

الله أكبر



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده تولید گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
بیوتکنولوژی در کشاورزی

تجزیه پروتئوم پدیده هتروزیس در برخی از صفات گندم نان

پژوهش و نگارش:

کیانا کبیر

اساتید راهنما:

دکتر احد یامچی

دکتر حسن سلطانلو

اساتید مشاور:

دکتر سیده ساناز رمضانپور

دکتر علی اصغر نصرالله نژاد قمی

تابستان ۱۳۹۲

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

- ۱- قبل از چاپ پایان نامه خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
- ۲- قبل از چاپ پایان نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
- ۳- انتشار نتایج پایان نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب کیانا کبیر دانشجوی رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

تقدیم بہ

پدر و مادر عزیزم

کہ چگونہ زیستن را بہ من آموختند

نامزد مہربانم

کہ سختی ہای راہ را برایم ہموار ساخت

استاد بزرگوارم دکتر احدیانی

مشکر و قدردانی

سپاس پروردگارم را...

می‌تایم آنرا که اندیشیدن را به من آموختند اندیشه ما را:

جناب آقای دکتر احدی (استاد راهنمای اول)

جناب آقای دکتر حسن سلطانلو (استاد راهنمای دوم)

سرکار خانم دکتر سیده ساناز رمضانپور (مشاور اول)

جناب آقای دکتر علی اصغر نصراله نژاد قمی (مشاور دوم)

جناب آقای دکتر سعید نواب پور (داور و نماینده تحصیلات تکمیلی)

از آقای مهندس مهدی کلاته مسئول محترم ایستگاه تحقیقات کشاورزی و آقای مهندس اسلامی مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک به جهت همکاری صمیمانه شان سپاسگزارم.

از تمامی دوستانم به ویژه خانم بانسرتن عالمی، نسیم چنارانی و آقایان شگری و سعیدی پور جهت همکاری هایشان کمال تشکر را دارم...

چکیده

برخی صفات در گندم که در هیبرید نسبت به والدین، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند، پدیده هتروزیس را بروز می‌کنند. این پدیده توسط ژن‌ها / پروتئین‌هایی کنترل می‌شوند که شناسایی این ژن‌ها و پروتئین‌ها از دیدگاه ملکولی در پروژه‌های اصلاح گیاهان، از اهمیت بسیاری برخوردار است. این تحقیق به منظور بررسی وجود اثر هتروزیس در مقاومت به بیماری سپتوریوز برگ گندم (*Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) در ارقام زاگرس (والد حساس)، N8118 (والد مقاوم) و هیبرید حاصل از آنها انجام گرفت. بدین منظور در سال ۱۳۹۰، این ارقام در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان (عراقی محله) در سه تکرار و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی کشت گردیدند. تلقیح ارقام در یک نوبت و به شکل همزمان انجام گرفت، قبل از تلقیح، از بافت برگ پرچم (شاخص مقاومت به قارچ) نمونه‌گیری به عمل آمد، نمونه‌گیری بعدی پس از ظهور علائم بیماری بر روی برگ پرچم انجام شد. جهت بررسی وجود اثر هتروزیس از آنالیز پروتئوم بافت برگ پرچم در مراحل قبل و بعد از اسپورپاشی استفاده گردید نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها در مرحله قبل از اسپورپاشی نشان داد که ۵ لکه پروتئینی دارای بیان افتراقی بین هیبرید و والدین می‌باشند. همچنین حضور یک لکه پروتئینی بر روی ژل هیبرید و عدم حضور همان لکه بر روی ژل‌های والدین در مرحله بعد از اسپورپاشی، می‌تواند پروتئین کاندید مربوط به هتروزیس باشد. هدف از این تحقیق، افزایش اطلاعات مولکولی در مورد پدیده هتروزیس و استفاده از آن در اکثر صفات زراعی و فیزیولوژیک مرتبط با این پدیده، در پروژه‌های اصلاح گیاهان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هتروزیس، آنالیز پروتئوم، گندم، سپتوریا، هیبرید

