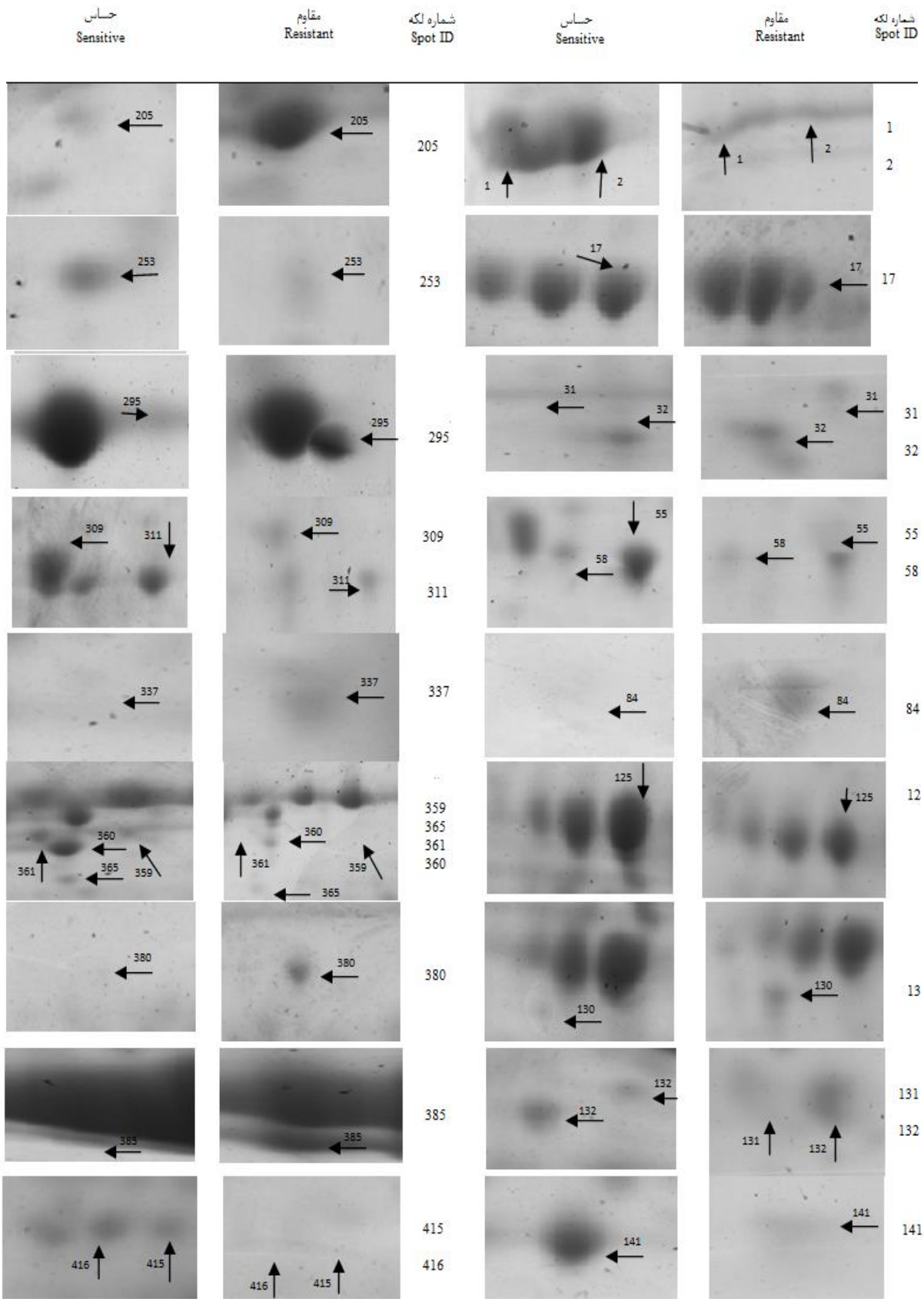
ارقام Cultivars	IT			DS			CI			AUDPC			r		
	IT1	IT2	IT3	DS1	DS2	DS3	CI1	CI2	CI3	AUDPC1	AUDPC2	AUDPC3	r1	r2	r3
بزوستایا Bosotya	1.2 ±0.2d	1.4 ± 0.24h	1.8 ± 0.2efg	3c	4f	14ef	0.12d	0.32h	2.24eh	24.5 f	63g	87.5ef	0.016	0.029	0.217ab
پیشگام Pishgam	1.2 ± 0.2d	1.2 ± 0.2h	1.4 ± 0.24g	2c	3f	4f	0.08d	0.32h	0.24h	21f	24.5g	42f	0.039	0.016	0.099ab
سایسون Syson	3 ± 0.44bc	4 ± 0.44bc	5.2 ± 0.37a	33b	55bc	69b	13.2bc	33bc	57.96b	308bc	434b	742b	0.002	0.001	0.105bc
گاسکوژن Gascogen	1.2 ± 0.2d	1.4 ± 0.24h	1.4 ± 0.24g	2c	4f	4ef	0.08d	0.32h	0.32h	21f	28g	49f	0.05	0	0.099ab
شاهپسند Shapesand	1.4 ± 0.24d	2 ± 0.31efgh	2.4 ± 0.24def	6c	12ef	16e	0.48d	2.4efgh	4.48de	63ef	98fg	161def	0.01	0.003	0.138ab
میهن Maihan	1.6 ± 0.24d	1.8 ± 0.2fgh	2.6 ± 0.24de	6c	8f	12ef	0.72d	1.28fgh	3.84de	49f	70g	119ef	0.009	0.006	0.099ab
امید Omid	2.2 ± 0.37cd	3.2 ± 0.37cd	4.2 ± 0.37b	18c	39cd	48c	4.32cd	17.16cd	30.72b	199.5cd	304.5cd	504c	0.006	0.001	0.138bc
