

تجزیه پروتئوم بذر علف گندمی بلند (*Agropyronelongatum*) تحت شرایط تنش خشکی و دمای پایین

علی مرادی^۱، فرزاد شریف زاده^۲، رضا توکل افشاری^{۳*} و رضا معالی امیری^۲
۱. استادیار دانشگاه یاسوج، ۲ و ۳. دانشیاران و استاد پردیس کشاورزی منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۴ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۱۸)

چکیده

در طی دوره رسیدگی بذر و جوانه زنی پس از آن، تغییرات عمده‌ای در بیان ژن‌ها، فرایندهای متابولیک و وضعیت فیزیولوژیک بذر رخ می‌دهد. به منظور ارزیابی الگوی پروتئوم بذرهای علف گندمی بلند در شرایط متفاوت رشدی شامل: بهینه (دمای 20°C و پتانسیل آبی صفر بار)، تنش خشکی (دمای 20°C و پتانسیل آبی -6 بار) و تنش دمای پایین (دمای 6°C و پتانسیل آبی صفر بار) برای جوانه زنی قرار گرفتند. نمونه برداری از بذرهای خشک (زمان صفر) و بذرهای جوانه زده در شرایط بهینه، تنش خشکی و دمای پایین به ترتیب در ۱۴، ۳۶ و ۹۶ ساعت پس از شروع آزمایش (پیش از خروج ریشه چه) انجام شد. به منظور شناسایی پروتئین‌های استخراج شده از روش انگشت‌نگاری جرم پپتید^۱ استفاده شد، که بدین منظور از روش MS (MALDI-TOF)^۲ برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد. در این سه گروه مقایسه‌ای تعداد ۱۱۴ لکه دچار تنظیم افزایشی و یا کاهش شد. بیشترین میزان تغییرات در میان این گروه‌ها نیز در مقایسه بذر جوانه زده در شرایط تنش دمای پایین و بذر خشک با ۷۸ لکه تغییر یافته مشاهده شد، که از میان آنها ۶۵ لکه دچار تنظیم افزایشی و ۱۳ لکه دچار تنظیم کاهش شدند. کمترین میزان تغییرات نیز در مقایسه بذرهای جوانه زده در شرایط بهینه و بذرهای خشک مشاهده شد که ۳۰ لکه از آنها دچار تنظیم افزایشی و ۱۱ لکه دچار تنظیم کاهش شده بود. بررسی لکه‌ها در مقایسه بذرهای جوانه زده در شرایط بهینه (۱۴ ساعت پس از شروع جوانه زنی) با بذرهای خشک (زمان صفر) نشان داد که *Elonagtaion factor 2* با ۳/۲ برابر افزایش، ساکارز سینتاز ۳ با ۲/۷ برابر افزایش و فاکتور رونویسی با ۲/۳ برابر افزایش بیشترین میزان تغییرات افزایشی را نشان دادند. به علاوه در گروه تیماری مذکور اینورتاز دیواره سلولی با ۳/۹ برابر کاهش، پروتئین شوک گرمایی با ۲/۴ برابر کاهش و اکتین با ۲ برابر کاهش به ترتیب بیشترین میزان تغییرات کاهش را در بذرهای جوانه زده در شرایط بهینه نسبت به بذرهای خشک به خود نسبت دادند. مقایسه الگوی پروتئوم بذرهای جوانه زده در شرایط تنش خشکی با بذرهای خشک نشان داد که گلوبولین ۳ با ۲/۹ برابر افزایش، پروتئین شوک گرمایی با ۲/۶ برابر افزایش و پروتئین کیناز وابسته به کلسیم با ۲/۱ برابر افزایش بیشترین میزان افزایش را در این گروه مقایسه‌ای به خود نسبت دادند. در میان پروتئین‌های با تغییرات کاهش نیز پروکسی ریدوکسین، پروتئین شوک حرارتی، گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز و پروتئین شوک گرمایی در بذرهای جوانه زده به ترتیب ۴/۸، ۴/۲، ۳/۱ و ۳ برابر نسبت به بذرهای خشک کاهش نشان داد. مقایسه بذر جوانه زده در شرایط دمای پایین با بذر خشک نشان داد که زیرواحدهای مختلف گلوپتین و آنزیم بتا-آمیلاز بیشترین سهم را در لکه‌های افزایش یافته به خود نسبت دادند. در این میان فاکتور رونویسی با ۳/۲ برابر افزایش و گلوپتین با ۳/۱ برابر افزایش بیشترین افزایش را به خود نسبت دادند.

واژه‌های کلیدی: علف گندمی بلند، جوانه زنی، تنش خشکی، تنش دمای پایین، تجزیه پروتئوم

1. Peptide Mass Fingerprint
2. Mass Spectrometry (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight)

مقدمه

علف گندمی بلند (*Agropyronelongatum*) بومی ایران بوده که در سطح نسبتاً وسیعی در مراتع ایران حضور داشته و در برنامه‌های بذریاشی دیم‌زارهای کم‌بازده از آن استفاده می‌شود. این گیاه از نظر تولید علوفه سبز و خشک دارای اهمیت فراوانی بوده و در حفاظت دیم‌زارها از فرسایش‌های آبی و بادی کمک فراوانی می‌نماید. علف گندمی با مقاومت بالا به خشکی قابلیت توسعه فراوانی در مناطق خشک و نیمه خشک دارد. نوسانات شدید دمای و رطوبتی از ویژگی‌های مهم این مناطق بوده که منجر به کاهش میزان جوانه‌زنی و افزایش نرخ مرگ و میر گیاهچه‌های جوانه‌زده می‌شود. از دیدگاه مولکولی و بیوشیمیایی مطالعه جوانه‌زنی مشکل است، زیرا که یک جمعیت بذری به‌طور همزمان فرایندهای جوانه‌زنی را تکمیل نمی‌نماید (مکدونالد ۲۰۰۰). در شرایط مختلف تنش‌زای محیطی جوانه‌زنی بذر بسته به پس‌زمینه ژنتیکی بذر کاهش یافته یا متوقف می‌شود. رشد گیاه به میزان معنی‌داری تحت تأثیر تنش‌های غیر زنده مانند تنش سرما و خشکی قرار می‌گیرد. در این میان تنش خشکی عمده‌ترین عامل محدود کننده رشد گیاهان و تولید گیاه می‌باشد. تنش دمای پایین یکی دیگر از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر روی جوانه‌زنی بذر است. کاهش جوانه‌زنی بذر منجر به کاهش استقرار گیاهچه، استقرار غیریکنواخت و در نهایت کاهش عملکرد گیاه می‌شود. در چنین شرایطی گیاهان به‌منظور زنده ماندن و حفظ بقاء خود عکس‌العمل‌هایی از خود نشان می‌دهند. درک مکانیسم‌هایی که گیاه به‌وسیله آنها به تنش پاسخ می‌دهد دارای اهمیت حیاتی در مطالعات بیولوژی گیاهی است.

این مهم است که نقش ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در پاسخ به تنش را تجزیه نمود تا مکانیسم‌ها مولکولی تحمل به تنش بهتر درک شود. به‌دست آوردن اطلاعات در این باره جهت دستیابی به رشد متداوم و تولید گیاهان با تحمل بالا به تنش نیاز می‌باشد (پستوا و همکاران ۲۰۰۸).

تغییرات زیادی در رابطه با بیان ژن‌ها، تغییر ترکیبات غشایی و تجمع ترکیبات با وزن مولکولی پایین

در شرایط دمای پایین گزارش شده است. انتخاب برای بهبود جوانه‌زنی در یک تنش ممکن است جوانه‌زنی در شرایط تنش‌های دیگر را نیز بهبود بخشد. در گیاه گوجه فرنگی انتخاب برای جوانه‌زنی در شرایط یک تنش منجر به افزایش جوانه‌زنی در سرما و خشکی نیز شد (فولاد و همکاران ۲۰۰۳). اخیراً تعداد زیادی از ژن‌ها که دارای نقش در شرایط تنش خشکی و سرما هستند مورد بررسی قرار گرفته‌اند (سیکی و همکاران ۲۰۰۱). این ژن‌ها در تعدادی از مطالعات نیز به‌منظور بهبود تحمل به تنش مورد استفاده قرار گرفته‌اند پستوا و همکاران (۲۰۰۸) با ارزیابی cDNA بذرهای در حال جوانه‌زنی چغندر قند در شرایط تنش‌های خشکی و سرما مشاهده نمودند که ۱۵۸ ژن دچار تغییر شدند که ۸۸ ژن در شرایط تنش دچار تغییرات افزایشی و مابقی کاهش یافتند. ژن‌های افزایش یافته در متابولیسم کربوهیدرات، چرخه گلیکولیز و پنتوزفسفات فعال بوده و ژن‌های کاهش یافته نیز دارای نقش‌هایی در چرخه گلی-اکسالات، بیوسنتز پروتئین و پروتئین‌های با نقش چاپرونی بودند. در مطالعه‌ای دیگر سیکی و همکاران (۲۰۰۱) بیان ۱۳۰۰ ژن را در شرایط تنش خشکی و سرمای بر جوانه‌زنی بذر آرآبیدوپسیس بررسی و مشاهده نمودند که ۴۴ cDNA مخصوص سرما و ۱۹ تا مخصوص تنش خشکی بود. ژن‌های فعال شده در شرایط تنش سرما آنزیم‌های از بین برنده اکسیژن مانند کاتالاز، گلی‌اکسیلاز، و نیز آنزیم‌های چرخه گلیکولیز مانند انولاز بودند، در حالی که پرکسی‌ریدوکسین و اسکوربات پراکسیداز در هر دو شرایط افزایش بیان نشان دادند.

مطالعه پروتئوم یکی از راهکارهای اساسی برای مطالعات post-genomics است. زیرا امکان بررسی بخش‌های ترجمه شده ژنوم در هر مرحله رشد و نمو و شرایط محیطی را فراهم می‌کند. پروتئین‌های برش داده شده از ژلهای دوبعدی نه تنها قابل شناسایی و تعیین هویت هستند، بلکه کمیت آنها که در اصل کنترل ژنتیکی دارد از طریق نرم‌افزارهای کامپیوتری قابل تخمین است (دوین و زیوی ۱۹۹۹). درک صحیح فرایندهای مولکولی تحمل و یا حساسیت به تنش‌ها در

به صورت مشترک در آزمایشگاه بذر دانشگاه تهران و آزمایشگاه پروتئومیکس دانشگاه DTU (دانشگاه فنی دانمارک) دانمارک انجام شد. مقایسات صورت گرفته در بذرها شامل (۱) بذر جوانه زده در شرایط بهینه (دمای 20°C و پتانسیل آبی صفر بار) در مقابل بذر خشک؛ (۲) بذر جوانه زده در شرایط تنش خشکی (دمای 20°C و پتانسیل آبی صفر بار) در مقابل بذر خشک؛ و (۳) بذر جوانه زده در شرایط تنش دمایی پایین (دمای 6°C و پتانسیل آبی صفر بار) در مقابل بذر خشک بود.

بدین منظور از هر تیمار ۱۰ تکرار ۵۰ تایی بذر درون پتری دیش‌های شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی متر کاشته شده و بسته به نوع تیمار و شدت تنش (۱۴، ۳۶ و ۹۶ ساعت) از بذرها موجود در پتری دیش‌ها نمونه برداری (قبل از خروج ریشه‌چه) به عمل آورده و نمونه‌های بذری پس از برداشتن بلافاصله درون پوشش‌های آلومینیومی پیچیده شده و در نیتروژن مایع منجمد گردیدند و تا زمان استفاده درون یخچال 80°C - نگهداری شدند.

رسوب دادن و استخراج پروتئین‌ها^۲

استخراج و رسوبدهی پروتئین‌ها به روش TCA-acetone انجام شد. به منظور استخراج پروتئین‌ها برای هر یک از تیمارها یک گرم بذر درون حاوی چینی حاوی نیتروژن مایع کوبیده شد و پودر حاصله به فالدکون‌های ۱۵ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول TCA^3 سرد انتقال داده شدند.

