فعالیت آنزیم پراکسیداز در واکنش های مقاومت و حساسیت گیاهچه‌های جو در برابر *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* ، عامل بیماری سفیدک سطحی

مهران پاتپور، مجتبی محمدی، محمد ترابی و عباس شریفی تهرانی

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران ، پژوهشگر مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر و استاد گروه

گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۱۰/۲۹

خلاصه

به منظور بررسی فعالیت و نقش آنزیم پراکسیداز در برگ های جو مقاوم و حساس به بیماری سفیدک سطحی، رقم افضل و لاین روهو/مازورکا که به ترتیب نسبت به جدایه K400 قارچ سفیدک سطحی جو حساسیت ومقاومت داشتند، مایه زنی شدند و در زمان های ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از مایه زنی ، پروتئین تام محلول نمونه ها و میزان فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز اندازه گیری شد. پروتئین تام محلول در رقم افضل مایه زنی شده نسبت به شاهد آن افزایش قابل توجهی نداشت اما در لاین روهو/ مازورکا در هر نمونه نسبت به شاهدش ۱۲ ساعت بعد از مایه زنی افزایش سنتز پروتئین مشاهده گردید .حداکثر میزان پروتئین در لاین روهو/ مازورکا در ۷۲ ساعت پس از مایه زنی برآورد شد. فعالیت پراکسیداز در برگ های مایه زنی شده حساس و مقاوم بیشتر از برگ های سالم آنهابود. در رقم حساس بر اساس هر میلی گرم پروتئین افزایش قابل توجهی در میزان پراکسیداز دیده نشد و در لاین مقاوم فعالیت پراکسیداز ، ۴۸ ساعت بعد از مایه زنی افزایش معنی دار نشان داد و در ۷۲ ساعت به اوج خود رسید. در الکتروفورز ژل پلی اکریل آمایدناواسرشت علاوه بر ضخامت و تیرگی نوارهای حاصل از نمونه های مقاوم ، یک آیزوزایم اسیدی جدید با R_m برابر ۰/۴۰ در ژل جداکننده نمونه های مقاوم مایه زنی شده در زمان های ۷۲ و ۱۲۰ ساعت بعد از مایه زنی دیده شد. در مجموع، نتایج حاصله نشان می دهد که فعال شدن آنزیم پراکسیداز در مکانیسم دفاع لاین‌مقاوم جو علیه بیماری سفیدک سطحی دخالت دارد.

واژه های کلیدی : مقاومت به بیماری جو، سفیدک سطحی ، پراکسیداز

مقدمه

چندین پروتئین جدید در میزبان مقاوم پس از حمله عامل بیماریزا تولید شده که در مکانیسم مقاوم دخالت دارند و به آنها پروتین های مربوط به بیماریزایی می گویند (۱۱). به عبارتی دیگر ، آلوده شدن گیاهان عالی به یک عامل بیماریزا سبب تغییر فعالیت تعدادی از آنزیم های اکسید کننده و هیدرولیز کننده می شود(۱۸). گزارش های متعددی مبنی بر ارتباط افزایشی فعالیت آنزیم های اکسید کننده بویژه پراکسیداز ها و پلی فنل اکسیدازها و مقاومت وجود دارد (۲۲ و ۶). معمولا" فعالیت این قبیل آنزیم ها (آنزیمهای اکسید کننده فنلی) دربافت های آلوده ارقام مقاوم بیشتر از بافت های آلوده ارقام

حساس می باشد. پراکسیدازها اکسیداسیون ترکیبات فنلی و آمین های آروماتیک[1] و آلیفاتیک[2] را کاتالیز می کنند، همچنین در بیوسنتز اتیلن از متیونال[3] واسید آلفا - کتو - گاما - متیل تیوبوتیریک[4] و نیز پلیمریزاسیون مواد فنیل پروپان شرکت کرده و مواد شبه لیگنین تشکیل می دهند (۱۵). اصولا" پراکسیداز ها در واکنش هایی که H_2O_2 و پروتون دهندگان مختلف حضور دارند شرکت می کنند (۲۳). از خصوصیات دیگر آنها اتصال و ایجاد پل هایی از ایزودی تیروزین[5] (یک اسید آمینه جدید از گلیکوپروتئین موجود در دیواره سلولی گیاه) در دیواره های سلولی می باشد(۷). این ترکیبات حاصله بصورت موانعی در برابر حمله عوامل بیماریزا قرار می گیرند. بعلاوه پراکسیدازها تولید رادیکال های آزاد (۱۹) و پراکسید هیدروژن کرده که برای بعضی از پاتوژنها سمی می باشند (۲۴).

چندین آیزوزایم[6] پراکسیداز تاکنون شناخته شده است که در برخی خواص بیوشیمیایی مانند میل ترکیبی با سوبسترا ، کوفاکتورها، حساسیت به بازدارنده ها ، نقطه ایزوالکتریک ، توالی اسیدهای آمینه ، pH مناسب و غیره با یکدیگر متفاوتند. این آیزوزایم ها از نظر اندازه نسبتا" یکسان بوده (۳۵ - ۳۰ کیلودالتون) و همگی هموپروتئین های گلیکوزیله[7] شده می باشند.

