

ارزیابی تأثیر تنش شوری القا شده توسط کلرید سدیم روی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و الگوی پروتئوم کلزای پاییزه

Evaluation of the effect of salinity stress induced by sodium chloride on morphological, physiological and biochemical traits and proteome pattern of autumn rapeseed

محمدرضا نقوی^۱، معروف خلیلی^{۱*}

۱- به ترتیب استادیار، دانشیار، بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، ایران

Naghavi MR¹, Khalili M^{*1}

1- Assistant Professor, Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Payame Noor University, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

به منظور بررسی مکانسیم پاسخ به تنش شوری در کلزای پاییزه، رقم متحمل Orient در شرایط گلخانه ارزیابی شد و تنش شوری در مرحله ساقه‌دهی گیاهچه‌ها شروع شد و دو هفته پس از اعمال تنش، نمونه‌های برگ‌ی تهیه شدند. نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش ارزش صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک، ایجاد عدم تعادل در غلظت‌های یونی از طریق افزایش غلظت یون سدیم و کاهش یون پتاسیم درون سلولی و همچنین کاهش نسبت پتاسیم به سدیم درون سلول‌های برگ شد. در ضمن در شرایط تنش شوری میزان محتوای آب نسبی برگ کاهش یافت ولی غلظت میزان پرولین و گلايسین بتائين بیشتر از شاهد بود. همچنین نتایج تجزیه پروتئوم نشان داد که در این رقم بین شرایط شاهد و تیمار تنش شوری شدید از بین ۱۱۸ لکه پروتئینی تعداد هشت لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای اختلاف مقدار معنی‌دار و همچنین فاکتور القای قابل ملاحظه بودند. عملکرد پروتئین‌های شناسایی شده در رقم مورد مطالعه مرتبط با هم‌نوسازی سلول، متابولیسم انرژی و کربوهیدرات، واکنش نوری فتوسنتز و تنظیم رونویسی (ستز پروتئینی) بودند.

واژه‌های کلیدی

پروتئومیکس

تنش شوری

روابط آبی و یونی

کلزا

مقدمه

کلزا در گروه گیاهان زراعی نسبتاً متحمل به شوری قرار داشته و قابلیت کشت در مناطق با شوری کم خاک را دارد (Ashraf and McNeilly 2004). از طرف دیگر، تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بوده و آثار منفی آن بر رشد گیاهان زراعی باعث افزایش پژمردگی‌ها در زمینه تحمل به شوری با هدف بهبود تحمل گیاهان شده است (Zhao et al. 2007). گیاهان در مواجهه با تنش از خود واکنش نشان می‌دهند ولی همه ارقام گیاهی واکنش یکسانی به تنش شوری ندارند و احتمال می‌رود در میان ارقام موجود ژنوتیپ‌هایی با تحمل بیشتر نسبت به تنش شوری وجود داشته باشد (Munns and Tester, 2008). انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به تنش به دو روش مستقیم (اندازه‌گیری عملکرد) و غیر مستقیم (اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک مرتبط با تحمل تنش) انجام می‌شود (Dadashi et al. 2007)، بنابراین شناخت ساز و کارهای تحمل به شوری ضروری به نظر می‌رسد. تحمل شوری یک صفت کمی است که توسط ژن‌های متعددی کنترل می‌شود. برخی از این ژن‌ها شناخته شده‌اند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نباتات و غربال ژنوتیپ‌ها استفاده شوند (Ashraf and Mc Neilly 2004). تحمل شوری فرایند پیچیده‌ای است، زیرا تنش شوری موجب از دست دادن آب بافت‌ها، افزایش سمیت یونی، عدم تعادل غذایی و یا ترکیبی از آن‌ها می‌شود (Ashraf et al. 2001).

تنش شوری علاوه بر کاهش ارتفاع گیاه، باعث کاهش سطح برگ و کل ماده خشک و در نتیجه کاهش محصول می‌شود. در اثر تنش شوری، سطح برگ و ارتفاع گیاه خیلی سریع‌تر از سایر شاخص‌های مورفولوژیکی کاهش می‌یابد. زیرا تجمع ماده خشک توسط گیاه، حاصل میزان فتوسنتز خالص و سطح فتوسنتز کننده گیاه است. ژنوتیپ‌های مقاوم، گرایش به حفظ مقادیر بالای این متغیرها را دارند (Su et al. 2013). توصیه می‌شود که گزینش برای تحمل به شوری بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی صورت گیرد. برای این منظور استفاده از شاخص‌های بیوشیمیایی مانند تجمع پرولین، گلاسیسین بتائین، قندها یا نسبت Na^+/Ca^{++} , Na^+/K^+ و غیره کاربرد بیشتری داشته

است (Pandey and Penna 2017). افزون بر اثر اسمزی و سمیت یونی، شوری خاک موجب بروز عدم تعادل تغذیه‌ای در گیاه می‌شود، که شدت و ضعف آن بسته به نوع گیاه و حتی گونه‌های مختلف یک گیاه است. کلر یکی از آنیون‌های غالب در خاک‌های شور می‌باشد و حضور آن به مقدار فراوان نه تنها به‌طور مستقیم موجب سمیت گیاه می‌شود، بلکه باعث برهم خوردن تعادل (نسبت) میان عناصر غذایی موجود در محلول خاک و گیاه می‌شود (Munns et al. 2006). در گیاهان تحت تنش K^+ به برگ‌ها انتقال داده می‌شود در حالیکه Na^+ به شکل یکنواخت‌تری توزیع می‌شود. از این رو، نسبت K^+/Na^+ در گیاهان واقع در شرایط نرمال بیشتر از گیاهان تحت تنش می‌باشد. با افزایش شوری محیط این نسبت کاهش نشان می‌دهد (Pandey and Penna 2017). تجمع کمتر سدیم در بافت گیاهی و در نتیجه افزایش K^+ بافت، موجب افزایش نسبت K^+/Na^+ در گیاه شده و در نتیجه باعث افزایش تحمل گیاه به نمک می‌شود (Houshmand et al. 2005). هم‌چنین، حفاظت از پتانسیل اسمزی مثبت برگ با تجمع ترکیباتی مثل مانیتول، رافینوز، تری هالوز، پرولین و گلاسیسین بتائین که اصطلاحاً محلول‌های سازگار نامیده می‌شوند بدست می‌آید (Verslues et al. 2007). در شرایط شور، گیاهان نیاز به مکانیزم‌های ویژه‌ای برای تنظیم شرایط اسمزی داخلی و تغییر فشار در محیط ریشه دارند، گیاهان تحت تنش از طریق اسیدهای آمینه آزاد، قندهای محلول و پروتئین‌ها پتانسیل اسمزی خود را کاهش می‌دهند و بدین طریق تنظیم اسمزی حاصل می‌شود (Mahmood and Athar, 2003). با افزایش شوری تجمع منیزیم (Valdez-Aguilar et al. 2009)، مقدار نشاسته کل (Pessarakli et al. 2005) و تجمع قندهای ساده نظیر گلوکز و فروکتوز به دلیل افزایش آنزیم اینورتاز در برگ‌های گیاهان تحت تنش (Pinheiro et al. 2001) افزایش یافته و محتوای نسبی آب برگ‌های گیاهچه‌های کلزا با افزایش تدریجی هدایت الکتریکی به تدریج کاهش می‌یابد (Francois 2007). پرولین به عنوان یک اسمولیت برای تنظیم اسمزی است و توزیع آن ساختار دیواره سلولی و پروتئین‌ها را پایدار می‌کند و رادیکال‌های آزاد را تمیز می‌کند. میزان تجمع پرولین در تنش متوسط یا شدید نسبت به سایر اسید آمینه‌ها افزایش می‌یابد (Saadia et al. 2012). گلاسیسین

