نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره سوم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

بررسی تغییرات میزان پروتئین و ترکیبات فنلی در برگ‌های ارقام حساس و مقاوم توتون آلوده به ویروس وای سیب‌زمینی (PVY)

عبدالرحمن عبدالهی[۱]، *سعید نصراله‌نژاد[۲]، سید مهدی جعفری[۳]، محسن یزدانیان[۴] و میثم تقی‌نسب[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۳

چکیده

سابقه و هدف: توتون (*Nicotiana tabacum*) گیاهی است، گرمادوست، یکساله، شامل تعدادی گونه یا تعدادی هیبرید که متعلق به تیره‌ی Solanaceae می‌باشد. پاسخ بیوشیمیایی نسبت به آلودگی‌های ویروسی در گیاهان مختلف متفاوت است. یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده مربوط به آن است. ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y,* PVY) از خانواده Potyviridae از پراکنش جهانی برخوردار است و از بیمارگرهای رایج مزارع توتون در ایران می‌باشد. ارقام مختلف توتون در برابر سویه‌های این ویروس عکس‌العمل‌های متفاوتی را نشان می‌دهند. این تحقیق به‌منظور بررسی تغییرات میزان پروتیین و ترکیبات فنلی در برگ‌های ارقام حساس و مقاوم توتون آلوده به ویروس وای سیب‌زمینی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی پروتئین کل، فنل کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در برگ‌های دو رقم توتون مقاوم (VAM) و حساس (K326) پس از مایه‌زنی

*مسؤل مکاتبه: Snasrollanejad@yahoo.com

مکانیکی با عصاره ویروس وای سیب‌زمینی نژاد (PVY^O) در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ روز پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار اجرا شد. جهت تأیید وجود آلودگی و تعیین میزان جذب نوری (OD) ویروس مذکور در نمونه‌ها از آزمون داس- الایزا و آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی PVY استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل رقم VAM از رقم K326 مایه‌زنی شده و شاهد آن در همه زمان‌های پس از مایه‌زنی از آن بیشتر بود، به غیر از روز سوم که اختلاف‌شان معنی‌دار نشد. بیشترین میزان پروتئین کل در روزهای اول و پنجم و در رقم VAM مایه‌زنی شده مشاهده شد و کمترین مقدار در روزهای دوم و چهارم پس از مایه‌زنی و در رقم K326 ثبت گردید. بیشترین میزان فنل کل در روز پنجم پس از مایه‌زنی ثبت شد و با سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد. در ارقام مایه‌زنی شده مقدار فنل کل نسبت به شاهد بیشتر بود و اختلاف بین آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. در ارقام مایه‌زنی شده میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری در رقم K326 از رقم VAM بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز برگ‌های توتون رقم VAM در همه زمان‌های پس از مایه‌زنی در سطح احتمال آماری یک درصد از رقم K326 کمتر بود. فعالیت آنزیم‌ها بسته به نوع رقم، نوع تیمار مایه‌زنی و زمان پس از مایه‌زنی متغییر بود. میزان جذب نوری در رقم K326 به مراتب از رقم VAM بیشتر بود. در این مطالعه همبستگی بین متغییرهای مذکور بسیار پایین بود و فقط بین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز همبستگی مثبت (R^2=۰/٥٤٦) دیده شد.

واژه‌های کلیدی: *Potato virus Y*، داس- الایزا، پروتئین کل، فنل کل، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum*) گیاهی یکساله و متعلق به تیره Solanaceae می‌باشد. ارتفاع بوته در شرایط مزرعه و بدون گل آذین به ۱/۵ متر و همراه با گل آذین به بیش از ۲ متر می‌رسد. طول دوره رشد گیاه در زمین اصلی و برای تولید برگ، به نوع رقم و شرایط تولید برگ بستگی زیادی دارد و معمولاً ۳ تا ۵ ماه می‌باشد. توتون حداقل در ۹۷ کشور جهان برای مقاصد تجاری کشت می‌شود. اگرچه خاستگاه توتون از نواحی نیمه‌گرمسیری است، اما تولید تجاری بیشتر تیپ‌های آن در نواحی معتدل صورت می‌گیرد. کل تولید تجاری توتون در سال ۱۹۸۸، حدود ۵/٦ میلیون تن بوده که از حدود ۳/٤ میلیون هکتار زمین زیر کشت آن به‌دست آمده و تقریباً یک سوم این تولید متعلق به کشور چین بوده است (۲۰). سطح زیر کشت توتون و تنباکو در ایران در سال ۱۳۸۷ حدود ۷ هزار هکتار بود که حدود ۸۰ درصد آن در استان‌های مازندران و گلستان و مابقی در استان‌های گیلان، آذربایجان غربی و کردستان قرار داشت. تولید تنباکو در استان‌های بوشهر، اصفهان، خراسان رضوی، مرکزی و فارس مرسوم می‌باشد (۲). بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی (فائو) در سال ۲۰۱۰ میلادی، کشورهای چین، برزیل و هند سه تولیدکننده بزرگ توتون در جهان بوده‌اند.

در گستره جهانی، بیش از ۲۰ ویروس به‌طور طبیعی در توتون بیماری ایجاد می‌کنند. همچنین، توتون به‌صورت آزمایشی به بیش از ۱۰۰ ویروس مبتلا می‌گردد. ویروس‌های مهم توتون که باعث خسارت اقتصادی می‌گردند شامل ویروس موزاییک توتون (TMV)[1]، ویروس رگبرگ ابلقی (TVMV)[2]، ویروس وای سیب‌زمینی (PVY)[3]، ویروس خراشک توتون (TEV)[4]، و ویروس پژمردگی لکه‌ای توتون (TSWV)[5] هستند. تأثیر بیماری‌های ویروسی بر عملکرد محصول توتون حائز اهمیت است (۲۰). ویروس‌های CMV[6]، PVX[7]، PVY، TMV و ToMV[8] در ایران از روی توتون گزارش شده‌اند (۱ و ۱۱).

1- Tobacco mosaic virus
2- Tobacco vein mottling virus
3- Potato virus Y
4- Tobacco etch virus
5- Tomato spotted wilt virus
6- Cucumber mosaic virus
7- Potato x virus
8- Tomato mosaic virus

ویروس وای سیب‌زمینی[1] (PVY) به جنس *Potyvirus* و خانواده Potyviridae تعلق دارد و دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای حدود ۱۰ کیلو باز است (۱۸). این ویروس مانند سایرپوتی‌ویروس‌ها رشته‌ای شکل خمش‌پذیر است (۹). ویروس PVY درتوتون و دیگر گیاهان زراعی انتشاری جهانی دارد و از لحاظ اقتصادی یکی از مهمترین ویروس‌های سیب‌زمینی است. آلودگی به‌این ویروس موجب کاهش عملکرد توتون می‌گردد. میزان خسارت این ویروس در گیاه توتون تا ۸۳ درصد گزارش شده است که به عوامل متعددی از جمله رقم توتون، زمان وقوع آلودگی و استرین ویروس بستگی دارد. برآورد خسارت این ویروس به کاهش توأم عملکرد و کیفیت توتون مربوط است (۲۱). این ویروس در مواردی ممکن است باعث نابودی کل محصول گردد (۱٦).

