زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و سوم، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۵-۲۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۵/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۰۷/۲۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵

اثر تنش شوری بر الگوی پروتئینی و برخی از شاخص‌های فیزیولوژی گیاه *Lycopersicon peruvianum* L. در شیشه

فیروزه ربیعی و علی اکبر احسانپور *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

در بررسی حاضر، گیاه گوجه وحشی (*Lycopersicon peruvianum*)، لاین ۸۱۵ در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک NaCl در شرایط کشت در شیشه کشت داده شدند. پس از ۴ هفته تأثیر نمک NaCl بر مقدار وزن تر و خشک، کلروفیل های a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها، پرولین، سدیم و پتاسیم، و پروتئین‌های محلول کل بخش هوایی گیاه و الگوی الکتروفورزی پروتئین با روش SDS-PAGE بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که با افزایش شوری، مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه در مقایسه با گیاه شاهد کاهش یافت. در بررسی اثر تنش شوری بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان تحت تنش شوری نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد. با افزایش غلظت NaCl در محیط، افزایش معنی‌داری در مقدار پرولین و سدیم نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد در حالی که مقدار پتاسیم و پروتئین‌های محلول کل کاهش یافت. همچنین، میزان نسبت پتاسیم به سدیم با افزایش غلظت نمک در گیاه کاهش یافت. نتایج SDS-PAGE نشان داد که الگوی پروتئین های گیاه شاهد با گیاهان تحت تنش تفاوت‌های آشکاری در برخی از نوارهای پروتئینی داشته، که بیانگر اختلاف اثر تیمار شوری بر پروتئوم گیاه بود. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تنش شوری به طور مستقیم بر رشد این گیاه اثر گذاشته است و به طور غیر مستقیم نیز بر متابولیسم آن تأثیر می‌گذارد، همچنین سبب تغییرات مهمی در بیان ژن‌های گیاه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: الگوی پروتئینی، تنش شوری، گوجه وحشی (*Lycopersicon peruvianum*)، کشت در شیشه

مقدمه

تنش شوری از مهم‌ترین تنش های غیرزیستی در مناطق خشک و نیمه خشک است. تقریبا ۷ درصد از خشکی‌های جهان و ۲۰ درصد از مناطق زیر کشت جهان و حدود نیمی از زمین‌های آبیاری شده تحت تأثیر شوری قرار دارند (Sudhir and Murthy, 2004). کلرید سدیم علت اصلی شوری خاک و ایجاد خسارت در بسیاری از گیاهان است. این نمک در غلظت‌های کم

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۲۵۰

باعث تحریک رشد گیاهان می‌شود اما در غلظت های زیاد سبب سوختگی برگ، کندی رشد، کمبود مواد غذایی، پژمردگی و مرگ گیاه می گردد (Chen *et al*., 2011). نمک موجود در خاک به دو دلیل عمده مانع رشد گیاهان می‌شود: الف) حضور نمک در محلول خاک است که سبب کاهش توانایی گیاه برای جذب آب و در نتیجه موجب کندی رشد گیاه به علت کاهش آب در دسترس می‌شود و ب) مقادیر اضافی نمک با ورود به جریان تعرق، به سلول‌های برگ در حال تعرق رسیده، موجب آسیب برگ‌ها و کاهش رشد می گردد (Munns *et al*., 2000). فتوسنتز و رشد سلول از نخستین فرآیندهایی است که تحت تنش شوری قرار می گیرد. زمانی که گیاه در معرض تنش شوری قرار می گیرد رشد کلی و محصول‌دهی گیاه کاهش می‌یابد که این امر در نتیجه اختلال در عملکرد اجزای حیاتی فتوسنتز نظیر: فتوسیستم II و آنزیم روبیسکو انجام می‌شود (Manna *et al*., 2013). در شرایط تنش اسمزی، گیاهان اسمولیت‌های آلی از قبیل پرولین، بتائین، پلی الها، قندهای الکلی و قندهای محلول را افزایش می‌دهند تا بتوانند تنش اسمزی را تحمل نمایند. از آنجا که این مواد با سوخت و ساز طبیعی سلول در گیاه تداخل ندارند، تحت عنوان متابولیت‌های سازگار نامیده می‌شوند (Chinnusamy *et al*., 2006). تجمع پرولین طی تنش حاصل تغییر در سرعت بیوسنتز و تجزیه این آمینو اسید است در این حالت، میزان فعالیت آنزیم‌های مربوط و غلظت مؤثر پیش‌سازها و فرآورده‌های آن از اهمیت برخوردار است (Deuschle *et al*., 2004).

طی تنش شوری، در سلول‌های گیاهی، جذب پتاسیم کاهش و انتشار سدیم افزایش می‌یابد (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001). یون‌های سدیم که وارد سیتوپلاسم می‌شوند اثر مهارکنندگی قوی بر فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها دارد. یک سازوکار برای کاهش تجمع سدیم سیتوزولی ذخیره آن در واکوئل است. سدیم در واکوئل نه تنها با آنزیم‌های سیتوزولی تماس ندارد بلکه موجب حفظ تعادل اسمزی داخل سلول با خارج آن نیز می گردد (Allen *et al*., 2001). در مجموع، پایین بودن غلظت سدیم سیتوزولی و عدم تعادل نسبت یون پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تحمل به شوری شناخته می‌شود. رقم‌های متحمل به شوری گونه‌های زراعی، نسبت پتاسیم به سدیم بالایی را نشان می‌دهند (Summart *et al*., 2010).