بتائین نیز یک محلول سازگاری است که در پاسخ به تنش اسمزی انباشته می‌شوند و تجمع این محلول یک عکس‌العمل مهم سازشی است (Pandey and Penna 2017). از طرف دیگر، ظرفیت فتوسنتزی کلروپلاست‌ها به دلیل تنش شوری کاهش می‌یابد، زیرا تنش شوری ساختار کلروپلاست‌ها را به هم زده، باعث عدم ثبات کمپلکس پروتئین رنگدانه‌ها، تخریب ساختار کلروفیل‌ها و تغییر در کمیت و ترکیب کاروتنوئیدها، افزایش کارتنوئیدها در کلزا (Kattab 2007) می‌شود. شاخص کلروفیل برگ‌ها یک شاخص مفید برای بهره‌وری از پتانسیل فتوسنتزی و قدرت عمومی گیاه می‌باشد (Alonso et al. 2002). همچنین اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل یک تکنیک نسبتاً جدیدی است که برای ارزیابی فعالیت‌های فتوسنتزی گیاهان به کار می‌رود (Kocheva et al. 2004). این تکنیک بر اساس محاسبه‌های فیزیولوژیکی پایه‌ریزی شده و بازده مکانیزم برداشت و جذب نور را در ارتباط با فعالیت‌های فتوسیستم II کلروفیل اندازه‌گیری می‌کند (Maxwell and Johnson 2000). نسبت F_v/F_m به عنوان یک شاخص گزینش قابل اطمینان برای شرایط واجد تنش، استفاده شده است (Schreiber et al. 1994). گزارش شده است که میزان عملکرد فتوشیمیایی در فتوسیستم II (F_v/F_m) تحت شرایط تنش کاهش می‌یابد (Mohammadian et al. 2003). در مجموع تحمل به شوری در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است و با انواع ساز و کارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در ارتباط می‌باشد لذا شناخت مکانیسم مولکولی پاسخ به تنش از اهمیت بالایی برخوردار است. سطح بالای شوری خاک و آب آبیاری بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی را به دلیل افزایش فشار اسمزی محلول خاک و همچنین نین ایجاد عدم تعادل در عناصر مورد نیاز گیاه تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش تقسیم و رشد سلولی می‌شود (Gama et al. 2007). از طرف دیگر تنش شوری تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) را در سلول‌های گیاهی افزایش می‌دهد (Khan and Panda 2008). ROSها بسیار فعال و سمی هستند و می‌توانند از طریق آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌های غشا و اسیدهای نوکلئیک منجر به مرگ سلولی شوند (Guo et al. 2012). به طور کلی در گیاهان عالی دو مکانیسم تحمل شوری شناخته شده است: در

مکانیسم اول، گیاه در عکس‌العمل به تنش شوری، یون‌های سمی مانند سدیم و کلر را از برگ‌های خود دفع می‌کند (de Lacerda et al. 2005). در مکانیسم دوم، یون‌های جذب شده به وسیله سلول‌ها در واکوئل‌ها انباشته می‌شوند (Parida and Das 2005). وجود غلظت بالای یون سدیم تعادل غذایی را به هم زده و باعث سمیت یونی و اختلال در تنظیم اسمزی می‌شود (Munns and Tester 2008). از طرف دیگر غلظت بالای کاتیون‌هایی مثل Na^+ که از عناصر اصلی شوری هستند در بافت‌های گیاهی فرایندهای بیوشیمیایی را مختل و یا حتی می‌تواند از انجام آن‌ها ممانعت به عمل آورد و سنتز پروتئین‌های لازم تحت چنین شرایطی دستخوش تغییرهای کمی و کیفی می‌شود، که به نوبه خود باعث اختلال در فرایند رشد می‌شود (Mer et al. 2000).

تنش‌های محیطی معمولاً باعث اختلالات پروتئینی می‌شوند (Joseph and Jini 2010). گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری بر تنش وارد شده غلبه می‌کنند. این عمل از طریق تغییر بیان ژن‌ها در جهت کاهش و یا افزایش میزان پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها نه تنها می‌توانند به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرند، بلکه نقشی اساسی در سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا کنند (Joseph and Jini 2010). از این رو مطالعه پروتئین‌های مذکور جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی تحمل به تنش‌های محیطی ضروری به نظر می‌رسد. رهیافت پروتئومیک ابزاری قدرتمند و مناسب جهت بررسی تغییرهای مقدار و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی است (Sobhanian et al. 2011). از طرفی تجزیه پروتئومیک یکی از بهترین راهبردها جهت بررسی دینامیک تظاهر پروتئین‌ها تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Guo et al. 2012).

در مجموع هدف از این پژوهش مطالعه تغییر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در رقم متحمل کلزا تحت تنش شوری و همچنین بررسی الگوی پروتئینی الکتروفورز دوبعدی رقم مورد مطالعه به منظور شناسایی پروتئین‌های دارای تغییر مقدار تحت تنش شوری به روش طیف سنجی جرمی و بررسی نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای متابولیکی سلولی و ایجاد تحمل به تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش کلزای پاییزه متحمل به شوری Orient که بذر آن از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد، در مرحله گیاهچه‌ای به روش کشت هیدروپونیک در سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی از نظر پاسخ به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در این آزمایش تنش شوری از نوع کلرید سدیم در سه سطح صفر (شاهد)، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار اعمال شد. کاشت گیاهچه‌ها در محیط اصلی آزمایش با توجه به اینکه رقم پاییزه بود بعد از عمل بهاره‌سازی صورت گرفت. برای این کار گیاهچه‌ها در مرحله پنج تا شش برگی به اتاقک رشد انتقال داده شده و تحت دمای دو تا چهار درجه سانتی‌گراد و میزان روشنایی ۱۰ ساعت به مدت هشت هفته قرار داده شدند. بعد از سپری شدن این مدت گیاهچه‌ها را به گلخانه منتقل کرده و بدین ترتیب گیاهان قادر به شروع ساقه‌روی شدند. سپس اعمال تنش بر گیاهان به صورت تدریجی به میزان ۵۰ میلی‌مولار در روز تا رسیدن به مقدار مورد نظر انجام شد و دو هفته پس از اعمال تنش کامل روی گیاهچه‌ها نمونه‌برداری برگ انجام شد و صفات مورد مطالعه با استفاده از روش مناسب خود اندازه‌گیری شدند. برای این منظور محتوای آب نسبی برگ^۱ها به روش (2004) Morant-Manceau et al. اندازه‌گیری شد، برای تعیین پتانسیل آب برگ^۲ از دستگاه محفظه فشار مدل (Soil Moisture Equipment crop, Sanat Barbara, CA) و برای پتانسیل اسمزی^۳ از دستگاه اسمومتر (مدل Osmomat o10, Gonotec) استفاده شد. از طرف دیگر، برای تعیین فلورسانس کلروفیل^۴ از دستگاه فلورومتر (مدل Opti Science, OS-30MSA)، برای شاخص کلروفیل^۵ برگ‌ها از دستگاه کلروفیل‌متر (مدل SPAD-502, Mlolta, Japan) و برای اندازه‌گیری یون‌های K^+ و Na^+ از دستگاه فلاپم فتومتر (مدل Genway Model PFP7/C) استفاده شد. همچنین، غلظت پرولین برگ و میزان گلیسین بتائین

¹ Relative Water Content (RWC)² Leaf Water Potential (LWP)³ Osmotic Potential (OP)⁴ Chlorophyll fluorescence⁵ Chlorophyll Index or SPAD

به ترتیب به روش نین‌هیدرین (ninhydrin) (Bates et al. 1973) و (Grieve and Grattan 1983) و با اسپکتروفتومتر تعیین شد. همچنین علاوه بر این، صفات ارتفاع بوته و وزن خشک بوته‌ها نیز اندازه‌گیری و ثبت شد. در ضمن در این آزمایش، برای افزایش اعتبار نتایج در هر واحد آزمایشی پنج نمونه در نظر گرفته شد و همه نتایج با استفاده از میانگین آن‌ها محاسبه شد. پس از جمع‌آوری داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه، تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه بر اساس طرح آزمایشی و همچنین مقایسه میانگین برای سطوح تنش به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. از طرف دیگر برای تجزیه پروتئوم، دومین برگ رشد یافته تحت شرایط شاهد و تیمار ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (تنش شدید)، تهیه شد و استخراج پروتئین کل برگ به روش (Damerval et al. 1986) انجام شد. الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG و الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE (Herbert 1999) اجرا شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول آبی کوماسی انجام و در نهایت لکه‌های پروتئینی تکراردار در دو رقم متحمل و حساس توسط نرم‌افزار PDQuest شناسایی و برچسب زده شد. درصد حجمی این نقاط تکراردار که توسط نرم‌افزار کمی شده بودند، مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. در تجزیه واریانس برای انتخاب نقاط پروتئینی که نسبت به تنش عکس‌العمل معنی‌دار نشان داده بودند، سطح احتمال معنی‌داری پنج درصد مد نظر قرار گرفت. از بین نقاط انتخاب شده معنی‌دار، نقاطی که (Induction Factor) IF آن‌ها بزرگ‌تر از دو و یا کوچک‌تر از ۰/۵ بود، مورد انتخاب نهایی قرار گرفتند. نقطه‌ای که دارای IF بزرگ‌تر یا کوچک‌تر از واحد است به ترتیب نشان‌دهنده این است که تحت تنش افزایش یا کاهش مقدار نشان داده است. در نهایت پس از هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی هدف از دستگاه طیف سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MS/MS) در دانشگاه توشای ایتالیا برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد. داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBIInr مورد آنالیز قرار گرفتند. شناسایی پروتئین با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و با استفاده از شاخص به نام MASCOT score صورت گرفت که این شاخص احتمال

نتایج و بحث

آماري شناسایی مثبت و درست پروتئين پيش‌بینی شده به‌وسیله MASCOT را نشان می‌دهد (Perkins et al. 1999).