در این تحقیق تلاش شد تا واکنش ساختار شیمیایی ارقام حساس و مقاوم توتون، از جمله محتوی فنل‌ها و پروتئین آن‌ها (که از اجزای مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشند) در برابر آلودگی به ویروس PVY تعیین شود تا در منابع ژنتیکی مقاومت و اصلاح که یکی از بهترین راهکارهای کاهش خسارت بیماری است، مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از تیرماه ۱۳۸۸ شروع شد و در خردادماه ۱۳۸۹ خاتمه یافت. کاشت گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۵×۲×۲ (عامل رقم در ۲ سطح، مایه تلقیح در ۲ سطح و زمان نمونه‌گیری در ۵ سطح) و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار (یک بوته در هر گلدان) انجام شد. در این پژوهش از ارقام توتون Virginia A Mutant (VAM) و K326 به‌ترتیب به‌عنوان ارقام مقاوم و حساس به ویروس وای سیب‌زمینی استفاده شد. بذور این ارقام از بانک بذر مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش تهیه گردیدند.

بذرهای توتون در گلدان‌های حاوی خاک استریل در شرایط کنترل شده و به دور از منابع آلودگی کاشته شدند. میانگین دمای شبانه‌روزی در گلخانه ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. گیاهچه‌های توتون مربوط به هر رقم در مرحله چهار برگی در گلدان‌های حاوی خاک استریل نشاکاری شدند. در این

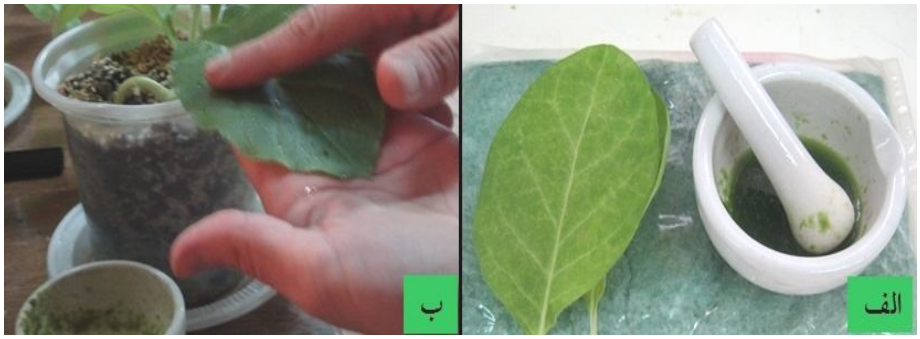
1- *Potato virus Y*

پژوهش به‌منظور مایه‌زنی ارقام کاشته شده از یک جدایه ویروس وای سیب‌زمینی (دارای پاسخ مثبت به پادتن تک‌همسانه‌ای سویه o ویروس)[1] استفاده شد. این جدایه از مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش تهیه و در شرایط گلخانه روی توتون رقم Burley 21 تکثیر و نگهداری شد و از آن به‌عنوان منبع PVY استفاده گردید.

فرایند انتقال ویروس: مایه تلقیح ویروس برای مایه‌زنی و انتقال عصاره ممکن است از قسمت‌های مختلف گیاه آلوده گرفته شود. برگ‌های جوان نسبت به بافت‌های مسن و چوبی معمولاً حاوی غلظت‌های بالاتری از ویروس هستند. در این بخش از آزمایش، برگ‌هایی که علایم آلودگی ویروسی را خوب نشان دادند، انتخاب شدند. پس از انتخاب بافت‌های آلوده مناسب و همگن‌سازی[2] آن‌ها با استفاده از هاون چینی سرد، مایه ویروس تهیه گردید. جهت عصاره‌گیری، ابتدا محلول بافرفسفات پتاسیم ۰/۱ مولاربا pH=۷/۵ آماده گردید، به‌این صورت که ابتدا ۱۷/٤ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن ارتوفسفات (K_2HPO_4) در یک لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۳/٤ گرم پتاسیم ارتوفسفات ($KHPO_4$) در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و دو محلول ترکیب شدند تا pH=۷/۵ به‌دست آید. این محلول تا زمان عصاره‌گیری و انتقال به گیاه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

یک گرم از برگ آلوده به ویروس در هاونی که قبلاً سرد شده بود، منتقل شد. محلول بافرفسفات پتاسیم سرد به‌میزان ۹ سی‌سی محلول به ازا هرگرم برگ به درون هاون اضافه شد و بافت برگی به کمک دسته هاون کاملاً له گردید تا عصاره همگن به‌دست آید. عصاره با استفاده از پارچه ململ به داخل ظرفی مناسب صاف گردید و سپس تا موقع مصرف در داخل ظرف یخ قرار گرفت. برای ایجاد زخم از پودر کاربوراندوم[3] (۲٤) استفاده شد (شکل ۱).

1- PVYo
2- Homogenization
3- Carborundum



شکل ۱- مایه‌زنی گیاهچه‌های توتون با ویروس PVY. الف: آماده‌سازی عصاره گیاهی حاوی ویروس PVY؛ ب: مایه‌زنی گیاهچه توتون با استفاده از پودر کاربوراندوم (اصلی).

Figure 1. Inoculation of tobacco leaves with PVY virus. (A) Preparation of plant extract containing PVY virus, (B) Inoculation of tobacco leaves with carborandum powder (main one).

آزمون الایزا: جهت اطمینان از آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس PVY و همچنین تعیین غلظت ویروس در زمان‌های نمونه‌برداری و رابطه آن با پارامترهای موردنظر، از تیمارهای مورد آزمایش نمونه‌گیری شد و پس از عصاره‌گیری با آزمون الایزای مستقیم (داس الایزا)[1] و با استفاده از آنتی‌سرم پلی‌کلونال[2] PVY، میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ٤۰۵ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر (Biotech مدل ELx 800) اندازه‌گیری گردید. برای تعیین آلودگی ویروس از روش داس الایزا بر پایه روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) و با استفاده آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی PVY (ساخت شرکت DSMZ آلمان) استفاده شد. این تست جهت تشخیص ویروس PVY و با استفاده از کیت کامل آن صورت گرفت: چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ٤۰۵ نانومتر خوانده شد و نتایج ثبت گردید. در آزمون الایزا با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول 3SD+، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید (۱۲). در این فرمول میانگین جذب و SD انحراف معیار چاهک‌های حاوی نمونه سالم است. نمونه‌های با جذب بالاتر از آستانه به‌عنوان نمونه آلوده به ویروس تشخیص داده شدند.

1- Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay
2- Polyclonal antibody

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل: یک گرم از بافت برگ گیاه در هاون چینی حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با pH=7 کاملاً ساییده و همگن شد. قبل از عصاره‌گیری، هاون چینی در یخچال سرد شد و در حین عصاره‌گیری هاون در ظرف حاوی یخ قرار گرفت. مخلوط حاصل بلافاصله به لوله اپندورف منتقل و در g ۱۳۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه در روتور سرد شده سانتریفیوژ (Sigma مدل 3K30) شد. فاز رویی (شناور) حاصل برای انجام آزمایش‌ها جداسازی گردید.

