

بررسی اثرات تنش‌های غیر زنده بر میزان و الگوی پروتئینی دو رقم گندم در مرحله گیاهچه

Effects of abiotic stresses on protein content and profile on two wheat cultivars in seedling stage

شیمای بهبودی^{۱*}، جعفر احمدی^۲، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری^۳، رحیم حداد^۴

۱، ۲، ۴- کارشناس ارشد و دانشیاران دانشگاه بین‌المللی امام خمینی

۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران

Behboudi S^{1*}, Ahmadi J², Shahnejat Bushehri AA³, Hadad R⁴

1,2,4. Graduate Student, Associate Professors Imam Khomeini International University

3. Professor, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shimabehboody@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) به عنوان مهمترین گیاه زراعی همواره تحت تاثیر تنش‌های محیطی بوده و امروزه دستیابی به عملکردی مطلوب و پایدار همواره مد نظر محققین بوده است. از آنجا که تنوع پروتئینی بخش مهمی از پاسخ گیاه به تنش محیطی و نیز سازگاری با شرایط محیطی به شمار می‌رود، تغییرات کمی و الگوی نواری پروتئین محلول در دو اندام (ریشه‌چه و ساقه‌چه) گیاهچه‌های دو رقم حساس (قدس) و متحمل (الوند) گندم نان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر رقم، تنش، اندام و نیز اثرات متقابل تنش × رقم و تنش × اندام باعث تغییرات معنی‌داری بر محتوای پروتئین محلول شدند. در ریشه‌چه به غیر از سطوح تنش شوری، سایر تنش‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین در ساقه‌چه به جز سطح اول تنش‌های خشکی و شوری، بقیه نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. در رقم الوند به غیر از دمای پایین و سطح دوم شوری و در رقم قدس به جز سطح دوم خشکی سایر سطوح تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. همچنین الگوهای نواری متفاوتی بر روی ژل SDS-PAGE در اندام‌های ارقام تحت تنش‌های مختلف مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین،
خشکی،
دمای پایین،
شوری،
گندم.

مقدمه

تحلیل آیزوزایم‌ها می‌تواند ابزاری در درک بیان ژن در پاسخ به تنش باشد (Metwali et al. 2011). مطالعه تاثیر سطوح مختلف شوری روی پروتئین‌های برخی ارقام گندم نشان داد پروتئین کل در ارقام در سطح شوری متوسط در مقایسه با سطح پایین شوری، افزایش داشته است. از طرف دیگر سطح بالای شوری در تمام ارقام (به استثنای یکی) اثر منفی بر محتوای پروتئینی کل داشته است. تفکیک پروتئین‌های دانه‌های ارقام مورد آزمایش توسط SDS-PAGE نشان داد که تغییری در تعداد نوارها طی تنش شوری رخ نداده است اما تغییرات محسوسی در شدت و قوت نوارها ایجاد شده است (Hendawey 2009). بررسی پروتئین‌های محلول استخراج شده از برگ‌های اولیه ارقام تتراپلوئید، هگزاپلوئید و اجداد وحشی گندم تحت تنش شوری با استفاده از الکتروفورز ژل دو بعدی بیانگر این مطلب بود که تحت تنش شوری هیچ پروتئین جدیدی در مقایسه با شرایط نرمال ایجاد نشده است (هرچند پروفیل‌های پروتئینی میان گونه‌ها تفاوت‌هایی را نشان دادند) و تنش شوری باعث تغییرات کمی پروتئین‌ها می‌شود (Yildiz and Terzi 2008).

دمای پایین خطری جدی برای کشاورزی به شمار رفته و بقا، حاصلخیزی و توزیع جغرافیایی گیاهان را در سطح وسیعی از جهان با محدودیت مواجه می‌کند. معمولا مواجهه با دمای پایین غیر کشنده موجب تغییرات متنوع بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی (پروتئین‌های محلول، پروتئین‌های آپوپلاستیک (دارای فعالیت ضد یخ زدگی، آنزیم‌ها، ترکیبات فنولی و ...) و مولکولی در گیاهان می‌شود که می‌تواند منجر به پاسخ اقلیمی شود که توسط توانایی بیشترشان در استقامت در برابر صدمات و بقا در تنش دمای پایین کشنده توصیف و مشخص می‌شود (Koc et al. 2003; Karimzade et al. 2010). در گیاهان به نظر می‌رسد که سرما ذخیره پروتئین محلول کل و آپوپلاستیک پروتئین را افزایش می‌دهد (Koc et al. 2010). بررسی تغییرات کمی کل پروتئین‌های محلول را در کالوس‌های جنینی منتج شده از دو رقم گندم نان (یک رقم بهاره و یک رقم پاییزه) نشان داد که کل محتوای پروتئینی محلول هر دو رقم در مواجهه با تیمار سرما (دوره ۴ زمانی معینی در ۴ درجه) از نظر کمی تفاوت معنی‌داری

