علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هشتم/ شماره سوم/ ۱۴۰۰ (۲۵۷ - ۲۴۵)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2021.5228

آنالیز پروتئوم بذور گندم تحت تنش خشکی شدید و احیاء

پریسا کوباز[1*]، منظر حیدری[2]

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۴

چکیده

گیاهچه‌های گندم بهاره تحمل زیادی نسبت به تنش شدید خشکی تا روز چهارم پس از جوانه‌زنی از خود نشان می‌دهند. تحقیق حاضر به‌منظور مطالعه پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در بذور متصل به گیاهچه‌های ۴ روزه گندم در شرایط تنش خشکی و آبیاری مجدد می‌باشد. آزمایش با اعمال تنش خشکی با قطع کامل آبیاری در دو دوره ده و بیست روزه و آبیاری مجدد به‌مدت سه و هفت روز در اتاقک رشد در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار زیستی انجام گرفت. بذور متصل به گیاهچه برای سنجش فیزیولوژیک و پروتیوم مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی صفات فیزیولوژیک به‌خوبی شدت تنش و تاثیر تنش بر بذر را نشان داد و با آبیاری مجدد نیز در تمامی آزمایشات بذر به شرایط شاهد بسیار نزدیک شد. بررسی پروتئوم با الکتروفورز دوبعدی در بذر تمامی تیمارها انجام و۶۵۷ لکه پروتئینی با رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده شدند. در نهایت پس از آنالیز معنی‌داری۱۳۰ لکه انتخاب و پس از جستجو در بانک‌های اطلاعاتی پروتئین، شناسایی شدند. تنش خشکی موجب افزایش بیان ژن‌های موثر در تولید پروتئین‌های دفاعی (افزایش پرولین)، شکسته‌شدن ترکیبات ذخیره‌ای بذر و تولید پروتئین‌های موثر در تغییرات ساختمانی دیواره سلول شد. از طرف دیگر کاهش بیان پروتئین‌های موثر در تنفس و تجزیه پروتئین موجب کاهش مصرف انرژی در سلول در شرایط تنش شد. در شرایط آبیاری مجدد افزایش بیان پروتئین‌های موثر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها موجب مصرف مواد غذایی موجود در بذر (کاهش وزن بذر) و تولید پروتئین‌های ساختمانی جدید (حضور برگ و ریشه جدید) شد.

واژه‌های کلیدی: بذر گندم، پروتئوم، خشکی، فیزیولوژی

۱- استادیار پژوهشی بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. pkoobaz@abrii.ac.ir
۲- کارشناس بخش زیست‌شناسی سامانه، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. m.heidari@abrii.ac.ir
*نویسنده مسئول: pkoobaz@abrii.ac.ir

مقدمه

گیاهانی که در شرایط طبیعی رشد می‌کنند، معمولًا کمبود آب ملایمی را در طول روز احساس می‌کنند. تقریبًا تمامی گونه‌های گیاهی (گیاهان حساس) هنگامی که محتوای آبی آن‌ها به ۲۰ درصد حالت بهینه کاهش یابد از بین می‌روند. گیاهانی که می‌توانند با ۱۰ درصد محتوای آبی زنده بمانند، به‌عنوان گیاهان متحمل به خشکی طولانی مدت شناخته می‌شوند (Tweddle *et al*., 2003). امروزه مدارکی وجود دارد که نقش اصلی قندهای محلول را نه تنها در متابولیسم بلکه به‌عنوان سوبسترایی برای فرایندهای بیوسنتزی و تولید انرژی، به‌عنوان محصولات فرایندهای هیدرولیک که در واکنش هورمون با قندها دخالت دارند، نشان می‌دهد (Gibson, 2005; Leprince *et al.,* 2004). دانه‌های بالغ گندم تحمل زیادی به خشکی نشان می‌دهند. این تحمل به میزان تحمل گیاهان رستاخیزی (Resurrection plants) شباهت بسیاری دارد (Walters *et al*., 2002). در طی جوانه‌زنی که در بسیاری از گیاهان با خروج ریشه‌چه از بذر همراه می‌شود، تحمل به خشکی به سرعت از دست می‌رود. یافته‌ها نشان می‌دهدکه گیاهچه‌های ۶ روزه گندم بهاری قادر به تحمل همان میزان کمبود آب برای گیاهان ۴ روزه نیستند. این مسئله احتمالاً به‌دلیل تفاوت آن‌ها در پاسخ به متابولیسم قندهای محلول است. تحمل به خشکی در این گیاهچه‌ها به‌طور مستقیم مربوط به کم‌آبی نیست و کاهش میزان پروتئین‌های دفاعی یکی از عوامل کاهش تحمل به خشکی در بذر است (Soares *et al*., 2015). تحمل به خشکی که به‌عنوان صفت کمی محسوب می‌شود، مستلزم مشارکت کمپلکس ژنی می‌باشد (Montalvo-Hernandez *et al.,* 2008). مطالعات قبلی نشان داده که بذر نقش مهمی در تحمل به خشکی و احیا پس از آبیاری مجدد دارد و این تحمل در گیاهان سه و چهار روزه دقیقا از یک روند تبعیت می‌کند، همچنین محیط غذایی نمی‌تواند جایگزین بذر شده و تاثیر معنی‌داری در ایجاد تحمل به تنش خشکی داشته باشد (Koobaz *et al*., 2014). الکتروفورز ژل دو بعدی (2-D DIGE) توسط محققین مختلف برای تجزیه و تحلیل پروتئومیک و نشان‌دادن پروتئین‌های کلیدی و فسفوپروتئین‌ها در دانه گندم مورد استفاده قرار گرفته است (Lv *et al*., 2016). بیش‌تر مطالعات پروتئوم روی دانه و آرد گندم (اهمیت کیفیت و کمیت پروتئین در پخت نان) معطوف شده است. مطالعات پروتئوم دیگری روی بذور در حال جوانه‌زدن (Lv *et al*., 2016)، آمیلوپلاست (Ma *et al*., 2018)، مراحل نموی گیاهچه گندم (Zhang *et al*., 2015) و پوسته بالغ بذر (Branlard, *et al*., 2007) صورت گرفته است. مطالعه محققان روی تغییرات فیزیولوژیک و پروتئوم بر جنین و آندوسپرم گندم پرمحصول چینی در طی جوانه‌زنی بذر نشان داده که در مرحله آبگیری، اندازه بذر و محتوای آب به‌سرعت افزایش یافته و این تغییرات همراه با برخی تغییرات متابولیک از جمله افزایش میزان قندهای محلول و فعالیت آلفاآمیلاز، کاهش در محتوای نشاسته و افزایش سریع هورمون‌های گیاهی است. بیش‌ترین لکه‌های پروتئینی در جنین در متابولیسم انرژی، اسیدهای آمینه، استرس یا دفاع و متابولیسم پروتئین نقش دارند، درحالی‌که در آندوسپرم بیش‌تر به متابولیسم کربوهیدرات و پروتئین‌های ذخیره‌ای مرتبط می‌شوند (Liu *et al*., 2018). مطالعه روی دو رقم متحمل و حساس به تنش خشکی در گندم نشان داد که رقم متحمل در شرایط تنش خشکی میزان بیان پروتئین‌های اکسیداتیو و دفاعی از جمله پراکسیداز، پروتئین‌های شوک حرارتی و یوبی کوئیتین (Ubiquitin) را افزایش داده است (Faghani *et al*., 2015). همچنین افزایش بیان سوکروز سنتاز در دو رقم متحمل و حساس به تنش خشکی در گندم طی مراحل پرشدن دانه گزارش شده است (Jiang *et al*., 2012). هدف از مطالعه مذکور، بررسی نقش پروتئین‌ها در تنش خشکی بذر گندم، آبیاری مجدد و بررسی پروتئین‌های موثر در تحمل به تنش و احیا است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار روی رقم مرودشت در اتاقک رشد با نور ۲۰۰۰ لوکس (Lux)، دمای ۲۳- ۲۵ درجه سلسیوس و روشنایی ۱۶ ساعت به تاریکی ۸ ساعت در آزمایشگاه فیزیولوژی ملکولی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج در پاییز سال ۱۳۹۵ انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام گرفت. رقم مرودشت به‌عنوان رقم حساس به تنش خشکی گندم