در سال‌های گذشته، به منظور شناسایی و درک نقش پروتئین‌ها در مقاومت به تنش شوری، توجه زیادی به تغییرات پروتئین ها طی تنش شوری شده است. تنش‌های غیرزیستی معمولاً موجب عملکرد ناقص پروتئین‌ها می‌شود (Joseph and Jini, 2010). در پاسخ به تنش شوری ممکن است پروتئین های جدید سنتز شوند یا ممکن است میزان پروتئین‌هایی که از قبل در غلظت‌های کم وجود داشته‌اند همزمان با تنش افزایش یابد (Parrek *et al*., 1997). بررسی پروتئین‌هایی که تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند می‌توانند به درک سازوکار فیزیولوژیک حساسیت یا تحمل به شوری کمک نماید. در گزارش های منتشر شده الکتروفورز دو بعدی مشخص شده است که تنش شوری سبب اختلافات قابل مشاهده‌ای در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد

می‌شود که این امر می‌تواند به علت تأثیرات بازدارندگی تنش شوری بر فرآیند رونویسی ژن‌ها باشد (Chen *et al.*, 2009). تاکنون ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در فرآیند تنظیم شوری متعددی با مطالعه ریزآرایه و پروتئومیک در ریشه‌های گیاهان گوناگون مانند: گوجه‌فرنگی، آرابیدوپسیس، توتون، تنباکو و برنج شناسایی شده است. پروتئین‌های پاسخ به شوری شناخته شده در اعمال مختلف سلولی نظیر: تنظیم کربوهیدرات‌ها، متابولیسم نیتروژن و انرژی، پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، سم‌زدایی و مسیر پیام‌رسانی، پردازش RNA و پروتئین و اسکلت سلولی درگیر هستند (Nam *et al.*, 2012).

گونه گیاهی *Lycopersicon peruvianum* L. از راسته *Polemoniales*، تیره *Solanaceae* و جنس *Lycopersicon* است. این گونه، منبع ژن‌های مهمی است که نسبت به بیماری‌هایی که در گیاه گوجه‌زراعی ایجاد می‌شود و عامل آن باکتری، قارچ، ویروس و نماتود است مقاومت نشان می‌دهد (Bhatia *et al.*, 2004) و علاوه بر ویژگی‌های مقاومت، این گیاه منبعی از ژن ها برای بهبود مقدار آسکوربیک اسید و افزایش مقاومت به شوری است (Jones, 1986). از آن جا که گیاه *L. peruvianum* از گونه‌های وحشی گوجه است و نسبت به برخی از آفات و بیماری‌ها و همچنین تنش شوری مقاومت نسبتا خوبی دارد و از سوی دیگر، به عنوان منبعی با ارزش برای اصلاح ژنتیکی سایر رقم‌های گوجه محسوب می‌شود بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و الگوی پروتئینی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تأثیر تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه *L. peruvianum* لاین ۸۱۵ از دانشگاه مورداک استرالیا تهیه شد. بذر به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت بیست دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲۰ درصد حجمی استریل شد. پس از گذشت چهار هفته از کشت بذر در محیط کشت موراشیک-اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962)، گیاهچه‌های حاصل به محیط کشت‌های جدید با غلظت‌های: ۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl منتقل شد و در اتاق کشت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۵۰ میکرومول بر فوتون و رطوبت ۹۵ تا ۹۸ درصد نگهداری شدند. بخش هوایی و ریشه گیاهچه‌های رشد یافته در محیط‌های با غلظت مختلف نمک پس از ۴ هفته از محیط کشت جدا و وزن تر و خشک آنها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

میزان کلروفیل و کاروتنوئید با روش Arnon (۱۹۴۹) اندازه‌گیری شد. میزان سدیم و پتاسیم اندام هوایی و ریشه با استفاده از روش خاکستر تر توسط دستگاه نورسنج شعله‌ای با کمک منحنی استاندارد سدیم و پتاسیم اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری پرولین از روش تغییر یافته Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. این روش بر پایه تشکیل یک ترکیب رنگی از واکنش آمینو اسید پرولین آزاد و معرفی به نام نین هیدرین در شرایط اسیدی و دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و سپس تخلیص این ترکیب

رنگی به کمک یک حلال آلی غیرقطبی مانند تولوئن استوار است.

اندازه‌گیری پروتئین کل در این طرح بر اساس روش تغییر یافته Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان استاندارد انجام گرفت.

استخراج پروتئین ها به منظور انجام SDS-PAGE از بخش هوایی گیاه *L. peruvianum* که به مدت ۴ هفته در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های: ۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl رشد کرده بودند، بر اساس روش ثبت شده به شماره ثبت ۷۳۲۱۷ با اندکی تغییر انجام شد (Shojaie Falavarjani *et al*., 2012).

۰/۵ گرم از بخش هوایی گیاه *L. peruvianum* وزن شد و به هاون چینی منتقل و توسط بافر استخراج پروتئین (نسبت ۱:۲) همگن شد (۰/۵ گرم بافت به ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج).

بافر استخراج یک محلول ۵۰ میلی‌مولار بافر تریس با pH=۷/۵ حاوی ۱ میلی‌مولار DTT، ۲ میلی‌مولار EDTA و ۲ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول بود. سپس عصاره مزبور به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل شده منتقل گردید. پس از این مرحله، میکروتیوب‌های حاوی عصاره به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (مدل ۵۴۱۷، شرکت اپندورف، آلمان) یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس محلول رویی به اپندروف‌های جدید منتقل و روی یخ نگهداری شد. از این عصاره جهت انجام الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد.

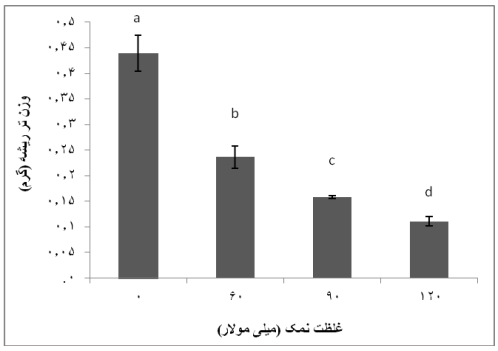
آنالیز SDS-PAGE با استفاده از ژل جدا کننده (separating) با غلظت ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده (stacking) با غلظت ۵ درصد انجام گرفت. پس از الکتروفورز، نوارهای پروتئینی با استفاده از کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و تغییرات الگوی پروتئینی بررسی گردید (Hames, 1990).