تعیین غلظت پروتئین‌ها

مقدار پروتئین نمونه‌های حاصل با استفاده از روش برادفورد (۱۹۶۱) تعیین شد. برای این منظور از کیت خریداری شده از شرکت PIERCE Biotechnology (Coomassie Protein Assay Reagent Kit) استفاده شد.

اجرای بعداول الکتروفورز (Isoelectric focusing)

در این مرحله پروتئین‌ها برحسب بارالکتریکی آنها در یک میدان الکتریکی از یکدیگر تفکیک شدند. در این تحقیق از ژل‌های ازپیش آماده با pH های ثابت با عنوان IPG gradient (Immobiline pH) استفاده شد.

مرحله جوانه زنی می‌تواند به اصلاحگران در انتخاب لاینهای مناسب برای شرایط تنش و یا بهبود و توسعه ارقام مقاوم به تنش کمک نماید. در این راستا پروتئومیکس یکی از راه‌یافت‌های مهم برای درک اساس مولکولی جوانه زنی در شرایط تنش خشکی و سرما است تا تغییرات القاء شده توسط تنش در سطح پروتئین‌ها مورد شناسایی و بررسی قرار گیرد.

اگرچه مطالعات بسیاری در باره جنبه‌های فیزیولوژیکی و زراعی جوانه زنی در شرایط تنش‌زای مختلف وجود دارد، ولی در مطالعات انجام شده در رابطه با بررسی جنبه‌های مولکولی این جوانه زنی در شرایط تنش به‌ویژه رابطه بین جوانه زنی در شرایط تنش‌های مختلف اطلاعات کمی وجود دارد. بنابراین این امر برای محققین ضروری به نظر می‌رسد که تعیین نمایند آیا ژن‌های مشابهی یا متفاوتی در جوانه زنی بذر در شرایط تنش‌زای مختلف نقش دارند. چنین اطلاعاتی می‌تواند به توسعه ارقامی که دارای جوانه زنی بالایی در شرایط تنش‌های مختلف می‌باشند کمک نماید (فولاد و همکاران ۲۰۰۳).

هدف از این آزمایش شناسایی پروتئین‌های دخیل در جوانه زنی بذرها علف گندمی بلند در شرایط بهینه رطوبتی-دمایی، تنش خشکی و دمایی پایین بود. این پروتئین‌ها می‌توانند به محققین علوم بذر در شناسایی شاخص بنیه گیاهچه کمک نموده و به بهینه‌سازی تیمارهای تقویت کننده بذر کمک نماید. این تحقیق عمدتاً بر روی مراحل اولیه جوانه زنی (تا قبل از خروج ریشه‌چه) تمرکز نموده و وقایعی که پس از خروج ریشه-چه اتفاق افتاده و با رشد و استقرار گیاهچه مرتبط است را بررسی نکرده است.

مواد و روش‌ها

تیمارهای بذرها در تجزیه پروتئوم

به منظور ارزیابی افزایش یا کاهش بیان پروتئین‌ها در بذرها علف گندمی بلند در شرایط مختلف دمایی و رطوبتی و نیز چگونگی تغییر الگوی پروتئینی در طول دوره جوانه زنی^۱ (پیش از خروج ریشه‌چه)، آزمایشی

2. Protein precipitation and extraction
3. TrichloroAcetic Acid

1. Germination sensostrico

نتایج و بحث

بررسی تغییرات افزایشی و کاهش لکه‌های الگوهای پروتئینی در مقایسه بذرهای جوانه‌زده با بذرهای خشک در تیمارهای مختلف حرارتی و رطوبتی با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود که در این سه گروه مقایسه‌ای تعداد ۱۱۴ لکه دچار تنظیم افزایشی و یا کاهش شد. بیشترین میزان تغییرات در میان این گروه‌ها نیز در مقایسه بذر جوانه‌زده در شرایط تنش دمایی پایین و بذر خشک با ۷۸ لکه تغییر یافته مشاهده شد، که از میان آنها ۶۵ لکه دچار تنظیم افزایشی و ۱۳ لکه دچار تنظیم کاهش بود (شکل ۱ و ۲). کمترین میزان تغییرات نیز در مقایسه بذرهای جوانه‌زده در شرایط بهینه و بذرهای خشک مشاهده شد که ۳۰ لکه از آنها دچار تنظیم افزایشی و ۱۱ لکه دچار تنظیم کاهش شده بود (شکل ۱).

شرایط بهینه

بررسی لکه‌ها در مقایسه بذرهای جوانه‌زده در شرایط بهینه (۱۴ ساعت پس از شروع جوانه‌زنی) با بذرهای خشک (زمان صفر) نشان داد که لکه‌های ۹۹ (Elonagtaion factor EF2 با ۳/۲ برابر افزایش)، ۱۰۹ (ساکارز سینتاز ۳ با ۲/۷ برابر افزایش)، ۷۴ (فاکتور رونویسی با ۲/۳ برابر افزایش) و ۴۳ (شناسایی نشده با ۲/۲ برابر افزایش) بیشترین میزان تغییرات افزایشی را نشان دادند (جدول ۱).

نمونه‌ای از تغییرات افزایشی و کاهش لکه‌ها در این گروه در شکل ۳ آمده است.

پرولامین‌ها در گیاهان خانواده غلات عمده‌ترین پروتئین ذخیره‌ای بذر (۴۶ درصد) بذر هستند. این پروتئین‌ها در طی رسیدگی و بلوغ بذر بر روی پایه مادری تولید شده و سپس در طی فرایند جوانه‌زنی شکسته شده و توسط گیاهچه در حال سبز شدن به عنوان منبع غذایی اولیه استفاده می‌شود (شروی و هالفورد ۲۰۰۲، نونوگاکاکی و همکاران ۲۰۰۷). در میان لکه‌های افزایش یافته در طی فرایند جوانه‌زنی لکه‌های ۲۳، ۲۶، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۳ و ۱۲۸ به این گروه پروتئینی اختصاص داشتند. این پروتئین‌ها اغلب زیرواحدهای گلوٹنین با وزن مولکولی بالا بوده که در دامنه ۸۰ کیلوالتون و بیشتر پراکنده شده بودند.

به‌منظور تعیین بهینه pH مورد نیاز از نوارهایی^۱ با دامنه pH خطی بین ۱۰-۳ استفاده شد. نتایج اولیه نشان دادند که عمده‌ترین پراکنش لکه‌های پروتئینی در دامنه pH های ۴ تا ۷ بوده، لذا نوارهای با همین دامنه pH (IPG Strip pH: 4-7) جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. طول نوارها در این تحقیق ۱۱ سانتی‌متر انتخاب شد.

بعد دوم الکتروفورز (SDS-PAGE)

در این مرحله پروتئین‌هایی که پیش‌تر بر حسب بار الکتریکی جدا شده بودند بر حسب جرم مولکولی تفکیک شدند. برای این منظور از تانک الکتروفورز دوژلی Ease 560 و ژلهای آماده^۲ به ابعاد ۷×۱۰ سانتی‌متر (Nu-Page 4-12% Tris Zoom Gel, Invigtron, Germany) استفاده شد.

رنگ‌آمیزی ژل‌ها^۳

رنگ‌آمیزی ژل‌ها طبق روش کانگ و همکاران (۲۰۰۲) و با استفاده از کوماسی^۴ (CBB G250) صورت گرفت.

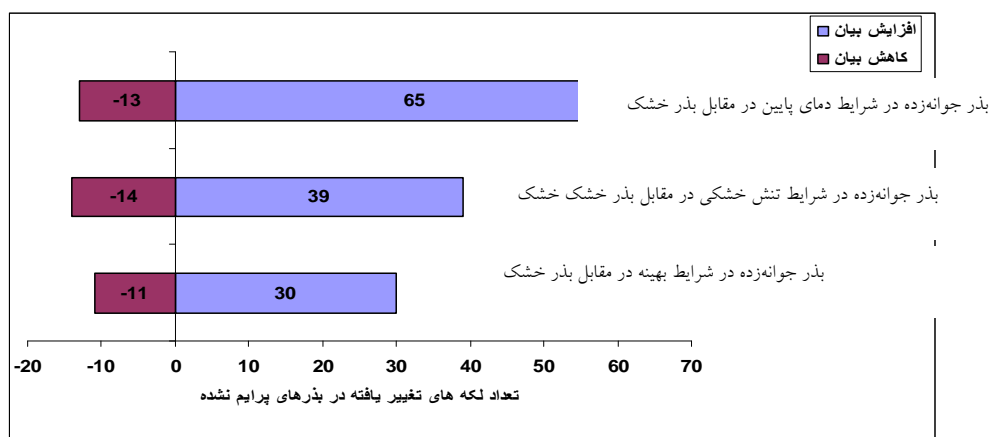
تجزیه و تحلیل تصاویر ژل‌های دوبعدی

پس از اسکن تصاویر جهت تجزیه و تحلیل لکه‌ها^۵ و شناسایی تغییرات موجود بین تیمارها از نرم افزار ProgenesisSamespot (Version 3.3; Nonlinear Dynamics) استفاده گردید.

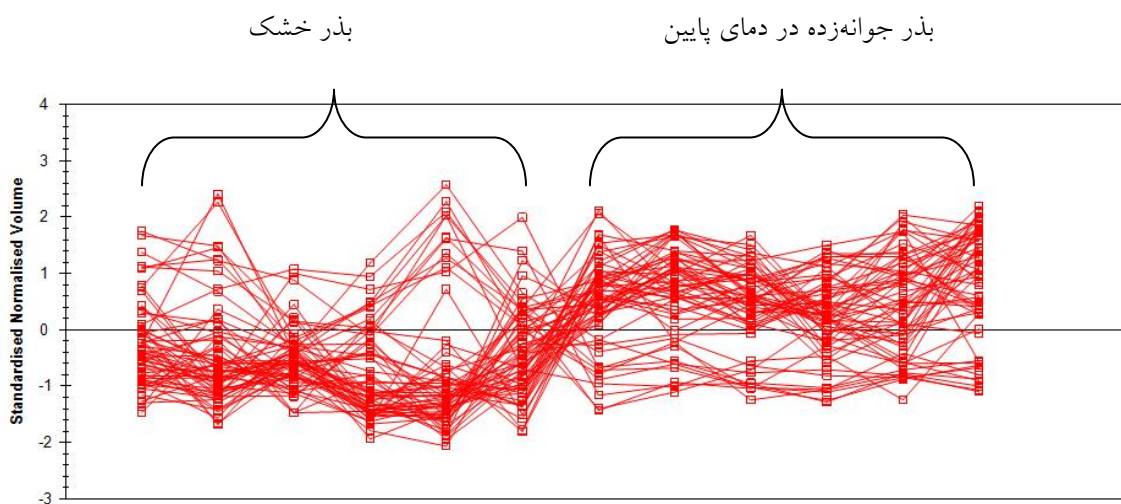
شناسایی پروتئین‌ها از طریق روش طیف سنجی جرمی^۶ و جستجو در بانک‌های اطلاعاتی

به‌منظور شناسایی پروتئین‌های استخراج شده از روش انگشت‌نگاری جرم پپتید^۷ استفاده شد، که بدین منظور ابتدا از روش^۸ (MALDI-TOF) MS برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد. در ادامه برای لکه‌هایی که به روش مذکور شناسایی نشده بودند، دو تا ۵ پیک از لیست پیک‌های به‌دست آمده از تجزیه MS انتخاب شده و تجزیه MS-MS (MALDI-TOF/ TOF) انجام شد.

1. Strip
2. Pre-cast Gels
3. Gel staining
4. Commaessie Brilliant Blue
5. Spots
6. Identification of Proteins by Mass Spectrometry (MS)
7. Peptide Mass Fingerprint
8. Mass Spectrometry (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight)



شکل ۱- تعداد لکه های تغییر یافته پروتئینی در طی مقایسات انجام شده میان بذرهای جوانه زده در شرایط بهینه (دمای 20°C و پتانسیل آبی صفر بار)، تنش خشکی (دمای 20°C و پتانسیل آبی -6 بار) و دمای پایین (دمای 6°C و پتانسیل آبی صفر بار) با بذرهای خشک.



