

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

علی شایان‌فر^۱، رضا توکل افشاری^{۲*}، هوشنگ علیزاده^۳ و عبدالرحمن رسول‌نیا^۴

۱، ۲، ۳ و ۴. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه زراعت و

اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۱۳)

چکیده

جوانه‌زنی یکی از مهم‌ترین مراحل رشدی در گیاهان است که به شدت از تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی آسیب می‌پذیرد. جوانه‌زنی از سه مرحله (فاز) مهم تشکیل شده است که بسیاری از فعالیت‌ها پیش از مرحله سوم آن (خروج ریشه‌چه) آغاز می‌شود. محور جنین بذر نیز با توجه به زنده بودن آن، فعالیت‌های بسیاری از نظر سوخت‌وساز (متابولیسم) به‌ویژه در مرحله اول آن رخ می‌دهد که از مهم‌ترین این تغییرات می‌توان به تغییر در الگوی پروتئین‌گان (پروتئوم) آن اشاره کرد. برای بررسی تغییرات پروتئینی محور جنین گندم (سرداری و قدس به‌ترتیب متحمل و حساس) تحت تنش خشکی (۱۲- بار) آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار بررسی شد. نتایج تحقیق گویای تأثیر منفی تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی بود و سبب کاهش چشمگیری در آن شد. در تجزیه ژل‌های الکتروفورزی دوبعدی در محور جنین گندم ۱۰۰۰ لکه تکرارپذیر مشاهده شد که تعداد ۳۴ لکه با تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد گزارش شد. در مقایسه رقم متحمل نسبت به حساس از ۳۴ لکه با تفاوت معنی‌دار، شمار ۲۲ و ۶ لکه در شرایط شاهد، ۲۱ و ۱۰ لکه در شرایط تنش، افزایش و کاهش بیان را نشان دادند. نتایج این آزمایش گویای آن بود که فراوانی لکه‌ها به میزان زیادی از زمان، شدت و میزان تنش بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌گان‌شناسی (پروتئومیکس)، جوانه‌زنی، گندم نان، محور جنین بذر.

مقدمه

است که این مراحل خود نیز از محیط تأثیر می‌پذیرند (Kumar et al., 2006). بذر بالغ خشک، اندامی در حال سکون است که رطوبت اندکی را در خود دارد و فعالیت‌های سوخت‌وسازی آن در حال سکون است. از این رو برای اینکه جوانه‌زنی در آن رخ دهد نیاز دارد تا در معرض محرک‌های فعالیت‌های سوخت‌وسازی مانند دمای مطلوب، اکسیژن و آب کافی قرار گیرد تا بتواند آبیگری کند و جوانه‌زنی رخ دهد (Gallardo et al., 2001). جوانه‌زنی از سه مرحله مهم تشکیل شده است

گندم از مهم‌ترین غلات است به‌گونه‌ای که در حدود ۶۵ درصد تولید دانه گندم به‌طور مستقیم به‌عنوان غذای بشر، ۲۱ درصد به‌عنوان غذای دام، ۸ درصد به‌عنوان بذر و ۶ درصد به‌منظور هدف‌های دیگر مانند مواد خام صنعتی استفاده می‌شوند (Orth & Shellenberger, 1988). جوانه‌زنی بذر اساسی‌ترین مرحله تعیین‌کننده رشد گیاه است که با فرایندی پیچیده و چندمرحله‌ای توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود، اگرچه شایان یادآوری

که پس از جذب آب حالت سیگموئیدی را نشان می‌دهد که در مرحله اول بذر به سرعت آب‌نوشی می‌کند (در بذر زنده و مرده رخ می‌دهد)، سپس یک مرحله پایا رخ می‌دهد و با شیب اندکی آب جذب می‌شود، در مرحله سوم نیز سرعت جذب آب به صورت خطی افزایش می‌یابد و بافت‌های احاطه‌کننده بذر در نتیجه فشار ناشی از رشد محور جنین حذف شده و جوانه‌زنی به پایان می‌رسد (Bewley *et al.*, 2013).

فعالیت‌های سوخت‌وسازی برای رشد یاخته‌های ناحیه محور جنین پس از آبتوشی نیاز است. محور جنین هورمون جیبرلین را از آغاز به صورت آنزیم‌های آب‌کافتی (هیدرولیزی) در لایه آلئورون که مقادیری زیادی از آنزیم آلفا‌امیلاز را در خود دارد، سنتز می‌کند (Zentella *et al.*, 2002). این آنزیم‌ها انتقال دوباره مواد ذخیره‌ای در داندرون (آندوسپرم) را برای رشد محور جنین فراهم می‌کنند (Fincher, 1989; Jones & Jacobsen, 1991).

