

ارزیابی پاسخ فیزیولوژیکی و پروتئینی ارقام متحمل و حساس گندم بهاره به غلظت‌های مختلف تنش خشکی

Evaluation of physiological and protein response of tolerant and scuseptible wheat cultivars to different concentration of drought stresses

معروف خلیلی^{۱*}، محمدرضا نقوی^۱

۱- استادیاران، بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

Khalili M^{*1}, Naghavi MR¹

1- Assistant Professors, Department of Agriculture, Payame Noor University, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

شناسایی ارقام متحمل به تنش خشکی گندم در ایران که یکی از کشورهای خشک و نیمه‌خشک جهان محسوب می‌شود، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین منظور و برای بررسی پاسخ به تنش خشکی اعمال شده با غلظت‌های مختلف PEG₆₀₀₀ آزمایشی با استفاده از دو رقم گندم بهاره در مرحله گیاهچه‌ای به روش کشت هیدروپونیک انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتور تنش در این آزمایش، شامل شاهد (بدون استفاده از PEG₆₀₀₀) و تنش خشکی اعمال شده شامل 10% PEG₆₀₀₀ (-0.26MP)، 15% PEG₆₀₀₀ (-0.39MP) و 20% PEG₆₀₀₀ (-0.52MP) حجمی بودند. فاکتور دوم نیز دو رقم متحمل (نیک‌نژاد) و حساس (پیشاز) گندم بهاره بودند. دو هفته پس از اعمال تنش و در پایان مرحله روزت نمونه‌برداری انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط تنش ارزش صفات فیزیولوژیک کاهش یافت و بین دو رقم مورد مطالعه از لحاظ پاسخ به تنش خشکی تنوع وجود داشت. براساس بررسی الگوی پروتئینی تعداد ۲۳ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی برای هر دو رقم، تشخیص داده شد که از این تعداد ۱۴ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و تعداد پنج لکه پروتئینی منحصر به رقم متحمل و چهار لکه پروتئینی منحصر به رقم حساس بودند. در مجموع به‌نظر می‌رسد، بیش‌ترین گروه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم، پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز و پروتئین‌های سم‌زدا بودند. هم‌چنین نوع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده منحصر به فرد در دو رقم متحمل و حساس تحت تنش متفاوت بودند. در مجموع مهم‌ترین دلیل حساسیت و تحمل ارقام گندم بهاره مقدار متفاوت این دسته از پروتئین‌ها و در نهایت تأثیر آن‌ها بر روی سایر صفات مورد مطالعه باشد.

واژه‌های کلیدی

پروتئومیک

پروتئین

تنش خشکی

صفات فیزیولوژیک

گندم

مقدمه

تنش خشکی یکی از علل اصلی خسارت به گیاهان زراعی در سرتاسر جهان از طریق کاهش میانگین عملکرد تا میزان ۵۰ درصد می‌باشد (Wang et al. 2003). تحمل خشکی از نظر ژنتیکی یک صفت ساده نبوده، بلکه صفتی کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف می‌باشد که به‌طور مثال با صفات مختلف از جمله محتوای آب نسبی برگ، پتانسیل اسمزی، فلورسانس کلروفیل، تجمع پرولین، تجمع آبسزیک اسید و تنظیم اسمزی ارتباط دارد (Reynolds et al. 2000). به‌عبارت دیگر، ویژگی‌های فیزیولوژیک متعددی می‌توانند در تداوم رشد تحت شرایط خشکی مشارکت کنند. فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان عمدتاً تابع آب در گیاه بوده و به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر تنش آب در خاک قرار دارند (Kramer 1969). مقدار آب نسبی برگ (RWC) یک صفت فیزیولوژیک است که بارها به‌عنوان معیار گزینش برای تحمل خشکی پیشنهاد و گزارش شده‌است و مقدار آن تحت تنش خشکی در ارقام حساس نسبت به ارقام متحمل بیشتر کاهش می‌یابد (Schonfeld et al. 1988). از طرف دیگر، افزایش معمول در سطح ویژه برگ تحت شرایط تنش خشکی ممکن است ناشی از، از دست دادن وزن برگ در مقایسه با کاهش سطح برگ باشد که در این راستا Araus et al. (1997) اظهار داشتند که افزایش سطح ویژه برگ در تنش خشکی ممکن است به‌جهت سازگاری با شرایط تنش اتفاق افتد. هم‌چنین کاهش در وزن خشک برگ ممکن است ناشی از کاهش مواد خشک ناپایدار و یا افزایش ضخامت دیواره سلولی باشد (Lu and Neumann 1999). حفاظت از پتانسیل اسمزی مثبت برگ با تجمع ترکیباتی مثل مانیتول، رافینوز، تری هالوز، پرولین و گلیسین بتائین که اصطلاحاً محلول‌های سازگار نامیده می‌شود به‌دست می‌آید (Vendruscolo et al. 2007). تنظیم اسمزی به‌نظر می‌رسد یک نوع سازگاری به تنش خشکی باشد، به‌طوری که افزایش مقدار مواد محلول در سلول می‌تواند منجر به حفظ تورژانس و فرآیندهای مرتبط با تورژانس مانند باز و بسته شدن روزنه‌ها، رشد ساقه، فتوسنتز و توسعه ریشه‌ها در لایه‌های عمیق خاک در پتانسیل‌های پایین بشود (Kumar et al. 1984). از جمله رویدادهای مهم بیوشیمیایی در گیاهان تحت تنش، تغییرات

به‌صورت کاهش یا افزایش پروتئین، محلول‌های قندی و پرولین می‌باشد (Paleg and Aspinall 1989). پرولین به‌عنوان یک اسمولیت برای تنظیم اسمزی است و توزیع آن ساختار دیواره سلولی و پروتئین‌ها را پایدار می‌کند و رادیکال‌های آزاد را تمیز می‌کند (Srinivas and Bala Subramanian 1995). میزان تجمع پرولین در تنش متوسط یا شدید نسبت به سایر اسید آمینه‌ها افزایش می‌یابد. پرولین به‌عنوان یک مخزن ذخیره نیتروژن و یا ماده محلولی که پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد عمل می‌نماید و گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌دهد (et al. 1995 AL-Hakimi). (Valeri et al. 2002) نشان دادند که وقتی برگ‌های گیاهان به‌صورت جدا کشت در محیط آزمایشگاهی تحت تنش اسمزی بالایی قرار داده می‌شوند، میزان پرولین زیادی در برگ‌ها تجمع می‌یابد. این پژوهشگران هم‌چنین نشان دادند که میزان پرولین تجمع یافته در برگ‌هایی که تحت تنش ملایم بودند حدود ۲۰۰ میکرومول بر گرم وزن خشک افزایش یافته و ثابت باقی می‌ماند. روزنه‌ها نقش مهمی در تبخیر و تعرق، فتوسنتز و تنفس گیاه به‌عهده دارند. قابل ذکر است در شرایط آبیاری کامل ۹۰ درصد کل تلفات آب از طریق روزنه‌ها صورت می‌گیرد (Monneveux and Belhassen 1996). هدایت روزنه‌ای از جمله صفاتی است که در محیط‌های خشک و مرطوب تظاهر متفاوت دارد. به‌طور مثال هدایت روزنه‌ای گندم در محیط خشک رابطه منفی و در محیط مرطوب رابطه مثبت با عملکرد دارد (Clark and Mc Caig 1993). مقاومت روزنه‌ای معیاری است برای ارزیابی مقاومت به خشکی که توسط محققین استفاده شده‌است (Aragi and Assad 1998). بسته شدن روزنه‌ها لازمه نگهداری پتانسیل آب بالاست اما این عمل موجب کاهش جذب کربن نیز می‌شود (Merano et al. 2002). شاخص کلروفیل برگ‌ها یک شاخص مفید برای بهره‌وری از پتانسیل فتوسنتزی و قدرت عمومی گیاه می‌باشد (Alonso et al. 2002). برای اصلاح گیاهان، اطلاعات روی کارایی فتوسنتزی نمی‌تواند فقط از طریق اندازه‌گیری تبادل گازها صورت گیرد (Dwyer et al. 1992). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تحمل خشکی در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است و با انواع ساز و کارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در ارتباط است. در این راستا پروتئومیک

