بررسی اثر تنش شوری بر روی الگوی پروتئوم برگ در گندم *Triticum boeoticum*

Investigation of Salinity Effect on Leaf Proteome Pattern of *Triticum boeoticum*

نجمه السادات علوی[۱]، محمود ملکی[۲*]، شهرام پورسیدی[۳]، مهدی رحیمی[۴]، امین باقی‌زاده[۵]، علی ریاحی مدوار[۶] و عبدالرحمان رسولنیا[۷]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۱۴

چکیده

گیاهان وحشی خویشاوند گیاهان زراعی منابع مهمی برای یافتن ژن‌های اعطاءکننده تحمل به تنش شوری هستند. در این مطالعه ده توده مختلف گندم بوئتیکوم در گلخانه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت گردیدند. در مرحله سه برگی تنش شوری در دو سطح صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار اعمال و بعد از ۱۵ روز نمونه‌برداری از پهنک جوانترین برگ توسعه‌یافته انجام گرفت. یون‌های سدیم و پتاسیم در هر نمونه اندازه‌گیری و سپس متحمل‌ترین جمعیت براساس غلظت یون سدیم و صفت K^+/Na^+ مشخص شد. نمونه حاصل از گندم متحمل برای انجام الکتروفورز دوبعدی مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین‌ها پس از استخراج ابتدا با استفاده از نوارهای IPG با pH ۳-۱۰ براساس نقطه ایزوالکتریک و سپس در بعد دوم با استفاده از SDS-PAGE براساس وزن مولکولی جداسازی گردیدند. نتایج نشان داد که دو توده C11 و C7 جمع‌آوری شده از مناطق سقز و کامیاران متحمل‌ترین و دو توده B2 و C1 جمع‌آوری شده از مناطق هرسین و سنندج حساس‌ترین بودند. براساس صفات فیزیولوژیک نمونه C11 برای انجام پروتئومیکس انتخاب گردید. نتایج نشان داد که تعداد ۱۷۷ لکه تکرارپذیر در ژل‌ها شناسایی و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. از این تعداد ۱۳ لکه تحت شرایط تنش شوری تغییر بیان نشان دادند که از بین آنها ۸ لکه (۶۱/۵٪) افزایش بیان و ۵ لکه (۳۸/۵٪) کاهش بیان نشان دادند. این بدان معنی است که C11 با تغییرات در بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده سعی در مقابله با تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولاری و تحمل آن را داشته است.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، *Triticum boeoticum*، پروتئومیکس

۱، ۲، ۴ و ۵. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، استادیاران و دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

۳. دانشیار اصلاح نباتات، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان

۶. استادیار بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

۷. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

*: نویسنده مسوول Email: Maleki.li@gmail.com

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که می‌تواند عملکرد گیاهان زراعی را به میزان زیادی کاهش دهد *تستر و داونپورت* (Tester and Davenport, 2003). تنش شوری اثرات مخرب جهانی دارد و پیش‌بینی شده است که افزایش شوری زمین‌های مزروعی تا سال ۲۰۵۰، باعث می‌شود تا ۵۰ درصد از زمین‌های کشاورزی بدون استفاده شوند *وانگ* و همکاران (Wang *et al*., 2003).

گندم یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی جهان است. شوری یک عامل محدودکننده‌ی مهم تولید گندم در کشاورزی دیم و آبی در سراسر جهان محسوب می‌شود *عسکری* و همکاران (Askari *et al*., 2006). پاسخ گیاهان به تنش شوری در مرحله اول به‌واسطه‌ی تنش اسمزی و در مرحله دوم بعد از تجمع بالای نمک در برگ‌ها اتفاق می‌افتد *مونز* (Munns, 1993). در واقع شوری بالا باعث کمبود آب، سمیت یونی و کمبود مواد غذایی در گیاه می‌شود که می‌تواند منجر به تخریب مولکولی، توقف رشد و حتی مرگ گیاه گردد (*عسکری* و همکاران، 2006).

گیاهان سعی می‌کنند با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی، به‌واسطه‌ی تغییر در بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های ویژه‌ای را کد می‌کنند، در برابر تنش مقاومت نشان دهند *بونهرت* و همکاران (Bohnert *et al*., 1995). تحمل به تنش شوری نیز با تغییر در سطح پروتئین‌ها همراه است. تنش شوری باعث کاهش یا افزایش بیان پروتئین‌ها می‌شود و یا به‌طور کامل باعث ناپدید شدن و یا ظاهر شدن برخی از پروتئین‌ها می‌شود *ییلدیز* (Yildiz, 2007).

گائو و همکاران (Gao *et al*., 2011) با بررسی پروفایل پروتئینی گندم نان تحت سطوح مختلف تنش شوری، ۵۲ لکه پاسخ‌دهنده به تنش شوری را شناسایی کردند که از بین آنها ۲۶ لکه (۵۰ درصد) افزایش بیان و ۲۱ لکه (۴۰ درصد) کاهش بیان نشان دادند و ۵ لکه (۱۰ درصد) هم روند مشخصی نداشتند. *کارسو* و همکاران (Caruso *et al*., 2008) تغییرات پروتئوم گندم دروم را تحت شرایط تنش شوری بررسی کردند و در نهایت ۳۶ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش شوری را شناسایی کردند که از بین آنها ۲۴ لکه (۶۶/۷ درصد) کاهش بیان نشان دادند و ۱۲ لکه (۳۳/۳ درصد) افزایش بیان نشان دادند. *کاپریوتی* و همکاران (Capriotti *et al*., 2014) یک رقم متحمل گندم دوروم را تحت تأثیر تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار قرار دادند و مشاهده کردند که ۴۱ لکه افزایش بیان و ۴۲ لکه کاهش بیان نشان داده‌اند.