جهت تهیه معرف بردفورد، ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از کوماسی بلو G-250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شده. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه گردید و کاملاً با هم مخلوط شدند. حجم محلول ابتدا با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و سپس توسط کاغذ صافی شماره ۱ صاف گردید. این معرف در تاریکی و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

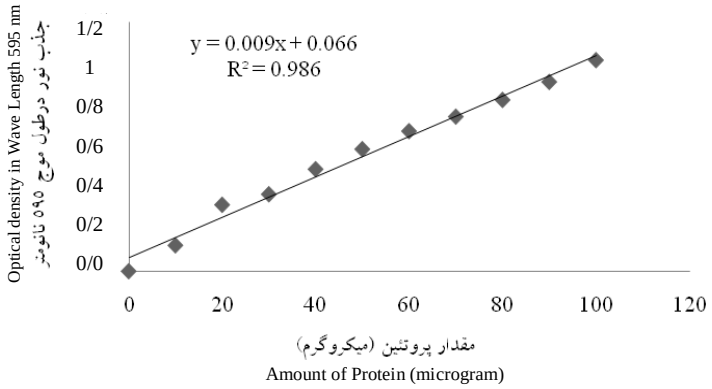
اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول طبق روش بردفورد (۱۹۷٦) انجام گرفت. به‌منظور اندازه‌گیری ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی با ۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد در یک لوله آزمایش با هم مخلوط شدند و محلول حاصل ورتکس گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند و سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (S 2000 UV/Vis) خوانده شد. مقدار پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از مقادیر جذب نوری مربوط به هر نمونه و نمودار استاندارد آلبومین محاسبه گردید.

جهت رسم نمودار کالیبراسیون پروتئین از محلول سرم آلبومین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. طبق جدول ۱ مقادیر ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به لوله‌های آزمایش منتقل گردیدند و حجم هر یک از نمونه‌ها با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. در مرحله بعد، ۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید و محلول‌های حاصل ورتکس شدند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومترخوانده شد. نمودار استاندارد پروتئین براساس غلظت آلبومین و مقادیر جذب هر یک از آن‌ها رسم گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مقادیر مواد و محلول‌های موردنیاز برای رسم نمودار کالیبراسیون آلبومین به روش بردفورد (۱۹۷٦).

Table 1. Materials and solutions needed for drawing albumin calibration curve with Bradford method (1976).

جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر Optical density in Wave Length 595 nm	معرف برد فورد (میلی‌لیتر) Bradford reagent (milimeter)	آب مقطر (میکرولیتر) Distilled watter (microliter)	مقدار محلول آلبومین (میکرولیتر) Amount of albumin solution (microliter)	شماره لوله آزمایش Number of tube test
0	5	100	0	شاهد Control
0/125	5	90	10	1
0/321	5	80	20	2
0/372	5	70	30	3
0/493	5	60	40	4
0/59	5	50	50	5
0/677	5	40	60	6
0/747	5	30	70	7
0/828	5	20	80	8
0/915	5	10	90	9
1/02	5	0	100	10



شکل ۲- نمودار برازش شده کالیبراسیون پروتئین به روش بردفورد (اصلی).

Figure 2. Calibration fitted curve for protein by Bradford method (main one).

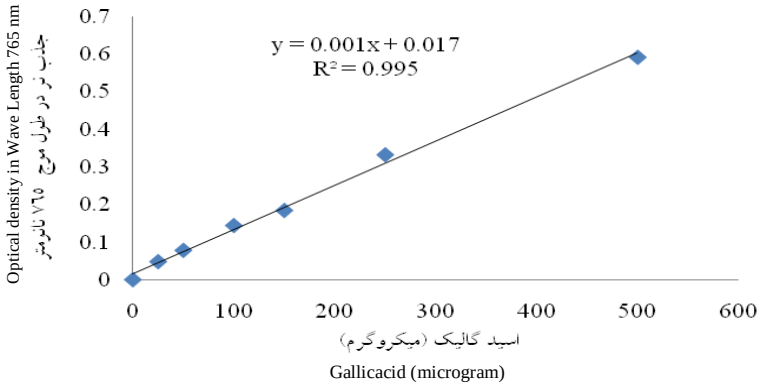
استخراج و اندازه‌گیری فنل کل: استخراج فنل با استفاده از روش فوکودا و همکاران (۲۰۰۳) همراه با تغییراتی انجام شد. در این روش، به یک گرم از بافت برگ ٤/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و سپس در داخل هاون چینی خرد شد تا به‌صورت کاملاً هم‌وزن و یکنواخت درآید. سپس، عصاره فوق به لوله‌های پلی‌اتیلنی منتقل گردید و به‌مدت ۸ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد.

پس از این مدت، همگن حاصله در مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی (روشناور) برداشته و برای اندازه‌گیری میزان فنل استفاده شد. ۲۰۰ گرم کربنات سدیم بدون آب[1] در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و جوشانده شد. بعد از سرد کردن تعدادی کریستال کربنات سدیم به داخل محلول ریخته و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس با استفاده از کاغذ صافی فیلتر و به حجم یک لیتری رسانیده شد. این محلول در دمای اتاق به مدت نامحدود قابل نگهداری می‌باشد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین سیوکالتو[2] به شرح زیر انجام شد: ابتدا ۱ میلی‌لیتر عصاره فنلی در بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۷۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد. به دنبال آن ۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتو با مخلوط موردنظر مخلوط گردید و به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم به آن اضافه گردید و با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتری رسانده شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومترتوسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. برای تعیین مقدار فنل کل موجود در هر یک از نمونه‌ها ازمنحنی استاندارد اسید گالیک استفاده شد (۲۵).

جهت رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه‌ای از اسیدگالیک به غلظت ۵ گرم در لیتر تهیه شد. به‌این ترتیب که ابتدا ۰/۵ گرم از اسیدگالیک در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. مقادیر ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر (که به‌ترتیب ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند) از این محلول برداشته و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. این محلول‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرارداده و اعداد به‌دست آمده ثبت شدند و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های اسید گالیک و مقادیر جذب به‌دست آمده رسم گردید (شکل ۳-). با استفاده از معادله رگرسیونی به‌دست آمده و مقدار جذب نوری عصاره‌های فنلی، مقدار فنل کل در هر یک از نمونه‌ها محاسبه گردید.

1- Anhydrous sodium carbonate
2- Folin-ciocalteau



شکل ۳- منحنی جذب استاندارد اسید گالیک (اصلی).

Figure 3. Standard absorbtion curve for gallic acid (main one).

ثبت و تجزیه داده‌های آزمایش: برای ثبت داده‌ها و تجزیه واریانس آن‌ها از نرم‌افزارهای Excel، SAS و SPSS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

مقدار پروتئین کل: جدول تجزیه واریانس (۲) تغییرات مقدار پروتئین کل را در رقم‌های به‌ترتیب حساس و مقاوم توتون K326 و VAM نسبت به آلودگی ویروس وای سیب زمینی نشان می‌دهد. بر این اساس، اثرات ساده نوع رقم توتون، تیمار مایه‌زنی و زمان نمونه‌گیری در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی، رقم با زمان نمونه‌گیری، زمان با تیمار مایه‌زنی و همچنین اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی و زمان نمونه‌گیری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر فاکتورهای رقم، مایه‌زنی، زمان پس از مایه‌زنی و اثر متقابل آن‌ها بر میزان پروتئین و فنل کل برگ توتون.

Table 2. ANOVA for the influence of factors including variety, inoculation, post-inoculation time and heir interactions on protein and phenolics content of tobacco leaves.