مواد و روش‌ها

در این پژوهش دو رقم گندم بهاره شامل نیک‌نژاد (به‌عنوان رقم متحمل) و پیش‌تاز (به‌عنوان رقم حساس) در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) به روش کشت سیستم آبکشت (هیدروپونیک) در سال ۱۳۹۵ از نظر پاسخ به تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این پژوهش تنش خشکی با استفاده از PEG₆₀₀₀ اعمال شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتور تنش شامل شاهد (بدون استفاده از PEG₆₀₀₀)، 10% PEG₆₀₀₀ (-0.26MP)، 15% PEG₆₀₀₀ (-) و 20% PEG₆₀₀₀ (-0.52MP) حجمی بود و فاکتور دیگر شامل دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز در نظر گرفته شد. دو هفته پس از اعمال تنش خشکی و در پایان مرحله روزت نمونه‌برداری از کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد. سپس محتوای آب نسبی برگ‌ها به روش (Morant-Manceau et al. 2004) محاسبه شد. همچنین، سطح ویژه برگ از طریق محاسبه نسبت سطح برگ (سانتی‌متر مربع) به وزن خشک برگ (گرم) به‌دست آمد (Arias 2007). پتانسیل اسمزی با استفاده از دستگاه اسمومتر (مدل Osmomat o10, Gonotec) اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان هدایت روزنه‌ای برگ از دستگاه پرومتر (Delta-T Devices, Cambridge, UK) استفاده شد. همچنین، شاخص کلروفیل برگ‌ها با استفاده از دستگاه کلروفیل متر (مدل SPAD-502, Mlolta, Japan) مشخص شد. غلظت پرولین برگ به روش نین‌هیدرین (ninhydrin) (Bates et al. 1973) با اسپکتروفتومتر تعیین شد. پس از جمع‌آوری داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه، تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه بر اساس طرح آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین نمودارهای مقایسه میانگین ارقام برای صفات مختلف در سطوح مختلف با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

از طرف دیگر برای تجزیه پروتئوم، استخراج پروتئین کل برگ از هر دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز انجام (Damerval et al. 1986) و الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای خطی ۱۷ سانتی‌متری IPG با برنامه زمانی تغییر ولتاژ برای بارگذاری شامل: ۵۰ ولتاژ برای

یکی از رهیافت‌های مهم برای درک اساس مولکولی تحمل تنش است تا تغییرات القا شده توسط تنش در سطح پروتئین‌ها مورد شناسایی و بررسی قرار گیرد (Thiellement et al. 2002). از طرف دیگر، (Kausar et al. 2013) در تجزیه پروتئوم ژنوتیپ‌های جو به تنش خشکی اظهار داشتند که نتایج نشان داده است که در مطالعه ژنوتیپ‌های متحمل و حساس پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز همراه با سنتز آمینواسیدها و پروتئین‌های مرتبط با degradation مقدار متفاوتی داشتند. این نتایج نشان‌دهنده این است که پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم کلروپلاستی و تولید انرژی نقش مهمی در سازگاری با شرایط تنش کمبود آب در مرحله گیاهچه‌ای جو دارند. از طرف دیگر، در مطالعه پروتئوم دیگری روی ارقام جو پروتئین آلفا SNAP که در انتقال درون سلولی و بقای سلول در شرایط تنش نقش حیاتی بر عهده دارد (Peter et al. 1998) در ارقام متحمل به میزان دو برابر ارقام حساس افزایش یافت و آن‌ها اظهار کردند که با توجه به نقش این پروتئین می‌تواند در تحمل به تنش مؤثر باشد (Kausar et al. 2013). در آزمایش دیگری روی گندم دوروم که توسط Caruso et al. (2009) انجام شد، تنش خشکی به مدت هفت روز بر گیاهچه‌های هفت روزه اعمال و با گیاهان شاهد مقایسه شد. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی در بعد اول به صورت IPG و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ‌آمیزی توسط کوماسی و طیف سنجی جرمی نشان داد که ۳۶ لکه پروتئینی به صورت تکرارپذیر دارای تغییرات مقدار معنی‌دار بین تنش و شاهد بودند. با گروه‌بندی این پروتئین‌ها مشخص شد که سهم نسبی این پروتئین‌ها بصورت دخالت در گلیکولیز، ۱۸ درصد؛ دخیل در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، ۱۵ درصد؛ دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه، ۱۲ درصد؛ در چرخه کالوین، ۹ درصد؛ در مکانیسم‌های دفاعی، ۶ درصد؛ و در تنظیم پس از ترجمه، ۳ درصد بود. در این راستا، هدف این پژوهش مقایسه واکنش فیزیولوژیک ارقام گندم تحت تنش خشکی و بررسی الگوی الکتروفورز دوبعدی ارقام حساس و متحمل گندم تحت تنش خشکی و در نتیجه شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان تحت تنش و بررسی نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای ترانسسانی مولکولی و ایجاد تحمل به تنش خشکی بود.

پروتئومیک دانشگاه توشای ایتالیا برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

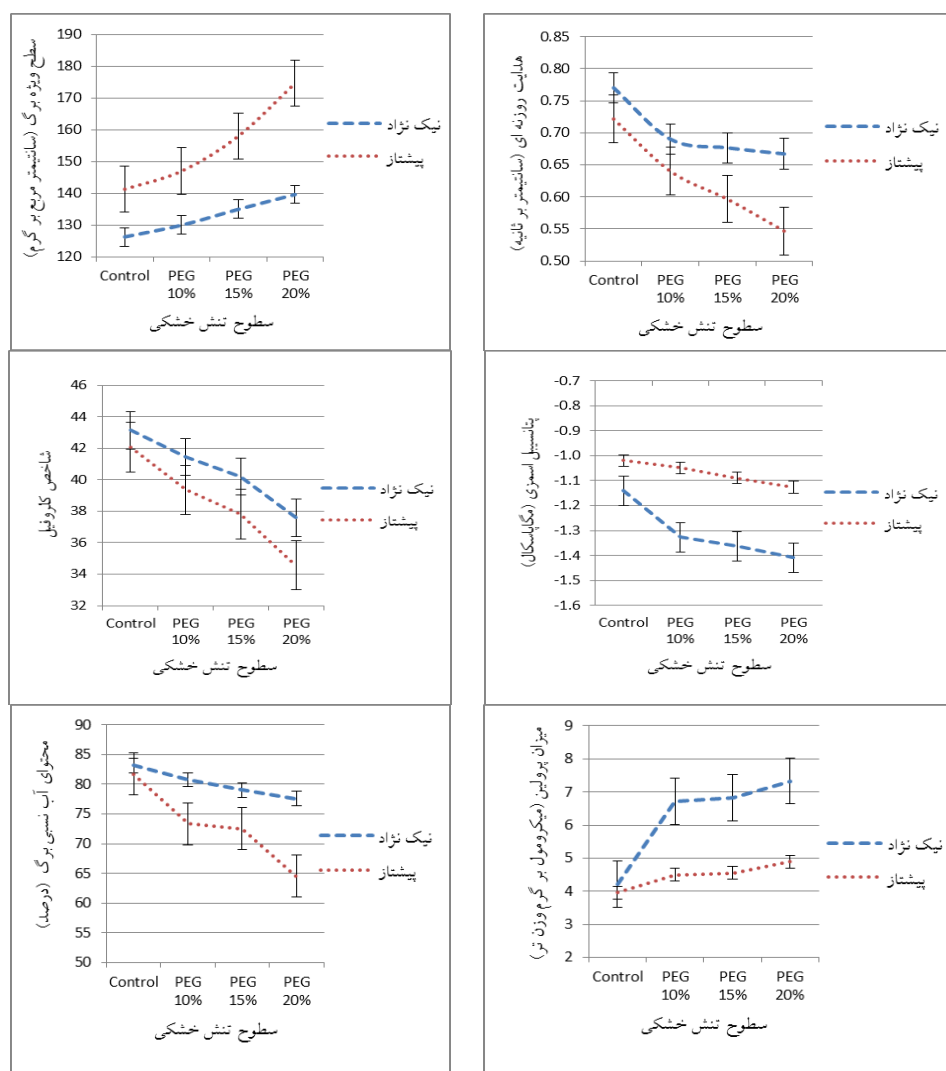
نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین سطوح تنش خشکی و همچنین بین ارقام برای تمامی صفات مطالعه شده نشان داد. در ضمن، اثر متقابل رقم با تنش برای صفات تمامی صفات مطالعه شده معنی‌دار به‌دست آمد. علاوه بر آن، کم‌ترین ضریب تغییرات مربوط به صفت شاخص کلروفیل (۹/۱۲ درصد) و بیش‌ترین آن مربوط به میزان پرولین (۱۵/۱۷ درصد) بود. به نظر می‌رسد که میزان پرولین بیش‌تر از سایر صفات تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند (جدول ۱). نحوه تغییر مقدار صفات فیزیولوژی مورد مطالعه تحت تیمارهای مختلف خشکی در دو رقم نیک‌نژاد (متحمل) و پیش‌تاز (حساس) در شکل ۱ نشان داده شده‌است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، در این آزمایش، سطح ویژه برگ و میزان پرولین از جمله صفاتی بودند که تحت تنش خشکی افزایش نشان دادند و مقدار سطح ویژه برگ در رقم پیش‌تاز تحت سطوح بالاتر تنش خشکی بیش‌تر از رقم نیک‌نژاد بود، در حالی‌که میزان پرولین در سطوح بالاتر تنش خشکی در رقم نیک‌نژاد بیش‌تر از رقم پیش‌تاز بود (شکل ۱). این نتایج مشابه گزارشات Araus et al. (1997) و AL-Hakimi et al. (1995) بودند.