نوید Navid	1.8 ± 0.37d	2.8 ± 0.37def	3.2 ± 0.37cd	12c	30de	31d	1.92d	10.8def	13.64cd	147def	213.5de	360.5cd	0.006	0.001	0.135bc
بک‌کراس روشن زمستانه Back cross roshan zemestane	1.2 ± 0.2d	1.6 ± 0.24gh	1.8 ± 0.37efg	2c	6f	7ef	0.08d	0.72gh	1.12ef	28f	45.5g	73.5f	0.07	0.003	0.178a
زارع Zare	1.2 ± 0.2d	1.4 ± 0.4h	1.6 ± 0.4fg	2c	4f	6ef	0.08d	0.32h	0.48h	21f	35g	56f	0.05	0.09	0.155ab
سرخ‌تخم Sorkh tokhm	3.4 ± 0.4b	4.4 ± 0.4b	5.6 ± 0.24a	44b	64ab	78ab	21.12b	43.52b	71.76a	378b	497ab	875b	0.001	0.001	0.079bc
شهریار Shahriar	4.4 ± 0.24a	5.4 ± 0.24a	6 ± 0.0a	64a	82a	86a	43.52a	72.16a	86a	511a	588a	1099a	0.001	0.001	0. 39a
توس Toos	2 ± 0.44d	3 ± 0.44cd	4 ± 0.44bc	17c	35d	56c	3.4d	14cde	33.6bc	182de	318.5c	500.5c	0.006	0.006	0.168bc
الوند Alvand	2 ± 0.31d	2.6 ± 0.4def	3 ± 0.31d	13c	22def	30d	2.6d	7.04defg	12d	122.5def	182ef	304.5cde	0.003	0.006	0.118c