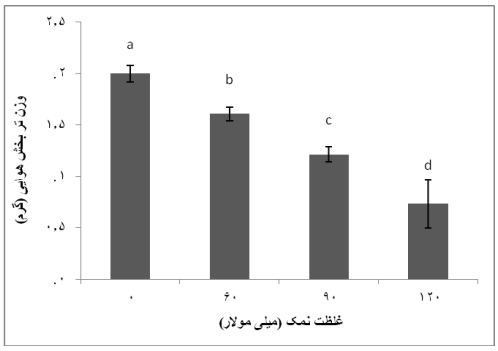
پژوهش حاضر بر اساس یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار برای هر آنالیز انجام گرفت و برای تحلیل داده‌ها از آنالیز ANOVA و آزمون دانکن با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ استفاده شد.

نتایج

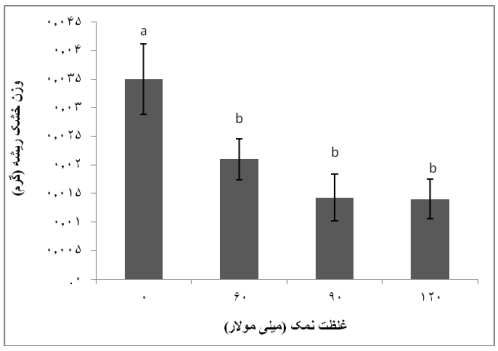
چهار هفته پس از اعمال تنش شوری در غلظت‌های مختلف NaCl، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، وزن تر بخش هوایی و ریشه به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش یافت. همچنین، در بین غلظت های مختلف نمک نیز تفاوت معنی داری مشاهده شد (شکل ۱).

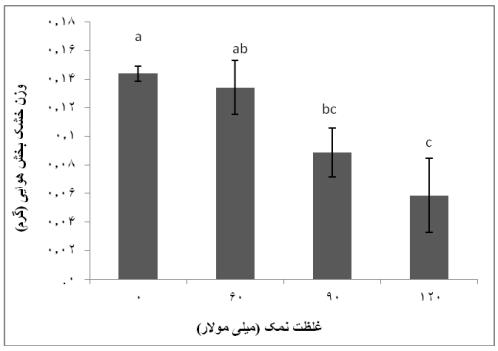
نتایج حاصل از آنالیز وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه *L. peruvianum* در شکل ۲ ارایه شده است. وزن خشک بخش هوایی در گیاه شاهد و غلظت ۶۰ میلی‌مولار نمک اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در صورتی که در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده گردید. در حالی که وزن خشک ریشه در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. اما در بین غلظت‌های مختلف نمک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.





شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر وزن تر بخش هوایی و ریشه گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.





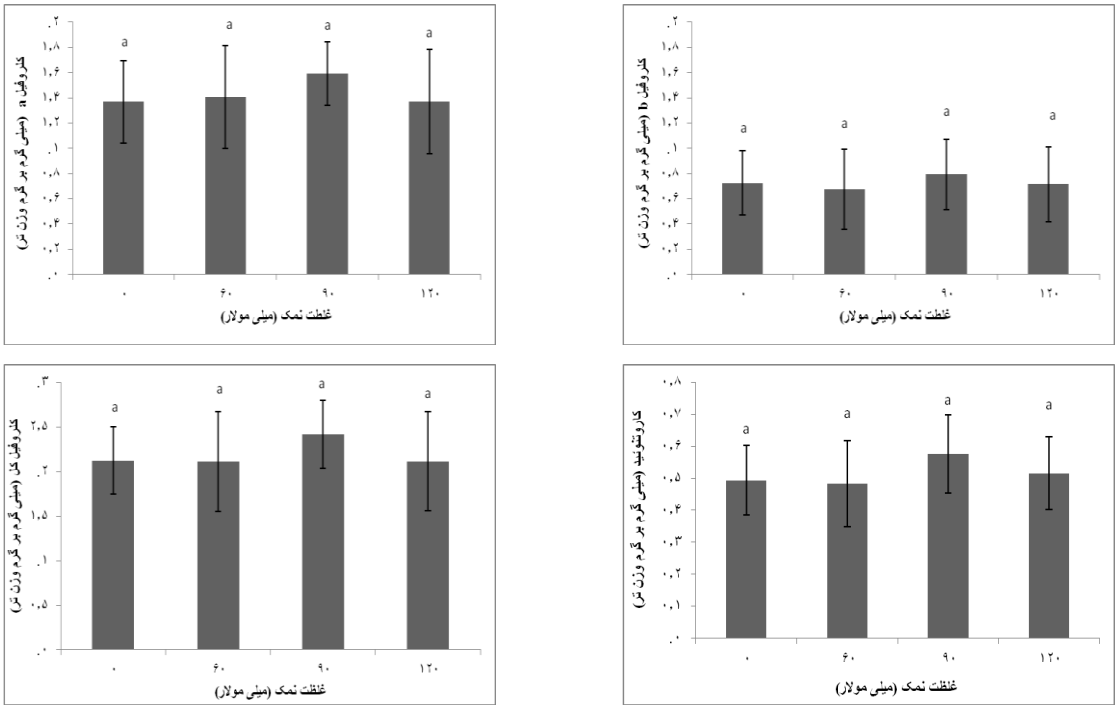
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.

نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر میزان کلروفیل‌های a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در برگ گیاه تأثیری نداشت و اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نمک و گیاه شاهد مشاهده نشد (شکل ۳).

