

اثر تنش شوری بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و پروفایل پروتئینی ارقام متحمل و حساس جو
(*Hordeum vulgare* L.) در مرحله رشد رویشی

Effect of salinity stress on physiological characteristics and protein profile of tolerant
and sensitive barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars at vegetative growth stage

معروف خلیلی^۱ و محمدرضا نقوی^۲

چکیده

خلیلی، م. و م. ر. نقوی. ۱۳۹۹. اثر تنش شوری بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و پروفایل پروتئینی ارقام متحمل و حساس جو (*Hordeum vulgare* L.) در مرحله رشد رویشی. نشریه علوم زراعی ایران. ۲۲(۱): ۴۹-۳۲.

به منظور بررسی ویژگی‌های مرتبط با تحمل تنش در ارقام متحمل (افضل) و حساس (ماکویی) جو در شرایط تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار کلرید سدیم)، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه پیام نور مهاباد انجام شد. تنش شوری از مرحله پنجه‌زنی آغاز شده و نمونه‌های برگ در صفر، ۳، ۶ و ۹ روز پس از اعمال تنش برداشت شدند. نتایج نشان داد که تنش شوری علاوه بر اثر منفی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل روابط آبی سلول و فتوسنتز گیاه، باعث افزایش غلظت یون سدیم، کاهش غلظت یون پتاسیم، اختلال در تعادل یونی و کاهش نسبت پتاسیم به سدیم در سلول شد. در شرایط تنش شوری، میزان نشت الکترولیتی، پرولین و گلاسیسین بتائین در ارقام جو بیشتر از شرایط بدون تنش بودند. بیشترین کاهش در ویژگی‌های مورد ارزیابی در نمونه‌های روز نهم پس از اعمال تنش مشاهده شد و از این نظر، رقم ماکویی نسبت به رقم افضل افت بیشتری داشت. نتایج تجزیه پروتئوم نشان داد که در شرایط تنش شوری هفت لکه پروتئینی بین دو رقم جو مورد ارزیابی مشترک بودند. نتایج طیف‌سنجی جرمی نشان داد که اکثر پروتئین‌های شناسایی شده در دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش داشته و بعنوان مهم‌ترین پروتئین‌های مشترک در دو رقم جو در هم‌نوسازی سلولی مشارکت داشتند. بر اساس نتایج این آزمایش، به نظر می‌رسد که بیان کمتر پروتئین‌های مشترک در رقم حساس نسبت به رقم متحمل جو، علت واکنش ضعیف‌تر این رقم در شرایط تنش شوری باشد.

واژه‌های کلیدی: تجمع مواد محلول آلی، تنش شوری، جو، روابط آبی و نشت الکترولیتی.

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) از نظر میزان تولید پنجمین غله دنیا است، ولی از نظر اهمیت، پس از گندم، ذرت و برنج چهارمین غله مهم دنیا به شمار می‌رود. این گیاه از نظر کشت و کار در شرایط متنوع آب و هوایی مقام اول را دارا است (FAO, 2017). جو بعد از گندم بیشترین سطح زیر کشت را در ایران داشته و با درجهٔ سازگاری وسیع‌تر، ولی با ارزش اقتصادی کمتر، در مناطقی از نواحی خشک که میزان بارندگی برای تولید گندم کافی نباشد، می‌تواند جایگزین گندم شود و با توجه به اینکه در این مناطق خاک‌ها علاوه بر خشکی معمولاً شور هستند، بنابراین مطالعه در مورد سازوکارهای واکنش این گیاه در شرایط تنش از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است (Koocheki, 1994).

شوری بالاتر از حد آستانه در آب خاک باعث وقوع دو نوع تنش اسمزی و یونی می‌شود که هر دو باعث کاهش معنی‌دار عملکرد گیاه می‌شوند (Pandey and Penna, 2017). اثر سوء تنش اسمزی بلافاصله پس از قرار گرفتن گیاه در معرض شوری در محیط ریشه رخ می‌دهد. تنش اسمزی باعث القای بسته شدن روزنه‌ها شده و رشد سلول‌های گیاه و سوخت و ساز سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در نتیجه سرعت رشد اندام‌های هوایی، سطح برگ‌ها و عملکرد زیستی کاهش پیدا می‌کنند. اثر یونی تنش شوری در مراحل بعدی که گیاه در معرض سطوح بالاتر نمک قرار می‌گیرد، آشکار می‌شود (Nayyar, 2003). تنش یونی روی اثر اسمزی اضافه شده و تنش بیشتری بر گیاه وارد می‌شود. سمیت سوخت و سازی یون سدیم (Na^+) تا حد زیادی نتیجهٔ برتری آن در رقابت با یون پتاسیم (K^+) برای اعمال سلولی است. نسبت‌های بالای یون سدیم به یون پتاسیم (Na^+/K^+) می‌تواند باعث تخریب فرایندهای آنزیمی در سیتوپلاسم سلول شود (Khan et al., 2009). تنش یونی با کاهش محتوای

کلروفیل ارتباط داشته و باعث جلوگیری از فتوسنتز گیاه و القای پیری و مرگ برگ پیش از بلوغ می‌شود. تنش یونی باعث کاهش ظرفیت فتوسنتزی و در نتیجه کاهش عملکرد زیستی گیاه می‌شود (Hortensteiner and Krautler, 2011). در شرایط تنش، ظرفیت فتوسنتزی کلروپلاست‌ها، به دلیل تنش شوری کاهش می‌یابد، زیرا تنش شوری باعث تخریب ساختار کلروپلاست، بی‌ثباتی کمپلکس پروتئین-رنگدانه، تخریب ساختار کلروفیل و تغییر در کمیت و ترکیب آن می‌شود (Khan et al., 2009; Momeni et al., 2013).

یکی از راه‌های مقابله گیاهان با تنش شوری، سنتز ترکیبات دارای خواص اسمزی و محافظت‌کننده‌های اسمزی از جمله پرولین است. افزایش پرولین در گیاهان در هنگام تنش، نوعی سازوکار دفاعی است. پرولین با سازوکارهایی مانند تنظیم اسمزی و جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، باعث افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌ها می‌شود (Khan et al., 2009). گلاسیسین بتائین نیز یک محلول سازگار است که در پاسخ به تنش اسمزی در گیاه انباشته شده و تجمع آن یک عکس‌العمل مهم سازشی محسوب می‌شود (Pandey and Penna, 2017). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در شرایط تنش‌های محیطی، از جمله تنش شوری رخ می‌دهد، تولید انواع اکسیژن فعال است که باعث تخریب غشاهای سلولی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Joseph and Jini, 2010). گیاهان برای مقابله با این عوامل، دارای سازوکارهای حفاظتی شامل مولکول‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها به سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند که شامل: ترکیبات غشایی و محلول در چربی مانند کاروتنوئیدها؛ ترکیبات محلول در آب مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز هستند. آنزیم‌ها در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش بیشتری دارند (Kausar et al., 2013). افزایش فعالیت آنزیم‌های

کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش گزارش شده است (Komatsu and Tanaka, 2004).

تحمل به شوری در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است و با انواع سازوکارهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی ارتباط دارد، بنابراین علاوه بر شناخت سازوکارهای مورفو-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، شناخت سازوکارهای مولکولی واکنش گیاه به تنش از اهمیت بالایی برخوردار است (Joseph and Jini, 2010). تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری معمولاً باعث اختلالات پروتئینی در گیاه می‌شوند. گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی از متابولیت‌های ضروری بر تنش وارد شده غلبه می‌کنند. این عمل از طریق تغییر در بیان ژن‌ها در جهت کاهش و یا افزایش میزان پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها علاوه بر استفاده بعنوان نشانگر، نقش مهمی در سازگاری گیاه به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Joseph and Jini, 2010)، از این رو مطالعه کارکرد این پروتئین‌ها جهت شناسایی سازوکارهای مولکولی تحمل به تنش‌های محیطی ضروری به نظر می‌رسد. رهیافت پروتئومیک ابزار قدرتمند و مناسبی جهت بررسی تغییرات بیان و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی محسوب می‌شود (Komatsu and Tanaka, 2004). تجزیه پروتئومیک یکی از بهترین راهبردها جهت بررسی دینامیک تظاهر پروتئین‌ها در شرایط تنش شوری گزارش شده است (Guo et al., 2012).