جدول ۵: لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار طی الکتروفورز دوبعدی برگ دو رقم حساس و مقاوم گندم نسبت به زنگ زرد

Table 5: Protein spots have a significant change in expression during two-dimensional electrophoresis of leaves of two susceptible and resistant wheat cultivars to yellow rust

شماره لکه Number (Landmark)	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم حساس شهریار±خطای استاندارد The average percentage of spots in Shahriyar Sensitive cultivars ± standard error	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم مقاوم پیشگام ±خطای استاندارد Average volume percent of spots in resistant cultivars Pishgam ± standard error	T	شاخص تغییرات بیان پروتئین IF (Induction factor)	کاهش یا افزایش بیان Decrease or increase expression
1	1.346 ± 0.032	0.514 ± 0.023	0.0015	0.381	کاهش Decrease
2	1.131 ± 0.023	0.379 ± 0.015	0.0014	0.335	کاهش Decrease
17	0.368 ± 0.007	0.158 ± 0.008	0.0031	0.429	کاهش Decrease
31	0.021 ± 0.003	0.151 ± 0.001	0.0008	7.191	افزایش Increase
33	0.031 ± 0.004	0.193 ± 0.014	0.0083	6.225	افزایش Increase
55	0.633 ± 0.005	0.311 ± 0.009	0.0011	0.492	کاهش Decrease
58	0.493 ± 0.006	0.103 ± 0.018	0.0025	0.208	کاهش Decrease
84	0.109 ± 0.009	0.793 ± 0.004	0.0002	7.275	افزایش Increase
125	0.819 ± 0.031	0.463 ± 0.013	0.0084	0.565	کاهش Decrease
130	0.021 ± 0.001	0.151 ± 0.005	0.0016	7.191	افزایش Increase
131	0.106 ± 0.0008	0.21 ± 0.002	0.0005	1.981	افزایش Increase
132	0.041 ± 0.0008	0.533 ± 0.03	0.0062	13	افزایش Increase
141	0.492 ± 0.015	0.269 ± 0.001	0.0049	0.546	کاهش Decrease
205	0.053 ± 0.008	0.585 ± 0.015	0.0011	11.03	افزایش Increase
253	0.193 ± 0.007	0.092 ± 0.003	0.0071	0.476	کاهش Decrease
295	0.404 ± 0.001	1.05 ± 0.017	0.0007	2.599	افزایش Increase
309	0.523 ± 0.011	0.163 ± 0.014	0.0025	0.311	کاهش Decrease
311	0.255 ± 0.011	0.093 ± 0.006	0.0067	0.364	کاهش Decrease
337	0.017 ± 0.0005	0.286 ± 0.025	0.0089	16.82	افزایش Increase
359	0.015 ± 0.002	0.071 ± 0.0006	0.0022	4.733	افزایش Increase
360	0.043 ± 0.0004	0.251 ± 0.016	0.0063	5.837	افزایش Increase
361	0.011 ± 0.0006	0.091 ± 0.004	0.0025	8.272	افزایش Increase
365	0.011 ± 0.001	0.064 ± 0.001	0.0014	5.818	افزایش Increase
380	0.015 ± 0.0009	0.147 ± 0.001	0.0001	9.8	افزایش Increase
385	0.264 ± 0.012	0.868 ± 0.007	0.0005	3.287	افزایش Increase
415	0.007 ± 0.00004	0.047 ± 0.0005	0.0002	6.714	افزایش Increase
416	0.007 ± 0.0001	0.086 ± 0.001	0.0005	12.28	افزایش Increase

تفاوت بارز در بیان پروتئین‌ها در دو رقم مقاوم و حساس گندم موردمطالعه را در شکل ۴ می‌توانید مشاهده کنید. در این شکل لکه‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار به‌منظور مشاهده و مقایسه دقیق‌تر در نمایی نزدیک به تصویر کشیده شده‌اند:



شکل ۴: لکه‌های بیان شده و دارای تفاوت معنی‌دار در دو رقم حساس و مقاوم گندم طی تنش ناشی از زنگ زرد گندم