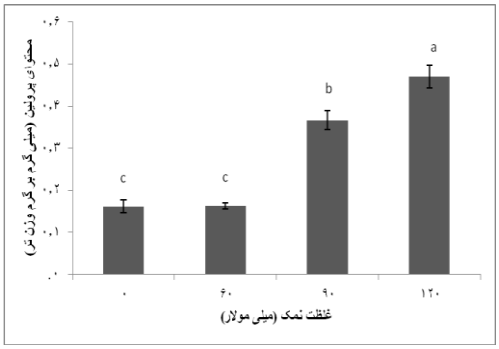
پرولین به عنوان اسمولیت سازگار در تنظیم اسمزی سلول‌های تحت تنش شوری نقش به سزایی دارد، بنابراین مقدار آن در سلول‌های بخش هوایی که تحت تنش شوری هستند، بررسی شد. با توجه به شکل ۴ میزان پرولین با افزایش غلظت نمک به طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. میزان پرولین در غلظت ۰ و ۶۰ میلی‌مولار نمک تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نداشت اما با افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان پرولین نیز افزایش معنی‌داری یافت به طوری که در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد.

زمانی که سلول‌های گیاهی تحت تنش NaCl قرار می‌گیرند ممکن است بر حسب نوع گونه گیاه و سازوکارهای مختلف تحمل شوری، مقداری از یون‌های سدیم را درون خود ذخیره کنند که مقدار آن در غلظت‌های مختلف نمک متفاوت است. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار یون سدیم و پتاسیم در بافت خشک نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت، میزان سدیم در برگ نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت اما میزان پتاسیم برخلاف سدیم کاهش پیدا کرد. نسبت پتاسیم به سدیم با افزایش غلظت نمک در گیاه کاهش

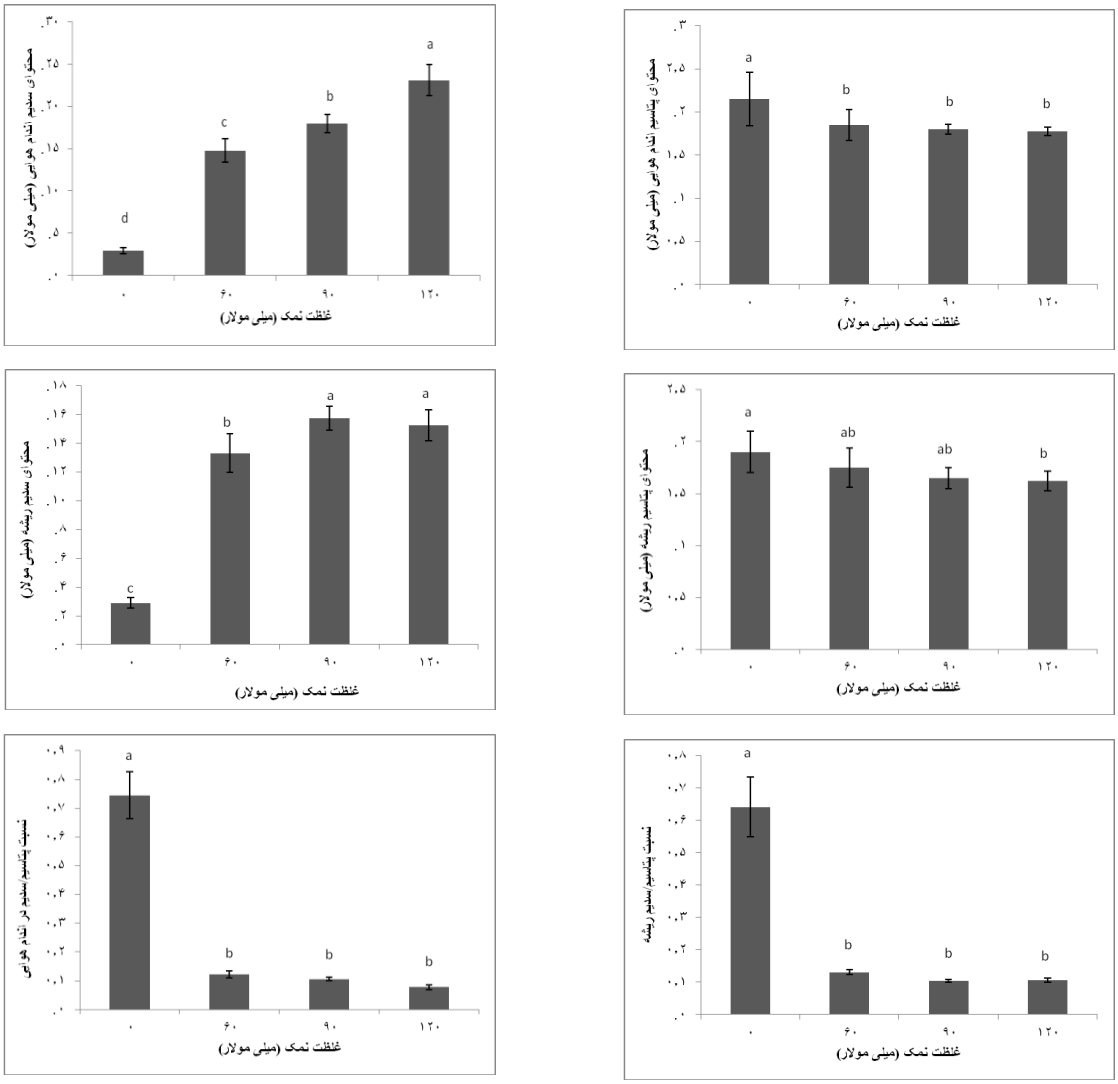
پیدا کرد در حالی که در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که بیانگر تحمل نسبی و خوب نمک توسط گیاه در این محدوده است. میزان یون سدیم در ریشه نیز از وضعیت اندام هوایی پیروی نمود و با افزایش شوری میزان آن در ریشه نیز به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود. در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری در میزان یون سدیم نسبت به یکدیگر مشاهده نشد. تفاوت معنی‌داری بین گیاه شاهد و غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک از نظر یون پتاسیم مشاهده شد. نسبت پتاسیم به سدیم با افزایش غلظت شوری کاهش پیدا کرد و تفاوت معنی‌داری بین گیاه شاهد و غلظت‌های مختلف نمک دیده شد اما در بین غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک تفاوت چشمگیری مشاهده نگردید.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر میزان کلروفیل‌های a و b ،کلروفیل کل و کاروتنوئید گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر مقدار پرولین اندام هوایی گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.