شکل ۲- دندروگرام الگوی افزایش یا کاهش بیان پروتئین ها در مقایسه بذر جوانه زده در دمای پایین (دمای 6°C و پتانسیل آبی صفر بار) با بذر خشک. هر خط بیانگر تغییرات یک لکه بوده و نقاط روی خطها نشان دهنده تکرارهای درون تیمارها است.

آنزیم های آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز شکسته شده و ترکیباتی مانند گلوکز، مالتوز و لیمیت دکسترین^۱ تولید می شود (بیولی و بلک ۱۹۹۴). به هر حال از آنجا که بیش از ۷۰ درصد ذخیره بذری غلات را کربوهیدراتها تشکیل می دهد بنابراین چندان دور از انتظار نیست که پروتئین های دخیل در متابولیسم نشاسته سهم عمده ای

یکی دیگر از ترکیبات ذخیره ای بذر نشاسته می باشد. این ترکیب به دو فرم آمیلوز و آمیلوپکتین که هر دو پلیمرهای گلوکز هستند تشکیل شده است. بسیاری از غلات دارای ۷۵-۵۰٪ آمیلوپکتین و ۲۵-۲۰ درصد آمیلوز می باشند. در طی فرایند جوانه زنی پیوندهای گلیکوزیدی مولکول های نشاسته توسط

1. Limit Dextrin

هیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل (OH) را احیا کنند. این آنتی اکسیدان نقش مهمی در حفظ یکپارچگی^۱ هسته در طی دوره خشک شدن بذر دارد (استاسی و همکاران ۱۹۹۹). استاسی و همکاران (۱۹۹۹) عقیده دارند که ۱-سیس پروکسی ریدوکسین فقط در بذرهایی تجمع می‌یابد که تحمل بالایی به تنش خشکی دارند. فیینی و همکاران (۲۰۰۲) مشاهده نمودند که پروتئین پروکسی ریدوکسین در ابتدای فاز خشک شدن در بذر جو تجمع یافته و با جوانه‌زنی بذر کاهش یافت.

در میان لکه‌های با کاهش بیان، لکه‌های ۴۰۵، ۴۰۶، ۴۰۷، ۴۱۴ و ۴۱۷ به گروهی از پروتئین‌های شوک گرمایی به نام پروتئین‌های شوک گرمایی کوچک (sHSPs) اختصاص داشتند. شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه sHSPsها در محافظت از اجزاء سلولی در طی فرایند اکتساب تحمل به خشکی در طی دوره رسیدگی بذر و آبیگری بذر در طی فرایند جوانه‌زنی نقش دارند (ویمر و همکاران ۱۹۹۶). این پروتئین‌ها از توده‌ای شدن غیرقابل برگشت سایر پروتئین‌ها در طی فرایند خشک شدن جلوگیری نموده و به تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها^۲ و سازماندهی آنها در طی فرایند آبنوشی کمک می‌نماید (ویمر و ویرلینگ ۲۰۰۰). به‌علاوه گزارش شده است که sHSPsها در تشکیل ماتریکس شیشه‌ای^۳ در طی مرحله اکتساب تحمل به خشکی در بذر نیز ایفای نقش می‌نمایند. تشکیل این ماتریکس در سلول از حرکت‌های هرز ماکرومولکول‌ها جلوگیری کرده و منجر به حفاظت از غشاء سلولی و پروتئین‌های سیتوپلاسمی در طی مرحله اکتساب تحمل به خشکی می‌شود (والکرز و همکاران ۱۹۹۸). sHSPsها به‌طور بالقوه در همه موجودات زنده در شرایط دمایی بالا سنتز می‌شوند. وزن مولکولی این پروتئین‌ها به فرم تک‌واحدی از ۱۵ تا ۴۲ کیلودالتون متغیر است و از پیوستن حدود ۹ تا ۳۰ زیرواحد از این پروتئین‌ها فرم‌های چندواحدی^۴ نیز تشکیل می‌شوند (ویمر و ویرلینگ ۲۰۰۰).

از آنزیم‌های فعال شده در طی جوانه‌زنی بذر را به‌خود اختصاص دهند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان فرم‌های مختلف بتا-آمیلاز (لکه‌های ۱۸۹، ۱۹۲، ۱۹۴، ۲۰۱) و نیز آنزیم سنتز ساکارز (لکه ۱۷۵) در طی فرایند جوانه‌زنی در مقایسه با بذر خشک بین ۱/۸-۱/۵ برابر افزایش یافت. حاصل فرایند هیدرولیز نشاسته بایستی به‌صورت ساکارز تولید شده و به ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های در حال رشد انتقال یابد. مشاهده شد که عمده‌ترین آنزیم دخیل در متابولیسم ساکارز یعنی ساکارز سینتاز (لکه ۱۰۹ با ۲/۷ برابر افزایش) نیز در بذرهایی جوانه‌زده بیشتر از بذرهایی خشک بود. این آنزیم UDP-گلوکز حاصل از هیدرولیز نشاسته را با فروکتوز ترکیب نموده و ساکارز تولید می‌نماید. به‌علاوه این آنزیم فعالیت بالایی در بافت‌های مصرف کننده ساکارز داشته و به نظر می‌رسد که مهم‌ترین نقش را در شکستن ساکارز داشته باشد و اسکلت کربنی مورد نیاز برای فعالیت‌های تنفسی و رشد گیاهچه در حال رشد را در اختیار آن می‌گذارد (ویمر و همکاران ۱۹۹۶).

سرپین‌ها (serin protease inhibitors) گروهی از آنزیم‌های بازدارنده پروتئاز بوده که در تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش مهمی دارند. این پروتئین‌ها حدود ۴ درصد از پروتئین‌های محلول بذر را تشکیل داده و نقش مهمی در مهار غیر قابل برگشت پروتئازها دارند (روبرتس و هجگارد ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان بیان این پروتئین (لکه‌های ۲۳۶ و ۲۳۷ با ۱/۵ برابر افزایش) در طی جوانه‌زنی در شرایط بهینه افزایش یافت. به‌علاوه در گروه تیماری مذکور لکه‌های ۲۹۰ (اینورتاز دیواره سلولی با ۳/۹ برابر کاهش)، ۳۴۱ (لکه شناسایی نشده با ۳/۳ برابر کاهش)، ۴۱۴ (پروتئین شوک گرمایی ۱۷ با ۲/۴ برابر کاهش) و ۲۸۶ (اکتین با ۲ برابر کاهش) به ترتیب بیشترین میزان تغییرات کاهشی را در بذرهایی جوانه‌زده در شرایط بهینه نسبت به بذرهایی خشک به‌خود نسبت دادند. در این گروه تیماری دو لکه ۳۵۲ و ۳۶۳ به ترتیب با ۱/۵ و ۱/۷ برابر کاهش به پروتئین پروکسی ریدوکسین تعلق داشتند (جدول ۶-۱۰ و شکل ۶-۷). پروتئین پروکسی ریدوکسین زیرمجموعه آنتی‌اکسیدان‌های وابسته به تیول بوده که می‌توانند ترکیباتی مانند پراکسید

1. Integrity
2. Protein Refolding
3. Glassy Matrix
4. Oligomeric

نیافت، بلکه مقدار آن در بذره‌های جوانه‌زده ۲ برابر کمتر از بذره‌های خشک بود.

تنش خشکی

در مقایسه الگوی پروتئوم بذره‌های جوانه‌زده در شرایط تنش خشکی با بذره‌های خشک نشان داد که لکه‌های ۱۴۰ (گلوبولین ۳ با ۲/۹ برابر افزایش)، ۸۷ (پروتئین شوک گرمایی ۱۰۱ با ۲/۶ برابر افزایش)، ۷۹ (شناسایی نشده با ۲/۶ برابر افزایش) و ۲۰۴ (پروتئین کیناز وابسته به کلسیم با ۲/۱ برابر افزایش) بیشترین میزان افزایش را در این گروه مقایسه‌ای به خود نسبت دادند. در میان پروتئین‌های با تغییرات کاهشی نیز حجم لکه‌های ۳۵۲ (پروکسی ریدوکسین)، ۴۱۴ (پروتئین شوک حرارتی) ۳۴۱ (شناسایی نشده)، ۴۸۲ (گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز) و ۴۰۵ (پروتئین شوک گرمایی) در بذره‌های جوانه‌زده به ترتیب ۴/۸، ۴/۸، ۴/۲، ۳/۱ و ۳ برابر نسبت به بذره‌های خشک کاهش نشان داد (جدول ۲). کاهش بیان پروتئین‌هایی مانند گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز، پروتئین شوک گرمایی و پروکسی ریدوکسین با جوانه‌زنی بذر در کلزا نیز گزارش شده است (سوندا و همکاران ۲۰۰۵). نمونه‌ای از لکه‌های با تغییرات افزایشی و کاهشی در شکل ۳ آمده است.

همانگونه که در شرایط بهینه مشاهده شد جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش خشکی نیز منجر به افزایش پروتئین ذخیره‌ای گلوتهین (لکه‌های ۱۲۸، ۱۳۱)، سرپین (لکه-های ۲۲۲۵، ۲۳۶، ۲۴۱) و نیز آنزیم‌های تجزیه نشاسته یعنی بتا-آمیلاز (لکه‌های ۱۸۲، ۱۸۹، ۱۹۴، ۲۰۱) و سنتزکننده نشاسته (لکه‌های ۱۷۱، ۱۷۲، ۱۷۳، ۱۷۵) شد (جدول ۲). به نظر می‌رسد که نشاسته به‌عنوان یک مخزن موقت ذخیره‌ای کربن در طی فرایند جوانه‌زنی عمل نموده که اسکلت کربنی اضافی حاصل از سیال شدن و تجزیه ذخایر بذری (پروتئین‌های ذخیره‌ای و لیپیدها) را تا زمان نیاز درون خود نگهداری می‌کند. در راستای نتایج این آزمایش افزایش فعالیت آنزیم سنتز کننده نشاسته پیوندی گرانول^۳ و به تبع آن افزایش غلظت نشاسته در محور زیرلپه و بالای لپه در بذر در حال جوانه‌زنی *Pinusedulis* گزارش شده است (مورفی

گروه دیگری از لکه‌ها که در طی دوره جوانه‌زنی تجمع یافتند به فاکتورهای دخیل در رونویسی (فاکتور رونویسی؛ لکه ۷۴ با ۲/۳ برابر افزایش) و ترجمه (فاکتور طول‌شدن^۱ EF2؛ لکه ۹۹ با ۳/۳ برابر افزایش) تعلق داشتند (جدول ۱). EF2 یک فاکتور وابسته به کلروپلاست بوده، که افزایش بیان آن در آزمایش حاضر نشان‌دهنده این است که دستگاه ترجمه‌ای پلاستید در طی مراحل اولیه جوانه‌زنی فعال شده تا سیستم فتوسنتزی به‌کمک ژن‌های واقع در پلاستید ساخته شود (گالاردو و همکاران ۲۰۰۱). افزایش ژن‌های وابسته به آبنوشی بذر مانند فاکتورهای رونویسی و کوفاکتورهای ترجمه در کلزا نیز گزارش شده است (گروت و همکاران ۲۰۰۲).