تکنیک‌های پروتئومیکس روش‌های نیرومندی برای شناسایی پروتئین‌های مرتبط با یک سیگنال محیطی یا نموی ویژه را ارائه می‌کنند. مطالعات نشان دادند که به علت تغییرات پس از ترجمه‌ای، فراوانی پروتئین‌ها همیشه با سطوح mRNA همبستگی ندارند جیجی و همکاران (Gygi *et al*., 1999). بنابراین تنها مطالعه‌ی خود پروتئین‌ها می‌تواند اطلاعاتی در مورد مقادیر واقعی و فعالیتشان را فراهم نماید *زیزی و دوینی* (Zivy and de Vienne, 2000).

کشاورزی در خاک‌های شور نیازمند افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری است. خویشاوندان وحشی گندم ممکن است منابع متحمل به شوری مناسبی برای اصلاح گندم باشند *کورین* و همکاران (Churin *et al*., 1999). درک مکانیسم‌هایی که گیاهان به هنگام مواجهه با تنش به‌کار می‌برند، کمک شایان توجهی به محققین به‌نژادگران گیاهی خواهد کرد.

همچنین به خاطر طبیعت پیچیده تحمل به تنش شوری در آزمایشات تنش شوری طولانی‌مدت، معیارهای انتخاب مبتنی بر صفت برای غربال کردن توصیه شده‌اند *فلاورز و یئو*؛ *یائو* و همکاران؛ *گارسیا* و همکاران (Flowers and Yeo, 1986; Yeo *et al*., 1999; Garcia *et al*., 1995). از مهم‌ترین صفات بکار رفته برای غربال ژرم‌پلاسم برای تحمل به تنش شوری صفت دفع یون سدیم و صفت نسبت K^+/Na^+ است *چیپا و لال*؛ *اش* و همکاران؛ *مونز و جیمز* (Chhipa and Lal 1995; Asch *et al*., 2000; Munns and James, 2003). تفاوت ژنتیکی در صفت دفع یون سدیم همبستگی بالایی با تفاوت‌ها در تحمل به تنش شوری در گندم‌های نان و دوروم دارد *گورهام* و همکاران؛ *متیوس و امان* (Gorham *et al*., 1987; Maathuis and Amtmann, 1999). همچنین حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ سیتوسولی ویژگی مهمی از تحمل به تنش شوری در گیاهان زراعی است و در سراسر زندگی گیاه ضروری است *شابالا و کوین* (Shabala and Cuin, 2008) زیرا بیش از ۵۰ آنزیم به‌وسیله K^+ فعال می‌شوند و غلظت بالای K^+ برای سنتز پروتئین نیز ضروری است. برخی شباهت‌های فیزیکوشیمیایی بین K^+ و Na^+ وجود دارد، به همین خاطر Na^+ می‌تواند با K^+ برای جایگاه‌های اتصال اصلی در فرآیندهای متابولیکی کلیدی در سیتوپلاسم از قبیل برهمکنش‌های آنزیمی، سنتز پروتئین و کارکردهای ریبوزومی رقابت کند *مارخنر*؛ *باندال و مالیک* (Marschner, 1995; Bhandal and Malik, 1988) به‌خاطر اینکه Na^+ نمی‌تواند نقش K^+ را بازی کند، این امر می‌تواند باعث تخریب فرآیندهای آنزیمی متعدد و نیز سنتز پروتئین در غلظت‌ای بالا شود (*مارخنر*، 1995؛ *چیپا و لال*، 1995).

در این مطالعه هم تغییرات پروتئوم برگ گندم دیپلوئید *Triticum boeoticum* غربال شده توسط صفات دفع یون سدیم و نیز نسبت K^+/Na^+، تحت شرایط تنش شوری طولانی‌مدت توسط تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

در این تحقیق ۱۰ جمعیت مختلف از گندم وحشی *T. boeoticum* که از مناطق مختلف غرب و شمال‌غرب ایران جمع‌آوری شده بودند به‌عنوان ماده‌ی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). بذور نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی پرلیت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در گلخانه دانشگاه تحصیلات تکمیلی و صنعتی و فناوری پیشرفته در یک آزمایش فاکتوریل (که فاکتور اول ارقام در ده سطح و فاکتور دوم تنش شوری در دو سطح صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار است) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تکرار کشت شدند. بعد از ظهور گیاهچه آبیاری با استفاده از محلول غذایی هوگلند انجام شد و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحله ۳ برگی ادامه یافت. برای اعمال تنش از سطوح صفر (به‌عنوان شاهد) و ۱۵۰ میلی‌مولار (تیمار شوری) استفاده گردید. تنش شوری ۱۵ روز اعمال گردید و در پایان آن نمونه‌برداری از پهنک جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه یافته انجام گرفت. یک‌سری از نمونه‌ها برای اندازه‌گیری میزان یون‌های سدیم و پتاسیم به‌کار رفتند و یکسری هم برای استخراج پروتئین در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱: توده‌های گندم دیپلوئید مورد استفاده در این تحقیق