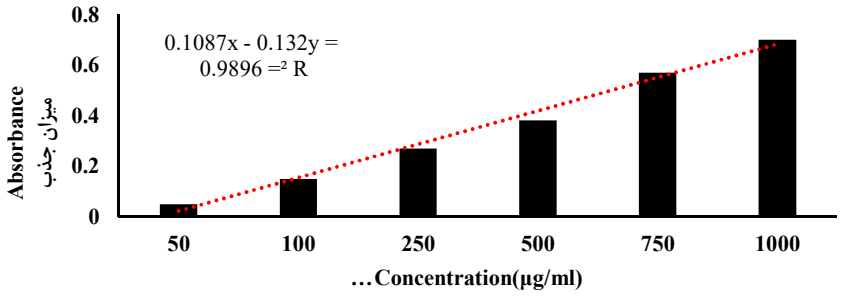
از موسسه اصلاح و تحقیقات بذر تهیه شد. کشت بذور در ظروف پلاستیکی شفاف یک‌بار مصرف (۲۰ میلی‌لیتر در یک ظرف پلاستیکی شفاف به‌طول ۲۰ سانتی‌متری و عرض۱۰ سانتی‌متری) و پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد (یک دقیقه) و شستشو با آب مقطر (سه بار) روی کاغذ صافی با آبیاری معمولی برای تولید گیاهچه در اتاقک رشد انجام شد. سپس گیاهچه‌های چهار روزه تقریبا یکسان از میان آن‌ها انتخاب شدند. بر اساس بررسی‌های قبلی برای تحمل به (Koobaz *et al.*, 2014) تنش خشکی با قطع کامل آبیاری (قرارگیری روی کاغذ صافی خشک) در ۲ مدت زمان مختلف (۱۰ و ۲۰ روز) انجام شد. شدت تنش به حدی است که موجب توقف کامل رشد شد. سپس آبیاری مجدد حاوی ۵۰ گیاهچه انجام شد. پس از سه روز آبیاری ریشه جدید ظاهر شد. گیاهچه‌های احیاشده پس از ۷ روز برگ و ریشه جدید تولید کردند که نشان از زنده‌بودن گیاه پس از تحمل به تنش بود. به همین جهت آن‌ها با گیاهچه‌های ۶ روزه که از نظر مرحله رشدی یکسان هستند، به‌عنوان شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند. بقیه تیمارها با توجه به شدت زیاد تنش خشکی (توقف رشد در گیاهان تحت تنش و احیا سه‌روزه) با گیاهچه‌های ۴ روزه نرمال مقایسه شدند (در این مطالعه دو شاهد مورد استفاده قرار گرفت). در واقع شاهد ۴ روزه (تیمار ۱)، تنش ۱۰ روزه (تیمار ۲)، تنش ۲۰ روزه (تیمار ۳)، تنش ۱۰ روزه احیا سه روزه(تیمار ۴)، تنش ۱۰ روزه احیا ۷ روزه (تیمار ۵)، تنش ۲۰ روزه احیا سه روزه (تیمار ۶)، تنش ۲۰ روزه احیا ۷ روزه (تیمار ۷)، شاهد ۶ روزه (تیمار ۸) تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق بودند. نمونه‌گیری در هر مرحله پس از جداسازی بذر از گیاهچه انجام شد. نمونه‌ها به‌طور همزمان برای مطالعات پروتیومیکس و فیزیولوژی برداشت شد. نمونه‌ها به‌دلیل تفاوت زمانی از نظر مرحله فیزیولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش وزن تر و خشک بذر

پس از پایان زمان اعمال تیمار برای هر یک از تیمارها نمونه‌برداری جداگانه برای صفات فیزیولوژیک و استخراج پروتئین انجام شد. بذرها از گیاهچه جدا شده و بلافاصله وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق دیجیتال اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در آون با دمای۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا کاملا خشک شده و وزن خشک آن‌ها با شرایط قبلی اندازه‌گیری شد. چون بذرها آبگیری پیدا کرده و رشد کرده‌اند، وزن تر و خشک آن‌ها با هم متفاوت بود.

سنجش پروتئین کل

در این آزمایش پروتئین محلول کل به‌روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری گردید. جهت اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های گیاهی، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) منحنی استاندارد رسم گردید. سپس۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی برگ و بذر با ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد ۲۰ درصد (v/v)مخلوط شد و بعد از پنج دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. غلظت پروتیئن محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب (µg/ml) محاسبه شد (شکل ۱).