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۱	فصل اول: مقدمه
۵	فصل دوم: کلیات و مرور منابع
۶	۱-۲) مشخصات گندم
۷	۲-۲) بیماری سپتوریوز برگی گندم و عوامل بیماریزا
۷	۱-۲-۲) تاریخچه، مناطق انتشار و اهمیت بیماری
۸	۲-۲-۲) شرح گونه <i>Septoria tritici</i> Rob. ex Desm
۹	۳-۲-۲) ظهور علائم و پیشرفت بیماری
۱۱	۴-۲-۲) چرخه آلودگی بیماری سپتوریوز برگی گندم
۱۱	۵-۲-۲) شرایط محیطی مورد نیاز جهت جوانه زنی، نفوذ و آلودگی
۱۲	۳-۲) هتروزیس و هتروبیلتیوسیسی
۱۳	۱-۳-۲) اساس ژنتیکی هتروزیس
۱۴	۴-۲) پروتئومیکس
۱۵	۱-۴-۲) جداسازی پروتئین
۱۶	۲-۴-۲) شناسایی پروتئین
۱۶	۳-۴-۲) آنالیز تصویر پروتئین
۱۷	۴-۴-۲) طیف سنجی جرمی
۲۰	۵-۲) مروری بر مطالعات گذشته
۲۷	فصل سوم: مواد و روشها
۲۸	۱-۳) کشت گیاه
۲۸	۲-۳) اسپورپاشی با قارچ <i>S. tritici</i>
۲۹	۳-۳) نحوه نمونه گیری
۳۰	۴-۳) بررسی مورفولوژیک هتروزیس

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۳۰	۵-۳) بررسی پروتئوم.....
۳۰	۱-۵-۳) استخراج پروتئین.....
۳۱	۲-۵-۳) تعیین کمیت پروتئین.....
۳۲	۳-۵-۳) الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی ژل.....
۳۵	فصل چهارم: نتایج و بحث.....
۳۶	۱-۴) ارزیابی فنوتیپی پدیده هتروزیس.....
۳۶	۱-۱-۴) تجزیه واریانس پارامترهای مورفولوژی رشد.....
۳۷	۲-۱-۴) مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده.....
۳۸	۲-۴) ارزیابی پروتئوم پدیده هتروزیس.....
۳۸	۱-۲-۴) نتایج بدست آمده از مرحله قبل از اسپورپاشی.....
۴۳	۲-۲-۴) نتایج بدست آمده از مرحله بعد از اسپورپاشی.....
۴۷	منابع.....

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۶	جدول ۱-۲- ترکیب شیمیایی بذر گندم.....
۳۶	جدول ۱-۴- تجزیه واریانس پارامترهای مورفولوژی رشد در گیاه گندم.....
۳۷	جدول ۲-۴- مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن ($\alpha=5\%$) برای صفات اندازه‌گیری شده.....
۳۸	جدول ۳-۴- Spot Report حاصل از نرم‌افزار Image master 2D platenium.....
۴۲	جدول ۴-۴- بررسی الگوی بیان افتراقی پروتئین‌ها بین هیبرید و والدین قبل از اسپورپاشی.....
۴۳	جدول ۵-۴- بررسی الگوی بیان افتراقی پروتئین‌ها بین هیبرید و والدین بعد از اسپورپاشی.....

فهرست شکل‌ها

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۲-۱- علائم بیماری *Septoria tritici* روی گندم ۱۰
- شکل ۲-۲-۲- چرخه زندگی *Septoria tritici* در گندم ۱۰
- شکل ۳-۲-۳- چرخه آلودگی *Septoria tritici* ۱۱
- شکل ۴-۲-۴- فلوچارت 2D-PAGE ۱۹
- شکل ۱-۳-۱- مرحله سه برگی ۲۸
- شکل ۲-۳-۲- اسپورپاشی با قارچ *Septoria tritici* ۲۹
- شکل ۳-۳-۳- مرحله نمونه‌گیری قبل از اسپورپاشی ۲۹
- شکل ۴-۳-۴- ظهور علائم قارچ و نمونه‌گیری بعد از اسپورپاشی ۳۰
- شکل ۵-۳-۵- پودر کردن نمونه با ازت مایع ۳۱
- شکل ۶-۳-۶- تعیین غلظت پروتئین با دستگاه اسپکتوفتومتر ۳۲
- شکل ۷-۳-۷- دستگاه بعد اول (GE Healthcare) Iso Electric Focusing (IEF) ۳۳
- شکل ۸-۳-۸- دستگاه بعد دوم SDS-PAGE (GE HEALTHCARE) ۳۳
- شکل ۹-۳-۹- دستگاه اسکنر IMAGE SCANNER GE HEALTHCARE ۳۴
- شکل ۱-۴-۱- نمودار scotter plot هیبرید و زاگرس ۳۹
- شکل ۲-۴-۲- نمودار scotter plot زاگرس و N8118 ۳۹
- شکل ۳-۴-۳- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم زاگرس. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا. لکه‌های نامگذاری شده، پروتئین‌هایی هستند که تغییر بیان داشتند ۳۹
- شکل ۴-۴-۴- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم N8118. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ... ۴۰
- شکل ۵-۴-۵- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم هیبرید. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ... ۴۰
- شکل ۶-۴-۶- مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های زاگرس (سمت راست)، N8118 (سمت چپ)، هیبرید (وسط) ۴۱