Table 1: *T. boeoticum* populations studied in this research

ردیف Row	کد Code	محل جمع‌آوری Collection site
1	A7	لرستان-رازان Lorestan- Razan
2	A11	لرستان-سفید دشت Lorestan- Sefid Dasht
3	B1	کرمانشاه-ده سفید Kermanshah- Deh Sefid
4	B2	کرمانشاه-هرسین Kermanshah- Harsin
5	C1	کردستان-سنندج Kordestan- Sanandaj
6	C3	کردستان-موچش Kordestan- Mochesh
7	C7	کردستان-کامیاران Kordestan- Kamiaran
8	C11	کردستان-سقز Kordestan- Saghez
9	D2	آذربایجان شرقی-اهر East Azarbaiejan- Ahar
10	E1	اردبیل-اردبیل Ardabil- Ardabil

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد

* Significant differences at 5% probability level

اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم

نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲°C خشک شدند. به‌منظور اندازه‌گیری یون‌های سدیم و پتاسیم از روش جذب اتمی استفاده شد. برای این منظور یک گرم از بافت گیاهی خشک را در ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ (۹۶ درصد) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا نمونه گیاهی به خوبی در اسید حل شود. سپس حجم محلول را به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و از کاغذ صافی عبور داده شدند. از محلول به‌دست آمده جهت

اندازه‌گیری در دستگاه جذب اتمی Varian مدل Spectra aa220 ساخت کشور استرالیا استفاده شد *برینی* و همکاران (Brini *et al*., 2007).

استخراج پروتئین‌ها

استخراج پروتئین از بافت برگی براساس روش *دامروال* و همکاران (Damerval *et al*., 1986) با اندکی تغییرات انجام گرفت که در مقاله پیشین به‌طور مفصل شرح داده شده است *ملکی* و همکاران (Maleki *et al*., 2014).

جدول ۲: تجزیه واریانس توده‌های گندم بوئتیکوم برای صفات مورد مطالعه

Table 2: The variance analysis of *T. boeoticum* populations for studied traits

		میانگین مربعات Mean Square	
منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of freedom	Na^+ trait	K^+/Na^+ trait
جمعیت‌ها Populations	9	9961.84**	205.87**
سطوح شوری Salinity levels	1	28754.14**	580.15**
سطوح شوری × جمعیت‌ها Salinity levels × Populations	9	3196.3**	53.95*
خطا Error	20	637.83	21.36

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

** Significant differences at 1% probability level

تعیین غلظت پروتئین‌ها

برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش *برادفورد* (Bradford, 1976) استفاده شد.

الکتروفورز

بعد اول

الکتروفورز دو بعدی براساس روش *گورگ* و همکاران (Gorg *et al*., 2000) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل، ابتدا پروتئین‌ها در استوک Rehydration حل شدند. نوارهای IPG در دمای اتاق و به‌مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در ۳۲۰ میکرولیتر از محلول Rehydration (8M Urea; 2% CHAPS; 0.002% Bromophenol Blue; 2% IPG Buffer; 0.018M DTT) که حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم پروتئین است قرار گرفتند. پس از تکمیل این مرحله، الکتروفورز بعد اول با استفاده از دستگاه IPGphore III ساخت شرکت GE Healthcare انجام گرفت.

بعد دوم

برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت بیورد استفاده شد. در بعد دوم از ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد استفاده گردید. پس از آماده شدن ژل بعد دوم، نوار ژل بعد اول به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول Equilibration (50mM Tris-HCl, pH= 8.8; 6M Urea; 2% SDS; 30% Glycerol; 1% DTT; 0.002% Bromophenol Blue) شناور گردید. سپس بعد از انجام بعد دوم، مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتکل *بلوم* و همکاران (Blum *et al*., 1987) انجام گرفت.

تصویربرداری و آنالیز ژل‌ها

پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS-800 ساخت شرکت بیورد اسکن شده و به فرمت خام ژل‌های دو بعدی (RAW2D) ذخیره شدند و در نهایت به‌وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت تیف درآورده شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار Melanie 7 استفاده شد *اپل* و همکاران (Appel *et al*., 1997). بدین ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس ژل‌های مختلف را با هم جفت نموده و مورد آنالیز آماری قرار داده شدند. بدین ترتیب که پس از شناسایی نمودن لکه‌ها بر روی ژل‌ها و سپس ویرایش دستی نقاط به‌وسیله نرم‌افزار لکه‌ها به‌طور اتوماتیک در ژل‌های مختلف با هم جفت شدند. پس از جفت نمودن لکه‌ها، به‌طور دستی لکه‌ها بررسی شدند تا از صحت عمل نرم‌افزار در جفت نمودن لکه‌ها اطمینان حاصل شود. لکه‌هایی که درصد حجمی

آنها بین دو تیمار اختلاف معنی‌دار داشتند به‌عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