فرضیه ای که پراکسیداز ها در مکانیسم مقاومت گیاهان دخالت دارند بر پایه گزارشهایی است که بیانگر افزایش فعالیت این آنزیم در بافتهای آلوده به ویژه در ارقام مقاوم می باشد (۳۵، ۲۷، ۲۵، ۲۳، ۱۷، ۱۰ و ۲). پراکسیداز ها توانایی جلوگیری از رشد قارچهارا دارا هستند. سلول های *Pseudomonas tabaci* که به وسیله حرارت کشته شده اند پس از تزریق به برگهای توتون باعث افزایش فعالیت پراکسیداز و ایجاد مقاومت به آلودگیهای بعدی شده اند (۱۷). قطعاتی از سیب زمینی شیرین پس از آنکه در معرض اتیلن قرار گرفتند به قارچ *Ceratocystis fimbriata* مقاومت نشان دادندو آشکار شد که فعالیت پراکسیداز ها و پلی فنل اکسیدازها در آنها افزایش می یابد (۲۹).در برگهای گندم آلوده به نژادهای ناسازگار زنگ زرد نیز افزایش فعالیت پراکسیدازهای دارای وزن مولکولی بالا و پایین دیده شده (۱۳) و همچنین در توتون مقاوم به *Phytophthora parasitica* افزایش آنزیم فوق ثابت شده است (۹). بررسی فعالیت پراکسیداز در دو لاین تقریبا" ایزوژنیک[8] جو مقاوم و حساس به نژاد CR3 سفیدک سطحی نشان داد که میزان آنزیم مورد نظر در هر دولاین ، ۸ و ۱۶ ساعت پس از آلودگی افزایش می یابد و از ۶ آیزوزایم موجود در گیاه شاهد، ۲ آیزوزایم در واکنش به حمله قارچ افزایش می یابد (۱۴). یافته های جدید تر نقش پراکسیدازها را در واکنش های دفاعی و مقاومت گیاه تأیید کرده‌اند (۲۴ و ۲۲). و گفته شده است که جهت پیش بینی مقاومت می توان از تغییرات فعالیت پراکسیداز بعنوان یک نشانگر بیوشیمیایی استفاده کرد (۲۶).

هدف از اجرای این آزمایش بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم حساس و مقاوم جو نسبت به *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* عامل سفیدک سطحی جو می باشد.

مواد و روشها

جهت اجرای آزمایش کاشت ارقام ، مایه زنی و عصاره گیری از روش هیسلوپ و اسکل ن (۱۰) باکمی تغییرات به شرح ذیل استفاده شده است :

مواد گیاهی

با بررسی های مقدماتی که نگارنده اول روی مقاومت تعدادی از ارقام و لاینهای جو نسبت به بیماری سفیدک سطحی داشته است، رقم افضل (یزد - ۵) و لاین روهو/مازورکا نسبت به جدایه K400 جمع آوری شده از منطقه کرج به ترتیب واکنش حساسیت و مقاومت نشان داده اند.

بذور ارقام فوق پس از ضدعفونی سطحی با محلول یک درصد (حجم به حجم) هیپوکلریت سدیم به مدت پنج دقیقه در تشتک های حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شدند. بعد از دوروز که گیاهچه ها رشد کرده و از سلامت آنها اطمینان کامل حاصل گردید، ۷۲ گلدان متوسط حاوی خاک مزرعه، ماسه ، کود حیوانی و خاک برگ پاستوریزه شده به نسبتهای ۳: ۲: ۱ آماده نموده و از هر رقم ۲۰ بذر در هرگلدان و جمعا" در ۳۶ گلدان کاشته شده و در سالن مخصوص رشد گیاهچه با دمای ۲ ± ۲۳ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی با نور طبیعی - مصنوعی قرار داده شدند. پس

1 . Aromatic 2. Aliphatic 3. Methional (β-methyl thioproponaldehyde) 4. α-Keto-λ-methyl thiopropionaldehyde

5. Isodityrosine 6. Isozymes 7. Glycosylated haemoproteins 8. Near isogenic lines

از هفت روز در هر گلدان ۱۰ گیاهچه که دارای شرایط رشدی یکسان بوده نگهداری و بقیه حذف گردیدند. سپس گلدانهای مورد نظر (۳۶ گلدان) در داخل دستگاه لامینارفلو[1] به کمک گردپاش مینیاتوری ساده با تراکم ۳۵۰-۲۵۰ اسپور در سانتیمتر مربع با جدایه K400 قارچ *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* مایه زنی شدند (برای یکسان بودن سن کنیدی های مورد استفاده، گلدانهای تکثیری را ۴۸ ساعت قبل از مایه زنی تکان داده تا کنیدیوم های مسن ریخته شوند). بعد از آن سرپوش پلی اتیلن شفاف روی کلیه گلدانها (۷۲ گلدان) گذاشته وگلدانهای مایه زنی شده و نشده (شاهد) در اتاقک تاریک با دمای ۱۲ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۱۰۰-۹۵ به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و پس از این مدت به گلخانه ای با شرایط ۲ ± ۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شده و در یک طرح فاکتوریل با پایه کاملا" تصادفی مرتب شدند. اولین نمونه برداری در زمان مایه زنی و پس از آن در زمانهای ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه زنی صورت پذیرفت.

عصاره گیری از بافت گیاهی

مقدار یک گرم از برگهای اولیه مایه زنی شده و شاهدهای مربوطه در زمانهای مورد نظر بطور مجزا توزین شده و با ذکر مشخصات رقم، تیمار یا شاهد و زمان برداشت در کیسه های پلاستیکی قرار داده و بلافاصله در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتیگراد گذارده شدند. پس از پایان نمونه برداری ، هر نمونه یک گرمی در یک میلی لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مول (pH۷/۰) در هاون و در دمای ۴ درجه سانتیگراد عصاره گیری شد و به منظور تخریب کامل بافت و سلولها، از ماسه شسته بادی[2] محصول کارخانه مرک[3] آلمان استفاده گردید. سپس عصاره های حاصله، در لوله های اپندورف ۱/۵ سی سی در مینی سانتریفوژ سانیو در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه[4] به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی جمع آوری و بلافاصله در لوله های اپندروف در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

سنجش پروتئین تام محلول

جهت تعیین پروتئین کل محلول نمونه‌ها، نیاز به یک پروتئین استاندارد و سپس تعیین معادله خط رگرسیون آن می باشد، بدین منظور از روش برادفورد استفاده شد. آلبومین سرم گاوی[5] به عنوان پروتئین استاندارد به کار برده شد. پس از تعیین معادله خط رگرسیون بر حسب نمونه، مقادیر ۵ یا ۱۰ میکرولیتر از عصاره های گیاهی به ۳ میلی لیتر معرف برادفورد اضافه کرده و مقادیر جذب در λMax برابر ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر شیماتزو[6]، ساخت ژاپن بدست آمد. برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته و میانگین آنها در معادله خط رگرسیون حاصله قرار داده شدند و سرانجام مقدار پروتئین کل محلول نمونه ها محاسبه شدند.