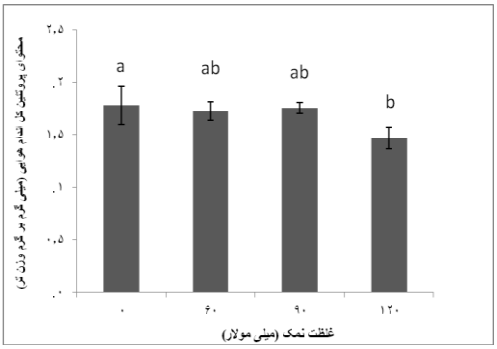


شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl بر مقدار سدیم، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در اندام هوایی و ریشه گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.

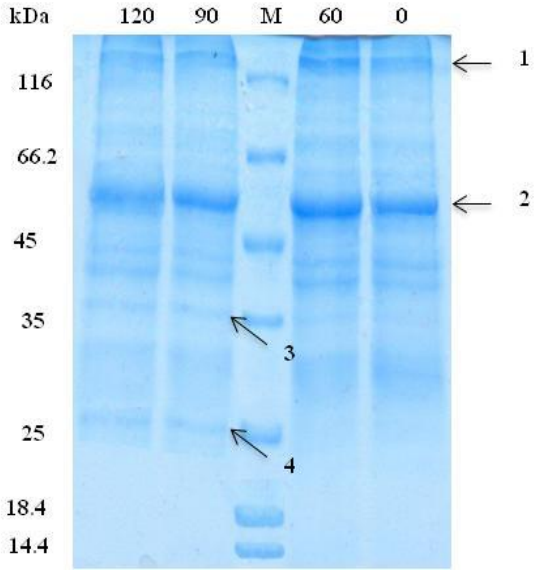
مقدار و نوع پروتئین‌های هر سلول نشان دهنده عملکرد ژن‌ها و میزان بیان آنها است. تشخیص نوع پروتئین‌هایی که در یک سلول یا سلول‌های یک بافت در اثر هر گونه تغییر حاصل می‌شود فرآیندی بسیار مشکل است، اما تعیین مقدار پروتئین های کل یک سلول یا بافت آسان‌تر است. بنابراین در تحقیق حاضر ارزیابی مقدار پروتئین کل تا حدی معیار مناسبی برای ارزیابی نحوه عملکرد ژن‌های سلول برگ گیاه *L. peruvianum* تحت تیمارهای مختلف نمک است. نتایج حاصل از تحلیل داده‌های پروتئینی نشان داد که پروتئین‌های محلول در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرده است.

همان طور که نتایج در شکل ۷ نشان می‌دهد نوار ۱ (تقریبا بیش از ۱۱۶ کیلو دالتون) و نوار ۲ (حدود ۵۰ کیلو

دالتون) در گیاه شاهد و گیاه رشد یافته در غلظت ۶۰ میلی‌مولار NaCl دارای شدت قوی‌تری نسبت به گیاهان رشد یافته در غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl است و نشان دهنده این مطلب است که افزایش غلظت NaCl سبب کاهش بیان یا ترجمه و بیوسنتز یکسری از پروتئین‌ها یا افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده پروتئین‌ها شده است. همچنین، تنش شوری موجب افزایش بیان پروتئین‌های ۳۵ و ۲۵ کیلو دالتونی (نوارهای ۳ و ۴) می‌شود که احتمالا این پروتئین‌ها در ارتباط با سازگاری گیاهان نسبت به تنش شوری هستند.



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر مقدار پروتئین‌های محلول اندام هوایی گیاه *Lycopersicon peruvianum*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۷- الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های برگ گیاه *Lycopersicon peruvianum* در غلظت‌های مختلف NaCl.
M: پروتئین نشانگر، ۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰: غلظت نمک (mM)

بحث

تنش شوری آثار مخربی بر متابولیسم گیاه دارد و به تغییراتی در رشد، نمو و بیان ژن‌های گیاهی منجر می‌شود (Amini and Ehsanpour, 2006). در مطالعه حاضر مشاهده شد که با افزایش غلظت نمک، رشد گیاه هم در بخش هوایی و هم در ریشه‌ها کاهش یافت

و وزن تر و خشک گیاهچه‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد. تنش شوری از طریق محدودیت در جذب عناصر غذایی، کمبود آب قابل استفاده گیاه و سمیت عناصر غذایی، باعث کاهش قدرت رشد سلولی شده و کاهش سطح برگ و فتوسنتز را به همراه داشته است. این موارد باعث کاهش کربوهیدرات تولیدی و در نتیجه کاهش رشد اجزای مختلف گیاه شده است که در نهایت سبب کاهش وزن گیاه گردید (Ali *et al*., 2004؛ Enferad *et al*., 2004). به عبارتی، به دلیل وجود نمک در محیط، سلول‌ها مقدار زیادی آب را از دست خواهند داد و با توجه به این که برای رشد و تقسیم سلولی باید فشار تورژسانس در حد بالایی باشد و سلول حجم مناسبی برای تقسیم داشته باشد، بنابراین با کاهش آب سلول و ایجاد تنش اسمزی فشار تورژسانس و حجم سلول کاهش می‌یابد و احتمال دارد که موجب کاهش تقسیم سلولی و رشد گردد (Xiong and Zhu, 2002).