۳۰ دقیقه، ۱۵۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۳۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۷۵۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۱۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۲۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۳۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۴۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت و ۵۰۰۰ ولتاژ برای دوازده ساعت و الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE به‌صورت دو تکه شامل ژل جداکننده (Separating gel 15%) و ژل نگه‌دارنده (Stacking gel 5%) انجام شد (Herbert 1999). 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 IF آن‌ها بزرگ‌تر از ۲ و یا کوچک‌تر از ۰/۵ بود، مورد انتخاب نهایی قرار گرفتند. نقطه‌ای دارای IF بزرگ‌تر از واحد است که تحت تنش خشکی افزایش مقدار نشان داده است. برای کاهش ریسک این مقدار بزرگ‌تر از ۲ گرفته شد. در مقابل، نقاط دارای IF کم‌تر از واحد دارای کاهش مقدار تحت تنش خشکی هستند و در اینجا هم برای کاهش ریسک، مقدار کم‌تر از ۰/۵ مد نظر قرار گرفت. در نهایت پس از هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی هدف، از دستگاه طیف‌سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MS/MS) واقع در آزمایشگاه بخش

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده ارقام گندم تحت تنش خشکی

میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	سطح ویژه برگ (سانتی متر مربع بر گرم)	میزان پرولین ($\mu\text{mol/g fw}$)	هدایت روزنه‌ای برگ (سانتی متر بر ثانیه)	شاخص کلروفیل	پتانسیل اسمزی (مگاپاسکال)	محتوای آب نسبی برگ (%)
تنش	۳	۳۳۹/۲۳ ^{۰۰}	۱۱/۹۸ ^{۰۰}	۰/۰۱۳ ^{۰۰}	۱۲/۷۱ ^{۰۰}	۰/۱۳۸ ^{۰۰}	۴۱/۱۵ ^{۰۰}
رقم	۱	۴۲۴/۷۲ ^{۰۰}	۲/۲۰ ^{۰۰}	۰/۰۱۱ ^{۰۰}	۷/۳۰ ^{۰۰}	۰/۰۷۶ ^{۰۰}	۳۳/۰۹ ^{۰۰}
رقم x تنش	۳	۸۴/۶۷ ^{۰۰}	۰/۱۲۹ ^{۰۰}	۰/۰۲۱ ^{۰۰}	۴/۹۹ ^{۰۰}	۰/۰۱۹ ^{۰۰}	۱۰/۳۰ ^{۰۰}
خطا	۲۴	۸۶/۲۲	۰/۰۲۲	۰/۰۰۳	۰/۹۴	۰/۰۰۳	۳/۴۳
ضریب تغییرات (%)		۱۴/۱۲	۱۵/۱۷	۱۲/۶۵	۹/۱۲	۱۱/۳۴	۹/۸۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

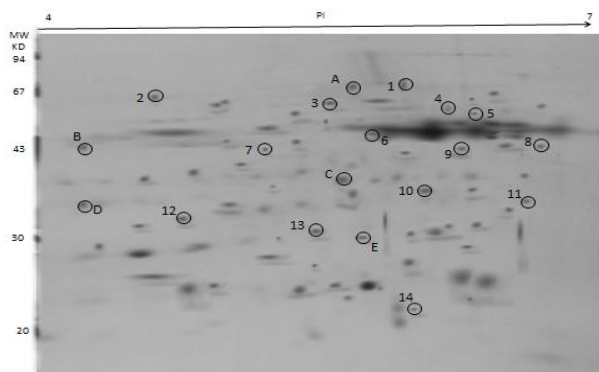


شکل ۱- نحوه تغییر صفات فیزیولوژیکی مطالعه شده در دو رقم نیک نژاد و پیشتاز تحت تیمارهای مختلف تنش خشکی

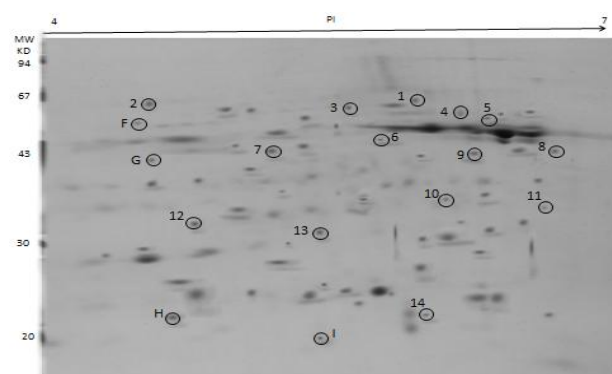
بالایی در حفظ محتوای آب نسبی برگ نسبت به ارقام حساس دارند (Martinez et al. 2004). از طرف دیگر، کاهش پتانسیل اسمزی که منجر به حفظ فشار تورمی برگ می شود معمولاً از طریق افزایش و تجمع نمک های محلول در سلول های گیاهی صورت می گیرد (Hasegawa et al. 2000). پرولین یکی از اسید آمینه های دخیل در تنظیم اسمزی است که تحت تنش خشکی به سرعت تولید می شود (Kavi Kishor et al. 2005). (et al. 2007). Vendruscolo حضور پرولین در گیاه را یک راهکار اصلی برای جلوگیری از اثرات زیان بار تنش کمبود آب دانستند و افزایش معنی دار میزان آن بعد از وقوع تنش کمبود آب در گندم را گزارش کردند. از طرف دیگر، هدایت روزنه ای از جمله صفاتی است که تحت تنش خشکی کاهش می یابد. بسته شدن روزنه ها لازمه نگهداری پتانسیل آب بالاست اما این عمل موجب کاهش

از طرف دیگر، صفات هدایت روزنه ای، شاخص کلروفیل، پتانسیل اسمزی و محتوای آب نسبی برگ تحت تنش خشکی کاهش نشان دادند و مقدار صفات هدایت روزنه ای، شاخص کلروفیل و محتوای آب نسبی برگ در رقم نیک نژاد تحت سطوح بالاتر تنش خشکی بیشتر از رقم پیشتاز بود. در حالی که در سطوح بالاتر تنش خشکی در رقم نیک نژاد صفت پتانسیل اسمزی منفی تر از رقم پیشتاز بود (شکل ۱). بنابر نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین در مجموع رقم نیک نژاد بهتر از رقم پیشتاز بود.

محتوای آب نسبی برگ یکی از مهم ترین صفات فیزیولوژیک می باشد که تحت تنش خشکی کاهش می یابد. در طی تنش خشکی تعادل آب گیاهان به هم می خورد و در نتیجه محتوای آب نسبی برگ کاهش می یابد (Bajjii et al. 2001). گزارش های متعدد نشان می دهد که ارقام متحمل به تنش کمبود آب توانایی



شکل ۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی (ژل مرجع) رقم نیک‌نژاد که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده‌است.



شکل ۳- الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم پیشناز (ژل مرجع) که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده‌است.

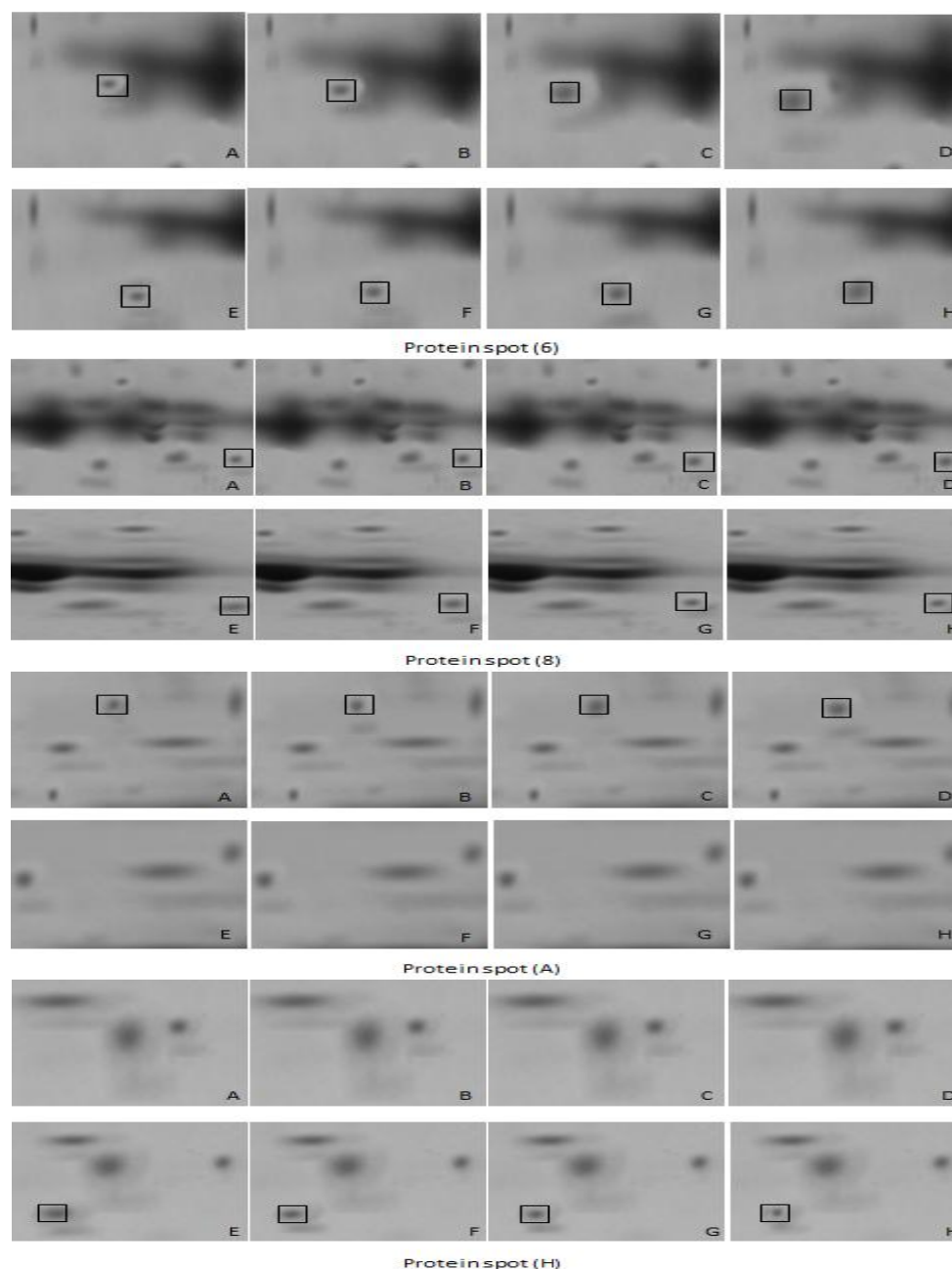
در مجموع پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر مقدار معنی‌دار با استفاده از طیف‌سنجی جرمی، از مجموع ۲۳ لکه، ۱۴ لکه پروتئینی به‌طور مشترک بین دو رقم متحمل و حساس شناسایی شد که تحت تنش خشکی تغییر مقدار نشان دادند (جدول ۲). بر طبق عملکرد این پروتئین‌ها در داخل سلول گروه‌بندی پروتئین‌ها انجام شد و بیش‌ترین درصد پروتئین‌های مشترک به‌ترتیب مربوط به واکنش نوری فتوستز (۵ پروتئین)، پروتئین‌های سم‌زدا (۳)، چرخه کالوین (۲)، انتقال پروتون (۲)، سیستم شاتلینگ و سنتز یا تجزیه پروتئین هر کدام یک پروتئین بودند (جدول ۲ و شکل ۵). علاوه بر آن پنج لکه پروتئینی تنها در رقم متحمل نیک‌نژاد تظاهر داشتند که بیش‌تر مربوط به واکنش نوری فتوستز بودند که با توجه به افزایش آن‌ها در جهت تقویت جذب و استفاده از نور تحت تنش فعالیت داشتند.