نتایج و بحث

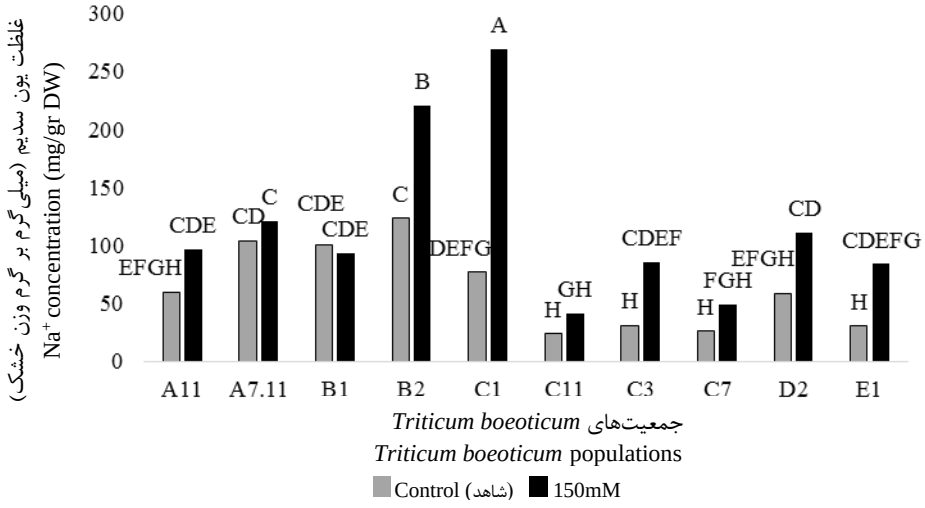
ارزیابی تحمل به تنش شوری توده‌های مختلف گندم بوئتیکوم به تنش شوری

در این تحقیق توده‌های مختلف از گندم‌های دیپلوئید *T. boeoticum* که از مناطق مختلفی جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱)، در شرایط گلخانه‌ای و در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ تکرار کشت شدند. تنش شوری در دو سطح صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار در مرحله سه برگی و به‌مدت ۱۵ روز اعمال گردید.

در این تحقیق میزان یون سدیم و پتاسیم موجود در پهنک برگ توده‌های مختلف گندم بوئتیکوم، در شرایط نرمال و تنش شوری با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شدند و سپس مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. نتایج تجریه واریانس گندم‌های بوئتیکوم برای صفت تجمع میزان یون سدیم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بین توده‌های گندم بوئتیکوم و سطوح شوری وجود داشته و نیز اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح شوری در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۲). این نتایج نشان‌دهنده این است که هم در بین توده‌های مورد مطالعه تنوع از نظر جذب و نگهداری یون‌های سدیم در پهنک برگ وجود دارد و هم اینکه تیمار شوری باعث تجمع معنی‌دار یون‌های سدیم در پهنک برگ گردیده است و نیز روند واکنش ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف شوری (صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار) یکسان نیست.

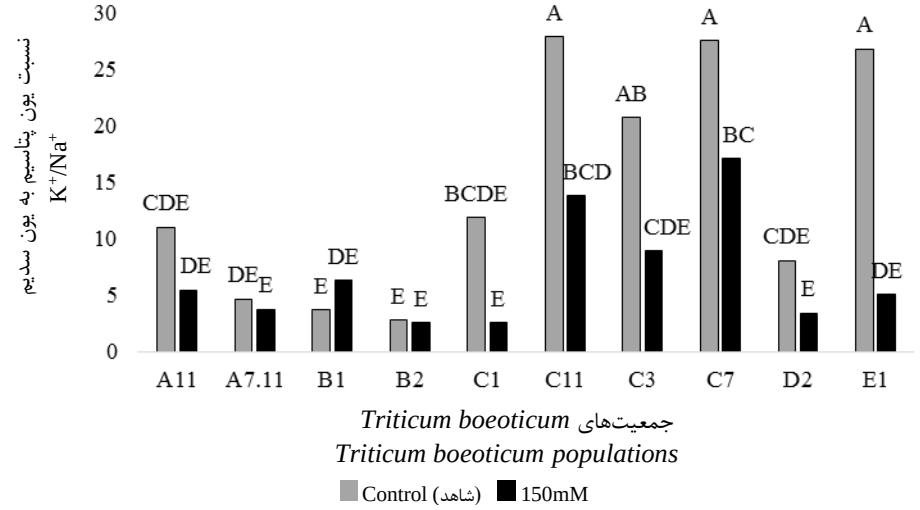
نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل بین ژنوتیپ و شوری برای تجمع یون سدیم در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به این شکل بعضی از ژنوتیپ‌ها برای دو صفت مورد بررسی بیشتر تحت تأثیر شرایط (وجود شوری و عدم وجود شوری) قرار گرفته‌اند. دو توده B2 و سپس توده C1 که به‌ترتیب از مناطق هرسین و سنندج جمع‌آوری شده بودند، بیشترین میزان تجمع یون سدیم را در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال در پهنک برگ خود نشان دادند که این به معنی حساس بودن این ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش شوری است (شکل ۱). اما در مقابل توده C11 و سپس C7 که به‌ترتیب از مناطق سقز و کامیاران جمع‌آوری شده بودند کمترین میزان تجمع یون سدیم را نسبت به شاهد در پهنک برگ خود داشتند و این به معنای متحمل‌تر بودن این توده‌ها نسبت به تنش شوری است (شکل ۱).