کلروفیل در زندگی گیاهان عالی نقش بسیار مهمی دارد (Eckhardt *et al*., 2004). میزان کلروفیل، یک ویژگی اصلی و مهم برای درک چگونگی پاسخ گیاه به محیطی که در آن به سر می‌برد، محسوب می‌شود. برای فهم این که آیا متابولیسم فتوسنتزی گیاهان تحت تأثیر تنش شوری آسیب می‌بینند یا خیر، میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه *L. peruvianum* اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، غلظت های مختلف نمک NaCl هیچ اثری بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی این گیاه نداشت و اختلاف معنی داری بین نمونه‌های تحت تنش شوری و نمونه شاهد مشاهده نشد. این نتایج بیانگر آن است که این گیاه با به‌کارگیری راهکارهای ویژه از جمله تولید اسمولیت‌های سازگار توانسته بر تجزیه کلروفیل و کاهش فعالیت فتوسنتزی غلبه کند. اما برخلاف نتایج حاصل از این پژوهش کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش شوری در گیاهانی از جمله آفتابگردان، گوجه‌فرنگی، توت‌فرنگی و گونه‌های نخود مشاهده شده است (Santos, 2004). به طور کلی، می‌توان عنوان نمود که احتمالا میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی با توجه به نوع و ژنوتیپ گیاه تحت تنش شوری متحمل تغییراتی می‌شود.

برای بررسی چگونگی پاسخ گیاه *L. peruvianum* به تنش شوری، میزان پرولین به عنوان یکی از شاخص‌ترین مواد محلول سازگار در تنش‌های محیطی در گیاهان ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان پرولین با افزایش غلظت نمک افزایش معنی‌داری یافت. گزارش مشابهی در مورد افزایش میزان پرولین تحت تنش شوری توسط Huang و همکاران (۲۰۱۳) روی گیاه *Jerusalem artichoke* انجام شده است که در آن، میزان پرولین در برگ، ساقه و ریشه گیاه تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش معنی داری یافته و این افزایش در برگ‌ها بیشتر مشاهده شده است (Huang *et al*., 2013).

طی تنش شوری، گیاهان سازوکارهای پیچیده‌ای برای سازگار شدن با تنش اسمزی و سمیت یون‌ها به کار می‌برند که بسته به نوع گیاه و میزان حساسیت آنها به شوری متفاوت است. برای مثال، در گیاهان مقاوم به شوری یون‌های سدیم و کلسیم در واکوئل و در ارقام حساس در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا می‌کنند (Gholam *et al*., 2002).

Sairam و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی‌های خود

روی گندم دریافتند که مقدار سدیم برگ با افزایش شوری افزایش یافت، اما این افزایش در رقم‌های متحمل غیرمعنی‌دار و در ارقام حساس معنی‌دار بود (Sairam *et al*., 2002). یکی از مشخصه‌های تحمل به شوری در گیاهان توانایی در حفظ نسبت ثابتی از Na^+ و K^+ درون سلولی است. در مقادیر بالای شوری مقدار یون‌های پتاسیم کاهش یافته و با سدیم جایگزین شده که این عمل علاوه بر به هم زدن تعادل یونی باعث اختلال در متابولیسم سلولی نیز می‌شود (Blumwald, 2000).

همان طور که نتایج حاصل از اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم نشان داد با افزایش غلظت نمک مقدار سدیم سلول ها افزایش و مقدار پتاسیم آنها کاهش یافت. این نتایج می‌تواند نشانگر آن باشد که با افزایش نمک یون‌های سدیم وارد سلول ها شده، احتمالا باعث خروج مقادیری از یون‌های پتاسیم شده‌اند یا از ورود پتاسیم جلوگیری نموده‌اند. در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک با آن که مقدار یون‌های سدیم با افزایش نمک افزایش یافته است، اما مقدار پتاسیم تقریبا یکسان بوده و کاهش معنی داری نیافته است. این امر احتمالا به دلیل آن است که اگر چه سدیم افزایش یافته است اما ممکن است مقدار زیادی از این سدیم درون واکوئل‌ها ذخیره شده در نتیجه از ورود پتاسیم جلوگیری نکرده و موجب خروج آنها نیز نشده است. بنابراین مقدار پتاسیم تقریبا ثابت است. اما بین گیاه شاهد و غلظت‌های مختلف نمک کاهش معنی‌داری در مقدار پتاسیم دیده شد.

یک نسبت بالای K^+/Na^+ در سیتوسل ضروری است تا واکنش‌های سلولی در گیاهان به صورت طبیعی صورت گیرد. در بررسی حاضر، نسبت پتاسیم به سدیم با افزایش غلظت نمک در گیاه کاهش یافت که این کاهش با توجه به این که *L. peruvianum* جزو شیرین‌رست‌ها است به نظر طبیعی می‌رسد. میزان این نسبت در غلظت‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک اختلاف معنی داری نداشته، این عدم اختلاف بیانگر این است که این گیاه در این محدوده از غلظت نمک می‌تواند نسبت پتاسیم به سدیم را ثابت نگه دارد. بنابراین می‌توان استنباط کرد که این گیاه این محدوده نمک را تحمل می‌کند و به فعالیت‌های حیاتی ادامه می‌دهد.