با توجه به اهمیت موضوع، هدف از این پژوهش مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در دو رقم جو در شرایط تنش شوری و همچنین شناسایی پروتئین‌های مشترک بین دو رقم به روش طیف‌سنجی جرمی و بررسی نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای متابولیک سلولی و ایجاد تحمل به تنش

شوری بوده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ارقام متحمل و حساس جو شامل رقم افضل (نیمه زودرس، متحمل در زمین‌های شور و حساس در اراضی حاصلخیز، نیمه حساس به ریزش، متحمل به شوری، حساس به زنگ‌ها، سفیدک و لکه قهوه‌ای) (بعنوان رقم متحمل به شوری) و رقم ماکویی (دیررس، مقاوم به خوابیدگی، نیمه حساس به ریزش، مقاوم به سفیدک و نیمه مقاوم به لکه قهوه‌ای، مقاوم به سرما) (بعنوان رقم حساس به شوری) (Emami et al., 2013) که بذر آنها از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد، در مرحله گیاهچه‌ای به روش آبکشت (هیدروپونیک) در سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه مهاباد از نظر پاسخ به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. جهت اطمینان از یکنواختی مواد گیاهی و عدم تداخل اثر سرعت جوانه‌زنی بذور بر تیمارهای شوری، اقدام به تهیه گیاهچه از ارقام جو شد. بذرهای ارقام جو در گلدان‌هایی با تراکم بالا کاشته شده و گیاهچه‌ها پنج روز پس از خیساندن بذرهای آخرین رقم، به بستر اصلی انتقال داده شدند. تغذیه گیاهان طبق برنامه‌ریزی در سه دوره زمانی ۳۰ دقیقه‌ای در طول دوره روشنایی هر شبانه‌روز انجام شد. برای تنظیم نور از روشنایی طبیعی و مصنوعی با استفاده از لامپ‌های فلورسانت و التهابی استفاده شد. دمای روزانه 25 ± 2 و شبانه 15 ± 2 درجه سانتی‌گراد برای رشد گیاهچه‌ها فراهم گردید. رطوبت نسبی گلخانه در طول اجرای آزمایش بین ۶۰-۴۰ درصد بود. تنش شوری از منبع کلرید سدیم ۲۵۰ میلی مولار در مرحله پنجه‌زنی اعمال شد و نمونه‌های برگ‌ی در چهار سطح صفر (شاهد)، ۳، ۶ و ۹ روز پس از اعمال تنش برداشت شدند. تنش روی گیاهان بصورت تدریجی به میزان ۵۰

میلی-مولار در روز تا رسیدن به مقدار مورد نظر (۲۵۰ میلی-مولار) انجام شد و زمان تیمارها پس از کامل شدن اعمال تنش در نظر شد. با توجه به تبخیر و تعرق از سطح بستر و گیاهان و امکان افزایش غلظت عناصر غذایی و نمک کلرید سدیم در بسترهای کاشت، هر دو روز یک بار سطح آب مخازن تغذیه کنترل و به میزان تبخیر و تعرق به آن آب اضافه شد. غلظت نمک کلرید سدیم در تیمارهای شوری و همچنین هدایت الکتریکی محلول‌ها به طور روزانه کنترل می‌شد. ویژگی‌های اندازه‌گیری شده شامل محتوای آب نسبی برگ‌ها به روش واگنر (Wagner, 1979) و سطح ویژه برگ (SLA) از طریق محاسبه نسبت سطح برگ (سانتی‌متر مربع) به وزن خشک برگ (گرم) بدست آمدند (Arias, 2007). برای تعیین پتانسیل آب برگ از دستگاه محفظه فشار (Soil Moistur Equipment Crop, Sanat Barbara, CA, USA) و برای پتانسیل اسمزی از دستگاه اسمومتر (Osmomat O10, Gonotec, Germany) استفاده شد. برای تعیین فلورسانس کلروفیل (کارایی کوانتومی نظام نوری ۲؛ Fv/Fm) از دستگاه فلورومتر (Opti Science, OS-3OMSA, Japan)، برای شاخص کلروفیل از دستگاه کلروفیل متر (SPAD-502, Minolta, Japan) و برای اندازه‌گیری محتوای یون‌های سدیم و پتاسیم از دستگاه فلیم فتومتر (Genway, PFP7/C, UK) استفاده شد. اندازه‌گیری نشت الکترولیتی (EL) با روش نیر (Nayyar, 2003) انجام شد. دمای برگ و میزان هدایت روزنه‌ای برگ نیز به ترتیب با استفاده از دماسنج مادون قرمز و دستگاه پورومتر (Delta-T Devices, Cambridge, UK) اندازه‌گیری شدند. میزان پرولین برگ و گلايسين بتائين به ترتیب با روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) و گریو و گراتان (Grieve and Grattan, 1983) و با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. ارتفاع بوته؛ وزن خشک بوته، تعداد و وزن خشک برگ‌ها نیز

اندازه‌گیری و ثبت شدند. برای افزایش اعتبار نتایج در هر واحد آزمایشی سه نمونه در نظر گرفته شد و کلیه داده‌ها بر اساس میانگین آنها محاسبه مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

جهت تجزیه پروتئوم، دومین برگ کاملاً توسعه‌یافته در شرایط شاهد و تیمار ۹ روز پس از تنش برداشت و استخراج پروتئین کل با استفاده از روش دمروال و همکاران (Damerval *et al.*, 1986) انجام شد. الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG و الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE (Herbert, 1999) اجرا شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول آبی کوماسی انجام و لکه‌های پروتئینی تکراردار در دو رقم متحمل و حساس با استفاده از نرم‌افزار PDQuest شناسایی و برجسته‌سازی شدند. درصد حجمی نقاط تکراردار که توسط نرم‌افزار کمی شده بودند، تجزیه واریانس شدند. در تجزیه واریانس برای انتخاب نقاط پروتئینی که نسبت به تنش عکس‌العمل معنی‌دار داشتند، سطح احتمال معنی‌داری یک درصد در نظر گرفته شد. از بین نقاط انتخاب شده معنی‌دار، نقاطی که IF (Induction Factor) آنها بزرگتر از ۲ و یا کوچکتر از ۰/۵ بود، انتخاب نهایی شده و از بین لکه‌های پروتئینی نهایی، لکه‌های پروتئینی مشترک شناسایی شدند. پس از هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی هدف، از دستگاه طیف سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MS/MS) (در گروه بیولوژی سلولی دانشگاه توشای ایتالیا) برای شناسایی لکه‌های پروتئینی استفاده شد. داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBItr تجزیه شدند. شناسایی پروتئین‌ها با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و با استفاده از شاخص MASCOT Score (Perkins *et al.*, 1999)

صورت گرفت. این شاخص احتمال آماری شناسایی مثبت و درست پروتئین پیش‌بینی شده را مشخص می‌کند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح تنش از نظر کلیه ویژگی‌های ارزیابی شده در ارقام جو در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تفاوت ارقام جو برای ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) و دمای برگ در سطح پنج درصد و برای سایر ویژگی‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار بود. با وجود تغییر نسبی متفاوت در ویژگی‌های ارقام جو در سطوح تنش، روند کلی تغییرات نشان دهنده اثر منفی تنش شوری بر ویژگی‌های مورد مطالعه بود (شکل ۱). برهمکنش رقم در سطوح تنش برای ارتفاع بوته، پتانسیل اسمزی، شاخص کلروفیل، فلورسانس کلروفیل، دمای برگ و سطح ویژه برگ در سطح احتمال پنج درصد و برای سایر ویژگی‌های مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

نتایج نشان داد که تیمار شوری باعث کاهش معنی‌دار صفات ارتفاع بوته، وزن خشک بوته، تعداد برگ در بوته و وزن خشک برگ شد (شکل ۱). بیشترین میانگین ارتفاع بوته در تیمار شاهد در رقم افضل و کمترین مقدار آن در شرایط ۹ روز پس از شروع تنش در رقم ماکویی مشاهده شد. رقم افضل در شرایط تنش وزن خشک بوته بیشتری نسبت به رقم ماکویی داشت (شکل ۱). روند تغییر ارتفاع بوته و وزن خشک بوته در سطوح تنش نشان داد که بیشترین شیب کاهش این صفات پس از سه روز از شروع تنش شوری آغاز شد. این موضوع با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Sairam et al., 2002; Wehner et al., 2015). گزارش شده است که تنش شوری خصوصاً هنگامی که زمان اعمال تنش افزایش می‌یابد، موجب کاهش ارتفاع و وزن خشک بوته می‌شود

