مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۱۰۳-۹۱)

مقایسه پروتئوم‌های جنین بذر پرایم‌شده و پرایم نشده گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در مرحله جوانه‌زنی

محسن عباس آبادی[1]، رضا توکل افشاری[2]*، محمود چمن خواه[3] و هوشنگ علیزاده[4]
۱، ۲، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳، استادیار مرکز نانوبیوتکنولوژی پژوهشکده ابن سینا، تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۸/۵)

چکیده

برای درک بهتر پرایمینگ بذر، که باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و یکنواختی رویش گیاهچه می‌گردد، تأثیر اسموپرایمینگ بذر در جوانه‌زنی بذر گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در مقیاس جنینی توسط پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت. از دو نوع بذر شامل بذر اسموپرایم شده با پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ در پتانسیل اسمزی ۰/۸- مگاپاسگال در دمای ۱۵°C به مدت ۲۴ ساعت، و سپس خشک کردن آن‌ها به صورت هواخشک در دمای اتاق و نوع دوم بذر شاهد بدون اعمال هیچ تیماری استفاده شد. ظهور ریشه‌چه در فواصل زمانی ۸ ساعت در یک دوره زمانی ۳۲ ساعته در هر دو تیمار طی آزمون جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش برای آنالیز تأثیر پرایمینگ در مقیاس جنینی روی جوانه‌زنی بذر استفاده گردید. آنالیز پروتئومی نشان داد که پرایمینگ در اکثر فرآیندهای جوانه‌زنی حقیقی (قبل از خروج ریشه‌چه) دخالت ندارد. حدود ۱۲۵۰پروتئین در روی ژل‌های دوبعدی تشخیص داده شدند، که تغییرات در فراوانی (کاهش یا افزایش بیان) ۹۲ پروتئین در طی جوانه‌زنی محض از لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. تغییرات در الگوی بیان ۲۶ پروتئین میان بذر پرایم‌شده و شاهد در جنین مشاهده شد. همچنین فواصل زمانی ۳۲ و ۲۴ ساعت به ترتیب بیشترین و کمترین تغییرات در الگوی بیان را نشان دادند. نتایج توالی‌یابی نقاط مورد نظر نشان داد که افزایش بیان پروتئین‌هایی مانند HSP 70 و ATP، می‌تواند در افزایش سرعت جوانه‌زنی و همچنین افزایش مکانیسم‌های دفاعی بذر نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی، پرایمینگ، پروتئومیکس، جنین بذر، گندم نان.

مقدمه

جوانه‌زنی بذر به عنوان اساسی‌ترین مرحله تعیین‌کننده رشد گیاه می‌باشد. جوانه‌زنی فرآیند پیچیده و چندمرحله‌ای است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌گردد که خود تحت تأثیر محیط می‌باشند (Kumar et al., 2006). بذر بالغ خشک، اندام‌های در حال رکودی هستند که محتوی رطوبتی اندکی داشته و فعالیت متابولیکی آنها تقریباً در حال سکون می‌باشد. برای اینکه جوانه‌زنی در آنها رخ دهد نیاز است که در وضعیت محرک فعالیت‌های متابولیک مانند درجه حرارت مناسب و حضور اکسیژن، آبگیری در آنها صورت گیرد (Gallardo et al., 2001).

جذب آب در ابتدای مرحله رشدی بذر، فرآیندی سه‌مرحله‌ای شامل یک دوره افزایش سریع جذب آب و

* نویسنده مسئول: رضا توکل افشاری تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۶۰۷۴ E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

افزایش محتوی رطوبتی (مرحله یک)، سپس یک مرحله یکنواخت و با تغییرات اندک در محتوی رطوبتی (مرحله دو) و مجدداً افزایش سریع در رطوبت محتوی که با خروج ریشه‌چه و ازسرگیری رشد همراه است (مرحله سه). جوانه‌زنی حقیقی (محض) صرفاً به مرحله یک و دو این فرآیند اطلاق می‌گردد که در طی آن بذرهایی که آب جذب کرده‌اند تحمل به از دست دادن رطوبت را در خود حفظ می‌کنند (Bewley, 1997).

از نقطه نظر مولکولی و بیوشیمیایی مطالعات جوانه‌زنی امری مشکل می‌باشد. زیرا بذرها در یک توده بذری کاملاً همزمان این فرآیند را انجام نمی‌دهند (Still et al., 1997). تیمارهای پرایمینگ یکی از روش‌هایی است که برای همزمان کردن جوانه‌زنی بذرها استفاده می‌گردد. در طی این تیمارها، کلیه فرآیندهای مرتبط با جوانه‌زنی آغاز می‌گردد، اما از خروج ریشه‌چه جلوگیری می‌شود. پرایمینگ بذر عموماً باعث جوانه‌زنی و رویش مزرعه‌ای سریع‌تر می‌گردد که این مساله به طور بارزی تحت شرایط نامطلوب جوانه‌زنی مشخص می‌گردد (McDonald, 1995). پرایمینگ یک روش معمول برای افزایش کارآیی بذر در صنعت بذر می‌باشد، که باعث جوانه‌زنی سریعتر و بسیار یکنواخت‌تر در محدوده‌های دمایی گسترده‌تر در اکثر گونه‌های گیاهان زراعی می‌گردد. در طی پرایمینگ مقداری آب در اختیار بذر قرار می‌گیرد که فعالیت‌های متابولیکی پیش‌جوانه‌زنی انجام گیرد، اما از خروج ریشه‌چه ممانعت به عمل می‌آید، سپس سطوح رطوبتی تا حد معمول کاهش می‌یابد. بهینه‌سازی این تیمارها نیاز به آزمایشات بیشتری دارد، زیرا آزمایشات قبلی تنها مؤثر بودن وضعیت‌های پرایمینگ را نشان داده‌اند (Job et al., 2000).

پرایمینگ بذر در اکثر گیاهان زراعی به عنوان یک روش مناسب در رویش سریع، یکنواخت و کامل فاکتورهای مطلوب در نظر گرفته می‌شوند و به طور موفقیت‌آمیزی به کار می‌رود. واضح است که تکنولوژی پرایمینگ بذر هنوز باید مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد تا تکمیل گردد. در برخی سیستم‌های بسیار پیچیده اسموپرایمینگ، محلول‌های اسمزی [نمک‌ها و پلی‌اتیلن گلایکول (PEG)] برای کنترل آبگیری استفاده می‌شوند (Moosavi et al., 2009). این مواد غلیظ به ویژه پلی اتیلن گلایکول باید هوادهی شوند و بعد از عمل خشک کردن از روی بذر پاک و تصفیه گردند. مهمترین قسمت هر تیمار پرایمینگ توانایی موفق خشک کردن بذرها است. خشک کردن سریع ممکن است منجر به صدمات فیزیکی گردد، در حالی که خشک کردن بسیار آهسته ممکن است باعث زوال بذر گردد (McDonald, 1995).

