

بررسی الگوی پروتئوم محور جنین گندم (*Triticum aestivum*) تحت تنش خشکی در دو رقم حساس و متحمل به خشکی طی فاز دوم جوانه‌زنی

علی شایان‌فر¹، رضا توکل افشاری^{2*}، هوشنگ علیزاده³ و عبدالرحمن رسول‌نیا⁴

- 1- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- 2- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- 3- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- 4- کارشناس ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

چکیده

تنش خشکی از عوامل نامساعد محیطی است که رشد گیاهان زراعی را به‌ویژه در مراحل اولیه جوانه‌زنی تحت تاثیر قرار می‌دهد. جوانه‌زنی بذر فرآیندی پیچیده است که شامل سه فاز مهم است که در مرحله پیش از خروج ریشه‌چه (فاز دوم جوانه‌زنی) تغییرات بسیاری از نظر پروتئینی به‌ویژه در ناحیه محور جنین که بخش زنده بذر است، اتفاق می‌افتد. این مطالعه برای فهم تاثیر تنش خشکی بر الگوی پروتئینی در فاز دوم جوانه‌زنی انجام شد. اثر تنش خشکی (پتانسیل آب 12- بار) بر الگوی پروتئینی محور جنین دو رقم گندم متحمل و حساس (به ترتیب ارقام سرداری و قدس) در سه تکرار به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی ارزیابی گردید. تنش خشکی سبب کاهش درصد جوانه‌زنی 50 درصدی در پتانسیل آب 12- بار نسبت به تیمار شاهد شد. طی تجزیه ژل‌های الکتروفورزی دوبعدی در محور جنین گندم 1000 لکه تکرارپذیر مشاهده شد که 25 لکه در سطح 5 درصد در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. در مقایسه رقم متحمل نسبت با حساس در 25 لکه معنی‌دار، تعداد 10 و 13 لکه در شرایط شاهد، 11 و 13 لکه در شرایط تنش، به ترتیب کاهش و افزایش بیان را نشان دادند. از جمله پروتئین‌های احتمالی دخیل در جوانه‌زنی طی تنش می‌توان به پروتئین‌های شوک حرارتی، بازدارنده‌های آلفا آمیلازی، پروکسی‌ردوکسین‌ها اشاره کرد. نتایج نشان داد که فراوانی این پروتئین‌ها تحت تنش خشکی به شدت و مقدار تنش و زمان آبنوشی بستگی دارد.

کلمات کلیدی: جوانه‌زنی، پروتئومیکس، محور جنین بذر، گندم نان.

مقدمه

است و در نهایت به گیاه جدید منجر می‌شود (Miransari and Smith, 2014). فرایند جوانه‌زنی بذر از مهم‌ترین مراحل رشدی گیاه و فرایندی پیچیده

جوانه‌زنی بذر توسط تعداد زیادی از مکانیزم‌ها کنترل می‌شود که برای رشد و توسعه جنین ضروری

*نویسنده مسئول: کرج - خیابان دانشکده - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران - گروه زراعت و اصلاح نباتات

E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: 93/5/18

تاریخ تصویب: 93/6/26

متابولیکی خود را حفظ می کنند (Leprince et al., 1993). تجمع پروتئین‌ها در جنین‌های بالغ به‌طور مستقیم با تحمل به از دست دادن آب مرتبط بوده به-گونه‌ای که در موارد مشابه مشاهده شده است که بسیاری از پروتئین‌ها در دو ناحیه جنین و اندام‌های رویشی گیاه در مواجهه با تنش‌های خشکی، سرما و شوری تجمع می‌یابند (Gomez et al., 1988). خشکی تجمع بسیاری از کمپلکس‌های پروتئینی مانند چپرون‌ها، پروتئین‌های فراوانی بالا در مراحل انتهایی جنینی (LEA)، بازدارنده‌های پروتئینازی را سبب می‌شود که ممکن است سلول‌ها را در برابر خسارات ناشی از کاهش پتانسیل آب حفظ کنند (Wang et al., 2004). یکی از روش‌های جدیدی که امروزه در کنار بررسی بیان ژن‌ها و ریزآرایه در پاسخ گیاهان به تنش خشکی کاربرد دارد پروتئومیکس از طریق ژل دو بعدی است (Jorin et al., 2007).

تکنیک الکتروفورز دو بعدی مقایسه‌ای روشی به-نسبت جدید است که می‌تواند فهم مناسبی را از کمپلکس پاسخ‌های پیچیده گیاه به تنش‌های محیطی و همچنین تعیین پروتئین‌های مرتبط با تحمل به پسابش و تنش خشکی در گیاهان ایجاد کند (Wu et al., 2010). با تعیین تفاوت در بیان ژن‌های تخصصی و تجمع پروتئین‌ها بین گیاهان متحمل و حساس می-توان به چگونگی مکانیزم‌های ژنتیکی تحمل به پسابش پی برد.