اسکلت سلولی مهمترین اندامک پایه‌ای درون سلولی بوده که دارای نقشی کلیدی در حیات پروکاریوتها می‌باشد. اسکلت سلولی به‌عنوان محل اصلی فعالیت‌های سلولی درگیر در واکنش به محرک‌های محیطی (نظیر نقل و انتقالات پروتئین‌ها، تغییرات در فعالیت پروتئین کینازها، فسفاتازها که ممکن است وابسته و یا مستقل از Ca^{2+} باشد) مد نظر قرار گیرد (اوروار و همکاران ۲۰۰۰). بذره‌های در حال جوانه‌زنی به تیوبولین برای ساختن میکروتوبولها نیاز دارند که در فرایندهای تقسیم سلولی، بزرگ شدن سلولی، جدایی کروموزوم‌ها و سیتوکینیز^۲ نقش دارد. افزایش بیان پروتئین تیوبولین (لکه ۲۱۳ با ۱/۵ برابر افزایش) در آزمایش حاضر شاهده بر این ادعا است. یکی دیگر از پروتئین‌های دخیل در فرایند فوق اکتین می‌باشد. اکتین در طی جوانه‌زنی بذر افزایش یافته و پس از جوانه‌زنی در همان حالت باقی می‌ماند، این مولکول نیز بخشی از اسکلت سلولی بوده که نه‌تنها در بزرگ شدن سلول نقش دارد بلکه در سلول‌هایی که به لحاظ متابولیکی فعال هستند در ارتباط سلول به سلول ایفای نقش می‌نماید (فاریا و همکاران ۲۰۰۷). بر خلاف آنچه انتظار می‌رفت بیان این پروتئین (لکه ۲۸۶) در آزمایش حاضر نه‌تنها در طی جوانه‌زنی افزایش

1. Elongation factor
2. cytokinesis

3. Granule bound starch synthase

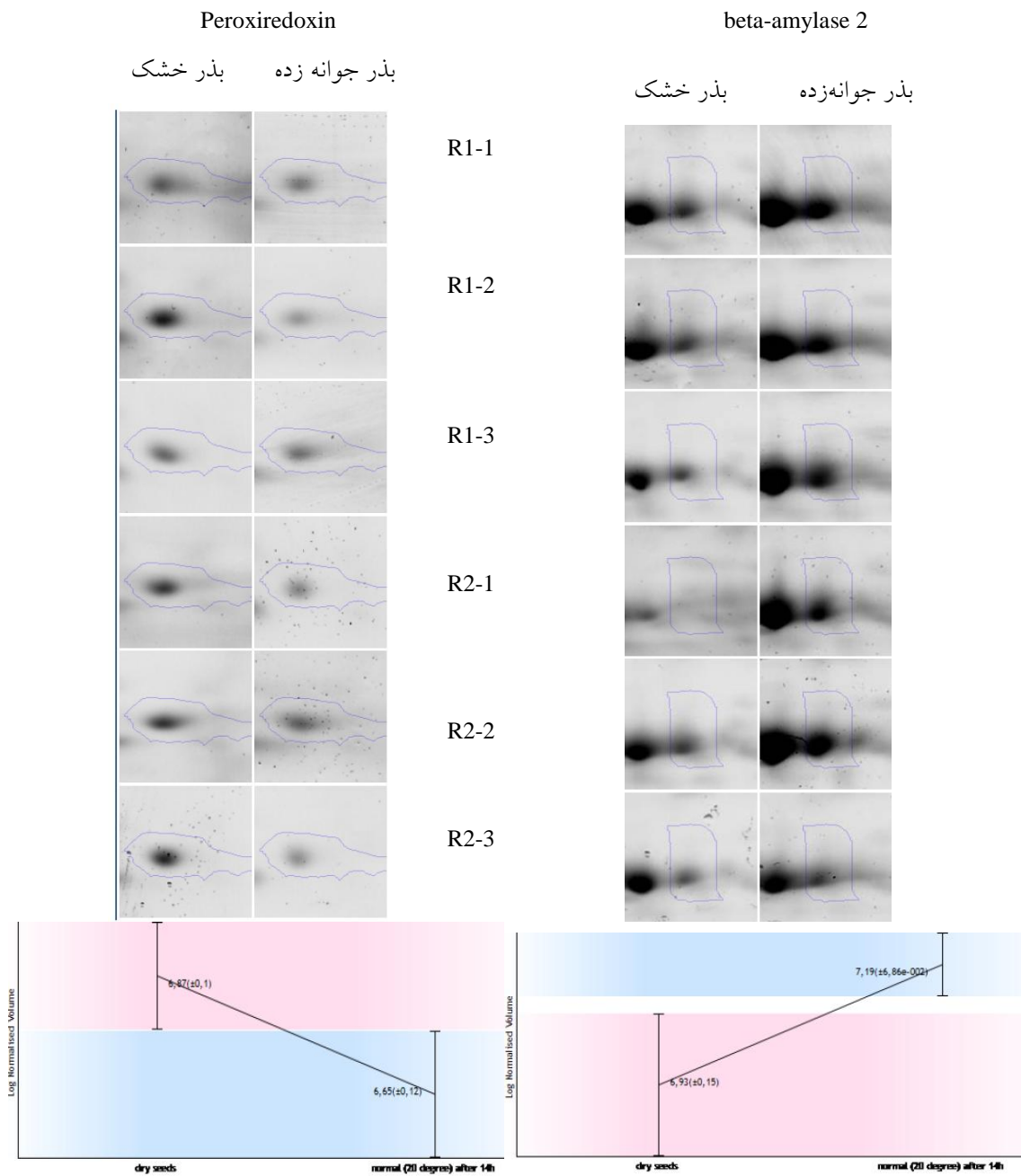
نشاسته تبدیل می‌شود. نرخ تبدیل ساکارز به نشاسته در بذره‌های درحال جوانه‌زنی تا ۵۰ درصد نیز گزارش شده است (مورفی و هامر ۱۹۹۴).

و هامر (۱۹۹۴). آنها چنین اظهار داشتند که در طی فرایند جوانه‌زنی لیپیدهای ذخیره‌ای طی فرایند اکسیداسیون بتای اسیدهای چرب به ساکارز تبدیل شده که ساکارز خود نیز توسط آنزیم سنتز کننده نشاسته به

جدول ۱- پلی پپتیدهای که فراوانی آنها به میزان معنی دار در مقایسه بذره‌های جوانه زده در شرایط بهینه (دمای ۲۰°C و پتانسیل آبی صفر بار) با بذره‌های خشک متفاوت بود.

شماره لکه بر روی ژل بعد دوم	نام پروتئین	میزان تغییرات	سطح معنی‌داری	شماره اکسشن ^۲	وزن مولکولی (کیلودالتون)		pI
					تئوری	آزمایشی	
23	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.7	0.01	gi 259130271	87.0	140	5.2
26	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.5	0.01	gi 259130271	87.0	140	5.35
36	NI	1.7	0.005	-	-	140	5.45
43	NI	2.2	0.05	-	-	140	6.8
66	NI	1.7	0.025	-	-	125	6.4
68	NI	1.5	0.017	-	-	128	6.5
74	transcription factor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2.3	5.01E-04	gi 186478394	102.5	108	6.2
77	NI	1.5	0.031	-	-	103	6.05
80	NI	1.5	0.037	-	-	125	5.25
95	HMW glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	2.1	0.01	gi 170743	88.7	109	6
99	Elongation factor EF-2	3.3	0.005	TC246839	109.4	109	6.6
100	high-molecular-weight glutenin subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	1.7	0.035	gi 32328645	15.4	125	6.45
109	sucrose synthase 3 [<i>Oryza sativa</i>]	2.7	0.012	gi 1196837	93.7	100	6.4
113	glutenin HMW subunit 1Dy [<i>Aegilops cylindrica</i>]	2.1	0.008	gi 13992211	70.9	100	6.65
128	high molecular weight glutenin [<i>Lophopyrum elongatum</i>]	2.1	0.023	gi 67975067	64.4	80	6.7
131	high molecular weight glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	1.5	0.024	gi 255957523	80.3	78.5	5.45
171	granule bound starch synthase 1 [<i>Triticum aestivum</i>]	1.7	0.001	gi 17736918	59.6	59	5.4
173	Granule-bound starch synthase	1.8	4.80E-05	TC239297	56.1	60	5.6
175	Granule-bound starch synthase	1.5	9.40E-04	-	56.1	56.5	6.7
189	beta-amylase 2 [<i>Hordeum vulgare</i>]	1.8	8.60E-04	gi 61006818	57.4	55.5	5.3
192	beta-amylase 1 [<i>Hordeum vulgare</i>]	1.5	0.001	gi 38349539	57.9	57.5	5.3
194	Beta-amylase	1.5	9.20E-04	gi 3334120	56.9	56	5.3
201	Beta-amylase	1.6	0.007	gi 3334120	56.9	56	5.2
206	disulfide isomerase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.5	0.034	TC251262	58.6	55	6
213	Tubulin alpha-2 chain	1.5	0.004	gi 8928422	50.4	49.5	5.15
236	Serpin	1.5	0.006	gi 75282265	43.3	43.5	6.25
237	serpin 1 [<i>Triticum aestivum</i>]	1.5	0.016	gi 224589266	43.3	30	5.58
286	Actin-100 - [<i>Solanum tuberosum</i>]	-2	0.001	ACT12_SOL TU	39.8	40	6.05
290	putative cell wall invertase [<i>Oryza sativa</i>]	-3.9	6.20E-05	gi 29788864	39.9	39	5.45
341	NI	-2.5	4.30E-04	-	-	33	5.25
352	1-Cys peroxiredoxin	-1.5	0.024	gi 1710077	24.2	30	6.05
363	peroxiredoxin [<i>Triticum aestivum</i>]	-1.7	0.002	gi 190684059	24.2	28.5	6.65
405	17.4 kDa class I heat shock protein 3 [<i>Sorghum bicolor</i>]	-1.7	0.017	gi 242041463	17.8	21	5.8
406	ATHSP17.4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-1.5	0.027	gi 15231372	17.4	20.5	5.45
407	heat shock protein 16.9. [<i>Triticum aestivum</i>]	-1.6	0.012	TC234994	21.5	20	6.3
414	Heat shock protein 17	-2.4	0.002	gi 123545	16.9	20	5.78
417	17.4 kDa heat shock protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>	-1.9	2.30E-04	HSP11_ARA TH	17.4	18	5.25
427	NI	-1.5	0.018	-	-	18	5.85

*در ستون میزان تغییرات، اعداد بدون علامت و با علامت منفی (-) به ترتیب نمایانگر مقدار افزایش و یا کاهش حجم لکه‌ها هستند. ۱. NI؛ شناسایی نشده (Not Identified) ۲. شماره اکسشن (Accession number) در بانک‌های اطلاعاتی NCBI، TIGR و SWISS-Prot ۳. نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric Point) یا pH هر لکه بر روی ژل



شکل ۳: نمونه‌ای از تنظیم افزایشی (لکه ۱۹۴ بتا-آمیلاز؛ سمت راست) و کاهش (لکه ۳۶۳ پروکسی ریدوکسین؛ سمت چپ) لکه‌ها در مقایسه تیمار بذر جوانه‌زده با بذر خشک در شرایط بهینه.

بود. در این شرایط پروتئین‌های ذخیره‌ای جدیدی مانند گلوبولین (لکه ۱۴۰)، اونین^۱ (لکه ۲۶۹) نیز افزایش بیان

با مقایسه الگوی پروتئینی بذرهای جوانه‌زده در شرایط بهینه و تنش خشکی مشاهده شد که دامنه پروتئین‌های تغییر یافته در بذرهای جوانه‌زده در شرایط تنش خشکی بیش از بذرهای جوانه‌زده در شرایط بهینه

1. Avenin

انتهای ریبوزوم کاتالیز می‌کند. افزایش بیان این پروتئین در طی جوانه‌زنی بذر و در گیاهانی مانند ذرت و کلزا نیز گزارش شده است (سوئدا و همکاران ۲۰۰۵، کولیپارا و همکاران ۲۰۰۹). فعالیت فاکتور طویل شدن ترجمه به همراه پروتئین‌های فاکتورهای آغازگر ترجمه به ATP نیازمند است. افزایش فعالیت ATP synthase FO subunit 1 (لکه ۱۸۱ با ۱/۷ برابر افزایش) را نیز می‌توان بر این اساس توجیه نمود (جدول ۲). این بدین معنی است که در این شرایط نیاز به انرژی نیز افزایش پیدا می‌کند. پروتئین ATP-سینتاز در غشای میتوکندری فعال بوده و با استفاده از شیب پروتئینی حاصل از شکست پیرووات در چرخه کربس نوکلئوتید ADP را با Pi ترکیب نموده ATP تولید می‌کند. افزایش همزمان فعالیت پروتئین‌های فاکتور طویل شدن ترجمه و ATP-سینتاز در برنج نیز گزارش شده است (کوئی و همکاران ۲۰۰۵).