تحقیقات زیادی بر روی فیزیولوژی پرایمینگ بذر صورت گرفته است. علی‌رغم این پیشرفت‌ها، محققین هنوز از زمان، مکان و چگونگی رخ دادن تأثیر مستقیم پرایمینگ مطمئن نیستند. به نظر می‌رسد که پرایمینگ وقایع فیزیولوژیک اولیه مرتبط با جوانه‌زنی را آغاز می‌کند. همچنین مشخص شده که پرایمینگ در عملیات بهبود بذر از طریق اصلاح زوال بذر نقش دارد. اکثر شواهد پیشنهاد می‌کنند که پرایمینگ زمان لازم را برای ترمیم صدمات حاصل از وقایع فساد حاصل از اعمال ناصحیح میتوکندریایی، عدم فعالیت آنزیمی، اختلالات غشایی و صدمات ژنتیکی که در طی انبارداری و زوال بذر رخ می‌دهند، را فراهم می‌کند (McDonald, 1995). مطالعات بیشتری برای آشکار ساختن اتفاقاتی که در طی مراحل اولیه آبگیری و خشک کردن مجدد رخ می‌دهد، لازم است. علل کاهش بسیار سریع‌تر کیفیت بذر به ویژه در طی انبارداری باید مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. بنابراین ممکن است نتیجه‌گیری شود که پرایمینگ در اصلاح عملیات بذر دو نقش مهم دارد. ابتدا، بهبود وقایعی که منجر به جوانه‌زنی می‌شوند و سپس، ترمیم صدمات بذر که به جوانه‌زنی بسیار موفق بذر منجر می‌شود. هر چه فیزیولوژی پرایمینگ بذر بهتر درک گردد و اصول تکنولوژی پرایمینگ بذر مشخص شود، بذر پرایم‌شده محصولات بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند و اجازه جوانه‌زنی سریعتر و یکنواخت‌تر را در گونه‌های بیشتری از گیاهان زراعی می‌دهند (Moosavi et al., 2009).

با وجودی که علاقه بسیار زیادی در تشخیص نشانگرهای جوانه‌زنی و پرایمینگ برای استفاده در صنعت بذر وجود دارد، تقریباً فرآیندهای بسیار محدودی در طی جوانه‌زنی بذر مشخص شده‌اند، شامل وقایع مرتبط با چرخه سلولی (DeCastro et al., 2000)،

شکاف آندوسپرم به علت فعالیت‌های هیدرولیزی (Bradford et al., 2000) و تجزیه پروتئین‌های ذخیره‌ای (Job et al., 1997). جوانه‌زنی محض، ترکیبی از بسیاری از این فرآیندهاست؛ ولی در طی پرایمینگ برخی از این فرآیندها می‌توانند تکمیل گردند در حالی که برخی دیگر تنها می‌توانند آغاز شوند.

پروتئومیکس علم تازه و نوظهوری است که دارای توان و دقت بسیار بالا در شناسایی پروتئین‌ها، کاربرد و چگونگی کنترل بیان آنها می‌باشد و یکی از بهترین روشها برای تعیین اطلاعات دقیق، جزیی و با ارزش با تهیه اطلاعات هم‌زمان در طی توده‌ای از این فرآیندها می‌باشد. بنابراین می‌توان از آن در تجزیه و تحلیل فرآیندهای مرتبط با جوانه‌زنی و پرایمینگ استفاده کرد.

گندم به عنوان یکی از عمده‌ترین محصولات کشاورزی، تأمین‌کننده بیشترین نیاز غذایی انسان در کشورهای مختلف جهان است، به طوری که حدود ۱۹/۶٪ منبع غذایی جهان را تشکیل می‌دهد. همچنین حدود۷۰٪ کالری غذای مصرفی انسان و تقریباً ۵۰٪ پروتئین دنیا توسط غلات بالاخص گندم تأمین می‌گردد. گندم دارای ارزش غذایی بسیار بالایی است چون اولاً نسبت پروتئین به کربوهیدرات در گندم نسبت مطلوب و مناسبی برای تغذیه انسان (۱ به ۶) است، ثانیاً پروتئین موجود در گندم شامل آلبومین، گلوبولین، گلوتلین و گلیادین است (Black & Bewley, 2000). محتوی پروتئینی گندم توسط عوامل ژنتیکی به اندازه عوامل محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. لزوم تحقیق در مورد عوامل مؤثر بر میزان و نوع فرآورده‌های پروتئینی در طی فرآیندهای متفاوت رشدی به ویژه جوانه‌زنی و پرایمینگ در گندم دیده می‌شود. با توجه به اهمیت روزافزون پروتئومیکس و الکتروفورز در مطالعه پروتئین‌های سلولی و حساسیت بسیار بالای آنها، از این روش‌ها در تعیین و تشخیص پروتئین‌ها و چگونگی بیان آنها استفاده می‌گردد.

هدف از این تحقیق، بررسی بیان پروتئین‌های دخیل در جوانه‌زنی و پرایمینگ با استفاده از پروتئومیکس است تا بتوان از آنها به عنوان نشانگر و شاخص در شناخت بهتر فیزیولوژی اسموپرایمینگ در جوانه‌زنی بذر استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

برای بررسی الگوی پروتئوم بذر در قسمت جنین از بذر گندم نان رقم قدس (*Triticum aestivum L.* cv Qods) استفاده گردید. بذر مورد نظر در تابستان سال ۱۳۸۴ از مزرعه آزمایشی و تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جمع‌آوری گردید. پرایمینگ و جوانه‌زنی در گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و آزمایشات پروتئومیکس در آزمایشگاه نانو بیوتکنولوژی پژوهشکده ابن سینا-دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.

روش‌ها

پرایمینگ

برای پرایم کردن بذر از پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ استفاده گردید. برای تعیین پتانسیل اسمزی از رابطه Michel & Kaufmann (1973) استفاده شد. بذر در ۱۵°C در پتانسیل اسمزی ۸- بار به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک تیمار گردیدند، به طوری که تقریباً تا نیمه در محلول اسمزی شناور بوده و نیمه دیگر بذر برای جلوگیری از خفگی بذرها با هوا تماس داشتند (Aboutalebian et al., 2006). سپس بذرها با آب مقطر شستشو و با یک پارچه تمیز به آرامی خشک گردیدند و برای خشک شدن کامل، ملایم و یکنواخت به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند.

آزمون جوانه‌زنی

برای بررسی قوه نامیه و میزان جوانه‌زنی در بذرهای شاهد و پرایم‌شده، آزمون جوانه‌زنی در پتری‌دیش‌های با یک لایه کاغذ صافی به روش روی کاغذ[1] با چهار تکرار ۵۰ بذری درون انکوباتور (شرکت ایران خودروساز مدل 1KH RH) در دمای ۱۲°C، رطوبت نسبی ۶۰٪ و در محیط تاریک انجام گرفت. سپس هر ۸ ساعت (در مجموع ۹۶ ساعت) یادداشت‌برداری (در مدت زمان ۱۰ دقیقه) برای بذر جوانه‌زده انجام شد (جدول ۱). بذری جوانه زده محسوب شد که ریشه‌چه در آنها ظاهر شده باشد.

برای محاسبه صفات مختلف جوانه‌زنی از فرمول‌های

1. Top of Paper

(Ranal & Santana, 2006) استفاده گردید:

$$\bar{t} = \sum_{i=1}^{k} n_i t_i / \sum_{i=1}^{k} n_i \quad (۱$$

$\bar{t}$: میانگین زمان جوانه‌زنی؛ ni: تعداد بذرها جوانه زده در واحد زمانی i (مقدار صحیح نه تجمعی)؛ ti: مدت زمان از آغاز آزمایش تا قرائت i؛ k: آخرین زمان جوانه‌زنی.

$$CVG = (\sum_{i=1}^{k} f_i / \sum_{i=1}^{k} f_i x_i) \times 100 \quad (۲$$

CVG: ضریب سرعت جوانه‌زنی؛ f_i: تعداد بذرها جوانه زده در واحد زمانی i (مقدار صحیح نه تجمعی)؛ x_i: مدت زمان از آغاز آزمایش تا قرائت i.

$$GI = \sum_{i=1}^{n} \left|(15 - D_i) G_i\right| / S \quad (۳$$

GI: شاخص جوانه‌زنی؛ مقدار کل واحدهای زمانی جوانه‌زنی + یک؛ D_i: تعداد کل واحدهای زمانی تا قرائت i؛ G_i: تعداد بذرها جوانه زده در واحد زمانی i؛ S: تعداد کل بذرها استفاده شده در آزمایش.

$$CUG = \sum_{i=1}^{k} n_i / \sum_{i=1}^{k} (\bar{D} - D_i)^2 n_i \quad (۴$$

$$\bar{D} = 100 / CRG \;\; ; \;\; CRG = \left(\sum_{i=1}^{k} n_i / \sum_{i=1}^{k} D_i n_i \right) \times 100$$

CUG: ضریب یکنواختی جوانه‌زنی؛ $\bar{D}$: میانگین زمان جوانه‌زنی؛ CRG: ضریب سرعت جوانه‌زنی کوتوفسکی.