بررسی پروتیین‌ها از طریق جداسازی پروتیین‌ها با روشنی بالا توسط الکتروفورز دوبعدی و در نهایت تعیین آنها توسط طیف‌سنجی (اسپکترومتری) جرمی با بانک اطلاعات موجود، ابزاری توانمند برای تحلیل و شناسایی پروتیین‌ها در بسیاری از زمینه‌های بیولوژی گیاهی و بذر است (Kersten *et al.*, 2002). پس از بررسی الگوی پروتیین‌گان محور جنین و داندرون گوجه طی جوانه‌زنی گزارش شده است که از مهم‌ترین پروتیین‌های تغییر یافته می‌توان به لگومین‌ها، ویسلین‌ها، آلبومین‌ها، آنزیم‌های خانه‌دار، پروفیلین متصل به آکتین، پروتیین کیناز مرتبط با فعالیت‌های دفاعی و پروتیین ناقل لیپید غیر اختصاصی و مرتبط با سوخت‌وسازهای عمومی اشاره کرد (Sheoran *et al.*, 2005). در بررسی خود بر روی الگوی پروتئوم بذر علف‌تال (آرابیدوپسیس) در ۲۴ ساعت پس از آب‌نوشی و پیش از خروج ریشه‌چه مشخص شده است که ۳۹ پروتیین تفاوت معنی‌داری را نشان دادند که بیشتر این پروتیین‌ها مرتبط با فعالیت‌های دیواره یاخته‌ای و انتقال دوباره پروتیین‌ها و لیپیدهای ذخیره‌ای بود (Gallardo *et al.*, 2001). تحلیل‌های ریزآرایه (microarray) نیز تغییرات ترانس‌کریپتومی طی جوانه‌زنی در بذرهای گندم در اوایل جوانه‌زنی نشان دادند (Wilson *et al.*, 2005; Li

که پس از جذب آب حالت سیگموئیدی را نشان می‌دهد که در مرحله اول بذر به سرعت آب‌نوشی می‌کند (در بذر زنده و مرده رخ می‌دهد)، سپس یک مرحله پایا رخ می‌دهد و با شیب اندکی آب جذب می‌شود، در مرحله سوم نیز سرعت جذب آب به صورت خطی افزایش می‌یابد و بافت‌های احاطه‌کننده بذر در نتیجه فشار ناشی از رشد محور جنین حذف شده و جوانه‌زنی به پایان می‌رسد (Bewley *et al.*, 2013).

فعالیت‌های سوخت‌وسازی برای رشد یاخته‌های ناحیه محور جنین پس از آبتوشی نیاز است. محور جنین هورمون جیبرلین را از آغاز به صورت آنزیم‌های آب‌کافتی (هیدرولیزی) در لایه آلئورون که مقادیری زیادی از آنزیم آلفا‌امیلاز را در خود دارد، سنتز می‌کند (Zentella *et al.*, 2002). این آنزیم‌ها انتقال دوباره مواد ذخیره‌ای در داندرون (آندوسپرم) را برای رشد محور جنین فراهم می‌کنند (Fincher, 1989; Jones & Jacobsen, 1991).

بررسی پروتیین‌ها از طریق جداسازی پروتیین‌ها با روشنی بالا توسط الکتروفورز دوبعدی و در نهایت تعیین آنها توسط طیف‌سنجی (اسپکترومتری) جرمی با بانک اطلاعات موجود، ابزاری توانمند برای تحلیل و شناسایی پروتیین‌ها در بسیاری از زمینه‌های بیولوژی گیاهی و بذر است (Kersten *et al.*, 2002). پس از بررسی الگوی پروتیین‌گان محور جنین و داندرون گوجه طی جوانه‌زنی گزارش شده است که از مهم‌ترین پروتیین‌های تغییر یافته می‌توان به لگومین‌ها، ویسلین‌ها، آلبومین‌ها، آنزیم‌های خانه‌دار، پروفیلین متصل به آکتین، پروتیین کیناز مرتبط با فعالیت‌های دفاعی و پروتیین ناقل لیپید غیر اختصاصی و مرتبط با سوخت‌وسازهای عمومی اشاره کرد (Sheoran *et al.*, 2005). در بررسی خود بر روی الگوی پروتئوم بذر علف‌تال (آرابیدوپسیس) در ۲۴ ساعت پس از آب‌نوشی و پیش از خروج ریشه‌چه مشخص شده است که ۳۹ پروتیین تفاوت معنی‌داری را نشان دادند که بیشتر این پروتیین‌ها مرتبط با فعالیت‌های دیواره یاخته‌ای و انتقال دوباره پروتیین‌ها و لیپیدهای ذخیره‌ای بود (Gallardo *et al.*, 2001). تحلیل‌های ریزآرایه (microarray) نیز تغییرات ترانس‌کریپتومی طی جوانه‌زنی در بذرهای گندم در اوایل جوانه‌زنی نشان دادند (Wilson *et al.*, 2005; Li

دو مرحله اول جوانه‌زنی شمار ۶۹ و ۶۳ پروتیین افزایش (مانند الفامیلازها، فروکتوکیناز و پیرووات دکربوکسیلاز) و کاهش (پروتیین‌های ذخیره‌ای، پروتیین‌های مرتبط با بلوغ و پسایش بذر) بیان یافتند (Agrawal *et al.*, 2009). تجمع پروتیین‌ها در جنین‌های بالغ به‌طور مستقیم با تحمل به از دست دادن آب مرتبط بود، به‌گونه‌ای که در موارد همسان مشاهده شده است که بسیاری از پروتیین‌ها در دو ناحیه جنین و اندام‌های رویشی گیاه در رویارویی با تنش‌های خشکی، سرما و شوری تجمع می‌یابند (Gomez *et al.*, 1988). خشکی تجمع بسیاری از ترکیب (کمپلکس)‌های پروتیینی مانند چپرون‌ها، LEAها، بازدارنده‌های پروتیین‌سازی را سبب می‌شود که ممکن است یاخته‌ها را در برابر آسیب‌های ناشی از کاهش پتانسیل آب به‌ویژه در محور جنین حفظ کنند (Wang *et al.*, 2004). با تعیین تفاوت در بیان ژن‌های تخصصی و تجمع پروتیین‌ها بین گیاهان متحمل و حساس می‌توان به چگونگی سازوکارهای ژنتیکی تحمل به پسایش پی برد.