سنجش فعالیت ویژه آنزیم

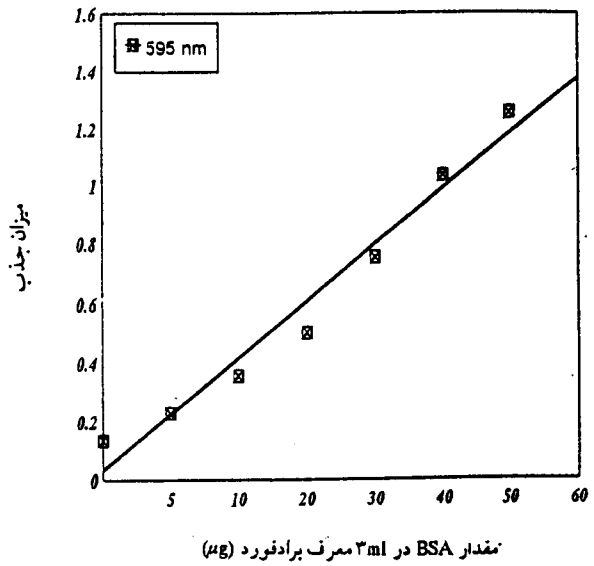
سنجش فعالیت پراکسیداز به روش محمدی (۲۰) اقتباس شده از جنینگز و همکاران (۱۲) به شرح زیر انجام شد:

دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۲۵ میلی مول بافر سیترات فسفات (pH۵/۴)، ۴۰۰ میکروگرم پروتئین محلول و ۲۰ میکرولیتر گوئیکول[7] (دهنده الکترون) ۲۰۰ میلی مول بود. با اضافه نمودن ۱۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳۰ درصد(حجم به حجم) به عنوان پذیرنده الکترون، واکنش در کیووتهای کوارتز آغاز شده که بلافاصله افزایش جذب در λMax ۴۷۵ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه به وسیله اسپکتروفتومتر شیماتزو اندازه گیری شد. برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و بر اساس میانگین آنها تغییرات جذب در دقیقه[8] بر حسب میلی گرم پروتئین محاسبه ونمودارهای مربوطه ترسیم شدند.آزمایشها در کل دوبار تکرار شدند.

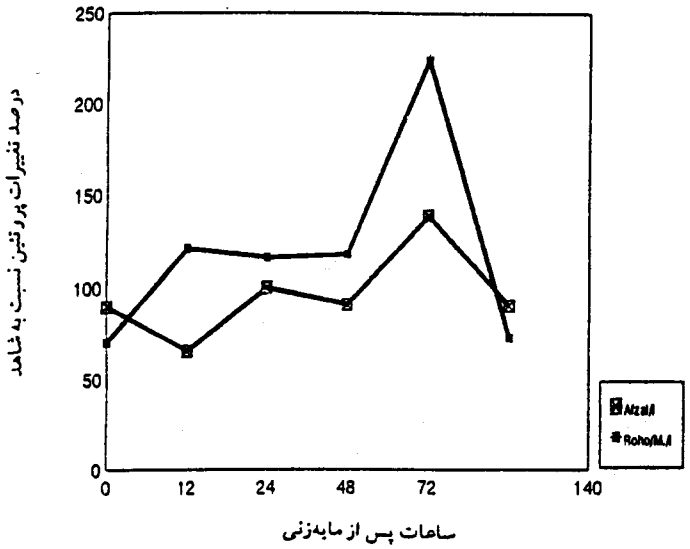
الکتروفورز آنزیمی

جهت انجام الکتروفورز آنزیم پراکسیداز از روش گارفین (۸) استفاده شد. دستگاه الکتروفورز از نوع عمودی اختریان مدل VSTS-1002 با صفحات شیشه ای به ابعاد ۲۱/۵×۱۶/۵ سانتیمتر بود. عمل الکتروفورز در ۲۵ میلی آمپر انجام شد (آمپر ثابت در نظر گرفته شد). غلظت ژل جداکننده ۱۲٪ و غلظت ژل متراکم کننده ۶٪ در نظر گرفته شد و حجمی از عصاره نمونه که شامل ۵۰ میکروگرم پروتئین بود در چاهک های ژل متراکم کننده قرار داده

1. Lamin air flow
2. Sea sand
3. Merck Co.
4. rpm
5. Bovine Serum Albumin
6. Kinetics
7. Guaiacol
8. Change in absorbance



شکل ۱ - سنجش پروتئین استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA)



شکل ۲ - درصد تغییرات پروتئین کل محلول در برگ های آلوده ارقام جو مورد آزمایش نسبت به شاهدهای مربوطه

شد. پس از پایان الکتروفورز ، جهت رنگ آمیزی آیزوزایم های پراکسیداز از روش جینگز و همکاران (۱۲) تغییر یافته توسط محمدی (۲۰) استفاده شد. ژل را دوبار با آب مقطر شسته و در ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی مول (pH۵/۳) روی شیکر چرخشی قرار داده و گوئیکول به غلظت نهایی ۵ میلی مول به آن اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، پراکسیدهیدروژن ۳۰% به نسبت ۰/۰۱ درصد غلظت نهایی ، به آن افزوده ، بعد از چند لحظه نوارهای قرمز - قهوه ای نمایان شد که نشان دهنده وجود آیزوزایم های پراکسیداز در نمونه ها بود.

