

تأثیر تنش خشکی روی پرولین آزاد، پروتئین کل، قند محلول و پروتئین پروفایل در گیاه علفی رستاخیزی *Sporobolus elongates* با توان تحمل خشکی زیاد

حمیدرضا قاسمپور- جهانبخش کیانیان
دانشگاه رازی کرمانشاه

چکیده

اسپوروبولوس النگیٹوس^۱ گونه‌ای با تحمل خشکی زیاد است که می‌تواند در کمبود آب تا خشکی کامل زنده بماند، و وقتی مجدداً آبدار شود فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را آغاز کند. در هر دوی برگ‌های متصل به گیاه و جدا شده با استفاده از روش آزمایش قرمز خنثی (Levitt; 1960) زنده بودن سلول‌ها اندازه‌گیری شد. در خلال تنش خشکی میزان پرولین آزاد، پروتئین کل، قند محلول و (SDS-PAGE) تعیین گردید، و با علف غیر رستاخیزی (*S. pyramidalis*) مقایسه شد. یافته‌های ما در افزایش قندها با تنوری شیشه‌ای و شیشه‌ای شدن در سیتوپلاسم تطابق داشت. افزایش اندک پرولین آزاد در گیاهان با توان تحمل خشکی در مقایسه با گیاه حساس با کارهای ارائه شده فعلی همخوانی داشت. پروتئین کل ابتدا با افزایش خشکی سیر صعودی داشت و سپس کاهش یافت، که ممکن است دال بر تغییر الگوی آنزیمی در خلال تنش خشکی باشد. آنالیز (SDS-PAGE) نشان داد که ظهور باندهای جدید با افزایش خشک شدن با تغییرات آنزیمی و نوع قندهایی که در خلال آن ایجاد می‌شود هماهنگی دارد.

مقدمه

حدود ۳۹ گونه گیاهی علفی توسط گروه‌های تحقیقاتی به سرپرستی پروفیسورگاف^۲ در جهان شناخته شده‌اند. این گیاهان قادرند پس از خشک شدن کامل (مثل خشکی کاه) مجدداً پس از دریافت آب (حدود ۱۰ میلی‌متر یا بیشتر) فعالیت‌های حیاتی و متابولیکی خود را از سرگیرند و تمامی برگ‌ها بخش‌های هوایی خشک شده (به جز گل) مجدداً احیا^۳ و سبز شوند و به فعالیت‌های عادی و فیزیولوژیک خود ادامه دهند. به همین دلیل این گیاهان را، گیاهان باتوان تحمل خشکی زیاد یا رستاخیزی می‌گویند. فراوانی این گونه در میان تک‌لپه‌ای‌ها نسبت به دولپه‌ای‌ها بیشتر است، و در خانواده گندمیان^۴ تعداد قابل ملاحظه‌ای از گونه‌های علفی رستاخیزی یافت شده است. گیاه رستاخیزی و گیاه معمولی ظاهراً تفاوت آشکاری ندارند، اما گیاهان معمولی در میزان RWC ۲۵ تا ۵۰٪ از بین می‌روند در حالی که اغلب گیاهان رستاخیزی در میزان RWC ۴-۱۳٪ هم بدون صدمه زنده می‌مانند [۵].

۱- orobolus Elongatus

۲- Gaff

۳- Revive

۴- Poaceae

شرایط اقلیمی آب و هوایی فلات ایران در بیشتر نقاط کشور به نحوی است که به مدت چندین ماه از سال فاقد بارندگی است. با توجه به خشک‌سالی‌های اخیر و احتمال تداوم آن بنا بر اظهار نظر کارشناسان، بی‌آبی در مراتع و مزارع مشکلات فراوانی را ایجاد خواهد کرد. نبودن بارش و کم‌آبی سبب فرسایش مراتع، پیش‌روی کویر، نابودی زمین‌های کشاورزی، مزارع و باغات می‌شود و پوشش گیاهی را با مخاطره روبرو کرده است و این پدیده خود به تنهایی تأثیرات منفی بسیاری در شرایط زیست محیطی، اقتصادی و اجتماعی در پی دارد. برگ‌های کاملاً خشک شده و چروکیده *S. elongatus* ظاهراً مرده‌اند ولی با جذب آب پس از ۲۴ ساعت حیات تازه را شروع می‌کنند. زنده ماندن بافت‌های کاملاً خشک شده با آزمایش‌های میکروسکوپی تایید شده است که ابفای نقش نیمه تراوایی غشا را ثابت می‌کند. برخی از گیاهان رستاخیزی در طول تحمل خشکی کلروفیل خود را حفظ می‌کنند^۱ و برخی دیگر کلروفیل خود را از دست می‌دهند^۲، که گونه رستاخیزی مورد بررسی ما در گروه دوم است [۱۳]، [۱۷].

سنتز مجدد کلروفیل در نور غالباً به طور وسیع پس از آبدهی مجدد در مریستم پایه برگ انجام می‌گیرد، ولی تنفس در مدت ۱۰-۳۰ دقیقه پس از آبدهی (Rehydration) شروع می‌شود. در مجموع سبز شدن بین ۳-۵ روز طول می‌کشد. این گیاهان نسبت به خشکی بردباری پروتوپلاسمی^۳ TD دارند. از تغییرات ظاهری که در اثر خشکی و از دست دادن آب پدید می‌آید، لول شدن و پیچ و تاب خوردن (Folding) وسیع در برگ‌هاست، که این حالت معمولاً مانع توسعه استرس مکانیکی مفرط بین دیواره سلولی و پلاسما می‌شود و همچنین مانع اکسید شدن نوری و متلاشی شدن درونی کلیه دیواره های سلولی در بافت خشک شده می‌شود. البته سلول‌های آماسی^۴ در این عمل نقش عمده‌ای دارند [۴].

از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تخریب غشای کلروپلاست و میتوکندری، کاهش فتوسنتز و تنفس، تجزیه احتمالی کلروفیل، هیدرولیز شدن نشاسته و پروتئین‌های غیر محلول در آب است. سطح پرولین آزاد در گونه رستاخیزی افزایش می‌یابد، اما معمولاً این افزایش تفاوت چندانی محسوس در مقایسه با گیاه حساس به خشکی ندارد. بعلاوه افزایش نسبت قند به یون نیز مشاهده شده است که قند افزایش یافته به طور عمده ساکاروز است و قندهای رافینوز و استاکیوز نقش کمکی دارند [۱]، [۷].

افزایش معنی‌داری در اتصال گزیلکان و پکتین غیر استریفیه در دیواره سلولی، در زمان اعمال تنش پدید می‌آید که در حالت آبدهی مجدد سطح آن کاهش می‌یابد. سطح سوکروز، اربیتون و گلوکوپیرانوزیل بتا گلیسرول افزایش پیدا می‌کند. همچنین فعالیت (G6PD) گلوکز-۶ فسفات - دهیدروژناز هم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. SDS-PAGE افزایش در میزان پروتئین ونیز سنتز پروتئین جدید را نشان داده است [۷]، [۸].

۱- مانند: *Myrothamnus flabellifolia*

۲- مانند: *Xerophyta villosa*

۳- Protoplasmic Drought Tolerance

۴- Buliform cells

در نتیجه اعمال تنش خشکی سیستم Switch که يك جز آن Aba است وارد عمل می شود و می تواند سبب فعالیت ژن و تغییر نسخه برداری برای القای تحمل خشکی شود. در غلظتهای کم، محلولهای chaotropic (کلریدو نیترات) اثر پایدار کنندگی روی غشا دارند، ولی در هنگام دهیدراته شدن گونه های حساس به خشکی، ممکن است غلظت این محلولها افزایش یابد و به اندازه ای سمی شود که موجب از بین رفتن غشا و ساختار دو لایه ای آن گردد. [۲۰، ۴۱]

اکنون، گروه های زیادی مشغول شناسایی ژنهای مقاوم به خشکی هستند، همانند ژن Rab16 و CDeT11 که در اثر استرس خشکی و تیمار Aba بیان شده است. [۱۶]

مواد و روشها

پس از استریل کردن بذرها، کشت و تکثیر گیاه رستاخیزی *S. elongatus* و گیاه حساس به خشکی (شاهد) *S. pyramidalis* در شرایط گلخانه ای صورت گرفت. سپس نمونه های رشد داده شده به شرایط کنترل شده اتاق رشد منتقل گردیدند. قبل از شروع آزمایش، به مدت ۱۶ روز در اتاق رشد نگه داری و کالیبره شدند. شرایط نگه داری ۲۸ درجه سانتیگراد در روز و ۲۵ درجه در شب، شدت روشنایی $372/46 \text{ W/m}^2$ در زمان تابش، رطوبت نسبی در شبانه روز ۳۵٪، دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و مدت تنش بی آبی ۴۵ روز بود که RWC از ۹۸٪ شروع و تا ۸٪ کاهش یافت. طی این دوره استرس، نمونه برداری جهت سنجش قند محلول، پروتئین کل، پرولین آزاد، آزمون زنده بودن و استخراج پروتئین برای SDS-PAGE انجام پذیرفت. اندازه گیری قند محلول با روش اسید سولفوریک فنل صورت گرفت. که در این روش ۰/۱ گرم از پودر خشک در ۱۵ میلی لیتر الکل اتانل ۷۰٪ مخلوط شد، و به مدت یک هفته در یخچال نگه داری شد و هر روز به هم زده شد. پس از یک هفته به ۲ میل لیتر از نمونه یک میلی لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و نیم ساعت به حال خود رها گردید و سپس جذب در ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. سنجش پروتئین کل با استفاده از روش فولن- لوری انجام شد. و به دلیل شهرت کافی آن و موجود بودن در منابع مختلف از ذکر آن صرف نظر می شود.

برای سنجش پرولین آزاد از روش Bates (1973) کمک گرفته شد. بدین ترتیب که به ۰/۰۴ گرم از پودر خشک برگ ۱۰ میلی لیتر از محلول سولفوسالسیلیک اسید (SSA) ۳٪ افزوده گردید، پس از ۴۸ ساعت با صافی شماره یک صاف شد و سپس یک میلی لیتر از محلول نمونه در لوله آزمایش ریخته و به آن یک میلی لیتر معرف نین هیدرین و یک میلی لیتر اسید استیک گلاسیال افزودیم. لوله های آزمایش یک ساعت در بن ماری جوشان (۱۰۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شد تا زمانی که رنگ آجری تثبیت شد، پس از آن بلافاصله لوله ها در آب یخ قرار گرفت (برای توقف واکنشها)، به دنبال آن به هر لوله ۲ میلی لیتر تولوئن افزوده شد، در

نهایت دو فاز تشکیل شد از فاز قرمز بالایی نمونه برداری گردید و در طول موج ۵۲۰ نانومتر مقدار جذب خوانده شد [۳].

آزمون زنده بودن در اندازه‌های مختلف RWC روی برگهای گونه رستاخیزی و گونه حساس پس از ۲۴ ساعت شناور کردن در آب مقطر انجام گرفت، از برگها برشهایی تهیه گردید. روی این برشها به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه محلول قرمز خنثی (neutral red test) (۰/۰۰۴ گرم در ۱۰ میلی لیتر کلرید کلسیم با $PH=6/8$) ریخته شد و با عدسی ۴۰، تعداد سلولهای زنده و کل شمارش شد و توسط رابطه $VT\% = \frac{x \text{ alive}(100)}{x \text{ Total}}$ درصد آزمون زنده بودن محاسبه گردید. [۲] پس از اندازه گیری های متعدد RWC متناسب با طول روز تنش با استفاده از رابطه $RWC\% = \frac{FW-DW}{TW-DW} \cdot 100$ به دست آمد. در این رابطه FW وزن برگ تازه، DW وزن برگ پس از خشک شدن (درآون ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت)، TW وزن برگ پس از تورژسانس کامل با قرار گرفتن در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت می باشد.

نتیجه و بحث

گونه علفی رستاخیزی *S. elongatus* (با توان تحمل خشکی زیاد) و گونه حساس به خشکی *S. pyramidalis* در RWCهای مختلف از ۹۸٪ تا ۸٪ مورد آزمایش قرار گرفت. (شکل ۱) در تست زنده بودن مطابق شکل D؛ گونه رستاخیزی تا RWC ۸٪ هم زنده ماند؛ اما گونه حساس در فاصله پایینتر از ۶۰٪ علائم حیاتی را نشان نداد. که این کار با استفاده از روش قرمز خنثی (neutral red test) و Levitt 1960 روی غشای نیمه تراوی تونوپلاست برای نشان دادن زنده یا غیر زنده ماندن گونه مقاوم و حساس به خشکی انجام گرفت. [۱۴] برای بررسی مقاومت در برابر خشکی در برگ جدا شده و زنده ماندن سلولها به وسیله تعادل بخار در محیط بسته از پتانسیلهای آب تهیه شده با استفاده از محلولهای NaCl و $CaCl_2$ در ظروف حاوی حبه‌های شیشه‌ای glass beads در برگهای جدا از گیاه صورت گرفت که در این حالت جدا شدن برگ از گیاه علائم زنده بودن را نشان نداد، که نتیجه به دست آمده تاییدی بود بر کارهایی که توسط گروه تحقیقاتی پروفیسورگاف صورت گرفته است. نتیجه‌ای که از این واکنش استنباط می شود این است که مجموعه‌ای از سیگنالها و یا هورمونهایی همچون ABA از بخشهای تحتانی (ریشه) ترشح و آزاد شده و توان تحمل خشکی را در برگ القا می کند، و به همین دلیل برگ جدا شده فاقد این ارتباط است [۲ و ۴] میزان قند محلول طبق شکل B در طی تحمل خشکی در علف رستاخیزی نسبت به گونه حساس افزایش پیدا کرد. این قند افزایش یافته سبب ایجاد حالت فاز شفاف (Viterous) در پروتوپلاسم آب از دست داده شده است، که می‌تواند از غشاهای محافظت کند. همچنین با افزایش نسبت قند به یون از ایجاد حالت سمیت (chaotropic) (