درک فعالیت‌های سوخت‌وسازی و سازوکارهای تحمل و آبخار پیام‌رسانی به تنش خشکی برای مهندسی ژن‌نمون (ژنوتیپ)‌های محلی برای دست‌یابی به گیاهان متحمل‌تر به تنش‌ها ضرورت دارد. برای رسیدن به این هدف بررسی پاسخ‌های مولکولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به تنش اهمیت دارد. در این تحقیق با توجه به اهمیت مرحله اول جوانه‌زنی که بسیاری از فعالیت‌های سوخت‌وسازی در آن رخ می‌دهد، الگوی پروتیینی محور جنین بذر گیاه گندم تحت تنش خشکی بررسی می‌شود تا درک مناسبی از آن در گیاه گندم هگزاپلوئید ایجاد کند.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

در این تحقیق از بذرهای دو رقم بذر گندم نان متحمل و حساس به ترتیب رقم سرداری (*Triticum aestivum*) و رقم قدس (*L. cv sardari*، رقم قدس (*Triticum aestivum* L. cv Qods) (منبع) برای بررسی الگوی پروتیین‌گان

گندم (قدس و سرداری)، تنش خشکی (صفر (شاهد)، ۱۲- بار)، ۱۲ ساعت آبنوشی در سه تکرار بود.

آماده‌سازی نمونه‌ها و استخراج جنین

بذرهای هر دو رقم در تکرارهای پنجاه‌تایی در پتری‌دیش‌های دارای یک لایه کاغذ صافی قرار داده شدند، سپس ۵ میلی‌لیتر آب مقطر یا محلول پلی‌اتیلن گلیکول بسته به تیمار مورد نظر، به پتری‌دیش‌ها اضافه شد و به کابین‌رشد با دمای ۲۰ درجه سلسیوس انتقال یافتند و پس از گذشت ۱۲ ساعت از آبنوشی بذرها (معادل مرحله اول آبنوشی یا پیش از خروج ریشه‌چه) بذرها از پتری‌دیش خارج و به سرعت برای توقف فعالیت‌های سوخت‌وسازی به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس انتقال یافتند و سپس جنین‌ها با اسکالپل خارج شدند.

استخراج پروتیین

استخراج پروتیین‌ها براساس روش Damerval *et al.* (1986) با اندکی تغییر انجام شد. ۳ میلی‌لیتر بافر استخراجی TCA به ۳۰۰ میلی‌گرم پودر جنین درون فالکون اضافه شد. محلول حاصل به خوبی به وسیله ورتکس هم زده شد تا همگن (هموژنیزه) شد، پس از اتمام یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، دمای سانتیفریوژ را به ۴ درجه سلسیوس رسانیده شد و سانتیفریوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سلسیوس، بیست دقیقه تنظیم شد. پس از اتمام بیست دقیقه به آرامی فالکون را بیرون آورده و محلول رویی بیرون ریخته شد در ادامه میزان ۳ میلی‌لیتر از بافر شستشو طی دو نوبت به آن اضافه شد و پس از یک ساعت، سانتیفریوژ و محلول رویی بیرون ریخته شد. سپس برای مدت دو ساعت در دستگاه لئوفلایز قرار داده شد تا به‌طور کامل آب سوسپانسیون موجود در فالکون خارج شود. پس از اینکه پودر آرمانندی حاصل شد، میزان ۲۰ میلی‌گرم از پودر نهایی را در لوله آزمایشی (تیوپ) ۱/۵ ریخته و حدود ۳۰۰ میکرولیتر از لایزیزبافر به درون آن ریخته و به مدت یک دقیقه ورتکس شد تا به‌طور کامل به‌صورت محلول درآید. سپس تیوپ موجود را به هم‌زن گرمایی (ترمومیکسر) با

محورجنین بذر استفاده شد که از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شد. همه آزمایش‌ها در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر و پروتئومیکس گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران انجام شد.

آزمون جوانه‌زنی

آزمون جوانه‌زنی در پتری‌دیش‌هایی با یک لایه کاغذ صافی به روش روی کاغذ با چهار تکرار پنجاه بذری درون کابین‌رشد (انکوباتور) دارای دمای ۲۰°C، در محیط تاریک برای هر دو رقم انجام شد. بذرهایی جوانه‌زده به‌شمار آمد که دارای ریشه‌چه‌هایی با اندازه ۱ تا ۲ میلی‌متر بودند. شایان یادآوری است که مدت زمان لازم تا پیش از خروج ریشه‌چه (مرحله دوم آبنوشی بذر) محاسبه شد، لذا نصف این مدت زمان به‌عنوان مرحله اول جوانه‌زنی محاسبه شد.

