

بررسی تأثیر قارچ‌های همزیست اندوفایت در تغییرات الگوی پروتئوم فسکیوی بلند تحت شرایط تنش خشکی

آزاده مداح^۱، عبدالله حاتم زاده^{۲*}، احد یامچی^۳ و رضا محمدی^۴

^۱گروه باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ^۲گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ^۳گروه بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران، ^۴گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۹/۲۱)

چکیده

در این تحقیق اثرات قارچ اندوفایت متعلق به جنس *نئوتیفودیوم* که به صورت همزیست اجباری با فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb) می‌باشد و تنش خشکی، روی تغییرات پروفیل پروتئینی این گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای مقاومت به استرس خشکی گیاهان دستخوش تغییراتی مانند تغییرات در ژن و پروفیل‌های بیان پروتئین قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۰ روز از استقرار گیاهان حاوی قارچ اندوفایت (E+) و بدون قارچ اندوفایت (E-) درون گلدان، بر اساس آزمایشات خاک مورد استفاده، تیمارهای آبی شامل شرایط مطلوب یا شاهد (۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه)، تنش خشکی به مدت ۱۴ روز (۲۵٪ ظرفیت مزرعه)، درون گلدان در گلخانه اعمال شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار اجرا شد. نتایج طیف سنجی جرمی نشان داد که اعمال تنش در گیاهان فسکیوی بلند تحت شرایط تنش خشکی در گیاهان E+ نسبت به E- بیان سه پروتئین را که در مسیر چرخه کالوین دخالت داشتند تغییر داده است. سه پروتئین مورد نظر شامل ریبولوز-۱۵-۵ بیس فسفات کربوکسیلاز (آنزیم روبیسکو) (لکه A13)، گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (لکه C7) و سدوهپتولوز-۷-۱ بیس فسفاتاز (لکه A1) بودند. گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز و سدوهپتولوز-۷-۱ بیس فسفاتاز به ترتیب در شرایط تنش در گیاهان آلوده به قارچ اندوفایت (E+) نسبت به شرایط کنترل ۱۸۳/۰ و ۲۵/۰ برابر کاهش بیان داشته‌است ولی در گیاهان بدون اندوفایت (E-) نسبت به شرایط کنترل ۴/۲ و ۱/۱۲ برابر افزایش بیان داشته‌است از طرفی آنزیم روبیسکو در شرایط تنش خشکی نسبت به کنترل در گیاهان E+، ۲/۶۱ برابر افزایش بیان و در گیاهان E-، ۷/۰ کاهش بیان داشته‌است. به طور کلی تنش خشکی در گیاهان به سیستم فتوسنتز صدمه می‌زند یعنی پتانسیل چرخه کالوین را در گیاه کاهش می‌دهد ولی با همزیست شدن گیاه با موجودات میکوریزا مانند اندوفایت و ریزوبیوم این کاهش پتانسیل جبران می‌شود و تنش در گیاه همزیست نسبت به کنترل درک نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: اندوفایت، پروتئومیکس، تنش خشکی، روبیسکو، سدوهپتولوز، گلیسرآلدئید

مقدمه

سردسیری، دگرگشن، علوفه‌ای و چمنی می‌باشد که دارای

فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Schreb) گیاهی ژنوم هگزاپلوئید است. در این گیاه و بعضی گیاهان مشابه

فسکیوی بلند در تمام ژنوتیپ‌ها سازگار نیست (Assuero *et al.*, 2000). از آنجا که پروتئین‌ها ملکول‌های ساختاری و عملکردی هستند مطالعه آنها جهت شناسایی کامل سیستم‌های زیستی ضروری است. لانگ و همکاران (۱۹۹۳) با روش SDS-PAGE به مطالعه اثر تنش گرما بر روی گیاهچه جوان و گیاه بالغ E+ و E- فسکیوی بلند نشان دادند که در گیاه بالغ E+، آنزیم رویسکو بیان بیشتری نسبت به تیمارهای دیگر داشته و یک پروتئین ۲۰ کیلو دالتونی نیز تنها در این نمونه‌ها مشاهده شده بود (Long *et al.*, 1993). Ghazanchian و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از الکتروفورز دو بعدی به بررسی تغییرات پروتئوم برگ در گیاه علف گندمی پا بلند (*Elymus elongatum* Host) تحت شرایط استرس خشکی و پس از آبیاری دوباره پرداختند. از ۶۰۰ پروتئینی که بر روی هر یک از ژل‌های دو بعدی مشاهده شد ۵۸ پروتئین بطور تکرار پذیر و تغییر معنی داری در بیان را نشان دادند. در پاسخ به خشکی شدید تنها اسید آبسزیک تغییرات معنی داری در بیان و موقعیت نشان داد (Ghazanchian *et al.*, 2007). در این تحقیق اثرات اندوفایت و تنش خشکی روی تغییرات پروفیل پروتئینی گونه فسکیوی بلند مورد بررسی قرار گرفته است و از آنجایی که چنین گزارشی در مورد گونه فسکیوی بلند ارائه نشده است، لذا نتایج این تحقیق درک ما را نسبت به پاسخ مولکولی گیاه فسکیوی بلند، تحت تنش خشکی در همزیستی گیاه با اندوفایت را بالا خواهد برد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور تولید بذر چمن بومی فسکیوی پابلند یک ژنوتیپ بومی با نام اختصاری Fa-fa-83-A که حاوی قارچ همزیست اندوفایت می‌باشد به عنوان والد مادری با یک ژنوتیپ از رقم تجاری Rebel به عنوان پایه پدری تلاقی داده شد. هدف از این تلاقی انتقال صفات مناسب چمنی نظیر رنگ سبز تیره، پاکوتاهی و باریکی برگ به ژنوتیپ بومی حاوی قارچ اندوفایت می‌باشد. بذور F1 حاصل از این تلاقی از ژنوتیپ بومی گرفته شده تا حاوی اندوفایت باشد. چون