همان‌طورکه در بالا ذکر شد در این تحقیق میزان یون سدیم و پتاسیم موجود در پهنک برگ و در شرایط نرمال و تنش شوری توده‌های مختلف گندم بوئتیکوم با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. سپس با تقسیم مقدار یون پتاسیم اندازه‌گیری شده بر میزان یون سدیم اندازه‌گیری شده نسبت K^+/Na^+ به‌دست آمد. طبق مطالعات متعددی که روی تنش شوری و اثر آن بر گیاهان مختلف انجام گرفته است مشخص شده است که نسبت فوق می‌تواند بیانگر متحمل بودن و یا حساس بودن گیاهان نسبت به تنش شوری باشد. در واقع هر چه مقدار این صفت در گیاهی تحت تنش شوری بیشتر باشد آن گیاه متحمل‌تر خواهد بود و هرچه این مقدار کمتر باشد نشان‌دهنده حساس‌تر بودن آن رقم خواهد بود. داده‌های به‌دست آمده به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. نتایج تجریه واریانس گندم‌های بوئتیکوم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بین توده‌های گندم بوئتیکوم و همچنین سطوح شوری وجود دارد، اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح شوری هم معنی‌دار گردید (جدول ۲). این نتایج نشان‌دهنده این است که در بین توده‌های مورد مطالعه تنوع، از نظر صفت K^+/Na^+ در پهنک برگ وجود دارد و مشابه با صفت قبل واکنش ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف شوری نیز متفاوت است.



شکل ۱: مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ در سطوح شوری برای صفت Na^+ در توده‌های گندم بوئتیکوم

Fig. 1: Mean comparison of cultivar × salt levels for Na^+ trait in *T. boeoticum* populations



شکل ۲: مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ در سطوح شوری برای صفت K^+/Na^+ در توده‌های گندم بوئتیکوم

Fig. 2: Mean comparison of cultivar × salt levels for K^+/Na^+ trait in *T. boeoticum* populations

مقایسه میانگین اثرات متقابل بین ژنوتیپ و شوری برای صفت نسبت یون پتاسیم به سدیم در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به این شکل با اینکه این صفت در دو ژنوتیپ C11 و C7 که به ترتیب از مناطق سقز و کامیاران جمع‌آوری شده بودند در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال کمتر بوده است، با این‌حال مقدار این صفت در این دو ژنوتیپ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش با اختلاف معنی‌داری بالا است که این به معنی توانایی بالای این توده‌ها در جذب کمتر یون سدیم و جذب بیشتر یون پتاسیم در پهنک برگ است و به عبارتی دیگر این ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش شوری متحمل‌تر هستند (شکل ۲). در مقابل برخی از ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش نسبت به شاهد چندان تغییری نکرده اند اما مقدار آن نسبت به دو ژنوتیپ C11 و C7 به مراتب پایین تر است. به‌عنوان مثال با اینکه مقدار صفت K^+/Na^+ در ژنوتیپ B2 که از منطقه هرسین جمع‌آوری شده، در شرایط تنش نسبت به شرایط شاهد تغییر معنی‌داری نکرده است اما مقدار آن نسبت به C7 و C11 به‌مراتب پایین‌تر است. ژنوتیپ B2 به همراه C1 (که از منطقه سنندج جمع‌آوری شده است) از نظر این صفت حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها محسوب می‌شوند.

شوری مشکلات متعددی به‌دلیل القای عملکردهای ناقص فیزیولوژیکی رشد و نمو را در گیاهان به‌دنبال دارد. گونه‌ها و واریته‌ها از لحاظ توانایی مقاومت در برابر شوری خیلی متنوع هستند. مقاومت به نمک حتی در گونه‌های یک جنس متغیر است *نوبل و روگرز* (Noble and Rogers, 1992). منابع ژرم-پلاسم با ارزشی در گونه‌های گیاهی وحشی وجود دارند و بهره برداری از آنها در اصلاح، کمیت و کیفیت گونه‌های زراعی را تداوم خواهد بخشید *وینز* (Waines, 1983). نژادهای بومی و خویشاوندان وحشی یک منبع ماده خام ضروری برای نگهداری

تنوع ژنتیکی برای پیشبرد برنامه‌های علمی در کشاورزی و یا برای حل مشکلات منابع ژنتیکی گیاهی در دسترس هستند *اشرف و هریس* (Ashraf and Haris, 2004). در این مطالعه، ۱۰ جمعیت مختلف از گندم دیپلوئید *T. boeoticum* که ژنوم آن بسیار مشابه با ژنوم AA گندم زراعی است برای ارزیابی آنها از نظر تحمل به تنش شوری انتخاب گردیدند. مطالعات مختلف اهمیت صفت دفع یون سدیم را در ارزیابی ارقام گندم از نظر تحمل به تنش شوری را نشان داده‌اند (*گورهام* و همکاران، 1987؛ *متیوس و امان*، 1999). به‌عنوان مثال *مونز* و همکاران (Munns *et al*., 2003) نشان دادند که میزان یون سدیم پایین در پهنک برگ همبستگی بالایی با تحمل به تنش شوری دارد. در این مطالعه هم تنوع در صفت دفع یون سدیم از برگ‌ها در جمعیت‌های مختلف گندم دیپلوئید *Triticum boeoticum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده این بود که این صفت توانایی شناسایی گیاهان متحمل به تنش شوری از حساس به تنش دارد و دو توده C11 و C7 به‌عنوان توده‌های متحمل به تنش شوری شناسایی شدند.