آزمون تنش خشکی

برای بررسی حساس و یا متحمل بودن دو رقم قدس و سرداری آزمون تنش خشکی در پتری‌دیش‌هایی با یک کاغذ صافی به روش روی کاغذ با چهار تکرار در شانزده سطح خشکی از پتانسیل ۱- تا ۱۶- بار و یک سطح شاهد (صفر) به‌وسیله پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ انجام شد. شایان یادآوری است که میزان ۵ میلی‌لیتر از آب مقطر یا محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به هر پتری‌دیش اضافه شد. پس از آماده‌سازی بستر رشد بذرها، آنها در دمای ۲۰°C در کابین‌رشد قرار داده شدند. در نهایت پتانسیل بحرانی برای جوانه‌زنی بذرها نیز محاسبه شد. فرمول محاسبه غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن به شرح زیر است (Michel & Kaufmann, 1973):

$$\Psi_s = (1/18 * 10^{-2}) C - (1/18 * 10^{-4}) C^2 + (2/67 * 10^{-4}) CT + (8/39 * 10^{-7}) C^2T$$

در معادله بالا C و T به ترتیب بیانگر میزان پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در گرم بر کیلوگرم آب و دما بر حسب درجه سلسیوس است.

پس از اطمینان از متحمل و حساس بودن ارقام مورد بررسی و تعیین توان بالقوه بحرانی، تیمارها مشخص شد که به ترتیب شامل دو رقم حساس و متحمل به خشکی

اکتساب تصاویر

پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از چگالی‌سنج (دنسیتومتر) GS800 ساخت بیورد اسکن شدند و به‌وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت TIEF تبدیل شدند.

تجزیه و تحلیل ژل‌ها با نرم‌افزار

برای بررسی کمی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار برای Melanie 6 (GeneBio, Geneva, Switzerland) استفاده شد به این ترتیب که در آغاز لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در تیمارهای مختلف علامت‌زده شده و پس از تعیین درصد حجمی همه لکه‌ها، آنها براساس آزمون تی استیودنت مورد مقایسه قرار گرفته و لکه‌هایی که مقادیر آنها در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند، به‌عنوان لکه‌های نامزد (کاندیدا) شناخته شدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمون جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را از نظر تأثیر متقابل رقم و تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۱). بیشتر گیاهان حتی گیاهان شورپسند، مرحله جوانه‌زنی آنها به خشکی حساس‌تر از دیگر مراحل رشدی است (Meyers & Cuper, 1989). نتایج آزمون تنش خشکی نشان داد که بحرانی‌ترین پتانسیل که به‌خوبی تأثیر تنش خشکی را نشان می‌دهد، پتانسیل ۱۲- بار بود، زیرا در این پتانسیل میزان جوانه‌زنی در رقم حساس بسیار کاهش یافت و به زیر ۱۰ درصد رسید، اما در رقم متحمل درصد جوانه‌زنی معادل نصف حالت شاهد گزارش شد (شکل ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس تیمارهای تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی در دو رقم گندم سرداری (متحمل) و قدس (حساس) گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
بلوک	۳	۲۶۵/۹۶۱*
رقم	۱	۱۳۴۶/۹۴۱**
تنش خشکی	۱۶	۱۰۰۵۲/۱۹۱**
رقم × تنش خشکی	۱۶	۱۰۸۷/۴۴۱**
خطای آزمایشی	۹۹	۷۰/۲۴۶
کل	۱۳۵	

*, ** و n.s به ترتیب، تأثیر معنی‌دار تیمار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت دو ساعت انتقال داده شد. پس از دو ساعت لوله‌ها را بیرون آورده و به سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰g، دمای ۷ درجه سلسیوس و برای مدت پانزده دقیقه انتقال داده شد و محلول رویی برداشته و در لوله‌های کوچک‌تر ۰/۲ تقسیم شدند و به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس انتقال داده شدند.

سنجش میزان پروتیین

سنجش میزان پروتیین با استفاده از روش Bradford (1976) و توسط دستگاه پلیت ریدر در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد.

الکتروفورز بعد اول و دوم

بعد اول (جداسازی براساس بار الکتربیکی)

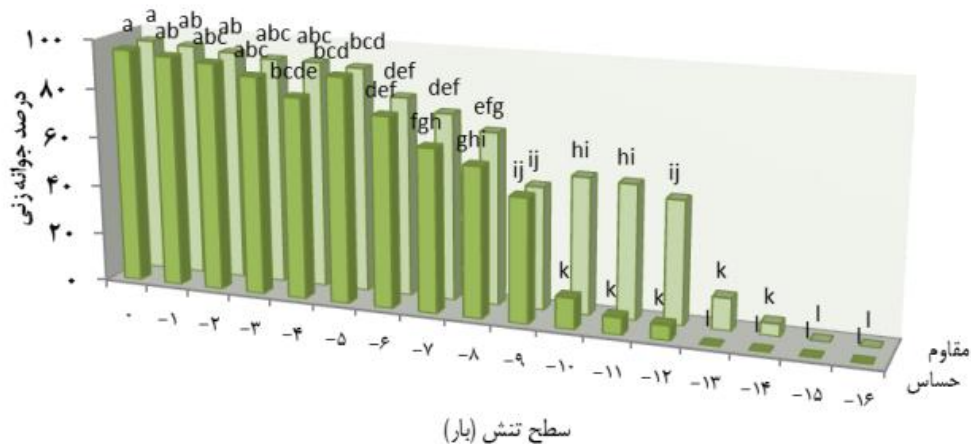
برای انجام بعد اول، پروتیین‌ها در محلول پایه (استوک) بازجذب حل شدند. این محلول شامل اوره ۸ مولار، ۲ درصد چپس، ۰/۰۰۲ درصد برموفنل بلو، ۳ میلی‌گرم دی تیوتریتول برای ۱ میلی‌لیتر محلول پایه بازجذب و ۳۵۰ میکرولیتر بافر IPG برای غلظت ۰/۵ درصد بود. در این آزمایش از نوارهای IPG شرکت Pharmacia ۱۸ سانتی‌متری با اسیدیته ۴ تا ۷ استفاده شد. این مرحله پس از شانزده ساعت به پایان رسید، سپس نوار IPG به دستگاه الکتروفورز بعد اول شرکت Amersham Bioscience انتقال یافت. مدت زمان قرارگیری در این دستگاه دوازده ساعت بود که دمای خنک‌کننده دستگاه روی ۲۰ درجه سلسیوس و با ۴۲ کیلوولت ساعت انجام شد.