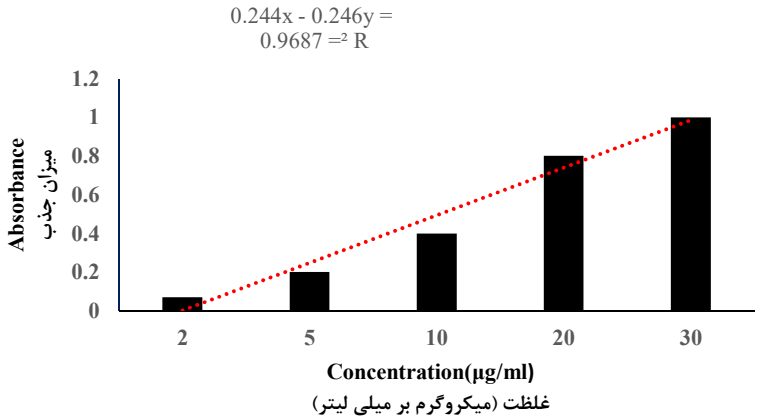


شکل ۱- منحنی کالیبراسیون سنجش پروتئین در بذر گندم

Figure 1. Calibration curve of protein measurement in seed wheat

سنجش محتوای پرولین

اندازه‌گیری محتوای پرولین به‌روش وندرسکولو و همکاران (Vendruscolo *et al.*, 2007) انجام شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ppm پرولین استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون سنجش پرولین در بذر گندم

Figure 2. Calibration curve of proline measurement in seed wheat

استخراج پروتئین

به‌منظور استخراج پروتئین از بذر، تیمارهای مورد بررسی پس از استفاده از ترکیبات مختلف استفاده از فنل، مناسب تشخیص داده شد. بدین ترتیب استخراج پروتئین از بذر انجام شد (Hurkman and Hanaka, 1986). سنجش غلظت پروتئین به‌روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Cary varian-300) انجام شد (Bradford, 1976).

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول به‌منظور تعیین بهینه pH مورد نیازابتدا از ژل‌های با pH=۳-۱۰ استفاده شد و پس از مشاهده تمرکز پروتئین‌ها در محدوده pH=۴-۷ در کلیه آزمایشات از ژل‌هایی با pH=۴-۷ خطی استفاده شد. برای آب‌دهی نمودن ژل‌ها،DTT و IPG بافر به محلول آب‌دهی اضافه شد. سپس ۲۵۰ میکروگرم پروتئین اضافه و محلول را به داخل شیار موجود در سینی آب‌دهی ریخته، ژل روی شیار به‌آرامی قرار داده شد. پس از تکمیل مرحله آب‌دهی در دمای اتاق، ژل‌ها روی صفحه دستگاه مولتی‌فور II شرکت Amersham Bioscience برای انجام بعد اول (IEF) قرار داده شده و برنامه بهینه‌شده به‌مدت ۲۲/۵ ساعت انجام شد (Blum *et al.*, 1987). پس از اتمام مراحل بعد اول، بعد دوم بر روی ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲/۵ درصد اجرا شد. سپس ژل‌های IPG به روی ژل‌های بعد دو منتقل شدند. الکتروفورز بعد دوم به وسیله دستگاه دوازده‌تایی ROTEAN Plus Dodeca Cell حاوی ۲۵ لیتر بافر تانک با ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت و آمپراژ متغیر به‌مدت ۸ ساعت انجام و ظهور با نیترات نقره انجام شد. ژل‌های رنگ‌آمیزی‌شده با استفاده از دنسیتومتر GS-700 (Bio-Rad) و با وضوح 600 dpi اسکن‌شده و تصاویر مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Melanie 6 مشخص شدند. پس از اکتساب تصاویر به فرمت دیجیتالی توسط دنسیتومتر و ورود آن‌ها به محیط نرم‌افزار و انجام فرآیند شناسایی لکه‌های پروتئینی، درصد حجمی آن‌ها مشخص شد.

وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز همزمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد مشخص و در نرم-افزارMelanie 6 تخمین زده شد (Fathi *et al.*, 2009). نقطه ایزوالکتریک نیز برای هر لکه پروتئینی با اندازه‌گیری مهاجرت لکه روی نوار ۱۸ سانتی‌متری IPG با محدوده pH خطی۴-۷ در نرم‌افزار مشخص شد. هر لکه پروتئینی با تغییر بیان معنی‌دار، با در دست داشتن وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک و با جستجو در مقالات مرتبط در Uniprot مورد شناسایی احتمالی قرار گرفت. کلیه آزمایشات با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آزمون LSD جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها درسطح احتمال P≤۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تنش و آبیاری مجدد بر وزن تر و خشک بذر، محتوای پروتئین محلول و محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

بررسی صفات فیزیولوژیک بذرها در زمان تنش و آبیاری مجدد

نتایج آنالیز وزن تر و مقایسه آن با وزن خشک بذر نشان داد که بذرهای هر دو شاهد مورد بررسی مقدار زیادی آب در خود دارند و تنش موجب کاهش شدید وزن تر بذر شده ولی تفاوت معنی‌داری با وزن خشک نرمال در تنش ۱۰ روزه نداشت (شکل A ۳و B ۳). اگرچه تنش ۲۰ روزه موجب کاهش وزن بیش‌تر بذر شد. با آبیاری مجدد و ادامه رشد گیاه، کاهش وزن در بذر ادامه یافته و با افزایش زمان آبیاری مجدد، این کاهش شدت بیش‌تری داشت که نشان‌دهنده زنده‌بودن گیاه و مصرف مواد غذایی داخل بذر بود، به‌طوری‌که این کاهش از بذر گیاهچه نرمال ۶ روزه نیز بیش‌تر شد (هر دو در مرحله سه برگی) این مسئله می تواند، به‌دلیل ایجاد ریشه‌های جدید در گیاه احیاشده به منظور جذب آب باشد. نتایج بررسی بر روند رشد بذور گندم نشان داده است که با آغاز آبگیری بذر، به‌تدریج ترکیبات نشاسته‌ای تجزیه‌شده و از طرف دیگر رشد هیپوکوتیل در گیاه آغاز شده است (Liu *et al*., 2018).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات وزن تر (FW) و خشک بذر (DW)، پروتئین کل و پرولین بذر

Table 1. Analysis of variance of seed fresh and dry weight, total protein and proline content

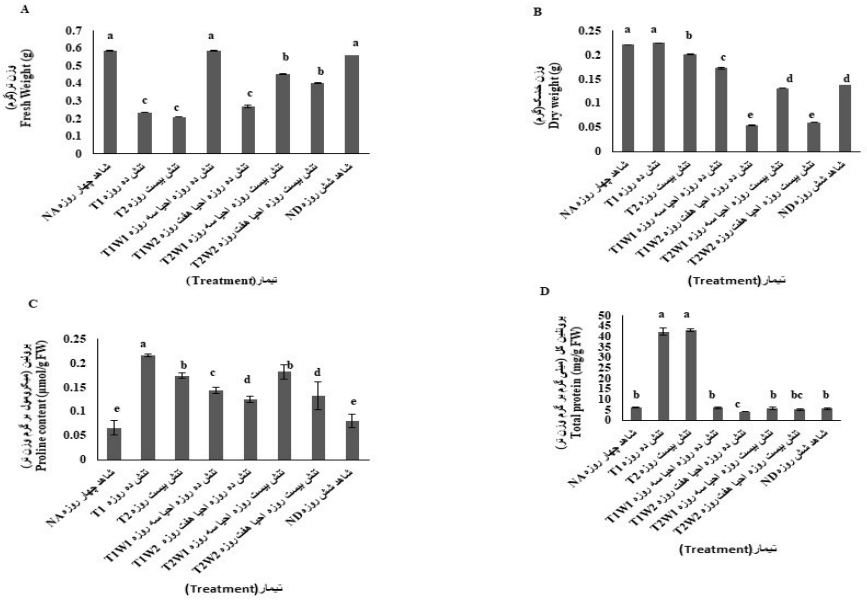
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
		وزن تر بذر Seed FW	وزن خشک بذر Seed DW	محتوای پروتئین کل Total protein content	محتوای پرولین Proline content
تنش خشکی Drought stress	7	0.077**	0.013**	891.076**	0.005**
اشتباه Error	23	0.015	0.005	0.36	0.0006
ضریب تغییرات CV(%)		3.7	4	11.2	2.7

** , ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

**,ns : Significant at 1% probability level and non-significant, respectively

بررسی محتوای پروتئین و پرولین کل بذر

نتایج آنالیز مقایسه میانگین پروتئین کل نشان داد که با توجه به کاهش میزان آب در شرایط تنش خشکی، محتوای پروتئین کل افزایش یافته و در آبیاری مجدد با مصرف پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در بذر، میزان آن‌ها کاهش یافته و با ادامه آبیاری مجدد (۷ روز) این کاهش بیش‌تر شد (شکل d ۳). این نتایج با گزارش بلترانو و همکاران مبنی بر افزایش پروتئین در دانه گندم تحت تنش خشکی مطابقت دارد. دلیل این افزایش می‌تواند تحت تاثیر عوامل محیطی باشد که در پرکردن دانه نقش دارند (Beltrano *et al.,* 1999). اگرچه برخی محققان با محاسبه محتوای پروتئین بر حسب سطح برگ اظهار داشتند که محتوای پروتئین برگ گندم تحت تنش خشکی نسبت به نرمال کم شده است و وجود برخی آنزیم های هیدرولیزکننده پروتئین دلیل این کاهش است (Simova-Stoilova, 2006). در *Sporobolus* در این گیاهان است (Mousavi *et al.,* 2016; Ehya *et al.*, 2013; Abro *et al*., 2019;). *stapfianus* نیز افزایش میزان پروتئین‌های موثر در تنش خشکی گزارش شده است (Oliver *et al*., 2011a). پرولین یک ترکیب ضد تنش محسوب می‌شود. تجمع پرولین تحت تنش‌های خشکی، شوری، تنش‌های اکسیداتیو، فلزات سنگین و غیره در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Ashraf and Foolad, 2007; Rampino *et al*., 2006). در تحقیق حاضر افزایش پرولین بذر تحت تنش خشکی و کاهش میزان آن در آبیاری مجدد ۷ روزه به‌خوبی مشهود بود (شکل c ۳). اگرچه با وجود آبیاری مجدد ۷ روزه، مقدار پرولین هنوز به اندازه گیاهان شاهد کاهش نداشت. این موضوع به‌خوبی نشان‌دهنده تاثیر افزایش پرولین در تنظیم اسمزی سلول، حمایت از پایداری ساختارهای سلولی، کاهش اسیدیته سلول و ممانعت در برابر سمیت آمونیومی است. علاوه گزارشات میزان زیاد پرولین در شرایط تنش خشکی در گندم بیانگر نقش مهم پرولین در کاهش اثرات کمبود آب



شکل ۳- تاثیر تنش خشکی و آبیاری مجدد بر وزن تر، خشک، پروتئین کل و پرولین بذر گیاهچه گندم

Figure 3. The effect of drought stress and recovery on fresh weight, dry weight, total protein and proline content

NA وND گیاهچه چهار روزه و شش روزه با آبیاری کامل، T1 و T2 گیاهچه چهار روزه تحت تنش خشکی به‌مدت ده و بیست روزه، T1W1 و T2W1 گیاهچه‌های آبیاری‌شده به‌مدت سه روز پس از پایان تنش، T1W2 و T2W2 گیاهچه‌های آبیاری‌شده به‌مدت هفت روز پس از پایان تنش

NA and ND: well-watered four&six day old seedlings; T1 and T2: Four-day-old seedlings deprived of water for 10 and 20 days; T1W1 andT2W1 seedlings watered for 3 day at the end of the imposed period of water stress; T1W2 andT2W2 seedlings watered for 7 day at the end of the imposed period of water stress

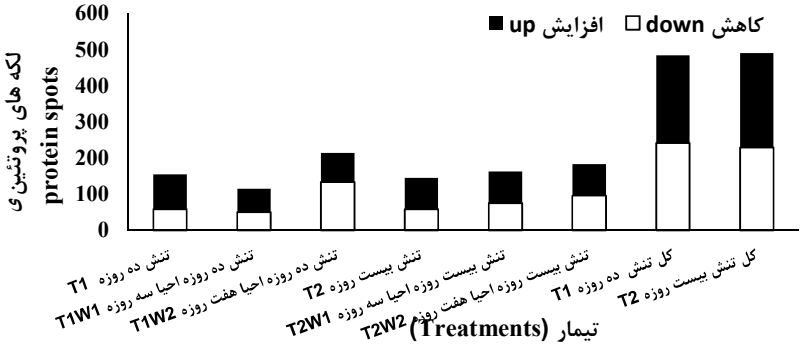
لکه‌های پروتئینی پاسخ دهنده به خشکی در بذر

بر اساس داده پروتئومیکس، ۶۵۷ لکه پروتئینی قابل تکرار از ۲۴ ژل (۸ تیمار با سه تکرار) جدا شدند. بررسی حجم لکه‌های پروتئین بر اساس مقایسه میانگین با آنالیز ANOVA انجام شد. این میان ۳۵۱ لکه پروتئینی طی تنش خشکی و آبیاری مجدد حداقل در یک تکرار در مقایسه با نمونه‌های شاهد تغییر معنی‌دار نشان دادند (در سطح احتمال یک درصد). تعداد لکه‌های پروتئین با بیان متفاوت در تمامی تیمارهای ۲۰ روزه بیش‌تر از تنش ۱۰ روزه است. تیمار تنش ۱۰ روزه و تنش ۱۰ روزه با آبیاری مجدد ۷ روزه، بیش‌ترین پروتئین‌های با بیان متفاوت در بین تمامی تیمارهای تنش و آبیاری مجدد را داشتند، اما تیمارهای تنش ۱۰ روزه آبیاری مجدد ۳ روزه و تنش ۲۰ روزه با آبیاری مجدد ۷ روزه، کم‌ترین تفاوت بیان را بین تیمارهای آبیاری مجدد ۳ و ۷ روزه نشان دادند. پس از ژن کاهش یافت، درحالی‌که تعداد ژن‌های کاهش بیان-یافته ثابت ماند. بیش‌ترین پروتئین‌هایی که در شرایط تنش افزایش بیان نشان دادند.