دسته‌ای از قارچ‌های اندوفایت متعلق به جنس نئوتیفودیوم به صورت همزیستی‌های اجباری مشاهده می‌شوند. در این رابطه همزیستی، از یک طرف گیاه مواد فتوسنتزی و معدنی را برای قارچ فراهم می‌کند و از طرف دیگر قارچ‌های اندوفایت می‌توانند موجب افزایش رشد، محافظت در مقابل استرس‌های زنده و غیر زنده - مانند آفات و بیماری‌ها، خشکی، سرما، دمای بالا، کمبود مواد معدنی خاک و غیره شوند. مجموع اثرات این قارچ بر روی فسکیوی بلند، جمعیتی با سازگاری در دامنه وسیعی از شرایط اقلیمی و جغرافیایی است (Hill *et al.*, 1991). بطور کلی وجود قارچ‌های نئوتیفودیوم بر روی خصوصیات فیزیولوژیکی فسکیوی بلند در واکنش به تنش خشکی و بازیابی تأثیر می‌گذارد. Elmi و West (۱۹۹۵) بیان کردند که پنجه‌های آلوده به اندوفایت (E+) تحت تنش خشکی تنظیمات اسمزی بیشتری در مقایسه با پنجه‌های بدون قارچ اندوفایت E- دارند. همچنین نمونه‌های فسکیوی بلند E+ در مقایسه با نمونه‌های E- پس از تنش خشکی بازیابی بهتری از خود نشان داده است (Elbersen and West, 1996). تنش خشکی بزرگترین استرس محیطی می‌باشد که از فاکتورهای محدود کننده رشد و توسعه گیاهان و کاهش عملکرد آنها در محصولات کشت شده در کل جهان می‌باشد (Waraich *et al.*, 2011). گیاهان برای مقاومت به استرس خشکی برای سازگاری با این تنش دستخوش تغییراتی شدند. این فرآیند نیازمند تغییرات در میزان بیان ژن (Harb *et al.*, 2010) و الگوی پروتئین‌های موجود و مقدار آنها می‌باشد (Plomion *et al.*, 2006; Aranjuelo *et al.*, 2011). تعداد زیادی از مطالعات اخیر پروتئومیکس روی گونه‌های متنوعی تحت تنش‌های غیر زنده مانند خشکی (Jorge *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2005) تنش‌های اسمزی (Toorchi *et al.*, 2009)، شوری بالا (Manaa *et al.*, 2011) دمای پایین (Cheng *et al.*, 2010) و گرما (Lee *et al.*, 2007) انجام شده است. گزارش‌های دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد مدرکی به واسطه اندوفایت در تحمل به خشکی وجود ندارد (H Tian *et al.*, 2015; White *et al.*, 1992). بنابراین اثرات اندوفایت در پاسخ به خشکی در

بافت برگ پرچم رقم والد در هاون‌های چینی جداگانه، با استفاده از ازت مایع، پودر و به تیوب‌های مجزا منتقل شدند. استخراج پروتئین با روش تغییر یافته دامروال و همکارانش (۱۹۸۶) انجام شد (یامچی، ۱۳۸۹). برای سنجش مقدار پروتئین از کیت (GE Healthcare) 2D Quant و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج جذب ۴۸۰ نانومتر استفاده شد.

الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی ژل: نوارهای خشک (18 cm 3-11 NL, immobline dry stri, IPG Amersham) در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده حاوی ۲۰۰ میکروگرم پروتئین در دستگاه (GE Healthcare) IPGphor در ۲۰ درجه سانتی‌گراد بدون جریان الکتریکی به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس دستگاه روشن شده و برای تثبیت لکه‌های پروتئین (Focusing) از برنامه زیر در دستگاه IPGphor استفاده شد: ۳۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت، ۵۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت، ۱۰۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت و افزایش تدریجی ولتاژ تا ۸۰۰۰ ولت در عرض ۵ ساعت و نهایتاً در ۸۰۰۰ ولت به مدت ۶۰۰۰ ولت ساعت تنظیم شد (یامچی، ۱۳۸۹). نوارهای IPG بعد از الکتروفورز بعد اول به مدت ۱۵ دقیقه در بافر اشباع شامل اوره ۶ مولار، تریس-کلر ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۸/۸، دیتیوتریتول (DDT) ۱ درصد، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲ درصد، گلیسرول ۳۰ درصد و مقدار کمی بروموفنل بلوقرار گرفته سپس برای ۱۵ دقیقه دیگر در همان بافر ولی با جایگزینی آیدواستامید ۲/۵ درصد به جای DTT قرار گرفتند. سپس نوارهای IPG به بالای ژل‌های SDS-PAGE با غلظت ۱۲/۵ درصد اکریل آمید منتقل شد و در جریان ثابت ۳۰ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۱۰۵ میلی آمپر به مدت ۴ ساعت برای ۳ ژل SDS-PAGE در ۲۰ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شد (یامچی، ۱۳۸۹). در مرحله بعد ژل‌های SDS-PAGE در محلول رنگ آمیزی حاوی Colloidal CBB G-250 رنگ شدند (Candiano et al. 2004). برای این کار ژل‌ها ابتدا در محلول تثبیت (اسید استیک ۱۰ درصد و متانول ۴۰ درصد) به مدت یک ساعت قرار گرفتند و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه

اندوفایت از طریق والد مادری به نتاج انتقال می‌یابد. گیاهچه‌های ژنوتیپ فسکیوی بلند حاوی اندوفایت از کلکسیون موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور واقع در تبریز تهیه شدند. جهت همسان شدن نمونه‌ها، یک گیاهچه E+ با استفاده از روش تقسیم پنجه‌ها به مدت ۲ ماه تکثیر شدند و برای تهیه گیاهچه‌های E- تعدادی از نمونه‌های E+ در اوایل تکثیر دو مرتبه با فاصله ۱۰ روز توسط قارچ کش پروپیکونازول با غلظت ۲ گرم در لیتر ماده مؤثره تیمار شدند.

تست وجود قارچ اندوفایت در غلاف برگ: بررسی آلودگی به قارچ اندوفایت با استفاده از رنگ آمیزی رزینگال صورت گرفت. بدین ترتیب که محلول رنگ آمیزی با حل کردن ۰/۵ گرم پودر رزینگال در ۹۹/۵ میلی‌لیتر اتانول ۵ درصد تهیه گردید، سپس نمونه غلاف برگ از ۶ - ۵ سانتیمتری بالای یقه گرفته شد و به طول ۱ سانتیمتر خرد شده و درون تیوب‌های ۰/۵ میلی لیتر قرار داده شد. مقدار ۰/۵ میلی لیتر قطره از محلول رنگی استاندارد را درون تیوب ریخته و ۲۰ - ۳۰ دقیقه صبر کردیم تا رنگ جذب بافت گیاهی شود. سپس رنگ اضافی با آب مقطر شسته و رطوبت اضافی را با استفاده از کاغذ صافی گرفته شد و قطعات طوری روی لام قرار داده شد که قسمت داخلی غلاف برگ به سمت بالا باشد. لامل روی نمونه گذاشته و با میکروسکوپ مشاهده گردید (Saha et al., 1988).

تنش خشکی: پس از گذشت ۲۰ روز از استقرار گیاهان درون گلدان، بر اساس آزمایشات خاک مورد استفاده، تیمارهای آبی اعمال شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار اجرا شد. این تیمارها شامل شرایط مطلوب یا شاهد (۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه)، تنش خشکی به مدت ۱۴ روز (۲۵٪ ظرفیت مزرعه) در ژنوتیپ گیاهی والد مادری و وجود و عدم وجود قارچ اندوفایت بودند که درون گلدان در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اعمال شد.