Fig. 4: Spots expressed and significant differences in two susceptible and resistant wheat cultivars during wheat yellow rust stress

بحث

استفاده از ارقام مقاوم یکی از مطمئن‌ترین روش‌های کنترلی بوده و برای کشاورزان در حکم بیمه‌ای مطمئن وکم‌هزینه است *صیدی صاحباری* (Seyyedi-Sahebari, 2012). عمده‌ترین مزیت کشت گیاهان مقاوم کاهش‌یافتن میزان هزینه‌های تولید است؛ زیرا مقداری از هزینه‌های کنترل یا تمامی این هزینه‌ها با کاشت بذر یا کلون مقاوم صرفه‌جویی می‌شود *اسمیت* (Smith, 1989). از آنجایی‌که تولید و استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم، روشی اساسی نسبت به سایر روش‌های کنترل آفات و بیماری‌ها است، دستیابی به آن از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد *خانجانی* (Khanjani, 2009). غربال ارقام به‌منظور مقاومت به آفات و بیماری‌ها، در برنامه‌های به‌نژادی اغلب محصولات کشاورزی از اهمیت شایانی برخوردار بوده و در بیشتر کشورها موردتوجه قرار می‌گیرد. بر این اساس، لزوم پرداختن به این امر در برنامه‌های به‌نژادی گندم در کشور روشن می‌گردد.

در این مطالعه ابتدا میزان مقاومت و حساسیت ۱۴ رقم گندم براساس شاخص‌های مقاومت نسبت به زنگ زرد موردمطالعه قرار گرفت. رقم پیشگام که در نهایت به‌عنوان مقاوم‌ترین رقم در بین ۱۴ رقم مورد مطالعه شناخته شد، از نظر بسیاری از شاخص‌ها، از جمله ضریب آلودگی کم‌ترین مقدار را دارا بود. همان‌طورکه در بخش مقدمه اشاره شد، این شاخص رایج‌ترین معیاری است که توسط پژوهشگران مختلف به‌منظور ارزیابی زنگ زرد مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به مقدار کم این شاخص و شاخص‌های موردمطالعه دیگر برای رقم پیشگام و تفاوت معنی‌دار آن با سایر ارقام، و نیز با توجه به بررسی نمودار تجزیه خوشه‌ای این رقم به‌عنوان رقم مقاوم شناخته شد. در مقابل، رقم شهریار دارای بیشترین مقدار از نظر این شاخص‌ها بود. از طرفی، در مقایسه پروتئین‌های برگ در دو رقم حساس و مقاوم گندم، نشان داده شد که رقم مقاوم پیشگام نسبت به رقم حساس شهریار، مقدار پروتئین کل بیشتری تولید کرده است. با توجه به این موضوع که پروتئین‌ها ازجمله متابولیت‌های اولیه گیاهان هستند که در ایجاد سازوکارهای مقاومتی گیاه در برابر تنش نقش دارند *اسمیت* (Smith, 1989) و نیز گیاهان بعد از آلودگی اولیه با بیمارگر، قادر به ایجاد یک پاسخ ایمنی هستند که به‌عنوان مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic Acquired Resistance) شناخته می‌شود، می‌توان گفت که به احتمال زیاد افزایش در مقدار پروتئین کل در رقم مقاوم پیشگام یک نوع فعال‌سازی مقاومت در گیاه باشد که باعث مقاومت آن نسبت به سایر ارقام و نیز رقم حساس شهریار شده است. چرا که، فعال‌سازی مقاومت اکتسابی سیستمیک با بیان ژن‌های وابسته به پاتوژن (Pathogenesis Related) همبستگی دارد. به‌نظر می‌رسد هر پروتئین در ایجاد مقاومت یا حساسیت در گیاهان مختلف، متفاوت باشد و نقش ویژه‌ای ایفا کند *بادایوریا* و همکاران (Bhadauria *et al*., 2007).