تنش خشکی یکی از شایع‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و تولید را تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب القای بسیاری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان می‌شود گیاهان در جهت سازگاری، سازوکارهای تحمل را توسعه می‌دهند (Arora et al. 2002). تنوع پروتئینی بخش اساسی از پاسخ گیاه به تنش محیطی و نیز سازگاری با شرایط محیطی است (Vierstra 1993; Hieng et al. 2004; Bakalova et al. 2008; Koc et al. 2010). تنش آبی سطوح پروتئینی گیاهان را تحت تاثیر قرار داده و نتایج ضد و نقیضی را به همراه داشته است به طوریکه برخی کاهش و گروهی افزایش در سطوح پروتئینی را تحت تنش آبی گزارش کرده‌اند (Tod and Basler 1965; Pierre and Savoure 1990; Roy-Macaulay et al. 1992; Close 1996, 1997; Svensson et al. 2002; Mrian et al. 2003). تنش خشکی بر پروتئین ذخیره دانه گیاه نخودفرنگی اثر معنی‌دار داشته و با افزایش شدت خشکی، پروتئین محصول کاهش یافته است (Mansourifar et al. 2011). در بررسی الگوی پروتئینی کوتیلدون گیاهچه‌های در حال جوانه‌زنی خللر تحت تنش آبی (10% PEG) مشخص شد که بین رقم‌ها، تحت شرایط شاهد و تنش تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد. بطوریکه تحت تنش تنوع مختص به ژنوتیپ مشاهده شد (Bibi et al. 2009). بررسی تاثیر کمبود آب بر روی ذخیره پروتئینی دانه در سه رقم گندم، افزایش تراکم پروتئین در آندوسپرم را نشان داد (Konopka et al. 2007). تنش شوری نیز از عوامل محدود کننده بوده و انتظار می‌رود افزایش شوری زمین‌های زراعی اثرات ویرانگر جهانی داشته و به کاهش ۳۰ درصد زمین طی ۲۵ سال آینده و بیش از ۵۰ درصد تا اواسط قرن ۲۱ منجر شود (Wang et al. 2003). تنش شوری موجب تغییرات پروتئینی (در الگو و محتوای پروتئینی) در گیاهان می‌شود (Hendawey 2009; Parida et al. 2004). بررسی الگوی پروتئینی ارقام گندم تحت تنش شوری نشان داد که سنتز برخی پلی‌پپتیدها افزایش یا کاهش یافته که این تفاوت‌ها احتمالا به دلیل فعالیت ژن‌های دخیل در سازگارسازی گیاه با شرایط شور می‌باشد. بنابراین الگوی پروتئینی و تجزیه

¹ Polyethylene glycol

نتایج و بحث

تجزیه آماری این آزمایش به این صورت انجام شد که هر سطح از هر تنش به عنوان یک تیمار (یک تنش) با کلیه سطوح هر سه تنش و نیز شاهد مورد مقایسه قرار گرفت. طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) تمام اثرات ساده و نیز اثرات متقابل تنش×رقم و تنش×اندام معنی‌دار شده و نتیجه‌ی آزمون مقایسه میانگین دانکن برای اثرات معنی‌دار در جداول (۲ تا ۶) نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده تحت تنش‌های مختلف، متحمل و یا حساس بودن ارقام و نیز اندام مورد بررسی موجب بروز پاسخ‌های متنوع با مکانیزم‌های مختلف می‌شود. با توجه به نوع ارقام مورد استفاده معنی‌دار شدن اثر رقم دور از انتظار نبود و براساس آزمون مقایسات میانگین دانکن (جدول ۲) میزان پروتئین کل در رقم حساس (قدس) نسبت به رقم متحمل (الوند) افزایش معنی‌داری داشت. بنابر این چنین به نظر می‌رسد که رقم متحمل با تنظیم کاهشی بیان برخی ژن‌ها قادر به تحمل بهتر شرایط تنش می‌باشد. که این تغییرات با آزمایشی که تفاوت معنی‌داری بین ارقام گندم مواجه با تنش را گزارش کرده بود موافق می‌باشد (Bibi et al. 2009).

جدول ۱- میانگین مربعات و تجزیه واریانس محتوای پروتئین محلول کل

منابع تغییر	درجه آزادی	پروتئین محلول کل
رقم	۱	۳۲/۳۵۲۴*
تنش	۵	۱۶۸/۳۲۳۵**
اندام	۱	۱۱۷/۹۱۸۹**
تنش×رقم	۵	۱۷۱/۶۲۹۰**
رقم×اندام	۱	۱۸/۳۸۱۹ ^{ns}
تنش×اندام	۵	۱۰۳/۹۹۳۲**
تنش×رقم×اندام	۵	۱۱/۳۳۷۹ ^{ns}
خطای آزمایش	۲۴	۷/۱۴۳۰

ns, *, ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۲- مقایسات میانگین اثر رقم براساس آزمون دانکن