استخراج پروتئین و تعیین غلظت: مقدار ۲۰۰ میلی گرم از

لیتر آلفا سیانو + استونیتریل ۰.۷٪ و تری فلئوئوریک استیک اسید TFA ۰/۱ درصد) روی صفحه ماتریکس مالدی جهت انجام طیف سنجی جرمی تزریق شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌ی هر نمونه با استفاده از تیپ‌های آماده شده روی صفحه مالدی تزریق شد. سپس صفحه مالدی را در دستگاه آنالیز کننده MALDI TOF/TOF 4800 PLUS (sciex) برای آنالیز کردن نمونه‌ها قرار دادیم و سرانجام نتایج حاصله به کمک نرم افزار MASCOT با پروتئین‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی مقایسه و پروتئین موجود در هر لکه شناسایی شد. پارامترهای مورد استفاده برای نرم افزار MASCOT شامل: carbamidomethyl (C) به عنوان تغییر ثابت پروتئین و deamidated (NQ) و oxidation (M) به عنوان تغییرات متغیر به نرم افزار معرفی شدند.

نتایج و بحث

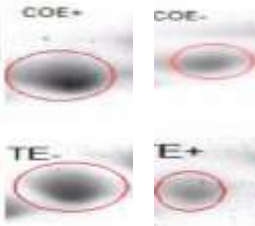
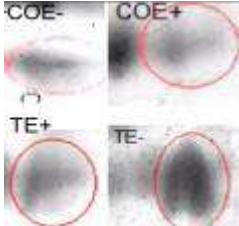
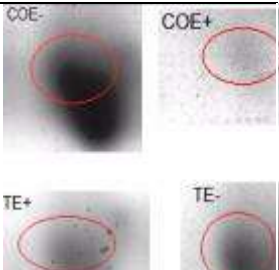
نتایج و آنالیز ژل‌های الکتروفورز: پس از انجام الکتروفورز دوبعدی الگوی پروتئوم گیاهان در شرایط تنش خشکی (T) و کنترل (CO) در گیاهان آلوده به قارچ اندوفایت (E+) و بدون اندوفایت (E-) در بررسی و آنالیز ژل‌های الکتروفورز با استفاده از نرم افزار 2D-Platenium نشان داده است (جدول ۱) که لکه C7 در شرایط تنش در گیاهان آلوده به قارچ اندوفایت (E+) در لکه‌های علامت گذاری شده در زیر نسبت به شرایط کنترل ۰/۱۸۳ برابر کاهش بیان داشته است، از طرفی در شرایط تنش در گیاهان بدون اندوفایت (E-) در لکه C7 نسبت به شرایط کنترل ۲/۴ برابر افزایش بیان داشته است (جدول ۱). لکه A1 در شرایط تنش نسبت به کنترل در گیاهان E+، ۰/۲۵ برابر کاهش بیان داشته است ولی در گیاهان E- ۱۲/۱ برابر افزایش بیان داشته است (جدول ۱). در لکه‌های A13 در شرایط تنش خشکی نسبت به کنترل در گیاهان E+، ۶۱/۲ برابر افزایش بیان و در گیاهان E-، ۰/۷ کاهش بیان داشته است (جدول ۱).

نتایج طیف سنجی جرمی: پس از انجام طیف سنجی جرمی، بررسی‌ها با نرم افزار مس کات نشان داده است که در شرایط تنش خشکی و کنترل و تحت اثر قارچ‌های اندوفایت ۳

در آب دو بار تقطیر شستشو شدند و سپس برای ۳۰ ساعت در محلول رنگ آمونیوم سولفات ۱۰ درصد، متانول ۲۰ درصد، فسفریک اسید ۱۰ درصد و کوماسی بلو CBB G-250 ۰/۱۲ درصد قرار گرفتند. ژل‌ها بعد از رنگ‌آمیزی توسط اسکنر (Image scanner) (GE Healthcare) اسکن شدند و از نرم افزار (Image master 2D platenium ver.6) (GE Healthcare) برای تجزیه و تحلیل تصاویر استفاده شد. نسبت اندازه لکه‌ها در بین ژل‌ها بر اساس درصد حجم به کمک نرم افزار محاسبه گردید. نحوه نرمال سازی لکه‌های پروتئین به روش Scotter plot بود (Salekdeh *et al.*, 2002). آزمایشات الکتروفورز دوبعدی در دو تکرار بیولوژیک انجام شد.