ممانعت می‌شود، این افزایش باعث پایداری در طول تنش خشکی شده، فرصتی را ایجاد می‌کند تا محلولهای

سازگاری بتوانند موجبات افت اثرات آشفته‌گی را فراهم نمایند. البته عمل تحمل به خشکی زیاد در دو فاز آغازین و تاخیری صورت می‌گیرد، در فاز اول مجموعه‌ای از پروتئینهای ضروری پاسخ حفاظتی اولیه را در برابر استرس خشکی داده، و در فاز بعدی سطح ساکاریدها بالا می‌رود و یا با جور شدن و ارتباط با پروتئینها موجب توسعه تحمل خشکی می‌شود.

سطح پرولین طبق شکل C در طی تنش بی‌آبی در نمونه مقاوم نسبت به نمونه حساس افزایش نسبی را نشان داد، با توجه به اینکه پرولین و دیگر آمینو اسیدها یا Glycin betaine به عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی در بسیاری از گیاهان در شرایط استرس بی‌آبی افزایش یافته‌اند. [۱۱ و ۶، ۱]

پروتئین کل مطابق شکل A در علف رستاخیزی تا RWC ۳۸٪ سیر صعودی را نشان داد و پس از آن رو به کاهش نهاد. در گونه حساس نوسانات زیادی به ثبت رسید. اگر چه در مجموع وضعیت کمی پروتئین جهت بررسی تحمل خشکی کافی نبود، اما تفسیر تغییر پروتئین کل در طی تنش ایجاد شده معرف آن است که در ابتدای تنش، گونه رستاخیزی برای مقابله و تحمل بی‌آبی فعالیتها و واکنشهای متابولیکی خود را احتمالاً بالا می‌برد که در این مسیر آنزیمهای متنوع آنابولیکی و کاتابولیکی زیادی ممکن است فعال شوند که این آنزیمها می‌توانند سطح نشاسته را در اثر هیدرولیز کاهش، و میزان ساکارید ساکاروز را افزایش دهند و سطح گلوکز و فرکتوز کاهش یابد و احتمالاً یک سری آنزیمهای اساسی متابولیکی را در پروتوپلاسم در داخل ارگانلها متراکم کند. پس از RWC ۳۸٪ بتدریج سطح فعالیت متابولیکی کاهش می‌یابد تنها آنزیمهای اساسی برای برگشت به حالت بهبود پس از آبدی در خود ابقا کرده است، لذا از این رو سطح پروتئین کل در پایینتر از این محدوده کاهش یافته است [۱۰].

بررسی تغییرات در قطر و تعداد باندهای پروتئینی در SDS-PAGE، نشان داد که در گیاه رستاخیزی در مراحل آخر تنش بی‌آبی دو باند پدیدار و دو باند کم رنگ شده، ولی در گونه شاهد باندهایی ناپدید شدند (شکل ۱). بررسی انجام گرفته توسط دیگران دو فاز اصلی تغییرات در سنتز پروتئین در *In vivo* در زنده ماندن خشکی کامل گیاه *S. stapfianus* تشخیص داده شده است. فاز اول ظاهر شدن ۱۰ پروتئین جدید در ۵۱-۸۵٪ RWC، ۱۵ پروتئین جدید در فاز دوم ۳-۳۷٪ RWC که احتمالاً فاز اصلی همین است [۱۵، ۴، ۸ و ۱۲].

برخی از آنزیمهایی که در تحمل خشکی شناسایی شده‌اند عبارتند از: گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، آلfa آمیلاز، سرین تر اونین فسفاتاز، گلوکورونیداز و زیر واحد بزرگ Rubisco [۱۵ و ۱۱].

M S₁ S₁₅ S₄₅ T₁ T₁₅ T₄₅

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

گیاه رستاخیزی در حال احیا (بهبودی و سبز شدن از قاعده برگ شروع شده است).

تأثیر کاهش میزان آب نسبی در میزان پروتئین کل (A)، قند محلول (B)، پرولین آزاد (C)

و درصد زنده ماندن (D) (R رستاخیزی، S شاهد)

منابع

1. R. P. Adams and *et al.* 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 Absciscic Acid - Modulated... Planta, 181, (1990), 27-34.
3. L. S. Bates, and *et al.* Rapid determination of free Proline...Plant and Soil. 39, (1973), 205-207.
4. D.F. Gaff, and B. R. Loveys, Absciscic 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 al.* 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 al.* 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 ExpressionPlant, 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.