(Sairam et al., 2002). در شرایط کمبود آب، کاهش وزن خشک بوته در اکثر گیاهان از جمله جو گزارش شده و اظهار شده است که شوری باعث کاهش ارتفاع بوته و وزن خشک گیاه در هر دو رقم حساس و متحمل شد، ولی در رقم متحمل کاهش کمتری مشاهده شد (Wehner et al., 2015). تعداد برگ در بوته و وزن خشک برگ در تیمار تنش شوری کاهش یافتند (شکل ۱). بیشترین کاهش تعداد برگ در بوته در مورد رقم افضل، در سطح اول تنش شوری (۳ روز پس از اعمال تنش) و در مورد رقم ماکویی، در سطح دوم تنش شوری (۶ روز پس از اعمال تنش) مشاهده شد و در مجموع در شرایط تنش شوری رقم افضل برتر از رقم ماکویی بود (شکل ۱). با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان اظهار داشت که تنش شوری از طریق کاهش فشار آماس باعث کاهش رشد و توسعه سلول‌های گیاه، بخصوص در برگ‌ها شده و به همین دلیل اثر محسوس تنش بصورت کمتر بودن تعداد برگ‌ها، کاهش وزن خشک برگ‌ها، کوچک‌تر بودن ابعاد آنها و کمتر بودن ارتفاع بوته مشاهده می‌شود (Wehner et al., 2015). نتایج سایر آزمایش‌ها نیز نشان داده است که تنش شوری باعث کاهش تعداد برگ‌ها و وزن خشک بوته و وزن خشک برگ می‌شود (Sairam et al., 2002; Wehner et al., 2015).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری بر پتانسیل اسمزی، پتانسیل آب برگ، محتوای آب نسبی برگ، دمای برگ و سطح ویژه برگ معنی‌دار بود و بین ارقام جو از نظر این ویژگی‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. رقم افضل پتانسیل اسمزی منفی‌تری نسبت به رقم ماکویی داشت. پتانسیل آب برگ نیز از ۱/۰۵- مگاپاسکال در تیمار شاهد به ۱/۷۳- مگاپاسکال در تیمارهای تنش کاهش یافت. این نتایج با گزارش‌های پندی و پانا (Pandey and Penna, 2017) مطابقت دارد. گزارش شده است که ارقام متحمل، پتانسیل آب برگ بیشتری در مقایسه با ارقام حساس

محتوای آب نسبی نسبت به ارقام حساس دارند (Michaletti *et al.*, 2018).

نتایج نشان داد که اثر تنش شوری بر سطح ویژه برگ و دمای برگ معنی دار بود. تفاوت ارقام جو از نظر دمای برگ در سطح احتمال پنج درصد و برای سطح ویژه برگ در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود و مقدار آنها در شرایط تنش شوری افزایش یافت (شکل ۱). از این نظر رقم افضل برتر از رقم ماکویی بوده و میزان افت آن در کلیه سطوح تنش، کمتر از رقم ماکویی بود. با وجود روند نسبتاً ثابت افزایشی در رقم افضل در سطوح تنش، کمترین و بیشترین میزان تغییرات دمای برگ و سطح ویژه برگ در رقم ماکویی در روز نهم پس از شروع تنش مشاهده شد (شکل ۱). افزایش سطح ویژه برگ در شرایط تنش ممکن است ناشی از کاهش وزن برگ در مقایسه با کاهش سطح برگ باشد (Michaletti *et al.*, 2018). به عبارت دیگر، کاهش وزن خشک برگ ممکن است ناشی از کاهش ماده خشک ناپایدار و یا افزایش ضخامت دیواره سلولی باشد که همراه با کاهش کمتر در سطح برگ (کاهش سطح برگ به دلیل کاهش محتوای آب نسبی برگ و کاهش در حجم سلول‌ها اتفاق می‌افتد)، باعث افزایش در سطح ویژه برگ در شرایط تنش می‌گردد (Lu and Neumann, 1999). هورتنشتینر و کروتلر (Hortensteiner and Krautler, 2011) تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد و تنش از نظر دمای برگ در جو گزارش کردند و اظهار داشتند که گیاهانی که دمای برگ کمتری دارند، سرعت فتوسنتز بالاتری داشته و افزایش تنفس باعث کاهش سرعت فتوسنتز و در نتیجه افزایش دمای برگ، خصوصاً در ارقام حساس در شرایط تنش می‌گردد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش شوری بر کارایی کوانتومی نظام نوری ۲ (Fv/Fm)، شاخص کلروفیل و هدایت روزنه‌ای معنی‌دار بوده و بین ارقام جو نیز از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تنش

دارند (Khan *et al.*, 2009). کاهش پتانسیل آب برگ و پتانسیل اسمزی برگ، سازوکارهایی برای بقای گیاه در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و شوری محسوب می‌شوند (Pandey and Penna, 2017). اثرهای منفی شوری بر رشد گیاه، به علت پایین بودن پتانسیل اسمزی محلول خاک (تنش اسمزی)، اثر ویژه یونی (سمیت یونی)، عدم تعادل عناصر غذایی یا مجموعه این عوامل ایجاد می‌شود. در چنین شرایطی پتانسیل اسمزی برگ منفی‌تر شده و پتانسیل آب برگ کاهش می‌یابد (Khan *et al.*, 2009). تنظیم اسمزی از طریق تجمع مواد محلول در سلول‌های گیاهی صورت گرفته و باعث حفظ آماس سلولی و تعدیل اثرات مخرب تنش آبی در بافت‌های مختلف می‌شود. بنابراین، پتانسیل اسمزی در شرایط تنش کاهش یافته و جذب آب ادامه یافته و باعث حفظ آماس سلول می‌شود. از این رو، تنظیم اسمزی در ارقام متحمل بیشتر از حساس است (Pandey and Penna, 2017). نتایج نشان داد که محتوای آب نسبی برگ با افزایش تنش شوری بطور معنی‌داری کاهش یافت و در مجموع رقم افضل از محتوای آب نسبی برگ بیشتری برخوردار بود (شکل ۱). محتوای آب نسبی برگ یکی از شاخص‌هایی است که تحمل گیاه را به تنش شوری نشان می‌دهد. کاهش محتوای آب نسبی برگ به دلیل کاهش جذب آب توسط گیاه است، زیرا پتانسیل اسمزی بسیار منفی محلول‌های شور خاک مانع از جذب آب به گیاه شده و در نتیجه پدیده‌ای به نام خشکی فیزیولوژیک بروز می‌کند. وجود نمک در محلول خاک باعث کاهش پتانسیل آب خاک شده و گیاه دچار کم‌آبی دچار شده و در اثر آن روزنه‌ها بسته می‌شوند (Momeni *et al.*, 2013). گزارش‌های متعدد نشان داده است که تنش شوری باعث کاهش محتوای آب نسبی برگ شده است (Momeni *et al.*, 2013; Michaletti *et al.*, 2018). همچنین گزارش شده است که ارقام متحمل به تنش، توانایی بالاتری در حفظ

شوری باعث کاهش کارایی کوانتومی نظام نوری ۲، شاخص کلروفیل و هدایت روزنه‌ای شد و تفاوت کارایی کوانتومی نظام نوری ۲ بین ارقام در سطح احتمال پنج درصد و برای شاخص کلروفیل و هدایت روزنه‌ای در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۱). رقم افضل از نظر این شاخص‌ها دارای میانگین بالاتری بود (شکل ۱). بیکر و روزنکوئیست (Baker and Rosenquist, 2004) گزارش کردند که کارایی کوانتومی نظام نوری ۲ در شرایط تنش، کاهش نشان می‌دهد. مشابه این نتایج توسط جعفرنیا و شریعتی (Jafarinia and Shariati, 2012) گزارش شده و اظهار شد که میزان کارایی کوانتومی نظام نوری ۲ در رقم حساس کلزا در شرایط تنش شوری کمتر از رقم متحمل بود. کارایی کوانتومی نظام نوری ۲ (F_v/F_m)، نشان دهنده سالم بودن غشاهای تیلاکوئید و کارایی نسبی انتقال الکترون از نظام نوری ۲ به نظام نوری ۱ است (Bhardway and Singhal, 1981). تنش‌های غیرزیستی مانند شوری و خشکی باعث کاهش ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون شده و باعث افزایش سرعت رسیدن سیستم به فلورسانس حداکثر (F_m) و کاهش فلورسانس متغیر (F_v) می‌شود. با افزایش شدت تابش، سیستم فتوسنتزی برای کاهش انرژی القا شده، انرژی مازاد را از طریق خاموشی غیر فتوشیمیایی، به صورت غیرتشنشعی از دست داده و به این ترتیب ضمن حفاظت از مرکز واکنش، موجب می‌شود که حداقل آسیب به این مرکز وارد شود (Bhardway and Singhal, 1981). از این رو، کارایی فتوشیمیایی نظام نوری ۲ به صورت نسبت F_v/F_m (نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس حداکثر) بیان می‌شود. تنش‌های محیطی با تأثیر منفی بر نظام نوری ۲، باعث کاهش این نسبت می‌شوند و کاهش این شاخص در ارقام حساس بیشتر است (Ma et al., 1995). برای شاخص کلروفیل نیز رقم افضل نسبت به رقم ماکویی میانگین بیشتری داشت (شکل ۱). شاخص کلروفیل در

تیمار شاهد میانگین بیشتری را داشته و در روز نهم پس از اعمال تنش شوری، بیشترین کاهش را داشت (شکل ۱). در همین رابطه، گزارشاتی در خصوص کاهش شاخص کلروفیل در شرایط تنش خشکی وجود دارد (Hortensteiner and Krautler, 2011). براساس نتایج آزمایش‌های قبلی تنش شوری باعث کاهش شاخص کلروفیل در هر دو رقم حساس و متحمل گندم شد و میزان کاهش این ویژگی برای ارقام حساس بیشتر بود (Khan et al., 2009). در شرایط تنش شوری، تغییرات یونی حاصل از شوری همراه با کاهش هدایت هیدرولیکی آب در خاک، کارایی فتوسنتزی گیاه را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش شاخص کلروفیل و کارایی فتوشیمیایی نظام نوری ۲ می‌شود (Khan et al., 2009). کاهش شاخص کلروفیل در شرایط تنش احتمالاً به دلیل افزایش تخریب این رنگیزه‌ها و یا کاهش ساخت آنها و نیز اختلال در فعالیت آنزیم‌های مسئول سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی است (Hortensteiner and Krautler, 2011).