آماده‌سازی نمونه‌ها و استخراج جنین

بذرهای شاهد و پرایم شده در تکرارهای ۵۰ تایی در پتری‌دیش‌های دارای یک لایه کاغذ صافی و حاوی ۴ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند. سپس پتری‌دیش‌ها به انکوباتور ۱۲°C و شرایط تاریک منتقل شدند. بنابر نتایج آزمایش قبلی در فواصل زمانی ۸ ساعت به مدت ۳۲ ساعت بذرهای شاهد و پرایم‌شده از انکوباتور خارج و بلافاصله برای توقف فعالیت‌های متابولیک ابتدا درون نیتروژن مایع قرار و سپس به فریزر ۸۰°C- منتقل گردیدند. برای نمونه‌گیری، بذرهای مورد نظر از فریزر ۸۰°C- خارج و جنین بذر با استفاده از پنس و اسکارپر جدا گردیدند. سپس جنین‌ها با استفاده از ازت مایع درون هاون چینی به طور کامل پودر گردیدند و درون میکروتیوپ‌های ۱/۵ ml تا زمان استخراج پروتئین در ۸۰°C- نگهداری شدند.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین بر اساس روش Damerval et al. (1986) با اندکی تغییرات انجام گرفت.

روش کار

در ابتدا ۳ml بافر استخراجی TCA (تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪، DTT ۰/۰۷٪ در استون) به ۳۰۰mg پودر بافت جنینی درون فالکون اضافه شد. سپس ورتکس روی مینی شیکر انجام تا کاملاً هموژنیزه گردد. در مرحله بعدی نگهداری در ۲۰°C- به مدت یک ساعت انجام شد. سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C و ۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در مرحله بعد انجام شد. حذف محلول رویی با دقت انجام شد و سایر مراحل بر روی یخ انجام گردید .پس از اضافه کردن بافر شستشو (۳-۶ ml)[DTT ۰/۰۷٪ در استون] و شکستن پلت به طور کامل، ورتکس انجام و سپس انتقال به ۲۰°C- به مدت حداقل نیم ساعت صورت گرفت. مراحل شستشو ۳-۵ بار تکرار گردید. سپس نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت یک ساعت یا زیر هود به مدت نیم ساعت در روی ظرف یخ نگهداری شدند. در مرحله بعدی ۳ml بافر لایزیز (اوره ۹ مولار، CHAPS ۴٪، DTT ۱٪، آمفولین با pH=۳.۵-۱۰، تریس ۳۵ میلی‌مولار در آب) اضافه گردید. سپس خرد نمودن و حل شدن کامل پلت به وسیله مینی شیکر و ورتکس انجام گردید. در مرحله بعدی نگهداری به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق بود به طوری که هر ۱۰ دقیقه یک بار به مدت یک دقیقه ورتکس صورت گرفت. انجام سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵°C و ۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) گام بعدی بود. در انتها برداشتن محلول رویی به عنوان نمونه پروتئینی به میزان‌های ۵۰۰ µl در تیوپهای ۱/۵ml و برداشتن ۱۰µl از نمونه برای آزمون برادفورد(سنجش پروتئین) انجام گردید. سپس ذخیره سازی بقیه نمونه پروتئینی در ۷۰°C- تا زمان استفاده صورت گرفت.

سنجش میزان پروتئین

سنجش میزان پروتئین با استفاده از روش Bradford (1976) و بر طبق روش کیت آماده شرکت بیورد در دستگاه بیوفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر

انجام شد.

الکتروفورز بعد اول و دوم

ابتدا الکتروفورز بعد اول توسط دستگاه ایزوالکتریک فوکسینگ (ساخت شرکت Pharmacia فنلاند) انجام شد. برای انجام این مرحله ابتدا رهیدراسیون نوارهای IPG با استفاده از محلول دهیدراسیون انجام شد. بدین منظور نمونه پروتئینی به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و۱۳۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس با توجه به آزمون سنجش میزان پروتئین به میزان ۲۰۰µg به محلول رهیدراسیون (اوره ۸ مولار، CHAPS ۲٪، بروموفنل بلو ۰/۰۰۲٪، در انتها قبل از اضافه کردن محلول به نمونه ۷DTT mg و ۵۰µl بافر IPG به تناسب ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اضافه گردید) به طوری که حجم محلول به ۳۴۰µl برسد. نمونه کاملاً هم زده شده، دوباره به همان صورت سانتریفیوژ گردید و در مرکز یکی از شیارهای سینی بارگذاری شد. سپس درب سینی را گذاشته و مدت حداقل ۱۶ ساعت درون سینی قرار گرفت. برای انجام بعد اول، ژل‌های IPG نواری را که آبگیری شده‌اند از سینی مربوطه با یک جفت پنس خارج کرده و ژل‌های IPG را به طور مختصر در آب مقطر شسته و روی یک کاغذ صافی آب اضافه آن را می‌گیریم تا اولاً همه محلول رهیدراسیون حذف شود و همچنین در طی مدت زمان IEF اوره بر روی ژل کریستاله نشود. نوارهای IPG را به شیارهای موجود در روی صفحه آلاینر سریعاً منتقل و انتهای مثبت آنرا (آند) در بالای صفحه و نزدیک به الکترود قرمز قرار و انتهای دیگر در ته صفحه و نزدیک الکترود مشکی (کاتد) قرار داده شد. نوارهای الکترود مرطوب در انتهای + و - بر روی نوارهای IPG قرار داده شد. نوارهای الکترود باید دقیقاً با سطح ژل هر نوار IPG تماس داشته باشند. الکترودها را بالای سینی قرار داده به طوری که الکترود آند و کاتد مطابق با انتهای ژل باشد وقتی که الکترودها به طور دقیق قرار گرفتند به سمت پایین فشار داده تا با نوارهای الکترود تماس پیدا کنند. سپس روی نوارها به طور کامل با روغن معدنی (تقریباً در حدود ۱۰ میلی‌لیتر) پوشش داده شدند. مدت زمان و ولتاژهای مربوطه برای نوارهای به طول ۱۷ cm و pH=۳-۱۰ طبق روش استاندارد انجام شد. دمای بعد اول ۲۰ درجه سانتیگراد و حداکثر شدت جریان ۲mA و حداکثر توان ۵ وات بود. سپس الکتروفورز بعد دوم (SDS-PAGE) که توسط دستگاه Protean II Xi Cell (شرکت بیورد) انجام شد. ابتدا آماده سازی و ریختن ژل بعد دوم انجام شد. ضخامت ژل با توجه به نوع کار ۱/۵mm انتخاب شد و درصد ژل نیز ۱۱ درصد بود. بعد از تهیه ژل متعادل کردن نوار IPG توسط ۷ml از محلول متعادل‌کننده (Tris-HCl pH=8.8 ۵۰ میلی‌مولار، اوره ۶ مولار، گلیسرول ۲۸/۷٪، SDS ۲٪، بروموفنل بلو ۰/۰۰۲٪) که ۷۰ میلی گرم DTT به آن اضافه شده بود انجام گردید. سپس نوارها را روی سطح ژل SDS قرار داده و روی آن با دو میلی‌لیتر محلول آگاروز، برای پیوسته مانده نوار IPG روی ژل، پوشانده شد. در مرحله بعدی قاب ژل را بر روی دستگاه الکتروفورز نصب کرده و ابتدا به مدت یک ساعت در شدت جریان ۵ میلی‌آمپر و بعد ۱۵ میلی‌آمپر ران شد. هنگامیکه رنگ موجود در ژل تقریبا به انتهای یک میلی‌متری ته ژل رسید جریان قطع گردید. رنگ‌آمیزی ژل‌های دو بعدی به روش نیترات نقره انجام شد.