همچنین رابطه بین تحمل به تنش شوری و نسبت K^+/Na^+ نیز مورد توجه خیلی از محققین قرار گرفته است، زیرا نسبت K^+/Na^+ به‌جای یون سدیم به تنهایی به‌عنوان شاخصی از تحمل به تنش شوری برای مقایسه ارقام در گندم *گورهام* و همکاران، 1987؛ *فرانکویز* و همکاران (Francois *et al*., 1986) و برنج (*اش* و همکاران، 2000) به‌کار رفته است. در این مطالعه هم تنوع در صفت نسبت K^+/Na^+ برگ‌ها در جمعیت‌های مختلف گندم دیپلوئید *Triticum boeoticum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده این بود که این صفت نیز توانایی شناسایی گیاهان متحمل به تنش شوری از حساس به تنش دارد و دو توده C11 و C7 نیز به‌عنوان توده‌های متحمل به تنش شوری شناسایی شدند و براساس نتایج حاصل از این قسمت از بین دو توده متحمل C11 و C7، توده C11 برای مرحله بعدی انتخاب گردید.

پروتئومیکس

بعد از تهیه تصاویر با استفاده از دنسیتومتر GS-800، لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش شوری موجود در ژل‌ها توسط نرم‌افزار Melanie 7 تشخیص داده شدند. پس از تجزیه ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره در جمعیت C11 از گندم تریتیکوم بوئتیکوم بیش از ۲۵۰ لکه پروتئینی تشخیص داده شدند که از بین آنها تعداد ۱۷۷ لکه پروتئینی به‌طور تکرارپذیر در ژل‌ها شناسایی و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. به‌منظور بررسی تغییرات کمّی بیان پروتئین‌ها از مقدار درصد حجمی هر لکه به‌عنوان یک مقدار نرمالیزه شده استفاده شد. داده‌های حاصل سپس با استفاده از آزمون تی استیودنت مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در این جمعیت تحت تنش شوری ۱۳ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به شوری شناسایی شدند، که از بین آنها ۸ لکه پروتئینی افزایش بیان و ۵ لکه کاهش بیان نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۳). موقعیت تعدادی از این پروتئین‌ها در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

تمامی لکه‌های مشاهده شده و تکرارپذیر در محدوده pH ۳/۵ تا ۸/۵ قرار گرفتند (جدول ۴). تعداد لکه‌های پروتئینی بین pHهای ۳-۶، ۶-۷، ۷-۸/۵ و ۸/۵-۱۰ به‌ترتیب ۱۰۶، ۴۲، ۲۸ و صفر لکه مشاهده شدند (جدول ۴). بیشترین میزان افزایش بیان مربوط به لکه شماره ۱۰ (با match ID مساوی با ۱۳۴) است که تحت شرایط تنش شوری افزایشی معادل ۲/۴۶ برابری نسبت به شرایط نرمال داشته است و کمترین افزایش بیان نیز مربوط به لکه شماره ۱۳ (با match ID مساوی با ۱۷۶) است که تحت شرایط تنش شوری افزایشی معادل ۱/۴ برابری نسبت به شرایط نرمال داشته است (جدول ۵). اما کمترین میزان کاهش بیان مربوط به لکه شماره ۸ (با match ID مساوی با ۱۱۸) است که تحت شرایط تنش شوری کاهشی معادل ۳/۲ برابری نسبت به شرایط نرمال داشته است و کمترین کاهش بیان نیز مربوط به لکه شماره ۵ (با match ID مساوی با ۴۶) است که تحت شرایط تنش شوری کاهشی معادل ۱/۴ برابری نسبت به شرایط نرمال داشته است (جدول ۵).

جدول ۳: لکه‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری

Table 3: Responsive spots to the salt stress

ژنوتیپ Genotype	تعداد کل لکه‌های پروتئینی Total protein spots	تعداد کل لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده Total responsive protein spots	لکه‌های پروتئینی افزایش بیان یافته Upregulated protein spots	لکه‌های پروتئینی کاهش بیان یافته Downregulated protein spots
C11	177	13	8	5

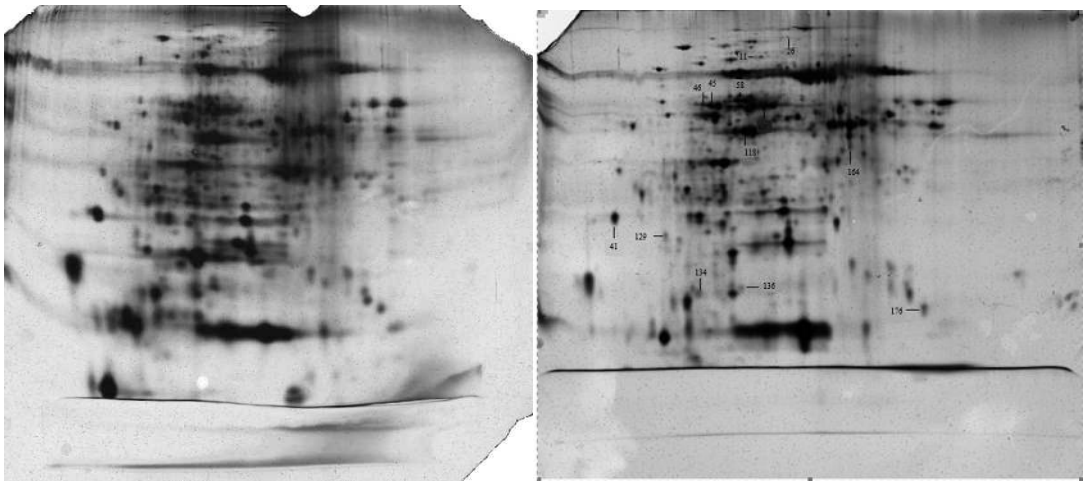
** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