منابع تغییرات (Cultivar)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		پروتئین کل (Total protein)	فنل کل (Total phenol)
رقم (Cultivar)	1	261696.8664**	840982015.3**
مایه‌زنی (Inoculation)	1	38428.3911**	276154540.3**
زمان (Time)	4	31592.7549**	103675532.3**
رقم × مایه‌زنی (Cultivar× Inoculation)	1	14162.9064**	115164002.8*
رقم × زمان (Cultivar× Time)	4	11392.0091**	48014559.8ns
مایه‌زنی × زمان (Inoculation× Time)	4	23965.8135**	96622913**
رقم × مایه‌زنی × زمان (Cultivar ×(Inoculation× Time)	4	78199.0906**	25105734.8ns
خطا (Eror)	60	2419.816	24124508
ضریب تغییرات (درصد) (CV%)		15.54	22.73

ns، * و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

با توجه به شکل ٤، میزان پروتئین کل رقم مقاوم (VAM) در مقایسه با رقم حساس (K326) به ویروس وای سیب‌زمینی هم در ارقام مایه‌زنی شده با ویروس و هم در ارقام مایه‌زنی نشده بیشتر بود. مقدار پروتئین کل رقم K326 در تیمار مایه‌زنی شده نسبت به تیمار مایه‌زنی نشده کمتر بود و اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد.

میزان پروتئین کل برگ‌های توتون رقم VAM در همه زمان‌های پس از مایه‌زنی از رقم حساس به ویروس K326 بیشتر بود، هر چند در روز سوم پس از مایه‌زنی، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۵). با توجه به شکل ۵، بیشترین مقدار پروتئین کل در رقم VAM و در روز اول پس از مایه‌زنی مشاهده گردید و کمترین مقدار پروتئین کل نیز به رقم K326 مربوط بود.

بر اساس شکل ٦، میزان پروتئین کل در تیمار مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی متفاوت بود به طوری‌که در روزهای اول و سوم، بین دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، هر چند مقدار پروتئین کل تیمار مایه‌زنی شده کمتر بود. در روز دوم و پنجم این

اختلاف در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در روز چهارم پس از مایه‌زنی ویروس، مقدار پروتئین کل در تیمار مایه‌زنی شده از تیمار مایه‌زنی نشده بیشتر بود و این اختلاف در آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

با توجه به شکل ۷، بیشترین میزان پروتئین کل در روزهای اول و پنجم پس از مایه‌زنی و در رقم VAM مایه‌زنی شده مشاهده شد. همچنین کمترین میزان پروتئین کل در روزهای دوم و چهارم پس از مایه‌زنی و در رقم K326 ثبت گردید. مقدار پروتئین کل بسته به نوع رقم، نوع تیمار مایه‌زنی و زمان پس از مایه‌زنی متغیر بود.

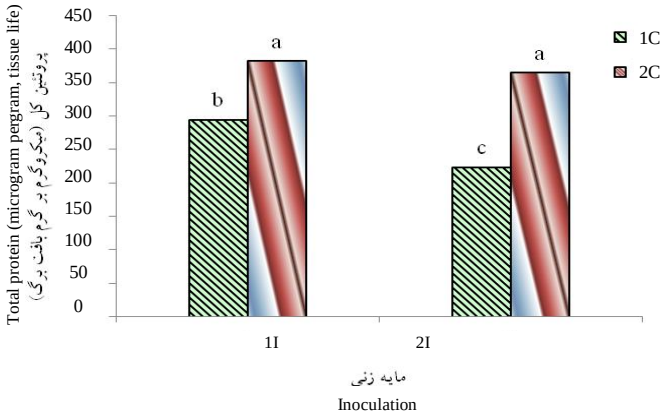
بهروزین و شریفی‌تهرانی (۱۹۹۸) تغییرات پروتین کل را در برگ‌های گندم مایه‌زنی شده با قارچ *Pucciniastriiformis* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی، بین تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تیمار مقاوم مایه‌زنی شده دارای بیشترین مقدار پروتئین و با تیمار حساس مایه‌زنی شده و تیمارهای شاهد (مقاوم و حساس بدون مایه‌زنی) کاملا دارای اختلاف معنی‌دار بود. آن‌ها همچنین بیان کردند که در رقم مقاوم شاهد (بدون مایه‌زنی)، مقدار پروتئین کل در زمان‌های ۷۲ و ۱۰۰ ساعت بعد از مایه‌زنی نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. در زمان ۱٤٤ ساعت مقدار پروتئین در تیمار مقاوم MV17 و تیمار حساس مایه‌زنی شده کاهش یافت و حتی این مقدار از تیمارهای گروه شاهد کمتر بود. افزایش تولید پروتئین در اوایل آلودگی به مقدار بیشتر و سریع‌تر در رقم مقاوم مایه‌زنی شده، ارتباط آن را با مقاومت رقم مقاوم MV17 نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مبنی‌بر افزایش مقدار پروتئین کل در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس در ارقام مایه‌زنی نشده و شاهد (شکل ٤-۱) همچنین، تکرار آن در همه زمان‌های پس از مایه‌زنی (شکل ٤-۲) با نتایج به‌دست آمده توسط بهروزین و شریفی‌تهرانی (۱۹۹۸) مطابقت دارند.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر فاکتورهای رقم، مایه‌زنی ویروس، زمان پس از مایه‌زنی و اثر متقابل آن‌ها بر غلظت ویروس (OD).

Table 3. ANOVA for the influence of factors including variety, inoculation, post-inoculation time and heir interactions on virus concentration (OD).

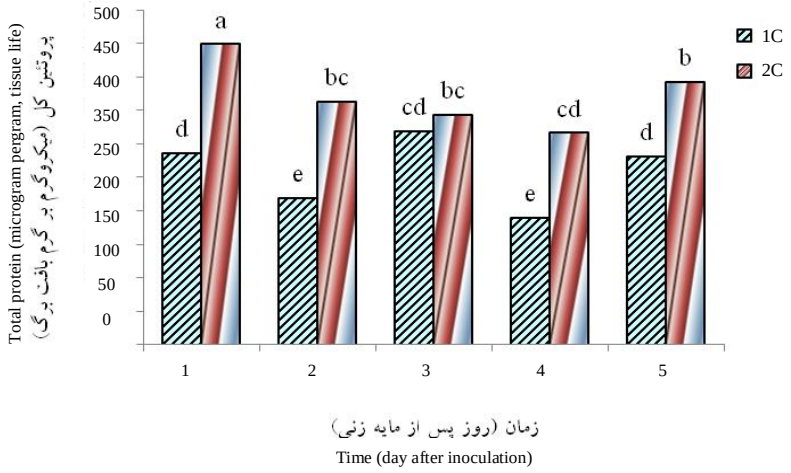
میانگین مربعات (MS) غلظت ویروس (OD)	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات
0.037074**	1	رقم (Cultivar)
0.032552**	1	مایه‌زنی (Inoculation)
0.00096ns	2	زمان (Time)
0.0298**	1	رقم × مایه‌زنی (Cultivar× Inoculation)
0.00193ns	2	رقم × زمان (Cultivar× Time)
0.00327ns	2	مایه‌زنی × زمان (Inoculation× Time)
0.00434ns	2	رقم × مایه‌زنی × زمان (Cultivar×(Inoculation× Time)
0.00163	36	خطا (Eror)
30.68		ضریب تغییرات (درصد) (CV%)