در شرایط تنش، میزان هدایت روزنه‌ای کاهش یافت. این موضوع نشان‌دهنده بسته‌شدن روزنه‌ها و جلوگیری از خروج آب در شرایط تنش است که خصوصاً روز نهم پس از اعمال تنش مشاهده شد (شکل ۱). رقم افضل در شرایط تنش هدایت روزنه‌ای بالاتری داشت (شکل ۱). برای میزان هدایت روزنه‌ای نیز بین سطوح تنش و ارقام جو تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. هدایت روزنه‌ای یکی از معیارهای تحمل تنش محسوب شده و کاهش آن در شرایط تنش گزارش شده است و در شرایط تنش هدایت روزنه‌ای در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس است. گزارش شده است که عامل اصلی محدودکننده فتوسنتز، کاهش هدایت مزوفیلی است و بین سرعت فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای، هدایت مزوفیلی و کاهش دمای پوشش گیاهی رابطه مثبت وجود دارد (Momeni et al., 2013).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش شوری و

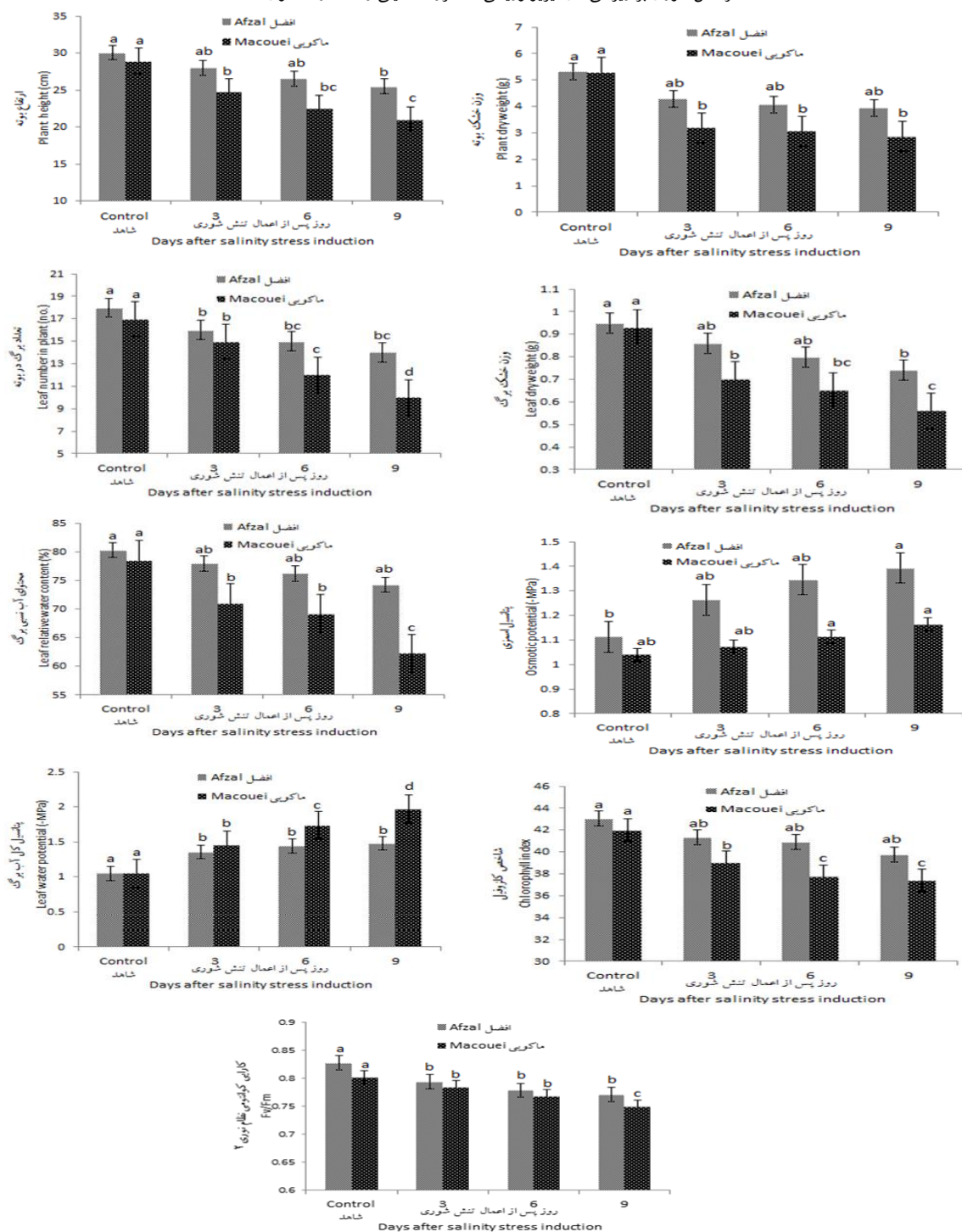
در گیاهان تحت تنش، کمبود یون پتاسیم باعث کاهش آماس سلول‌های محافظ روزنه می‌شود و از این رو، جذب انتخابی این یون باعث تنظیم بهتر حرکات سلول-های روزنه خواهد شد. در این رابطه، شاخص نسبت پتاسیم به سدیم می‌تواند معیار مناسبی برای گزینش ارقام متحمل باشد. گزارش شده است که نسبت پتاسیم به سدیم توارث‌پذیری بالایی دارد و می‌توان از این ویژگی به عنوان یک شاخص قابل اطمینان برای انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری استفاده کرد (Khan et al., 2009).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام جو و تیمارهای شوری از نظر نشت الکترولیتی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج نشان داد که در روز نهم پس از اعمال تنش، میزان نشت الکترولیتی بالاترین مقدار را داشت (شکل ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در رقم حساس، میزان نشت الکترولیتی در شرایط تنش شوری بیشتر بود (شکل ۱). در آزمایش نیر (Nayyar, 2003) نیز ژنوتیپ‌های حساس گندم و ذرت دارای نشت الکترولیتی بیشتری بودند. نشت الکترولیتی نشان دهنده میزان پایداری غشا است. افزایش نشت الکترولیتی نشان دهنده کاهش پایداری غشا و پراکسیداسیون لیپیدهای عشایی توسط گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (Nayyar, 2003).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش شوری برای میزان پرولین و گلایسین بتائین معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تنش شوری باعث افزایش غلظت پرولین و گلایسین بتائین شده و بین دو رقم جو از این لحاظ تفاوت معنی‌داری وجود داشت و افزایش آنها در رقم افضل بیشتر از رقم ماکویی بود (شکل ۱). محتوای پرولین و گلایسین بتائین در روز نهم پس از اعمال تنش شوری به ترتیب حدود ۱/۵ و ۲/۵ برابر تیمار شاهد بود (شکل ۱). تنش شوری محتوای پرولین را در برگ‌های جو به طور معنی‌داری افزایش داد و بیشترین شیب افزایش سه روز پس از