تنش شوری سبب تغییرات کمی و کیفی در میزان پروتئین‌های محلول سلول می‌شود. پروتئین‌هایی که در گیاهان طی تنش شوری افزایش می‌یابند ممکن است یک شکل ذخیره‌ای از نیتروژن باشند که بعدا مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرند یا ممکن است در تطابق اسمزی نقش داشته باشند. همچنین ممکن است موجب مصرف مجدد آنها برای سنتز پروتئین های شبه اسموتین یا پروتئین‌های ساختاری گردند، یا سبب تغییر ساختار دیواره سلولی شوند. این پروتئین ها ممکن است در پاسخ به تنش شوری سنتز شوند یا ممکن است به صورت ساختاری در غلظت های اندک وجود داشته باشند (Parvaiz and Satyawati, 2008). Manna و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی بر گیاه گوجه‌فرنگی دریافتند که با افزایش شوری سطح پروتئین های محلول گیاه کاهش یافت (Manna *et al*., 2013). مشابه این یافته‌ها در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است. در برخی گزارش‌ها درگیاهان مقاوم به شوری مقدار پروتئین کل در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی داری

نشـــان داده اســـت. Demiral و Türkan (۲۰۰۶) در گزارش خود عنوان نمودند که محتوای پروتئین محلول کل در ژنوتیپ تحمل کننده شوری افزایش یافت در حالی که در نوع حساس به شوری این میزان کاهش یافت. با توجه به گزارش‌های یاد شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که سنتز پروتئین با درجه تحمل ژنوتیپ گیاه مرتبط است (Demiral and Türkan, 2006).

در تحقیق حاضر، با افزایش غلظت نمک مقدار پروتئین کل در گیاه *L. peruvianum* کاهش یافت به طوری که در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داده شد که بیانگر این مطلب است که در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک احتمالا سرعت تجزیه پروتئین‌ها بیش از سرعت سنتز آنها است یا این که میزان بیان پروتئین‌ها متوقف یا کاهش پیدا کرده است.

در سال‌های گذشته، به تغییرات پروتئینی القا شده در اثر تنش شوری توجه زیادی شده است تا نقش پروتئین ها در مقاومت نسبت به تنش شوری درک و شناسایی گردد. پروتئین های تنش شوری بر اساس الگوی SDS-PAGE در گونه‌های متعددی گزارش شده است. برای مثال، در گیاه *Bruguiera parvifiora* شدت چندین نوار پروتئینی با وزن‌های مولکولی ۱۷، ۲۳، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ کیلو دالتون در اثر تنش NaCl کاهش یافت. میزان کاهش این پروتئین ها به شدت وابسته به غلظت NaCl محیط بود، به طوری که پروتئین ۲۳ کیلو دالتون در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار ناپدید شد (Parida *et al*., 2004). Amini و همکاران (۲۰۰۷) در گزارش خود در مورد گیاه گوجه‌فرنگی عنوان نمودند که در الگوی پروتئینی این گیاه شدت نوارهای پروتئینی با وزن مولکولی ۳۰، ۶۲ و ۷۵ کیلو دالتون در ریشه و پروتئین های ۳۸ و ۴۶ کیلو دالتون در برگ‌ها در اثر تنش شوری افزایش یافت در حالی که پروتئین هایی با وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون در برگ‌های تحت تنش شوری کاهش معنی‌داری نشان داد (Amini *et al*., 2007).

در مطالعه حاضر نیز در برگ گیاه *L. peruvianum* تغییراتی در الگوی پروتئین ها تحت تنش شوری رخ داد. برای مثال، کاهش بیان پروتئین‌هایی در محدوده وزن مولکولی ۵۰ و ۱۱۶ کیلو دالتون در غلظت های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد که نشان دهنده این مطلب است که افزایش غلظت NaCl سبب کاهش بیان یا ترجمه و بیوسنتز یک سری از پروتئین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده پروتئین‌ها شد. همچنین تنش شوری موجب افزایش بیان پروتئین های ۲۵ و ۳۵ کیلو دالتون در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک گردید که احتمالا این پروتئین ها در ارتباط با سازگاری گیاه نسبت به تنش شوری نقش دارند. به طور کلی، داده‌های به دست آمده در آزمایش حاضر مشخص کرد که شوری سبب تغییرات الگوی پروتئینی در برگ گیاه *L. peruvianum* می‌گردد و بنابراین پروتئین‌هایی که مقادیر آنها پس از تنش شوری افزایش یافت، می‌تواند پروتئین های القا شده در اثر تنش شوری باشند. همچنین وزن مولکولی برخی پروتئین های پاسخ دهنده به شوری نیز گزارش گردید. اما برای بررسی وظایف ساختاری و نقش این پلی‌پپتیدها در پاسخ به تنش شوری، مطالعه و بررسی بیشتری لازم است و همچنین ذکر این نکته ضروری است که این نوارها صرفا تغییرات الگوی پروتئینی را نشان می‌دهند و شناسایی

تعداد و نوع پروتئین های موجود در این باندها نیاز به مطالعات دقیق‌تر و بیشتری دارد.

جمع‌بندی

به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که تنش شوری به طور مستقیم بر رشد این گیاه اثر گذاشته است و به طور غیر مستقیم نیز بر متابولیسم آن تأثیر می‌گذارد و همچنین سبب تغییرات مهمی در بیان ژن‌های گیاه می‌گردد (Sariri *et al.*, 2011). این تغییرات در نهایت، به تجمع یا کاهش متابولیت‌های مهمی منجر می‌شود که در اثر عدم توازن در پروتئین‌های سلولی به وجود می‌آیند. در واقع این تغییرات پروتئینی که شامل تغییر در پروتئین‌های آنزیمی درگیر در مسیرهای علامتی بیوسنتز برخی مواد مانند پرولین یا تغییر در میزان فعالیت ناقل های پروتئینی است (Amini and Ehsanpour, 2010) همگی در جهت برقراری مجدد هم‌ایستایی گیاه و مقاومت در برابر تنش شوری است.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت از این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M. Y. and Tahir, G. R. (2004) Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield component of rice genotypes grown under saline environment. International Journal of Environmental Science *and* Technology 1(3): 221-225.

Allen, G. J., Dang, L. M., Alper, S. L., Gaxiola, R. A., Li, J. and Undurraga, S. (2007) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1H1 pump. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 11444-11449.