رقم	میانگین (mg/ FW)
قدس (حساس)	۳۷/۵۶۱ a
الوند (متحمل)	۳۵/۹۱۹ b

* حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند

در مقایسه با شاهد (همان دوره زمانی در ۲۵ درجه) دارند (Karimzade et al. 2003). پژوهش حاضر با هدف یافتن تفاوت‌های موجود در روند تغییرات و الگوی پروتئینی اندام‌های مختلف ارقام متحمل و حساس به تنش‌های غیر زنده، دو رقم قدس (حساس) و الوند (متحمل) گندم در مرحله گیاهچه را تحت اثر تنش‌های خشکی، شوری و دمای پایین مورد مطالعه قرار داد.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی اثر تنش‌های غیرزنده بر مقدار و الگوی پروتئینی، بذور دو رقم متحمل (الوند) و حساس (قدس) گندم (Kafi and Stewart 1998 ; Khodabande 2005) تحت تنش‌های شوری، خشکی و دمای پایین مورد مطالعه قرار گرفتند. هر پتری دیش حاوی ۲۵ بذر بود و تنش خشکی با استفاده از PEG 6000 به روش میشل و کافمن (Kaufman and Michel 1973) در دو سطح ۶- و ۹- بار در دمای ۲۲ درجه، تنش شوری با استفاده از NaCl در دو سطح EC^۱ ۹ و ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر در دمای ۲۲ درجه و تنش دمای پایین در یک سطح با دمای ۱۰°C (و آب مقطر) و نیز شاهد برای هر سه تنش (با شرایط دمای ۲۲ درجه و آب مقطر) در دو تکرار بر بذور کشت شده در پتری دیش در داخل اتاقک رشد به صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. پس از پایان روز ششم، نمونه برداری از دو بافت ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌ها انجام گرفت و پس از تثبیت در ازت مایع، در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. استخراج پروتئین محلول کل به روش عمومی استخراج پروتئین و سنجش پروتئین محلول کل به روش کالریمتری^۲ و با روش Bradford (1979) انجام شد و جهت بررسی تغییرات مقدار پروتئین محلول کل در این آزمایش از تکنیک SDS-PAGE که از فنون رایج برای آنالیز پروتئین‌های رقم‌های گندم است (Neves and Lourenco 1995; Abdel-Tawab et al. 1998) به روش Laemli (1970) استفاده شد.

^۱ Electrical Conductivity^۲ Colourimetric

قدرس) سطوح مختلف شوری و شاهد از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در مقدار پروتئین محلول ایجاد نکردند. همچنین تنش دمای پایین در رقم متحمل بیشترین مقدار پروتئین را موجب شده و دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد و تمامی سطوح تنش های دیگر بود. اما در رقم حساس دمای پایین موجب تفاوت معنی‌دار با شاهد و بقیه سطوح تنش‌ها (به جز خشکی ۹- بار) نشد. بطور کل به غیر از دمای پایین و نیز سطح دوم خشکی و شوری بقیه سطوح تنش‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد ایجاد نکردند. بررسی الگوهای پروتئینی چند رقم خللر تحت تنش خشکی آشکار کرد که بین رقم‌ها، تحت شرایط شاهد و تنش تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد (Bibi et al. 2009).

بررسی و مقایسه گونه‌های مختلف جوهای بومی ایران از نظر میزان کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین و آنزیم نشان داد که گونه‌ها و ژنوتیپ‌های داخل گونه‌ها از لحاظ صفات مورد بررسی تنوع بسیار معنی‌داری نشان می‌دهند (Ebrahimi et al. 2010).

معنی‌دار شدن اثر متقابل تنش × اندام و نتایج آزمون مقایسه میانگین دانکن (جدول ۶) نشان داد عمل تنش‌های گوناگون در اندام‌های مختلف یکسان نبوده و بر حسب نوع یا سطح تنش و اندام مورد نظر تغییرات متنوعی رخ داده است. بیشترین مقدار پروتئین در اندام ساقه‌چه و در اثر سطح دوم تنش خشکی (۹-) بار ایجاد گردید و سطوح این تنش در دو دسته متفاوت آماری قرار گرفت ولی سطح اول تنش نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نداشت. در ریشه‌چه نیز سطح دوم تنش خشکی (۹-) بار موجب بیشترین میزان پروتئین محلول در این اندام گردید. سطوح مختلف تنش خشکی در ریشه‌چه در دسته‌های آماری متفاوتی نسبت به یکدیگر و شاهد قرار گرفتند. مشاهده شد که در هر دو اندام ریشه‌چه و ساقه‌چه میزان پروتئین در اثر تنش دمای پایین افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت اما نسبت به یکدیگر از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. بطور کل در ریشه‌چه به غیر از سطوح تنش شوری، سایر تنش‌ها تفاوت (افزایش) معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین در ساقه‌چه به جز سطح اول تنش‌های خشکی و شوری، بقیه نسبت به شاهد

اثر تنش در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد و بر اساس آزمون دانکن (جدول ۳) تنش‌ها در دسته‌های آماری متفاوتی قرار گرفتند. سطح دوم خشکی و پس از آن دمای پایین موجب بیشترین میزان پروتئین کل شدند البته این دو تنش نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند. کمترین میزان پروتئین نیز در تیمار شاهد مشاهده شد که البته تفاوت معنی‌داری با سطح اول تنش‌های خشکی و شوری نداشت، همچنین اثر اندام در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار گردید و آزمون دانکن (جدول ۴) دو اندام ریشه‌چه و ساقه‌چه را در دو دسته متفاوت آماری قرار داد که این موارد با نتایج (Bakalova et al. 2008) مطابقت دارد.