ازجمله روش‌های بررسی بیان پروتئین‌ها استفاده از ژل‌های الکتروفورز است که در اثر آن حضور یا عدم حضور باند پروتئین در ارقام مختلف و یا در شرایط تنش و عدم تنش (زیستی و غیرزیستی) مورد مقایسه قرار می‌گیرد *کاکایی* و همکاران (Kakaei *et al*., 2017). پروفایل پروتئینی برگ دو رقم حساس و مقاوم گندم نسبت به زنگ زرد با استفاده از آزمون الکتروفورز دوبعدی مورد بررسی قرار گرفت. پس از جفت نمودن ژل‌های مربوط به رقم مقاوم پیشگام و رقم حساس شهریار و اطمینان از بالا بودن میزان تکرارپذیری و عدم وجود خطای ناشی از تفاوت غلظت در ژل‌های موردبررسی، تعداد ۴۴۲ لکه تکرارپذیر ۲۷ لکه دارای تغییر بیان معنی‌دار بودند. بر این اساس مقدار کمّی درصد حجمی (VOL%) لکه‌های متناظر دارای تغییر بیان در ژل‌ها مشخص گردید. در این مطالعه کاهش و افزایش در میزان بیان برخی پروتئین‌ها در محدوده PI موردبررسی مشاهده شد. شایان ذکر است که این میزان کاهش در بیان لکه‌های پروتئینی در رقم مقاوم پیشگام نسبت به رقم حساس شهریار، براساس میزان IF (Induction Factor) بسیار ناچیز بوده است؛ به‌طوری‌که میزان افزایش در بیان پروتئین‌ها بسیار چشمگیر تر از میزان کاهش آن‌ها است. تفاوت در الگوی پروتئوم رقم مقاوم پیشگام نسبت به رقم حساس شهریار می‌تواند تأییدکننده نتایج آزمایش قبلی ما در بررسی شاخص‌های مقاومت نسبی ۱۴ رقم گندم موردمطالعه باشد. هرچند در این آزمایش لکه‌های پروتئینی برای توالی‌یابی ارسال نشد اما دامنه نسبتاً بالای پروتئین‌ها با بیان متفاوت از نظر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک، حاکی از وجود سازوکارها و مسیرهای بیولوژیکی گسترده درگیر در مقاومت نسبی رقم مقاوم نسبت به عامل بیماری زنگ زرد باشد. طیف گسترده لکه‌های با بیان افتراقی نشان می‌دهد که سازوکارهای گسترده‌ای در مقاومت به زنگ زرد دستخوش تغییر می‌شوند و این تغییرات حداقل در سطح پروتئین خود را نشان می‌دهد. به‌طورکلی، نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد، تفاوت در الگوی پروتئوم دو رقم مقاوم و حساس گندم نسبت به زنگ زرد می‌تواند تغییر در میزان بیان آنزیم‌ها و پروتئین‌های درگیر در مقاومت را نشان داده و این امکان را فراهم نماید که در برابر عوامل بیماری‌زا مقاومت نماید.

این موضوع می‌تواند در مدیریت بیماری‌های گیاهی و تولید ارقام مقاوم مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی بر اساس شاخص‌های مقاومت نسبی موردمطالعه ارقام به سه گروه حساس، مقاوم و نیمه‌مقاوم تقسیم و دو رقم پیشگام و شهریار به‌ترتیب به‌عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام شناخته شدند. پس از بررسی الگوی پروتئینی این دو رقم، ۱۷ لکه دچار افزایش بیان و ۱۰ لکه دچار کاهش بیان شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، تفاوت در الگوی پروتئوم دو رقم مقاوم و حساس گندم احتمالاً می‌تواند تغییر در میزان بیان آنزیم‌ها و پروتئین‌های درگیر در مقاومت را نشان دهد.

سپاسگزاری

از همکاری مطلوب دکتر علی مصطفایی و دانشگاه پیام‌نور اسدآباد قدردانی می‌گردد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.