اکتساب تصاویر

ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیورد اسکن شده و به فرمت خام ژل‌های دو بعدی (Raw 2d) ذخیره شدند و در نهایت به وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت تیف درآورده شدند. پس از اکتساب تصاویر به فرمت دیجیتالی ژل‌ها را لابلای سلفون قرار داده و اطراف آنها را مهروموم کرده و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آنالیز ژل‌ها با نرم‌افزار

برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار ملانی نسخه ۶/۲ (شرکت ژنبیو، ژنو، سوئیس) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس ژل‌های مختلف را باهم جفت نموده و مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. به این ترتیب که پس از شناسایی نمودن لکه‌ها بر روی ژل‌ها و سپس ویرایش دستی نقاط، به طور دستی چندین لکه را در ژل‌های مختلف باهم جفت نموده و علامت زده شدند. سپس به وسیله نرم‌افزار لکه‌ها به طور اتوماتیک در ژل‌های مختلف باهم جفت گردیدند. پس از جفت

نمودن، به طور دستی لکه‌ها بررسی شدند تا از صحت عمل نرم‌افزار در جفت نمودن لکه‌ها اطمینان حاصل گردد. ژل‌های مربوط به تیمارهای مختلف را به هم جفت نموده و سپس دو به دو با هم مقایسه کرده و تفاوتهای بین لکه‌های دو تیمار متفاوت را شناسایی شدند. طبق دستورالعمل ذکر شده در نرم‌افزار آموزشی ملانی به وسیله Inter Class Report لکه‌هایی که درصد حجمی آنها بین دو تیمار به میزان دو برابر در Ratio با هم اختلاف داشتند به عنوان پروتئین‌های کاندیدا شناخته شدند که بین دو تیمار تفاوت معنی‌دار نشان می‌دادند. در حقیقت تعیین درصد حجمی لکه‌ها روش مناسبی برای بررسی تفاوت‌های کمی لکه‌ها بین ژل‌های مختلف یک تیمار و ژل‌های تیمارهای مختلف است. برای هر لکه در هر ژل درصد حجمی براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^{n} Vol\, s} \times 100$$

که در این فرمول Vol s حجم لکه s در ژلی است که nلکه دارد.

در حقیقت مقدار درصد حجمی هر لکه مقدار کمی نرمالیزه شده هر لکه است و مستقل از تغییراتی که ممکن است در اثر تفاوت در مقدار پروتئین بارگذاری شده و یا تغییر در لکه‌ها به واسطه تغییرات رنگ‌آمیزی می‌باشد. یکی از روش‌های شناسایی لکه‌هایی که بین دو تیمار تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهند، استفاده از آزمون آماری t- استیودنت است. برای انجام آزمون t بایستی داده‌ها پیوسته بوده و منحنی پراکنش آنها حول میانگین از توزیع نرمال پیروی کند. همچنین واریانس دو تیمار بایستی مشابه باشد. نرم‌افزار ملانی با توجه به میانگین هر لکه در تیمار و طبق رابطه:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)\sqrt{n_1 + n_2 - 2}}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)\left(n_1 s_1^{\,2} + n_2 s_2^{\,2}\right)}}$$

مقدار t-استیودنت را بین دو تیمار محاسبه می‌نماید. $\bar{x}_1$ و $\bar{x}_2$ میانگین مقادیر درصد حجمی هر لکه در هر تیمار است و s انحراف معیار می‌باشد. درجه آزادی برای t محاسباتی می باشد و nنیز تعداد تکرارها را در هر تیمار نشان می‌دهد برای هر لکه‌ای که t محاسباتی از t جدول بزرگتر باشد می‌توان نتیجه گرفت که بیان پروتئین منطبق با لکه تغییر کرده است. پس از آنالیز نمودن ژل‌ها پروتئین‌های کاندید از روی ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو جدا شدند. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی‌بلو نیاز به بارگذاری مقادیر زیادتری پروتئین است. بنابراین برای این منظور مقدار ۱۲۰۰ میکروگرم پروتئین به همراه محلول رهیدراسیون وارد ژل شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی‌بلو و تطبیق لکه‌ها باهم، لکه‌هایی که در ژل‌های تحلیلی به طور افتراقی بیان شده بودند را به طور دستی و با استفاده از اسکالپل تمیز از ژل کوماسی جدا نموده و در تیوپ‌های جداگانه قرار داده و تا زمان ارسال جهت طیف‌سنجی جرمی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نتایج و بحث

آزمون جوانه‌زنی

نتایج آزمون جوانه‌زنی نشان داد که میانگین زمان جوانه‌زنی در بذر پرایم‌شده بسیار کمتر از بذر شاهد و تفاوت آنها بسیار معنی‌دار بود (جدول‌های ۱ و ۲). همچنین میانگین سرعت، شاخص و یکنواختی جوانه‌زنی بذر پرایم شده بیشتر از بذر شاهد و بسیار معنی‌دار بود. درصد جوانه‌زنی بذر شاهد و تیمار شده تفاوت معنی‌داری نشان نداد که با نتایج Aboutalebian et al. (2005) مطابقت داشت. بنابر نتایج آزمایش آزمون جوانه‌زنی مدت زمان کل ۳۲ ساعت با چهار بازه زمانی ۸ ساعت برای انجام فرآیند جوانه‌زنی بذر بدون خروج ریشه‌چه برای آزمایشات پروتئومیکس در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها

پس از شناسایی لکه‌ها توسط نرم‌افزار، به طور متوسط حدود ۱۰۰۰ لکه تکراری در کلیه تیمارها رویت شدند. نتایج حاصل از جفت نمودن ژل‌ها نشان داد که حدود ۷۵۰ لکه به طور تکرارپذیر در کلیه تیمارها باهم جفت شدند. آزمون آماری t-استیودنت نشان داد که برای ۹۲ لکه بین تیمار پرایمینگ و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان می دهند. از این تعداد ۴۸ لکه از لحاظ آماری تفاوت بسیار معنی‌دار نشان دادند.

به منظور جداسازی و انجام طیف‌سنجی جرمی بر روی لکه‌هایی که به صورت افتراقی در اثر تیمار

پرایمینگ دچار تغییر بیان شده بودند، ژل‌های تیمار شاهد و پرایمینگ در بازه زمانی ۸ ساعت دوباره تکرار شدند، با این تفاوت که میزان پروتئین مورد استفاده افزایش یافته و از رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو به جای نیترات نقره به دلیل سازگار بودن با طیف‌سنجی جرمی و انجام مطالعات بعدی استفاده شد. اما پس از مقایسه ژل‌ها حاصل از رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو با ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره تنها تعداد ۵۰ مورد، از ۹۸ لکه، در این ژل‌ها مشاهده شدند که حدود ۲۸ لکه تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ نشان دادند. این ۲۸ مورد برای انجام طیف‌سنجی جرمی و مطالعات بعدی انتخاب شدند (شکل‌های ۱ و ۲).