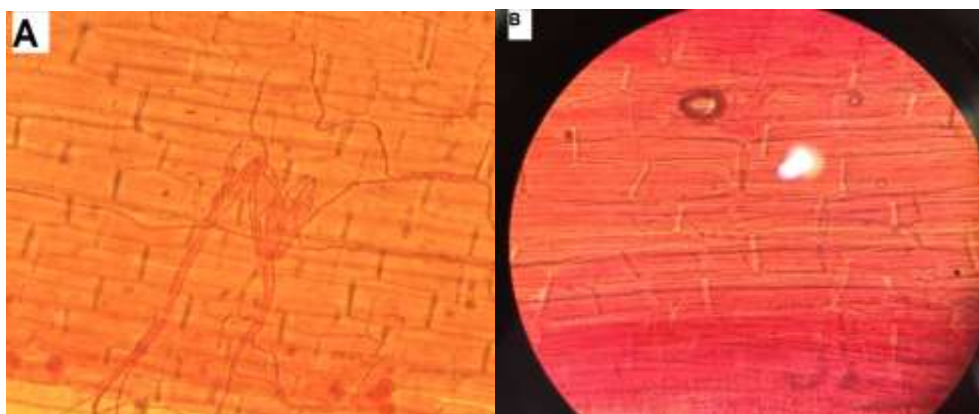
آزمون طیف سنجی جرمی: با توجه به عدم وجود دستگاه مناسب برای تعیین توالی لکه‌های بدست آمده در داخل کشور، لکه‌ها پروتئین با بیان افتراقی از روی ژل اکریل آمید بریده شده و پس هضم با آنزیم تریپسین طبق روش (Shevchenko, *et al.* 1996) در دانشگاه دانمارک جنوبی توالی یابی شدند. برای از بین بردن رنگ کوماسی بلو از استونیتریل ۱۰۰٪ (ACN) و سپس آب به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکراستفاده شد. در مرحله بعد برای احیا و آلکیله شدن پروتئین‌ها از محلول دیتیوتریتول (DTT) (Apollo Scientific LTD, B1015) حاوی ۴۹۵ میکرولیتر آمونیوم بی کربنات ۰/۱ مولار و ۵ میکرولیتر DTT ۱ مولار به مقدار ۵۰ میکرولیتر از این محلول روی قطعات ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد شیکر شده و سپس بلافاصله در محلول یدواستامید حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر یدواستامید ۵۵ میلی مولار در آمونیوم بی کربنات ۰/۱ NH₄HCO₃ مولار به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک قرار گرفت و نهایتاً با ۰/۱ NH₄HCO₃ مولار شستشو شدند. در ادامه آنزیم تریپسین (Promega Seq grade modified, V5111) با غلظت ۶ نانو گرم در هر میکرولیتر به هر لکه ژل افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه محلول تریپسین اضافی حذف شد و با ۳۰ میکرولیتر ۵۰ NH₄HCO₃ میلی مولار بدون تریپسین جایگزین شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. ۲۴۵ میکرولیتر محلول ماتریکس (۵ میلی گرم در میلی

جدول ۱- نتایج مربوط به آنالیز طیف سنگی جرمی با استفاده از نرم افزار MASCOT و مقایسه لکه ها تحت شرایط تنش خشکی (T) و کنترل (co) مربوط به چمن های E+ و E-

Spot	Genotype	Best matching gene product	Theoretical MW (KD)/PI	VOL E- T/CO	VOL E+ T/CO	Accession Number	Identified fragment peptides sequence	Spots Fig.
C ₇	Parent	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	6.40 / 36509.85	2.4	0.183	<u>ACV860</u> <u>34.1</u>	VALQCPDVEL VAVNDPFITD YMTYMFK;NPE EIPWASAGAD YVVESTGVFTD K;TVDGPSSQD WR;VPIVDVSV VDLTVRLEK	
A ₁₃	Parent	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, partial	8.59 / 18810.74	0.697	61.2	<u>AAF079</u> <u>42.1</u>	SNAG LGSVSNNGGR; WVPCLEFSK;E VEE VK;EYPDAYVR	
A ₁	Parent	SedoheptulosE-1,7-bisphosphatase	5.04 / 56077.75	12/16	0.255	<u>S17P_SP</u> <u>IOL</u>	SSSLFGESLRM TTK;CELGDSL EEFLAK;TASC GGTQCVNTFG DEQLAIDVLAD K;LTGVTGR;YT GGMVPDVNQII VKEK	

در شرایط تنش در گیاهان E- نسبت به E+ افزایش بیان ولی در شرایط کنترل در گیاهان E+ نسبت به E- افزایش بیان دیده شده است (شکل ۱ و ۲). نتایج طیف سنگی جرمی نشان داد که اعمال تنش در گیاهان فسکوئی بلند تحت شرایط تنش خشکی در گیاهان E+ نسبت به E- پروتئین هایی که تغییر بیان پیدا کردند در مسیر چرخه کالوین دخالت داشتند. کراسو و همکاران (۲۰۰۹) یافتند که در موقعیت های خشکی شدید پروتئین های پاسخگو در گلیکولیز، گلیکوژینزیم، چرخه کالوین، اکسیژن فعال مهارگونه، بیوستنز آمینواسید، مکانیسم دفاعی و تنظیم ویرایش بعد از رونویسی دخیل هستند. به طور کلی تنش خشکی در گیاهان به سیستم فتوستنز صدمه میزند یعنی پتانسیل چرخه کالوین را در گیاه کاهش می دهد ولی با

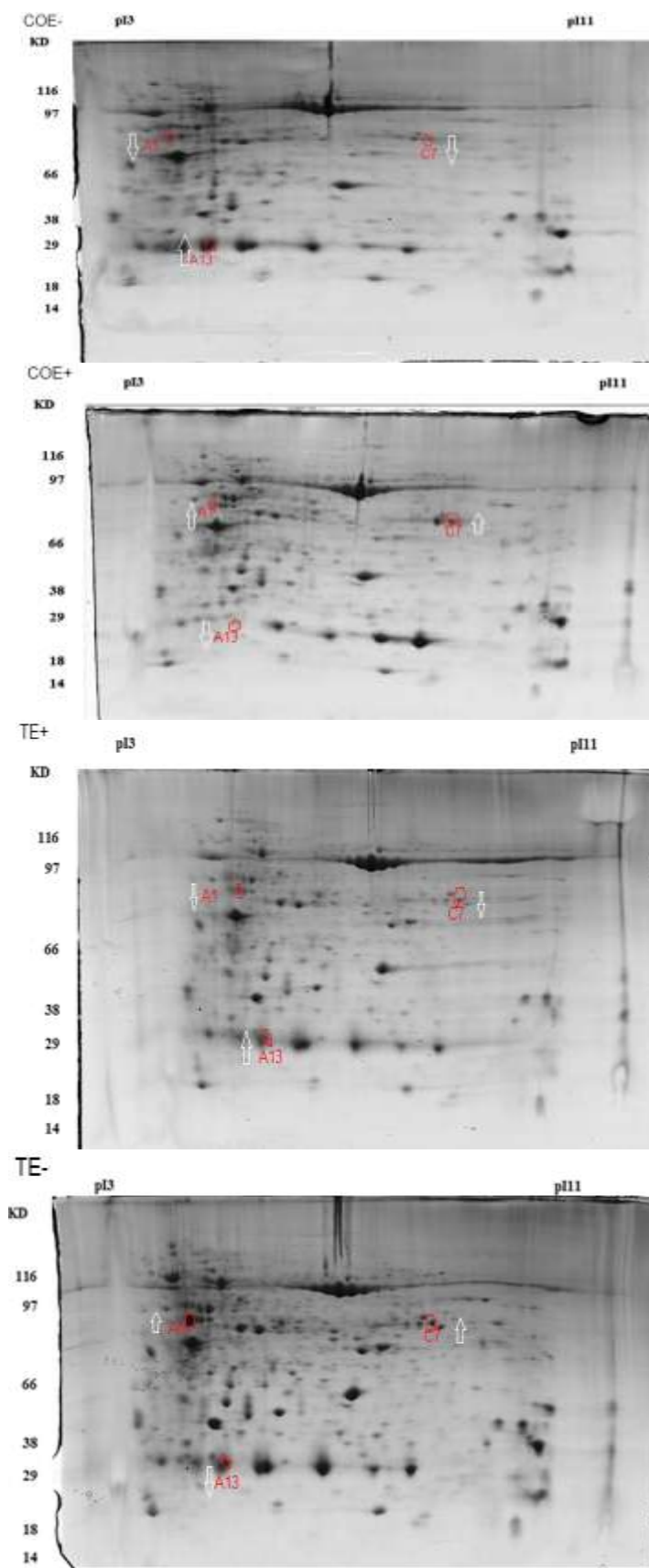
نوع پروتئین بیشتر دخیل بوده اند به نام های: ریبولوز-۱و۵- بیس فسفات کربوکسیلاز (آنزیم روبیسکو) (لکه A13)، گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز (لکه C7) و سدوهپتولوز-۱و۷- بیس فسفاتاز (لکه A1) (جدول ۱). همانطور که نتایج آنالیز ژل های الکتروفورز نشان داده است، آنزیم روبیسکو در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در گیاهان E- کاهش بیان و در گیاهان E+ افزایش بیان داشته است همچنین آنزیم روبیسکو در گیاهان E+ نسبت به E- در شرایط کنترل و تنش افزایش بیان داشته است. از طرفی گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز و سدوهپتولوز-۱و۷- بیس فسفاتاز، در شرایط تنش نسبت به شرایط کنترل در E+ ها کاهش بیان ولی در گیاهان E- افزایش بیان داشته اند. از طرفی



شکل ۱- نمونه ای از مشاهده میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی رزنگال در چمن فسکیوی بلند آلوده به قارچ اندوفایت (شاهد) (A) و چمن عاری از قارچ اندوفایت پس از تیمار با قارچ کش پروپیکونازول (B)