فهم مکانیزم‌های تحمل و پیام‌رسانی به تنش خشکی برای مهندسی ژنوتیپ‌های محلی برای حصول گیاهان متحمل‌تر به تنش‌ها ضروری است. این هدف می‌تواند از طریق بررسی پاسخ‌های مولکولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به تنش حاصل شود، بنابراین در این تحقیق به بررسی تفاوت-

است که توسط چندین ژن کنترل می‌شود (Kumar et al., 2006). جوانه‌زنی بذر با جذب آب در بذر خشک انجام می‌شود که این فرایند یک فعالیت فیزیکی است به‌گونه‌ای که در بذر (زنده و فاقد-حیات) این حالت صورت می‌پذیرد. جذب آب توسط یک بذر بالغ خشک یک فرآیند سه مرحله‌ای است که شامل یک مرحله جذب اولیه سریع (مرحله یک)، سپس یک مرحله پایا (مرحله دو) است. افزایش بعدی در جذب آب بعد از تکمیل جوانه‌زنی رخ می‌دهد، هنگامی که محورهای جنین طویل می-شوند (مرحله سه) (Bewley et al., 2013). طی فاز یک و دوم جذب آب تغییرات متابولیکی زیادی در بذر صورت می‌پذیرد از جمله این تغییرات می‌توان به تغییرات رونویسی، ترجمه‌ای و پس ترجمه‌ای اشاره کرد که از مهم‌ترین آنها تغییرات پروتئینی در تولید یکسری از پروتئین‌های مقاومت در برابر تنش، تولید هورمون‌های خاص (جیبرلین) در نتیجه ترجمه یکسری از آنزیم‌ها، کاهش فعالیت‌های بازدارندگی در برابر جوانه‌زنی اشاره کرد جملات از نظر ادبی اصلاح گردد (Gallardo et al., 2001).

امروزه از جنین غلات به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعه تحمل به تنش خشکی و پسابدگی به علت توانایی آنها در زنده‌مانی در شرایط با کمبود آب در مراحل انتهایی رسیدگی استفاده می‌شود، به گونه‌ای-که مشخص شده است که توسعه جنین با اتمام تحمل به پسابش همبستگی دارد (Ingram and Bartlets, 1996). رسیدگی در بذرها با تحمل به پسابش و ایجاد خواب همزمانی دارد. سلول‌های آندوسپرم نشاسته‌ای طی پسابش و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فاقد حیات می‌شوند (Young et al., 1997) درحالی‌که جنین و لایه آلثورون آنها بسیاری از فعالیت‌های

انجام شد. لازم بذکر است که میزان 5 میلی لیتر از آب مقطر یا محلول پلی اتیلن گلیکول 6000 به هر پتری دیش اضافه شد. پس از آماده سازی بستر رشد بذرها، آنها در دمای 20°C در انکوباتور قرار داده شدند.

در نهایت پتانسیل بحرانی برای جوانه زنی بذرها نیز محاسبه شد (Ansari and Sharifzade, 2013).

پس از اطمینان از متحمل و حساس بودن ارقام مورد بررسی و تعیین پتانسیل بحرانی، تیمار خشکی صفر (شاهد) و 12- بار به مدت 24 ساعت آبنوشی در 3 تکرار مشخص گردید.

آماده سازی نمونه ها و استخراج جنین

بذرها هر دو رقم در تکرارهای 50 تایی در پتری دیش های حاوی یک لایه کاغذ صافی قرار داده شدند سپس 5 میلی لیتر آب مقطر یا محلول پلی اتیلن گلیکول بسته به تیمار مورد نظر، به پتری دیش ها اضافه شد و به انکوباتور با دمای 20 درجه سانتی گراد انتقال یافتند و پس از گذشت 24 ساعت از آبنوشی بذرها (معادل مرحله دوم آبنوشی یا قبل از خروج ریشه چه) بذرها از پتری دیش خارج و به سرعت برای توقف فعالیت های متابولیکی ابتدا به فلاسک حاوی ازت مایع انتقال یافت و سپس به فریزر 80- درجه سانتی-گراد انتقال یافته و سپس جنین ها با اسکالپل خارج شدند.

استخراج پروتئین و تعیین مقدار آن

استخراج پروتئین ها با اندکی تغییرات در روش Damerall و همکاران (1986) انجام گردید. 3 میلی لیتر بافر استخراجی TCA (10 درصد وزنی/حجمی تری کلرواستیک اسید در استون) به حجم 100 میلی لیتر رسانده شد، 0/07 وزنی/حجمی دی تیوتریتول) به

های الگوی پروتئینی دو رقم گندم حساس و متحمل به خشکی پرداخته شد تا فهم مناسبی را از الگوی پروتئینی محور جنین گیاه گندم در مواجهه با تنش خشکی طی جوانه زنی و در مرحله دوم آبنوشی بذر که بسیاری از فعالیت های متابولیکی رخ می دهد، حاصل شود.

مواد و روش ها

مواد ژنتیکی

برای بررسی الگوی پروتئوم محور جنین بذر از دو رقم بذر گندم نان (*Triticum aestivum* L.) متحمل و حساس به ترتیب رقم سرداری، قدس استفاده گردید. تمامی آزمایشات در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر و پروتئومیکس گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی تهران انجام شد.