نتایج و بحث

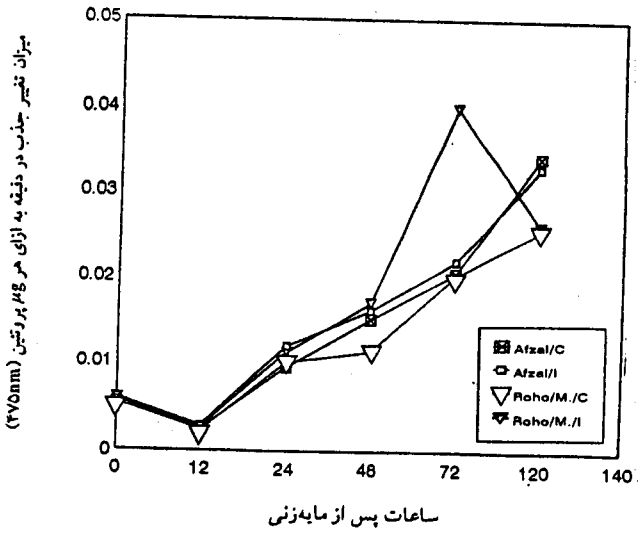
نتیجه حاصل از سنجش پروتئین استاندارد، معادله خط رگرسیون y=۰/۰۸۹۶+۰/۰۲۳۱x بود (شکل ۱) و در شکل ۲، درصد تغییرات پروتئین کل محلول برگهای آلوده رقم افضل و لاین روهو / مازورکا نسبت به شاهدهایشان نمایش داده شده است. همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس پروتئین کل محلول بر حسب میلی گرم در گرم بافت تازه در زمانهای مختلف نمونه برداری با توجه به طرح آماری مورد استفاده در جدول ۱ و گروه بندی آماری تیمارها مطابق آزمون دانکن در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج بدست آمده در بررسی میزان پروتئین کل در لاین روهو /مازورکا و رقم حساس افضل نشان داد که سنتز پروتئین در رقم حساس در هیچیک از زمانهای آزمایش شده افزایش قابل توجهی نشان نمی دهد. اما در لاین مقاوم هرنمونه نسبت به شاهد خود از زمان ۱۲ ساعت پس از مایه زنی افزایش سنتز پروتئین داشته است (به استثناء زمان ۱۰ ساعت پس از مایه زنی). میزان سنتز پروتئین در لاین مقاوم در ۱۲ ساعت به حداکثر رسید اما از نظر تفاوت با شاهد ، در زمان خاص ، ۷۲ ساعت پس از مایه زنی بیشترین اختلاف و افزایش را نشان داد . این نتایج با یافته های برخی از محققان مطابقت دارد. برومن و هادویگر (۴) گزارش دادند که در واکنش سازگار بین کتان و زنگ کتان در روزهای اول بعد از آلودگی تغییری در مقدار پروتئین میزبان حساس پدید نمی آید اما در همین زمان در واکنش ناسازگار در میزبان مقاوم مقدار پروتئین ۱۸ ساعت پس از مایه زنی افزایش می یابد. بوشنل (۵) گزارش داد، مقدار پروتئین کل بافتهای گندم آلوده به زنگ سیاه ۲۰ تا ۵۰ درصد افزایش می یابد و این میزان در واکنش ناسازگار در روزهای اول بعد از آلودگی بیشتر از واکنش سازگار می‌باشد. احمد و همکاران (۱) از تحقیقات خود نتیجه گرفتند که در ارقام گندم مقاوم به زنگ قهوه ای در ۳ روز اول بعد ازمایه زنی سنتز پروتئین کل افزایش می یابد در حالیکه در ارقام حساس در این مدت

تغییری حاصل نمی شود و از روز پنجم پس از مایه زنی افزایش سنتز پروتئین کل مشاهده می گردد.

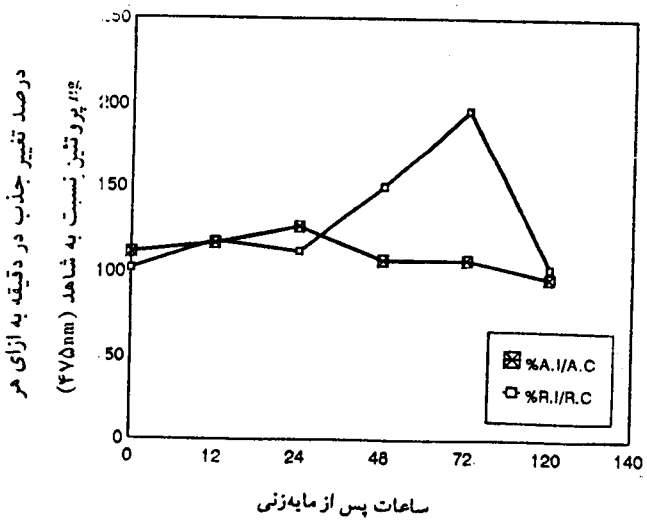
نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت پراکسیداز بر حسب پروتئین کل محلول در شکل های ۳ و ۴ ارائه شده است و داده های حاصل از تجزیه واریانس فعالیت پراکسیداز بر حسب میکروگرم پروتئین کل محلول در جدول ۳ و نتیجه گروه بندی آماری تیمارها مطابق آزمون دانکن در جدول ۴ نشان داده شده است.

باتوجه به این نتایج ، آشکار شد که فعالیت این آنزیم در بافتهای مایه زنی شده بیشتر از بافتهای سالم بوده و افزایش معنی دار پراکسیداز در لاین مقاوم مایه زنی شده از زمان ۴۸ ساعت پس از مایه زنی آغاز شد ولی در رقم حساس مایه زنی شده افزایش معنی دار مشاهده نشد. بیشترین فعالیت آنزیم در لاین روهو/مازورکا در زمان ۷۲ ساعت پس از مایه زنی مشاهده شد و در مورد رقم حساس بیشترین میزان فعالیت آنزیم در زمان ۱۲۰ ساعت حاصل شده است که نسبت به شاهد در همین زمان اختلاف معنی داری نشان نداد با توجه به این مشاهدات می توان اظهار نمود که آنزیم پراکسیداز به احتمال قوی در مکانیسم مقاومت جو نسبت به سفیدک سطحی شرکت دارد که با گزارش های تعدادی از پژوهشگران مطابقت می‌کند. کوژ (۱۶) افزایش فعالیت پراکسیداز بعد از مایه زنی را با مقاومت به بیماری مرتبط داشته است. سی ورس و همکاران (۲۸) افزایش این آنزیم را در ارقام گندم مقاوم زنگ سیاه در مقایسه با گیاهان حساس گزارش داده اند. اسکل ن و دمورست (۲۹) نیز افزایش فعالیت پراکسیداز را در برگهای گندم آلوده به زنگ بیان داشته اند. پاتی کوسکی و همکاران (۲۳) فعالیت پراکسیداز در ارقام گندم مقاوم و حساس به سفیدک سطحی را سنجیده و اعلام داشتند که در رقم مقاوم، ۵ روز بعد از آلودگی افزایش شدیدی در میزان پراکسیداز بوجود آمد در صورتیکه این افزایش در رقم حساس ۱۵ روز بعد از آلودگی مشاهده گردید.