بعد دوم (جداسازی براساس وزن)

نوار IPG پس از قرارگیری در بعد اول در ۷ میلی‌لیتر محلول متعادل‌کننده (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با اسیدیته ۸/۸، اوره ۶ مولار، ۳۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد سدیم دودسیل سولفات، ۰/۰۰۲ درصد برموفنل بلو) به مدت بیست‌وپنج دقیقه شناور شد. سپس الکتروفورز بعد دوم انجام شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت Biorad استفاده شد. پس از پایان بعد دوم ژل از دستگاه خارج و براساس شیوه‌نامه (پروتکل) Blum *et al.* (1987) رنگ‌آمیزی انجام شد.

متحمل گندم از نظر درصد جوانه‌زنی مشاهده نشد، اما در بالاتر از این پتانسیل، درصد جوانه‌زنی در رقم حساس (قدس) به شدت کاسته شد که بیانگر حساس بودن این رقم به تنش خشکی است (شکل ۱).

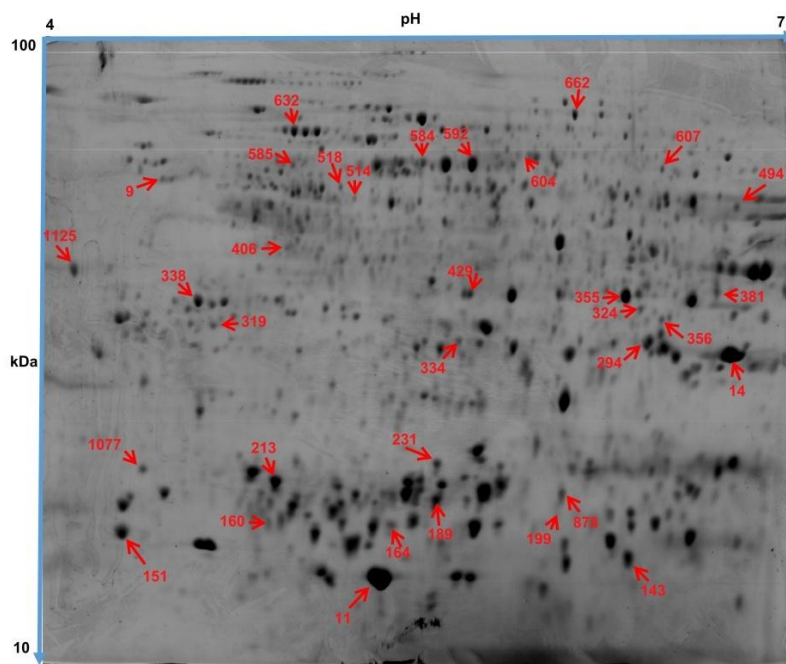
بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد در هر دو رقم مشاهده شد که به تدریج با افزایش سطح تنش خشکی (بار) از میزان این شاخص کاسته شد، تا پتانسیل ۹- بار تفاوت معنی‌داری بین دو رقم حساس و



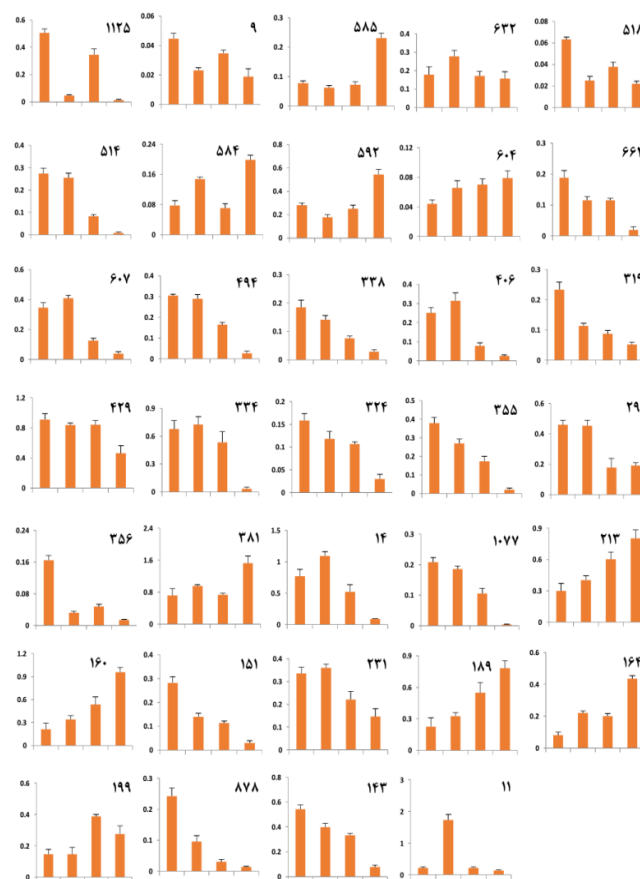
شکل ۱. مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی دو رقم حساس (قدس) و سرداری (متحمل) در سطوح مختلف تنش خشکی برای تعیین پتانسیل بحرانی. با توجه به اینکه در پتانسیل ۱۲- بار درصد جوانه‌زنی در رقم حساس بسیار پایین و در رقم متحمل برابر با نصف بیشینه بود، این پتانسیل گزینش شد.