آزمون جوانه زنی

برای بررسی قوه نامیه و میزان جوانه زنی بذرها، آزمون جوانه زنی در پتری دیش هایی با یک لایه کاغذ صافی به روش روی کاغذ با چهار تکرار 50 بذری درون انکوباتور دارای دمای 20°C، در محیط تاریک برای هر دو رقم انجام شد. بذرهایی جوانه زده محسوب شد که دارای ریشه چه هایی با اندازه 1 تا 2 میلی متر بودند. لازم به ذکر است که مدت زمان لازم تا قبل از خروج ریشه چه (مرحله دوم آبنوشی بذر) اندازه گیری شد.

آزمون تنش خشکی

برای بررسی حساس و یا متحمل بودن دو رقم قدس و سرداری آزمون تنش خشکی در پتری دیش-هایی با یک کاغذ صافی به روش روی کاغذ با 4 تکرار در 16 سطح خشکی از پتانسیل 1- تا 16- بار و 1 سطح شاهد (صفر) به وسیله پلی اتیلن گلیکول 6000

الکتروفورز بعد اول، دوم و تهیه عکس

برای انجام بعد اول، پروتئین‌ها در استوک بازجذب حل شدند. این محلول شامل اوره 8 مولار، 2 درصد CHAPS، 0/002 درصد برموفنل بلو، 3 میلی‌گرم دی تیوتریتول برای 1 میلی‌لیتر محلول استوک بازجذب و 350 میکرولیتر بافر IPG برای غلظت 0/5 درصد بود. در این آزمایش از نوارهای IPG شرکت Pharmacia 18 سانتی‌متری با اسیدیته 4 تا 7 استفاده شد. این مرحله پس از 16 ساعت به اتمام رسید، سپس نوار IPG به دستگاه الکتروفورز بعد اول شرکت Amersham Bioscience انتقال یافت. مدت زمان قرارگیری در این دستگاه 12 ساعت بود که دمای خنک‌کننده دستگاه روی 20 درجه سانتی‌گراد و با 42 کیلوولت ساعت انجام شد.

نوار IPG پس از قرارگیری در بعد اول در 7 میلی-لیتر محلول متعادل‌کننده (50 میلی‌مولار Tris-HCl با اسیدیته 8/8، اوره 6 مولار، 30 درصد گلیسرول، 2 درصد سدیم دودسیل سولفات، 0/002 درصد برموفنل بلو، 20 میلی‌مولار دی تیوتریتول) به مدت 25 دقیقه شناور شد. سپس الکتروفورز بعد دوم انجام شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت BioRad استفاده شد. پس از اتمام بعد دوم ژل از دستگاه خارج رنگ‌آمیزی ابتدا توسط نترات نقره و سپس با کوماسی بلو G-250 انجام شد (Blum et al., 1987). از دستگاه دنسیتومتر GS800 ساخت BioRad به منظور اسکن ژل‌های رنگ‌آمیزی استفاده و سپس عکس‌ها به وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت TIEF تبدیل شدند.

تجزیه و تحلیل ژل‌ها با نرم‌افزار

برای بررسی کمی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار Melanie 6 (GeneBio, Geneva, Switzerland)

300 میلی‌گرم پودر جنین درون فالكون اضافه گردید. محلول حاصل به خوبی به وسیله ورتکس به هم زده تا هموژنیزه شد، پس از اتمام یک ساعت در دمای 20- درجه سانتی‌گراد، دمای سانتریفوژ را به 4 درجه سانتی‌گراد رسانیده شد و سانتریفوژ در 14000 دور در دقیقه، دمای 4 درجه، 20 دقیقه تنظیم شد. پس از اتمام 20 دقیقه به آرامی فالكون را بیرون آورده و محلول رویی بیرون ریخته شد در ادامه میزان 3 میلی-لیتر از بافر شستشو (0/07 وزنی/حجمی دی تیوتریتول در استون (به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شد)) طی دو نوبت به آن اضافه شد و پس از یک ساعت، سانتریفوژ محلول رویی بیرون ریخته شد.

سپس برای مدت 2 ساعت در دستگاه لئوفلاز قرار داده شد تا کاملاً آب سوپانسیون موجود در فالكون خارج شود. پس از اینکه پودر آردمانندی حاصل شد، میزان 20 میلی‌گرم از پودر نهایی را در تیوپ 1/5 ریخته و حدود 300 میکرولیتر از لایزیز بافر (4 درصد وزنی/حجمی چپس، اوره 9 مولار، 1 درصد وزنی/حجمی دی تیوتریتول، 1 درصد وزنی/حجمی آمفولیت (اسیدیته 3 تا 10)، 35 میلی‌مولار تریس (Tris-base)) به درون آن ریخته و برای مدت یک دقیقه ورتکس شد تا کاملاً بصورت محلول درآید. سپس تیوپ موجود را به ترمومیکسر با دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای مدت 2 ساعت انتقال داده شد. پس از اتمام 2 ساعت تیوپ‌ها را بیرون آورده و به سانتریفوژ با 12000g، دمای 7 درجه و برای مدت 15 دقیقه انتقال داده شد و محلول رویی را برداشته و در تیوپ‌های کوچکتر 0/2 تقسیم شدند و به فریزر 80- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. به منظور تعیین پروتئین از طول موج 595 نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر استفاده گردید (Bradford, 1976).

حتی گیاهان شورپسند، مرحله جوانه‌زنی آنها به خشکی حساس‌تر از دیگر مراحل رشدی است (Meyers and Cuper, 1989).

با توجه به اینکه درصد جوانه‌زنی در پتانسیل 12- بار در رقم سرداری تقریباً نصف این مقدار در شرایط فاقد تنش خشکی گزارش شد و همچنین در این تنش درصد جوانه‌زنی در رقم حساس (قدس) پایین مشاهده شد، لذا برای مشاهده بهتر تفاوت‌ها طی تنش این سطح از تنش خشکی (12- بار) به عنوان پتانسیل بحرانی انتخاب گردید (شکل 1).

استفاده شد به این ترتیب که در ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در تیمارهای مختلف علامت زده شده و پس از تعیین درصد حجمی هر لکه‌ها، آنها براساس آزمون تی استیودنت مورد مقایسه قرار گرفته و لکه‌هایی که مقادیر آنها در سطح آماری 5 درصد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند، به عنوان لکه‌های کانیدیدا شناخته شدند.

نتایج و بحث

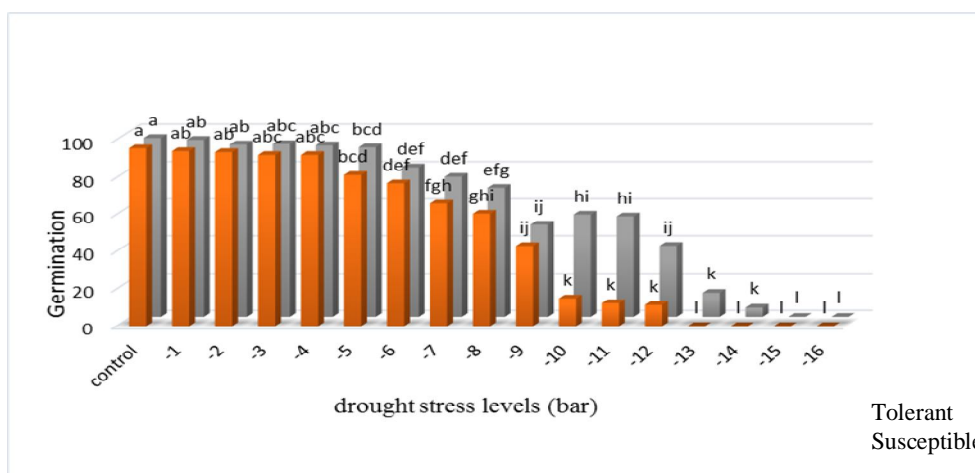
نتایج آزمون جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را از نظر اثر متقابل رقم و تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی در سطح یک درصد نشان داد (جدول 1). اکثر گیاهان

جدول 1- تجزیه واریانس تیمارهای تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی در دو رقم گندم سرداری (متحمل) و قدس (حساس) گندم
Table 1- analysis of variances of drought stress treatment on germination percentage in two wheat varieties, Sardari (Tolerant) and Qods (susceptible).

Mean square	df	Source of variance
265/961*	3	بلوک (Block)
1346/941**	1	رقم (variety)
10052/191**	16	تنش خشکی (Drought stress)
1087/441**	16	رقم × تنش خشکی (Variety × stress)
70/246	99	خطای آزمایشی (Error)
	135	کل (Total)

*، ** و ns به ترتیب، اثر معنی‌دار تیمار در سطح 5٪ و 1٪ و غیر معنی‌دار.

NS **, *, Nonsignificant or significant at P= 0.05, 0.01 respectively



شکل 1- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی دو رقم حساس (قدس) و سرداری (متحمل) در سطوح مختلف تنش خشکی برای تعیین پتانسیل بحرانی. با توجه به اینکه در پتانسیل 12- بار درصد جوانه‌زنی در رقم حساس بسیار پایین و در رقم متحمل برابر با نصف حداکثر بود، این پتانسیل انتخاب شد.