است که کاهش نتایج ظرفیت فتوسنتزی ناشی از بازسازی ریبولوز او۵-بیس فسفات می‌باشد (Giménez *et al.*, 1992). مقدار روپیسکو در برگ‌ها با میزان سنتز و تخریب کنترل می‌شود. حتی در شرایط تنش خشکی هولو آنزیم روپیسکو با نیمه عمر چند روز نسبتاً پایدار است (Webber *et al.*, 1994). اما تنش خشکی در گوجه فرنگی (Bartholomew *et al.*, 1991)، آرابیدوپسیس (Williams *et al.*, 1994) و برنج (Vu *et al.*, 1999) منجر به کاهش سریع در فراوانی رونوشت زیرواحد کوچک روپیسکو شده‌است که ممکن است کاهش سنتز را نشان دهد که این نتایج نیز موافق با نتایج این پژوهش در مورد گیاهان E- در شرایط تنش بوده است. با همزیست شدن اندوفایت در فسکیوی بلند در گیاه قدرت بیان ژن‌های گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز (GA3P) و سدوهپتولوز-۱و۷- بیس فسفاتاز (S1,7BP) نسبت به گیاه E- در شرایط تنش کاهش پیدا کرده که این نشان می‌دهد بدلیل وجود قارچ اندوفایت گیاه تنش را احساس نکرده است و بجای عکس العمل دفاع به رشد عادی خود ادامه داده است. محدودیت‌های غیر روزنه‌ای شامل: کاهش مقدار ATP به دلیل کمبود فعالیت ATP سینتاز (Tezara *et al.*, 1999)، کاهش مقدار کلروفیل کل به خصوص کلروفیل b (Moran *et al.*, 1994) و کاهش سطح آنزیم‌های فتوسنتتیک شامل سدو هپتولوز-۱و۷-بیس فسفات (SBP)، ترنس کتولاز (TK)، NADP- گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (NADP

همزیست شدن گیاه با موجودات میکوریزا مانند اندوفایت و ریزوبیوم این کاهش پتانسیل جبران می‌شود. با همزیست شدن اندوفایت در فسکیوی بلند توانمندی عملکرد و رشد گیاه افزایش پیدا کرده به طوریکه اعمال تنش خشکی روی گیاه E+ اثر منفی نداشته بلکه باعث افزایش بیان ژن در گیاه شده لذا توان رشد و فتوسنتز در گیاه E+ در شرایط تنش تقویت شده است و آزمایشات پروتئومیکس نشان داده است که با اعمال تنش پتانسیل بیان ژن روپیسکو (RUBP) در گیاهان E- کاهش می‌یابد (این بیان در شرایط کنترل ۱/۴۳ برابر شرایط تنش می‌باشد) ولی برعکس در گیاهان E+ میزان بیان آن در شرایط تنش افزایش می‌یابد (۶۱/۲۱ برابر). بیش از ۴۰ درصد پروتئین محلول کل برگ را آنزیم روپیسکو تشکیل می‌دهد (Tiaz and zeiger, 1998). پاسخ‌های کوتاه مدت از روپیسکو به تنش خشکی مشخص نیست، و در مطالعات مختلف نتایج متناقضی به دست آمده است. از ویژگی‌های مهم در ارقام مقاوم به تنش خشکی کنترل عملکرد روزنه ای جهت تغلیظ دی اکسید کربن (CO₂) در کلروپلاست سلول‌های مزوفیل به منظور فرآیند فتوسنتز است (Rahbarian *et al.*, 2011). این افزایش بیان پروتئین در گیاهان E+ نسبت به E- نشان می‌دهد که قارچ اندوفایت یا باعث افزایش بیان ژن روپیسکو شده یا باعث افزایش نیمه عمر روپیسکو شده است و نگذاشته است که تخریب شود بنابراین ظرفیت فتوسنتز در E+ بالاتر از E- خواهد بود که در تأیید این مطلب مطالعات مختلف نشان داده



شکل ۲- الگوی پروتئوم چمن های فسکویی بلند حاوی قارچ اندوفایت (E+) و عاری از قارچ اندوفایت (E-) در شرایط کنترل (CO) و تنش خشکی (T)