Amini, F. and Ehsanpour, A. (2006) Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to MS, water agar and salt stress in *in vitro* culture. Pakistanian Journal of Biological Sciences 9: 170-175.

Amini, F. and Ehsanpour, A. A. (2010) Study of protein changes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under salt stress using two dimensional electrophoresis. Iranian Journal of Plant Biology 1(1): 13-24.

Amini, F., Ehsanpour, A. A., Hoang, Q. T. and Shin, J. Sh. (2007) Protein pattern changes in tomato under *in vitro* salt stress. Russian Journal of Plant Physiology 54: 464-471.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-10.

Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T. and Midmore, D. (2004) Tissue culture studies of tomato *(Lycopersicon esculentum)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 1-21.

Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. Current Opinion in Cell Biology 12: 431-434.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistery 72: 248-254.

Chen, H., Lao, Y. and Jiang, J. (2011) Effects of salinities on the gene expression of a (NAD^+)- dependent

glycerol- 3- phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. Science of the Total Environment 409: 1291-1297.

Chen, S., Gollop, N. and Heuer, B. (2009) Proteomic analysis of salt-stressed tomato(*Solanum lycopersicon*) seedling: effect of genotype and exogenous application of glycinbetaine. Journal of Experimental Botany 60(7): 2005-2019.

Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. (2006) Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. Genetic Engineering 27: 141-177.

Demiral, T. and Türkan, I. (2006) Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. Environmental and Experimental Botany 56: 72-79.

Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Biehe, A., Leister, D., Graaff, E., Kunze, R. and Frommer, W. B. (2004) The role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. The Plant Cell 16(12): 3413-3425.

Eckhardt, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. Plant Molecular Biology 56: 1-14.

Enferad, A., Poustini, K., Majnoon Hosseini, N. and Khajeh-Ahmad-Attari, A. A. (2004) Physiological responses of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties to salinity. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 7(4): 103-113.

Gholam, C., Foursy, A. and Fares, K. (2002) Effect of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugarbeet cultivars. Environmental and Experimental Botany 47: 39-50.

Hames, B. D. (1990) One-dimentional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins. 2nd edition, Oxford University Press, New York.

Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., Shao, H. and Long, X. (2013) Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. PLOS ONE 8(4): e62085.

Jones, R. A. (1986) High salt tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. Euphytica 35: 576-582.

Joseph, B. and Jini, D. (2010) Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. Asian Journal of Plant Sciences 9: 307-313.

Manna, A., Mimouni, H., Wasti, S., Gharbi, E., Aschi-Smiti, S., Faurobert, M. and Ben Ahmad, H. (2013) Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. Plant Omics Journal 6: 268-277.

Munns, R., Hare, R. A., James, R. A. and Rebetzke, G. J. (2000) Genetic variation for improving the salt resistance of durum wheat. Australian Journal of Agricultural Research 51: 69-74.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Nam, M. H., Huh, S. M., Kim, K. M., Park, W. J., Seo, J. B., Cho, K., Kim, D. Y., Kim, B. G. and Yoon, I. S. (2012) Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. Proteome Science 10: 25.

Parida, A. K., Dasa, A. B., Mittrac, B. and Mohanty, P. (2004) Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the Mangrove *Bruguiera parviflora*. Zeitschrift fur Naturforschung. 59: 408-414.

Parrek, A., Singla, S. L. and Grover, A. (1997) Salt responsive proteins/genes in crop plant. In strategies for improving salt tolerance in higher plants. Oxford and International Book House Publication, New Delhi.

Parvaiz, A. and Satyawati, S. (2008) Salt stress and phytobiochemical responses of plants. Plant, Soil and Environment 54: 89-99.

Sairam, R. K., Veerabharda, K. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotype to long term salinity stress in relation to oxidative stress. Antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163: 1037-1046.

Santos, C. V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sun flower leaves. Scientia Horticulturae 103: 93-99.

Sariri, R., Galvani, M., Fotouhi Ghazvini, R. and Jafarian, V. (2011) The effect of cold temperature stress on antifreeze protein production and lipid peroxidation in two citrus species. Journal of Plant Biology 3(7): 97-102.

Serrano, R. and Rudriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. Current Opinion in Cell Biology 13: 399-404.

Shojaie Falavarjani, B., Rostami Darehsari, F. and Ehsanpour, A. A. (2012) Separation of protein according to point of Isoelectric (PI) and molecular weight merely by one electrophoresis phase. IRAN Patent 73217.

Sudhir, P. and Murthy, S. D. S. (2004) Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. Photosynthetica 42: 481-486.

Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and Mc Manse, M. T. (2010) Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, Callus Culture. African Journal of Biotechnology 9: 145-152.

Xiong, L. and Zhu, J. K. (2002) Salt tolerance. The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists, USA.

Effect of salt stress on protein pattern and some physiological parameters of *Lycopersicon peruvianum* under *in vitro* culture

Firoozeh Rabiei and Ali Akbar Ehsanpour *

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

In this study, *Lycopersicon peruvianum* line 815 was grown on MS medium containing 0, 60, 90 and 120 mM NaCl. After 4 weeks of NaCl treatment dry and fresh weights, chlorophyll a, b, total chlorophyll and caretenoid, proline, sodium and potassium, , the total protein, SDS-PAGE pattern were studied. The results showed that dry and fresh weight in shoot and root decreased with increasing of NaCl concentration. Chlorophyll and carotenoid pigments did not show any significant difference between the control and the treated explants. Proline and sodium contents increased with salinity compared to the control, but the potassium level and total protein content decreased. K^+/Na^+ ratio decreased with increasing of salt stress. In addition, SDS-PAGE results showed different protein pattern between the treated and the untreated plants. According to the mentioned results salt stress could directly affect plant growth and it had indirect on metabolism of plant.

Key words: Protein pattern, Salt stress, *Lycopersicon peruvianum*, *in vitro* culture

* Corresponding Author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir