تأثير تنش خشكي روي پرولين آزاد، پروتئين كل، قند محلول و پروتئين پروفايل درگياه علفي رستاخيزي *Sporobolus elongates* با توان تحمل خشكي زياد

حميدرضا قاسمپور- جهانبخش كيانيان
دانشگاه رازي كرمانشاه

چكيده

اسپوروبولوس النگيتوس[۱] گونه‌اي با تحمل خشكي زياد است كه مي‌تواند در كمبود آب تا خشكي كامل زنده بماند, و وقتي مجدداً آبدار شود فعاليتهاي فيزيولوژيكي خود را آغاز كند. در هر دوي برگ‌هاي متصل به گياه و جدا شده با استفاده از روش آزمايش قرمز خنثي(Levitt;1960) زنده بودن سلولها اندازه‌گيري شد. در خلال تنش خشكي ميزان پرولين آزاد, پروتئين كل, قند محلول و (SDS-PAGE) تعيين گرديد, و با علف غير رستاخيزي (S.pyramidalis) مقايسه شد.يافته‌هاي ما در افزايش قندها با تئوري شيشه‌اي و شيشه‌اي شدن در سيتوپلاسم تطابق داشت. افزايش اندك پرولين آزاد در گياهان با توان تحمل خشكي در مقايسه با گياه حساس با كارهاي ارائه شده فعلي همخواني داشت. پروتئين كل ابتدا با افزايش خشكي سير صعودي داشت و سپس كاهش يافت, كه ممكن است دال بر تغيير الگوي آنزيمي در خلال تنش خشكي باشد. آناليز (SDS-PAGE) نشان داد كه ظهور باندهاي جديد با افزايش خشك شدن با تغييرات آنزيمي و نوع قندهايي كه در خلال آن ايجاد مي‌شود هماهنگي دارد.

مقدمه

حدود ۳۹ گونهء گياهي علفي توسط گروه‌هاي تحقيقاتي به سرپرستي پروفسورگاف[۲] در جهان شناخته شده‌اند, اين گياهان قادرند پس از خشك شدن كامل(مثل خشكي كاه) مجدداً پس از دريافت آب(حدود ۱۰ ميلي‌متر يا بيش‌تر) فعاليت‌هاي حياتي و متابوليكي خودرا از سرگيرند و تمامي برگ‌ها بخش‌هاي هوايي خشك شده (به جزگل) مجدداً احيا[۳] و سبز شوند و به فعاليت‌هاي عادي و فيزيولوژيك خود ادامه دهند. به همين دليل اين گياهان را، گياهان باتوان تحمل خشكي زياد يا رستاخيزي مي‌گويند. فراواني اين گونه درميان تك لپه‌اي‌ها نسبت به دولپه‌اي‌ها بيش‌تر است, و در خانواده گندميان[۴] تعداد قابل ملاحظه‌اي از گونه‌هاي علفي رستاخيزي يافت شده است. گياه رستاخيزي و گياه معمولي ظاهراً تفاوت آشكاري ندارند، اما گياهان معمولي در ميزان ۲۵RWCتا۵۰% از بين مي‌روند در حالي كه اغلب گياهان رستاخيزي در ميزان RWC۴-۱۳% هم بدون صدمه زنده مي‌مانند[۵].

۱-orobolos Elongatus ۲ -Gaff ۳- Revive ۴- Poaceae

شرايط اقليمي آب و هوايي فلات ايران دربيشتر نقاط كشوربه نحوي است كه به مدت چندين ماه از سال فاقد بارندگي است. با توجه به خشك‌سالي‌هاي اخير و احتمال تداوم آن بنا بر اظهار نظر كارشناسان، بي‌آبي در مراتع و مزارع مشكلات فراواني را ايجاد خواهد كرد. نبودن بارش وكم آبي سبب فرسايش مراتع، پيش‌روي كوير، نابودي زمين‌هاي كشاورزي، مزارع و باغات مي‌شود و پوشش گياهي را با مخاطره روبرو كرده است و اين پديده خود به تنهايي تاثيرات منفي بسياري در شرايط زيست محيطي، اقتصادي و اجتماعي در پي دارد. برگ‌هاي كاملاً خشك شده و چروكيده *S .elongatus* ظاهراً مرده‌اند ولي با جذب آب پس از ۲۴ ساعت حيات تازه را شروع مي‌كنند. زنده ماندن بافتهاي كاملاً خشك شده با آزمايش‌هاي ميكروسكوپي تاييد شده است كه ايفاي نقش نيمه تراوايي غشا را ثابت مي‌كند. برخي از گياهان رستاخيزي در طول تحمل خشكي كلروفيل خود را حفظ مي‌كنند[۱] و برخي ديگركلروفيل خود را از دست مي‌دهند[۲] ، كه گونه رستاخيزي مورد بررسي ما در گروه دوم است[۱۳],[۱۷].