رقم بر غلظت یون سدیم، غلظت یون پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم و میزان نشت الکترولیتی معنی‌دار بود. تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار غلظت یون سدیم و اختلال در تعادل یونی شده و در روز نهم پس از اعمال تنش، مقدار آن بیشتر بود. در خصوص یون پتاسیم، روند غلظت بر عکس بود و نسبت پتاسیم به سدیم در تیمار شاهد بیشتر از تیمار تنش شوری بود (شکل ۱). با افزایش شوری، غلظت یون سدیم در هر دو رقم افزایش یافت و این افزایش در رقم ماکویی بیشتر از رقم افضل بود. در شرایط تنش شوری غلظت یون پتاسیم در رقم افضل بیشتر بود (شکل ۱). بر اساس نتایج بدست آمده در مجموع واکنش رقم افضل از لحاظ روابط یونی بهتر از رقم ماکویی بود. در گیاهان تحت تنش یون پتاسیم به برگ‌ها منتقل می‌شود، در حالی که یون سدیم به صورت یکنواخت‌تری توزیع می‌شود. از این رو، نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط بدون تنش بیشتر از گیاهان تحت تنش است و با افزایش شوری محیط این نسبت کاهش می‌یابد (Pandey and Penna, 2017). در بسیاری از آزمایش‌ها اثر یونی به تحمل تنش شوری ربط داده شده است (Khan et al., 2009; Pandey and Penna, 2017). نتایج نشان داد که تحمل ارقام جو با محتوای یون سدیم در آنها رابطه عکس داشت. در همین رابطه گزارش شده است که درجه تحمل شوری با انباشتگی یون سدیم همبستگی منفی دارد. این موضوع نشان‌دهنده متفاوت بودن درجه تحمل بافتی یا سلولی نسبت به یون سدیم است. غلظت بالای یون سدیم در برگ‌ها باعث اختلال در عمل یون پتاسیم و اختلال در کارکرد روزنه‌ها می‌شود (Pandey and Penna, 2017). به عبارت دیگر بالا بودن جذب یون سدیم با جذب سایر عناصر، بویژه یون پتاسیم، رقابت ایجاد کرده و باعث کمبود یون پتاسیم در گیاه می‌شود (شکل ۱). گزارش شده است که در گیاه یک سازوکار انتقال یون برای یون سدیم وجود دارد که بر علیه انباشت یون پتاسیم عمل می‌کند.

" اثر تنش شوری بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی...، معروف خلیلی و محمد رضا نقوی، ۱۳۹۹، ۴۹-۳۲"

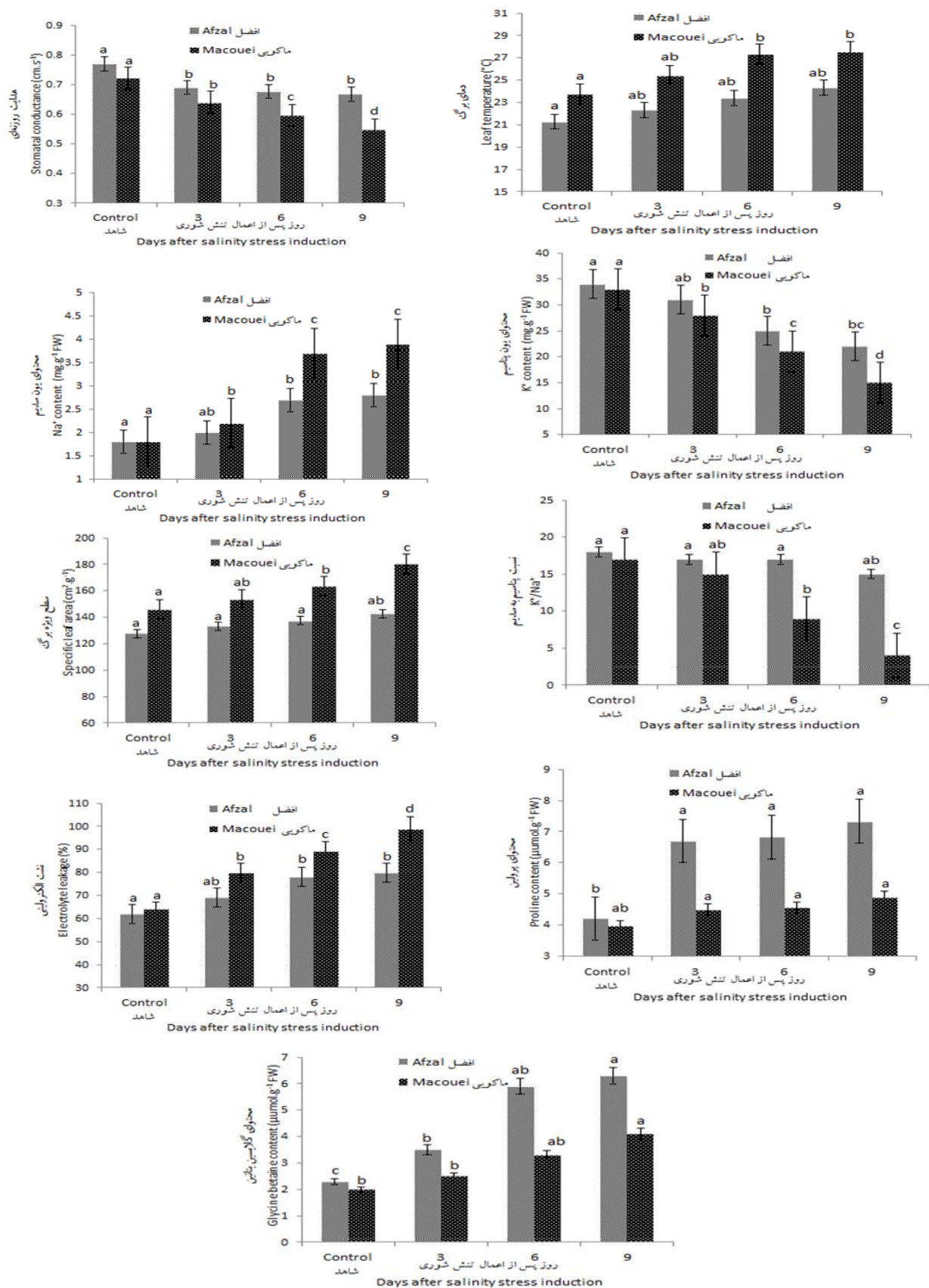


شکل ۱- مقایسه میانگین صفات و ویژگی‌های ارقام جو در تیمارهای تنش شوری؛ صفر (شاهد)، ۳، ۶ و ۹ روز پس از اعمال تنش شوری

میله‌های عمودی نشان‌دهنده اشتباه معیار میانگین‌ها است و میانگین‌های با حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 1. Mean comparison of plant traits of barley cultivars under salinity stress treatments; control, 3 , 6 and 9 days after salinity stress induction

Vertical bars represent the standard error of the means and means with similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD test



شکل ۱- ادامه

Fig. 1. Continued

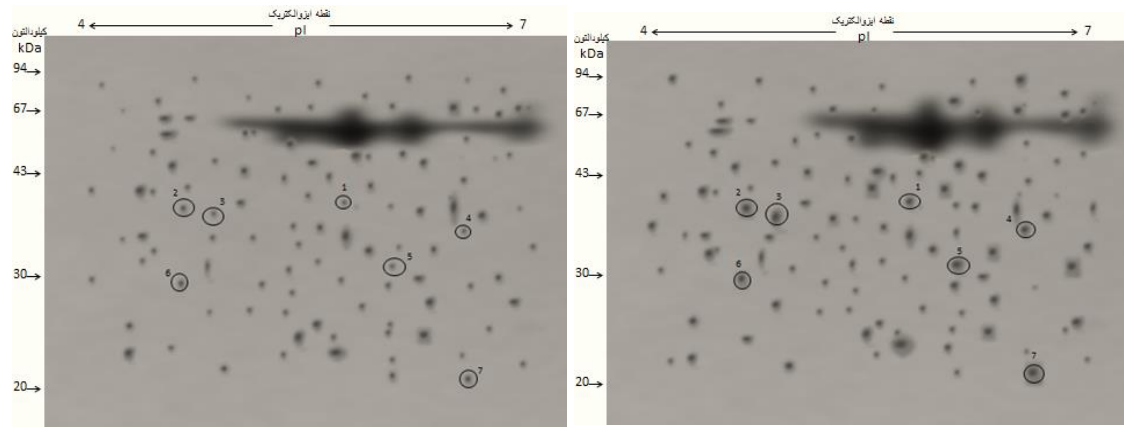
اعمال تنش مشاهده شد. در شرایط تنش اسمزی ناشی از شوری و خشکی، محلول‌های سازگار در سلول‌ها تجمع یافته و در نتیجه محتوای آب سلولی علیرغم کاهش پتانسیل آبی بافت، حفظ می‌شود. پرولین و گلايسین بتائين محلول‌های سازگاري هستند که در واکنش به تنش اسمزی در سلول انباشته می‌شوند و تجمع آنها یک واکنش مهم سازگاري محسوب می‌شود (Khan et al., 2009). براساس نتایج آزمایش‌ها، افزایش پرولین در گیاهان در هنگام وقوع تنش، نوعی سازوکار دفاعی است که با چندین سازوکار مانند تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، حفظ و سنتز پروتئین‌ها، تحمل گیاه را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Nayyar, 2003). میزان پرولین در ارقام حساس به شوری کمتر از ارقام متحمل گندم گزارش شده است (Khan et al., 2009).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان گلايسین بتائين در ارقام جو معنی‌دار بوده و تولید آن همانند پرولین، در شرایط تنش شوری افزایش داشت (شکل ۱). البته نتایج برخی آزمایش‌ها نشان داده است که افزایش میزان گلايسین بتائين در شرایط تنش، معنی‌دار نیست. این تفاوت می‌تواند به دلیل متفاوت بودن شرایط آزمایشی و یا تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌های گیاهی در پاسخ به تنش شوری باشد (Tian et al., 2013). تجمع گلايسین بتائين در پاسخ به تنش خشکی، شوری و دمای بالا به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده است که در گیاهان مقدار اندکی از گلايسین بتائين در شرایط بدون تنش و مقدار بیشتری از آن در شرایط تنش‌های غیرزیستی، خصوصاً در ارقام متحمل، تولید می‌شود (Hussain Wani et al., 2013). بطور کلی گلايسین بتائين نقش مهمی در محافظت از غشاءهای تیلاکوئیدی و حفظ کارایی فتوسیستم‌های فتوسنتزی دارد (Tian et al., 2013).

بررسی الگوی الکتروفورز دوبعدی نشان داد که از

بین لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده در دو رقم جو، هفت لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند (شکل‌های ۲ و ۳). بر اساس تغییر بیان لکه‌های پروتئینی می‌توان اظهار داشت که کلیه پروتئین‌ها در رقم متحمل افضل دارای افزایش بیان بودند و در مواردی نیز که لکه‌های پروتئینی در رقم ماکویی افزایش بیان داشتند، میزان افزایش در رقم افضل بیشتر بود (شکل ۴). به نظر می‌رسد که در رقم افضل با فعال شدن و افزایش بیان پروتئین‌های مهم شناسایی شده در شرایط تنش شوری، عکس‌العمل گیاه جهت حفظ وضعیت رشد بهتر بوده است که این موضوع با نتایج آزمایش جوزف و جینی (Joseph and Jini, 2010) مطابقت دارد. مشخصات هفت پروتئین شناسایی شده با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MALDI TOF/TOF MS) در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس اطلاعات جدول ۲ و بر طبق عملکرد سلولی، این پروتئین‌ها بیشتر نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و تنها دو پروتئین مشترک در انتقال پروتون و چرخه کالوین نقش داشتند. در مجموع از میان لکه‌های پروتئینی شناسایی شده، پنج لکه پروتئینی (لکه‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۷) در دفاع آنتی‌اکسیدانی، یک لکه پروتئینی (لکه ۴) در انتقال پروتون نقش داشته و یک لکه پروتئینی (لکه ۶) نیز جزء پروتئین‌های چرخه کالوین تشخیص داده شد.

بیان پروتئین‌های Glutathione S transferase I (لکه‌های پروتئینی ۳ و ۷) و Copper/Zinc Superoxide Dismutase (لکه پروتئینی ۲) نشان دهنده القای تنش اکسیداتیو در شرایط تنش شوری است (جدول ۱، شکل‌های ۲، ۳ و ۴). GSTs (Glutathione S transferase) گیاهی بیشتر از نوع آنزیم‌های سیتوسولی هستند که از لحاظ عمل، آنزیم‌های سم‌زدای وابسته به گلوکوتایون (Glutathione-dependent detoxifying enzymes) محسوب می‌شوند که گلوکوتایون را با ترکیبات طبیعی مختلف در آمیخته می‌کنند.

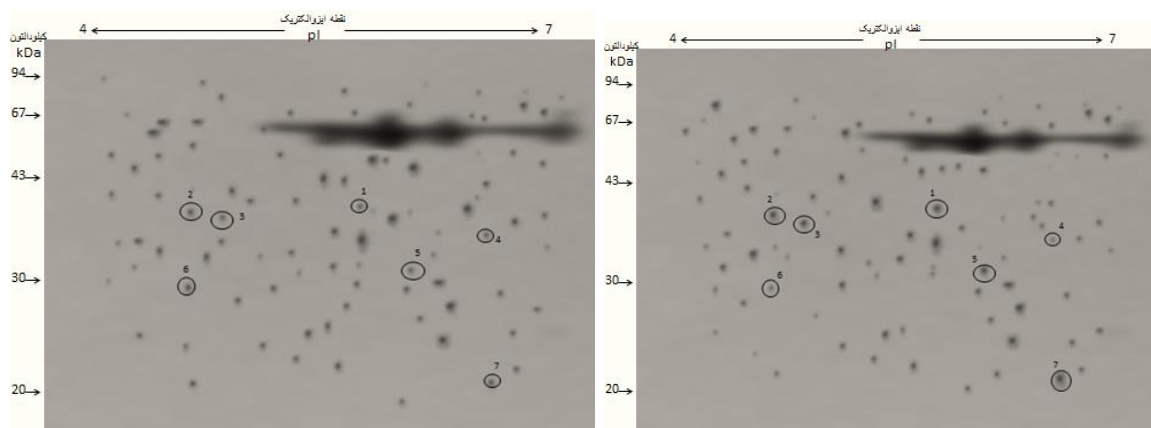


شکل ۲- الکتروفورز دو بعدی جو رقم افضل در تیمارهای بدون تنش (چپ) و تنش شوری (۹ روز پس از اعمال تنش) (راست)

لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری بین دو رقم با شماره مشخص شده است

Fig. 2. Two-dimensional gel electrophoresis of barley cv. Afzal under control (left) and salinity stress treatments (9 days after salinity stress induction) (right)

Common protein spots responsive to salinity stress between two cultivars is shown with numbers



شکل ۳- الکتروفورز دو بعدی جو رقم ماکویی در تیمارهای بدون تنش (چپ) و تنش شوری (۹ روز پس از اعمال تنش) (راست)

لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری بین دو رقم با شماره مشخص شده است

Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoresis of barley cv. Macouei under control (left) and salinity stress treatments (9 days after salinity stress induction) (right)

Common protein spots responsive to salinity stress between two cultivars is shown with numbers

در ارقام متحمل جهت مقابله با تنش افزایش و در ارقام حساس افزایش کمتری می‌یابد (Kausar *et al.*, 2013) که این موضوع با نتایج آزمایش حاضر تطابق دارد. افزایش میزان پروتئین گلوکاتایون ترانسفراز در طی تنش

گلوکاتایون‌های در آمیخته شده برای متابولیسم‌های بعدی از جمله متابولیسم سولفور، به واکوئل‌ها منتقل می‌شوند (Kausar *et al.*, 2013). نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که میزان پروتئین گلوکاتایون ترانسفراز در شرایط تنش

(جدول ۱ و شکل‌های ۲ و ۴).

شواهدی از کاهش کلی سازوکارهای دفاعی در گیاهچه‌های گندم رقم حساس به خشکی از طریق کاهش فراوانی پروتئین harpin binding protein-1 بدست آمده است که باعث ایجاد حساسیت به خشکی می‌شود (Michaletti et al., 2018). از طرف دیگر، افزایش بیان بیشتر ژن *hrf1* که کدکننده پروتئین harpin است (لکه پروتئینی مشترک ۶ با افزایش بیان در رقم افضل و افزایش بیان کمتر در رقم ماکویی) در گیاهچه‌های برنج متحمل به خشکی نیز گزارش شده است که باعث بسته‌شدن روزنه‌ها، افزایش محتوای آسزیک اسید، پرولین و قندهای محلول می‌شود (Zhang et al., 2011). نتایج نتایج سایر آزمایش‌های چند گانه مستقل در خصوص بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی توسط ژن‌های وابسته به عوامل بیماری‌زا، نشان دهنده یک همپوشانی تنظیم‌کننده بین تنش‌های غیرزیستی و زیستی است (Sharma et al., 2013).

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که حضور فعال‌تر پروتئین‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه در شرایط تنش شوری (شکل‌های ۲ و ۴) به عملکرد بهتر رقم متحمل افضل کمک می‌کند و بنابراین با توجه به تغییر پروتئین‌ها در اثر تنش شوری، می‌توان اظهار داشت که واکنش رقم افضل نسبت به رقم ماکویی در هموستازی سلولی بهتر بود.

گروه دیگر از پروتئین‌های مشترک از نظر نوع عمل مربوط به پروتئین دخیل در انتقال پروتون (H^+) بود. لکه پروتئینی ۴ در شرایط تنش شوری در دو رقم جو نشان دهنده زیر واحد دلتای ATP synthase complex بود. از نظر ساختاری ATP سنتاز کلوپلاستی دارای دو جزء اصلی CF_1 extrinsic و CF_0 است که ATP سنتاز با کمک آنها باعث انتقال پروتون از غشای تیلاکوئید و تولید ATP می‌شود. CF_1 دارای پنج زیر واحد آلفا، بتا، گاما، دلتا (لکه پروتئینی مشترک ۴ با افزایش بیان در رقم افضل و کاهش بیان در

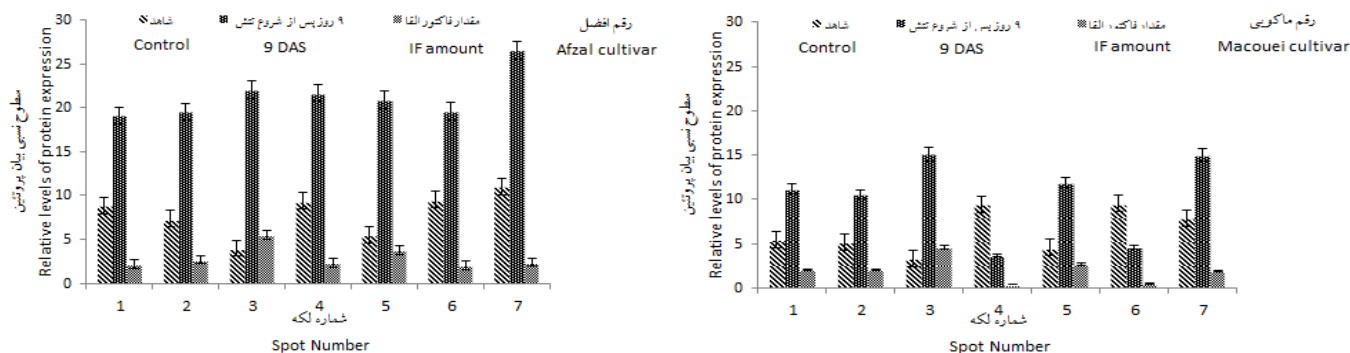
جهت خنثی کردن اثر سوء گونه‌های فعال اکسیژن است (Komatsu and Tanaka, 2004). از طرف دیگر، پروتئین‌های گروه سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) اولین خط دفاعی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محسوب می‌شوند که سوپر اکسید را به مولکول‌های پراکسید هیدروژن (H_2O_2) که سمیت کمتری دارند، تبدیل می‌کنند (Kausar et al., 2013). در واکنش به تنش شوری، فراوانی Cu-Zn SOD (لکه پروتئینی مشترک ۲) در رقم متحمل افضل افزایش بیان بیشتری داشت. همسو با این نتایج، تجمع سوپر اکسید دیسموتاز در رقم متحمل برنج در پاسخ به تنش شوری نیز گزارش شده است (Komatsu and Tanaka, 2004).

تولید پراکسی ردوکسین (لکه پروتئینی مشترک ۱) که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد، در بسیاری از آزمایش‌ها در اثر تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (Joseph and Jini, 2010). پروتئین‌های پراکسی ردوکسین به طور گسترده‌ای در بافت‌ها و میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و سیتوزول یافت می‌شوند. محل این پروتئین‌ها در سلول نشان می‌دهد که آنها نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های سلولی که منبع اصلی گونه‌های فعال اکسیژن هستند، دارند. این پروتئین‌ها علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل پیام‌های سلولی نقش دارند. انتهای این پروتئین‌ها متصل به اسید آمینه سیستئین است که پلی‌اتیلن سولفینیک اکسید شده برای واکنش با پراکسید است. کارکرد آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، تبدیل گونه‌های فعال اکسیژن به پراکسید هیدروژن است و پراکسی ردوکسین نوع ۲، مولکول‌های پراکسید هیدروژن را احیاء می‌کند. در بسیاری از آزمایش‌ها واکنش پراکسی ردوکسین به تنش، به عنوان یک پروتئین پاسخ‌دهنده در شرایط تنش، گزارش شده است (Sairam et al., 2002). حضور بیشتر این پروتئین در جو رقم افضل (لکه پروتئینی ۲)، نقش آن را در تحمل تنش شوری پس از روز نهم اعمال تنش، نشان می‌دهد

جدول ۱- خصوصیات پروتئین‌های مشترک شناسایی شده در ارقام جو افضل و ماکویی در شرایط تنش شوری

Table 1. Characteristics of common proteins identified in Afzal and Macouei barlet cultivars under salinity stress condition

گروه عملکردی پروتئین Functional group of protein	شماره لکه Spot number	تجربی Empirical		تئوری Theoretical		نام پروتئین Name of protein	شماره دسترسی Accession number
		جرم مولکولی MW	نقطه ایزوالکتریک pI	جرم مولکولی MW	نقطه ایزوالکتریک pI		
دفاع آنتی اکسیدانی Antioxidant defense	1	39.3	5.78	17	5.37	Type 2 peroxiredoxin	gi 473787383
دفاع آنتی اکسیدانی Antioxidant defense	2	38.8	4.81	20.35	5.3	Cu/Zn Superoxide Dismutase	gi 1572627
دفاع آنتی اکسیدانی Antioxidant defense	3	36.7	5.04	23.6	5.8	Glutathione S-transferase	gi 5923877
انتقال پروتون Proton transport	4	35.9	6.49	17.72	4.49	ATP Synthase delta chain, chloroplastic	gi 475627717
دفاع آنتی اکسیدانی Antioxidant defense	5	32.2	6.10	29.5	10.2	Harpin binding protein 1	gi 38679331
چرخه کالوین Calvin cycle	6	29.9	4.79	51.24	6.9	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	gi 474153435
دفاع آنتی اکسیدانی Antioxidant defense	7	21.3	6.51	45.26	8.3	Glutathione S-transferase DHAR2	gi 474023258



شکل ۴- سطوح نسبی پروتئین‌های مشترک دارای تغییر بیان معنی‌دار و فاکتور القای قابل ملاحظه در ارقام جو افضل و ماکویی در شرایط بدون تنش و روز نهم پس از اعمال تنش شوری
Fig. 4. Relative levels of common proteins with significant changes of expression and significant induction factor (IF) in Afzal and Macouei barley cultivars under control and 9 days after salinity stress induction (9 DAS)

متحمل افضل، به نظر می‌رسد که این رقم از سازوکار مولکولی مناسبی در شرایط تنش شوری برخوردار است و در بین مسیرهای مختلف متابولیکی، نقطه قوت این رقم در شرایط تنش، دفاع آنتی‌اکسیدانی است (جدول ۱ و شکل‌های ۲ و ۴).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان اظهار داشت رقمی که در شرایط تنش از نسبت پتاسیم به سدیم بالاتری برخوردار بوده و خصوصیات مهم فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آن حفظ شود، از نظر سایر صفات و ویژگی‌ها نیز برتر خواهد بود. با توجه به اینکه پتاسیم از طریق رقابت با سدیم برای جذب و انتقال در گیاه، باعث کاهش اثرگذاری نامطلوب تجمع یون سدیم در گیاه شده و از طریق تعدیل پتانسیل اسمزی و بهبود هدایت روزنه‌ای باعث حفظ فتوسنتز در شرایط تنش شوری می‌شود و بدین ترتیب اثر سوء تنش شوری بر وزن خشک، ارتفاع بوته و سایر ویژگی‌های گیاه کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج این برتری در رقم متحمل (افضل) مشاهده شد. بعلاوه رقم افضل در شرایط تنش شوری افزایش بیان پروتئین‌های مشترک را نشان داده و مشخص شد که پروتئین‌های شناسایی شده در فرایند دفاع آنتی‌اکسیدانی، انتقال پروتون و چرخه کالوین نقش داشتند. در مجموع مهم‌ترین سازوکار پروتئینی در رقم متحمل (افضل) القای بیشتر پروتئین‌های دخیل در هموستازی سلول بود.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از حوزه پژوهشی و فناوری دانشگاه پیام نور جهت حمایت مالی از این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

رقم ماکویی (شکل‌های ۲، ۳ و ۴) و اپسیلون است، در حالی که CF_0 دارای سه زیر واحد a، b و c است (von Ballmoos and Dimroth, 2007). CF_1 ، یک کمپلکس آنزیمی است که از پنج زیر واحد ساخته شده است. وظیفه فیزیولوژیکی اصلی ATP سنتاز کلروپلاستی تولید ATP از ADP در حضور شیب پروتون از طریق غشای تیلاکوئید است. این شیب پروتون در اثر واکنش‌های نوری فتوسنتز بوجود می‌آید (von Ballmoos and Dimroth 2007). نتایج تحقیقات نشان داده است که در طی تنش میزان ATP سنتاز و زیر واحدهای آن، خصوصاً در رقم حساس گندم، کاهش یافت (Guo et al., 2012). در چند پژوهش قبلی نیز کاهش میزان پروتئین‌های مرتبط با تولید ATP در شرایط تنش در رقم حساس و افزایش بیان آنها در رقم متحمل در شرایط خشکی و شوری گزارش شده است (Guo et al., 2012; Michaletti et al., 2018) که نتایج آزمایش حاضر با آنها مطابقت دارد.