** Significant differences at 1% probability level

جدول ۴: تعداد لکه‌های مشاهده شده بین pIهای مختلف

Table 4: Observed spots between different pIs

تعداد کل لکه‌ها در بین نقطه ایزوالکتریک ۳-۱۰ Totall number of spots between pI 3-10	تعداد و درصد لکه‌ها در بین نقطه ایزوالکتریک ۳-۶ Number and percent of spots between pI 3-6	تعداد و درصد لکه‌ها در بین نقطه ایزوالکتریک ۶-۷ Number and percent of spots between pI 6-7	تعداد و درصد لکه‌ها در بین نقطه ایزوالکتریک ۷-۸/۵ Number and percent of spots between pI 7-8.5	تعداد و درصد لکه‌ها در بین نقطه ایزوالکتریک ۸/۵-۱۰ Number and percent of spots between pI 8.5-10
177	106/59.88%	42/23.72%	28/15.82%	0/0%



شکل ۳: الگوی حاصل از الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های استخراج شده از تیمارهای شوری (سمت راست) و شاهد (سمت چپ). لکه‌های پاسخ‌دهنده بر روی ژل سمت چپ با شماره مشخص شده‌اند

Fig. 3: 2DE patterns of proteins extracted from salt (right) and control (left) treatments. Responsive spots are labled by numbers on the left gel

جدول ۵: تعداد کل لکه‌ها و وضعیت تغییر بیانشان در طی تنش شوری

Table 5: The number of spots and situation of their expression changes during salt stress

ردیف Row	شماره هر لکه Match ID	تغییرات بیانی Expression changes	شاهد Control	تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار 150mM treatment	تی استیودنت Student T	میزان بیان Expression value
1	11	+	0.036388	0.053521	4.49*	1.47
2	26	+	0.019249	0.04634	10.95**	2.41
3	41	+	0.612637	1.48993	13.44**	2.43
4	45	-	0.483595	0.232995	4.59*	0.482
5	46	-	0.188497	0.134073	5.25*	0.71
6	58	+	0.151197	0.220589	4.41*	1.46
7	67	-	0.431482	0.257102	8.34*	0.59
8	118	-	0.471488	0.147083	4.61*	0.311
9	129	+	0.185622	0.318732	7.10*	1.717
10	134	+	0.234624	0.579391	5.22*	2.46
11	136	+	0.278422	0.534133	6.41*	1.91
12	164	-	0.090381	0.054135	11.79**	0.59
13	176	+	0.280343	0.390452	9.12*	1.4

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد

* Significant differences at 5% probability level

نکته جالب این است که که بین pH ۴-۳ تنها ۲ لکه قرار گرفته‌اند و بین pH۱۰-۸ هم تنها ۸ لکه قرار گرفته بودند. از طرفی به دلیل تعداد خیلی زیاد لکه‌های پروتئینی ممکن است برخی از لکه‌ها در نزدیکی یکدیگر قرار گرفته و با هم هم‌پوشانی داشته باشند. به همین دلیل نیاز است که زووم بیشتری بر روی ژل صورت گیرد تا لکه‌های هم‌پوشان از همدیگر تفکیک بیشتری پیدا کنند. همان‌طورکه در بالا توضیح داده شد است بین pH ۴-۳ و نیز ۱۰-۸ حداکثر ۱۰ لکه از ۱۷۷ لکه تکرارپذیر یعنی حدود ۵/۶ درصد قرار گرفته‌اند. پس این مقدار می‌تواند قابل چشم‌پوشی باشد و در عوض می‌توان زووم بیشتری به داخل ژل پیدا کرد این بدان معنی است که به‌جای استفاده از نوار IPG با pH ۱۰-۳ می‌توان از نوار IPG با

pH ۸-۴ استفاده کرد که با این عمل لکه‌های هم‌پوشان تفکیک بهتری خواهند داشت و آنالیز ژل‌ها هم راحت‌تر خواهد بود. اما از بین ۱۷۷ لکه تکرارپذیر، ۱۳ لکه تحت شرایط تنش شوری تغییر بیان نشان دادند که از بین آنها ۸ لکه (۶۱/۵٪) افزایش بیان و ۵ لکه (۳۸/۵٪) کاهش بیان نشان داده‌اند این بدان معنی است که گندم C11 با این تغییرات سعی در مقابله با تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولاری و تحمل آن را داشته است.