شکل ۵ نشان دهنده آیزوزایمی پراکسیداز در نمونه های شاهد و مایه زنی شده رقم افضل می باشد تعداد ۶-۳ نوار آیزوزایمی مشاهده شد به طوریکه ۳ آیزوزایم بازی در ژل متراکم کننده و ۳ آیزوزایم اسیدی در ژل جداکننده قرار دارند. یک آیزوزایم بازی درزمان ۷۲ ساعت در نمونه های مایه زنی شده دیده شد که در شاهد مربوطه موجود نبود. میزان R_m (حرکت نسبی)[1]



شکل ۳ - مقایسه فعالیت ویژه پراکسیداز در برگ های سالم و مایه زنی شده ارقام حساس و مقاوم جو A=جذب C, =شاهد I, =مایه زنی شده



شکل ۴- مقایسه درصد تغییرات پراکسیداز دربرگهای مایه زنی شده ارقام جو نسبت به شاهدها A=رقم افضل R, =لاین روهو/مازورکا C, = شاهد =مایه زنی شده

1. Relative mobility

جدول ۱ ـ جدول تجزیه واریانس پروتئین تام محلول بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تازه، در مراحل مختلف زمانی مورد آزمایش.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
رقم (V)	۳	۸/۴۶۱	۲/۸۲۰	۹۹/۹۰**
زمان (T)	۵	۳۴/۷۰۴	۶/۹۴۱	۲۴۵/۸۶**
اثر متقابل (V*T)	۱۵	۹/۳۴۷	۰/۶۲۳	۲۲۰/۰۷**
خطای آزمایشی	۴۸	۱/۳۵۵	۰/۰۲۸	
کل	۷۱	۵۳/۸۶۷		

** = در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. ضریب تغییرات= ۱۰/۳۳٪

جدول ۲- مقایسه میانگین ها در سنجش پروتئین تام محلول در ارقام مقاوم و حساس جو به بیماری سفیدک سطحی بر حسب میلی گرم در گرم بافت تازه در زمان‌های مختلف بعد از مایه زنی [1]

زمان (ساعت)	رقم			
	افضل(شاهد)	افضل(آلوده)	R./M.[2](شاهد)	R./M.(آلوده)
۰	۱/۶۷۳ef	۱/۵۰۳efgh	۳/۵۵۳a	۲/۴۹۷fgh
۱۲	۲/۴۷۰c	۱/۶۱۷efg	۳/۰۱۳b	۳/۶۶۰a
۲۴	۱/۴۱۳fgh	۱/۴۲۰fgh	۱/۸۶۷de	۲/۱۸۳cd
۴۸	۱/۲۲۷ghi	۱/۱۲۰hi	۱/۳۴۰fghi	۱/۵۸۷efg
۷۲	۰/۷۲۷j	۱/۰۱۰ij	۰/۶۸۰j	۱/۵۲۳efgh
۱۲۰	۰/۶۹۰j	۰/۶۲۷j	۰/۹۵۳ij	۰/۶۹۷j

۱ ـ میانگین‌هایی که با حروف مشترک نشان داده شده اند با آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف ندارند($R<0.01$).

۲ ـ Roho/Mazurka

آیزوزایم ها بترتیب : ۰/۰۷، ۰/۱۰، ۰/۱۱، ۰/۳۱، ۰/۴۳ و ۰/۷۰ تعیین گردید.

شکل پروفیل آیزوزایمی حاصله از نمونه های شاهد و مایه زنی شده لاین روهو / مازورکا را نشان می دهد. در این ژل تعداد ۷-۳ نوار آیزوزایمی مشاهده شد، بطوریکه ۳ آیزوزایم بازی در ژل متراکم کننده و ۴ آیزوزایم اسیدی در ژل تفکیک کننده قرار دارند. همانند ژل حاصل از نمونه های حساس در اینجا نیز یک آیزوزایم بازی در زمان ۷۲ ساعت در نمونه های مایه زنی شده دیده می شود که در شاهد وجود ندارد. در نمونه های مایه زنی شده در زمانهای ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه زنی یک نوار اسیدی جدیدی در ژل جداکننده ظاهر شد که در نمونه های شاهد و همچنین در ژل حاصل از نمونه های حساس نیز دیده نمی شود. میزان R_m آیزوزایم‌های حاصله در این ژل بترتیب : ۰/۰۷، ۰/۰۹، ۰/۱۱، ۰/۳۱، ۰/۴۰، ۰/۴۲ و ۰/۶۹ برآورد شدند. پراکسیداز ها از

جدول ۳ ـ جدول تجزیه واریانس فعالیت ویژه پراکسیداز بر حسب میکروگرم پروتئین تام محلول در مراحل مختلف زمانی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
رقم (V)	۳	۰/۰۰۰۲۲۵	۰/۰۰۰۰۷۵	۳۵/۲۳**
زمان (T)	۵	۰/۰۰۶۹۴۶	۰/۰۰۱۳۸۹	۶۵۴/۰۰**
اثر متقابل (V*T)	۱۵	۰/۰۰۰۹۲۸	۰/۰۰۰۰۶۲	۲۹/۱۴**
خطای آزمایشی	۴۸	۰/۰۰۰۱۰۲	۰/۰۰۰۰۰۲	
کل	۷۱	۰/۰۰۸۲۰۱		