جدول ۳- مقایسات میانگین اثر تنش بر اساس آزمون دانکن

تنش	میانگین (mg/ FW)
شاهد	۳۲/۲۱ d
سطح اول خشکی (۶- بار)	۳۴/۴۶ cd
سطح دوم خشکی (۹- بار)	۴۴/۶۴ a
سطح اول شوری (EC=۹)	۳۳/۴۵ d
سطح دوم شوری (EC=۱۵)	۳۶/۴۵ c
دمای پایین	۳۹/۲۲ b

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند

جدول ۴- مقایسات میانگین اثر اندام بر اساس آزمون دانکن

اندام	میانگین (mg/ FW)
ساقه‌چه	۳۸/۳۰۷ a
ریشه‌چه	۳۵/۱۷۲ b

* حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند

با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل تنش × رقم و بر اساس نتایج آزمون مقایسات میانگین دانکن (جدول ۵) بیشترین مقدار پروتئین در رقم قدس و تحت سطح دوم تنش خشکی (۹- بار) ایجاد شد که با سطح اول تنش خشکی (۶-) بار و شاهد (که در یک دسته آماری اند) تفاوت معنی‌دار دارد. اما در رقم متحمل (الوند) سطوح مختلف تنش خشکی با یکدیگر و نیز شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. سطوح تنش شوری در رقم متحمل با یکدیگر تفاوت چندانی نداشتند، گرچه سطح دوم شوری (EC=۱۵) و شاهد در دسته‌های آماری مختلف قرار گرفتند. در رقم حساس

جدول ۵- مقایسات میانگین اثر متقابل تنش × رقم بر اساس آزمون دانکن

تنش	رقم	میانگین (mg/ FW)
شاهد	الوند	۳۱/۰۶۵ d
سطح اول خشکی (۶- بار)	الوند	۳۳/۳۸۳ dc
سطح دوم خشکی (۹- بار)	الوند	۳۵/۲۰۵ dc
سطح اول شوری (EC=۹)	الوند	۳۴/۹۵۰ dc
سطح دوم شوری (EC=۱۵)	الوند	۳۷/۶۷۴ c
دمای پایین	الوند	۴۳/۲۳۹ b
شاهد	قدس	۳۳/۳۵۶ dc
سطح اول خشکی (۶- بار)	قدس	۳۵/۵۳۷ dc
سطح دوم خشکی (۹- بار)	قدس	۵۴/۰۷۵ a
سطح اول شوری (EC=۹)	قدس	۳۱/۹۵۷ d
سطح دوم شوری (EC=۱۵)	قدس	۳۵/۲۲۵ dc
دمای پایین	قدس	۳۵/۲۱۸ dc

* حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می باشند

جدول ۶- مقایسات میانگین اثر متقابل تنش × اندام بر اساس آزمون دانکن

تنش	اندام	میانگین (mg/ FW)
شاهد	ریشه	۲۹/۳۳۶ f
سطح اول خشکی (۶- بار)	ریشه	۳۳/۷۳۹ de
سطح دوم خشکی (۹- بار)	ریشه	۳۹/۶۸۲ bc
سطح اول شوری (EC=۹)	ریشه	۲۹/۴۹۸ f
سطح دوم شوری (EC=۱۵)	ریشه	۳۱/۱۰۳ ef
دمای پایین	ریشه	۳۷/۷۶۳ bcd
شاهد	ساقه	۳۵/۰۸۵ de
سطح اول خشکی (۶- بار)	ساقه	۳۵/۱۸۱ de
سطح دوم خشکی (۹- بار)	ساقه	۴۹/۵۹۸ a
سطح اول شوری (EC=۹)	ساقه	۳۷/۴۰۹ cd
سطح دوم شوری (EC=۱۵)	ساقه	۴۱/۷۹۶ b
دمای پایین	ساقه	۴۰/۶۹۴ bc

* حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می باشند

مختلف متفاوت می باشد. در آندوسپرم محتوای پروتئین کل از بیشترین تا کمترین مقدار به ترتیب تحت شرایط دمای پایین، ساکارز، NaCl، آب اکسیژنه، شاهد، آبسیزیک اسید و دمای بالا ولی در ریشه در اثر دمای پایین، ساکارز، دمای بالا، آبسیزیک اسید، NaCl، آب اکسیژنه و شاهد رخ داد. ضمناً محققین دیگری نیز افزایش و تغییرات کمی در محتوای پروتئین محلول تحت

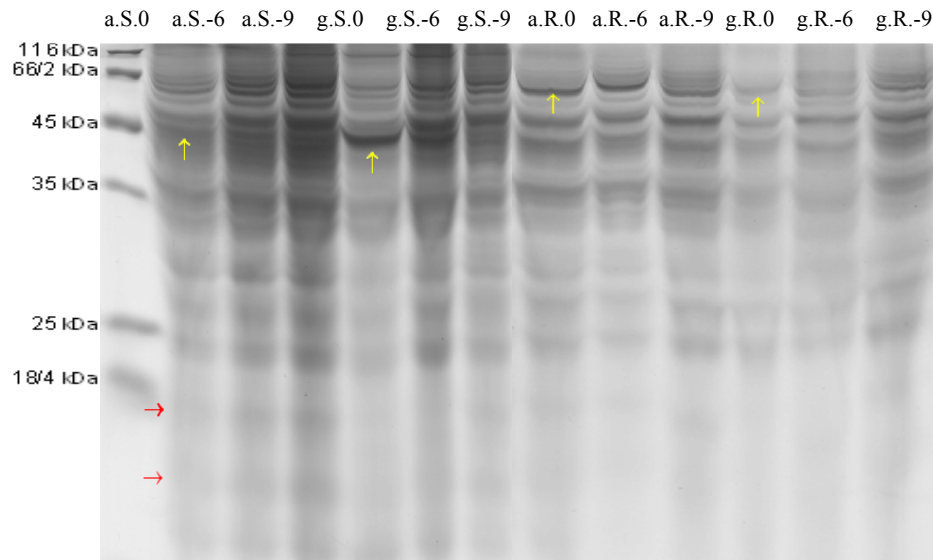
افزایش معنی‌داری داشتند. این مشاهدات تا حدود زیادی با نتایج محققینی که به مطالعه تغییر در محتوای پروتئینی ریشه و آندوسپرم گندم در مراحل ابتدایی جوانه زنی تحت تنش‌های دهیدراسیون پرداختند و گزارش کردند که پاسخ به شرایط تنش مختص بافت است (Bakalova et al. 2008) تطابق نشان می‌دهد آن‌ها مشاهده کردند که تغییرات مقدار پروتئین در اندام‌های