ns و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



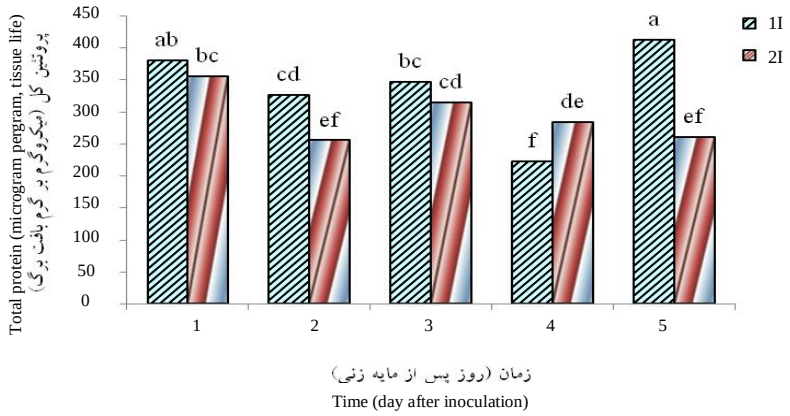
شکل ٤- اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی بر تغییرات پروتئین کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده، C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون می‌باشند.

Figure 4. Interaction influence of variety and inoculation treatment on total protein changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated, C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability of the test.



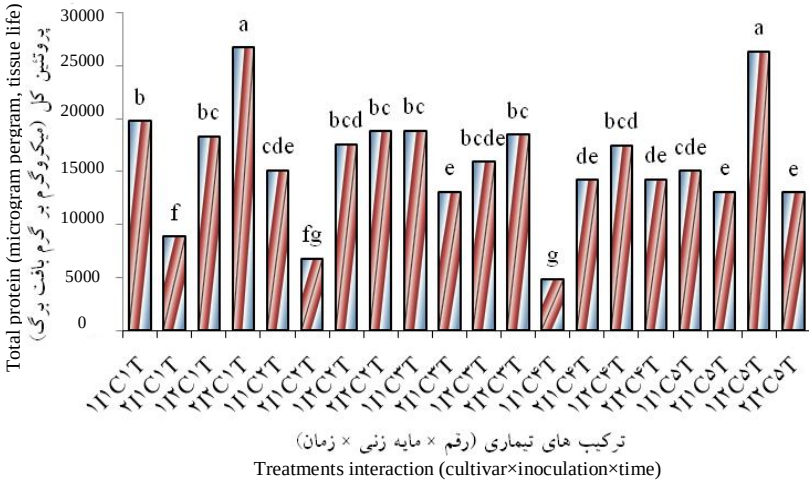
شکل ٥- اثر متقابل رقم با زمان پس از مایه‌زنی بر تغییرات پروتئین کل در رقم‌های K326 و VAM. C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 5. Interaction influence of variety and post-inoculation time on total protein changes in VAM and K326 varieties. C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.



شکل ٦- اثر متقابل تیمار مایه‌زنی با زمان پس از مایه‌زنی بر تغییرات پروتئین کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 6. Interaction influence of inoculation treatment and post-inoculation time on total protein changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.



شکل ۷- اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی و زمان نمونه‌گیری بر تغییرات پروتئین کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده. C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. T1، T2، T3، T4 و T5: به‌ترتیب ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ روز پس از مایه‌زنی ویروس. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 7. Interaction influence of variety and inoculation treatment and sampling time on total protein changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated, C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. T1, T2, T3, T4, and T5 show days of 1, 2, 3, 4, and 5 after inoculation, respectively. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

ساراوانان و همکاران (۲۰۰٤) با اشاره به میان کنش گیاه- بیمارگر بیان نمودند که برخی از پروتئین‌های خاص، موسوم به پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر پدید می‌آیند که توان مقابله با عوامل بیماری‌زا را دارند.

طبق گزارش ساراوانان و همکاران (۲۰۰٤)، پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (پروتئین‌های PR) شامل گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی‌اند. این پروتئین‌ها درگیاهان توزیع گسترده‌ای دارند ولی در سطوح بسیار پایینی دیده می‌شوند. اما به دنبال حمله بیمارگرها یا تنش‌های محیطی، در غلظت بسیار بالاتری تولید می‌گردند. آن‌ها همچنین بیان نمودند که پروتئین‌های PR به‌صورت‌های درون‌سلولی و بین‌سلولی، به‌ویژه در دیواره‌های سلولی بافت‌های مختلف گیاهی وجود دارند. اندام‌های مختلف گیاه،

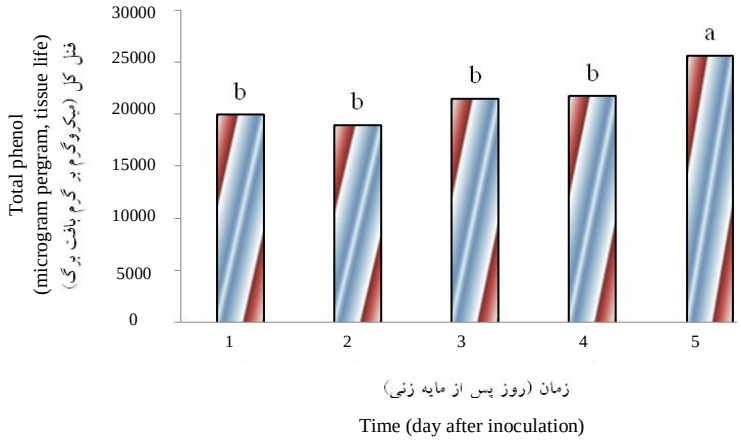
مثلاً برگ‌ها، ریشه‌ها و بذرها ممکن است مجموعه‌های مختلفی از پروتئین‌های PR را تولید کنند. استینتزی و همکاران (۱۹۹۳) نیز نشان دادندکه پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی، در واکنش به آلودگی تولید می‌شوند و بیشترین میزان تغییرات در پروتئین‌های محلول به آن‌ها مربوط می‌باشد.

اوکوشیما و همکاران (۲۰۰۰) در رابطه با پروتئین‌های مرتبط بابیماریزایی بیان کردند که در زمان القای واکنش فوق‌حساسیت بر اثر حمله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، مجموعه‌ای از ژن‌های دفاعی در میزبان فعال و تعدادی پروتئین محلول با وزن مولکولی پایین سنتز می‌شوند و سپس، به فضای بین‌سلولی منتقل می‌گردند. وجود این پروتئین‌های PR با مقاومت القایی همبستگی دارد. نتایج این تحقیق نیز با نتایج مطالعات استینتزی و همکاران (۱۹۹۳) واوکوشیما و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد و نقش پروتئین کل به‌ویژه پروتئین‌های PR را در بروز مقاومت نسبت به بیمارگرهای گیاهی تأیید می‌نماید. همان‌طور که در شکل ٤-٤ نشان داده شده است، بیشترین میزان پروتئین کل در رقم مقاوم مایه‌زنی شده و در روزهای اول و پنجم پس از مایه‌زنی و کمترین میزان پروتئین کل در رقم حساس و در روزهای دوم و چهارم پس از مایه‌زنی مشاهده شد.