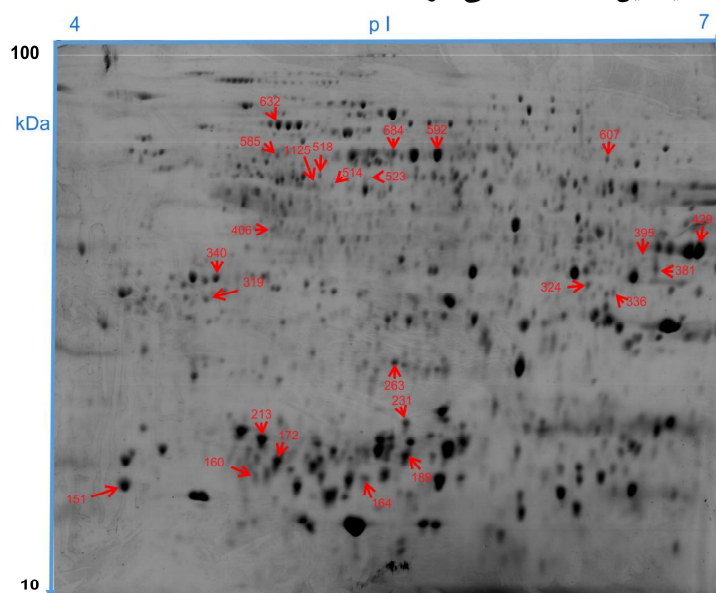
Figure 1- Mean comparison germination percentage of two wheat variety under different drought stress for determination of critical potential was shown. Potential -12 bar was chosen since in this potential, germination percentage in susceptible variety was low and in tolerant varieties equally with half of maximum index.

لکه در تکرارهای مختلف یک تیمار نسبت به میانگین درصد حجمی همان لکه در تکرارهای مختلف تیمار شاهد. برای محاسبه فاکتور القا تیمار بذر شاهد رقم متحمل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (جدول 2). به عنوان مثال در جدول 2 میانگین درصد حجمی لکه شماره 592 در بذرهای شاهد رقم متحمل در سه تکرار 0/13 و درصد حجمی همان لکه در سه تکرار در بذرهای 12- بار رقم حساس (تیمار 3) 0/56 بوده است و فاکتور القا 4/30 گزارش شده است که نشان می دهد این لکه در تیمار 12- بار رقم حساس نسبت به تیمار شاهد متحمل به میزان 4/30 برابر افزایش بیان داشته است. در مقایسه از نظر تنش خشکی، تعداد 25 لکه تفاوتی در بیان آنها مشاهده شد. تعداد 10 و 15 لکه به ترتیب در رقم متحمل نسبت به حساس، کاهش و افزایش بیان یافتند.

بیشترین میزان درصد جوانه زنی در تیمار شاهد در هر دو رقم مشاهده شد که به تدریج با افزایش سطح تنش خشکی (بار) از میزان این شاخص کاسته شد، تا پتانسیل 9- بار تفاوت معنی داری بین دو رقم حساس و متحمل گندم از نظر درصد جوانه زنی مشاهده نشد اما در بالاتر از این پتانسیل، درصد جوانه زنی در رقم حساس (قدس) به شدت کاسته شد که بیانگر حساس بودن این رقم به تنش خشکی است (شکل 1).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ژل ها

پس از شناسایی لکه ها توسط نرم افزار در حدود 1000 لکه به طور تکرارپذیر در بین تمامی تیمارهای اعمال شده مشاهده شد (شکل 2). در جدول 2 میانگین درصدهای حجمی، میزان فاکتور القا، پی اچ ایزوالکتریک و وزن مولکولی برحسب کیلوالتون تمامی لکه های با تفاوت معنی دار آورده شده است. فاکتور القا عبارت است از میانگین درصد حجمی هر



شکل 2- تصویر ژل بعد دوم رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. نقاط با تفاوت معنی دار نشان داده شده است.

Figure 2- The second dimension gel image stained with coomassie brilliant blue G-250 dye. Spots with significant differences was shown.

نیز تفاوت معنی داری را با یکدیگر نداشتند و تعداد 11 و 13 لکه در متحمل نسبت به حساس کاهش و

در تیمار شاهد تعداد 10 و 13 لکه در متحمل نسبت به حساس کاهش و افزایش بیان یافتند و 2 لکه

افزایش بیان داشتند و یک لکه نیز تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند (شکل 4).

جدول 2- درصد حجمی لکه‌ها در سه تیمار 1 (متحمل -12 بار)، 2 (حساس شاهد) و 3 (حساس -12 بار)، فاکتور القا، اسیدیته (pH) ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها برحسب کیلودالتون. اعداد موجود در زیر شماره هر لکه بیانگر درصد حجمی لکه در تیمار شاهد (شاهد، متحمل) است.

Table 2- volume spots percentage in three treatment 1 (Tolerant (-12 bar)), 2 (susceptible (control)) and 3 (susceptible (-12 bar)), induction factor, pI, Mw (kDa). Volume spots percentage in control treatment was shown under each spots number.