مشاهده شد (شکل ۲). در بین همه تیمارهای مورد بررسی شمار ۳۴ لکه تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر در سطح ۵ درصد نشان دادند (شکل ۳).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ژل‌ها پس از شناسایی لکه‌ها توسط نرم‌افزار در حدود ۱۰۰۰ لکه به‌طور تکرارپذیر در بین همه تیمارهای اعمال شده



شکل ۲. تصویر ژل بعد دوم رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو. نقاط با تفاوت معنی‌دار نشان داده شده است.



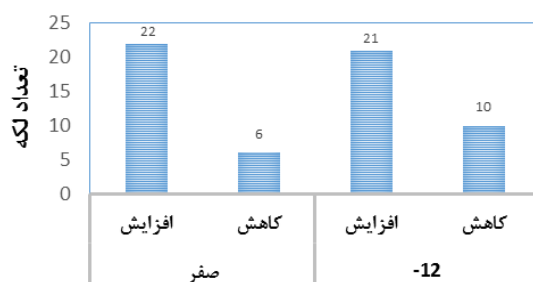
شکل ۳. مقایسه میانگین درصد حجمی لکه‌های پروتئینی مختلف با تفاوت معنی‌دار (گزینه‌شده) در هر نمودار (به ترتیب از سمت چپ به راست، متحمل (سرداری) شاهد - متحمل ۱۲- بار - حساس (قدس) شاهد - حساس ۱۲- بار)

پروتئین‌های مرتبط با مسیره‌های انرژی طی تنش نیز در بذره‌های علف‌تال کاهش بیان یافتند که بیانگر نقش آنها در فرآیند جوانه‌زنی است (Gallardo *et al.*, 2001). پروتئین‌های مرتبط با هومئوستازی و سوخت‌وساز 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). پروتئین‌های مرتبط با پسابش نیز دارای تجمع بالایی در بذره‌های اسفناج و علف‌تال بودند (Kazuaka & Oeda, 1994; Figueras *et al.*, 2004). چندی از پروتئین‌های پالایند نیز وجود دارند که در شرایط تنش با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، میزان آنها افزایش می‌یابد (Lee *et al.*, 2007). این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان تنش بر فعالیت چندی از پروتئین‌ها افزوده می‌شود از جمله این پروتئین‌ها با توجه به بررسی‌های مختلف،

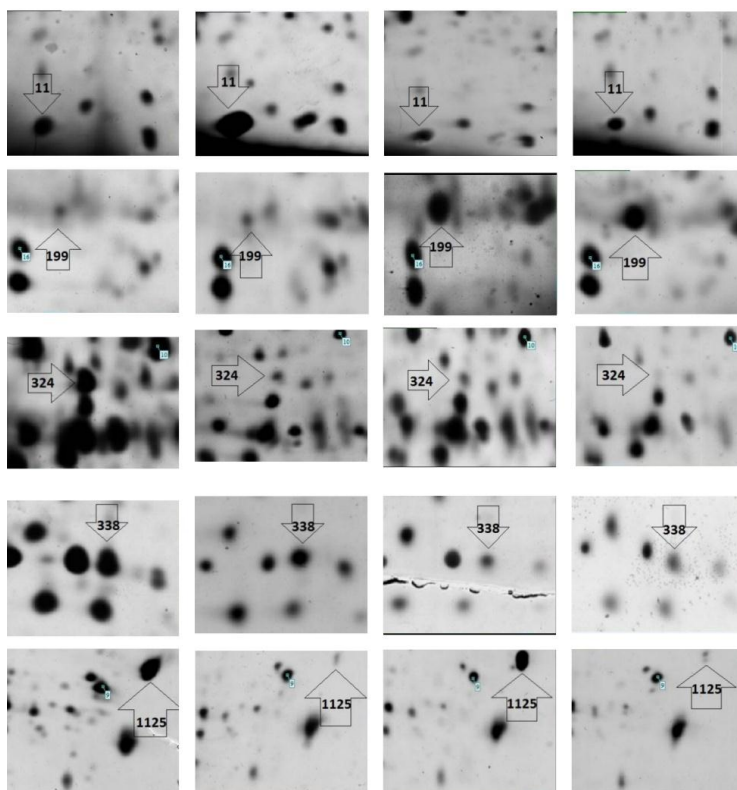
در مقایسه از نظر تنش خشکی، شمار ۳۴ لکه تفاوتی در بیان آنها مشاهده شد. در تیمار شاهد شمار ۶ و ۲۲ لکه در متحمل نسبت به حساس کاهش و افزایش بیان یافتند و ۶ لکه نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و شمار ۱۰ و ۲۱ لکه در متحمل نسبت به حساس کاهش و افزایش بیان داشتند و ۳ لکه نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۴). همان‌گونه که مشاهده می‌شود شمار افزایش بیان لکه‌ها در هر دو تیمار (صفر و ۱۲- بار) با یکدیگر تقریباً برابر بود، اما میزان کاهش بیان در رقم متحمل نسبت به حساس در شرایط شاهد کمتر از تنش گزارش شد که بیانگر کاهش فعالیت چندی از پروتئین‌ها در شرایط تنش است. مشخص شده است که در بذره‌های خیار، ارزن ایتالیایی و گندم فراوانی پروتئین‌های سوخت‌وسازی در شرایط تنش کاهش بیان یافتند (Todaka *et al.*, 2000; Veeranagamallaiah *et al.*, 2008; Jiang *et al.*,