مقدار فنل کل: تغییرات مقدار فنل کل در رقم‌های توتون K326 و VAM نسبت به آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی در جدول (۲) نشان داده شده است. بر طبق نتایج این جدول، اثرات ساده نوع رقم توتون، تیمار مایه‌زنی، زمان نمونه‌گیری و همچنین اثر متقابل زمان با تیمار مایه‌زنی در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل رقم با زمان نمونه‌گیری و همچنین اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی و زمان نمونه‌گیری معنی‌دار نبودند. با توجه به معنی‌دار شدن اثر ساده زمان پس از مایه‌زنی بر میزان فنل کل در جدول ۲، مقایسه میانگین زمان‌ها (شکل ۸) نشان داد که بیشترین میزان فنل کل در روز پنجم پس از مایه‌زنی بوده و با سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان داد. مقدار فنل کل زمان‌های اول، دوم، سوم و چهارم پس از مایه‌زنی با وجود تفاوت‌های کمی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در ارقام توتون مایه‌زنی شده با ویروس، نسبت به ارقام مایه‌زنی نشده مقدار فنل کل بیشتر بود (شکل ۹) و اختلاف بین این دو نوع تیمار مایه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲ نشان می‌دهد که مقدار فنل کل بین رقم VAM (مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی) و رقم K326 (حساس به ویروس وای سیب‌زمینی) در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت و بیشترین مقدار فنل کل به رقم VAM مربوط بود (شکل ۱۰). این نتیجه با نتایج مانداویا و همکاران (۱۹۹۷) مطابقت دارد، آن‌ها نشان دادند که در ریشه واریته مقاوم لوبیا چشم بلبلی (JG-62) به قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cicero* پس از مایه‌زنی قارچ میزان فنل کل (اسید سالیسیلیک) در رقم مقاوم بیشترین میزان خود را داشت.

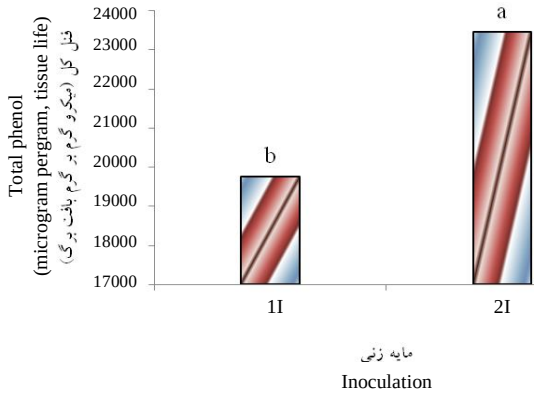


شکل ۸- اثر ساده زمان پس از مایه‌زنی بر روند تغییرات فنل کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 8. Influence of post-inoculation time on total phenolic changes in VAM and K326 varieties. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

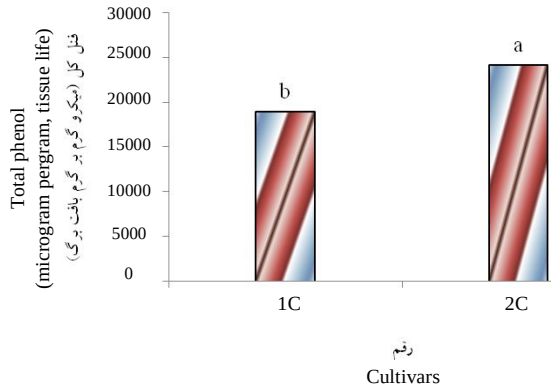
نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با نتایج بالوگان و ترائوکا (۲۰۰٤) مبنی‌بر افزایش فنل در رقم مایه‌زنی شده و همچنین افزایش فنل بعد از زمان مایه‌زنی مطابقت دارد. آن‌ها نشاهای گوجه‌فرنگی معمولی ژاپنی رقم Fucuju No.2 کاشته شده در گلدان با ۳ برگ حقیقی را با تیمارهای بافر به تنهایی، ویروس ایکس سیب‌زمینی (PVX) و یک استرین ضعیف ویروس موزاییک توتون (TMV-L11A) به‌صورت منفرد و آلودگی دوگانه در شرایط گلخانه‌ای مایه‌زنی کردند و محتوای فنل را در طی زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی بررسی نمودند. تجمع و ذخیره فنل در سه روز اول و در برگ‌های اولیه هم در نمونه‌های شاهد (بافر به تنهایی) و هم در نمونه‌های مایه‌زنی شده در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری بالا بود در حالی‌که در گیاهان سالم

در یک سطح باقی‌ماند. در گیاهان آلوده، ذخیره فنل به‌طور پیوسته افزایش پیدا کرد و دو نقطه اوج در روزهای ششم و دهم پس از مایه‌زنی مشاهده شدند. این محققان همچنین ذکر کردند که تجمع فنل در آلودگی تک بیمارگر از آلودگی دوگانه در نقاط اوج به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.



شکل ۹- اثر ساده تیمار مایه‌زنی بر تغییرات فنل کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 9. Influence of inoculation treatment on total phenolic changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.



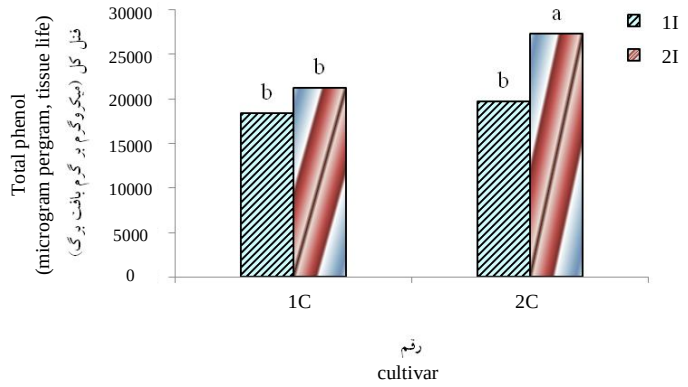
شکل ۱۰- اثر ساده نوع رقم بر روند تغییرات فنل کل. C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

Figure 10. Influence of variety on total phenolic changes in VAM and K326 varieties. C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

با توجه به شکل ۱۱، مقدار فنل کل رقم مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی (VAM) مایه‌زنی شده در مقایسه با رقم حساس به ویروس وای سیب‌زمینی (K326) مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده و همچنین در مقایسه با شاهد خود (رقم VAM مایه‌زنی نشده) بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد نشان داد. بین رقم K326 مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد هر چند در رقم مایه‌زنی شده، مقدار فنل کل بیشتر بود. به‌طور کلی در ارقام VAM و K326 مایه‌زنی شده میزان فنل کل نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد که این میزان افزایش در رقم VAM بسیار بیشتر از رقم K326 بود و اختلاف معنی‌داری را با آن نشان داد.