تمامی این لکه‌ها از ژل شاهد ۸ ساعت جدا و برای طیف سنجی جرمی ارسال گردید. جدول سه لکه‌های با تفاوت معنی‌دار در ژل‌های کوماسی بلو را نشان می‌دهد. نقاط دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪ به ترتیب با یک و دو ستاره مشخص شده‌اند که نقاط دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ همان نقاط ارسالی برای طیف‌سنجی جرمی می‌باشند.

در بازه زمانی ۸ ساعت تعداد ۹ لکه تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵٪ بین دو تیمار پرایمینگ و شاهد نشان دادند که ۳ لکه آن در سطح آماری ۱٪ نیز تفاوت معنی‌دار داشتند. ۸ لکه از ۹ لکه بیان بیشتری در تیمار شاهد نسبت به پرایم داشتند. تعداد لکه‌هایی که در بازه زمانی ۱۶ ساعت بین تیمار شاهد و پرایمینگ تفاوت معنی‌داری در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ نشان دادند به ترتیب ۵ و ۱ لکه بود، که از این تعداد ۲ لکه بیان بیشتری در تیمار پرایمینگ داشتند. همچنین تعداد این لکه‌ها در بازه زمانی ۲۴ به ترتیب ۱ و ۱ لکه و در بازه زمانی ۳۲ ساعت ۱۱ و ۷ لکه در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ بود. بود. تعداد لکه‌های با بیان کمتر در تیمار پرایمینگ در بازه زمانی ۲۴ ساعت ۱ و در ۳۲ ساعت ۴ لکه بود. بنابراین در مقایسه بین تیمار شاهد و پرایمینگ در مجموع در ۴ بازه زمانی تعداد ۲۶ و ۱۵ لکه به ترتیب در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری نشان دادند، که ۹ لکه بیان کمتری در تیمار پرایمینگ نسبت به شاهد داشتند.

مقایسه بازه‌های زمانی مختلف روند بیان پروتئین‌ها را در طی پرایمینگ و جوانه‌زنی مشخص کرد (شکل ۳). به طوری که مقایسه بازه زمانی ۸ با ۱۶ ساعت در تیمار پرایمینگ نشان داد که تعداد ۶ لکه در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌دار دارند و از این تعداد ۲ لکه در سطح

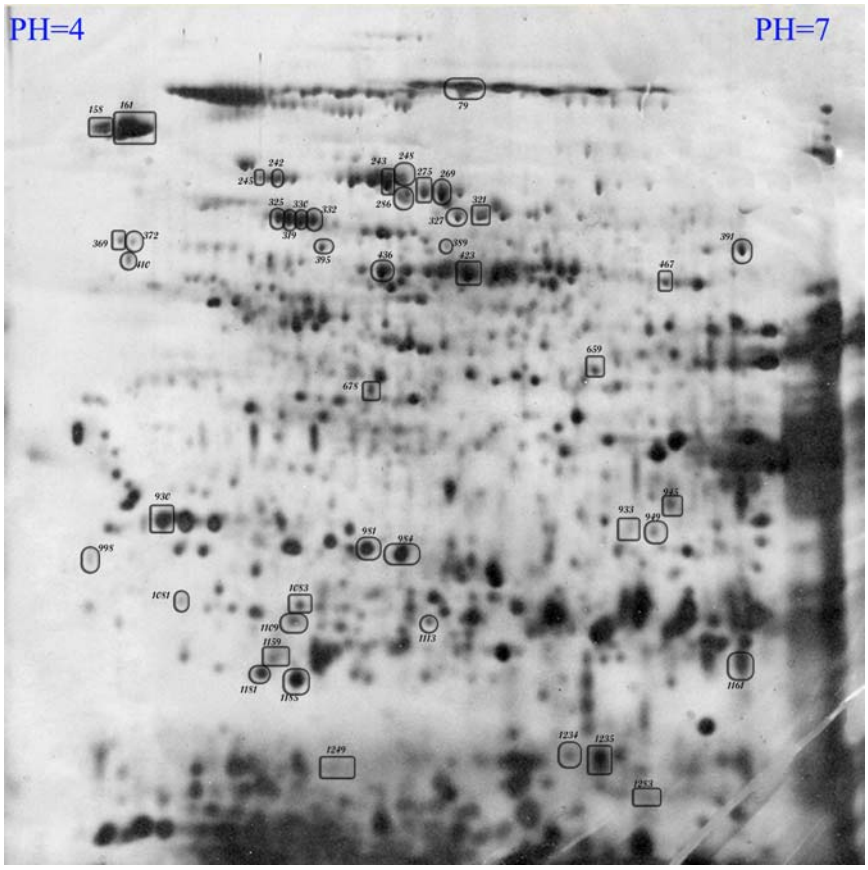
جدول ۱- روند جوانه‌زنی بذرها پرایم شده و شاهد گندم نان در بازه های زمانی ۸ ساعت

تیمارها	بذرها پرایم				بذرها شاهد			
یادداشت برداری تکرار	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۴	۱۵	۱۶	۱۲	۲۰	۲	۰	۰	۱
۳۲	۳۷	۳۱	۳۰	۳۱	۶	۱	۱	۷
۴۰	۴۵	۴۲	۳۹	۴۰	۲۱	۷	۲۱	۱۶
۴۸	۴۸	۴۷	۴۸	۴۹	۴۲	۲۳	۳۸	۳۶
۵۶	۴۸	۴۹	۴۹	۵۰	۴۷	۴۰	۴۳	۴۰
۶۴	۴۹	۴۹	۴۹	۵۰	۵۰	۴۷	۴۷	۴۸
۷۲	۴۹	۴۹	۴۹	۵۰	۵۰	۴۹	۴۸	۴۹
۸۰	۴۹	۴۹	۵۰	۵۰	۵۰	۴۹	۴۹	۴۹
۸۸	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۴۹	۵۰	۵۰
۹۶	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۴۹	۵۰	۵۰

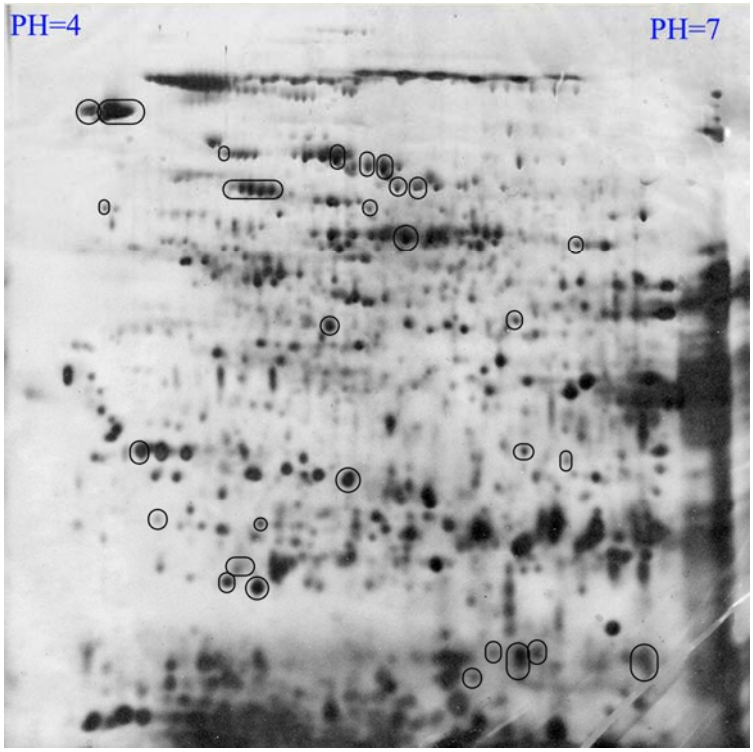
جدول ۲- میانگین و میانگین مربعات بذرها پرایم شده و شاهد در صفات اندازه گیری شده گندم نان

تیمار	صفات				
	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	زمان جوانه‌زنی	یکنواختی جوانه‌زنی	شاخص جوانه‌زنی
میانگین بذرها پرایم	۱۰۰	۲/۹۰۲	۳۴/۴۸	۲/۸۸۲	۳/۲۶
میانگین بذرها شاهد	۹۹/۵	۲/۰۵۸	۴۸/۴۸	۰/۰۲۱	۲/۶۸۵
میانگین مربعات	۰/۵ ns	۱/۴۲۷**	۳۹۲**	۰/۶۶۱**	۰/۴۹۸**

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیرمعنی‌دار.