فهرست شکل‌ها

صفحه

عنوان

- شکل ۴-۷- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم زاگرس. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ۴۳
- شکل ۴-۸- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم N8118. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا..... ۴۳
- شکل ۴-۹- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم هیبرید. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ۴۴
- شکل ۴-۱۰- مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های زاگرس (سمت راست)، N8118 (سمت چپ)، هیبرید (وسط) ۴۴
- شکل ۴-۱۱ الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم هیبرید. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ۴۵
- شکل ۴-۱۲ مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های زاگرس (سمت راست)، N8118 (سمت چپ)، هیبرید (وسط) ۴۵

فصل اول

مقدمه

امروزه گندم غذای اصلی مردم بسیاری از کشورها می‌باشد. به طور متوسط سالانه ۱۶-۱۵ درصد زمین‌های زیر کشت جهان به این محصول اختصاص داده می‌شود و بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تأمین می‌کند (بوشاک و رسپر، ۱۹۹۴). در ایران نیز گندم به‌عنوان منبع تأمین کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت کشور بوده و حدود ۷۵ درصد پروتئین و ۶۱ درصد کالری دریافتی روزانه هر فرد از نان تأمین می‌شود (عبدمیشانی و بوشهری، ۱۳۷۶). بوته‌های گندم در مراحل مختلف رشد در تمام محیط‌های طبیعی در معرض تنش‌های گوناگون قرار دارند. شرایط آب و هوایی، عناصر غذایی، آفات، عوامل بیماری‌زا گیاهی و علف‌های هرز از جمله عواملی هستند که تولید گندم را تهدید می‌کنند. عوامل بیماری‌زا شامل قارچ‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و غیره می‌باشند که در بین آنها قارچ‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند. تعداد بیماری‌های گندم نامعلوم است اما بیش از ۵۰ بیماری شناخته شده است که دارای اهمیت اقتصادی هستند (وایز، ۱۹۷۷). در حال حاضر سپتوریوز برگ‌گی گندم^۱ با عامل *Mycosphaerell graminicola* در بسیاری از مناطق دنیا شایع می‌باشد که باعث کاهش عملکرد از ۳۱ تا ۵۴ درصد می‌شود (ایال و همکاران، ۱۹۸۵). علائم بیماری ابتدا در برگ‌های پایینی و به‌صورت لکه‌های سفید و آب‌سوخته ظاهر شده، حاشیه لکه‌ها به رنگ زرد تا قرمز قهوه‌ای در آمده و در مرکز آن دانه‌های ریز سیاه‌رنگ فرورفته در بافت پدید می‌آید. بروز این لکه‌ها روی قاعده پهنک برگ‌ها باعث خشکیدگی آن می‌شود. در اثر آلودگی میزان دانه‌بندی کاهش یافته، پر شدن دانه‌ها ضعیف می‌شود و دانه‌های چروکیده هنگام برداشت همراه کاه از بین می‌روند. علت گسترش بیماری به‌طور عمده ناشی از متداول شدن ارقام نیمه کوتاه، زودرس و حساس به بیماری و جایگزینی سریع و استفاده گسترده از آن‌ها به‌جای ارقام محلی گندم می‌باشد (ایال و همکاران، ۱۹۸۵). مقاومت در گیاه باعث جلوگیری از رشد عامل بیماری و یا کند شدن سرعت رشد آن می‌شود. کنترل مقاومت به وسیله یک ژن بزرگ‌اثر در بعضی از مواد گیاهی و همچنین چندین ژن نیز شناسایی شده است. آگاهی از مبنای شیمیایی و ساختمانی مقاومت به *Septoria tritici* به‌منظور فهم اینکه چگونه گندم در اثر متقابل میزبان-پاتوژن از خود دفاع می‌نماید، مهم می‌باشد. گیاهان به‌منظور دفاع در مقابل آلودگی قارچی، مکانیسم‌های دفاعی گوناگونی را در پیش می‌گیرند که اولین آنها مرگ سلول یا واکنش فوق حساسیت می‌باشد، تقویت دیواره سلولی با لیگنین در مکانی که نفوذ صورت گرفته و تولید مواد ضد میکروبی مانند فیتوالکسین‌ها از مهمترین مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد. تنوع در بیان ژن‌های گیاه باعث تفاوت در مقاومت گیاه نسبت به بیماری می‌شود. دانش

1- *Septoria tritici* blotch (STB)