جذب کربن نیز می‌شود، بنابراین کاهش کم‌تر این صفت تحت تنش خشکی مطلوب‌تر است (Merano et al. 2002).

از مجموع لکه‌های شناسایی شده تعداد ۲۳ لکه پروتئینی بر روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده و با توجه به مقدار IF آن‌ها انتخاب شدند. از بین این لکه‌های پروتئینی ۱۴ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و پنج لکه فقط در رقم نیک‌نژاد تغییر مقدار داشت و چهار لکه هم تنها در رقم پیشناز تحت تنش، تغییر مقدار معنی‌دار نشان دادند که در مجموع ۲۳ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در هر دو رقم شناسایی شد. تصویر ژل مرجع مربوط به دو رقم نیک‌نژاد و پیشناز در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده‌است. بر اساس این نتایج می‌توان اظهار داشت که در رقم متحمل گندم تعداد پروتئین‌های دارای افزایش مقدار در شرایط تنش خشکی نسبت به رقم حساس بیش‌تر بود (جدول ۲ و ۳). بیش‌تر بودن تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در رقم نیک‌نژاد و همچنین افزایش مقدار اکثر پروتئین‌های معنی‌دار در این رقم نسبت به رقم حساس بیانگر این است که این رقم با دخالت‌دادن پروتئین‌های مختلف و با مقدار بیش‌تر تحت تنش خشکی عکس‌العمل بهتری نسبت به رقم حساس جهت حفظ رشد خود داشته است. (Hosseini Salekdeh et al. (2002)

مطالعه پروتئوم ارقام حساس و متحمل برنج نسبت به تنش خشکی، زیاد بودن تعداد پروتئین‌های دارای افزایش مقدار در رقم متحمل را گزارش کرده‌اند و این نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر روی دو رقم گندم می‌باشد.

از بین پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی آن‌هایی که بر روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با آبی کوماسی قابل مشاهده بودند، جدا شده و برای شناسایی با استفاده از اسپکترومتری جرمی استفاده شدند. ۲۳ پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با استفاده از روش MALDI TOF/TOF MS مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۲ و ۳). در روش MALDI TOF، شناسایی پروتئین‌ها بروش انگشت‌نگاری جرم پپتید (PMF) صورت می‌گیرد (Twyman 2004). جایگاه پروتئین‌های شناسایی شده در ژل در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.



شکل ۴- نحوه تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی شماره ۶، ۸ و لکه‌های A و H در این اشکال قسمت A، B، C و D به ترتیب مربوط به شرایط شاهد، PEG10%، PEG15% و PEG20% در رقم نیک‌نژاد و قسمت E، F، G و H به ترتیب مربوط به شرایط شاهد، PEG10%، PEG15% و PEG20% در رقم پیشنهاد می‌باشد.

حساس و متحمل افزایش مقدار داشتند و این افزایش در رقم متحمل بیش‌تر بود (مانند پروتئین شماره ۶). ب- پروتئین‌هایی که در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش مقدار داشتند (مانند پروتئین شماره ۸). ج- پروتئین‌هایی که فقط در رقم متحمل ظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد A) و د- پروتئین‌هایی که فقط در رقم حساس ظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد H) (شکل ۴).

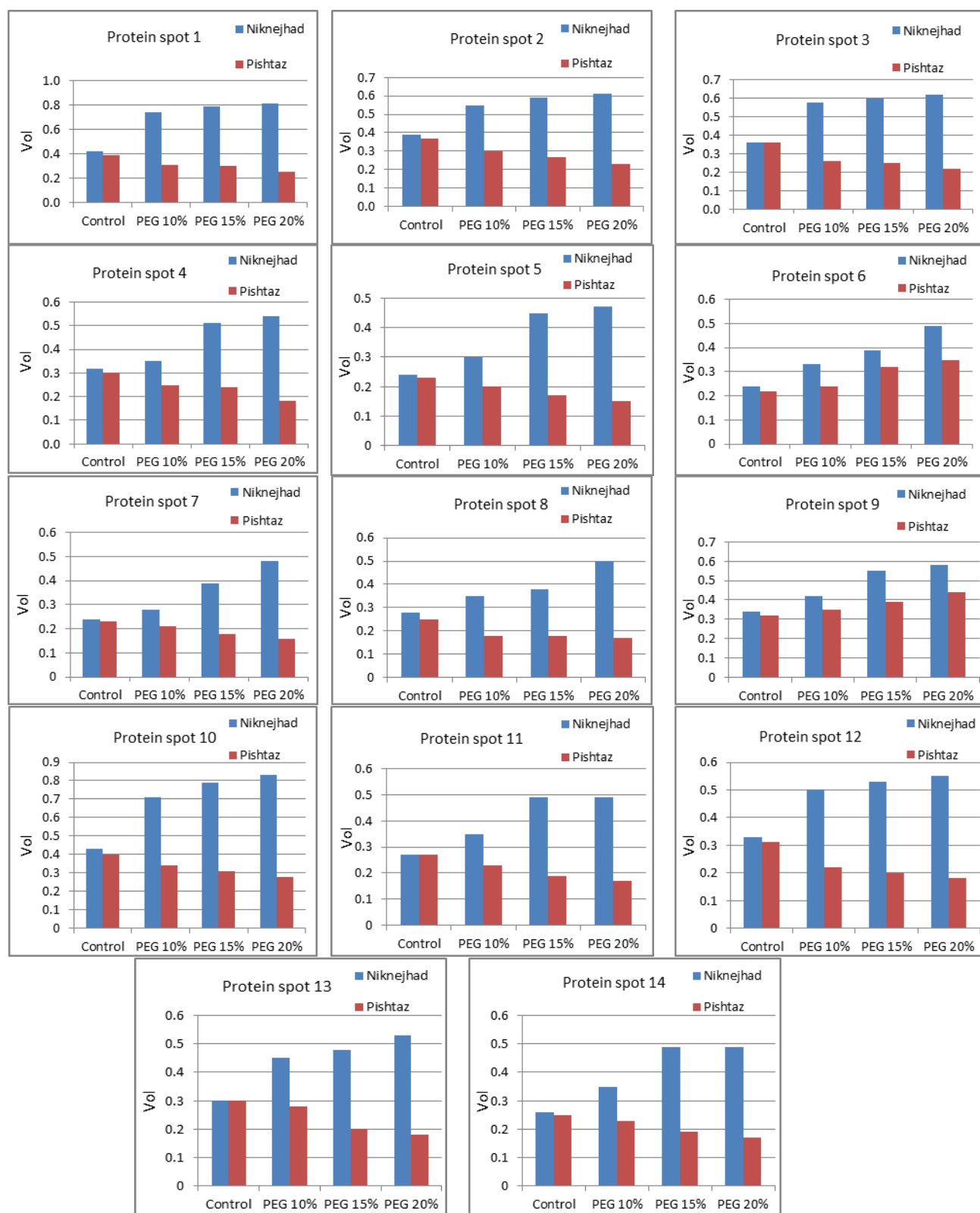
در حالی که چهار لکه پروتئینی تنها در رقم حساس دیده شدند که بیش‌تر مرتبط با تجزیه ساختار پروتئین‌ها بودند که با توجه به کاهش مقدار آن‌ها نشان‌دهنده کاهش پایداری پروتئین‌ها تحت تنش در رقم حساس است (جدول ۳ و شکل ۶). علاوه بر آن در مجموع بر اساس الگوی تغییر مقدار پروتئین‌ها در شرایط نرمال و هم‌چنین تنش خشکی می‌توان چهار گروه (حالت) را برای پروتئین‌ها مشاهده کرد: الف- پروتئین‌هایی که در هر دو رقم