آبیاری مجدد میزان بیان لکه‌های پروتئینی نسبت به تنش کاهش یافت و این مسئله در آبیاری ۷ روزه به‌خوبی قابل ملاحظه است (شکل ۴). با توجه به تفاوت زیاد بین دو شاهد و تعداد زیاد لکه‌های پروتئینی، از روش آماری دیگری (K means) برای جداسازی استفاده شد. در این روش ۱۴۵ لکه پروتئینی در سطح ۱ درصد تفاوت معنی-دار نشان داده و مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۲)که از بین آن‌ها ۱۳۰ لکه قابل شناسایی بودند. تنها لکه پروتئینی که روی ژل‌های آبیاری مجدد قابل دیدن است، فقط شماره۴۳۲ (دهیدرین) بود

پروتئین‌های دارای افزایش بیان در شرایط تنش

بررسی مقایسه میانگین لکه‌های پروتئینی مورد بررسی نشان داد در تنش ۱۰ روزه ۵۸ ژن کاهش بیان یافته و ۹۷ ژن افزایش بیان نشان دادند. با افزایش شدت تنش (۲۰ روزه) تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته به ۸۷



شکل ۴- تعداد پروتئین‌های بذر دارای تفاوت معنی دار تحت تنش و آبیاری مجدد نسبت به شاهد

.بخش سیاهرنگ نشانگر تعداد پروتئین‌های با افزایش بیان معنی‌دار تحت تنش و بخش سفید رنگ کاهش بیان معنی‌دار پروتئین‌های تحت تنش نسبت به شاهد را نشان می‌دهد.

Figure 4. The number of significantly different proteins under water-stressed and rewater compare to control

Black bars showed proteins more abundant in stressed plants and white bars showed proteins less abundant in stressed plants compare to control.

NA وND گیاهچه چهار روزه و شش روزه با آبیاری کامل، T1 وT2 گیاهچه چهار روزه تحت تنش خشکی به‌مدت ده و بیست روزه، T1W1 و T2W1 گیاهچه های آبیاری شده به‌مدت سه روز پس از پایان تنش، T1W2 و T2W2 گیاهچه های آبیاری شده به مدت هفت روز پس از پایان تنش

NA&ND: well-watered four&six day old seedlings; T1&T2: Four-day-old seedlings deprived of water for 10&20 days; T1W1&T2W1 seedlings watered for 3 day at the end of the imposed period of water stress; T1W2&T2W2 seedlings watered for 7 day at the end of the imposed period of water stress.

پروتئین‌های مربوط به متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌های دفاعی و سنتز پروتئین‌های جدید بودند. یکی از این پروتئین‌ها ایمیدازول فسفات دهیدراتاز (Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase) است که در مسیر بیوسنتزی تولید اسیدهای آمینه در کلروپلاست نقش داشته و پروتئین موثر در ساخته‌شدن L-histidine است. پنج لکه پروتئینی که با مشخصات این پروتئین مطابقت دارند افزایش بیان نشان دادند. لازم به ذکر است شماره داخل پرانتز مربوط به شماره لکه‌های پروتئینی در جدول است (۲۵۳-۲۵۴-۳۱۲-۳۱۴-۳۰۹) (جدول۲). تیوردوکسین‌ها در برخی از فرایندهای بیوشیمیایی شامل به حرکت درآوردن پروتئین و نشاسته در بذر غلات هنگام جوانه‌زنی و محافظت سلول در برابر تنش اکسیداتیو، به خصوص در زمان کاهش آب درون سلول (در دانه و جوانه‌زنی بذر، دخیل می‌باشند (Serrato and Cejudo, 2003). تیوردوکسین h موجب احیای انواع پروتئین‌های دارای پیوند دی‌سولفید از جمله پروتئین‌های ذخیره‌ای‌مانند گلوتنین (Glutenin) و گلایدین (Gliadin) در گندم و پروتئین‌های مرتبط با تنش‌های اکسیداتیو می‌شود (Buchanan and Balmer, 2005, Hajheidari *et al*., 2007). در این مطالعه نیز بیان پروتئین‌های نقاط ۶۵ و ۶۴۳ مرتبط با دو پروتئین گلوتنین و گلایدین افزایش یافته است. پروتئین ATP synthase beta and alfa subunit نیز از جمله آنزیم‌های کلیدی برای انتقال الکترون است. بیان بیش‌تر زیر واحد بتا قبلا نیز در پروتئین‌های گیاهچه در تنش خشکی گزارش شده است که می‌تواند نشان‌دهنده مکانیسم تحمل در گیاه بوده و موجب افزایش میزان انرژی در زمان آبیاری مجدد شود (Koobaz *et al*., 2020, Calvo –Polanco *et al*., 2019). فروکتان اگزوهیدرولاز (۱ Fructan 1-exohydrolase (W3FEH3_WHEAT موجب هیدرولیز اتصالات اینولینی در فروکتان می‌شود. این پروتئین بیش‌تر در ساقه به‌خصوص در ناحیه میانگره بیان شده و در ریشه‌ها بیان بسیار پایینی نشان داده است (Van Riet *et al*., 2008). این آنزیم بسیار حساس بوده و فعالیت آن در حضور سوکروز متوقف می‌شود و در این پژوهش نیز تحت تنش افزایش بیان یافته است (لکه پروتئینی ۱۰۱). پروتئین Ubiquitinconjugating enzyme E2 7 نیز در مسیر یوبی‌کوییتینه‌شدن (ubiquitination) پروتئین که بخشی از تغییرات پروتئینی است نقش دارد. در واقع، موجب اتصال کوالانسی یوبی‌کوییتون به پروتئین‌های دیگر

جدول ۲- ضریب تاثیر مربوط(درصد حجمی لکه های پروتئینی تحت شرایط تنش نسبت به درصد حجمی لکه‌های پروتئینی تحت شرایط شاهد)به برخی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی در بذر

Table2- The corresponding induction factor (percent volume of spot in stress condition/percent volume of spot in well-watered condition) of drought responsive protein of seedlings