رقم متحمل (الوند) غلظت نوارها بیشتر و تغییرات در شدت نوارها طی سطوح تنش نسبت به شاهد کمتر بود. در آزمایشی اعمال تنش های مختلف دهیدراسیون نشان داد که حرکت پروتئین‌های محلول، تحت تاثیر نوع تنش قرار می‌گیرد و پاسخ به شرایط تنش، مختص به بافت است و تحت تنش خشکی نوارهای ۶۰-۵۲، ۲۵ و ۱۹-۲۰ کیلودالتونی تظاهر شدیدی دارند (Bakalova et al. 2008) که تا حدود زیادی با نتایج ارائه شده در فوق مطابقت دارد. همچنین نتایج آزمایش حاضر با مشاهدات آزمایشی که طی آن الگوی نواری پروتئینی گیاهچه‌های ژنوتیپ‌های مختلف خللر تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت‌هایی در تظاهر نوارهای پروتئینی در برخی وزن‌های مولکولی مشاهده شد (Bibi et al. 2009) همخوانی دارد.

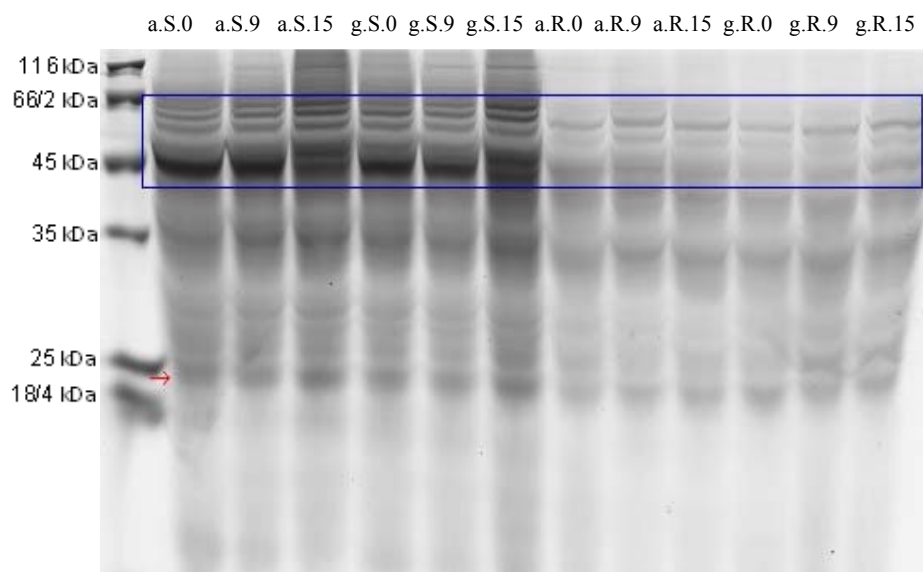
تحت تنش شوری (شکل ۲) در ریشه‌چه رقم حساس (قدس) در قسمت بالایی ژل (حدوداً تا حداقل نوار ۲۵ کیلودالتونی) شدت نوارها در سطوح مختلف یکسان و یا با افزایش مقدار تنش روند افزایشی بسیار کمی نشان دادند و در نیمه پایینی ژل شدت نوارها با افزایش شدت تنش ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. اما در ساقه‌چه رقم حساس با افزایش میزان تنش ابتدا از شدت نوارها کاسته و سپس افزوده شد به این صورت که کمترین شدت نوار را در سطح تنش $EC=9$ و بیشترین شدت نوار در سطح تنش $EC=15$ مشاهده شد. همچنین در ساقه‌چه هر دو رقم مشاهده شد که نواری که بلافاصله بالای نوار ۴۵ کیلودالتونی (که دارای بیشترین غلظت در تمام ستون‌ها بود) قرار داشت در سطح دوم تنش شوری یعنی $EC=15$ با غلظت و قوت بسیار بیشتری نمایان شد. در مورد رقم متحمل در ریشه‌چه شدت نوارها دارای روند تغییر خاص و یا ثابتی نبودند اما در ساقه‌چه رقم متحمل در اکثریت قریب به اتفاق موارد، شدت نوارها با افزایش شدت تنش روند افزایشی واضحی را نشان داد به این صورت که ترتیب سطوح تیمار براساس شدت نوار عبارت بود از $EC=9$ ، $EC=15$ و شاهد. بنا بر این تحت این تنش در اندام‌های مورد نظر ارقام، تغییرات کیفی در نوارها مشاهده نشد و تنش شوری موجب تغییرات کمی نوارهای پلی‌پپتیدی گردیده است. این نتایج یعنی

تنش سرما در برگ و ساقه فلفل و نیز در اثر تنش خشکی در کالوس‌های جنینی و آندوسپرم گندم گزارش کردند (Karimzade et al. 2003; Konopka et al. 2007; Koc et al. 2010) که با مشاهدات پژوهش حاضر توافق دارد.