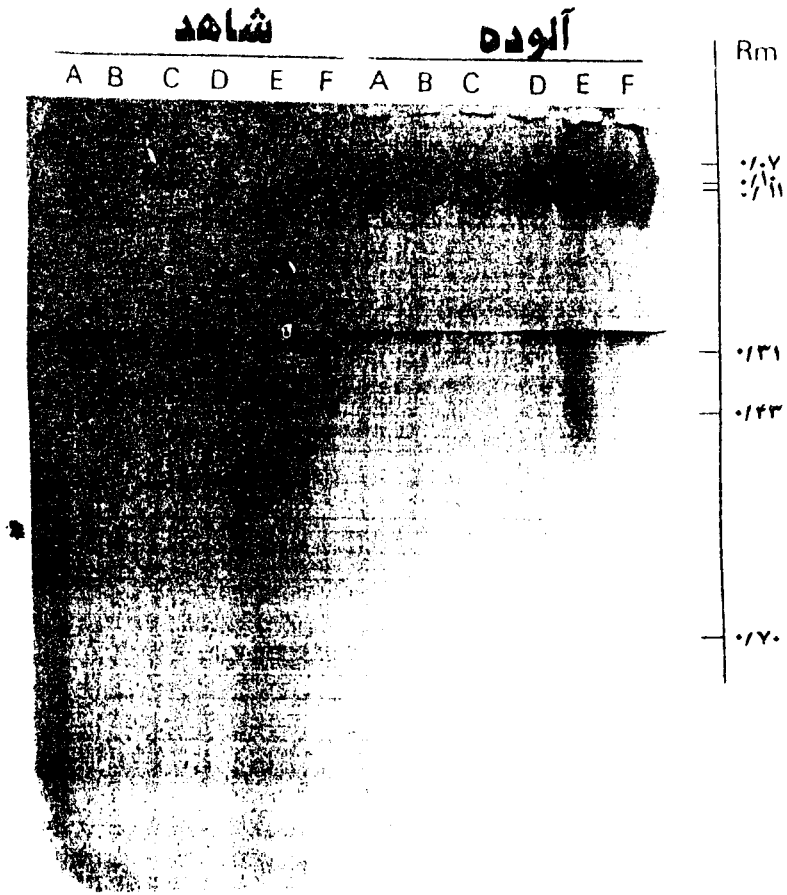
** = در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. ضریب تغییرات=۹/۶۲٪

جدول ۴ ـ مقایسه میانگین‌ها در سنجش فعالیت ویژه پراکسیداز در ارقام مقاوم و حساس جو به بیماری سفیدک سطحی بر حسب پروتئین تام محلول در زمانهای مختلف بعد از مایه‌زنی[1]

زمان	رقم			
(ساعت)	افضل(شاهد)	افضل(آلوده)	R./M.[2](شاهد)	R./M.(آلوده)
۰	۰/۰۰۵۳ghi	۰/۰۰۵۹g	۰/۰۰۵۷gh	۰/۰۰۵۸gh
۱۲	۰/۰۰۲۴hi	۰/۰۰۲۸ghi	۰/۰۰۲۲i	۰/۰۰۲۶ghi
۲۴	۰/۰۰۹۵f	۰/۰۱۲۰f	۰/۰۱۰۸f	۰/۰۱۱۳f
۴۸	۰/۰۱۵۲e	۰/۰۱۶۲e	۰/۰۱۱۴f	۰/۰۱۷۱e
۷۲	۰/۰۲۰۷d	۰/۰۲۲۰d	۰/۰۲۰۴d	۰/۰۴۰۱a
۱۲۰	۰/۰۳۴۲b	۰/۰۳۲۹b	۰/۰۲۵۷d	۰/۰۲۶۲c

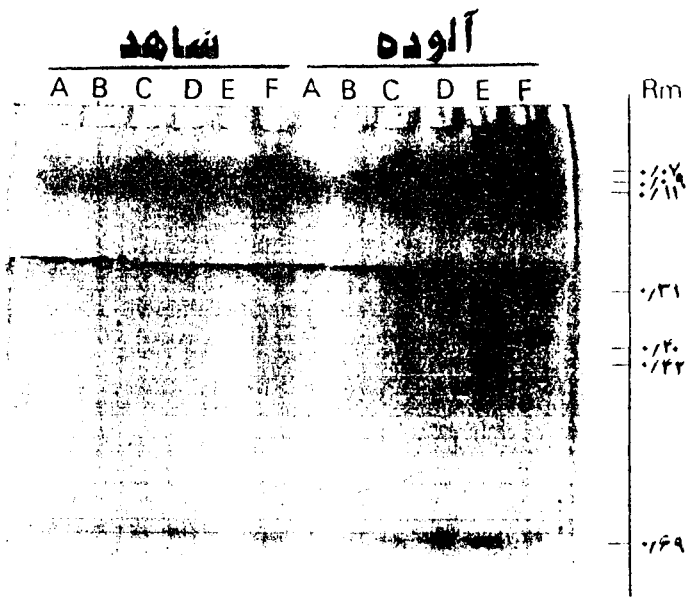
۱ ـ میانگین هایی که با حروف مشترک نشان داده شده اند با آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف ندارند($R<0.01$).
۲ -Roho/Mazurka

چندین آیزوزایم تشکیل یافته اند که می توانند انواع واکنش های اکسیداتیو را کاتالیز نمایند. در بررسی الکتروفورتیک فعالیت پراکسیداز، مشاهده شد که در کلیه نمونه ها ، تقریبا" آیزوزایم های نمونه های مایه زنی شده دارای تراکم بیشتری بودند که نشاندهنده تحریک پراکسیداز در ارقام آلوده بود. در قسمت ژل متراکم کننده حاوی نمونه های مایه زنی شده رقم افضل و لاین روهو / مازورکا، در زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با شاهدهای مربوطه نوار آیزوزایمی جدیدی مشاهده شد که نمی توان آنرا با مقاومت در ارتباط دانست



شکل ۵ ـ الکتروفورز ژل ناواسرشت پلی‌آکریل آماید، رنگ آمیزی شده برای فعالیت پراکسیداز در رقم افضل.