گروه دیگر از پروتئین‌های مشترک مربوط به پروتئین‌های دخیل در فعال‌سازی آنزیم روبیسکو بودند. در همین راستا گزارش شده است که پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز مانند پروتئین متصل به روبیسکو و روبیسکو اکتیواز (Kausar et al., 2013) (شامل لکه پروتئینی مشترک ۶ با افزایش بیان در رقم افضل و کاهش بیان در رقم ماکویی) در رقم حساس جو در روز نهم پس از اعمال تنش شوری کاهش بیان نشان دادند، در حالی که میزان این پروتئین‌ها در رقم متحمل جو تغییری نداشته و یا افزایش نشان دادند که این نتایج با گزارشات کوثر و همکاران (Kausar et al., 2013) مطابقت دارد.

بر اساس نتایج بدست آمده، با توجه به نقش پروتئین‌های عملکردی و افزایش بیان بیشتر آنها در رقم

منابع مورد استفاده

References

- Arias, D. 2007. Calibration of LAI-2000 to estimate leaf area index and assessment of its relationship with stand productivity in six native and introduced tree species in Costa Rica. *Forest Ecol. Manag.* 247: 185-193.
- Baker, N. R. and E. Rosenquist. 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55: 1607-1627.
- Bates, L. S., R. D. Walderen and L. D. Taere. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207.
- Bhardway, R. and G. Singhal. 1981. Effect of water stress on photochemical activity of chloroplasts during greening etiolated barley seedlings. *Plant Cell Physiol.* 22 (2): 155-162.
- Damerval, C., D. De Vienne, M. Zivy and H. Thiellement. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling rotein. *Electrophoresis.* 7: 52-54.
- Emami, Y., E. Hosseini, N. Rafiei and H. Pirasteh anousheh. 2013. Reaction of the initial growth and concentrations of sodium and potassium ions in ten cultivars (*Hordeum vulgare* L.) under salinity stress conditions. *J. Crop Physiol.* 5 (19): 5-15 (in Persian with English abstract).
- FAO. 2017. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- Grieve, C. M. and S. R. Grattan. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil.* 70: 303-307.
- Guo, G., P. Ge, C. Ma, X. Li, D. Lv, S. Wang, W. Ma and Y. Yan. 2012. Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *J. Proteomics.* 75: 1867-1885.
- Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 20 (4-5): 660-663.
- Hortensteiner, S. and B. Krautler. 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophys. Acta.* 1807: 977-988.
- Hussain Wani, S., N. Brajendra Singh, A. Haribhushan and J. Iqbal Mir. 2013. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Cur. Genomics.* 14: 157-165.
- Jafarinia, M. and M. Shariati. 2012. Effects of salt stress on photosystem II of canola plant (*Brassica napus* L.) probing by chlorophyll a fluorescence measurements. *Iran. J. Sci. Tech.* A1: 71-76.
- Joseph, B. and D. Jini. 2010. Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian J. Plant Sci.* 9: 307-313.
- Kausar, R., M. Arshad, A. Shahzad and S. Komatsu. 2013. Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids.* 44: 345-359.
- Khan, M. A., M. U. Shirazi, M. A. Khan, S. M. Mujtaba, E. Islam, S. Mumtaz, A. Shereen, R. U. Ansari and M. U. Ashraf. 2009. Role of proline, K^+/Na^+ ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat. *Pak. J. Bot.* 41 (2): 633-638.
- Komatsu, S. and N. Tanaka. 2004. Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice

- genome. *Proteomics*. 4: 938-949.
- Koocheki, A. 1994.** Crop Production in Dry Region: Cereals, Legumes, Industrial and Forage Crops. Jihad Daneshghahi Mashhad Press. (In Persian).
- Lu, Z. and P. M. Neumann. 1999.** Low cell-wall extensibility can limit maximum leaf growth rates in rice. *Crop Sci.* 39: 126-130.
- Ma, B. L., M. J. Morison and H. D. Videng. 1995.** Leaf greenness and photosynthetic rates in soybean. *Crop Sci.* 35: 1411-1414.
- Michaletti, A., M. R. Naghavi, M. Toorchi, L. Zolla and S. Rinalducci. 2018.** Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci. Rep.* 8: 1-18.
- Momeni, N., M. Arvin, Gh. Khajoei nejad, B. Keramat and F. Daneshmand. 2013.** Effects of sodium chloride and salicylic acid on some photosynthetic parameters and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Biol.* 5 (15): 15-30 (in Persian with English abstract).
- Nayyar, H. 2003.** Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environ. Exp. Bot.* 50: 253-264.
- Pandey, M. and S. Penna. 2017.** Time course of physiological, biochemical and gene expression changes under short-term salt stress in *Brassica juncea* L. *Crop J.* 5 (3): 219-230.
- Perkins, D. N., D. J. C. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrel. 1999.** Probability based protein identification by searching sequences databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20: 3551-3567.
- Sairam, R. K., K. V. Rao and G. C. Srivastava. 2002.** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163: 1037-1046.
- Sharma, R., D. De Vleeschauwer, M. K. Sharma and P. C. Ronald. 2013.** Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. *Mol. Plant.* 6: 250-260.
- Tian, F., J. Gong, J. Zhang, M. Zhang, G. Wang, A. Li and W. Wang. 2013.** Enhanced stability of thylakoid membrane proteins and antioxidant competence contribute to drought stress resistance in the *tasg1* wheat stay-green mutant. *J. Exp. Bot.* 64(6): 1509-1520.
- von Ballmoos, C. and P. Dimroth. 2007.** Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochem.* 46: 11800-11809.
- Wagner, G. J. 1979.** Content and vacuole/ extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiol.* 64: 88-93.
- Wehner, G. G., C. C. Balko, M. M. Enders, K. K. Humbeck and F. F. Ordon. 2015.** Identification of genomic regions involved in tolerance to drought stress and drought stress induced leaf senescence in juvenile barley. *BMC Plant Biol.* 15 (1): 125.
- Zhang, L., S. Xiao, W. Li, W. Feng, J. Li, Z. Wu, X. Gao, F. Liu and M. Shao. 2011.** Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 62 (12): 4229-4238.

Effect of salinity stress on physiological characteristics and protein profile of tolerant and sensitive barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars at vegetative growth stage

Khalily, M.,¹ and M. R. Naghavi²

ABSTRACT

Khalily, M., and M. R. Naghavi. 2020. Effect of salinity stress on physiological characteristics and protein profile of tolerant and sensitive barley (*Hordeum vulgare*) cultivars at vegetative growth stage. **Iranian Journal of Crop Sciences. 22(1): 32-49.** (In Persian).

To study the variation of plant traits related to stress tolerance in tolerant and sensitive barley cultivars under salt stress conditions, an experiment was carried out as factorial arrangements in completely randomized design in Payame Noor University of Mahabad, Iran in 2018. Application of salinity stress of 250 mM of sodium chloride started from tillering stage, and leaf samples were taken at 0, 3, 6 and 9 days following application of salinity treatment. The results showed that salinity stress had adverse effect on morphological and physiological traits such as those traits involved in cell-water relation and photosynthetic traits of the plant. Salinity stress increased sodium ion concentration, but decreased potassium ion concentration, imbalanced ionic concentrations and decreased $K^+:Na^+$ ratio in the cell. In addition, under salinity stress, electrolyte leakage, proline and glycine betaine concentrations were higher than non-stressed conditions. The results also showed that the highest significant decrease in traits was observed in the 9 days samples after the beginning of salinity stress. Overall, Afzal cultivar had better response to salinity stress. Analysis of proteome showed that seven protein spots were in common between the two barley cultivars. Mass spectrometry showed that most of the identified proteins were involved in antioxidant defense, and therefore, the most important common proteins in the two cultivars were involved in cellular homeostasis. In general, the lower expression of these common proteins in cv. Makouei (sensitive) compared to cv. Afzal (tolerant) resulted in its lower performance under salinity stress.

Key words: Barley, Electrolyte leakage, Organic solutions accumulation, Salinity stress and Water relations

Received: May, 2019 Accepted: December, 2019

1. Associated Prof., Agricultural Department, Payam Nour University, Iran (Corresponding author)
(Email: makhalily@yahoo.com)

2. Assistant Prof., Agricultural Department, Payam Nour University, Iran