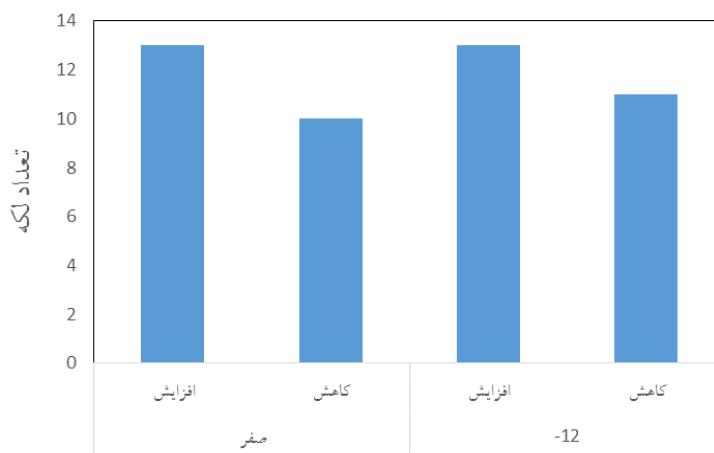
شماره لکه	تیمار	درصد حجمی	فاکتور القا	وزن مولکولی (کیلودالتون)	اسیدیته ایزوالکتریک	شماره لکه	تیمار	درصد حجمی	فاکتور القا	وزن مولکولی (کیلودالتون)	اسیدیته ایزوالکتریک
607	1	0/49	1/4	65	6/5	319	1	0/09	0/52	38	4/8
	2	0/016	0/04				2	0/04	0/23		
	3	0/061	0/17				3	0/043	0/25		
518	1	0/01	0/41	64	5/4	523	1	0/035	0/39	61	5/6
	2	0/033	1/37				2	0/034	0/38		
	3	0/02	0/83				3	0/028	0/31		
0/24	1	0/08	0/61	68	5/1	395	1	0/1	0/71	48	6/6
	2	0/15	1/15				2	0/039	0/27		
	3	0/14	1/07				3	0/035	0/25		
1125	1	0/12	0/42	63	5/4	324	1	0/032	0/21	41	6/4
	2	0/017	0/06				2	0/057	0/38		
	3	0/078	0/27				3	0/047	0/31		
0/28	1	0/33	1/5	23	5	592	1	0/28	2/15	66	6/1
	2	0/74	3/36				2	0/44	3/38		
	3	0/87	3/86				3	0/56	4/30		
381	1	0/87	1/01	43	6/7	336	1	0/062	0/88	40	6/5
	2	1/4	1/62				2	0/081	1/15		
	3	1/72	2				3	0/095	1/35		
213	1	0/56	2/24	27	5/1	340	1	0/16	0/72	42	4/9
	2	0/5	2				2	0/01	0/04		
	3	0/65	2/6				3	0/05	0/22		
172	1	0/15	0/33	26	5/3	406	1	0/37	1/02	51	5/1
	2	0/05	0/11				2	0/02	0/05		
	3	0/12	0/26				3	0/03	0/08		
0/45	1	0/27	1/42	23	5/6	263	1	0/09	0/37	33	5/8
	2	0/31	1/63				2	0/05	0/2		
	3	0/35	1/84				3	0/07	0/29		
164	1	0/43	1/16	31	5/9	429	1	0/87	0/80	48	6/9
	2	0/24	0/64				2	0/95	0/87		
	3	0/21	0/56				3	0/6	0/55		
0/37	1	0/14	2	67	5/8	189	1	0/3	1/57	26	5/9
	2	0/17	2/42				2	0/56	2/94		
	3	0/21	3				3	0/86	4/52		
584	1	0/49	2/13	74	5/2	514	1	0/38	0/90	60	5/5
	2	0/21	0/91				2	0/01	0/02		
	3	0/17	0/73				3	0/008	0/01		
0/23	1	0/14	0/56	22	4/6	151	1	0/14	0/56		
	2	0/05	0/2				2	0/05	0/2		
	3	0/02	0/08				3	0/02	0/08		

شده که بیانگر کاهش فعالیت یکسری از پروتئین‌ها در شرایط تنش است. از آنجایی که لکه‌های پروتئینی برای شناسایی ارسال نشد لذا براساس پی‌اچ و وزن مولکولی لکه‌ها اقدام به شناسایی احتمالی در تعدادی

همانگونه که مشاهده می‌شود تعداد افزایش بیان لکه‌ها در هر دو تیمار (صفر و -12 بار) با یکدیگر برابر بود، اما میزان کاهش بیان در رقم متحمل نسبت به حساس در شرایط شاهد کمتر از تنش گزارش

آرابیدوپسیس کاهش بیان یافتند که بیانگر نقش آنها طی جوانه‌زنی است، لکه شماره 1125 نیز محتمل است که پروتئین ATPase beta subunit باشد که در شرایط تنش و در رقم حساس کاهش در بیان را نشان داد (Gallardo et al., 2001). پروتئین‌های مرتبط با هومئوستازی و متابولیسم نیتروژن نیز طی تنش خشکی در بذره‌های گندم و نخود در رقم حساس نسبت به متحمل کاهش بیان یافتند (Pandey et al., 2008; Altenbach, 2012).

از لکه‌ها گردید. مشخص شده است که در بذره‌های خیار، ارزن ایتالیایی و گندم فراوانی پروتئین‌های متابولیسمی در شرایط تنش کاهش بیان یافتند، لکه شماره 160 احتمال می‌رود که بازدانه‌های آلفا آمیلازی باشند که در شرایط تنش به‌ویژه در رقم حساس نسبت به متحمل افزایش فراوانی پیدا کرده‌اند (Veeranagamallaiah et al., 2000; Todaka et al., 2000). پروتئین‌های مرتبط با مسیرهای انرژی طی تنش نیز در بذره‌های



شکل 4- مقایسه افزایش و کاهش بیان لکه‌های پروتئینی محورجین بذر گندم رقم متحمل نسبت به حساس.