لکه پروتئین Spot	تنش۱۰روزه/شاهد ۴روزه T1/NA	تنش۲۰روزه/شاهد ۴روزه T2/NA	تنش۱۰روزه احیا۳روزه/شاهد۴روزه T1W1/ND	تنش۱۰روزه احیا۷روزه/شاهد ۴روزه T1W2/ND	تنش۲۰روزه احیا۷روزه/شاهد۴ روزه T2W1/NA	تنش۲۰روزه احیا۷روزه/شاهد ۶روزه T2W2/ND	نقطه ایزوالکتریک/وزن مولکولی pI/MW	کد شناسایی ID	نام پروتئین Protein name
65	2.200781	1.9483	0.86354	0.784339	0.761976	1.028891	5.77/83	GLT5_WHEAT	Glutenin, high molecular weight ,DX5
101	1.578607	2.352586	0.559366	0.519198	0.610684	0.659113	4.85/67	1FEH3_WHEAT	Fructan 1-exohydrolase w3
230	2.339307	1.655774	1.18253	0.52051	0.69462	0.647075	6.04/16	HS16A_WHEAT	16.9 kDa class I heat shock protein 1.
234	1.635382	1.252927	0.835262	0.682874	0.863857	0.921176	6.44/16	HS16B_WHEAT	16.9 kDa class I heat shock protein 2
244	2.091401	2.144997	1.004276	0.545519	0.769132	0.541759	6.28/18	HS16B_WHEAT	16.9 kDa class I heat shock protein 2
245	2.25935	1.94619	1.477347	1.050122	1.267614	1.076797	6.30/17	HS16B_WHEAT	16.9 kDa class I heat shock protein 2
253	2.74236	3.200102	1.407778	3.305469	1.563021	1.032036	6.2/24	HIS7A_WHEAT	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 1
254	1.513886	1.01379	0.001738	0.001738	0.001738	1.022496	6.2/23	HIS7C_WHEAT	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 1
312	2.079556	2.378437	0.825652	0.75575	0.559256	0.46107	6.5/24	HIS7C_WHEAT	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 3
314	1.52143	2.064903	0.766394	0.375145	0.453244	0.630901	6.4/24	HIS7C_WHEAT	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 3
320	2.995867	3.204729	0.758842	0.452282	0.827813	0.616497	6.34/15	GRP1_HORVU	Glycine-rich cell wall structural protein
504	0.400431	0.658542	0.799728	1.191449	0.760269	0.702639	4.5/31	COX2_WHEAT	Cytochrome c oxidase subunit 2
505	0.244702	0.602054	0.951355	0.743353	0.905027	0.75144	4.5/32	COX2_WHEAT	Cytochrome c oxidase subunit 2
524	0.29164	0.35712	0.679095	1.61936	0.802908	1.083885	5.12/87	None	
643	5.100725	6.020359	0.597687	0.453707	0.753991	0.503395	6.53/33	GDA2_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-II

a اعداد مرتبط با ژل الکتروفورز دو بعدی.

رنگ‌ها نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار در بیان حداقل یکی از تیمارهای پاسخ‌دهنده به خشکی در سطح ۵ درصد در مقایسه با شاهد است.

رنگ طوسی پررنگ نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده در مقایسه با شاهد و رنگ طوسی کمرنگ نشان‌دهنده کاهش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده در مقایسه با شاهد است.

a The numbering corresponds to the 2D gel in Figure 3.

Shading represents change statistically significant in at least one variety in response to drought stress compared to well-watered.

Significantly down-regulated proteins in response to drought stress compared to well watered

Significantly up-regulated proteins in response to drought stress compared to well watered

برای پیام‌رسانی به آن‌ها برای تغییرات پروتئینی (Degradation) می‌شود.

پروتئین ساختمانی دیواره سلولی غنی از گلیسین که در ایجاد خاصیت کشسانی سلول نقش مهمی دارد و در غشا خارجی سلول وجود دارد. شرایط تنش موجب افزایش میزان بیان این پروتئین می‌شود (لکه پروتئینی ۳۲۰). در نهایت HSP (Heat Shock Proteins)ها که در تنش شوری و خشکی القا می‌شوند (Campalans *et al*., 2001) و بازیابی عملکردهای سلولی را در طی تنش غیر-زیستی تسهیل می‌کنند (Lee *et al*., 1995). حداقل ۴ نقطه پروتئینی (۲۴۴,۲۳۴,۲۳۰و ۲۴۵) از این پروتئین در شرایط تنش افزایش بیان یافته‌اند (جدول ۱). این افزایش در پروتئوم برگ گیاهچه های گندم در شرایط تنش خشکی نیز گزارش شده است (Koobaz *et al*., 2020).

پروتئین‌های دارای کاهش بیان در شرایط تنش

بیش‌تر پروتئین‌هایی که تحت تنش کاهش بیان نشان دادند از جمله پروتئین‌هایی بودند که ایزومرهای دیگر آن ها افزایش بیان نشان داده‌اند، این مسئله به‌دلیل خاصیت هگزامری گندم است. البته برخی نیز ناشناخته بودند (۵۶ و ۵۸). سیتوکروم c اکسیداز (۵۰۴ و ۵۰۵) و Phytepsine از جمله پروتئین‌های موثر در فرایند تنفس و تجزیه پروتئین‌ها هستند که بیان آن‌ها تحت تنش کاهش یافته است.

نتایج تحقیق روی خانواده پروتئینی Aspartic Dehydrogenase که پروتئین Phytepsine یکی از اعضای این خانواده است، نشان داد که تنش گرما موجب کاهش بیان ژن‌های این خانواده شده، ولی تنش‌های زیستی بیش‌تر موجب افزایش بیان این ژن خواهند شد. این پروتئین در ساختار فتوسیستم یک نقش دارد و تنش خشکی به‌دلیل توقف سریع رشد موجب کاهش بیان این ژن شده است (Sun *et al*., 2020).