از میان پروتئین‌های با بیان متفاوت در بذر خشک و بذر جوانه‌زده، در بذر جوانه‌زده یک ایزوفرم اکتین (لکه ۲۴۲) برابر نسبت به بذر خشک افزایش و دیگری (لکه ۲۸۶) ۱/۵ برابر کاهش یافت. اکتین جزء اساسی اسکلت سلولی بوده و در تعدادی از فرایندهای سلولی مانند جریانات سیتوپلاسمی، تقسیم سلول، طویل شدن سلول، رشد انتهایی و ایجاد قطبیت سلولی نقش دارد (کاست گیلیاند و همکاران ۲۰۰۳). از آنجا که تک-واحدهای اکتین می‌توانند به صورت خودبه‌خودی با هم جفت شوند، لذا تعادل میان تک‌واحدها و چندواحدهای این پروتئین ممکن است توسط عوامل محیطی تحت تأثیر قرار گیرد که به صورت افزایش یا کاهش بیان یک ایزوفرم خاص تظاهر پیدا می‌کند. ویلانوا و همکاران (۱۹۹۹) با مطالعه mRNA ایزوفرم‌های مختلف اکتین مشاهده نمودند که یک ایزوفرم در طی ۴۸ ساعت پس از جوانه‌زنی افزایش و سپس کاهش یافت. این در حالی است که ایزوفرم دیگری تا ۷۲ ساعت پس از شروع جوانه‌زنی فعال و سپس کاهش یافت. به هر حال بیان متفاوت ایزوفرم‌های مطالعه شده در آزمایش

نشان دادند. گلوبولین‌ها نیز از دیگر پروتئین ذخیره‌ای جنین غلات هستند، اما درصد کمی از پروتئین کل بذر (۵-۱۰ درصد) را به خود نسبت می‌دهند. همانند گلوٹنین، اونین و گلوبولین نیز در طی رسیدگی و بلوغ بذر بر روی پایه مادری تولید شده و سپس در طی فرایند جوانه‌زنی شکسته شده و توسط گیاهچه در حال سبز شدن به عنوان منبع غذایی اولیه استفاده می‌شود (شروی و هالفورد ۲۰۰۲).

اگرچه در جوانه‌زنی در شرایط تنش خشکی نیز همانند جوانه‌زنی در شرایط بهینه بیان برخی از پروتئین‌های شوک حرارتی sHSPs (لکه‌های ۳۸۱، ۴۰۵، ۴۱۴، ۴۱۷، ۴۲۱ دارای وزن‌های مولکولی ۱۶/۹ تا ۲۷ کیلودالتون) و پروکسی‌ریدوکسین (لکه ۳۵۲ وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون) کاهش یافت (جدول ۲)، ولی در این میان مشاهده شد حجم لکه‌های ۸۷ (پروتئین شوک گرمایی ۱۰۱)، ۴۰۷ (پروتئین شوک گرمایی ۱۶/۹) و ۱۹۷ (پروتئین تیوریدوکسین پراکسیداز با ۱/۷ برابر افزایش) متعلق به این دو پروتئین با جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش خشکی افزایش یافت. به نظر می‌رسد فرم‌های مختلف پروتئین شوک گرمایی ممکن است دارای نقش‌های متفاوتی نیز باشند (کوئیچ و همکاران ۲۰۰۰). این بدین معنی است که نقش حفاظتی پروتئین‌های دخیل در تحمل به خشکی در بذر نه تنها در طی رسیدگی بذر دارای اهمیت است بلکه در طول دوره جوانه‌زنی در شرایط تنش خشکی نیز نقش مهمی بازی می‌کنند. هانگ و ویرلینگ (۲۰۰۰) به نقش پروتئین شوک گرمایی ۱۰۱ در جوانه‌زنی بذر آرابیدوپسیس در شرایط تنش گرمایی پی برده و مشاهده نمودند که بیان Antisense این پروتئین منجر به کاهش تحمل به تنش گرمایی در مرحله جوانه‌زنی این گیاه شد.

فاکتور طویل شدن ترجمه، (لکه ۲۱۶ با ۱/۷ برابر افزایش) پروتئین دیگری بود که با جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش خشکی افزایش یافت. همان طور که از نام این پروتئین نیز پیداست، این فاکتور متشکل از مجموعه‌ای از پروتئین‌ها بوده که طویل شدن زنجیره پلی‌پپتیدی در طی فرایند ترجمه را تسهیل می‌نمایند. این پروتئین‌ها انتقال tRNA و mRNA را به سمت

بذر تجمع می‌یابد و نقش مهمی در تحمل به خشک- شدن بذر دارد. افزایش بیان این پروتئین در افزایش تحمل به خشکی، شوری و سرما نیز گزارش شده است (بنساگر ۲۰۰۷). پروتئین بازدارنده آلفا-آمیلاز (لکه‌های ۴۷۶ و ۵۶۳ به ترتیب با ۱/۵ و ۱/۷ برابر کاهش) نیز یکی دیگر از پروتئین‌هایی بود که در بذر خشک بیشتر از بذر جوانه‌زده بود. این پروتئین در طی دوره پرشدن دانه افزایش یافته و بذر را از صدمه حشرات حفظ نموده و در طی فرایند جوانه‌زنی بذر کاهش می‌یابد (فینی و همکاران ۲۰۰۴).

تنش دمای پایین

بررسی لکه‌های با بیشترین تغییرات افزایشی در طی مقایسه بذر جوانه‌زده در شرایط دمای پایین با بذر خشک نشان داد که زیرواحدهای مختلف گلوٹنین (لکه-های ۲۳، ۲۶، ۴۳، ۴۴، ۴۹، ۵۳، ۵۷، ۶۵، ۱۱۳، ۱۳۰، ۱۴۹) و آنزیم بتا-آمیلاز (لکه‌های ۱۶۲، ۱۷۹ و ۲۱۲) بیشترین سهم را در لکه‌های افزایش یافته به خود نسبت دادند. در این میان لکه‌های ۴۳ (شناسایی نشده با ۳/۳ برابر افزایش)، ۷۴ (فاکتور رونویسی با ۳/۲ برابر افزایش) و ۱۱۳ (گلوٹنین با ۳/۱ برابر افزایش) بیشترین افزایش را به خود نسبت دادند (جدول ۳). افزایش فعالیت آنزیم‌های سنتز نشاسته در شرایط دمای پایین در گیاهان دیگری مانند کلزا (پستوا و همکاران ۲۰۰۸) نیز گزارش شده است.

از میان پروتئین‌های افزایش یافته آنزیم‌های پیرووات دکربوکسیلاز (لکه ۱۵۵ پیرووات دکربوکسیلاز با ۱/۹ برابر افزایش)، فسفوانول پیرووات سینتاز (لکه ۱۶۰ با ۲/۴ برابر افزایش) و انولاز (لکه ۲۱۰ با ۱/۸ برابر افزایش) در چرخه‌های گلوکوژنز، گلیکولیز و تنفس غیرهوازی فعال هستند. این پروتئین‌ها به همراه آنزیم‌های متابولیسم نشاسته مانند بتا-آمیلاز می‌توانند مسیر تنفسی بذر در حال جوانه‌زنی را از مسیر هوازی^۳ به غیرهوازی^۴ تغییر دهند. در شرایطی که میزان اکسیژن در دسترس محدود است تنفس میتوکندریایی محدود شده و نسخه‌برداری ژن‌ها به سمت تولید آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات‌ها

حاضر ممکن است ناشی از تفاوت در زمان بیان آنها و نیز تفاوت در نقش آنها در واکنش به تنش خشکی باشد. از طرفی، غشاء سلولی به‌عنوان جایگاه اولیه برای دریافت سیگنال مرتبط با محرک‌های محیطی مانند خشکی و سرما است. با تغییرات سیالیت غشاء و برهم خوردگی نظم و بازاریابی^۱ میکروتیوبول‌ها و میکروفیلانته‌های اکتینی جریان ورودی کلسیم به درون سلول تحریک می‌شود و آبشار سیگنال‌دهی مرتبط با کلسیم فعال می‌شود. در چنین شرایطی تغییرات اکتین به‌عنوان واسطه برای انتقال سیگنال بیرونی به درون سلول و ارتباط دادن آن با مسیر کلسیم وابسته است (اوروار و همکاران ۲۰۰۰). تغییر در بیان اکتین به واسطه محرک‌های بیرونی (مانند تنش سرما و خشکی) و تیمارهای هورمونی در آرابیدوپسیس و برنج گزارش شده است (گیلیاند و همکاران ۲۰۰۳، لی و همکاران ۲۰۰۸). در راستای چنین تفسیری افزایش بیان پروتئین کیناز وابسته به کلسیم (لکه ۲۰۴ با ۲/۱ برابر افزایش) در بذر جوانه‌زده در مقایسه با بذر خشک را نیز می‌توان توجیه نمود (جدول ۲).

پروتئین گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GADPH) پروتئین دیگری بود که بیان آن در طی جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش خشکی کاهش یافت (جدول ۲). این پروتئین نیز یکی از پروتئین‌های دارای نقش حفاظتی بوده که در طی فرایند خشک شدن بذر درون بذر تجمع نموده و سپس در طی جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. GADPH در شرایط تنش خشکی و کم اکسیژنی نیز در بذر در حال جوانه‌زنی تجمع می‌یابد. نقش عمده این آنزیم در شرایط کم اکسیژنی کاتالیز کردن واکنش‌های گلیکولیز و گلوکوژنز است. این پروتئین به‌علاوه ممکن است در مسیر پیام‌رسانی^۲ ROS نیز ایفای نقش نماید. (لاینو و همکاران ۲۰۱۰). در میان پروتئین‌هایی که در طی جوانه‌زنی کاهش یافتند گلی اکسالاز I (لکه ۲۹۸) نیز مشاهده شد. این آنزیم در سمیت‌زدایی methylglyoxal یکی از فرآورده‌های جانبی گلیکولیز نقش دارد. این آنزیم در طول دوره رسیدگی

3. Aerobic
4. Anaerobic

1. Rearrangement
2. Signalling

و تخمیر الکی مانند ساکارز سینتاز، الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز پیش می‌رود (مگنشی و پراتا ۲۰۰۹).

جدول ۲- پلی پپتیدهای که فراوانی آنها به میزان معنی دار در مقایسه بذره‌های جوانه زده در شرایط بهینه (دمای ۲۰ °C و پتانسیل آبی ۶- بار) با بذره‌های خشک متفاوت بود.