در بررسی نوارهای پروتئینی با روش SDS-PAGE (شکل ۱) تحت تنش خشکی در ریشه‌چه رقم حساس (قدس) در اغلب نوارها تیمار شاهد کمترین شدت نوار و با افزایش مقدار تنش روند افزایشی در شدت نوار مشاهده شد در حالی که در ساقه‌چه این رقم در اکثریت قریب به اتفاق نوارها گرچه کمترین شدت نوار در سطح شاهد و بیشترین شدت در سطح تنش ۶- بار مشاهده گردید اما در سطح تنش ۹- بار مجدداً از شدت نوارها کاسته شد. در مورد رقم متحمل (الوند) در ریشه‌چه در بیشتر موارد روند منظم و ثابتی دیده نشد اما در نوار حدود ۴۵ کیلودالتونی که بیشترین غلظت را در میان نوارها داشت کمترین شدت نوار در سطح ۹- بار و بیشترین شدت نوار در سطح ۶- بار مشاهده شد. همچنین در ساقه‌چه رقم متحمل شدت نوارهای معادل (هم وزن) با اعمال تنش و افزایش شدت آن افزایش یافت. به این شکل که کمترین شدت نوار در شاهد و بیشترین شدت در همان نوار در تنش ۹- بار مشاهده شد. ضمناً در ساقه‌چه رقم حساس (قدس) نوار بسیار قوی ۴۵ کیلودالتونی در شاهد، تحت سطح اول تنش خشکی به دو نوار قوی و در سطح دوم تنش خشکی نیز همان دو نوار اما با غلظت بیشتر نوار بالایی نمایان گردید. در رقم متحمل در شاهد نوار ۴۵ کیلودالتونی و نوار بالایی آن با شدت و تمایز بسیار کمتری نسبت به شاهد رقم حساس دیده می‌شوند که در سطح اول تنش هر دو نوار افزایش غلظت یافته و در سطح دوم تنش نوار زیرین حذف (و یا بسیار بسیار ضعیف) شده و نوار بالایی شدیداً غلظت می‌یابد. همچنین در تیمار شاهد رقم متحمل (الوند) دو نوار حدوداً ۱۸ و ۱۶ کیلودالتونی وجود دارند و از شاهد به سطح اول و دوم تنش روند افزایش غلظت دارند. اما این نوارها در تیمار شاهد رقم حساس وجود ندارند، در سطح اول تنش خشکی پدیدار گشته و در سطح دوم تنش ضعیف تر می‌شوند. تحت تنش خشکی در ریشه‌چه، با مقایسه دو رقم تغییر کیفی در نوارها مشاهده نشد اما همواره در



شکل ۱- آشکارسازی نوآرهای پروتئینی ساقه‌چه و ریشه‌چه دو رقم حساس (قدس) و متحمل (الوند) تحت سطوح مختلف تنش خشکی روی ژل SDS-PAGE (a, الوند؛ G, قدس؛ S, ساقه‌چه؛ R, ریشه‌چه؛ 0, -6 و -9 سطوح تنش).



شکل ۲- آشکارسازی نوآرهای پروتئینی ساقه‌چه و ریشه‌چه دو رقم حساس (قدس) و متحمل (الوند) تحت سطوح مختلف تنش شوری روی ژل SDS-PAGE (a, الوند؛ G, قدس؛ S, ساقه‌چه؛ R, ریشه‌چه؛ 0, 9 و 15 سطوح تنش).

بافت بوده و شوری موجب غلظت بالای نوآرهای بین ۵۲-۶۰ و ۲۵ کیلودالتونی در ریشه‌چه گندم (Bakalova et al. 2008) و نیز در ساقه‌چه شده است. در اثر تنش دمای پایین (شکل ۳) در اغلب موارد شدت نوآرها در ریشه‌چه رقم حساس و متحمل نسبت به شاهد افزایش نشان داد.

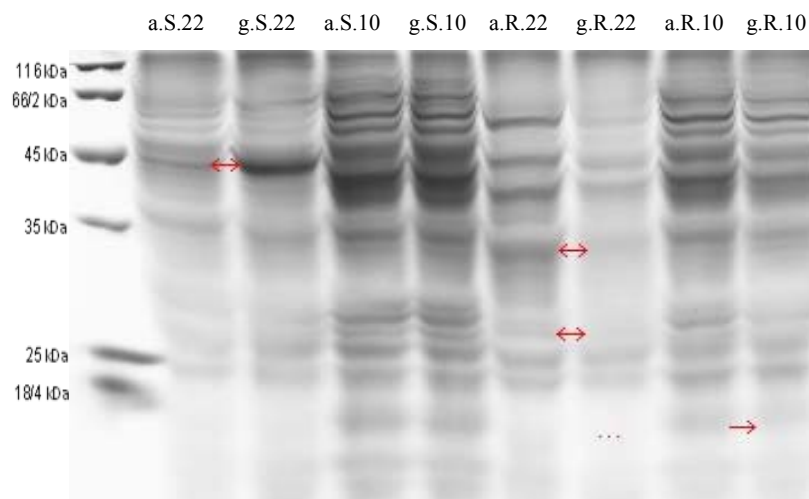
مشاهده تغییرات کمی نوآرهای پروتئینی در گیاهان رشد کرده تحت تنش شوری، توسط بسیاری از پژوهشگران در اندام‌ها و مراحل رشدی مختلفی از گندم مانند گیاهچه، برگ‌های اولیه و دانه گزارش شده است (Yildiz and Terzi 2008; Hendawey 2009; Metwali et al. 2011). پاسخ به شرایط تنش، مختص به