نتایج آزمایش نشان داد که بین سطوح تنش از نظر همه صفات ارزیابی شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). ارتفاع بوته، وزن خشک بوته تحت تأثیر تنش شوری کاهش یافت (شکل ۱ قسمت الف و ب) و از لحاظ آماری این اختلاف در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در پژوهش‌های قبلی مشابه این نتایج گزارش شده‌است (Sairam et al. 2002; Ahmadi and Niazi Ardekani 2006). در مقایسه ارقام مختلف کلزا اعمال تیمار شوری، باعث کاهش وزن خشک (Ahmadi and Niazi Ardekani 2006) در هر دو رقم حساس و متحمل شد ولی در رقم متحمل کاهش کمتری مشاهده شد (Ashraf and Ali 2007).

فلورسانس کلروفیل و شاخص کلروفیل از جمله صفات مرتبط با فتوسنتز گیاه می‌باشند که در شرایط تنش کاهش نشان دادند ولی کاهش فلورسانس کلروفیل و شاخص کلروفیل از لحاظ آماری به‌ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بودند (شکل ۱ قسمت ج و د). بررسی فلورسانس کلروفیل، شاخص حساس تحمل سیستم فتوسنتزی به تنش‌های محیطی می‌باشد (Maxwell and Johnson 2000). گزارش شده‌است که فلورسانس کلروفیل تحت شرایط تنش، کاهش نشان می‌دهد (Baker and Rosenquist 2004). شاخص کلروفیل نیز در شرایط شاهد میانگین بیشتری را به خود اختصاص دادند و تحت تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم بیشترین کاهش را داشت (شکل ۱ قسمت ج). گزارش شده‌است که تنش شوری و تغییرهای یونی حاصل از آن به‌همراه کاهش هدایت هیدرولیکی آب در خاک، اثر منفی بر عملکرد فتوسنتزی گیاه دارد (Ahmadi and Niazi Ardekani, 2006; Ashraf and Ali, 2007). در این راستا، گزارش‌هایی در مورد کاهش میزان کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی وجود دارد (Hortensteiner and Krautler 2011). همچنین بر طبق آزمایش‌های قبلی در مقایسه ارقام مختلف کلزا، اعمال تیمار شوری باعث کاهش میزان شاخص کلروفیل در هر دو رقم

حساس و متحمل کلزا شد ولی میزان کاهش این صفت برای ارقام حساس بیشتر از سایر رقم‌ها به‌دست آمد (Sairam and Tyagi 2004; Ashraf and Ali 2007). در مجموع، هنگامی که گیاه در شرایط شور رشد می‌کند، فعالیت فتوسنتزی آن کاهش یافته و محتوای کلروفیل و فلورسانس کلروفیل کاهش می‌یابد (Viera Santos 2004). علی‌رغم این که گیاهان در میزان تحمل به شوری متفاوت می‌باشند، اما در نهایت شوری سبب کاهش رشد آن‌ها خواهد شد. این کاهش به‌طور عمده در ارتباط با افت ظرفیت فتوسنتزی بوده که خود می‌تواند معلول کاهش در محتوای کلروفیل باشد (Viera Santos 2004). مهم‌ترین علت این موضوع، به ویژه در شرایط تنش شدید، کاهش فعالیت آنزیم‌های موثر در سنتز کلروفیل (ALA-دهیدروژناز) و تولید آن می‌باشد (Vieira Santos 2004).

در رابطه با اثر تنش شوری بر روابط آبی، صفات پتانسیل اسمزی، پتانسیل کل آب برگ و محتوای آب نسبی برگ مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری بر این صفات بجز محتوای آب نسبی برگ (که در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). پتانسیل اسمزی بین ارقام مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان داد و بیش‌ترین پتانسیل اسمزی در سطح شوری ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌دست آمد (شکل ۱ قسمت و). از طرف دیگر، تنش شوری پتانسیل آب برگ را از ۱/۲۸- مگاپاسکال در شرایط شاهد به ۱/۵۸- مگاپاسکال در شرایط تنش شوری شدید کاهش داد (شکل ۱ قسمت ه). این نتایج با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد (Moustafa et al. 1996; Chimenti et al. 2002). از طرف دیگر اظهار شده‌است که کاهش پتانسیل آب برگ و پتانسیل اسمزی برگ مکانیسم‌هایی برای بقای گیاه به هنگام مواجه شدن با تنش کمبود آب محسوب می‌شوند (Chimenti et al. 2002). اثرهای منفی شوری بر رشد گیاه، به‌علت پتانسیل اسمزی پایین محلول خاک (تنش اسمزی)، اثرهای ویژه یونی (تنش شوری)، عدم تعادل عناصر غذایی یا مجموعه این عوامل ایجاد می‌شود. در این شرایط پتانسیل اسمزی برگ گیاه در جهت مقابله

با شرایط منفی تر شده و همچنین پتانسیل کل آب برگ کاهش می‌یابد (Khan et al. 2009).

از طرف دیگر، محتوای آب نسبی برگ با افزایش تنش شوری کاهش نشان داد و تفاوت بین سطوح تنش در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و شکل ۱ قسمت ز). بیش‌ترین کاهش محتوای آب نسبی برگ بین شاهد و تنش ملایم اتفاق افتاد در حالی که کم‌ترین مقدار این صفت در سطح تنش شوری شدید به‌دست آمد (شکل ۱ قسمت ز). محتوای آب نسبی برگ یکی از مهم‌ترین صفات فیزیولوژیک می‌باشد که تحت تنش شوری کاهش می‌یابد. در طی تنش شوری تعادل آب گیاهان به هم می‌خورد و در نتیجه محتوای آب نسبی برگ کاهش می‌یابد (Bajjii et al. 2001). گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که ارقام متحمل به تنش توانایی بالایی در حفظ محتوای آب نسبی برگ نسبت به ارقام حساس دارند (Martinez et al. 2004; Morant-; Manceau et al. 2004). از طرف دیگر، کاهش پتانسیل اسمزی که منجر به حفظ فشار تورمی برگ می‌شود معمولاً از طریق افزایش و تجمع نمک‌های محلول در سلول‌های گیاهی صورت می‌گیرد (Hasegawa et al. 2000).