شکل ۱- لکه‌هایی که در طی ۸ ساعت فرآیند جوانه زنی بذر پرایم شده تفاوت معنی‌دار داشتند و در ژل با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو نیز مشاهده شدند (نقاط شماره‌دار).



شکل ۲- لکه‌هایی که در طی ۸ ساعت فرآیند جوانه‌زنی بذر پرایم شده در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار داشتند و در ژل با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو نیز مشاهده شدند (ارسال برای طیف‌سنجی جرمی).

آماری ۱٪ نیز تفاوت معنی‌دار نشان دادند. هر ۶ لکه در این مقایسه کاهش بیان نشان دادند. در حالی که در مقایسه مشابه بازه‌های زمانی ۸ و ۱۶ ساعت در تیمار شاهد تعداد لکه‌های با تفاوت معنی‌دار در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ به ترتیب ۳۹ و ۱۹ لکه بود، که ۴ لکه افزایش بیان و ۳۵ لکه کاهش بیان نشان دادند. در مقایسه بازه زمانی ۱۶ با ۲۴ ساعت کمترین تفاوت معنی‌دار در بیان پروتئین‌ها رخ داد، به طوری‌که این تعداد در تیمار پرایمینگ ۴ لکه در سطح آماری ۵٪ و ۳ لکه در سطح آماری ۱٪ بود و ۲ لکه کاهش بیان داشتند. در تیمار شاهد هم تعداد این لکه‌ها به ترتیب ۹ و ۵ لکه در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ بود و ۳ مورد افزایش بیان در میان آنها دیده شد. مقایسه الگوی پروتئوم بذر در بازه زمانی ۲۴ با ۳۲ ساعت دوباره بیان پروتئین‌های بیشتری را نشان داد. تعداد لکه‌های با تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری در سطوح آماری ۵٪ در تیمار شاهد ۹ لکه (۷ مورد افزایش بیان) و پرایمینگ ۱۸ لکه (۱۲ مورد افزایش بیان) بودند. در حالی که در سطح آماری ۱٪ تعداد لکه‌های با تفاوت معنی‌دار در تیمار شاهد ۵ لکه و در پرایمینگ ۹ لکه بود.

مقایسه الگوی پروتئوم در بازه‌های زمانی به طور گسترده نیز انجام شد (شکل ۳). در مقایسه بازه زمانی ۸ با ۲۴ ساعت تعداد لکه‌های با تفاوت معنی‌دار در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ به ترتیب ۴۷ و ۲۶ برای تیمار شاهد مشاهده شد که ۴۵ مورد کاهش بیان داشتند و ۱۵ و ۷ مورد برای تیمار پرایمینگ بود که ۱۳ مورد کاهش بیان نشان دادند. تعداد این لکه‌ها برای بازه زمانی ۸ و ۳۲ ساعت برای تیمار شاهد ۳۲ و ۱۳ لکه (۳۱ لکه با کاهش بیان) و برای تیمار پرایمینگ ۱۴ و ۴ لکه (۵ مورد افزایش بیان) بود. همچنین در مقایسه بازه زمانی ۱۶ با ۳۲ ساعت الگوی پروتئوم تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری در سطح ۵٪ و ۱٪ را برای ۱۳ و ۴ لکه را در تیمار پرایمینگ (۱۰ مورد افزایش بیان) و ۴ و ۱ لکه را برای تیمار شاهد نشان داد، که ۳ لکه با افزایش بیان مواجه بودند.

در مجموع در مقایسه بازه‌های زمانی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار در بیان ۹۲ و ۴۸ پروتئین در سطوح آماری ۵٪ و ۱٪ مشاهده شد. از میان این لکه‌ها در طی فرآیند پرایمینگ و جوانه‌زنی ۵۷ لکه فقط کاهش بیان،

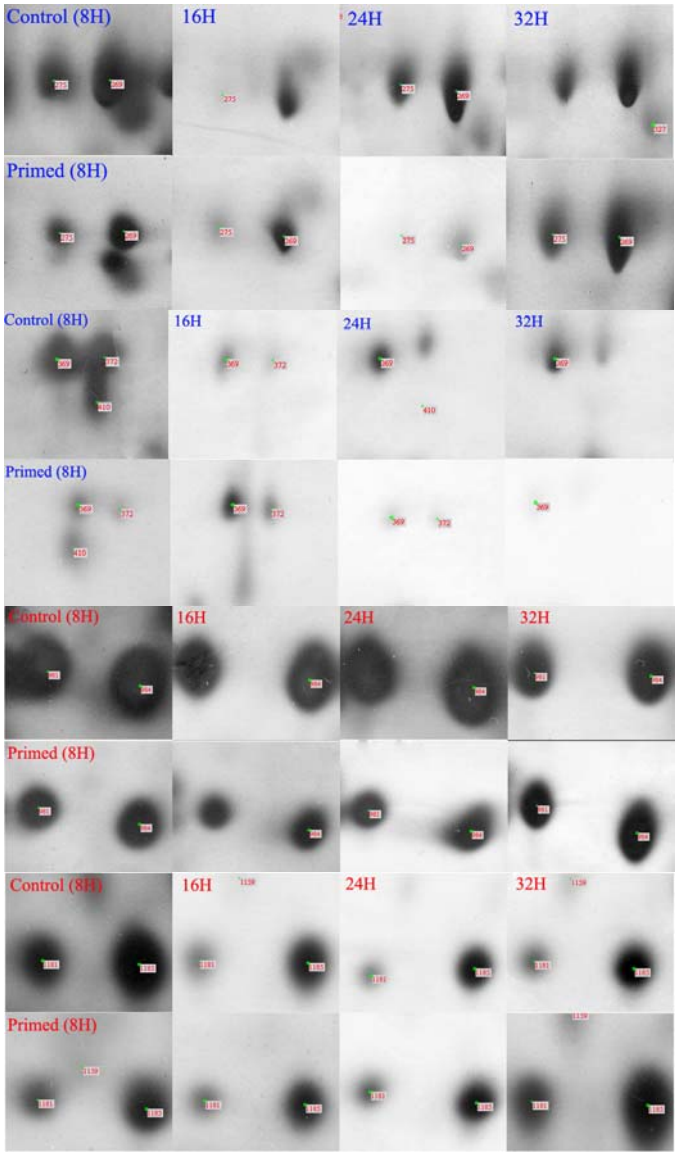
جدول ۳- نقاط پروتئینی با تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ (*) و ۱٪ (**) در طی فرآیند جوانه‌زنی در ژل کوماسی‌بلو