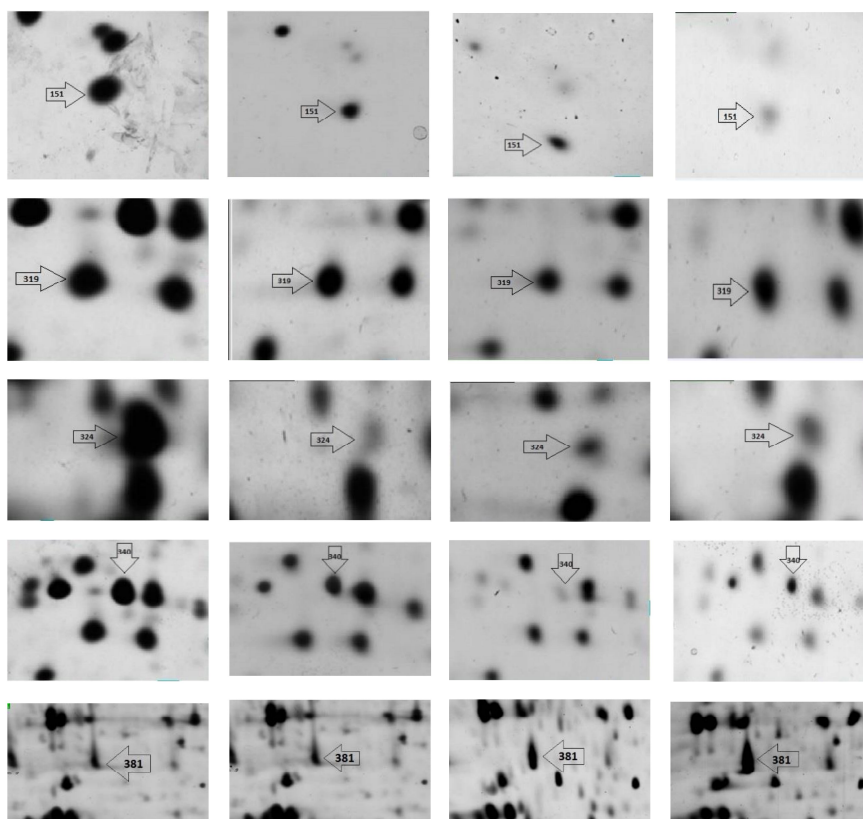
Figure 4- Comparison of increased and decreased expression of protein spots of tolerant than the susceptible wheat embryo was shown.

افزایش بیان آنها تحت تنش خشکی در محورجین بذره‌های گندم گزارش شده است (Irar et al., 2010)، لکه 632 با توجه به وزن مولکولی و پی اچ آن محتمل است که Heat shock cognate 70 kDa protein3 باشد که در تیمار تنش خشکی و در رقم متحمل افزایش یافته است (جدول 2). از جمله دیگر پروتئین‌های مهم در شرایط تنش، پروتئین‌های مرتبط با پیام‌رسانی است که به نظر می‌رسد لکه شماره 151، کالمودولین باشد که در رقم متحمل فراوانی بالاتری از آن گزارش شد (جدول 2). در شکل 5 نیز 5 لکه انتخابی با تفاوت معنی‌دار از نظر درصد حجمی لکه نشان داده شده است همانگونه که مشاهده می‌شود با

همچنین نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان تنش بر فعالیت یکسری از پروتئین‌ها افزوده می‌شود از جمله این پروتئین‌ها با توجه به مطالعات مختلف، پروتئین‌های مرتبط با تنش‌ها هستند (Huang et al., 2012)، لکه 263 به نظر می‌رسد ا-سیس پروکسی ردوکسین باشد که در هر دو رقم در شرایط تنش افزایش یافته اما در رقم متحمل فراوانی بالاتری گزارش شد. از دیگر پروتئین‌ها مرتبط با تنش می‌توان به پروتئین‌های مقاومتی اشاره کرد که از مهم‌ترین آنها پروتئین‌های شوک حرارتی هستند که ماکرومولکول‌های بزرگ را در برابر صدمات ناشی از تنش و گونه‌های فعال اکسیژن حفظ می‌کنند که

تحت تنش در رقم متحمل نسبت به حساس بیانگر فعالیت‌های متابولیکی خاص برای مقابله با تنش خشکی است (Irar et al., 2010). فراوانی بیشتر یکسری از پروتئین‌ها در رقم حساس نسبت به متحمل نیز با توجه به مطالعات مختلف، به پروتئین‌های بازدارنده جوانه‌زنی نسبت داده می‌شود. مشخص شده است که بذر طی جوانه‌زنی تحت تنش، گونه‌های فعال اکسیژن را تولید می‌کنند، که این عوامل آسیب‌رسان توسط یکسری از پروتئین‌های مرتبط با تنش حذف و از میزان آنها کاسته می‌شود (Bailly et al., 2008). به نظر می‌رسد که بذر در برابر تنش خشکی با تولید یکسری از پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی پاسخ می‌دهد.