گائو و همکاران (2011) با بررسی پروفایل پروتئینی گندم نان تحت تنش شوری، ۵۲ لکه پاسخ‌دهنده به تنش شوری را شناسایی کردند که از بین آنها ۲۶ لکه (۵۰ درصد) افزایش بیان و ۲۱ لکه (۴۰ درصد) کاهش بیان نشان دادند و ۵ لکه (۱۰ درصد) هم جز این دو گروه نبودند. *کارسو* و همکاران (2008) تغییرات پروتئوم گندم دوروم را تحت شرایط تنش شوری بررسی کردند و در نهایت ۳۶ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش شوری را شناسایی کردند که از بین آنها ۲۴ لکه (۶۶/۷ درصد) کاهش بیان نشان دادند و ۱۲ لکه (۳۳/۳ درصد) افزایش بیان نشان دادند. *کارسو* و همکاران (2011) نشان دادند که در شرایط تنش شوری حدود ۶۷ درصد از پروتئین‌های پاسخ‌دهنده در گندم دوروم کاهش بیان نشان دادند که این می‌تواند به معنی حساس بون بیشتر گندم‌های دوروم نسبت به گندم‌های زراعی نان باشد. *یلدیز* (2007) یک رقم گندم نان متحمل به تنش شوری و یک رقم گندم دوروم حساس به تنش شوری را تحت شرایط تنش شوری قرار دادند و پروفایل پروتئینی آنها را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که بیشتر لکه‌ها در محدوده pH ۵-۶ مشاهده شده‌اند که این نتیجه موافق نتیجه‌ای است که در این مطالعه به‌دست آمد. همان‌طورکه در قسمت نتایج ذکر شد ۶۱ درصد لکه‌ها در بین pH ۵ تا ۶ مشاهده گردید. همچنین در مطالعه صورت گرفته در گندم دوروم از بین ۱۲ لکه پاسخ‌دهنده به تنش شوری ۱۱ لکه کاهش بیان داشتند که این نشان‌دهنده تخریب پروتئین‌ها در شرایط تنش شوری در گندم دوروم است. به‌طورکلی تخریب پروتئین را نشانه‌ای بر حساس بودن گیاه نسبت به تنش شوری می‌دانند (*یلدیز*، 2007؛ *ملکی* و همکاران، 2014).

مطالعات مختلفی که تغییرات پروتئوم‌ها را در شرایط تنش شوری در گندم‌های نان متحمل به تنش شوری بررسی کرده‌اند نشان داده‌اند که بیشتر پروتئوم‌های پاسخ‌دهنده افزایش بیان را نشان داده‌اند تا کاهش بیان، *گائو* و همکاران، 2011؛ *ملکی* و همکاران (Maleki *et al*., 2012). با این که مطالعات قبلی حاکی از حساس بودن گندم‌های دوروم و نیز کم اهمیت بودن ژنوم AA در اعطای تحمل به تنش شوری حکایت دارد با این حال اخیراً گزارش شده است که یک‌سری از جمعیت‌های گندم‌های دیپلوئید وحشی دارای ژنوم AA به‌دلیل وجود ژن‌های مفید نسبت به تنش شوری متحمل‌تر هستند جیمز و همکاران (James *et al*., 2006). در این مطالعه هم تنوع خوبی در بین جمعیت‌های گندم بوئتیکوم مشاهده شده است، به‌طوری‌که مطالعه پروتئوم متحمل‌ترین جمعیت بوئتیکوم (C11) نشان داد که از بین کل پروتئوم‌های پاسخ‌دهنده ۶۱/۵ درصد افزایش بیان نشان داده‌اند. این می‌تواند به این معنی باشد که این توده تحمل نسبتاً مناسبی نسبت به تنش شوری داشته است. این مطالعه نشان می‌دهد که گندم‌های بوئتیکوم (ژنوم AA) می‌توانند برای شناسایی ژن‌های متحمل به تنش شوری از اهمیت زیادی برخوردار باشند، به خصوص با اطلاع از این نکته که گندم‌های دوروم بدلیل نداشتن ژنوم DD نسبت به گندم‌های نان زراعی حساس‌تر هستند.

با این‌که این مطالعه روی تعداد اندکی ازجمعیت‌های بوئتیکوم صورت گرفته است ولی درهمین تعداد اندک هم تنوع نسبتاً خوبی از لحاظ واکنش به تنش شوری قابل مشاهده است. این بدان معنی است که اگر در بین گندم‌های وحشی دارای ژنوم AA جستجوی بیشتری صورت گیرد قطعاً تنوع بیشتری قابل مشاهده خواهد بود و می‌توان به جمعیت‌های متحمل‌تر هم رسید. در این مطالعه جمعیت C11 وC7 به‌عنوان متحمل‌ترین جمعیت‌ها نسبت به تنش شوری معرفی می‌شوند. در این مطالعه، نتایج حاصل از پروتئومیکس نیز نشان داد که اگر از نوارهای IPG با pH ۱۰-۳ استفاده گردد در pH بین ۴-۳ و ۱۰-۸ تعداد لکه‌های خیلی کمی ظهور پیدا می‌کنند. همچنین لکه‌هایی که PI وMW آنها مشابه هم باشند ممکن است هم‌پوشانی داشته باشند و تفکیک خوبی صورت نگیرد، به همین خاطر بهتر است از نوارهای IPG با pH ۸-۴ یا ۷-۴ استفاده کرد. همچنین آنالیز لکه‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری نشان داد که بیشتر لکه‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری افزایش بیان نشان داده‌اند که این می‌تواند نشان‌دهنده متحمل بودن توده C11 باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از تأمین هزینه مالی این تحقیق از محل طرح پژوهشی (با شماره ۱/۱۵۱۶) توسط پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان اعلام می‌دارند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۷-۱۶ متن انگلیسی مراجعه شود.