ردیف	شماره نقاط	ایزوالکتریک pH	وزن ملکولی (KDa)
۱	۷۹**	۵.۶۸	۱۰۳
۲	۱۵۸*	۴.۳۹	۸۷
۳	۱۶۱*	۴.۴۹	۸۷
۴	۲۴۲**	۵	۷۳
۵	۲۴۳*	۵.۳۹	۷۷
۶	۲۴۵*	۴.۹۴	۷۴
۷	۲۴۸**	۵.۴۴	۷۷
۸	۲۶۹**	۵.۵۷	۷۰
۹	۲۷۵*	۵.۵۱	۷۱
۱۰	۲۸۶**	۵.۴۲	۷۰
۱۱	۳۱۹**	۵.۰۳	۶۵
۱۲	۳۲۱*	۵.۷۲	۶۵
۱۳	۳۲۵**	۴.۹۹	۶۶
۱۴	۳۲۷**	۵.۶	۶۶
۱۵	۳۲۸*	۴.۹۵	۶۶
۱۶	۳۳۰**	۵.۰۷	۶۵
۱۷	۳۳۲**	۵.۱۲	۶۵
۱۸	۳۶۹*	۴.۴۵	۵۷
۱۹	۳۷۲**	۴.۴۹	۵۷
۲۰	۳۸۰*	۵.۵۲	۶۱
۲۱	۳۸۹**	۵.۶	۶۰
۲۲	۳۹۱**	۶.۶۹	۵۷
۲۳	۳۹۵**	۵.۱۴	۵۹
۲۴	۴۱۰**	۴.۴۸	۵۴
۲۵	۴۲۳*	۵.۶۶	۵۴
۲۶	۴۳۶**	۵.۳۶	۵۵
۲۷	۴۶۷*	۶.۴	۵۱
۲۸	۶۵۹*	۶.۰۹	۳۹
۲۹	۶۷۸*	۵.۲۹	۳۹
۳۰	۹۳۰*	۴.۵۸	۲۸
۳۱	۹۳۳*	۶.۲۹	۲۷
۳۲	۹۴۵*	۶.۴۶	۲۷
۳۳	۹۴۹**	۶.۳۶	۲۶
۳۴	۹۸۱**	۵.۲۶	۲۶
۳۵	۹۸۴**	۵.۳۸	۲۶
۳۶	۹۹۸**	۴.۳۳	۲۵
۳۷	۱۰۸۱**	۴.۶۴	۲۴
۳۸	۱۰۸۳*	۵.۰۳	۲۴
۳۹	۱۱۰۹**	۵.۰۱	۲۳
۴۰	۱۱۱۳**	۵.۴۷	۲۳
۴۱	۱۱۵۹*	۴.۹۷	۲۲
۴۲	۱۱۶۱**	۶.۵۹	۲۱
۴۳	۱۱۸۱**	۴.۹	۲۱
۴۴	۱۱۸۵**	۵.۰۱	۲۱
۴۵	۱۱۹۶*	۶.۸۲	۲۰
۴۶	۱۲۳۴**	۵.۸۹	۱۸
۴۷	۱۲۴۴*	۶.۸	۱۸
۴۸	۱۲۶۱*	۶.۱۳	۱۸
۴۹	۱۲۶۹**	۵.۸۲	۱۸
۵۰	۱۲۸۳*	۶.۲۹	۱۷

نقاطی که دارای دو ستاره هستند برای طیف‌سنجی جرمی ارسال شدند.

۱۶ لکه فقط افزایش بیان و ۱۸ لکه هم کاهش و هم افزایش بیان معنی‌دار از لحاظ آماری نشان دادند.

نتایج اولیه نشان داد که میزان بیان ۹۲ و ۴۸ پروتئین به ترتیب در سطوح ۵٪ و ۱٪ تغییر معنی‌دار داشته‌اند که با مطالعه انجام شده توسط Gallardo et al. (2001) که در آن میزان بیان ۳۹ پروتئین در طی جذب آب بذرها تغییر یافته است، مطابقت ندارد. گزارش شده که تنها میزان بیان ۳۹ پروتئین در طی جذب آب بذرها تغییر یافته است که هیچکدام از این آنزیم‌ها تنفسی نبوده اند. این مورد با نتایج ما مطابقت ندارد. اما مقدار actin7، زیرواحدهای توبولین و یک پروتئین WD-40 درگیر در گیرندگی پروتئین کیناز c فعال‌شده (RACK) و همزمان با آغاز طویل شدن سلولی و فعالیت چرخه سلولی فعالیت آن افزایش یافته است. همچنین در این آزمایش مشخص شد که پروتئین‌های متابولیک در مرحله اول آبگیری در بذرها خشک غیرخواب، از پیش سنتز شده‌اند و پروتئین‌های سنتزشده جدید در کامل شدن این فرآیندها در مرحله دوم آبگیری نقش دارند.



شکل ۳- الگوی بیان لکه‌های ۲۷۵، ۲۶۹، ۳۶۹، ۳۷۲، ۴۱۰، ۹۸۱، ۹۸۴، ۱۱۸۱ و ۱۱۸۵ در تیمار شاهد و پرایمینگ در طول فرآیند جوانه‌زنی بذر گندم. در اکثر لکه‌ها، ابتدا کاهش بیان و سپس افزایش بیان دیده می‌شود. همچنین تفاوت معنی‌دار در بیان لکه‌های ۳۷۲، ۹۸۱ و ۱۱۸۱ در بین تیمار شاهد و پرایمینگ مشاهده می‌گردد.

مشابه با این آزمایش گزارش شد که تجمع توبولینی در طی جوانه‌زنی بذر در ارتباط با فعال‌سازی دوباره فعالیت چرخه سلولی است (DeCastro et al., 2000). همچنین گزارش کردند که تجمع پروتئین WD-40 در طی فرآیند جوانه‌زنی در آرابیدوپسیس برخلاف برنج است که این نتیجه را در پی دارد که فرایند جوانه‌زنی در گونه‌های مختلف گیاهی کاملاً مشابه نمی‌باشد (Gallardo et al., 2003). در جنین برنج و ذرت دو پروتئین گلوبولینی در سطوح بالا در طی نمو جنین تجمع می‌یابند و سریعاً در مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر کاهش می‌یابند. به عبارت دیگر، این پروتئین‌ها به عنوان منبع ذخیره ممکن است منابع نیتروژنی و کربنی را برای جنین در حال جوانه‌زنی بر اساس آنالیز ترکیب اسیدآمینه آنها فراهم کنند (Komatsu et al., 2005).

نتایج توالی‌یابی

توالی‌یابی با استفاده از روش MS/MS انجام گردید. نتیجه توالی‌یابی اولیه به صورت جدول زیر بوده است.

نتایج توالی‌یابی نشان داد که کاندیدهای پروتئین احتمالی برای این نقاط HSP70، Bip، ATP synthase beta unit و Endo-β-1,3 Glucanase می باشند.

شماره نقاط	شماره دسترسی	pH ایزوالکتریک	وزن ملکولی	پروتئین فرضی مرتبط
۲۴۸	gi/۴۷۵۶۰۰	۵.۴۴	gi|475600	BiP isoform B
۲۶۹	gi/۱۷۴۷۶۰۸۶	۵.۵۷	gi|17476086	Putative heat shock 70 kDa protein, motchondrial precursor
۴۳۶	gi/۵۲۵۲۹۱	۵.۳۶	gi|525291	ATP synthase beta subunit
۹۸۴	gi/۲۵۴۳۴۵۶۶	۴.۵۸	gi|25434566	Endo-1,3 Glucanase

HSP70 وBip جزو چاپرون‌های ملکولی به شمار می‌روند و در بسیاری از اعمال سلولی مانند تاخوردگی‌های پروتئینی، انتقال پروتئین‌ها از غشاها، تغییر در فعالیت پروتئین‌ها، تنظیم میزان تجزیه پروتئین‌ها و جلوگیری از تشکیل توده‌های پروتئینی غیرقابل بازگشت نقش دارند (Su & Li, 2008). HSP70های گیاهی توسط یک خانواده چندژنی کد می‌گردند و آنالیز توالی‌های این خانواده ژنی نشان داده که ۴ زیرگروه اصلی وجود دارند که در سیتوسول، شبکه آندوپلاسمی، پلاستیدها و میتوکندری‌ها تجمع می‌یابند (Sung et al., 2001). بیان این دو پروتئین همچنین در واکنش به تنش‌های غیرزنده به خصوص تنش‌های حرارتی تغییر می‌کند (Alvim et al., 2001). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاهش بیان این پروتئین‌ها در بازه زمانی ۱۶ و ۲۴ ساعت نشان‌دهنده کاهش مقاومت به تنش‌های غیرزنده و همچنین تحمل به پس آبش باشد و اقزایش بیان این دو پروتئین در بازه زمانی ۳۲ ساعت بیانگر القای دوباره مقاومت می باشد.