شماره لکه بر روی ژل بعد دوم	نام پروتئین	میزان تغییرات	سطح معنی- داری	شماره اکسشن ^۲	وزن مولکولی (کیلودالتون)		pI	آزمایشی	تئوری
					آزمایشی	تئوری			
68	NI	2.3	0.005			128		6.5	
79	NI	2.6	0.01			109		6.7	
87	Heat shock protein 101, complete high molecular weight glutenin [<i>Lophopyrumelongatum</i>]	2.6	0.004	TC267698	113	6.53	6.4		
128		2.2	0.017	gi 67975067	64	6.91	6.7		
131	high molecular weight glutenin [<i>Triticumaestivum</i>]	1.6	9.20E-04	gi 255957523	80	6.09	5.45		
140	globulin 3 [<i>Triticumaestivum</i>]	2.9	0.011	gi 215398470	66	7.78	6.7		
171	granule bound starch synthase I [<i>Triticumaestivum</i>]	1.5	0.03	gi 17736918	59	5.60	5.4		
172	granule-bound starch synthase [<i>Triticumaestivum</i>]	1.6	0.027	gi 4588607	63	7.86	5.5		
173	Granule-bound starch synthase	1.7	0.004	TC239297	56	9.14	5.6		
175	Granule-bound starch synthase	1.8	0.001		56	9.14	6.7		
181	ATP synthase F0 subunit 1 [<i>Oryza sativa</i>]	1.7	0.007	gi 89280711	55	5.85	5.9		
182	Beta-Amylase	1.6	0.04	gi 6729696	56	5.73	5.4		
186	NI	1.8	0.04		49		6.55		
189	beta-amylase 2 [<i>Hordeumvulgare</i>]	1.7	0.01	gi 61006818	57	5.34	5.3		
191	high molecular weight gluten subunit	2	0.002	gi 84181091	53	8.19	6.5		
192	beta-amylase 1 [<i>Hordeumvulgare</i>]	1.5	0.04	gi 38349539	57	5.65	5.3		
194	Beta-amylase	1.6	0.002	gi 3334120	56	5.24	5.3		
197	Putative thioredoxin peroxidase [<i>Oryza sativa</i>]	1.7	0.001	Q7F8S5_ORYSA	23	6.15	6.65		
201	Beta-amylase	1.7	0.01	gi 3334120	56	5.24	5.2		
204	calcium-dependent protein kinase 23 [<i>Arabidopsis lyrata</i>]	2.1	0.007	gi 297813857	61144	6.76	6.73		
212	Beta-amylase precursor	1.8	0.005	TC249903	68520	5.54	5.45		
216	eukaryotic translation elongation factor-1 (EF1) [<i>Sorghum bicolor</i>]	1.6	0.03	gi 242096224	47	6.08	6.55		
221	NI	1.7	0.003		44		6.7		
234	acyl-desaturase [<i>Triticumaestivum</i>]	2.2	0.016	gi 300681441	46	6.41	6.35		
235	serpin 1 [<i>Triticumaestivum</i>]	2.1	1.40E-02	gi 224589266	43	5.44	6.25		
241	Serpin-Z1A [<i>Triticumaestivum</i>]	1.5	0.01	gi 75282265	43	5.60	5.85		
242	actin	1.6	0.03	gi 255636850	41	5.31	5.4		
249	NI	1.6	0.01		43		5.7		
251	NI	2.1	0.003		38		5.8		
269	avenin-like protein [<i>Triticumaestivum</i>]	-1.9	3.20E-05	gi 145321072	33	8.29	6.8		
277	NI	2.1	0.002		39		6.6		
286	Actin-100 - [<i>Solanumtuberosum</i>]	-1.5	0.03	ACT12_SOLTU	39	5.56	6.05		
298	glyoxalase I [<i>Oryza sativa</i>]	-1.6	0.01	gi 16580747	32	5.51	5.3		
341	NI	-4.2	0.001		33		5.25		
352	1-Cys peroxiredoxin	-4.8	6.40E-04	gi 1710077	24	6.31	6.05		
381	Tri a Bd 27K [<i>Triticumaestivum</i>]	-1.8	0.006	gi 283480515	23	6.06	6.1		
405	17.4 kDa class I heat shock protein 3 [<i>Sorghum bicolor</i>]	-3	0.003	gi 242041463	17	5.82	5.8		
407	heat shock protein 16.9. [<i>Triticumaestivum</i>]	2	0.032	TC234994	21	6.41	6.3		
414	Heat shock protein 17	-4.8	3.20E-04	gi 123545	16	5.83	5.78		
417	17.4 kDa class I heat shock protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-1.6	0.007	HSP11_ARATH	17	5.21	5.25		
418		-1.7	0.018		18		6.35		
421	17.5kDa heat-shock protein [<i>Aegilopsstrongissima</i>]	-1.9	0.036	gi 147225042	17592	5.58	5.9		
427	NI	-2.2	0.002		18		5.85		
435	Alpha-amylase/trypsin inhibitor dimeric alpha-amylase inhibitor	1.6	0.006	gi 123957	18.8	7.44	6.35		
476	[<i>Aegilopssharonensis</i>]	-1.5	0.024	gi 114215910	13	5.25	5.35		
482	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Ficusfistulosa</i>]	-3.1	0.015	gi 125658315	12	5.80	5.95		
563	dimeric alpha-amylase inhibitor	-1.8	0.017	gi 114215822	13	6.49	6.18		

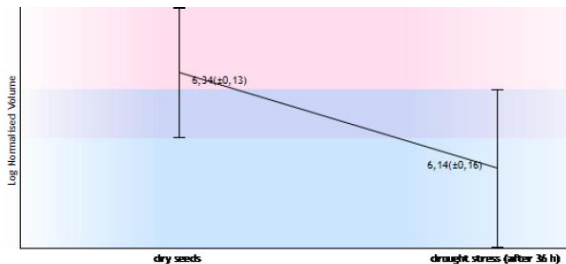
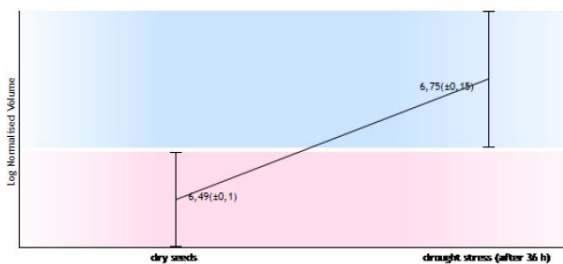
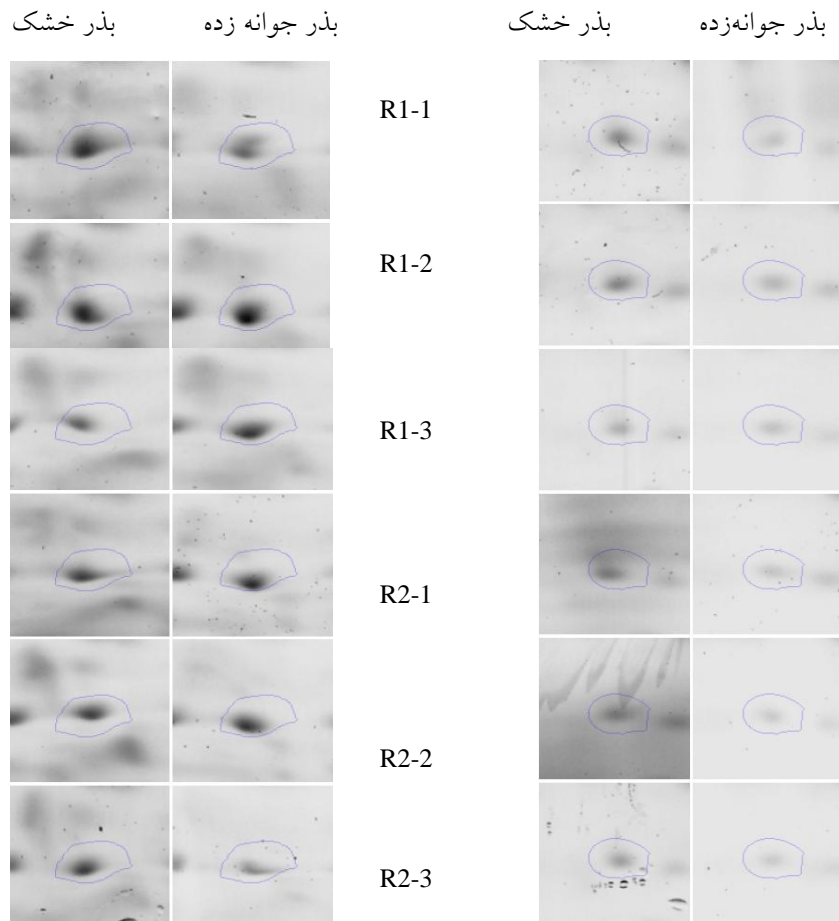
*در ستون میزان تغییرات، اعداد بدون علامت و با علامت منفی (-) به ترتیب نمایانگر نسبت افزایش و یا کاهش حجم لکه‌ها هستند. |NI|؛

شناسایی نشده (Not Identified) ۲. شماره اکسشن (Accession number) در بانک‌های اطلاعاتی NCBI، TIGR و SWISS

Prot ۳. نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric Point) یا pH هر لکه بر روی ژل

Granule-bound starch synthase

Glyoxalase I



شکل ۴- نمونه‌ای از تنظیم افزایشی (لکه ۱۷۵ پروتئین سنتز کننده نشاسته؛ سمت چپ) و تنظیم کاهش‌ی (لکه ۲۹۸ گلی‌اکسالاز؛ سمت راست) لکه‌ها در مقایسه بذر جوانه‌زده با بذر خشک در شرایط تنش خشکی (دمای ۲۰ °C و پتانسیل آبی ۶- بار).

نسبتاً غیرهوازی^۲ که قبل از خروج ریشه‌چه در بذر وجود دارد پیروات عمدتاً به اتانول و استالدهید تبدیل می‌شود. در این شرایط و با تغییر مسیر تنفسی به مسیر گلیکولیز، سلول کمبود ATP ناشی از کمبود دسترسی

چنین وضعیتی در طی مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر نیز مشاهده می‌شود. بسته به گونه گیاهی به نظر می‌رسد که در طی چند ساعت تا چند روز اولیه پس از شروع آبنوشی^۱ بذر، مسیر تنفسی عمده گلیکولیز بوده که محصولات آن پیروات و ATP می‌باشد. در شرایط

به اکسیژن را توسط تغییر مسیر تنفس به تنفس غیرهوازی تا حدودی

جبران می‌کند (بیولی و بلک ۱۹۹۴). در راستای نتایج این آزمایش پستوا و همکاران (۲۰۰۸) افزایش فعالیت آنزیم‌های چرخه گلیکولیز، گلوکوژنز و آنزیم‌های دخیل در تنفس غیرهوازی را در بذر چغندر قند جوانه-زده در شرایط دمای پایین گزارش نمودند. لی و همکاران (۲۰۰۸) نیز مشاهده نمودند که بروز تنش دمای پایین در برنج منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در فعالیت آنزیم‌هایی گلیکولیزی به‌ویژه انولاز گردید، آنها چنین اظهار نمودند که می‌توان از فعالیت این آنزیم به‌عنوان نشانگر-بیولوژیکی واکنش به تنش دمای پایین استفاده نمود. فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز (لکه‌های ۵۴ و ۵۵ با ۱/۷ و ۱/۹ برابر افزایش) پروتئین دیگری بوده که بیان آن در شرایط دمای پایین افزایش یافت. این آنزیم واکنش فسفوانول پیرووات را با HCO_3^- کاتالیز نموده و اگرالواستات تولید می‌کند. این آنزیم اغلب در بافتهای فتوسنتزی گیاهان C_4 و CAM فعال است. گزارش شده است که این آنزیم دارای نقش آناپلروتیک بوده و در شرایطی که تقاضا برای اسکلت کربنی جهت سنتز اسیدهای آمینه زیاد است، این آنزیم با تولید اگرالواستات و تحویل آن به چرخه اسید سیتریک تا حدودی این نیاز را تأمین می‌نماید. افزایش بیان این پروتئین در سپرچه و آندوسپرم بذرهای در حال جوانه‌زنی گندم در طی ۲۴ تا ۹۶ ساعت پس از شروع جوانه‌زنی نیز گزارش شده است (گنزالس و همکاران ۱۹۹۸). به‌علاوه نتایج آزمایش حاضر نشان داد که آنزیم کلیدی مسیر سنتز متیونین یعنی متیونین سینتاز (لکه‌های ۱۱۸ و ۱۸۷ به‌ترتیب با ۱/۶ و ۲/۸ برابر افزایش) در بذر جوانه‌زده در شرایط تنش دمای پایین بیش از بذر خشک بود (شکل ۵) که با نتایج کالیپارا و همکاران (۲۰۰۲) مبنی بر افزایش ۲/۵ برابری فعالیت این آنزیم در بذرهای ذرت جوانه‌زده در شرایط دمای پایین هماهنگ است. این آنزیم در طی مراحل اولیه جوانه‌زنی حداکثر بوده و در هنگام خروج ریشه‌چه کاهش می‌یابد. متیونین تولید شده از این آنزیم سپس با ترکیب شدن با ATP به آدنوزیل متیونین تبدیل شده که خود از پیش ماده‌های هورمون‌گازی اتیلن و

پلی‌آمین‌ها (مانند اسپرمیدین، اسپرمین و بیوتین) می‌باشد. پلی‌آمین‌ها در تقسیم سلولی و مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر نقش فعالی بازی می‌کنند (گالاردو و همکاران ۲۰۰۲). به‌هر حال از آنجایی که هورمون اتیلن در جوانه‌زنی بذر به‌ویژه در شرایط کم اکسیژنی نقش فعالی دارد (مگنشی و پراتا ۲۰۰۹). افزایش فعالیت متیونین سینتاز به همراه آنزیم‌های چرخه گلیکولیز و نیز فعالیت کمپلکس سنتز کننده ATP (لکه ۱۸۰) می‌تواند شاهدی احتمالی بر وقوع شرایط کم اکسیژنی در طی جوانه‌زنی در شرایط دمای پایین باشد. گالاردو و همکاران (۲۰۰۱) فقدان آنزیم متیونین سینتاز در بذر خشک را با توانایی بذر در جهت حفظ سطح متابولیسی پایین در بذر در حال سکون مرتبط می‌دانند.