تغییر پروتئین‌ها در آبیاری مجدد

آبیاری مجدد کوتاه‌مدت در تنش ۱۰ روزه موجب کاهش بیان ۵۰ ژن شده و بیان ۶۵ ژن را افزایش داد، درحالی‌که ادامه این آبیاری و حضور برگ و ریشه جدید (نشانه رشد مجدد) تعداد ژن‌های کاهش بیان‌یافته را به مصرف گیاه برسد. برگشت بهتر و سریع‌تر گیاهان با تنش ده روزه پس از آبیاری مجدد در مطالعه قبلی انجام‌شده ۱۳۳ ژن و تعداد افزایش یافته‌ها را به ۸۱ ژن تغییر دادند. پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات و سنتز پروتئین از جمله لکه‌های پروتئینی افزایش‌یافته در آبیاری مجدد می‌باشند. سرپین‌ها SPZ2B_WHEAT (P93692) در آبیاری مجدد ۱۰ روزه افزایش بیان نشان داده‌اند. این پروتئین‌ها دارای خاصیت ممانعت‌کننده فعالیت پروتئازی هستند که این کار با تخریب جایگاه فعال پروتئازها انجام می شود، این واکنش یک‌طرفه است و امکان بازگشت وجود ندارد. البته تمامی سرپین‌ها دارای خاصیت ممانعت-کنندگی نیستند و برخی برای ذخیره مواد و یا انتقال هورمون و یا خاصیت تاخوردگی (Chaperone) مورد استفاده قرار می‌گیرند و اغلب در بخش خارج سلولی قرار دارند (Belitz *et al*., 2004). در شرایط تنش طولانی-مدت میزان افزایش بیان ثابت مانده ولی کاهش بیان در تنش ۱۰ روزه در بیش‌تر لکه‌های پروتئینی نمایان شده است. گیاه به‌منظور حفظ بقای بیش‌تر میزان بیان ژن‌های خود را کاهش داده است. نتایج حاصل از تحقیقات محققان دیگر نیز حاکی از تاثیر تنش خشکی بر گندم در ارقام حساس و متحمل کاهش بیان ژن‌های زیادی از جمله زیرواحد بزرگ روبیسکو، زیرواحدهای طویل‌شدن پروتئین و پروتئین‌های مربوط به تولید کربوهیدرات‌ها و متابولیسم انرژی است (Faghani *et al*., 2015). پروتئین‌هایی مانند آلفاآمیلاز که در شکستن نشاسته نقش دارند، در این شرایط افزایش بیان نشان داده‌اند تا ترکیبات موجود در بذر شکسته‌شده و مورد استفاده گیاه قرار گیرد. افزایش بیان آلفاآمیلاز در زمان آبگیری جهت کمک به ترکیبات نشاسته‌ای در مطالعه محققان دیگرروی گندم نشان داده شده است (Liu *et al*., 2018). سه روز پس از آبیاری مجدد تنش ۲۰ روزه، ۸۷ ژن کاهش بیان و ۷۵ ژن افزایش بیان یافته است ولی پس از یک هفته آبیاری، تعداد ژن‌های کاهش‌یافته به ۹۷ ژن رسیده درحالی‌که تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته ثابت است. کاهش بیان بیش‌تر در آبیاری مجدد طولانی‌مدت در تنش ۱۰ روزه نشان‌دهنده نزدیک‌تر شدن این گیاه به شرایط ایده‌آل است. پروتئین سنتز نشاسته در بذر موجب می‌شود تا ترکیبات ذخیره ای در بذر باقی‌مانده و در صورت نیاز به روی پروتئوم گیاهچه بذرهای گندم نیز این نتایج را تایید می‌کند (Koobaz *et al*., 2020).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج تحقیق نشان داد گیاهچه‌های چهار روزه گندم می‌توانند تنش خشکی شدید را به‌خوبی تحمل نموده و پس از آبیاری مجدد به رشد خود ادامه دهند. تولید برگ، ریشه‌های جدید و مصرف مواد موجود در بذر نشان‌دهنده رشد مجدد گیاه است. میزان بیان پروتئین‌های زیادی در زمان‌های متفاوت تحمل به تنش خشکی و آبیاری مجدد افزایش و کاهش پیدا می‌کنند. افزایش بیان ژن‌های موثر در تولید پروتئین‌های دفاعی در تنش خشکی و پروتئین‌های موثر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در شرایط آبیاری مجدد از طرفی و کاهش بیان پروتئین‌های موثر در تنفس و تجزیه پروتئین از سوی دیگر گزارش شده است. این مطالعه بینش جدیدی درباره سازوکارهای تحمل به خشکی گیاهچه‌های گندم و نقش موثر بذر جهت بررسی جزئیات دقیق‌تر مولکولی را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، جهت تامین اعتبار مالی این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

Abro, A.A., Memon, S., Abro, S.A., Magsi, F.H., Soomro, A.A., Mahar, N.A. and Chang, B.H. 2019. Influence of additional amino acids in growth of different wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Journal of Plant Nutrition, 42(19): 2539-2551. **(Journal)**

Ashraf, M., and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59, 206–216. **(Journal)**

Belitz, D., Grosch, W. and Schieberle, P. 2004. Food Chemistry (3rd ed.). Springer. ISBN 978-3-540-64704-1. **(Book)**

Beltrano, J., Ronco, M.G. and Montaldi, E.R. 1999. Drought stress syndrome in wheat is provoked by ethylene evolution imbalance and reversed by rewatering, aminoethoxyvinylglycine, or sodium benzoate. Journal of Plant Growth Regulation, 18: 59-64. **(Journal)**

Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8: 93–99. **(Journal)**

Bradford, 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. **(Journal)**

Branlard, G., Bancel, E. Allain, E., Girousse, C., Merlino, M., Laubin, B., Nadaud, I., Debiton, C., Bronner, G. and Martre, P. 2007. Proteomics studies on wheat developmental and mature kernel. Gluten proteins, 2006: 352-356. **(Journal)**

Buchanan, B.B. and Balmer, Y. 2005. Redox regulation: A Broadening Horizon. Annual Revolution of Plant Biology, 56: 187-220. **(Journal)**

Campalans, A., Pagès, M. and Messeguer, R. 2001. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (Prunus.amygdalus). Tree Physiology, 21(10): 633-643. **(Journal)**

Ehya, F., Monavarfeshani, A., Fard, E.M., Farsad, L.K., Nekouei, M.K., Mardi, M. and Salekdeh, G.H. 2013. Phytoplasma-responsive microRNAs modulate hormonal, nutritional, and stress signaling pathways in Mexican lime trees. PLoS One, 8, 66372. **(Journal)**

Faghani, E., Gharechahi, J., Komatsu, S., Mirzaei, M., Khavarinejad, R.A., Najafi, F., Karimi Farsad, L. and Salekdeha, G.H. 2015. Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. Journal of Proteomics, 104:1-15. **(Journal)**

Fathi, A., Pakzad, M., Taei, A., Brink, T.C., Pirhaji, L., Ruiz, G., Sharif Tabe Bordbar, M., Gourami, H., Adjaye, J. and Baharvand, H., 2009. Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid bodybased differentiation. Proteomics, 9:4859–4870. **(Journal)**

Gibson, S.I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. Current Opinion Plant Biology, 8: 93–102. **(Journal)**

Hajheidari, M.E., Buchanan, A., Wong, B.B., Majidi, I. and Salekdeh, G.H. 2007. Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. Journal of Proteome Research, 6: 1451-1460. **(Journal)**

Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K., 1986. Solobolization of plant membrane proteins for analysis by two-dimentional gel electrophoresis. Plant Physiology, 81: 802-806. **(Journal)**

Jiang, S.S., Liang, X.N., Li. X., Wang, S.L., Lv, D.W., Ma, C.Y., Li, X.H., Ma, W.J. and Yan, Y.M. 2012. Wheat Drought-Responsive Grain Proteome Analysis by Linear and Nonlinear 2-DE and MALDI-TOF Mass Spectrometry. International Journal of Molecular Sciences, 13: 16065-16083. **(Journal)**