گردید در واقع الگوی کاهش/ افزایش (یعنی در سطح اول کاهش ولی در سطح دوم افزایش یافت) مشاهده گردید. در ریشه‌چه نیز در هر دو تنش روند نامنظم تغییر در شدت نوارها در رقم متحمل مشاهده شد. در رقم حساس در تنش خشکی سطح اول تنش موجب افزایش و سطح دوم نیز باعث افزایش بیشتر شدت نوارها گردید به عبارت بهتر روند افزایشی مشاهده شد. اما در همین رقم در تنش شوری نوارهای سنگین‌تر از ۲۵ کیلو دالتون تحت سطوح تنش روند افزایشی کم و پس از آن روند افزایش/کاهش (یعنی در سطح اول افزایش ولی در سطح دوم کاهش یافت) نشان دادند. نهایتاً با توجه به نتایج حاصل از SDS-PAGE چنین به نظر می‌رسد که تنش‌های خشکی و شوری (با سطوح مورد استفاده در این آزمایش) در اندام‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه ارقام متحمل و حساس تغییرات کمی متفاوتی در الگوهای پروتئینی ایجاد می‌کنند ولی در مورد تنش دمایی پایین (با سطح مورد استفاده در این آزمایش) تغییرات الگوی پروتئینی ارقام روند یکسان (افزایشی) از لحاظ کمی داشت. البته در مورد تنش‌های خشکی و دمایی پایین به ترتیب سه و یک (به احتمال زیاد دو) نوار پلی پپتیدی نیز تغییرات کیفی نیز نشان دادند.

در مطالعه ای جامع تر به منظور بررسی مقدار و الگوی پروتئینی ریشه‌چه و ساقه‌چه با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل رقم×تنش و تنش×اندام می‌توان با استفاده از تعداد بیشتری از ارقام حساس و متحمل و نیز دامنه وسیعتری از سطوح تنش‌های مختلف به نتایج قابل تعمیم دست یافت. همچنین با توجه به اینکه در طبیعت تنش‌های محیطی تفکیک شده نیستند و غالباً خشکی با شوری توأم است و دمایی پایین نیز می‌تواند در این میان به ویژه در مرحله گیاهچه تهدید کننده باشد، ممکن است اجرای این آزمایش در شرایط تلفیقی از این تنش‌ها منجر به نتایج کاربردی‌تری گردد. ضمن اینکه استفاده از الکتروفورز دوبعدی برای تجزیه تحلیل تغییرات پروتئین‌ها (به ویژه از لحاظ کیفی) اطلاعات دقیقتری از تفاوت پاسخ اندام‌های مختلف ارقام متفاوت، به نوع و سطح تنش بدست خواهد داد.

روند فوق در ساقه‌چه هر دو رقم نیز صادق است البته با این تفاوت که در ساقه‌چه افزایش شدت نوار نسبت به شاهد واضح تر و بیشتر است. این نتایج با مشاهدات برخی محققین که اعلام کردند حرکت پروتئین‌های محلول، تحت تاثیر نوع تنش قرار می‌گیرد و نیز اینکه پاسخ به شرایط تنش، مختص به بافت است مطابقت دارد (Bakalova et al. 2008) همچنین مشاهده شد در ساقه‌چه تحت دمایی پایین نوار حدوداً ۴۵ کیلو دالتونی رقم حساس (قدس) بسیار قوی تر از رقم متحمل است. در تیمار شاهد در ریشه‌چه در رقم متحمل نوار نسبتاً قوی ۳۵ کیلو دالتونی مشاهده شد که در رقم حساس بسیار کم‌رنگ و ضعیف بود و ضمناً نوار حدوداً ۲۵ کیلو دالتونی در الوند وجود داشت که در قدس دیده نشد. همچنین در ریشه‌چه رقم حساس (قدس) نوار حدود ۱۷ کیلو دالتونی در اثر تنش دمایی پایین ظاهر شد که در شاهد وجود نداشت.

به طور کلی با بررسی و مقایسه ستون‌های نواری هر تیمار (هر چاهک) تنش خشکی در ساقه‌چه رقم متحمل روند افزایشی واضحی مشاهده شد به این شکل که ستون نواری شاهد کمترین شدت نوارها و سپس سطح اول تیمار خشکی یعنی شدت بیشتر و نهایتاً سطح دوم تنش خشکی بیشترین شدت نوار را نشان داد. در واقع یک روند افزایشی در ژل مشاهده شد در حالی که در رقم حساس مشاهده شد که سطح اول تنش خشکی موجب شدت بیشتری نسبت به شاهد در نوارها شد اما سطح دوم دارای شدت نواری کمتری نسبت به سطح اول بود. به عبارت دیگر الگوی مشاهده شده در رقم حساس دارای روند افزایش/کاهش (یعنی در سطح اول افزایش ولی در سطح دوم کاهش یافت) بوده است. در تنش شوری نیز مشاهده شد که در ساقه‌چه رقم متحمل شدت ستون‌های نواری هر تیمار (چاهک) در سطح اول تنش بیشتر از شاهد بود و همچنین شدت نوارهای سطح دوم شوری از سطح قبلی نیز بیشتر بود که بطور کلی روند افزایشی روی ژل مشاهده شد. در صورتی که در ساقه‌چه رقم حساس به شوری، سطح اول این تنش موجب کاهش شدت نوارها نسبت به شاهد گردید و سطح دوم تنش موجب افزایش شدت نوارها (بیش از شاهد)