تنش شوری باعث ایجاد عدم تعادل در غلظت‌های یونی (Na^+ ، K^+ و K^+/Na^+) شد، به‌طوری که با افزایش غلظت نمک کلرور سدیم، غلظت Na^+ افزایش معنی‌دار یافت و در سطح ۳۰۰ میلی مولار، مقدار بیشتری نسبت به سایر سطوح تنش داشت. در مورد K^+ روند غلظت عکس Na^+ بود. نسبت K^+/Na^+ در سطح شاهد بیشتر از سطح شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار بود (شکل ۱ قسمت ح، ط، ی). در گیاهان تحت تنش K^+ به برگ‌ها انتقال داده می‌شود در حالی که Na^+ به شکل یکنواخت‌تری توزیع می‌شود. از این رو، نسبت K^+/Na^+ در گیاهان واقع در شرایط نرمال بیش‌تر از گیاهان تحت تنش می‌باشد و با افزایش شوری محیط این نسبت کاهش نشان می‌دهد (Pandey and Penna 2017). در بسیاری از مطالعه‌ها تغییرهای یونی به تحمل تنش شوری ربط داده شده است (He and Cramer 1993; Pandey and Penna 2017). در این راستا گزارش شده‌است درجه تحمل شوری با انباشتگی Na^+ همبستگی منفی دارد. این موضوع نشان‌دهنده درجه متفاوت تحمل بافتی یا سلولی نسبت به Na^+ است. غلظت بالای این یون

در برگ‌ها، عدم کارایی K^+ و عکس‌العمل نامناسب روزنه‌ها را در پی دارد. به بیان دیگر، میزان بالای جذب Na^+ با جذب عناصر دیگر بویژه K^+ رقابت ایجاد می‌کند که منجر به کمبود K^+ می‌شود (شکل ۱ قسمت ح). نتایج نشان داده است که یک مکانیسم انتقال یون برای Na^+ وجود دارد که بر علیه تجمع K^+ در ارقام می‌باشد. در گیاه تحت تنش کاهش آماس سلول‌های نگهدارنده روزنه می‌تواند از کمبود K^+ القا شود و از این رو، جذب انتخابی این یون باعث تنظیم بهتر سلول‌های روزنه و متابولیسم خواهد شد (He and Cramer 1993). نسبت پایین K^+/Na^+ شاخص مسمومیت گیاه می‌باشد. زیرا Na^+ فعالیت آنزیم‌های وابسته به K^+ را مختل کرده و در نهایت باعث کاهش رشد می‌شود (He and Cramer, 1993). گزارشات متعددی مبنی بر افزایش میزان سدیم در بخش هوایی و همچنین نسبت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی در اثر تنش شوری وجود دارد (Ashraf and Mc Neilly 2004; Parida and Das 2005). همین گزارش‌ها حاکی از کاهش میزان پتاسیم در بخش هوایی و ریشه بر اثر تنش شوری است که به دلیل رابطه آنتاگونیستی یون Na^+ با یون K^+ رخ می‌دهد. به‌طوری که حضور یون Na^+ به مقدار فراوان در محیط مانع جذب یون K^+ می‌شود. در این پژوهش نیز این موضوع به وضوح مشاهده شد (شکل ۱ قسمت ط). غلظت بالای یون Na^+ در بافت‌های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کرده و یا حتی می‌تواند از اجرای آن‌ها ممانعت به‌عمل آورد (Mer et al. 2000). از طرف دیگر، شوری از طریق کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک یا تنش آبی (Maathuis and Amtmann 1999; Ashraf 2004)، تأثیر ویژه یونی (He and Cramer 1992; Ashraf 1994) و به هم خوردن تعادل عناصر غذایی به دلیل افزایش غلظت Na^+ باعث آسیب به گیاه می‌شود. تأثیرهای مضر املاح بر روی گیاهان نتیجه تلفیق عواملی می‌باشد که می‌توان آن را در گیاه به‌صورت کاهش رشد مشاهده کرد (Blumwald et al. 2000). سدیم غالب‌ترین کاتیون موجود در محلول خاک و آب مناطق شور است (Munns and Termaat 1986). تنش شوری اثر فزاینده‌ای بر تجمع سدیم و کلر در گیاه دارد (Turan et al. 2009). بسیاری از گیاهان زراعی حساسیت قابل ملاحظه‌ای نسبت به شرایط شور دارند که این موضوع

به علت تجمع یون سدیم در داخل سلول و تأثیر آن بر اختلال در تعادل یونی و تنظیم اسمزی، فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها و متابولیسم سلول و نیز ایجاد سمیت باز دارنده است. فراوانی سدیم در خاک باعث لطمه به جذب پتاسیم توسط گیاه می‌شود (Munns and Termaat 1986; Turan et al. 2009). در مجموع، پایین بودن غلظت سدیم سیتوزولی و عدم تعادل نسبت یون پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+)، یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تحمل به شوری شناخته می‌شود. ارقام متحمل به شوری گونه‌های زراعی، نسبت پتاسیم به سدیم بالایی را نشان می‌دهند (Summart et al. 2010). ساز و کار جذبی که بین یون‌های مشابه، نظیر سدیم و پتاسیم تمایز قائل می‌شود، می‌تواند یک شاخص انتخاب مفید برای گزینش ارقام متحمل در برنامه‌های اصلاحی به منظور بهبود و جذب مؤثر عناصر غذایی باشد (Khan et al. 2009). تنش شوری سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که نشت از غشاءهای سلولی را به دنبال خواهد داشت (Summart et al. 2010).

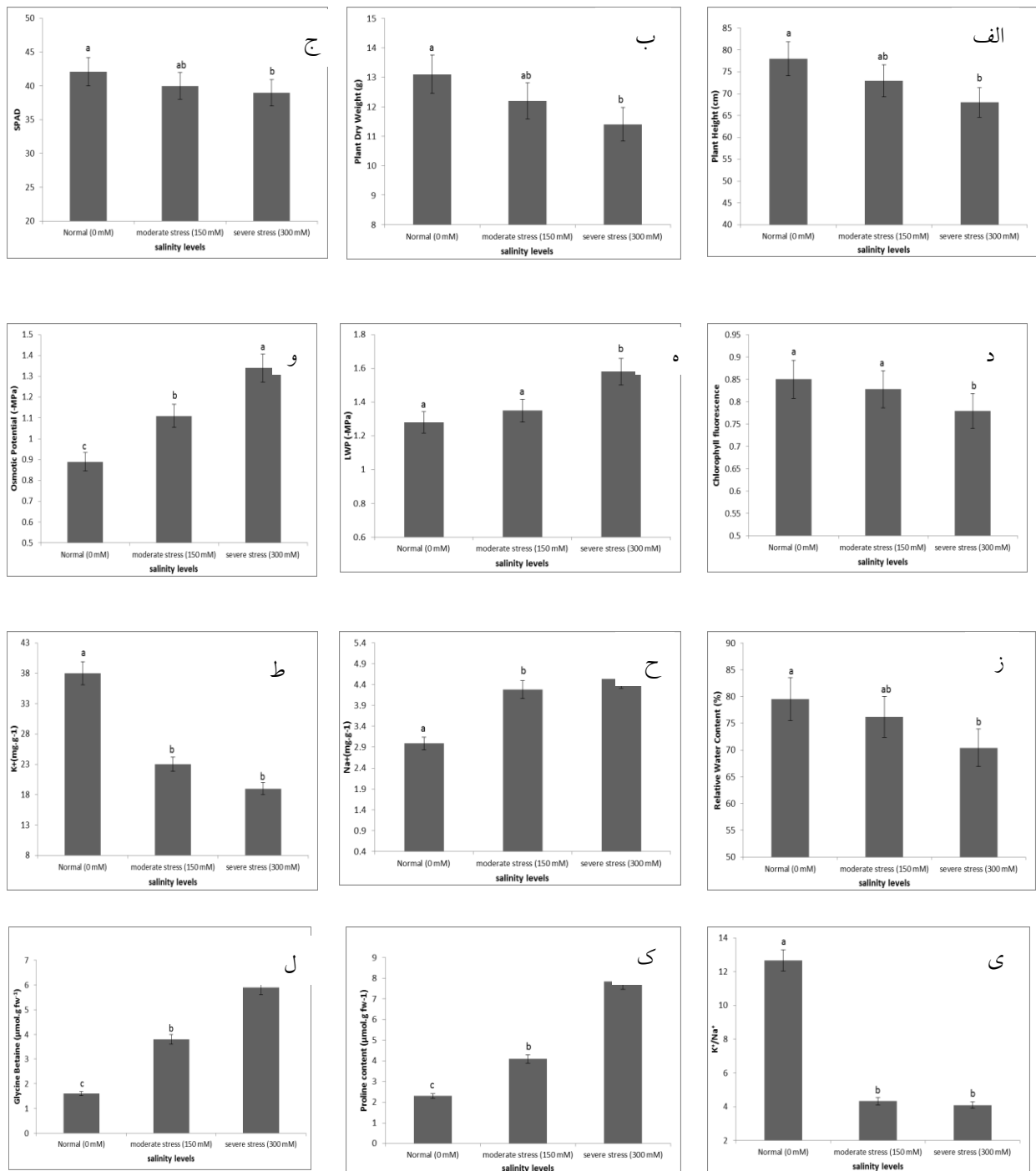
تجزیه واریانس برای میزان پرولین و گلايسين بتائين (جدول ۱) نشان داد که تولید هر دو ماده تحت تأثیر تنش شوری قرار داشت و بر اثر تنش شوری و با افزایش سطح تنش غلظت هر دو ماده افزایش یافت. غلظت پرولین و گلايسين بتائين در شوری ۳۰۰ میلی مولار به ترتیب حدود ۳/۴ و ۳/۶ برابر شاهد بود (شکل ۱ قسمت ک، ل). در شرایطی که سلول‌ها در معرض تنش اسمزی