تنش خشکی در محور جنین بذرهای گندم گزارش شده است (Irar *et al.*, 2010; Bartels & Sunkar, 2004). در بررسی الگوی پروتئینی بذر جو نیز میزان فراوانی بالایی از این پروتئین‌های بازدارنده مشاهده شده است (Finnie *et al.*, 2002). در شکل ۵ نیز پنج لکه گزینشی با تفاوت معنی‌دار از نظر درصد حجمی لکه نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش تنش در شماری از لکه‌ها از درصد حجمی لکه کاسته می‌شود و برعکس، که بیانگر کارایی پروتئین‌ها در فرآیند جوانه‌زی است.

پروتئین‌های مرتبط با تنش‌ها هستند. یکی از مهم‌ترین پروتئین‌ها بازدارنده‌های جوانه‌زی هستند که مشخص شده است که در فرآیند جوانه‌زی تحت تنش در محور جنین بذر گندم دوروم افزایش بیان می‌یابند و سبب کاهش در جوانه‌زی بذر می‌شوند. از دیگر پروتئین‌های مرتبط با تنش می‌توان به پروتئین‌های مقاومتی اشاره کرد که از مهم‌ترین آنها پروتئین‌های تکانه (شوک) گرمایی هستند که ماکرومولکول‌های بزرگ را در برابر آسیب‌های ناشی از تنش و گونه‌های فعال اکسیژن حفظ می‌کنند که افزایش بیان آنها در



شکل ۴. مقایسه افزایش و کاهش بیان لکه‌های پروتئینی محور جنین بذر گندم رقم متحمل نسبت به حساس



شکل ۵. پنج لکه تصادفی با تفاوت معنی‌دار از نظر درصد حجمی لکه‌ها. هر ردیف معرف یک لکه که به ترتیب از بالا به پایین، لکه‌های ۱۱، ۱۹۹، ۳۲۴، ۳۳۸ و ۱۱۲۵ است. چهار شکل موجود در هر ردیف بیانگر تیمارهای به ترتیب متحمل (سرداری) شاهد، متحمل ۱۲- بار، حساس (قدس) شاهد، حساس ۱۲- بار از سمت چپ به راست است.

نتیجه‌گیری کلی

جوانه‌زنی، به شدت، زمان رخداد و میزان تنش بستگی دارد که هر کدام از این عوامل تأثیر بسزایی را بر میزان تولید و کارایی پروتیین‌ها اعمال می‌کند. با توجه به شناسایی پروتیین‌های دخیل در جوانه‌زنی به‌ویژه در شرایط تنش، می‌توان در اصلاح این پروتیین‌ها، فعالیت‌هایی را راه‌اندازی کرد و جوانه‌زنی گونه‌های مهم زراعی را در شرایط تنش، به‌ویژه تنش خشکی که از تنش‌های مهم کشور ایران است، بهبود بخشید و استقرار و یکنواختی مناسب‌تری در امر سبز شدن گیاهچه‌ها در گندمزار را شاهد بود. در کنار تحقیقات پروتیین‌گان‌شناسی (پروتئومیکس) بایستی آزمایش‌های ژن‌گان‌شناسی (ژنومیکس)، رونویسی‌شناسی (ترانس-کریپتومیکس) و متابولومیکس نیز انجام شود و ارتباطات آنها بررسی شود و در نهایت با تغییر در بیان ژن‌های دخیل در ساخت (سنتز) رونوشت‌های mRNA و در نهایت پروتیین‌های مهم در شرایط تنش، جوانه‌زنی را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت‌های مالی آنها در انجام این پروژه با شماره گرت ۸۸۰۰۱۳۹۹ و همچنین از دانشگاه تهران در امر تهیه امکانات و لوازم آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