Koobaz, P., Ghaffari, M.R., Heidari, M., Mirzaei, M., Ghanatie, F., Amirkhani, A., Mortazavi, S.E., Moradi, F., Hajirezaei, M.R. and Hosseini Salekdeh, G. 2020.Proteomic and metabolomic analysis of desiccation tolerance in wheat young seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 146: 349-362. **(Journal)**

Koobaz, P., Ghanati, F., Salekdeh, G., Heidari, M., Moradi, F. and Ale buye, R. 2014. Native tolerance of four day old seedlings wheat to dessication tolerance. Journal of Plant Process and Function, 3, 81–91. (In Persion)**(Journal)**

Lee. G.J., Pokala. N. and Vierling, E. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. Journal of Biological Chemistry, 270: 10432-10438. **(Journal)**

Leprince, O., Satour, P., Ly-Vu, B. and Buitink, J. 2004. The role of sugars and hexose phosphorylation in regulating re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Cucumis sativa* and *Medicago truncatula*. Physiologia Plantarum, 64: 200–209. **(Journal)**

Liu, Y., Han, C., Deng, X., Liu, D., Liu, N. and Yan, Y .2018. Integrated physiology and proteome analysis of embryo and endosperm highlights complex metabolic networks involved in seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Physiology, 229: 63–76. **(Journal)**

Lv, Y., Zhang, S., Wang, J. and Hu, Y. 2016. Quantitative Proteomic Analysis of Wheat Seeds during Artificial Ageing and Priming Using the Isobaric Tandem Mass Tag Labeling .PLoS One, 11(9):e0162851. **(Journal)**

Ma, D., Huang, X., Hou, J., Ma, Y., Han, Q., Hou, G., Wang, C., and Guo,T. 2018. Quantitative analysis of the grain amyloplast proteome reveals differences in metabolism between two wheat cultivars at two stages of grain development. BMC Genomics, 19(768): 1-17. **(Journal)**

Montalvo-Hernandez. L., Piedra-Ibarra. E.E., Gomez-Silva. L., Lira-Carmona. R. and Acosta-Gallegos. J.A. 2008. Differential accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. New Phytologist, 177: 102-113. **(Journal)**

Mousavi, S.A., Pouya, F.M., Ghaffari, M.R., Mirzaei, M., Ghaffari, A., Alikhani, M., Ghareyazie, M., Komatsu, S., Haynes, P.A. and Salekdeh, G.H. 2016. A database for plant proteome response to stress. Journal of Proteomics, 143, 69–72. **(Journal)**

Oliver, M.J., Jain, R., Balbuena, T.S., Agrawal, G., Gasulla, F., and Thelen, J.J. 2011. Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, Sporobolus stapfianus, in response to dehydration. Phytochemistry, 72: 1273–1284. **(Journal)**

Rampino. P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G. and Perrotta, C. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant Cell Environment, 29: 2143–52.**(Journal)**

Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. 2003. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. Planta, 217(3): 392-399. **(Journal)**

Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Petrova, T., Tsenov, N., Demirevska, K. and Feller, U. 2006. Proteolytic activity in wheat leaves during drought stress and recovery. General and Applied Plant Physiology, 32: 92-100. **(Journal)**

Soares, G.C.M., Dias, D.C.F.S., Faria, J.M.R. and Borges, E.E.L. 2015. Physiological and biochemical changes during the loss of desiccation tolerance in germinating *Adenanthera pavonina* L. seeds. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 87(4): 2001-2011. **(Journal)**

Sun, H., Wang, C.Y., Zhang, G.L. and Gou, J.Y., 2020. Genomic analyses of wheat Aspartic proteinase gene family provide novel insights for wheat stress responses. Journal of Plant Science, 4(1): 174-185. **(Journal)**

Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C. and Baskin, J.M. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. Journal of Ecology, 91: 294–304. **(Journal)**

Van Riet, L., Altenbach, D., Vergauwen, R., Clerens, S., Kawakami, A., Yoshida, M., Van den Ende, W. and Wiemken Van Laere, A. 2008. Purification, cloning and functional differences of a third

fructan 1-exohydrolase (1-FEHw3) from wheat (*Triticum aestivum*)". Physiologia Plantarum, 133:242-253. **(Journal)**

Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J. and Vieira, L.G.E. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. Journal of Plant Physiology, 164: 1367-1376. **(Journal)**

Walters, C., Farrant, J.M., Pammenter, N.W. and Berjak, P. 2002. Desiccation and Damage. In: Black M, Pritchard HW (eds) Desiccation and Survival in Plants. Drying Without Dying. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 263–291. **(Book)**

Zhang, N., Chen, F., Huo, W. and Cui, D. 2015. Proteomic analysis of middle and late stages of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) grain development. Frontiers in Plant Science, 6:735-782. **(Journal)**

Proteome analysis of wheat seeds under severe drought stress and recovery

Parisa Koobaz*[1], Manzar Heidari[2]

Received: July 16, 2020 Accepted: November 14, 2020

Abstract

Seedling wheat spirit are tolerant to strict dehydration up to the 4th day following imbibitions. The aim of present study is investigation of responsive proteins to drought stress and recovery in seeds attached to four day seedlings. The test was done by drought stress using interruption of irrigation in two time points (10 and 20 days) and recovery for 3 and 7 days in a growth chamber. All the experiments were conducted based on Completely Randomized Design (CRD) with three replications. Seedlings attached to seedlings were examined for physiological and protein assays. Physiological traits showed strict drought stress level on seed and recovery could return seedlings to normal condition. 2DE done on seed of all treatments and replicates and 657 protein spots were reproducibly detected by Ag No_3 staining from seeds. Finally, after significance test, 130 spots were detected by searching protein data banks. Drought stress has increased the expression of genes involved in the production of defense proteins (proline increase), the breakdown of seed storage compounds, and the production of proteins that are effective in structural changes in the cell wall. On the other hand, reduced expression of proteins effective in respiration and protein breakdown has reduced energy consumption in cells under stress. Under re-irrigation conditions, increased expression of proteins effective in carbohydrate metabolism has led to the consumption of nutrients in seeds (reduction of seed weight) and the production of new structural proteins (presence of new leaves and roots).

Key words: Drought; Physiology; Proteome; Wheat seed

How to cite this article

Koobaz, P. and Heidari, M. 2021. Consideration of wheat seed proteome under strict drought stress and recovery. Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(3): 245-257. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms. 2021.5228

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Research Assistant Prof. Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. pkoobaz@abrii.ac.ir
2. Researcher, Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. m.heidari@abrii.ac.ir

*Corresponding author: pkoobaz@abrii.ac.ir