سنتز مجدد كلروفيل در نور غالباً به طور وسيع پس از آبدهي مجدد در مريستم پايه برگ انجام مي‌گيرد، ولي تنفس در مدت ۱۰-۳۰ دقيقه پس از آبدهي(Rehydration) شروع مي‌شود. در مجموع سبز شدن بين۳-۵ روز طول مي‌كشد. اين گياهان نسبت به خشكي بردباري پروتوپلاسمي TD[۳] دارند. از تغييرات ظاهري كه در اثر خشكي و از دست دادن آب پديد مي‌آيد، لول شدن و پيچ و تاب خوردن (Folding) وسيع در برگ‌هاست، كه اين حالت معمولاً مانع توسعه استرس مكانيكي مفرط بين ديوارهء سلولي و پلاسما مي‌شود و همچنين مانع اكسيد شدن نوري و متلاشي شدن دروني كليه ديواره هاي سلولي در بافت خشك شده مي‌شود. البته سلول‌هاي آماسي[۴] در اين عمل نقش عمده‌اي دارند[۴].

از تغييرات فيزيولوژيكي و بيوشيميايي تخريب غشاي كلروپلاست و ميتوكندري, كاهش فتوسنتز و تنفس، تجزيه احتمالي كلروفيل , هيدروليز شدن نشاسته و پروتئين‌هاي غير محلول در آب است. سطح پرولين آزاد در گونه رستاخيزي افزايش مي‌يابد, اما معمولاً اين افزايش تفاوت چندان محسوسي در مقايسه با گياه حساس به خشكي ندارد. بعلاوه افزايش نسبت قند به يون نيز مشاهده شده است كه قند افزايش يافته به طور عمده ساكاروز است وقندهاي رافينوز و استاكيوز نقش كمكي دارند[۱],[۷].

افزايش معني‌داري در اتصال گزيلوكان و پكتين غير استريفيه در ديواره سلولي, در زمان اعمال تنش پديد مي‌آيد كه درحالت آب‌دهي مجدد سطح آن كاهش مي‌يابد. سطح سوكروز، اربيتون و گلوكوپيرانوزيل بتا گليسرول افزايش پيدا مي كند, همچنين .فعاليت (G6PD) گلوكز-۶فسفات - دهيدروژناز هم به طور قابل توجهي افزايش مي‌يابد. SDS-PAGE افزايش درميزان پروتئين ونيز سنتز پروتئين جديد را نشان داده است[۷],[۸].

---

[۱] مانند: Myrothamnus flabellifolia

[۲] مانند: Xerophyta villosa

[۳] Protoplasmic Drought Tolerance

[۴] Buliform cells

در نتيجهء اعمال تنش خشكي سيستم Switch كه يك جز آن Aba است وارد عمل مي شود و مي تواند سبب فعاليت ژن و تغيير نسخه برداري براي القاي تحمل خشكي شود. درغلظتهاي كم، محلولهاي chaotropic (كلريدو نيترات) اثر پايدار كنندگي روي غشا دارند ، ولي در هنگام دهيدراته شدن گونه هاي حساس به خشكي, ممكن است غلظت اين محلولها افزايش يابد و به اندازه اي سمي شود كه موجب از بين رفتن غشا و ساختار دو لايه‌اي آن گردد.[۲،۴و۱۰]

اكنون, گروههاي زيادي مشغول شناسايي ژنهاي مقاوم به خشكي هستند، همانند ژن Rab16 و-CDeT11 24 كه در اثر استرس خشكي و تيمار Aba بيان شده است.[۱۶]