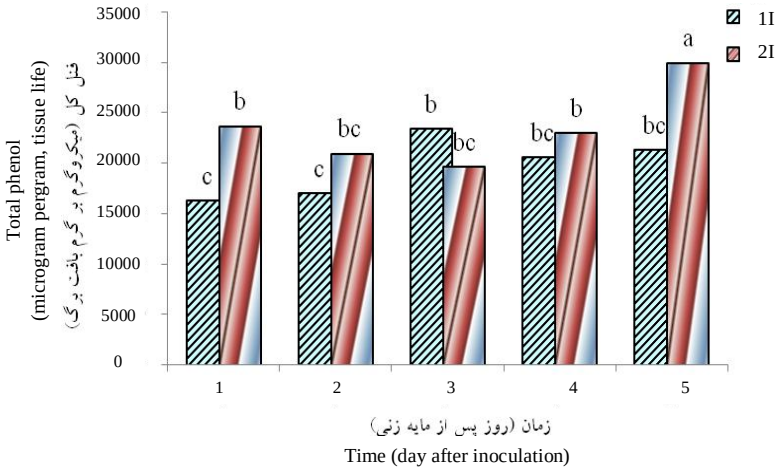
بر اساس شکل ۱۲، مقدار فنل کل در تیمار مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی متفاوت بود. به طوری‌که در روزهای دوم، سوم و چهارم بین دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، هر چند مقدار فنل کل تیمار مایه‌زنی شده در روز دوم بیشتر بود. در روز اول و پنجم پس از مایه‌زنی، مقدار فنل کل اندازه‌گیری شده در تیمار مایه‌زنی شده از تیمار مایه‌زنی نشده (شاهد) بیشتر بود و این اختلاف در آزمون دانکن در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. همچنین طبق شکل ۱۲، بیشترین مقدار فنل کل در روز پنجم پس از مایه‌زنی و در رقم مایه‌زنی شده ثبت شد.

این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط بالوگان و ترائوکا (۲۰۰٤) مطابقت دارند ولی نتایج دوآرت و همکاران (۲۰۰۸) را مبنی‌بر کاهش مقدار فنل در برگ‌های مایه‌زنی شده تایید نکرد. دوآرت و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی تأثیر ویروس X سیب‌زمینی (PVX) را روی محتوای فنل کل و آلکالوئید در برگ‌های *Datura stramonium* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که در مقایسه با شاهد، محتوای فنل کل در تیمارهای برگ‌های مایه‌زنی شده با بافر، برگ‌های فوقانی آن‌ها و برگ‌های فوقانی برگ‌های مایه‌زنی شده با PVX افزایش یافت، اما در برگ‌های مایه‌زنی شده با PVX به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد. آن‌ها بیان کردند که کاهش در محتوای فنل کل و آلکالوئیدها در برگ‌های مایه‌زنی شده به‌احتمال زیاد در نتیجه انحراف در مسیرهای متابولیسمی می‌باشد که به افزایش مواد ناشناخته در برگ‌های مایه‌زنی شده منجر گردیده است.



شکل ۱۱- اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی بر تغییرات فنل کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده، C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 11. Interaction influence of variety and inoculation treatment on total phenolic changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated, C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.



شکل ۱۲- اثر متقابل تیمار مایه‌زنی با زمان پس از مایه‌زنی بر تغییرات فنل کل در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

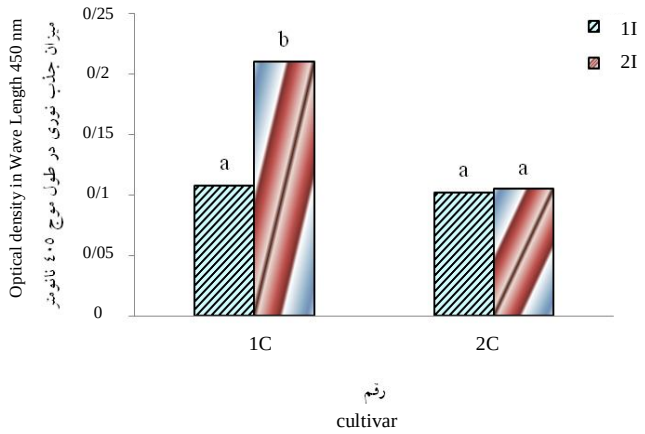
Figure 12. Interaction influence of inoculation treatment and post-inoculation time on total phenolic changes in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

بهروزین (۲۰۰٤) در تحقیقی مقدار فنل کل را در عصاره‌های برگ‌های اول دو رقم گندم MV17 (مقاوم) و بولانی (حساس) در شرایط گلخانه‌ای و در زمان‌های ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۱۰۰، ۱٤٤ و ۲۱٦ ساعت پس از مایه‌زنی با یوریدیوسپورهای نژاد 134 E 150 زنگ زرد (*Puccinia striiformis*) بررسی کرد و دریافت که مقدار فنل کل در رقم مقاوم مایه‌زنی شده، ۲٤ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش پیدا نمود و این افزایش تا ۱٤٤ ساعت همچنان ادامه یافت و پس از ۱۰۰ ساعت به اوج خود رسید. مقدار فنل کل در زمان ۲۱٦ ساعت پس از مایه‌زنی کاهش پیدا نمود و به حد تیمار شاهد خود رسید. در رقم حساس بولانی مایه‌زنی شده در مقدار فنل کل تغییری دیده نشد و با تیمار شاهد خود اختلافی نداشت. نتایج این تحقیق نیز با نتایج به‌دست آمده توسط بهروزین (۲۰۰٤) مبنی‌بر افزایش فنل کل در رقم مقاوم مایه‌زنی شده منطبق می‌باشد. همچنین، عدم تفاوت معنی‌دار رقم حساس مایه‌زنی شده نسبت به شاهد خود (شکل ۱۱) با نتایج بهروزین (۲۰۰٤) کاملاً منطبق است.

به‌طور کلی، تغییرات در میزان فنل کل در ارقام حساس و مقاوم توتون نشان داد که در ارقام مقاوم و پس از مایه‌زنی، میزان فنل کل با سرعت بالاتر و به‌میزان بیشتری افزایش پیدا کرد. اما در رقم حساس، افزایش میزان فنل کل با تأخیر و به‌میزان کمتری مشاهده گردید.

غلظت ویروس (OD): نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های تست الایزا در رقم‌های توتون K326 و VAM نسبت به آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی در جدول تجزیه واریانس ۳ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، اثرهای ساده نوع رقم توتون و تیمار مایه‌زنی و اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند. ولی اثر ساده زمان نمونه‌گیری و اثرهای متقابل رقم با زمان نمونه‌گیری، زمان با تیمار مایه‌زنی و همچنین اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی و زمان نمونه‌گیری معنی‌دار نبودند.

میزان جذب نوری (OD) در طول موج ٤۰۵ نانومتر که شاخصی از غلظت ویروس است، در رقم‌های حساس و مقاوم مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به شکل ۱۳، غلظت ویروس (OD) در رقم حساس به ویروس وای سیب‌زمینی (K326) مایه‌زنی شده در مقایسه با شاهد خود (رقم K326 مایه‌زنی نشده) بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان داد. بین رقم مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی (VAM) مایه‌زنی شده و مایه‌زنی نشده (شاهد) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

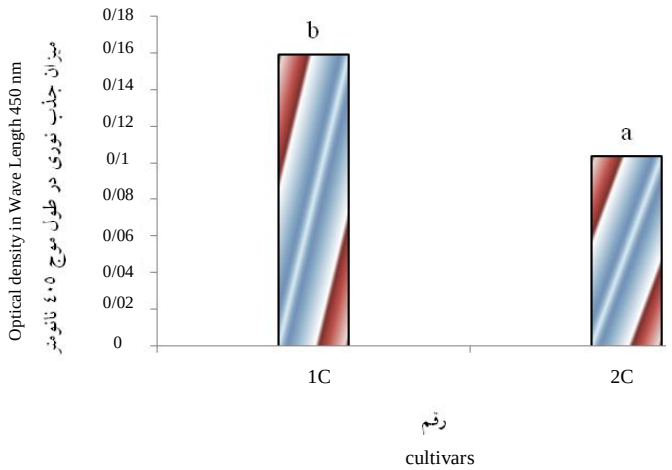


شکل ۱۳- اثر متقابل رقم با تیمار مایه‌زنی بر غلظت ویروس (OD) در رقم‌های توتون K326 و VAM. I1: مایه‌زنی نشده، I2: مایه‌زنی شده. C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی، C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمالیک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 13. Interaction effect of variety and inoculation treatment on virus concentration in VAM and K326 varieties. I1: non-inoculated, I2: inoculated, C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