پروتئین ATPاز واکوئلی (v-type ATPase) پروتئین دیگری (لکه ۱۴۴ با ۱/۷ برابر افزایش) بود که با جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش دمای پایین فعال شد (جدول ۳). وجود این پروتئین جهت رشد و نمو گیاه در شرایط تنش و غیر تنش ضروری است. این پروتئین یک پمپ الکتروژنیک بوده که از طریق هیدرولیز ATP منجر به تجمع پروتون (H^+) درون واکوئل می‌شود. شیب به‌دست آمده از طریق تجمع H^+ درون واکوئل تولید نیروی محرک پروتونی^۱ (PMF) نموده که این نیرو نیز آنتی-پورتهای غشاء تونوپلاست را فعال می‌نماید. با فعال شدن این آنتی-پورترها انتقال فعال ثانویه تحریک می‌شود. فعال شدن این آنتی-پورترها منجر به تجمع محلول‌هایی مانند ساکارز، رافینوز و استاکیوز در درون واکوئل می‌شود (دایتز و همکاران ۲۰۰۱). مشاهده شده که PMF ایجاد شده توسط این پمپ می‌تواند از طریق کده‌بندی^۲ صحیح محلول‌ها منجر به افزایش تحمل به تنش سرمایی شود. در آزمایش حاضر افزایش فعالیت ATP سینتاز (لکه ۱۸۰) به همراه آنزیم‌های متابولیسم ساکارز و نشاسته در شرایط تنش سرمایی می‌تواند در جهت تأمین ATP مورد نیاز برای پمپ ATPاز واکوئلی باشد. پروتئین دی-سولفید ایزومراز^۳ (PDI) پروتئین

1. Proton motive force

2. Compartmentation

3. Protein disulphideisomerase

دیگری (لکه ۲۰۶ با ۱/۶ برابر افزایش) بود که با جوانه‌زنی بذر در شرایط دمای پایین افزایش یافت.

جدول ۳- پلی‌پپتیدهای که فراوانی آنها به میزان معنی دار در بذرهای جوانه زده در شرایط تنش دمای پایین (دمای ۶°C و پتانسیل آبی صفر بار) در مقایسه با بذرهای خشک متفاوت بود.

شماره لکه بر روی ژل بعد دوم	نام پروتئین	میزان تغییرات	سطح معنی‌داری	شماره اکسشن ^۲	وزن مولکولی (کیلو دالتون)		pI	آزمایشی
					تئوری	آزمایشی		
23	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	2.4	6.20E-05	gi 259130271	87.0	140	6.51	5.2
26	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	2.3	1.60E-04	gi 259130271	87.0	140	6.51	5.35
36	NI	2.4	4.10E-05			140		5.45
40	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.8	0.02	gi 259130271	87.0	140	6.51	6.5
43	NI	3.3	0.009					
44	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	2.3	0.001	gi 259130271	87.0	140	6.51	6.15
49	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.8	0.01	gi 259130271	87.0	135	6.51	5.85
50	NI	2.1	1.80E-04					
53	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.5	0.027	gi 259130271	87.0	135	6.51	5.35
54	phosphoenolpyruvate carboxylase [<i>Oryza sativa</i>]	1.7	0.003	gi 222619275	110.5	125	6.05	5.6
57	x-type HMW glutenin [<i>Lophopyrum elongatum</i>]	2	0.018	gi 38492341	74.4	125	7.55	6.3
65	x-type HMW glutenin [<i>Lophopyrum elongatum</i>]	1.9	4.10E-04	gi 38492341	74.4	120	7.55	5.9
66	NI	1.8	0.01			125		6.4
68	NI	1.7	0.01			128		6.5
74	transcription factor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3.2	5.10E-05	gi 186478394	102.5	108	5.82	6.2
87	Heat shock protein 101	2	0.015	TC267698	113.2	115	6.53	6.4
97	NI	1.9	8.00E-04			113		5.9
110	NI	2.1	0.01			109		6.5
113	glutenin HMW [<i>Aegilops cylindrica</i>]	3.1	8.40E-04	gi 13992211	70.9	100	6.88	6.65
118	methionine synthase [<i>Hordeum vulgare</i>]	1.6	0.04	gi 50897038	84.8	105	5.68	6.1
127	NI	2.2	0.01			109		6.5
130	HMW glutenin [<i>Aegilops tauschii</i>]	1.6	0.015	gi 46981760	80.5	80	6.08	6.15
137	Methionine synthase [<i>Sorghum bicolor</i>]	2.8	4.00E-04	Q8W0Q7_SORBI	84.1	80	5.93	6.05
142	NI	2.1	0.02			70		6.4
143	Microtubule associated protein [<i>Arabidopsis lyrata</i>]	2.4	8.90E-04	gi 297820936	74.0	69.5	6.08	6.2
144	V-ATPase 69 kDa subunit [<i>Hordeum vulgare</i>]	1.7	4.30E-04	gi 2493123	64.4	64.5	5.38	5.3
146	NI	1.6	0.002			72		5.45
147	granule-bound starch synthase [<i>Solanum sibiricum</i>]	1.6	0.002	gi 45826417	41.0	62	6.04	5.9
148	polyphenol oxidase [<i>Triticum monococcum</i>]	2.8	2.40E-04	gi 170280425	64.5	63.5	5.95	6.25
149	high molecular weight glutenin [<i>Thinopyrum ponticum</i> x <i>Triticum aestivum</i>]	1.8	0.038	gi 259130277	50.8	65	5.93	6.55
155	Pyruvate decarboxylase isozyme 2	1.9	1.10E-04	gi 158513193	65.9	60	5.60	5.6
156		2.2	0.003					

ادامه جدول ۳- پلی پپتیدهای که فراوانی آنها به میزان معنی دار در بذره‌های جوانه زده در شرایط تنش دمایی پایین (دمای 6°C و پتانسیل آبی صفر بار) در مقایسه با بذره‌های خشک متفاوت بود.

5.7	65				5.90E-04	2.1	NI	158
5.9	5.90	63	65.3	gi 1009710	0.003	1.6	pyruvate decarboxylase 2 [<i>Oryza sativa</i>]	159
5.2	5.33	59.5	71.3	gi 3319357	4.10E-04	2.2	phosphoenolpyruvate synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	160
5.15	5.66	59	59.6	gi 10953875	7.50E-06	2.4	beta-amylase [<i>Hordeum vulgare</i>]	162
6.3	7.36	60	57.1	gi 215398472	3.00E-03	2.5	globulin 3B [<i>Triticum aestivum</i>]	167
6.55	7.36	58	57.1	gi 215398472	1.80E-06	3.4	globulin 3B [<i>Triticum aestivum</i>]	169
5.4	5.60	59	59.6	gi 17736918	0.003	1.5	starch synthase I [<i>Triticum aestivum</i>]	171
6.18		55			8.10E-04	2.1	NI	177
6.8	6.16	58	67.0	gi 48716089	4.00E-03	1.5	granule bound starch synthase 1 [<i>Hordeum bogdanii</i>]	178
5.75	5.65	52	57.9	gi 38349539	1.29E-04	1.7	beta-amylase 1 [<i>Hordeum vulgare</i>]	179
5.75	5.70	55.5	55.6	gi 81176509	0.011	1.5	ATP Synthase [<i>Triticum aestivum</i>]	180
6.22	5.21	55.5	56.8	gi 24212082	2.80E-04	1.8	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	184
6.4		45.5			0.002	1.5	NI	200
6	5.95	55	58.6	TC251262	9.50E-04	1.9	protein disulfide isomerase precursor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	206
5.35	5.70	51	48.4	gi 162460735	0.002	1.8	enolase2 [<i>Zea mays</i>]	210
5.45	5.54	53	68.5	TC249903	9.30E-04	1.7	Beta-amylase	212
6.1	6.60	38	24.6	gi 37928995	0.001	-1.6	cytosolic malate dehydrogenase [<i>Triticum aestivum</i>]	285
6.4	6.40	35.5	33.4	gi 156630197	0.003	1.5	avenin-like protein [<i>Aegilops columnaris</i>]	288
5.3	5.51	38	32.9	gi 16580747	0.005	-1.5	glyoxalase I [<i>Oryza sativa</i>]	298
5.25		33			1.62E-06	-3.9	NI	341
6.3		28			0.035	1.5	NI	349
6.65	6.31	28.5	24.2	gi 190684059	2.52E-05	-2	peroxiredoxin [<i>Triticum aestivum</i>]	363
5.8	5.82	21	17.8	gi 242041463	1.50E-04	-2.4	17.4 kDa class I heat shock protein 3	405
5.45	5.21	20.5	17.4	gi 15231372	0.017	-1.6	heat shock protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	406
6.3	6.41	20	21.5	TC234994	0.003	-1.8	heat shock protein 16.9. [<i>Triticum aestivum</i>]	407
5.78	5.83	20	16.9	gi 123545	4.50E-05	-3	Heat shock protein 17	414
5.25	5.21	18	17.4	HSP11_ARATH	3.40E-05	-2.2	17.4 heat shock protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	417
5.85		18			0.002	-1.5	NI	427
6.7		15			1.20E-02	-1.5	Ni	456
6.15	5.81	70	57.3	gi 283896812	0.005	1.9	phosphoenolpyruvate carboxylase [<i>Setaria palmifolia</i>]	551
6.05	6.04	13.9	13.9	gi 114215958	1.40E-04	-1.6	dimeric alpha-amylase inhibitor [<i>Aegilops searsii</i>]	562
6.18	6.49	13	14.0	gi 114215822	2.00E-02	-1.5	dimeric alpha-amylase inhibitor [<i>Aegilops bicornis</i>]	563

*در ستون میزان تغییرات، اعداد بدون علامت و با علامت منفی (-) به ترتیب نمایانگر نسبت افزایش و یا کاهش حجم لکه‌ها است. ۱. NI؛ شناسایی نشده (Not Identified) ۲. شماره اکسشن (Accession number) در بانک‌های اطلاعاتی NCBI، TIGR و یا SWISS-Prot ۳. نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric Point) یا pH هر لکه بر روی ژل

بین زیرواحدهای سیستمین در پروتئین در حال تا خوردن کاتالیز می‌نماید. این فرایند به پروتئین‌ها اجازه می‌دهد که ساختار مناسب خود را بازیابی نموده و در نتیجه در تا خوردگی پروتئین نیز ایفای نقش می‌نماید (احسن و همکاران ۲۰۰۷). همانگونه که در شرایط بهینه رطوبتی و تنش خشکی نیز مشاهده شد، در شرایط دمایی پایین نیز پروتئین شوک گرمایی (لکه‌های ۴۰۵، ۴۰۶، ۴۰۷ و ۴۱۴) بیشترین سهم را در پروتئین‌های