ATP synthase β subunit یکی از زیرواحدهای پایه در کمپلکس F_0F_1 میتوکندریایی می‌باشد. ATP واحد انرژی سلولی می باشد و کنترل تولید و تجزیه آن اهمیت حیاتی برای بقای تمامی ارگانیسم‌های زنده دارد (Stock et al., 1999). ATP سینتازها از کمپلکس کاتالیتیک بیرونی F_1 که دارای ۵ زیرواحد مختلف ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$) است و مسیر پروتونی F_0 تشکیل شده است (Groth & Strotmann, 1999). افزایش بیان این پروتئین در طی فرآیند جوانه‌زنی که در بذرها پرایم شده با سرعت بسیار بیشتری صورت گرفت نشان‌دهنده سنتز میتوکندری‌های جدید جهت تأمین انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های در حال آغاز برای تولید یک گیاه جدید می‌باشد. همچنین این مطلب بیانگر این است که سرعت بیشتر سنتز میتوکندری‌ها در بذرها پرایم شده احتمالاً به دلیل سرعت و میزان بیشتر فعالیت انجام شده در این بذرها می باشد.

Endo-β-1, 3 Glucanase آنزیم‌های با فراوانی بسیار زیاد در گونه‌های گیاهی بذرزاد می باشند (Høj et al., 1995). اگرچه نقش اصلی این پروتئین‌ها، نقش احتمالی آنها در مقابله گیاهان با عوامل بیماری‌زا و میکروبی باشد، مدارک بسیار زیادی وجود دارد که این آنزیم‌ها در فرآیندهای متنوع فیزیولوژیکی و نموی در گیاهان غیرمبتلا مانند تقسیم سلولی (Fulcher et al., 1976)، میکروسپروژنز (Bucciaglia et al., 1994)، جوانه‌زنی

گرده و رشد لوله گرده (Meikle et al., 1991)، لقاح (Ori et al., 1990)، جنین‌زایی (Helleboid et al., 1998)، رسیدن میوه (Hinton et al., 1980)، جوانه‌زنی بذر (Leubner-Metzger et al., 1995)، تجزیه ذخایر آندوسپرمی بذرها غلات (Fincher et al., 1993) و واکنش به صدمات فیزیکی، سرما، ازن و اشعه ماوراء بنفش (Ernst et al., 1996; Hincha et al., 1997) دخالت دارند. بنابراین افزایش بیان این پروتئین در بذر شاهد و میزان بالای آن در بذر پرایم شده بیانگر تقویت مکانیسم دفاعی در برابر عوامل خارجی می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

فناوری‌های تقویت‌کننده بذر مانند پرایمینگ اهمیت بسزایی در افزایش نمود بذر در شرایط مختلف رشدی و همچنین تنش دارند. نتایج این تحقیق بیانگر اهمیت تیمار پرایمینگ در افزایش بیان پروتئین‌های محور جنینی بذر می باشد. افزایش بیان پروتئین‌هایی مانند ATP synthase β subunit که نشانگر افزایش تولید میتوکندری‌های جدید به عنوان موتور تولید انرژی سلولی می‌باشد می تواند عامل تعیین‌کننده در افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر پرایم شده باشد. افزایش بیان پروتئین HSP 70 در بذر پرایم شده می‌تواند عامل تعیین‌کننده در حفظ و سلامت پروتئین‌های درگیر در واکنش‌های ضروری محور جنینی باشد. به طور کلی می‌توان بیان کرد که پرایمینگ بذر می‌تواند نقش بسزایی در افزایش فعالیت پروتئین‌های کلیدی درگیر در رشد محور جنینی داشته باشد.

REFERENCES

1. Aboutalebian, M. A. (2006). *Seed osmopriming improved seed invigoration in cold and temperate Iranian wheat cultivars under stress conditions*. Ph.D. Thesis. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj, Iran.
2. Alvim, F. C., Carolino, S. M., Cascardo, J. C., Nunes, C. C., Martinez, C. A., Otoni, W. C. & Fontes, E. P. (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 126, 1042–1054.
3. Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
4. Black, M. & Bewley, J. D. (2000). S*eed technology and its biological basis*. Sheffield academic Press Ltd, England. 419 pp.
5. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
6. Bradford, K. J., Chen, F., Cooley, M. B., Dahal, P., Downie, B., Fukunaga, K. K., Gee, O.H., Gurusinghe, S., Mella, R. A., Nonogaki, H., Wu, T. & Yim, K. O. (2000). Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. *Seed biology: advances and applications*. CAB International, Wallingford, UK, 231-251.
7. 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.
8. De Castro, R. D., van Lammeren, A. A. M., Groot, S. P. C., Bino, R. J. & Hilhorst, H. W. M. (2000). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology*, 122, 327-336.
9. Ernst, D., Bodemann, A., Schmelzer, E., Langebartels, C. & Sandermann, H. J. (1996). ß-1,3- Glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum L. cv. BEL* after ozone fumigation. *Journal of Plant Physiology*, 148, 215-221.
10. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. & Job, D. (2001). Proteomic analysis of Aarabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126, 835-848.
11. Groth, G. & Strotmann, H. (1999). New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF_0CF_1). *Physiology Plantarum*, 106, 142–148.
12. Hincha, D. K., Meins, F. Jr. & Schmitt, J. M. (1997). ß-1, 3-Glucanase is cryoprotective *in vitro* and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiology*, 114, 1077-1083.
13. Hoj, P. B. & Fincher, G. B. (1995). Molecular evolution of plant ß-glucan endohydrolases. *Plant Journal*, 7, 367-379.
14. Job, D., Capron, I., Job, C., Dacher, F., Corbineau, F. & Come, D. (2000). Identification of Germination-specific Protein Markers and their Use in Seed Priming Technology. Seed Biology: Advances and In: Proceedings of *the Sixth International Workshop on Seeds*, Merida, Mexico, 1999.
15. Komatsu, S., Abbasi, F., Kobori, E., Fujisawa, Y., Kato, H. & Iwasaki, Y. (2005). Proteomic analysis of rice embryo: an approach for investigating Gα protein-regulated proteins. *Proteomics*, 5, 3932-3941.

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. McDonald, M. B. (1995). Seed priming. In: Black, M. and Bewley, Y. D., (eds), *Seed technology and its biological basis*. Sheffield Academic Press CRC, Sheffield, England 9, 287-317.
18. Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethyleneglycol 6000. *Plant Physiology*, 51, 914-916.
19. Moosavi, A., Tavakkol Afshari, R., Sharifzadeh, F. & Aynehband, A. (2009). Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenoloxidase, and peroxidase activities of four Amaranth cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 353-358.
20. Ranal, M. A. & Santana, D. G. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29, 1-11.
21. Still, D., Dahal, P. & Bradford, K. (1997). A single-seed assay for endo-β-mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues. *Plant Physiology*, 113, 13-20.
22. Stock, D., Leslie, A. G. & Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286, 1700–1705.
23. Su, P. & Li, H. (2008). Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146, 1231-1241.
24. Sung, D. Y., Kaplan, F. & Guy, C. L. (2001). Plant hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiology Plantarum*, 113, 443–451.