همچنین، شکل ۱۳ نشان می‌دهد که بین ارقام مایه‌زنی شده VAM و K326 اختلاف معنی‌داری وجود دارد و میزان جذب نوری (OD) در رقم K326 به مراتب از رقم VAM بیشتر بود. میزان جذب نوری (OD) در رقم مایه‌زنی شده VAM با شاهد خود و شاهد رقم حساس به ویروس وای سیب‌زمینی (K326) با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و در یک گروه دسته‌بندی شدند.

میزان جذب نوری در رقم K326 (حساس به ویروس وای سیب‌زمینی) اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد با رقم VAM (مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی) نشان داد به طوری‌که میزان جذب نوری در رقم K326 از رقم VAM بیشتر بود (شکل ١٤).



شکل ١٤- اثر ساده نوع رقم بر غلظت ویروس (OD). C1: رقم K326 حساس به ویروس وای سیب‌زمینی .C2: رقم VAM مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون دانکن می‌باشند.

Figure 14. Influence of variety on virus concentration in VAM and K326 varieties. C1: K326 variety sensitive to potato Y virus, C2: VAM variety resistant to potato y virus. Unsimilar letters show significanr difference in 1 percent probability level by duncan test.

افزایش غلظت ویروس در رقم حساس نسبت به رقم مقاوم با تعریفی که پوررحیم و همکاران (۲۰۰۲) در مورد گیاه حساس و مقاوم ارایه کردند، مطابقت دارد. گیاهی حساس است که ویروس به آسانی آن را آلوده نماید و در آن تکثیر پیدا کند (۱۷).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی واکنش گیاهان نسبت به آلودگی توسط بیمارگرها به‌وسیله تغییر در متابولیت‌ها که همراه با گسترش نشانه‌های بیماری یا پاسخ دفاعی است مشخص می‌شود. به‌طوری که در این تحقیق نیز در اثر مایه‌زنی با ویروس PVY تغییر در مقدار پروتئین کل اتفاق افتاد که بیشترین مقدار آن در رقم مقاوم (VAM) ظاهر شد. همچنین افزایش در مقدار فنل کل در ارقام مایه‌زنی شده نسبت به شاهد ثبت گردید که بیشترین میزان آن در روز پنجم پس از مایه‌زنی نمایان شد. فرض‌های تحقیق مبنی‌بر متفاوت بودن واکنش شیمیایی ارقام مختلف توتون در برابر ویروس PVY و مؤثر بودن ترکیباتی مانند پروتئین و فنل در برابر حساسیت گیاه به ویروس، محقق گردید. با توجه به نقش دفاعی

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و ترکیبات فنلی در مقابل بیمارگرهای گیاهی، استفاده از ژن‌های تولید کننده این ترکیبات در جهت ایجاد ارقام مقاوم توصیه می‌شود.

منابع

1.Abedi, H. 1998. Appearance of PVY in tobacco fields of Iran (Regions of Mazandaran and Gorgan). Bull. Sp. Coresta, Brighton Congress. 24p.

2.Anonymous. 2008. Agricultural amarnameh of Iran. Agriculture organization of Iran. 63p. Anonymous. 2009. Structure of *Potato virus Y*. Retrieved: *http://www.ictvdb.org/ WIntkey/ Images/ a1 .gif*.

3.Anonymous. 2010. FAOSTAT. Retrieved: *http://faostat.fao.org/site/567/ Desktop Default. aspx? PageID = 567 # ancor*.

4.Behrozin, M. 2004. Investigation of Activity on Total Phenol in reaction two resistance and susceptible wheat to *Puccinia striiformis*. J. Agri. Sci. Technol., 4(62): 70-74.

5.Behrozin, M. and Sharifitehrani, A. 1998. Investigation of Total protein Activity on wheat to *Puccinia striiformis*. J. Pest Dis. 66(1-2): 12-16.

6.Balogun, O., and Teraoka, T. 2004. Time-course analysis of the accumulation of phenols in tomato seedlings infected with Potato Virus X and Tobacco mosaic virus. Biokemistri, 16(2): 112-120.

7.Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Bioch. 72: 248-245.

8.Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme Linked Immunosrobent Assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.

9.Debox, J.A., and Hutting, H. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB. Discription Plant Virus. 247: 1-12.

10.Duarte, L., Salatino, M., Salatino, A., Negri, G., and Barradas, M. 2008. Effect of potato virus X on total phenol and alkaloid contents in *Daturastramonium* leaves. Summa Phytopathologica, 34: 65-67.

11.Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A.R., and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Saman Co. 205p.

12.Garcia, L.E., Brandenburg, R.L., and Bailey, J.E. 2000. Incidence of *Tomato spotted wilt virus* (Bunyaviridae) and tobacco thrips in virginia type Peanuts in North Carolina. Plant Dis. 459-464.

13.Jafarpour, B. 1992. Methods in Plant Virology. Ferdosi University Press. 207p.

14.Mandavia, M.K., Patel, C.M., Maravia, G.V., and Parameswaran, M. 1997. Role of phenolic compounds in resistance to fusarium wilt in chichpea. Indian J. Agric. Biochem. 10(1&2): 11-13.

15.Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 42(3): 479-488.
16.Pirone, T.P., and Nesmith, W.C. 1994. Survy of kentuky for Potato virus Y and other potiviruses in tobacco. Plant Dis. 78: 754.
17.Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., and Golnaraghi, A. 2002. Fundamental of Virology. Pishegar Co. 457p.
18.Posada, D., and Crandall, K.A. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequence. Simulation, Proc. Natl. Acad. Sci. 13757-13762.
19.Saravanan, T., Bahskaran, R., Mutthusamy, M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (CV. Rastali) against fusarium wilt disense, P. Pathol. J. 3(2): 72-80.
20.Shew, H.D., and Lucas, G.B. 1991. Compendium of tobacco diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 68p.
21.Sivert, R.C. 1978. Effect of Potato virus Y on cultivars and hybrids of burley tobacco. Phytopathol. 68: 974-978.
22.Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legranda, M., and Fritig, B. 1993. Plant pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Bioch., 75(8): 687-706.
23.Tománková, K., Luhová, L., Petrivalsk, M., Pec, P., and Lebeda, A. 2006. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *(Lycopersicon spp.)* and *Oidium neolycopersici*. Physiol. Molecular Plant Path. 68(1-3): 22-32.
24.Verrier, J.L., Marchand, V., Cailleteau, B., and Delon, R. 2001. Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV and PVY infection in burley tobacco. CORESTA Meet. Agro Phyto Groups. Cape Town, South Africa. p1.
25.Waterhouse, A.L. 2002. Determination of total phenolics. In: Wrolstad, R.E. (Ed.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, New York, units I.1.1.1–I.1.1.8.