جدول ۲- مشخصات ۱۴ لکه پروتئینی مشترک شناخته شده از کل لکه‌های معنی‌دار در رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز تحت غلظت‌های مختلف تنش خشکی

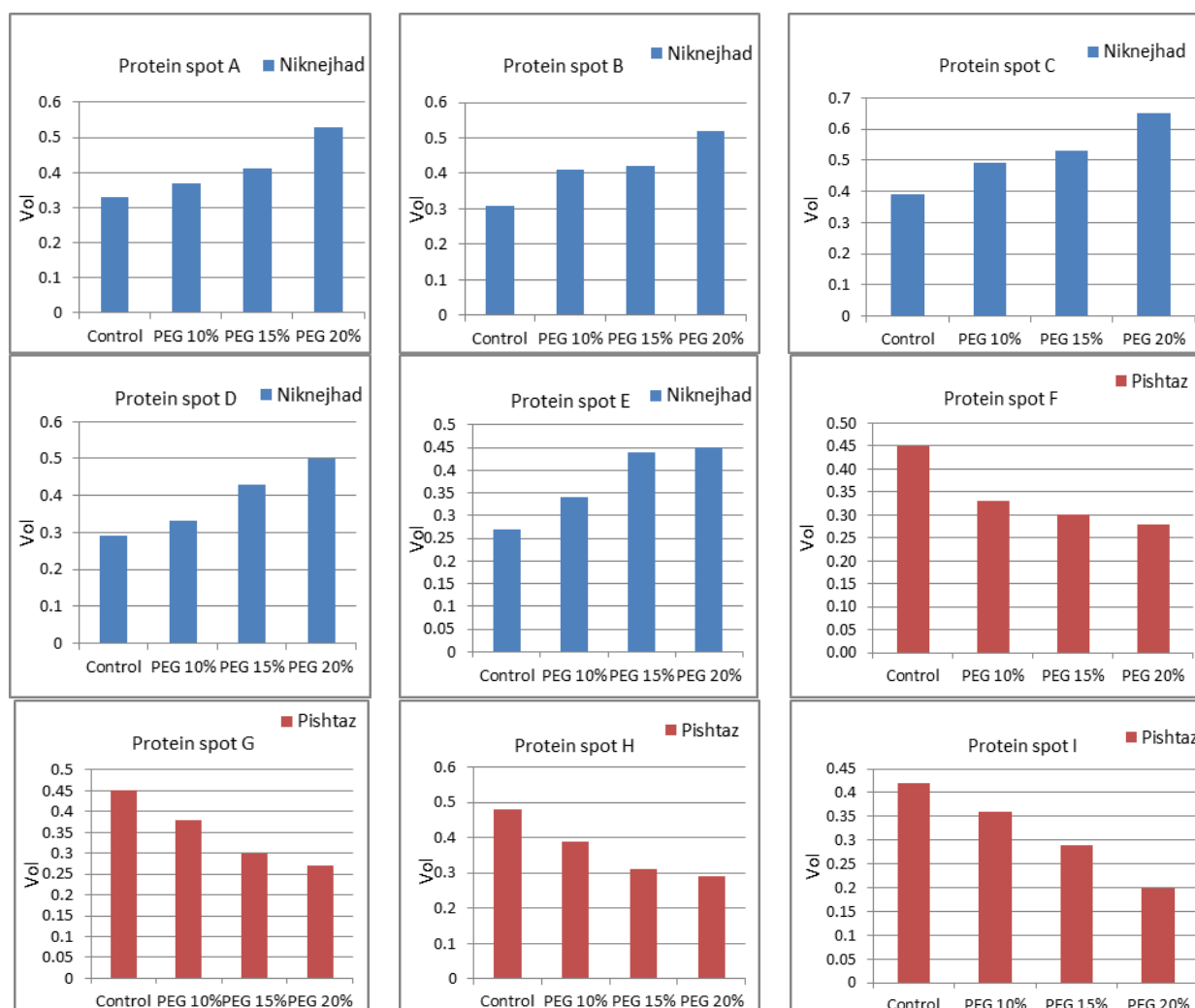
Accession number	اسم پروتئین	تئوری		تجربی		شماره لکه	گروه عملکردی پروتئین
		pI	MW	pI	MW		
gi 474219338	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	4.82	46.10	6.03	67.71	1	واکنش نوری فتوسنتز
gi 7619802	putative glyoxalase I	5.39	31.83	4.50	66.43	2	سم‌زدا
gi 474153435	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	6.9	51.24	5.45	65.30	3	چرخه کالوین
gi 475577109	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	5.26	34.93	6.25	62.12	4	سیستم شاتلینگ
gi 474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	5.75	34.64	6.34	55.97	5	واکنش نوری فتوسنتز
gi 14017579	ATP synthase CF1 beta subunit	5.06	53.88	5.83	48.92	6	انتقال پروتون
gi 475620929	Alpha-soluble NSF attachment protein	4.96	35.16	5.15	43.10	7	انتقال سلولی
gi 131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	8.84	27.42	6.63	42.91	8	واکنش نوری فتوسنتز
gi 47607439	mitochondrial ATP synthase precursor	7.71	27.09	6.29	42.82	9	انتقال پروتون
gi 2499477	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic	5.4	23.39	6.10	35.65	10	سم‌زدا
gi 131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	8.84	27.42	6.51	33.23	11	واکنش نوری فتوسنتز
gi 474023258	Glutathione S-transferase	8.3	45.26	4.63	31.90	12	سم‌زدا
gi 156143205	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	5.43	17.7	5.35	31.14	13	چرخه کالوین
gi 474352688	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	9.71	14	5.99	22.33	14	واکنش نوری فتوسنتز

جدول ۳- مشخصات پنج لکه پروتئینی غیر مشترک در رقم نیک‌نژاد و چهار لکه پروتئینی غیر مشترک در رقم پیش‌تاز تحت غلظت‌های مختلف تنش خشکی

Accession number	اسم پروتئین	تئوری		تجربی		شماره لکه	گروه عملکردی پروتئین
		pI	MW	pI	MW		
gi 167096	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	8.62	47.34	5.72	67.31	A	چرخه کالوین
gi 357117071	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like	5.4	37.01	4.21	43.52	B	واکنش نوری فتوسنتز
gi 218192573	50S ribosomal protein L10	10.1	24.4	5.53	38.25	C	سنتز یا تجزیه پروتئین
gi 131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	8.84	27.42	4.25	33.16	D	واکنش نوری فتوسنتز
gi 1572627	Cu/Zn superoxide dismutase	5.3	20.35	5.74	30.23	E	سم‌زدا
gi 254211611	70kDa heat shock protein	4.9	73.72	4.41	58.34	F	پروتئین شوک گرمایی
gi 52001641	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-large subunit	6.09	52.5	4.53	41.98	G	چرخه کالوین
gi 475577109	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	5.26	34.93	4.59	23.83	H	سیستم شاتلینگ
gi 218192573	50S ribosomal protein L10	10.1	24.4	5.32	20.12	I	سنتز یا تجزیه پروتئین



شکل ۵- نحوه تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم نیک‌نژاد و پیشتاز تحت تیمارهای مختلف تنش خشکی



شکل ۶- نحوه تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی غیرمشترک در دو رقم نیک‌نژاد و پیشتاز تحت غلظت‌های مختلف تنش خشکی

می‌شود (Heide et al. 2004). اعتقاد بر این است که پروتئین‌های تقویت‌گر^۱ درگیر اکسیژن دو وظیفه را بر عهده دارد: اولین وظیفه بهینه‌سازی گروه منگنز در طی تجزیه فتوشیمیایی آب می‌باشد و دومین وظیفه آن حفاظت از پروتئین‌های مرکز واکنش II در برابر خسارت ناشی از تشکیل رادیکال‌های اکسیژن در اثر نور می‌باشد (Heide et al. 2004). به عبارت دیگر زیر واحد فرعی کمپلکس PSII پروتئین‌هایی هستند که در سیستم فتوسنتزی نقش دارند و به‌عنوان پروتئین‌های OEC شناخته می‌شوند و در پایداری کمپلکس PSII نقش دارند (Ifuku et al. 2008) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به فتوسیستم II می‌شود (Takahashi and Murata 2008). بنابراین با توجه به افزایش و کاهش مقدار این پروتئین‌ها به ترتیب در رقم متحمل و حساس نیک‌نژاد و