شکل ۳- آشکار سازی نوار های پروتئینی ساقه‌چه و ریشه‌چه دو رقم حساس (قدس) و متحمل (الوند) تحت سطوح مختلف تنش دمایی پایین روی ژل SDS-PAGE (a, الوند؛ g, قدس؛ S, ساقه‌چه؛ R, ریشه‌چه؛ 22°C و 10°C به ترتیب سطوح شاهد و تنش).

منابع

- Abdel-Tawab FM, Fahmy EM, Bahieldin A, Mohmoud Saleh OM (1998) Development of genetic and molecular indices for drought tolerance in some inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.). Proc Third Arab Conf Biotech Cairo, 5: 195-204.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82,
- Bakalova S, Nedeva D, Mckee J (2008) Protein profiles in wheat seedlings subjected to dehydration stress. Applied Ecology and Environmental Research 6: 37-48.
- Bibi N, Hameed A, Ali H, Iqbal N, Haq MA, Atta BM, Shah TM, Alam SS (2009) Water stress induced variations in protein profiles of germinating cotyledons from seedlings of chickpea genotypes. Pak J Bot 41: 731-736.
- Bradford MM (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.
- Close TJ (1996) Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiol Plant 100:291-296.
- Close TJ (1996) Dehydrins: Emergence of a bicemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiol Plant 97:795-803.
- Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M Evaluation and comparison of chlorophyll content, carotenoid, protein and enzyme in different barley species of Iran. Iranian Journal of Agricultural Sciences 41 :57-65. (In Farsi)
- Hendawey MH (2009) Effect of salinity on proteins in some wheat cultivars. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3: 80-88.

- Hieng B, Ugrinovich K, Sustar-Vozlich J, Kidric M (2004) Different classes of proteases are involved in the response to drought of Phaseolus vulgaris L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology. 161: 519-530.
- Kafi M, Stewart WS (1998) Effect of salinity on ion accumulation in shoot and roots of sensitive and tolerant wheat cultivars. Iranian Journal of Field Crop Sciences 2: 9-21. (In Farsi)
- Karimzade G, Bagheri K, Jalali-Javaran M (2003) Changes in the callus soluble proteins of winter and spring wheat cultivars following cold treatment. Plant Tissue Cult 13: 135-144.
- Kaufman R, Barlyn E, Michel N (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology 51: 914-916.
- Khodabande N (2005) Ceraels, University of Tehran Press. (In Farsi)
- Koc E, Islek C, Ustun AS (2010) Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. GU Journal of Science 23: 1-6.
- Konopka I, Tanska M, Pszczolkowska A, Fordonski G, Kozirok W, Olszewski J (2007) The effect of water stress on wheat kernel size, color and protein composition. Polish Journal of Natural Sciences 22: 157-171.
- Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Mansurifar C, Shaban M, Ghobadi M, Rostami Ajirlu A (2011) Effect of drought stress and N fertilizer on yield, yield components and grain storage proteins in chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. African Journal of Plant Science 5 : 634-642.

- Marian CO, Krebs SL, Arora R (2003) Dehydrin variability among *Rhododendron* spp: A25 kDa dehydrin is highly conserved and associated with cold acclimation across wide array of species. *New Phytol* 161 : 773-780.
- Metwali E. MR, Eid MH and Bayoumi TY (2011) Agronomical traits and biochemical genetics markers associated with salt tolerance in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5 : 174-183.
- Neves VA, Lourenco EJ (1995) Isolation and in vitro hydrolysis of globulin G1 from lentils (*Lens culinaris*, Medik). *J Fd Biochem* 19: 109-120.
- Parida A, Das A, Mitra B, Mohanty P (2004) Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the Mangrove *Brugueria parviflora* Z. *Naturforsch* 59c: 408-414.
- Pierre M, Savoure A (1990) Effects of water-stress and SO₂ pollution on spruce endoproteases. *Plant Physiol Biochem* 28: 95-104.
- Roy-Macaulay H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Vieira da Silva J (1992) Effect of drought stress on proteolytic activities in Phaseolus and Vigna leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol Plant* 85:90-96.
- Svensson J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. In: K. B. Storey and J. M. storey (Eds.), *Sensing Signaling and Cell Adaptation*, Elsevier Science BV pp.155-171.
- Tod GW, Basler E (1965) Fate of various protoplasmic constituents in droughted wheat plants. *Phyton* 22 : 79-85.
- Vierstra RD (1993) Protein degradation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 385-410.
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Yildiz M, Terzi H (2008) Effects of NaCl on protein profiles of tetraploid and hexaploid wheat species and their diploid wild progenitors. *Plant Soil Environ* 54: 227-233.