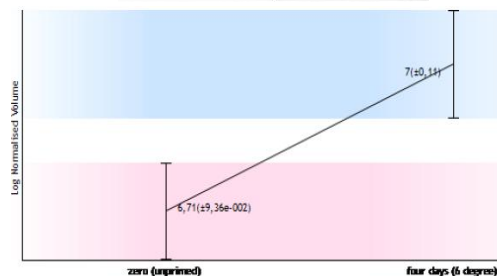
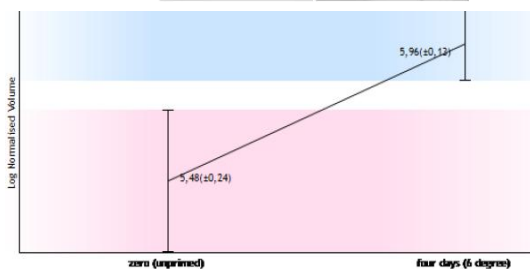
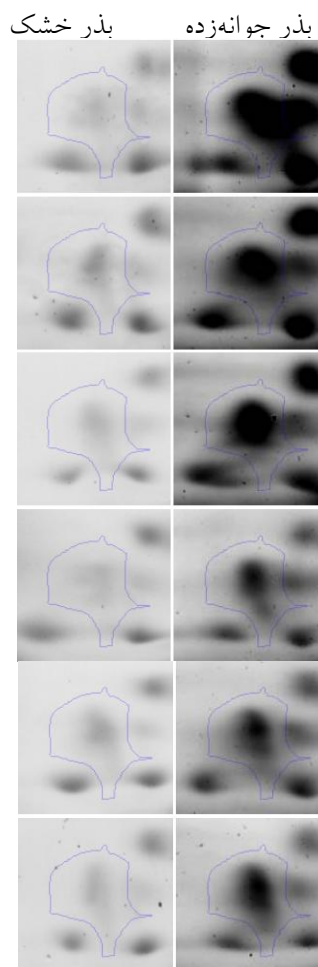
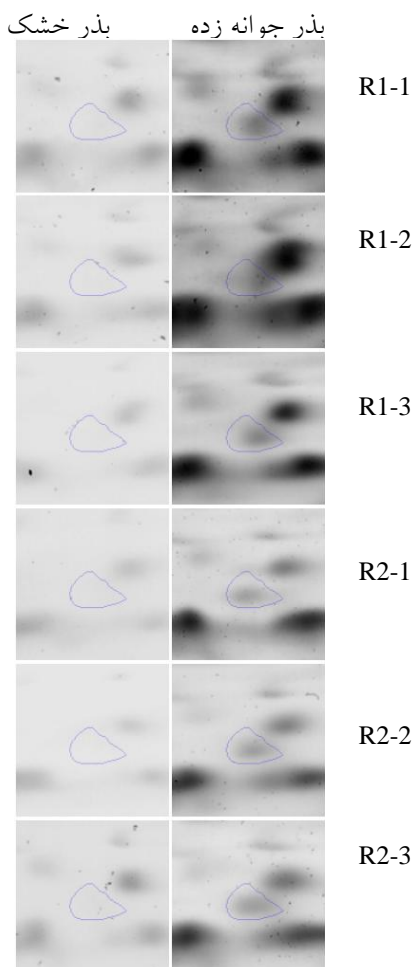
این پروتئین در شبکه اندوپلاسمی یوکاریوت‌ها فعال بوده و در جنین و لایه آلتورون بذر گندم نیز مشاهده شده است (لیوسلی و همکاران ۱۹۹۹). به علاوه فعالیت این پروتئین با جزء میکروزومی سلول وابسته بوده و فعالیت آن در سطح سلول نیز گزارش شده است. مشاهده شده که این پروتئین در حفظ تعادل ریدوکسی در شرایط تنش نقش دارد. PDI همچنین دارای نقش چاپرونی بوده و تشکیل و شکستن پیوند دی‌سولفیدی

کاهش) و ۴۰۵ (پروتئین شوک گرمایی ۱۷/۴ با ۲/۳ برابر کاهش) بیشترین مقدار تغییرات کاهشی را داشتند.

کاهش یافته به خود اختصاص داد (جدول ۳). در این میان نیز لکه‌های ۳۴۱ (شناسایی نشده با ۳/۹ برابر کاهش)، ۴۱۴ (پروتئین شوک گرمایی ۱۷ با ۳ برابر

Methionine synthase

Pyruvate decarboxylase



شکل ۵- نمونه‌ای از تنظیم افزایشی پروتئین‌های متیونین سینتاز (لکه ۱۳۷، سمت چپ) و پیرووات دکربوکسیلاز (لکه ۱۵۵، سمت راست) در مقایسه بذر جوانه‌زده با بذر خشک در شرایط تنش دمای پایین.

داد که با جوانه‌زنی بذر تغییرات عمده‌ای در الگوی پروتئینی توده بذری مورد آزمایش به‌وجود آمد. در راستای این نتایج بیشترین تغییرات افزایشی و کاهش

نتیجه‌گیری

ارزیابی گروه‌های مختلف مقایسه‌ای میان بذرهای جوانه‌زده در محیط‌های مختلف و بذرهای خشک نشان

کاهشی در مقایسات گروهی مختلف با پروتئین‌های ذخیره‌ای (گلوکوتنین، گلوبولین و اونین) مرتبط بودند. پروتئین‌های با نقش دوگانه ذخیره‌ای دفاعی (مانند سرپین و پروتئین بازدارنده آلفا-آمیلاز) در جایگاه بعدی قرار داشتند. پروتئین‌های ذخیره‌ای عمدتاً در طی دوره نمو بذر بر روی پایه مادری تجمع یافته و در طی دوره جوانه‌زنی بعدی متحرک شده و صرف فعالیت‌های رشدی جنین در حال جوانه‌زنی می‌شوند. در بذرها بیان این پروتئین‌ها در طول دوره جوانه‌زنی افزایش یافت. از طرفی، در مورد پروتئین‌های سرپین و بازدارنده آلفا آمیلاز روند نسبتاً معکوسی مشاهده شد به این صورت که بیان این دو نوع پروتئین در بذر خشک بیشتر از بذرها جوانه‌زده بود.

در بیان پروتئین‌ها با جوانه‌زنی بذر در شرایط دمایی پایین حاصل شد و بذرها جوانه‌زده در شرایط تنش خشکی و شرایط بهینه جایگاه‌های بعدی را داشتند. این نتایج موید این موضوع است که سلول‌های بذر تنش دمایی پایین را بیشتر و سریع‌تر از تنش خشکی احساس می‌کنند و این دو نسبت به شرایط بهینه بیشتر احساس می‌شود، به عبارت دیگر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که جوانه‌زنی در شرایط تنش (به‌ویژه تنش‌های خشکی و دمایی پایین) سبب افزایش احساس سلول و تغییر نهایت طلبی سلول‌ها در جهت جوانه‌زنی می‌شود. بر مبنای این نتایج شاید بتوان افزایش کارایی پرایمینگ بذر را در شرایط دمایی پایین توجیه کرد. نتایج نشان دادند که بخش عمده پروتئین‌های با تغییرات افزایشی و

REFERENCES

- Ahsan, N., Lee., S.H. Lee., D.G. Lee., H. Lee., S. W. Bahk, J. D. & Byung-Hyun Lee. (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *C. R. Biologies*, 330, 735–746.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press, pp. 445.
- Bonsager, B. C. (2007). *Proteome analysis of dissected barley seed tissues during germination and radicle elongation and Heterologous expression of barley limit dextrinase inhibitor*. Ph.D. Thesis, Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory and Enzyme and Protein Chemistry, BioCentrum-DTU, 193 pages.
- Cui., S., Huang., F. Wang., J. Ma., X. Cheng, Y. & Liu, J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5, 3162–3172.
- Dietz, K. J. N. Tavakoli. C. Kluge. T. Mimura., S. S. Sharma. G.C. Harris. A.N. Chardonnes, & Golladak, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, 52 (363), 1969-1980.
- Faria, J. M. R., Lammers., M. Ligterink., W. Kodde, J. & M. Hilhorst, H. W. (2007). Alterations in Gene Expression During Loss and Re-establishment of Desiccation Tolerance in Germinating and Germinated *Medicago truncatula* Seeds, CAB International 2007. *Seeds: Biology, Development and Ecology*, 50-56.
- Finnie, C., Melchior., S. Roepstorff, P. & Svensson, B. (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology*, 129, 1308–1319.
- Finnie, C., K. Maeda., O. stergaard., K.S. Bak-Jensen., J. Larsen. & Svensson, B. (2004). Aspects of the barley seed proteome during development and germination. *Biochemical Society Transactions*, 32 (3), 517-519.
- Foolad, M. R., Subbiah., P. Kramer, C. Hargrave, G. & Lin, G. Y. (2003). Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Euphytica*, 130, 199-206.
- Gallardo, K., C. Job., S. Groot., P.C. Puype., M. Demol., H. Vandekerckhove, J. & Job, D. (2001). Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming, *Plant Physiology*, 126, 835–848.
- Gilliland, L. U., Pawloski., L. C. Kandasamy, M. K. & Meaghe, R. B. (2003). Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *The Plant Journal*, 33, 319–328.
- Gonzalez, M. C., Osuna., L. Echevarr., C. Vidal, J. & Cejudo, F. J. (1999). Expression and Localization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Developing and Germinating Wheat Grains. *Plant Physiol*, 116, 1249–1258.
- Groot, S. P. C., Y. Soeda., G. Stoopen., Konings, M. C. J. M.. & Van Der Geest, A. H. M. (2002). Gene expression during loss and regaining of stress tolerance and drying. The biology of seeds: recent research advances. CAB International, Wallingford, UK, 279-288.

14. Hong., S.W. & Vierling., E. (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, in press.
15. Kollipara, K. P., I. N. Saab., R. D. Wych., M. J. Lauer. & G. W. Singletary. (2002). Expression Profiling of Reciprocal Maize Hybrids Divergent for Cold Germination and Desiccation Tolerance. *Plant Physiology*, 129, 974–992.
16. Laino, P., Shelton., D. Finnie., C. De Leonardis., A. M. Mastrangelo., A. M. Svensson., B. Lafiandra, D. & Masci S. (2010). Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. *Proteomics*, 10, 2359–2368.
17. Lee, D. G., N. Ahsan., S. H. Lee., J. J. Lee., Bahk., J. D. Kang., K. Y. Lee., B. H. (2009). Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *J. Plant Physiol*, 166 (1), 1-11
18. Magneschi, L. & Perata., P. (2009). Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Annals of Botany*, 103, 181–196.
19. McDonald, M. B. (2000). Seed priming. In “Seed Technology and its Biological Basis” (M.Black and J. D. Bewley, Eds.), pp. 287–325. Sheffield Academic Press Ltd., Sheffield.
20. Murphy, J. B. & Hammer., M. F. (1994). Starch synthesis and localization in post-germination *Pinusedulis* seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, (7) 1457-1463.
21. Orvar, B.L., V. Sangwan, F. Omann. & R. S. Dehindsa. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J*, 23, 785-794.
22. Pestsova, E., Meinhard., J. Menze., A. Fischer., U. Windhovel., A. & Westhoff., P. (2008). Transcript profiles uncover temporal and stress-induced changes of metabolic pathways in germinating sugar beet seeds. *BMC Plant Biology*, 122 (8), 1-22.
23. Seki, M., Narusaka., M. Abe., H. Kasuga., M. Yamaguchi-Shinozaki., K. Carninci., P. Hayashizaki, Y. & Shinozaki., K. (2001). Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *The Plant Cell*, 13, 61–72.
24. Sharma., P. Sharma., N. & Deswal., R. (2005). The molecular biology of the low- temperature response in plants. *BioEssays*, 27, 1048–1059.
25. Shewry, P. R. & N.G. Halford. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947–958.
26. Soeda Y, C. J. M. Konings., O. Vorst., M. M. L. van Houwelingen., G. M. Stoopen, C. A. Maliepaard., J. Kodde., R. j. Bino., S. Groot P. & van der Geest., A. H. M. (2005). Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, 137, 354–368.
27. Villanueva, M. A. F. Campos. C. Doaaz., J. M. Colmenero-Flores. E. Danta. F. Sanchez. & A.A. Covarrubias. (1999). Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 207, 582-589.
28. Wehmeyer., N. Hernandez., L. Finkelstein., R. & Vierling., E. (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol*, 112, 757–757
29. Wehmeyer, N. & Vierling., E. (2000). The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 122, 1099–1108.
30. Wolkers, W., Alberda., M. Koornneef., M. Leon-Kloosterziel., K. & Hoekstra., F. (1998). Properties of proteins and the glassy matrix in maturation-defective mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16, 133–143