به‌طور کلی در هر دو رقم بیش‌ترین تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش مربوط به واکنش نوری فتوسنتز و هموستازی سلول بودند (جدول ۲ و ۳). در نتیجه میزان مشارکت بالای پروتئین‌ها در این گروه‌ها نشان‌دهنده اهمیت بالای این دسته از پروتئین‌ها در رشد و نمو گیاه و مقابله با تنش خشکی است. این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده در مطالعه پروتئوم ذرت (Proubleva et al. 2001)، برنج (Nozu et al. 2006)، کلزا (Naghavi 2010) و گندم (Naghavi 2014) می‌باشد. در مجموع، در دو رقم نیک‌نژاد و پیشتاز بیش‌ترین پروتئین‌های مشترک در گروه واکنش نوری فتوسنتز مربوط به، پروتئین‌های OEC (شامل لکه‌های پروتئینی مشترک ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ لکه پروتئینی D در نیک‌نژاد) بودند. تجزیه شیمیایی آب در اثر نیروی تابشی در مجموعه درگیر اکسیژن (OEC) مرکز واکنش فتوسیستم II انجام

¹ Enhancer

پیش‌تاز که شامل لکه‌های پروتئینی مشترک ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و لکه پروتئینی D هستند، باعث اختلال در فعالیت فتوسیستم II در رقم حساس پیش‌تاز شده و در نهایت موجب کاهش کارایی واکنش نوری در این رقم نسبت به رقم متحمل می‌شود. از طرف دیگر، پروتئین HCF136 که یک پروتئین اساسی برای تعمیر، ساخت و پایداری کمپلکس فتوسیستم II می‌باشد (Plucken et al. 2002) و در تجزیه پروتئوم گندم تحت تنش خشکی کاهش مقدار آن گزارش شده است (Ford et al. 2011)، در این آزمایش نیز در رقم نیک‌نژاد (لکه B) افزایش مقدار و در رقم پیش‌تاز عدم بیان نشان داد (جدول ۳ و شکل ۵). از طرف دیگر، فعالیت پروتئین peptidyl-prolyl cis-trans isomerase یا CYP38 گاهی با فعالیت پروتئین‌های شوک گرمایی مقایسه می‌شود (Ji et al. 2012). در حالی که بر اساس مطالعات درون شیشه‌ای در *Arabidopsis thaliana* مشخص شده است که پروتئین CYP38 (لکه مشترک شماره ۱ در هر دو رقم) تنظیم فعالیت فسفاتاز پروتئین D1 داخل غشای تیلاکوئید را بر عهده دارد. بنابراین با توجه به نقش این پروتئین فسفاتاز در تجمع و سنتز زیر واحد D1 فتوسیستم II می‌توان اذعان داشت که پروتئین CYP38 در تجمع و ساخت فتوسیستم II نقش دارد (Lepedu et al. 2009). از طرف دیگر، در دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز پروتئین‌ها در گروه چرخه کالوین در دو گروه زیر واحد بزرگ روبیسکو و روبیسکو اکتیواز بودند. روبیسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز است که از چندین زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده (شامل لکه‌های پروتئینی مشترک ۱۳ و همچنین لکه پروتئینی G در رقم پیش‌تاز) و چند زیر واحد کوچک تنظیم کننده تشکیل شده است (Santos et al. 2004). در تجزیه پروتئوم غلاف برگ برنج در طی تنش کمبود آب گزارش شده است که زیر واحد بزرگ و کوچک روبیسکو کاهش یافته است (Ali and Komatsu 2006). هم‌چنین کاهش مقدار زیر واحد کوچک روبیسکو در طی تنش خشکی در لاین‌های حساس گندم گزارش شده است که نشان‌دهنده نقش آن در تحمل به تنش خشکی در گندم می‌باشد (Demirevska et al. 2009). از طرف دیگر، گزارش شده است که پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز مانند پروتئین اتصال یافته به روبیسکو، روبیسکو اکتیواز (شامل لکه پروتئینی مشترک ۳ و

هم‌چنین لکه پروتئینی A در رقم نیک‌نژاد) در رقم حساس جو کاهش مقدار نشان دادند، در حالی که این پروتئین‌ها در رقم متحمل جو تغییر مقدار نداشته و یا افزایش مقدار نشان دادند (Kaiser and Kappen 1997). بنابراین تفاوت در الگوی پاسخ پروتئینی ارقام متحمل و حساس باعث می‌شود که این ارقام از لحاظ ارزش صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک تحت تنش خشکی متفاوت باشند.

کلروپلاست و میتوکندری منبع اولیه ROS می‌باشند که توسط اکسید کردن نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و چربی‌ها منجر به آسیب سلول می‌شود. اگرچه غلظت پایین ROS در حفاظت پیام‌های مولکولی که در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و زیستی موثرند، نقش دارند (Petrov and Van Breusegem 2012). تعادل بین تولید ROS و پاک‌سازی آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند توسط اشکال مختلف تنش مختل شود (Gill and Tuteja 2010). Glyoxalase I (لکه مشترک شماره ۲) در سم‌زدایی methylglyoxyl نقش دارد و افزایش مقدار این پروتئین در طی تنش غیرزیستی در گیاهان نشان داده شده است (et al. 2005). Yadav. در حالی که (Hajheidari et al. 2007) کاهش در مقدار پروتئین glyoxalase I در دو رقم حساس گندم (ارقام افغانی و ارون) و عدم تغییر این پروتئین را در رقم متحمل خزر گزارش کرده‌اند. از طرف دیگر، (Ford et al. 2011) گزارش کردند که میزان این پروتئین در ارقام متحمل افزایش یافته است و در ارقام حساس گندم به تنش خشکی مقدار این پروتئین کاهش نشان داده است. از طرف دیگر، Glutathione S transferase I لکه مشترک شماره ۱۲ در این پژوهش شناسایی شد. GSTs گیاهی بیشتر آنزیم‌های cytosolic هستند (Dixon et al. 2002) که به‌صورت هومو یا هترودایمر دیده می‌شوند و دارای دامنه وزن مولکولی ۲۵ تا ۲۷ کیلودالتون می‌باشند (Edwards et al. 2000). بنابراین احتمال آن زیاد است که لکه ۲۶ کیلودالتونی GST (لکه مشترک شماره ۱۲ جدول ۲) که در این آزمایش شناسایی شد زیر واحد این آنزیم باشد. از لحاظ عمل، GSTs آنزیم‌های سم‌زدای وابسته به گلوتاتیون هستند که گلوتاتیون را با محصولات طبیعی مختلف و توکسین‌های محیطی مانند علف‌کش‌ها درآمیخته می‌کنند. سپس گلوتاتیون‌های درآمیخته شده به واکوئل‌ها برای متابولیسم‌های

سلولی این پروتئین‌ها بیانگر نقش مهم آنتی اکسیدانتی آن‌ها در اندامک‌های سلولی مذکور می‌باشد. این پروتئین‌ها علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانتی، در کنترل انتقال پیام هم فعال هستند. انتهای N این پروتئین که حاوی سیستین می‌باشد، به اسید سولفونیک اکسیده شده که این خود پلی برای واکنش با پراکسیدها است. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H_2O_2 انجام شده و آنزیم type 2 peroxiredoxin مولکول H_2O_2 را احیا می‌کند. در بسیاری از مطالعات پروتئین peroxiredoxin به عنوان پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش مطرح شده است (Hashimoto et al. 2009). حضور بیش‌تر و فعال‌تر این پروتئین در رقم متحمل نیک‌نژاد (لکه شماره ۱۰) نقش این پروتئین را در تحمل تنش شوری نشان می‌دهد (شکل ۵).

گروه دیگر از پروتئین‌ها از نظر نوع عمل با دو لکه پروتئینی مشترک ۶ و ۹ در دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز مربوط به پروتئین‌های دخیل در انتقال پروتون نقش دارند. اجزای زیر واحد مختلف ATP synthase complex در مطالعه پروتئوم ساقه کلزا (Albertin et al. 2009) و برگ ذرت (Porubleva et al. 2001) شناسایی شده‌اند. از نظر ساختاری ATP سنتاز کلروپلاستی دارای دو جزء اصلی می‌باشد که عبارتند از CF₁ و extrinsic CF₁ که ATP سنتاز با کمک آن‌ها باعث انتقال پروتون از غشای تیلاکوئید می‌شوند. CF₁ دارای پنج زیر واحد آلفا، بتا (لکه مشترک شماره ۶)، گاما، دلتا و اپسیلون است در حالی که CF₀ دارای سه زیر واحد a، b و c می‌باشد (Von Ballmoos and Dimroth 2007). CF₁ یک کمپلکس آنزیمی^۱ است که یکی از زیر واحدهای آن زیر واحد β است، که یک catalytic and ADP-binding unit می‌باشد و نقش مهمی در متابولیسم انرژی به واسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون درون غشایی^۲ دارد (Ye et al. 2013). وظیفه فیزیولوژیکی اصلی ATP سنتاز کلروپلاستی تولید ATP از ADP در حضور شیب پروتون از طریق غشای تیلاکوئید می‌باشد (Von Ballmoos and Dimroth, 2007). این شیب پروتون در نتیجه واکنش نوری فتوسنتز ایجاد می‌شود. سپس