همان‌گونه که مشاهده شد با افزایش میزان تنش خشکی از درصد جوانه‌زنی بذرها گندم کاسته شد که این موضوع بیانگر تغییرات در فعالیت‌های مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن است. از جمله تغییرات مهم تغییرات در فعالیت‌های مولکولی بود که می‌تواند در بعد رونویسی و ترجمه‌ای و پس‌ترجمه‌ای تغییراتی را در محصول نهایی یاخته‌های محور جنین ایجاد کند. الگوی پروتیینی موجود بیانگر تغییرات اندکی بود که نشان‌دهنده آغاز و از سرگیری فعالیت‌های ساخت‌وسازی برای آغاز جوانه‌زنی است. پس از جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش خشکی، کاهش در فعالیت پروتیین‌های مرتبط با چرخه یاخته‌ای منطقی به نظر می‌رسد. براساس نتایج پروتیین‌های زیادی در شرایط تنش در رقم مقاوم نسبت به حساس در حالت تنش افزایش یافتند که این بیانگر کارایی بالاتر این رقم در مقاومت به تنش خشکی با تولید پروتیین‌های مرتبط با تنش، فعالیت دفاعی است. به‌احتمال افزایش در فراوانی چندی از پروتیین‌ها در رقم حساس نسبت به مقاوم در فرآیند تنش به پروتیین‌های بازدارنده و تولید گونه‌های اکسیژن فعال نسبت داده می‌شود. نکته مهم اینکه این گونه‌های اکسیژن فعال در کنار اثرگذاری‌های مثبت خود در فرآیند جوانه‌زنی اثرگذاری‌های منفی نیز دارند که توسط چندی از پروتیین‌های دفاعی از بین می‌روند. در مجموع فراوانی پروتیین‌های مختلف در مرحله اول

REFERENCES

1. Agrawal, G. K., Jwa, N-S. & Rakwal, R. (2009). Rice proteomics: Ending phase I and the beginning of phase II. *Proteomics*, 9, 935-963.
2. 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.
3. Bartels, D. & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Review Plant Sciences*, 24, 23-58
4. 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.
5. 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 proteins. *Electrophoresis*, 7, 52-54.
6. Figueras, M., Pujal, J., Saleh, A., Save, R., Pages, M. & Goday, A. (2004). Maize Rab17 over-expression in Arabidopsis plants promotes osmotic stress tolerance. *Annals Applied Biology*, 144, 251-7.
7. Fincher, G. B. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grain. *Annuals Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 40, 305-346.
8. Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P. & Svensson, B. (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology*, 129 (3), 1308-19.
9. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. & Job, D. (2001). Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126, 835-848.

10. Gomez, J., Sanchez Martinez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomenech, P. & Pages, M. (1988). A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*, 334 (6179), 262-264.
11. 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.
12. 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. *International Journal of Molecular Science*, 13, 16065-16083.
13. Jones, R. L. & Jacobsen, J. V. (1991). Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *International Review of Cytology*, 126, 49-88.
14. Kazuaka, T. & Oeda, K. (1994). Purification and characterisation of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant Cell Physiology*, 35, 601-11.
15. Kersten, B., Burkle, L., Kuhn, E. J., Giavalisco, P., Konthur, Z., Lueking, A., Walter, G., Eickhoff, H. & Schneider, U. (2002). Large-scale plant proteomics. *Plant Molecular Biology*, 48, 133-141.
16. Kumar, V., Rani, A., Pandey, V. & Chauhan, G. S. (2006). Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chemistry*, 99, 563-568.
17. Lee, P.Y., Kim, S.H., Bang, G.W., Lee, H.S., Kwak, S.S. & Kwon, S.Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26, 591-598.
18. Li-Pook-than, J., Carrillo, C. & Bonen, L. (2004). Variation in mitochondrial transcript profiles of protein-coding genes during early germination and seedling development in wheat. *Current Genetics*, 46, 374-380.
19. Mak, Y., Skylasm D. J., Willows, R., Connolly, A., Cordwell, S. J. & Wrigley, C. W., *et al.* (2006). A proteomic approach to the identification and characterisation of protein composition in wheat germ. *Functional and Integrative Genomics*, 6, 322-37.
20. Meyers, B. & Cuper, D. I. (1989). Effects of temperature and salinity on germination of *puccinellia cumenemen*. Australian. *Journal of Agricultural Research*, 46, 561-571.
21. Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. (1973). The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51, 914-916.
22. Orth, R.A. & Shellenberger, J.A. (1988). Origin, production and utilization of wheat. Wheat Chemistry and Technology. ed. Y. Pomeranz, *American Association of Cereal Chemists*, StPaul, Minnesota, 1-14.
23. Pandey, A., Chakraborty, S., Datta, A. & Chakraborty, N. (2008). Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 88-107.
24. Sheoran, I. S., Olson, D. J. H., Ross, Andrew R. S. & Sawhney, V. K. (2005). Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*, 5, 3752-3764.
25. Todaka, D., Matsushima, H. & Morohashi, Y. (2000). Water stress enhances beta-amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, 51, 739-745.
26. Veeranagamallaiah, G., Jyothsnakumari, G., Thippeswamy, M., Chandra Obul Reddy, P., Surabhi, G. K., Sriranganayakulu, G., Mahesh, Y., Rajasekhar, B., Madhurarekha, C. H. & Sudhakar, C. H. (2008). Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. *Plant Science*, 175, 631-641.
27. 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 Science*, 9(5), 244-52.
28. Wilson, I.D., Barker, G.L. A., Lu, C. & Coghill, J.A., *et al.* (2005). Alteration of the embryo transcriptome of hexaploid winter wheat (*Triticum aestivum* cv. Marcia) during maturation and germination. *Functional and Integrative Genomics*, 5, 144-154.
29. Zentella, R., Yamauchi, D. & Ho, T. D. (2002). Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell*, 14, 2289-2301.