(A ـ F بترتیب زمان ۱۲۰،۷۲،۴۸،۲۴،۱۲،۰)



شکل ۶ ـ الکتروفورز ژل ناواسرشت پلی‌آکریل آماید، رنگ آمیزی شده برای فعالیت پراکسیداز در لاین Roho/Mazurka

(A ـ F بترتیب زمان ۱۲۰،۷۲،۴۸،۲۴،۱۲،۰ ساعت)

چراکه در هر دو گیاه حساس و مقاوم موجود بود. اما در ژل جداکننده لاین مقاوم در زمانهای ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از مایه زنی یک آیزوزایم اسیدی با R_m برابر ۰/۴۰ مشاهده گردید که در نمونه های شاهد و حساس دیده نشد و ضخامت این نوار جدید نیز در ۷۲ ساعت پس از مایه زنی بیشتر از ۱۲۰ ساعت بود. این احتمال وجود دارد که وجود همین آیزوزایم جدید عامل مقاومت لاین روهو/مازورکا به بیماری سفیدک سطحی باشد. در ارتباط با برهمکنش زنگ سیاه و گیاهان گندم دارای ژن مقاومت Sr6 و Sr11 نیز آیزوزایم جدیدی (نوار ۹) گزارش شد که وجودش را با مقاومت در ارتباط دانسته اند (۱۳). همچنین سی ورس و همکاران (۲۸)، در بررسی واکنش بین گیاه گندم کاملا" مقاوم (Sr6) و یک نژاد غیر بیماریزای زنگ ساقه (P6) آیزوزایم جدیدی از پراکسیداز را کشف نمودند.

تغییرات در فعالیت های آنزیمی مستلزم این است که بیوسنتز ترکیبات آروماتیک در اثر آلودگی افزایش یابد و بطور مستمر در مدت ابراز مقاومت زیاد شود. بیوسنتز آروماتیک نیز شامل تولید واحدهای فنیل پروپانوئید و مواد اولیه تشکیل دهنده لیگنین سازی می باشد. افزایش میزان فعالیت پراکسیداز منجر به افزایش میزان فرآیندهایی می شود که به وضوح در گیاهان بیمار دیده شده است (۳۳). این فرآیندها شامل سنتز فلاونوئیدها، لیگنین و اتیلن ، اکسیداسیون ایندول استیک اسید و هیدروکسیلاسیون پرولین ترکیب شده در پروتئین دیواره سلولی و احتمالا" تولید سوپراکسید[1] آنیون بود که می تواند در مقاومت نقش داشته باشد (۲۱).

زمانیکه لیگنین و سوبرین در دیواره های سلولی گیاه تجمع می یابند، تولید پراکسیداز مشاهده شده است (۳۱) و گیاهان در اثر افزایش فعالیت لیگنین سازی در اطراف محل زخم نسبت به پارازیت ها واکنش نشان می دهند (۳۰ و ۳۴). در این بررسی آشکار شد که ایجاد مقاومت با افزایش میزان پراکسیداز همبستگی دارد. زمانیکه در کلونیزه کردن قارچ ۷۲ساعت آغاز می شود، میزان پراکسیداز در واکنش ناسازگار به حداکثر می رسد که می توان آنرا با فرآیند لینگین سازی مرتبط دانست. البته نشان داده شده ست که اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینون های سمی[2] نیز توسط پراکسیداز و یا پلی فنل اکسیدازها می تواند منجر به مقاومت گردد(۲).

بطورکلی ، نتایج حاصله در این بررسی نشان می دهد که تغییرات کمّی در فعالیت پراکسیداز و افزایش کیفی در ظهور آیزوزایم های پراکسیداز برگ جو منجر به فعال شدن یک سیستم اکسیداسیون فنلی و یا لیگنین سازی در پاسخ به سفیدک سطحی و در نتیجه ابراز مقاومت در این برهمکنش انگل - میزبان می شود. البته بایستی در نظر داشت که این تغییرات تنها یکی از رخدادهای بیوشیمیایی حاصله از ابراز مقاومت است ، به همین دلیل پیشنهاد می شود که در ادامه این تحقیق با در نظر گرفتن برهمکنش سازگار و ناسازگار جو - سفیدک سطحی ، مطالعات بیشتری در زمینه سایر مکانیسم های بیوشیمیایی، بخصوص آنزیم های شرکت کننده در مکانیسم مقاومت از قبیل پلی فنل اکسیداز، کیتیناز و بتا ۱،۳- گلوکاناز و همچنین بررسی های هیستولوژیکی و سیتولوژیکی جهت شناخت هرچه بیشتر مکانیسم دفاع میزبان صورت پذیرد، تا بتوان با دید علمی کاملتر در جهت کنترل این بیماری اقدام نمود.

REFERENCES

1. Ahmad, S., Y. Yusuf and H. A. Ali. 1995. Differences in protein content of leaves of resistant and susceptible varieties of wheat (*Triticum aestivum*) after infection with brown rust fungus (*Puccinia recondita*). Abstract in : Rev. Plant Pathol. 1996. Vol. 75.
2. Arora, Y. K. and K. L. Bajaj. 1985. Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. Phytopathol. Z. 114: 325-331.
3. Bradford, M. M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding . Analyt. Biochem. 72: 248-254.

1. Superoxide anion
2. Toxic quinones

4. Broembmen, S. L., and L.A. Von-Hadwiger. 1972. Characterization of disease resistance responses in certain gene-for - gene interaction between flax and *Melamspora lini*. Physiol. Plant Pathol.2: 207-210.

5. Bushnell, W.R., 1984. Structural and physiological alterations in susceptible host tissue. In: Bushnell, W. R. and Roelfs. A.P. (eds.) the Cereal Rusts. Academic Press. Inc. Vol. 1, 477-507.

6. Farkas, G. L. and Z. Kiraly . 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopathol. Z. 44:105-150.

7. Fry, S. C., 1982. Isodityrosine, a new aminoacid from plant cell wall glycoprotein. Biochem. J. 204: 449-455.

8. Garfin, D. 1990. One- dimensional gel electrophoresis. Methods in Enzymol. 182:425-441.

9. Goy, P. A., G. Felix, J. P. Metraux and Jr.F. Meins. 1992. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* X. N. debneyi is associated with high constitutive levels of β-1, 3-glucanase chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. Physiol. Mol. Plant pathol. 41:11-21.