ناشی از شوری و خشکی قرار می‌گیرند محلول‌های سازگار کننده در سلول‌ها تجمع می‌یابند و در نتیجه محتوای آب سلولی با وجود کاهش پتانسیل آبی بافت حفظ می‌شود. گونه‌ها و ارقام مختلف با توجه به نوع محلول‌هایی که در خود انباشته می‌کنند با یکدیگر فرق می‌کنند (Chaparzadeh et al. 2003; Saadia et al. 2012) و اسمولیت‌هایی که نقش مهمی در تنظیم اسمزی ایفا می‌کنند وابسته به نوع گونه گیاهی هستند. پرولین و گلايسين بتائين محلول‌های سازگاری هستند که در پاسخ به تنش اسمزی انباشته می‌شوند و تجمع این محلول‌ها یک عکس‌العمل مهم سازشی است (Saadia et al. 2012). تجمع پرولین در شرایط تنش شوری، بیش از سایر اسیدهای آمینه صورت می‌گیرد که می‌تواند در تنظیم اسمزی و احتمالاً حفظ فعالیت آنزیمی گیاه نقش داشته باشد (Ashraf 2004). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که میزان پرولین یکی از مهم‌ترین معیارهای تحمل تنش در اغلب گونه‌های گیاهی است و گزارش شده‌است که میزان پرولین در ارقام حساس به شوری کمتر از ارقام مقاوم می‌باشد (Verslues et al. 2007). اظهار شده است که تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و کربوهیدرات‌های محلول یکی از راهکارهای افزایش تحمل به شوری در گیاهان خانواده براسیکا می‌باشد (Ashraf and McNeilly, 2004). در رابطه با گلايسين بتائين نیز مانند پرولین، تولید این ماده و افزایش آن تحت تنش شوری مشاهده شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کلزا تحت تنش شوری

S.O.V	df	Mean of squares											
		Plant Height (cm)	Plant Dry Weight (g)	SPAD	Chlorophyll fluorescence	LWP (MPa)	Osmotic Potential (MPa)	Relative Water Content (%)	Na ⁺ (mg.g ⁻¹)	K ⁺ (mg.g ⁻¹)	K ⁺ /Na ⁺	Proline content (μmol.g fw ⁻¹)	Glycine Betaine (μmol.g fw ⁻¹)
Replication	2	15.34 ^{ns}	0.391 ^{ns}	2.61 ^{ns}	0.0026*	0.065*	0.021 ^{ns}	125.03*	0.138 ^{ns}	29.12 ^{ns}	9.01 ^{ns}	2.48 ^{ns}	0.95 ^{ns}
Stress	2	153.14*	4.344*	15.02*	0.008**	0.148**	0.304**	127.34*	4.098**	602.01*	142.71**	48.12**	27.68**
Error	4	12.14	0.347	1.22	0.0002	0.005	0.011	10.34	0.112	20.93	4.72	1.51	0.97
CV (%)		4.93	5.31	3.45	4.89	6.71	10.25	6.90	10.01	17.45	29.80	26.62	25.92

^{ns}، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.



شکل ۱- تأثیر تنش شوری (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار) بر روی صفات مورفو-فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد مطالعه (که در شکل با حروف مختلف نشان داده شده است) در رقم Orient. حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

رابطه با گلايسين بتاين می‌تواند به واسطه شرایط مختلف آزمایشی و یا تفاوت‌های واقعی بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌های گیاهی در پاسخ به تنش شوری باشد (Khalid et al. 2015).

اگرچه، میزان این ماده تحت تنش شوری و با افزایش آن افزایش نشان داده بود، اما در برخی آزمایش‌های قبلی با وجود افزایش مقدار آن تحت تنش این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نبود (Makela et al. 1996; Khalid et al. 2015). این گزارش‌ها در

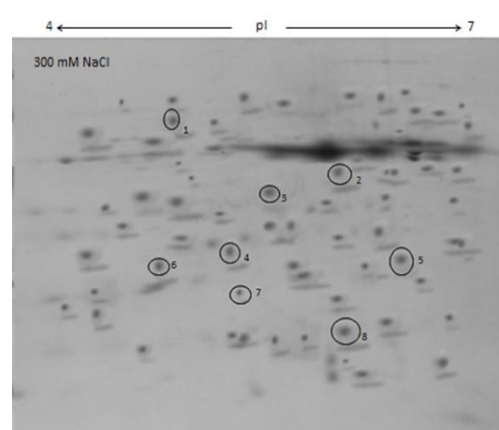
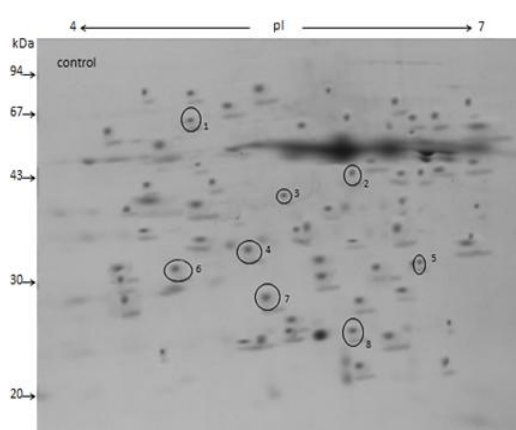
پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار بین شرایط نرمال و تنش هفت لکه پروتئینی با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی دو مرحله‌ای^۱ شناسایی شدند. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده‌است بر طبق عملکرد سلولی این پروتئین‌ها به‌ترتیب مربوط به دفاع آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم انرژی و کربوهیدرات، دخیل در واکنش نوری فتوسنتز و تنظیم رونویسی بودند.

بررسی الگوی الکتروفورز دوبعدی نشان داد که از بین ۱۱۸ لکه پروتئینی تعداد هشت لکه پروتئینی با اختلاف مقدار و دارای IF معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمار تنش شوری شدید در رقم Orient تشخیص داده شد (شکل ۲). بر طبق بررسی تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی می‌توان اظهار داشت بیش‌تر پروتئین‌ها در رقم متحمل Orient دارای افزایش مقدار بودند. به‌نظر می‌رسد این رقم با فعال‌کردن پروتئین‌های مختلف و افزایش مقدار آن‌ها تحت تنش شوری توانسته است عکس‌العمل بهتری جهت حفظ رشد خود داشته باشد که این نتایج با گزارش آزمایشی در این زمینه مطابقت دارد (Joseph and Jini 2010). از بین هشت لکه

¹ MALDI TOF/TOF MS

جدول ۲- مشخصات هفت لکه پروتئینی شناخته شده و یک لکه پروتئینی شناخته نشده در رقم Orient در شرایط تنش شوری

Functional group of protein	Spot number	Experimental		Theoretical		name of protein	Accession number	Expression change
		MW	pI	MW	pI			
Antioxidant defense	1	66.21	5.02	45.26	8.30	Glutathione S-transferase DHAR2	gi 474023258	Increase
unknown	2	43.19	5.89	55.50	5.50	Unknown protein	gi 217071692	Increase
Carbohydrate and energy metabolism	3	40.48	5.56	35.80	5.70	Cytosolic Malate dehydrogenase	gi 49343245	Increase
Carbohydrate and energy metabolism	4	34.25	5.31	39.00	6.70	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases	gi 15229231	Increase
Antioxidant defense	5	32.00	6.35	27.96	5.00	ascorbate peroxidase	gi 15808779	Increase
Transcriptional regulation	6	31.83	4.98	33.10	4.60	Nucleic acid binding protein1	gi 162463757	Increase
Photo-reaction of Photosynthesis	7	29.80	5.34	23.10	5.90	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur	gi 136707	Decrease
Antioxidant defense	8	26.34	5.90	22.20	6.28	Copper/Zinc superoxide dismutase	gi 3273753	Increase

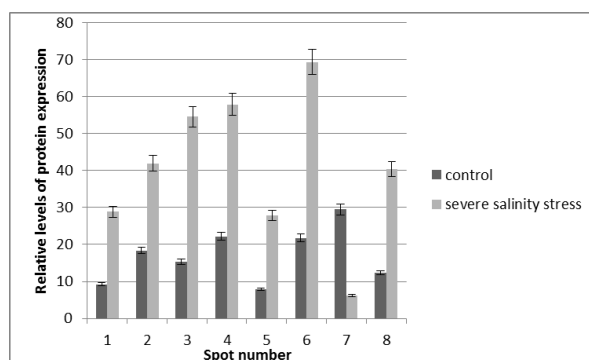


شکل ۲- ژل الکتروفورز دوبعدی رقم Orient در شرایط شاهد (سمت چپ) و در شرایط تنش شدید (سمت راست) که در آن لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش شوری با شماره مشخص شده‌است.