بعدی که شامل سولفور است، انتقال می‌یابد (et al. 2000). Glutathione S transferase ممکن است در nonenzymatic carrier proteins (ligandins) که ترکیب و انتقال هورمون‌های گیاهی از قبیل indoleacetic acid را بر عهده دارند، نقش دارند (Marrs 1996). هم‌چنین میزان گلوکاتایون ترانسفراز در طی تنش در ارقام متحمل جهت مقابله با تنش افزایش و در ارقام حساس کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد که این آنزیم همراه با مالات دهیدروژناز می‌توانند فعالیت آنزیمی ROS Scavenging را بهتر انجام دهند (Kausar et al. 2013). افزایش میزان گلوکاتایون ترانسفراز در طی تنش کمبود آب در جهت خنثی کردن تأثیر سو ROS می‌باشد (Dhindsa 1991). از طرف دیگر، حضور پروتئین‌های (لکه پروتئینی E در رقم نیک‌نژاد) copper/zinc superoxide dismutase و (لکه پروتئینی مشترک شماره ۱۰) type 2 peroxiredoxin دلالت بر القا تنش اکسیداتیو در تنش خشکی دارد. پروتئین‌های گروه superoxide dismutase (SOD) در واقع 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 دی اکسید کربن کافی به عنوان پذیرنده نهایی الکترون، الکترون‌ها از غشا فتوسنتزی به سمت مولکول‌های اکسیژن از طریق واکنش Mehler جابجا شده و یون‌های سوپر اکسید را به وجود می‌آورند (Cakmak 2005). در پاسخ به تنش خشکی، Cu-Zn SOD کلروپلاستی (لکه شماره E) (شکل ۲، ۶) در رقم متحمل نیک‌نژاد افزایش مقدار داشت در حالی که در رقم حساس بیان نداشت. هم‌سو با این نتایج، تجمع SOD در رقم متحمل برنج در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu and Tanaka 2004). بیان نشدن این پروتئین در برگ‌های تحت تنش رقم پیش‌تاز بیانگر سطح بالای تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در کلروپلاست این رقم می‌باشد. به عبارت دیگر، در شرایط تنش که میزان تولید ROS افزایش می‌یابد، تعادل بین تولید و حذف آن، میزان اثر سوء تنش اکسایشی و هم‌چنین میزان حساسیت نسبت به آن را تعیین می‌کند (Sun et al. 2006). از طرف دیگر، پروتئین‌های peroxiredoxin به صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان

¹ Enzyme complex

² Transmembrane

ATP پروسه سلولی مصرف انرژی را مانند چرخه کالوین در طی رشد و نمو سلولی گیاهان فعال می‌کند (ATP and Dimroth 2007). مطالعات نشان داده است که در طی تنش خشکی مقدار ATP synthase کاهش می‌یابد (Tezara et al. 1999) و همچنین کاهش مقدار زیر واحد بتای ATP synthase در طی تنش خشکی اعمال شده توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول گزارش و اظهار شده است که این امر موجب کاهش تولید ATP و کاهش نسبت فتوسنتزی و کارایی چرخه کالوین می‌شود (Ye et al. 2013). همچنین گزارش شده است در تجزیه پروتئوم گندم تحت تنش کاهش مقدار ATP synthase CF1 subunit و *atp1* (که هم‌چنین F1-ATP synthase subunit α هم نامیده می‌شود) که در تولید ATP نقش دارند، منجر به کاهش نسبت فتوسنتزی می‌شود (Caruso et al. 2009). به‌طور کلی در چند پژوهش قبلی کاهش مقدار پروتئین‌های مرتبط با تولید ATP تحت تنش گزارش شده است (Caruso et al. 2009; Kausar et al. 2013). از طرف دیگر، افزایش مقدار پروتئین‌های مرتبط با سنتز ATP تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی شامل خشکی و شوری در چند مطالعه قبلی گزارش شده است (Wang et al. 2008; Guo et al. 2012). از طرف دیگر، بیش‌تر انرژی مورد نیاز سلول‌ها در میتوکندری و از طریق فرآیند فسفریلاسیون-اکسیداتیو تشکیل می‌شود. مرحله نهایی این فرآیند توسط F1F0-type ATP synthase (لکه مشترک شماره ۹) که در غشای داخلی میتوکندری قرار گرفته است انجام می‌شود. این آنزیم که همچنین کمپلکس V نامیده می‌شود از انرژی حاصل از شیب پروتون ایجاد شده بین دو غشای میتوکندری استفاده کرده و از ADP و فسفات معدنی ATP می‌سازد. این شیب پروتون در طی کاهش اکسیژن توسط زنجیره انتقال الکترون (کمپلکس I-IV) مستقر در غشای داخلی میتوکندری ایجاد می‌شود (Saraste 1999). ATP synthase میتوکندریایی دارای یک دامنه هیدروفوبیک (F0) دربرگیرنده کانال عبور پروتون است و همچنین دارای یک hydrophilic ATPase (دامنه F1) که شامل نوکلئوتید آدنین انجام‌دهنده اتصال بین ADP و فسفات معدنی می‌باشد (Stock et al. 2000). Ji (2012) با مطالعه پروتئوم برگ پرچم ژنوتیپ‌های برنج ۳۰ روزه تحت تنش خشکی گزارش کردند که بعد از ۲۰ روز تنش

میزان پروتئین mitochondrial F1-ATPase در ژنوتیپ حساس Zhenshan97B کاهش مقدار نشان داده است ولی در ژنوتیپ‌های متحمل تغییر مقدار مشاهده نشده است که این نتایج مشابه نتایج این آزمایش است.

دو ایزوفرم ملات دهیدروژناز (MDH) در برگ گندم بهاره تشخیص داده شدند. لکه مشترک شماره ۴ و لکه H در رقم پیش‌تاز نشان‌دهنده ملات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد (شکل‌های ۲، ۳، ۵ و ۶ و جداول ۲ و ۳). در سلول‌های گیاهی ایزوفرم‌های گوناگونی از MDHs شناسایی شده است که تفاوت آن‌ها در کوانتیم اختصاصی، مکان زیرسلولی و عمل بیولوژیکی می‌باشد (Ding and Ma 2004; Minarik et al. 2002). به‌طور کلی MDHs تبدیل داخلی اگزوالاستات و ملات را با استفاده از سیستم کوانتیم NAD/NADP کاتالیز می‌کنند (Minarik et al. 2002). مقدار این آنزیم در شرایط تنش برای فراهم کردن انرژی مضاعفی که گیاه در طی تنش نیاز دارد، افزایش می‌یابد (Guicherd et al. 1997). افزایش سطح آنزیم ملات دهیدروژناز در طی تنش خشکی 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).

پروتئین‌های شوک گرمایی (لکه شماره F با کاهش مقدار منحصر به رقم پیش‌تاز) در زمرهٔ چاپرون‌های مولکولی بوده و باعث پایداری و بهبود پیچ‌خوردگی دوباره پروتئین‌هایی که در طی تنش‌های گوناگون باز و تجزیه شده‌اند می‌شود (Zang and Komatsu 2007). پروتئین‌های شوک گرمایی که چاپرون هستند نقش تعیین‌کننده در حفاظت گیاه علیه تنش برای برگرداندن پروتئین‌ها به شکل طبیعی اولیه آن‌ها و در نتیجه هموستازی سلول بر عهده دارند (Wang et al. 2004; Toorchi et al. 2009). کاهش این پروتئین را در طی تنش اسمزی در ارقام حساس سویا گزارش کردند. از طرف دیگر پروتئین Heat shock cognate 70KDa در مطالعه پروتئوم ارقام جو تحت تنش خشکی در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش نشان داد که با توجه به نقش این پروتئین‌ها می‌تواند نشان‌دهنده نقش آن‌ها در تحمل به تنش خشکی باشد.

مطلوب‌تری قرار داشت. هم‌چنین نتایج تجزیه پروتئوم ارقام متحمل و حساس نشان داد که تعداد ۲۳ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمارهای تنش خشکی، تشخیص داده شدند که از این تعداد ۱۴ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و تعداد پنج و چهار لکه پروتئینی به‌ترتیب منحصر به رقم متحمل نیک‌نژاد و رقم حساس پیشتاز بودند. رقم نیک‌نژاد با دخالت دادن پروتئین‌های متعددتر و با مقدار بیشتر تحت تنش خشکی عکس‌العمل بهتری نسبت به رقم حساس پیشتاز جهت حفظ رشد خود داشته است. هم‌چنین در پاسخ اختصاصی، رقم متحمل تحت تنش بیشتر در مسیر پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز فعالیت داشته و رقم حساس بیش‌تر آسیب را در مسیرهای مختلف بیولوژی با کاهش فعالیت پروتئین‌ها مواجه می‌شود. بر پایه این ارقام متحمل و حساس با داشتن مقدار پروتئینی متفاوت و اثر این پروتئین‌ها در ساختار سلولی و روی صفات مختلف گندم بنحوی متفاوت به مقابله با تنش خشکی پرداختند.

SNAPs^۱ برای اتصالات درون ارگانی و همچنین نقل و انتقالات وزیکولی ضروری می‌باشد (Stenbeck 1998). هم‌چنین مطالعات اخیر نقش این گونه پروتئین‌ها را در رشد لوله‌های گرده نشان می‌دهد زیرا گیرنده‌های SNAP که SNRE نامیده می‌شوند به‌عنوان واسطه انتقال اجزای خارجی و داخلی رشد نوک دانه‌های گرده شناخته شده‌اند (Guo and Mccubbin 2012). بنابراین به نظر می‌رسد کاهش مقدار این پروتئین (شکل ۵) در رقم پیشتاز (لکه مشترک شماره ۷) تحت تنش نشان‌دهنده کاهش فعالیت درون سلولی و کاهش ارتباطات بین اندامی باشد و می‌تواند از طریق تداوم تنش در مرحله زایشی کاهش رشد لوله گرده روی تولید مثل گیاه تأثیر بگذارد.

نتیجه‌گیری کلی

بر طبق نتایج به‌دست آمده رقم نیک‌نژاد نسبت به رقم پیشتاز از لحاظ صفات فیزیولوژیک تحت تنش خشکی در وضعیت

¹ Soluble NSF-attachment protein

منابع

- AL-Hakimi A, Monneveux P, Galiba G (1995) Soluble sugar, proline, and relative water content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *T. Polonicum* into *T. durum*. Journal of Genetics and Breeding 49:239-243.
- Albertin W, Langella O, Joets J, Negroni L, Zivy M, Damerval C, Thiellement H (2009) Comparative proteomics of leaf, stem, and root tissues of synthetic *Brassica napus*. Proteomics 9:793-799.
- Ali GM, Komatsu S (2006) Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. Journal of Proteome Research 5:396-403.
- 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.
- Aragi GS, Assad MT (1998) Evaluation of four screening techniques for drought resistance and their relationship to yield reduction ratio in wheat. Euphytica 103:293-299.
- Araus JL, Ceccarelli S, Grando S (1997) Relationship between leaf structure and carbon isotope discrimination in field-grown barley. Plant Physiology and Biochemistry 35:533-541.
- Arias D (2007) Calibration of LAI-2000 to Estimate Leaf Area Index and Assessment of its Relationship with stand

- productivity in six Native and Introduced tree Species in costarica. Forest Ecology and Management 247:85-193
- 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
- Bates IS, Waldern RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline water stress studies. Plant and Soil 39:205-207.
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrient and Soil Science 168:521-530.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Science 177:570-576.
- Clark JM, Mc Caig IN (1993) Breeding for efficient root system. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romago L (Eds). Plant breeding principles and prospects. London: Champan and Hall 256-280.
- 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 rotein. Electrophoresis 7:52-54.
- Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, Simova-Stoilova L, Stamenova M, Feller U (2009) Drought stress effects on

- rubisco in wheat: Changes in the rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum* 31:1129-1138.
- Dhindsa RS (1991) Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiology* 95:648-651.
- Ding Y, Ma QH (2004) Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie* 86:509-518.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: 1-10
- Dwyer LM, Stewart DW, Tollenaar M (1992) Analysis of maize leaf photosynthesis under drought stress. *Canadian Journal of Plant Science* 12:477-481.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5:193-198.
- Ford KL, Cassin A, Bacic A (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Plant Science* 2:1-11.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Granlund I, Storm P, Schubert M, Garcia-Cerdi JG, Funk C, Wolfgang PS (2009) The TL29 Protein is Lumen Located, Associated with PSII and Not an Ascorbate Peroxidase. *Plant, Cell Physiology* 50:1898-1910.
- 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.
- Guo F, Mccubbin AG (2012) The pollen-specific R-SNARE/longin PiVAMP726 mediates fusion of endo- and exocytic compartments in pollen tube tip growth. *Journal of Experimental Botany* 63:3083-3095.
- Hajheidari M, Eivazi A, Buchanan BB, Wong JH, Majidi I, Salekdeh GH (2007) Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research* 6:1451-1460.
- 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.
- Heide H, Kalisz HM, Follmann H (2004) The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology* 161:139-149.
- Hosseini Salekdeh Gh, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2:1131-1145.
- Ifuku K, Ishihara S, Shimamoto R, Ido K, Sato F (2008) Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants. *Photosynthesis Research* 98:427-437.
- Ji K, Wang Y, Sun W, Lou Q, Mei H, Shen S, Chen H (2012) Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology* 169:336-344.
- Kaiser H, Kappen L (1997) In situ observations of stomatal movements in different light- dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments. *Journal of Experimental Botany* 48:583-1589.
- 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.
- Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, Naidu KR, Rao SS, Reddy K, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current of Science* 88:424-438.
- Komatsu S, Tanaka N (2004) Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. *Proteomics* 4:938-949.
- Kramer PJ (1969) Plant and soil water relationships. Modern synthesis. Mc Graw-Hill Book co, New York.
- Kumar A, Singh P, Singh DP, Singh H, Sharma HC (1984) Difference in osmoregulation in *Brassica* species. *Annals of Botany* 54:537-541.
- Lepedu H, Toma A, Juri SA, Katani Z, Cesar V, Fulgosi H (2009) Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana*. *Food Technology and Biotechnology* 47:275-280.
- Lu Z, Neumann PM (1999) Low cell-wall extensibility can limit maximum leaf growth rates in rice. *Crop Science* 39: 126-130.
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:127-158.
- 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.
- Merano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plant in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89:895-905.
- Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalík M (2002) Malate dehydrogenases-structure and function. *General Physiology and Biophysics* 21:257-265.
- Monneveux P, Belhassen, E (1996) The diversity of drought adaptation in wide. *Plant Growth Regulation* 20:85-92.
- Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin G (2004) Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 169:25-33.
- Naghavi MR (2010). Response and 2-Dimensional electrophoresis pattern of spring rapeseed genotypes under

- osmotic stress. M.Sc. Dissertation, University of Tabriz, Iran (In Farsi).
- Naghavi MR (2014). Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. PhD Thesis, University of Tabriz, Iran (In Farsi).
- Nozu Y, Tsugita A, Kamijo K (2006) Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. *Proteomics* 6:3665-3670.
- Paleg LG, Aspinall D (1989) The physiology and biochemistry of drought resistance in plant (chapter 1 and 2) Academic press sydng 1-24.
- Peter F, Wong SH, Subramaniam VN, Tang BL, Hong W (1998) a-SNAP but not c-SNAP is required for ER-Golgi transport after vesicle budding and the Rab1-requiring step but before the EGTA-sensitive step. *Journal of Cell Science* 111:2625-2633.
- Petrov VD, Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide- a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* 2012:pls014.
- Plucken H, Muller B, Grohmann D, Westhoff P, Eichacker LA (2002) The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 532:85-90.
- Porubleva L, Vander L, Velden K, Kothari S, Oliver DJ, Chitnis PR (2001) The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22:1724-1738.
- Reynolds MP, Skovmand B, Trethowan RM, Singh RP, van-Ginkel M (2000) Applying physiological strategies to wheat breeding. Anonymous: Research Highlights of the CIMMYT Wheat Program. 1999-2000. Mexico, D.F. CIMMYT. 49-56.
- Santos C, Pereira A, Pereira S, Teixeira J (2004) Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 103: 101-111.
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488-1493.
- Schonfeld MA, Johnson RC, Carver BF, Mornhinweg DW (1988) Water relation in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science* 28:526-531.
- Srinivas V, Bala Subramanian D (1995) Proline is a protein compatible hydrotrope. *Langmuir* 11: 2830-2833.
- Stenbeck G (1998) Soluble NSF-attachment proteins. *International Journal of Biochemical and Cell Biology* 30:573-577.
- Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Current Opinion Structural Biology* 10:672-679.
- Sun Y, Ahokas RA, Bhattacharya SK, Gerling IC, Carbone LD, Weber KT (2006) Oxidative stress in aldosteronism. *Cardiovascular Research* 71:300-309.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photo inhibition? *Trends Plant Science* 13:178-182.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll S, Lawlor D (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401:914-917.
- Thiellement H, Zivy M, Plomion C (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *Chromatography B* 782:137-149.
- Toorchi M, Yukawa K, Nouri MZ, Komatsu S (2009) Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybeans roots. *Peptides*, 30:2108-2117.
- Twyman RM (2004) Principles of proteomics. BIOS Scientific Publishers.
- Valeri HR, Sulpice R, Lefort C, Maerskack V, Emery N, Larher FR (2002) The suppression of osmoinduced praline response of *Brassica napus* L. var *olefera* leaf discs by poly unsaturated fatty acids and methyl-jasmonate. *Plant Science* 164:119-127.
- Vendruscolo ACG, Schuster I, Pleggi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marar CJ, Vieria GC (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164:1367-376.
- Von Ballmoos C, Dimroth P (2007) Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* 46:11800-11809.
- 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.
- Wang W, Vinocur B, Soseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9:244-52.
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Yadav SK, Singla-Pareek SL, Ray M, Reddy MK, Sopory SK (2005) Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysics Research Communication* 337:61-67.
- 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.
- Zang X, Komatsu S (2007) A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry* 68:426-437.