10. Hislop, E. C., and M. A. Stahmann. 1971. Peroxidase and ethylene prodution by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. Physiol. Plant Pathol. 1: 297-312.

11. Issac, S. 1992. Fungal- Plant - Interactions. Chapman and Hall. 418p.

12. Jennings, P. H., B. L. Brannaman and F. P. Zscheile. 1969. Peroxidase and polyphenol xidase activity associated with *Helminthosporium* left spot of maize. Phytopathology 59: 963-967.

13. Johnson, L. B. and R. F. Lee. 1978. Peroxidase changes in wheat isolines with compatible and incompatible left rust infections. Physiol. Plant Pathol. 13:173-181.

14. Kerby, K. and S. Somerville. 1989. Enhancement of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 35:4, 323-337.

15. Ku, H. S., S. F. Yang and H. K. Partt. 1970. Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. Plant Cell Physiol. (Tokyo) 11:241-246.

16. Kuc, J. 1966. Resistance of plants to infectious agents. Annu. Rev. Microbiol. 20:337-370.

17. Lovrekovich,L., H. Loverkovich and M. A. Stahmann. 1968. The importance of peroxidase in the wildfire disease. Phytopathology 58: 193-198.

18. Macko, V., W. Woodbury and M. A. Stahmann. 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth of mycelium of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology 58: 1250-1254.

19. Mader, M; J. Ungemach and P. Schloss. 1980. The role of peroxidase isozyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. Planta 147: 467-470.

20. Mohammadi, M. 1994. The early decline in nitrogen fixation capacity in soybean root nodules is correlated with the activation of host defense responses induced by *Bradyrhizobium Japonicum* Ph.D. Thesis, Univ. Missouri, Columbia, MO, USA. 525p.

21. Moreau, R. A. and S. F. Osman. 1989. The properties of reducing agents released by treatment of

Solanum tuberosum with elicitors from *Phytophthora infestans*. Physio. Mol. Plant Pathol. 35:1-10.

22. Okey, E.N., E. J. Duncan; G. Sirju-charran and T. N. Sreenivasan. 1997. *Phytophthora* canker resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase. J. Phytopathol. 145:295-299.
23. Patykowski, Y., A. Urbanek and T. Kaczorowska. 1988. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis* DC. J. Phytopathol. 122: 126-134.
24. Peng, M., J. A. Kuc. 1992. Peroxidase - generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. Phytopathology 82:696-699.
25. Rathmell, W. G. and L. Sequeira. 1975. Induced resistance in tobacco leaves. The role of inhibitors of bacterial growth in the intercellular fluid. Physiol. Plant Pathol. 5:65-73.
36. Reuveni, R. 1995. Biochemical markers for disease resisrance. pp.99-114. In:Singh, R. P., and Singh, U.S. (eds). Molecular Methods in Plant Pathology . CRC Press.
27. Ross, A. F., 1961. Systemic acquired resistance induced localized virus infections in plants. Virology 14:340-358.
28. Seevers, P. M. , J. M. Daly and F. F. Catedral. 1971. The role of peroxidase isoenzymes in reistance to wheat stem rust disease. Plant Physiol. 43:353-360.
29. Stahmann, M. A. and D. M. Demorest. 1973. Changes in enzymes of host and pathogen with special reference to peroxidase interaction. pp. 405-422. In: Byrde, R. J. W. and C. V. Cutting (eds). Fungal Pathogenicity and the Plants Response. Academic Press, London.
30. Vance, C. P.,T. K. Kirk and R.T. Sherwood. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol 259-288.
31. Van Fleet, D. S. 1962. The significance of oxidation in the endodermis. Am. J. Bot. 29:747-755.
32. Van Huystee, R. B., 1987. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Annu. Rev. Plant. Physiol. 38:205-219.
33. Ward, E. W.B. 1986. Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi. pp. 107-131. In: Bailey, J. A. (ed.), Biology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg.
34. Wu, L. C. 1973. Changes in some enzymes of mung bean seeds germinated on mycelial macerates of *Rhizoctonia solani*. Physiol. Plant Pathol. 3: 19-27.
35. Yamamoto, H. 1995. Pathogenesis and host-parasite specificity in rusts. In:Kohmoto, K., V. Singh and R. P. Singh (des.) Plant Disease Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases. Vol. II. Eukaryotes. Pergam. 407p.

Peroxidase Specific Activity Pattern in Resistant and Susceptible Barley Seedlins Inocuiated with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, the Causal Agent of Powdery Mildew Disease

M. POTPOUR, M. MOHAMMADI, M. TORABI AND A. SHARIFI-TEHRANI

Former Graduate Student, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Research Associate, Seed and Plant Improvment Institute Karaj, and Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted Jan. 19, 2000

SUMMARY

Peroxidase is considered one of several plant defense related enzymes involved in disease resistance mechanism of host plants following inoculation with pathogenic agents. In this study, peroxidase specific activity as well as total soluble protein were measured spectrophotometrically in resistant (Roho/Mazurka line) and susceptible [cv. Yazd-5 (Afzal)] barley seedlings following incoculation with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* isolate K400, the causal agent of powdery mildew disease. The results revealed that total soluble protein content increased in Roho/ Mazurka resistant line at 12 hr post-inoculation, reached a maximum level at 72 hr and was significantly greater than that of the non-inoculated control. Peroxidase specific activity increased in the resistant line 48 hr after the inoculation and reached a maximum rate at 72 hr. This was not observed in the susceptible Afzal-cultivar. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) stained specifically for peroxidase activity showed the presence of a new acidic isozymic band with R_m value of 0.40 as well as thicker activity bands in the resistant leaf tissue at 72 and 120 hr post-inoculation times. However, this was absent in the susceptible leaf tissue. It can be concluded that peroxidase activation may play a defensive role in the biochemical resistance of barley seedlings following an inoculation with the powdery mildew fungus.

Key words: Peroxidase, Powdery mildew, barley, disease resistance