می‌شوند (Edwards et al. 2000). از لحاظ عمل، GSTs آنزیم‌های سم‌زدای وابسته به گلوکوتایون^۲ هستند که گلوکوتایون را با محصولات طبیعی مختلف درآمیخته می‌کنند. سپس گلوکوتایون‌های درآمیخته شده به واکوئل‌ها برای متابولیسم‌های بعدی که شامل سولفور است، انتقال می‌یابند (Edwards et al. 2000). بر طبق پژوهش‌های محققان مشخص شده است که میزان گلوکوتایون ترانسفراز^۳ تحت تنش در ارقام متحمل جهت مقابله با تنش افزایش و در ارقام حساس کاهش می‌یابد (Kausar et al. 2013) که این نتایج همسو با نتایج این آزمایش می‌باشد. افزایش میزان پروتئین گلوکوتایون ترانسفراز در طی تنش در جهت خنثی کردن تأثیر سوء ROS می‌باشد (Dhindsa 1991). از طرف دیگر، پروتئین‌های گروه superoxide dismutase (SOD) اولین خط دفاعی در برابر ROS محسوب می‌شوند که سوپر اکسید را به مولکول‌های پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌کنند. در صورت عدم وجود دی‌اکسیدکربن کافی به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون، الکترون‌ها از غشا فتوستتزی به سمت مولکول‌های اکسیژن از طریق واکنش Mehler جابه‌جا شده و یون‌های سوپر اکسید را بوجود می‌آورند (Cakmak 2005). در پاسخ به تنش شوری، فراوانی Cu-Zn SOD (لکه شماره ۸) در رقم متحمل Orient افزایش مقدار داشت. همسو با این نتایج، تجمع SOD در رقم متحمل برنج در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu and Tanaka 2004). در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H₂O₂ انجام می‌دهد (Hashimoto et al. 2009). در مجموع حضور فعال پروتئین‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش (شکل ۲ و ۳) به عملکرد بهتر رقم متحمل Orient تحت تنش شوری کمک می‌کند.

در این آزمایش دو پروتئین مرتبط با این گروه عملکردی شامل گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز^۴ (لکه پروتئینی شماره ۴) و آنزیم مالات دهیدروژناز سیتوسولی^۵ (لکه پروتئینی شماره ۳) شناسایی شدند که در شرایط تنش شوری شدید (NaCl ۳۰۰

در مجموع از میان لکه‌های پروتئینی شناسایی شده تعداد سه لکه پروتئینی (لکه پروتئینی شماره ۱، ۵ و ۸) در دفاع آنتی‌اکسیدانی، تعداد دو لکه پروتئینی (لکه پروتئینی شماره ۳ و ۴) در متابولیسم انرژی و کربوهیدرات و یک لکه پروتئینی هم مربوط به پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوستتزر (لکه پروتئینی شماره ۷) و تنظیم رونویسی (لکه پروتئینی شماره ۶) بودند. در ضمن لکه شماره ۲ با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی مربوط به توالی پپتیدی به‌طور دقیق قابل شناسایی نبود.



شکل ۳- سطوح نسبی تغییر مقدار پروتئین‌های معنی‌دار دارای فاکتور القای قابل ملاحظه تحت شرایط تنش شوری شوری

آسکوربات پراکسیداز یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم و اصلی در گیاهان است که می‌تواند با اکسیدکردن آسکوربات، پراکسید هیدروژن (H₂O₂)، که وجود آن باعث زیان سلولی می‌شود، را غیرسمی نماید (Caruso et al. 2008). در این آزمایش لکه پروتئینی شماره ۵ این پروتئین بود که تحت تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl مقدار آن افزایش یافت. بر طبق گزارش‌های قبلی بیان این آنزیم در گندم نان (Wang et al. 2008) و گندم دوروم (Caruso et al. 2008) نیز تحت تنش شوری به‌ویژه در رقم متحمل افزایش یافته است.

از طرف دیگر حضور پروتئین‌های Glutathione S transferase I (لکه شماره ۱) و copper/zinc superoxide dismutase (لکه شماره ۸) دلالت بر القاء تنش اکسیداتیو در تنش شوری است (جدول ۲، شکل ۲). GST's گیاهی بیش‌تر آنزیم‌های cytosolic هستند (Dixon et al. 2002) که به‌صورت هومو یا هترودیمر دیده

^۱ Glutathione S transferase

^۲ Glutathione-dependent detoxifying enzymes

^۳ Glutathione transferase

^۴ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases

^۵ Cytosolic Malate dehydrogenase

پراکسی‌زوم، وابسته به NAD^+ و در کلروپلاست وابسته به NADP^+ است. در سیتوسول آنزیم مالات دهیدروژناز وابسته به NAD^+ واکنش تبدیل اگزالواستات به مالات را کاتالیز می‌کند. سپس مالات از طریق ناقل دیکربوکسیلات وارد میتوکندری می‌شود و در آنجا وارد چرخه تری کربوکسیلیک اسید می‌شود. این موضوع باعث عملکرد بهتر این چرخه می‌شود. همچنین اگزالواستات به‌عنوان پیش ماده اسیدآمینه در گیاهان عمل می‌کند (Kumar et al. 2000)، مقدار این آنزیم در شرایط تنش برای فراهم کردن انرژی مضاعفی که گیاه در طی تنش نیاز دارد، افزایش می‌یابد (Guicherd et al. 1997). بنابراین به‌نظر می‌رسد که افزایش فعالیت مالات دهیدروژناز در حفظ فعالیت بالاتر چرخه تری کربوکسیلیک اسید و نیز ستر بیشتر اسیدآمینه‌ها کمک می‌کند. افزایش سطح آنزیم مالات دهیدروژناز تحت تنش در ارقام متحمل نشان‌دهنده نقش این آنزیم برای سازگاری با تنش می‌باشد، در حالی که در ارقام حساس سطح این آنزیم در طی تنش کاهش نشان داده است (Kausar et al. 2013). در این راستا، افزایش فعالیت این آنزیم در برگ گندم نان (Wang et al. 2014; Naghavi, 2008) و آرابیدوپسیس (Ndimba et al. 2005) تحت تنش مشاهده گردیده است. علاوه بر این بر طبق پژوهش‌ها به‌نظر می‌رسد که آنزیم مالات دهیدروژناز به فعالیت آنزیم گلوتاتیون ترانسفراز در فعالیت همئوستازی سلول کمک می‌کند (Kausar et al. 2013).

بر طبق نتایج تجزیه پروتئوم، پروتئین Cytochrome b6-f complex iron-sulfur، لکه پروتئینی شماره ۷ و Nucleic acid binding protein1، لکه پروتئینی شماره ۶ بودند که به‌ترتیب دخیل در واکنش نوری فتوسنتز با کاهش مقدار و دخیل در رونویسی ژن‌ها با افزایش مقدار تحت تنش شوری دارای غلظت 300 میلی‌مولار NaCl بودند (جدول ۲ و شکل ۲ و ۳).