مواد و روشها

پس از استريل كردن بذرها، كشت و تكثيرگياه رستاخيزي *S .elongatus* و گياه حساس به خشكي (شاهد) *S.pyramidalis* درشرايط گلخانه‌اي صورت گرفت. سپس نمونه هاي رشد داده شده به شرايط كنترل شدهء اتاق رشد منتقل گرديدند . قبل از شروع آزمايش , به مدت ۱۶ روز در اتاق رشد نگه داري و كاليبره شدند. شرايط نگه داري ۲۸ درجة سانتيگراد در روز و۲۵ درجهء در شب، شدت روشنايي ۳۷۲/۴۶ W/m^2 درزمان تابش، رطوبت نسبي در شبانه روز۳۵ % ، دوره روشنايي وتاريكي ۱۲ساعته ومدت تنش بي آبي ۴۵ روز بود كه RWC از۹۸% شروع و تا ۸% كاهش يافت. طي اين دوره استرس، نمونه برداري جهت سنجش قند محلول، پروتئين كل، پرولين آزاد، آزمون زنده بودن و استخراج پروتئين براي SDS-PAGE انجام پذيرفت.

اندازه گيري قند محلول با روش اسيد سولفوريك ـفنل صورت گرفت. كه دراين روش ۰/۱ گرم از پودر خشك در۱۵ ميلي ليترالكل اتانلز۷۰% مخلوط شد, و به مدت يك هفته در يخچال نگه داري شد و هر روز به هم زده شد. پس از يك هفته به ۲ ميل ليتر از نمونه يك ميلي ليتر فنل ۵% و ۵ ميلي ليتر اسيد سولفوريك غليظ افزوده شد و نيم ساعت به حال خود رها گرديد و سپس جذب در ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. سنجش پروتئين كل با استفاده از روش فولن- لوري انجام شد. و به دليل شهرت كافي آن و موجود بودن در منابع مختلف از ذكر آن صرف نظر مي شود.

براي سنجش پرولين آزاد از روش Bates (1973) كمك گرفته شد. بدين ترتيب كه به ۰/۰۴ گرم از پودر خشك برگ ۱۰ ميلي ليتر از محلول سولفوساليسيليك اسيد ۳%(SSA) افزوده گرديد، پس از ۴۸ ساعت با صافي شمارة يك صاف شد و سپس يك ميلي ليتر از محلول نمونه در لولهء آزمايش ريخته و به آن يك ميلي ليتر معرف نين هيدرين و يك ميلي ليتر اسيد استيك گلاسيال افزوديم . لوله‌هاي آزمايش يك ساعت در بن ماري جوشان(۱۰۰ درجه سانتي گراد) قرار داده شد تا زماني كه رنگ آجري تثبيت شد، پس از آن بلافاصله لوله‌ها در آب يخ قرار گرفت (براي توقف واكنشها) ، به دنبال آن به هر لوله ۲ ميلي ليتر تولوئن افزوده شد، در

نهايت دو فاز تشكيل شد از فاز قرمز بالايي نمونه برداري گرديد و در طول موج ۵۲۰ نانومتر مقدار جذب خوانده شد [۳].

آزمون زنده بودن در اندازه‌هاي مختلف RWC روي برگهاي گونة رستاخيزي و گونه حساس پس از ۲۴ ساعت شناور كردن در آب مقطر انجام گرفت، از برگها برشهايي تهيه گرديد. روي اين برشها به مدت۴۵–۶۰ دقيقه محلول قرمز خنثي (neutral red test) (۰/۰۰۴ گرم در ۱۰ ميلي ليتر كلريد كلسيم با۶/۸=PH) ريخته شد و با عدسي ۴۰, تعداد سلولهاي زنده و كل شمارش شد و توسط رابطه VT%= x alive(100)/ x Total درصد آزمون زنده بودن محاسبه گرديد.[۲] پس از اندازه گيري هاي متعدد RWC متناسب با طول روز تنش با استفاده از رابطه RWC% = FW-DW/TW-DW.100 به دست آمد. دراين رابطه FW وزن برگ تازه, DW وزن برگ پس از خشك شدن (درآون ۷۰ درجه سانتي گراد به مدت ۴۸ ساعت)، TW وزن برگ پس از تورژسانس كامل با قرار گرفتن در آب مقطر به مدت ۲۴ساعت مي باشد.