افزایش تنش در تعدادی از لکه‌ها از درصد حجمی لکه کاسته می‌شود و بلعکس، که بیانگر کارایی پروتئین‌ها طی جوانه‌زنی است. در انتها این گونه نتیجه‌گیری می‌شود که جوانه‌زنی یکی از مهم‌ترین مراحل رشدی گیاه است که به شدت از تنش‌ها به‌ویژه تنش خشکی آسیب می‌پذیرد. با توجه به نتایج مشاهده شد که با افزایش تنش خشکی از میزان درصد جوانه‌زنی بذر کاسته شد. کاهش در میزان جوانه‌زنی را به تغییرات رونویسی و ترجمه‌ای و پس‌ترجمه‌ای ژن‌ها و پروتئین‌ها نسبت داده می‌شود که طی فاز دوم جوانه‌زنی این فعالیت‌ها نیز بیشتر مشاهده می‌شود. تغییرات پروتئینی در این بین، نقش بسیاری را دارند، اما فراوانی پروتئین‌ها



شکل 5- پنج لکه تصادفی با تفاوت معنی‌دار از نظر درصد حجمی لکه‌ها. هر ردیف معرف یک لکه که به ترتیب از بالا به پایین، لکه‌های 151، 319، 324، 340 و 381 است. چهار شکل موجود در هر ردیف بیانگر تیمارهای به ترتیب متحمل (سرداری) شاهد، متحمل 12- بار، حساس (قدس) شاهد، حساس 12- بار از سمت راست به چپ است.

Figure 5- Five random spots with a significant difference in volume spots percentage. Each row represents one spots, from top to bottom, 151, 319, 324, 340 and 380 respectively. Four figures in each row represents Tolerant (Control) – Tolerant (-12 bar) – susceptible (control) – susceptible (-12 bar) treatment from right to left respectively.

REFERENCES

منابع

- Altenbach, S.B. 2012.** New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *Journal of Cereal Science*. 56: 39-50.
- Ansari, O., Sharifzade, F. 2013.** Priming of *Secale montanum* seeds with using hormones and osmotic treatment and effect of postpriming treatment on quality and longevity seeds. M. Sc dissertation. University of Tehran, Iran.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F., 2008.** From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactiveoxygen species in seed physiology. *C.R. Biol.* 331, 806–814.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H. 2013.** Seeds. Physiology of development, Germination, Dormancy. (3rd Eds). Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- Bradford, M.M. 1976.** 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.
- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. 1986.** Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis*. 7: 52-54.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. 2001.** Proteomic analysis of Aarabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*. 126: 835-848.
- Gomez, J., Sanchez Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P., Pagès, M. 1988.** A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*. 334(6179): 262–4.
- Huang, H., Moller, I.M., Song, S-Q. 2012.** Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of proteomics*. 75:1247–1262
- Ingram, J., Bartels, D 1996.** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 47: 377–403.
- Irar, S., Brini, F., Goday, A., Masmoudi, KH., Pages, M. 2010.** Proteomic analysis of wheat embryo with 2-DE and liquid-phase chromatography (proteome lab PF-2D)_a wider perspective of the proteome. *Proteomics*. 73: 1707-172.
- Jiang, S.S., Liang, X.N., Li, X., Wang, S.L., Lv, D.W., Ma, C.V., Li, X.H., Ma, W.J., Yan, Y.M. 2012.** Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-de and maldi-tof mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci*. 13: 16065-16083.
- Jorin, J.V., Maldonado, A.M., Castillejo, M.A. 2007.** Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics*. 7: 2947–62.
- Kumar, V., Rani, A., Pandey, V. and Chauhan, G.S. 2006.** Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chemistry*. 99: 563-568.
- Leprince, O., Hendry, G.A.F., McKersie, B.D. 1993.** The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res*. 3: 231–46.
- Meyers, B., Cuper, D.I. 1989.** Effects of temperature and salinity on germination of *puccinellia* cumenemen. *Aus.J.Agr.Res*. 46: 561-571.
- Miransari, M., smith, D.L. 2014.** Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*. 99: 110–121.
- Pandey, A., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N. 2008.** Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular and Cellular Proteomics*. 7: 88-107.
- Todaka, D., Matsushima, H., Morohashi, Y. 2000.** Water stress enhances beta-amylase activity in cucumber cotyledons. *J Exp Bot*. 51: 739–745.
- Veeranagamallaiah, G., Jyothsnakumari, G., Thippeswamy, M., Chandra Obul Reddy, P., Surabhi, GK., Sriranganayakulu, G., Mahesh, Y., Rajasekhar, B., Madhurarekha, CH., Sudhakar, CH. 2008.** Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. *Plant Science*. 175: 631–641.
- Wang, W., Vinocur, B., Soseyov, O., Altman, A. 2004.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*. 9(5): 244–52.
- Wu, x., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X., Li, C. 2010.** Proteomic analysis of seed viability in maize (*Zea mays* L.) .*Acta Physiol Plant*. In press.
- Young, T.E., Gallie, D.R., DeMason, D.A. 1997.** Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunk2* genotypes. *Plant Physiol*. 115: 737–51.