زمانی که گیاه با تنش شوری مواجه می‌شود، رشد کلی و محصول‌دهی گیاه کاهش می‌یابد که این امر در نتیجه اختلال در عملکرد اجزای حیاتی فتوسنتز نظیر آنزیم‌های دخیل در واکنش نوری و تاریکی فتوسنتز انجام می‌شود (Manna et al. 2013). در فرآیند واکنش نوری فتوسنتز، الکترون‌های جدا شده از مولکول آب توسط فتوسیستم II در نهایت از طریق فتوسیستم I به

میلی‌مولار) افزایش مقدار نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۲ و ۳). محصول نهایی واکنش اولیه چرخه کالوین مولکول‌های تری فسفوگلیسرات^۱ (3PGA) (نتیجه ترکیب ریبولوز ۱، ۵ بیس فسفات^۲ (RuBP) و مولکول دی اکسید کربن) (Andersson and Backlund, 2008) می‌باشد که توسط ATP فسفریله می‌شود و ۱،۳-بی فسفوگلیسرات^۳ و ADP تشکیل می‌شود. این واکنش توسط ۳-فسفوگلیسرات کیناز سیتوسولی^۴ کاتالیز می‌شود. واکنش مذکور یکی از دو واکنشی است که در فاز دوم (فاز کاهشی^۵) چرخه کالوین انجام می‌شود که در مرحله بعدی ۱، ۳-بی-فسفوگلیسرات با گرفتن هیدروژن از NADPH هیدروژنه می‌شود (Macdonald and Buchanan 1997). گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) (لکه پروتئینی شماره ۴) نقش کلیدی در کاهش گلیسرات ۳-فسفات^۶ به گلیسرآلدئید-۳-فسفات^۷ بر عهده دارد. گلیسرآلدئید-۳-فسفات تنها یک محصول فتوسنتزی نیست و به‌عنوان پیش ماده‌ی ریبولوز ۵-فسفات هم عمل می‌کند (Ye et al. 2013). مطالعه‌های قبلی نشان داده است که تنش شوری باعث افزایش بیان پروتئین گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) در برگ برنج، ریشه برنج، نیشکر و ریشه‌های *Arabidopsis thaliana* می‌شود (Jiang et al. 2007; Nam et al. 2012). هم‌چنین، Wang et al. (2008) اظهار داشتند که مقدار GAPDH در گندم تحت تنش شوری اعمال شده با NaCl افزایش مقدار نشان داده و این افزایش مقدار بیشتر در رقم متحمل مشاهده می‌شود. افزایش مقدار GAPDH ممکن است انباشت قندهای محلول را افزایش دهد و انرژی بیشتری برای گیاهان تحت استرس فراهم آورد و به‌عنوان شاخص تحمل استرس شناخته می‌شود (Nam et al. 2012).

از طرف دیگر، آنزیم مالات دهیدروژناز یک آنزیم مهم متابولیسم سلولی می‌باشد که تبدیل اگزالواستات و مالات را کاتالیز می‌کند (Musrati et al. 1998). این آنزیم در سیتوسول، میتوکندری و

¹ 3-phosphoglycerate

² Ribulose 1,5-bisphosphate

³ 1,3-bisphosphoglycerate

⁴ Cytosolic 3-phosphoglycerate kinase

⁵ Reduction phase

⁶ Glycerate 3-phosphate

⁷ Glyceraldehyde-3-phosphate

نوکلیتیک است که اسیدهای نوکلئیک تک‌رشته ای را به هم متصل می‌کند و در شرایط تنش مقدار این پروتئین در ارقام متحمل افزایش بیش‌تری می‌یابد (Yang et al. 2012).

در مجموع بر طبق نتایج به‌دست آمده، با توجه به نقش پروتئین‌های عملکردی و افزایش مقدار بیش‌تر آن‌ها در رقم متحمل Orient به‌نظر می‌رسد این رقم از سازوکار مولکولی مناسبی تحت تنش شوری کلرید سدیم برخوردار است و در بین مسیرهای متابولیکی مختلف نقطه قوت این رقم در شرایط تنش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (جدول ۲ و شکل ۲ و ۳).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که تنش شوری کاهش ارزش صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی را همراه داشت و بیشترین افزایش و کاهش تغییر کمی تحت شرایط تنش شدید به‌ترتیب در مورد صفات میزان پرولین و نسبت پتاسیم به سدیم مشاهده شد. علاوه بر این، واکنش رقم Orient تحت تنش شوری به‌صورت فعال کردن پروتئین‌های با فعالیت درون سلولی متنوع بود و به‌نظر می‌رسد افزایش مقدار بیش‌تر این پروتئین‌ها تحت تنش شوری در تحمل این رقم مؤثر باشد. پروتئین‌های شناسایی شده در فرایند دفاع آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم انرژی و کربوهیدرات، واکنش نوری فتوسنتز و تنظیم رونویسی دخیل بودند و مهم‌ترین مکانیسم پروتئینی این رقم القای پروتئین‌های دخیل در هم‌مستازی سلول بود.

NADP^+ انتقال یافته و NADPH تولید می‌شود. این فرآیند انتقال خطی الکترون نامیده می‌شود. همزمان با این فرآیند و در نتیجه انتقال الکترون از کمپلکس (Cyt) b6/f (لکه پروتئینی شماره ۷) شیب پروتون در غشای تیلکوئیدها ایجاد می‌شود (Allen 2003). گزارش‌ها نشان داده است که کاهش میزان کمپلکس (Cyt) b6/f سبب کاهش در نسبت انتقال الکترون و نسبت تولید دی-اکسیدکربن می‌شود (Ruuska et al. 2000). در این آزمایش نیز مقدار پروتئین کمپلکس (Cyt) b6/f تحت تنش شوری کاهش یافت و با توجه به اینکه این پروتئین تنها پروتئین کاهش مقدار یافته در این پژوهش بود به نظر می‌رسد تنها آسیب رقم متحمل Orient تحت تنش شوری در قسمت واکنش نوری فتوسنتز بود و سایر پروتئین‌های افزایش مقدار یافته دخیل در متابولیسم انرژی و کربوهیدرات، نقش جبرانی و تقویت کارایی نهایی فتوسنتز را ایفا کردند.

تنظیم بیان ژن در سطوح مختلف از قبیل رونویسی، پس از رونویسی^۱، ترجمه و سطوح پس از ترجمه انجام می‌شود (Yang et al. 2012). لکه پروتئینی شماره ۶ Nucleic acid binding protein یا به‌اختصار NABP بود که در فرآیند تنظیم رونویسی ژن‌ها و در نهایت سنتز پروتئین‌ها نقش داشت و در شرایط تنش شوری 300 میلی‌مولار NaCl مقدار آن افزایش نشان داد (جدول ۲ و شکل ۲ و ۳). مشخص شده است که NABP یک پروتئین کوچک و بسیار محافظت شده با فعالیت تاخوردگی^۲ اسید

¹ Post-transcription

² Chaperone activity

منابع

- Ahmadi H, Niazi Ardekani J (2006). The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight Canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Irrigation Science 25: 11-20.
- Allen JF (2003). Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. Trends in Plant Science 8: 15-19.
- Alonso M, Rozados MJ, Vega JA, Perez-Gorostiaga P, Cuinas P, Fonturbel MT, Fernandes C (2002). Biochemical responses of *Pinus Pinaster* tree to fire-induced trunk girdling and crown scorch: secondary metabolites and pigments as needle chemical indicators. Journal of Chemical Ecology 28: 687-700.

- Andersson, I, Backlund A (2008). Structure and function of Rubisco. Plant Physiology and Biochemistry 46: 275-291.
- Ashraf M (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 13: 17-42.
- Ashraf M (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora Journal 99: 361-376.
- Ashraf M, Ali Q (2007). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Environmental and Experimental Botany 63: 266-273.
- Ashraf M, Mc Neilly T (2004). Salinity tolerance in some brassica oilseeds. Critical in Review Plant Sciences 23: 154-174.