نتيجه وبحث

گونهء علفي رستاخيزي *S .elongatus* (با توان تحمل خشكي زياد) و گونهء حساس به خشكي *S.pyramidalis* درRWC هاي مختلف از ۹۸%تا ۸% مورد آزمايش قرار گرفت.(شكل ۱)

در تست زنده بودن مطابق شكل D؛ گونه رستاخيزي تا RWC ۸% هم زنده ماند؛ اما گونه حساس

در فاصله پا يينتر از ۶۰% علائم حياتي را نشان نداد. كه اين كار با استفاده از روش قرمز خنثي (neutral red test) و Levitt"1960 روي غشاي نيمه تراواي تونوپلاست براي نشان دادن زنده يا غير زنده ماندن گونة مقاوم وحساس به خشكي انجام گرفت. [۱۴] براي بررسي مقاومت در برابر خشكي در برگ جدا شده و زنده ماندن سلولها به وسيلة تعادل بخار در محيط بسته از پتانسيلهاي آب تهيه شده با استفاده ازمحلولهاي NaCl و $CaCl_2$ در ظروف حاوي حبه‌هاي شيشه‌اي glass beads در برگهاي جدا از گياه صورت گرفت كه در اين حالت جدا شدن برگ از گياه علائم زنده بودن را نشان نداد، كه نتيجه به دست آمده تاييدي بود بر كارهايي كه توسط گروه تحقيقاتي پروفسورگاف صورت گرفته است. نتيجه‌اي كه از اين واكنش استنباط مي شود اين است كه مجموعه اي از سيگنالها و يا هورمونهايي همچون ABA از بخشهاي تحتاني(ريشه) ترشح و آزاد شده و توان تحمل خشكي را در برگ القا مي كند، و به همين دليل برگ جدا شده فاقد اين ارتباط است[۲و۴]

ميزان قند محلول طبق شكلB در طي تحمل خشكي در علف رستاخيزي نسبت به گونه حساس افزايش پيدا كرد. اين قند افزايش يافته سبب ايجاد حالت فاز شفاف (Viterous) در پروتوپلاسم آب از دست داده شده است، كه مي‌تواند ازغشاها محافظت كند.همچنين با افزايش نسبت قند به يون از ايجاد حالت سميت و(chaotropic)

ممانعت مي‌شود، اين افزايش باعث پايداري در طول تنش خشكي شده , فرصتي را ايجاد مي كند تا محلولهاي

سازگاري بتوانند موجبات افت اثرات آشفتگي را فراهم نمايند. البته عمل تحمل به خشكي زياد در دو فاز آغازين و تاخيري صورت مي گيرد، در فاز اول مجموعه اي از پروتئينهاي ضروري پاسخ حفاظتي اوليه را در برابر استرس خشكي داده، و در فاز بعدي سطح ساكاريدها بالا مي‌رود ويا با جور شدن و ارتباط با پروتئينها موجب توسعه تحمل خشكي مي شود.

سطح پرولين طبق شكلC در طي تنش بي آبي در نمونه مقاوم نسبت به نمونة حساس افزايش نسبي را نشان داد، با توجه به اينكه پرولين و ديگر آمينو اسيدها يا Glycin betaine به عنوان تنظيم كنندهاي اسمزي دربسياري از گياهان در شرايط استرس بي آبي افزايش يافته اند .[۱،۶و۱۱]

پروتئين كل مطابق شكلA در علف رستاخيزي تا RWC ۳۸% سير صعودي را نشان داد و پس از آن رو به كاهش نهاد. در گونه حساس نوسانات زيادي به ثبت رسيد. اگر چه در مجموع وضعيت كمي پروتئين جهت بررسي تحمل خشكي كافي نبود, اما تفسير تغيير پروتئين كل در طي تنش ايجاد شده معرف آن است كه در ابتداي تنش، گونه رستاخيزي براي مقابله وتحمل بي آبي فعاليتها و واكنشهاي متابوليسمي خود را احتمالاً بالا مي برد كه در اين مسير آنزيمهاي متنوع آنابوليسمي و كاتابوليسمي زيادي ممكن است فعال شوند كه اين آنزيمها مي توانند سطح نشاسته را در اثر هيدروليز كاهش , و ميزان ساكاريد ساكاروز را افزايش دهند و سطح گلوكز و فركتوز كاهش يابد و احتمالا يك سري آنزيمهاي اساسي متابوليسمي را در پروتوپلاسم در داخل ارگانلها متراكم كند. پس از RWC ۳۸% بتدريج سطح فعاليت متابوليسمي كاهش مي‌يابد تنها آنزيمهاي اساسي براي برگشت به حالت بهبود پس از آبدهي در خود ابقا كرده است , لذا از اين رو سطح پروتئين كل در پايينتر از اين محدوده كاهش يافته است [۱۰].