- Ashraf M, Nazir N, Mc Neilly T (2001). Comparative salt tolerance of amphidiploid and *Brassica* species. *Plant Science* 160: 683-689.
- Bajjii M, Lutts S, Kinet KM (2001). Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf) cultivars performing in arid conditions. *Plant Science* 60: 669-681.
- Baker NR, Rosenquist E (2004). Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1627.
- Bates LS, Walderen RD, Taere ID (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Blumwald E, Aharon SG, Apse MP (2000). Sodium Transport in Plant Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-151.
- Cakmak I (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 521-530.
- Caruso G, Cavaliere C, Guarino C, Gubbiotti R, Foglia P, Laganà A (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391: 381-390.
- Chaparzadeh N, Khavari-Nejad RA, Navari-Izzo F, Izzo R (2003). Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. *Agrochimica* 47: 69-79.
- Chimenti CA, Pearson J, Hall AJ (2002). Osmotic adjustment in Maize: Genetic variation and association with water uptake. In: Edmeades GO, (Ed.). *Developing Drought and Low N-Tolerant Maize*. CIMMYT, Mexico. 200-203.
- Dadashi MR, Majidi Heravan I, Soltani A, Noori nia AA (2007). Evaluation of different genotypes of barley to salinity salt stress. *Journal of Agriculture Science Islamic Azad University* 13: 181-190. (In Farsi).
- Damerval C, De Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling roteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
- de Lacerda CF, Cambraia J, Oliva MA, Ruiz HA (2005). Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environmental and Experimental Botany* 54: 69-76.
- Dhindsa RS (1991). Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiology* 95: 648-651.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: 1-10.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends of Plant Science* 5: 193-198.
- Francois BB (2007). Effect of salinity on germination and seedling growth of canola. PhD thesis. *Agricultural Sciences at the University of Stellenbosch* p: 73.
- Gama PBS, Inanaga S, Tanaka K, Nakazawa R (2007). Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 6: 79-88.
- Grieve CM, Grattan SR (1983). Rapid assay for determination of water solublequaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* 70: 303-307.
- Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Bligny R, Marigo G (1997). Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L. malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees* 11: 155-161.
- Guo G, Ge P, Ma C, Li X, Lv D, Wang S, Ma W, Yan Y (2012). Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *Journal of Proteomics* 75: 1867-1885.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hashimoto M, Toorchi M, Matsushita K, Iwasaki Y, Komatsu S (2009). Proteome analysis of rice root plasma membrane and detection of cold stress responsive proteins. *Protein and Peptide Letters* 16: 685-697.
- He T, Cramer GR (1992). Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling *Brassica* species in response to seawater salinity. *Plant and Soil Sciences* 139: 285-294.
- He T, Cramer GR (1993). Growth and ion accumulation of two rapid-cycling *Brassica* species in response to seawater salinity. *Plant and Soil* 153: 19-31.
- Herbert B (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 660-663.
- Hortensteiner S, Krautler B (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807: 977-988.
- Houshmand S, Arzani A, Maibody SAM, Feizi M (2005). Evaluation of salt-tolerant genotypes of durum wheat derived from in vitro and field experiments. *Field Crops Research* 91: 345-354.
- Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* 58: 3591-607.
- Joseph B, Jini D (2010). Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 307-313.
- Kattab H (2007). Role of glutathione and polyadenylic acid on the oxidative defense systems of two different cultivars of canola seedlings grown under saline condition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1:323-334.
- Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids* 44: 345-359.
- Khalid A, Athar HUR, Zafar ZU, Akram A, Hussain K, Manzour F, Al-Qurainy A. Ashraf M (2015). Photosynthetic capacity of canola (*Brassica napus* L.) plants as affected by glycinebetaine under salt stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88: 78-86.

- Khan MH, Panda SK. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 81-89.
- Khan MA, Shirazi MU, Khan MA, Mujtaba SM, Islam E, Mumtaz S, Shereen A, Ansari RU, Ashraf MU (2009). Role of proline, K^+/Na^+ ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 41: 633-638.
- Kocheva K, Lambrev P, Georgiev G, Goltsev V, Karabaliev M (2004). Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry* 63: 127-124.
- Komatsu S, Tanaka N (2004). Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. *Proteomics* 4: 938-949.
- Kumar RG, Shah K, Dubey RS (2000). Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science* 156: 23-34.
- Maathuis FJM, Amtmann A (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity. The basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annual Botany* 84: 123-133.
- Macdonald FD, Buchanan BB (1997). The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Eds.), *Plant Metabolism* (2nd Ed.). Essex: Addison Wesley Longman. 299-313.
- Mahmood SS, Athar HR (2003). Intra specific variability in sesame (*sesamum indicum* L.) for various quantitative and qualitative attributes under differential salt regimes. *Journal of Science Research* 14: 177-186.
- Makela P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, Setaia H, Hinkkanen R, Somersalo S (1996). Uptake and translocation of foliar-applied glycine betaine in crop plants. *Plant Science* 121: 221-230.
- Manna A, Mimouni H, Wasti S, Gharbi E, Aschi-Smiti S, Faurobert M, Ben Ahmad H (2013). Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. *Plant Pmics Journal* 6: 268-277.
- Martinez JP, Luttus S, Schanck A, Banjji M (2004). Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L. *Journal of Plant Physiology* 16: 1041-1051.
- Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mer RK, Prajith PK, Pandya DH, Pandey AN (2000). Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 209-217.
- Mohammadian R, Rahimian H, Moghaddam H, Sadeghian SY (2003). The effect of early season drought on chlorophyll a fluorescence in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Pakistan Journal of Biological Science* 6: 1763-1769.
- Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin G (2004). Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 25-33.
- Moustafa M, Boersma AL, Krostad E (1996). Response of four spring wheat cultivars to drought stress. *Crop Science* 36: 982-986.
- Munns R, James RA, Lauchli A (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- Munns R, Termaat A (1986). Whole-plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 60-140.
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Musrati RA, Kollarova M, Mernik N, Mikulasova D (1998). Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiology and Biophysics* 17: 193-210.
- Naghavi MR (2014). Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. PhD Thesis. Faculty of Agriculture. University of Tabriz. (In Farsi).
- Nam MH, Huh SM, Kim KM, Park WJ, Seo JB, Cho K, Kim DY, Kim BG, Yoon IS (2012). Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. *Proteome Science* 10: 25.
- Ndimba BK, Chivasa S, Simon WJ, Slabas AR (2005). Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5: 4185-4196.
- Pandey M, Penna S (2017). Time course of physiological, biochemical, and gene expression changes under short-term salt stress in *Brassica juncea* L. *The Crop Journal* 5: 219-230.
- Parida AK, Das AB (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999). Probability based protein identification by searching sequences databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
- Pessaraki MM, Morgan PV, Gilbert JJ (2005). Dry-Matter yield, protein synthesis, starch, and fiber content of barley and wheat plants under two irrigation regimes. *Journal of Plant Nutrition* 28: 1227-1241.
- Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of (*Lupinus albus* L.). *Journal of Experiment Botany* 52: 1063-1070.
- Ruuska SA, Andrews TJ, Badger MR, Price GD, von Caemmerer S (2000). The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco: insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome b/f complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology* 122: 491-504.
- Saadia M, Jamil A, Akram NA, Ashraf M (2012). A study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. *Molecules* 17: 5803-5815.

- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Sairam RK, Tyagi A (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86: 407-422.
- Schreiber U, Bilper W, Neubauer C (1994). Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell M (Eds). *Ecophysiology of photosynthesis*. (Ecological studies, Vol 100). Springer, Berlin Heidelberg, New York. 49-70.
- Sobhanian H, Aghaei K, Komatsu S (2011). Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *Journal of Proteomics* 74: 1323-1337.
- Su JJ, Wu S, Xu ZJ, Qiu S, Luo TT, Yang YM, Chen QT, Xia YY, Zou S, Huang BL, Huang BQ (2013). Comparison of salt tolerance in *Brassicas* and some related species. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1911-1917.
- Summart J, Thanonkeo P, Panichajakul S, Prathepha P, Mc Manse MT (2010). Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice. *Kaho Dawk Mail* 105, *Callus Culture* 9: 145-152.
- Turan MA, Elkiram AHA, Taban N, Tban S (2009). Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations in maize plant. *African Journal of Agricultural Research* 4: 893-897.
- Valdez-Aguilar L, Grieve ACM, Poss J, Layfie DA (2009). Salinity and alkaline pH in irrigation water affect marigold plants: II. Mineral Ion Relations. *Hortscience* 44: 1726-1735.
- Verslues PE, Kim YS, Zhu JK (2007). Altered ABA, Proline and hydrogen peroxide in an Arabidopsis glutamate: glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology* 64: 205-217.
- Viera Santos C (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae* 103: 93-99.
- Wang MC, Peng ZY, Li CL, Li F, Liu C, Xia GM (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics* 8: 1470-1489.
- Yang C, Wang L, Siva VS, Shi X, Jiang Q, Wang J, Zhang H, Song L (2012). A novel cold-regulated cold shock domain containing protein from scallop *Chlamys farreri* with nucleic acid-binding activity. *PLoS One* 7: e32012.
- Ye J, Wang S, Zhang F, Xie D, Yao Y (2013). Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG6000 stress and rewatering. *Plant Omics Journal* 6: 286-294.
- Zhao GQ, Ma BL, Ren CZ (2007). Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Science* 47: 123-131.