بررسي تغييرات در قطر وتعداد باندهاي پروتئيني در SDS-PAGE , نشان داد كه در گياه رستاخيزي در مراحل آخر تنش بي آبي دو باند پديدار و دو باند كم رنگ شده , ولي درگونه شاهد باندهايي ناپديد شدند(شكل۱). بررسي انجام گرفته توسط ديگران دو فاز اصلي تغييرات در سنتز پروتيين در In vivo در زنده ماندن خشكي كامل گياه *S. stapfianus* تشخيص داده شده است. فازاول ظاهر شدن ۱۰ پروتيين جديد در ۵۱-۸۵% RWC, ۱۵ پروتيين جديد در فاز دوم ۳-۳۷% RWC كه احتمالا فاز اصلي همين است[۴،۱۵، ۸ و۱۲].

برخي از آنزيمهايي كه در تحمل خشكي شناسايي شده اند عبارتند از: گلوكز ۶ فسفات دهيدروژناز، آلفا آميلاز, سرين تر اونين فسفاتاز, گلوكورونيداز و زير واحد بزرگ Rubisco [۱۵ و ۱۱].

M S_1 S_{15} S_{45} T_1 T_{15} T_{45}

SDS-PAGE از نمونه رستاخيزي (T) در مقايسه با شاهد (S)
(1) روز اول تنش با RWC 98% . (15) روز پانزدهم پس از تنش با RWC 58% (45) چهل و پنج روز پس از تنش با RWC 8%

گياه رستاخيزي در حال احيا (بهبودي و سبز شدن از قاعده برگ شروع شده است.)

تأثير كاهش ميزان آب نسبي در ميزان پروتئين كل (A), قند محلول (B) , پرولين آزاد (C)

و درصد زنده ماندن (D) (R رستاخيزي , S شاهد)

منابع

1. R. P. Adams and *et a*l. Comparison of free sugar in growing and …Biochemical Systematic and Ecology, 18(2/3), (1990). 107-110.
2. D. Bartels, K. Schneider and *et al*. Molecular Cloning of Abscisic Acid - Modulated… Planta, 181, (1990), 27-34.
3. L. S. Bates, and *et a*l. Rapid determination of free Proline…Plant and Soil. 39, (1973), 205-207.
4. D.F. Gaff, and B. R. Loveys, Abscisic Acid Content…Journal of Experimental Botany, 35(158), (1984), 1350-1358.
5. D. F. Gaff, 1971. Desiccation-Tolerant Flowering Plant …Science, 174; (1984), 1033-1034
6. D. F. Gaff, The Biology of Resurrection Plant. In; J. S. Pate, and A.J. Mc CMB, (eds) (1981).
7. D. F. Gaff, and *et al*. The fine Structure of Dhydrated and ... Plant Physiol, 104, (1976), 1185-1192.
8. H.R Ghasempour, R.D. Gianello and *et al.* Proteins Correlated….chapter 20. Plant Responses to Environmental stress. Scientific Publishers, Oxford, 161-166.
9. H. R.Ghasempuor, and *et al*. Contents of Sugar In Leaves of Plant Growth Regulation. 24; (1998),185-91.
10. H. R. Ghasempuor, and *et al*. Growth Inhibitor…plant Growth Regulation 24; (1998), 79-83
11. R. D. Gianello, J. Kuang, and *et a*l. Proteins Correlated with Desiccation Tolerance in a Resurrection Grass…Bios Scientific Publisher Oxford, (ed.) M.S. Smallwood (1999).
12. J. Kuang, D. F. Gaff and *et a*l. Changes in vivo Proteins Complements in …Plant Physiology. 22; (1995), 1027-34.
13. J. Levitt and *et al.* Some problem in drought resistance. Bull. Res. Counc. Isr. 8D. (1960), 177-179.
14. P. C. Owen The Relation of Germination pf Wheat to …Journal of Expermental Botany, 3(8), (1952), 188-203.
15. Tracyl. and *et al*. Characterization of Protein Synthetic …Journal of Experimental Botany Vol. 44, No 262; (1993), 921-928.
16. R .Velesco, F. Salamini, D. Bartels Gene Structure and Expression ….Plant, 204; (1998),

459-71.

17. F. A. M.Wellburn, and *et al*. Novel Chloroplast and unusual cellular ….Botanical Journal of the Linnaean Society, 72; (1976), 51-4.