جذب دی اکسید کربن بوسیله مبادله گاز از این دیدگاه پشتیبانی می‌کند. کاهش جبران دی‌اکسیدکربن در گیاهان E+ نشان می‌دهد که غلظت داخلی دی‌اکسیدکربن ممکن است بالاتر از آن باشد که سبب بهبود فرآیند فتوسنتز شود. غلظت‌های بالاتر دی‌اکسیدکربن داخلی نشان دهنده افزایش میزان جذب کربن توسط روئیسکو است. افزایش کربوکسیلات ممکن است از افزایش فعالیت یا فراوانی روئیسکو حاصل شود (Piuter et al., 2015). همانطور که پیوتر و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که با توجه به مطالعات پروتئومیک و بیان ژن، بیان روئیسکو، چند پروتئین کلروفیلی اتصال دهنده و پروتئین‌های ساختاری فتوسیستم دو و فتوسیستم یک در گیاهان E+ افزایش یافته است. بنابراین همانند نتایج گرفته شده در این تحقیق آنالیز پروتئومیکس روش خوبی برای بررسی فتوسیستم یک و دو و چرخه کالوین نیز می‌باشد.

همان‌طور که در این مطالعه نشان داده شده است، همزیستی‌های مفید بین قارچ اندوفایت و گیاه فسکویی بلند باعث افزایش بازدهی سیستم فتوسنتز گیاه در مقابله با استرس خشکی شده است. نتایج آزمایشات پروتئومیکس نشان داد که سه ژن ریبولوز-۱و۵-بیس فسفات، سدوهپتولوز-۱و۷-بیس فسفات و گلیسرآلدئید-۳فسفات دهیدروژناز از ژن‌های مؤثر در سیستم فتوسنتز گیاه می‌باشد که قارچ اندوفایت از طریق همزیستی با گیاه فسکویی بلند باعث افزایش راندمان این ژن‌ها و در نتیجه باعث افزایش راندمان فتوسنتز گیاه میزبان در برابر تنش خشکی شد. به طور کلی تحقیقات بیشتر به ما امکان می‌دهد که به درک بهتری از مبادله ارتباطات مولکولی بین همزیستی گیاهان و قارچ‌ها دست پیدا کنیم.

GAPDH) و ریبولوز-۱و۵-بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (روئیسکو) اکتیواز می‌باشد (Bayramov et al., 2010). با این حال اسپیرینگ (۲۰۰۰) اعلام کرد در تحقیقی به طرز شگفت‌انگیزی مقدار ریبولوز-۱و۵-بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (روئیسکو) که یک آنزیم کلیدی و محدود کننده در چرخه کالوین می‌باشد، با وجود میزان فتوسنتز خالص گیاهان آلوده به اندوفایت، تحت تأثیر وضعیت اندوفایت قرار نگرفت (Spiering, 2000)، که این نتیجه مخالف با نتیجه گرفته شده در این تحقیق می‌باشد. Buchanan و همکاران (۲۰۰۳) به کمک تکنیک SDS-PSGE نشان دادند که در برگ‌های آراییدوپسیس از روز ۳۲ بعد از کاشت (بعد از اینکه برگ‌ها کاملاً توسعه یافتند) میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روئیسکو کاهش پیدا می‌کند. از آنجاییکه هیچ اطلاعات منسجمی برای توضیح پدیده بهبود رشد چمن‌های *Festuca arundinacea* ناشی از قارچ نئوفتیدیوم هنوز ارائه نشده است، پیشنهاد می‌کنیم که حضور قارچ‌های مفید باعث تغییر متابولیسم گیاه از دفاع به رشد می‌شود که اجازه می‌دهد گیاه از منابع موجود برای فتوسنتز و جذب کربن استفاده کند. مطالعات متعدد در مورد گیاهان میکوریزیایی شده نشان داده است که مقاومت به تنش و افزایش کارایی فتوسنتز با کلونیزاسیون قارچی افزایش می‌یابد (Aloui et al., 2011; Ruiz-Lozano et al., 2012). به نظر می‌رسد مقاومت به تنش در گیاهان تلقیح شده از طریق تحریک فتوسنتز، آزادسازی انرژی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی انجام گیرد. به نحو جالبی، قارچ بیان برخی پروتئین‌های جدید که ارتباط آنها با مقاومت به تنش هنوز به طور کامل آشکار نشده را نیز تغییر داده است (قبولی و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می‌رسد بهبود

منابع

- قبولی، م.، حسینی سالکده، ق.، سپهری، م. و حیدری، م. (۱۳۹۲) بررسی پروتئوم گیاهان جو تلقیح شده با قارچ اندوفیت *P.indica* تحت تنش خشکی با استفاده از تکنیک الکترونفورز دو بعدی، هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی، تهران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، دانشگاه تهران.
- یامچی، ا. (۱۳۸۹). تجزیه و تحلیل پاسخ‌های گیاهی در سیستم بیماری‌زایی یونجه یکساله و باکتری *Ralstoniasolanacearum* پایان نامه دکتری، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.

- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S. and Dumas Gaudot, E. (2011) On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis, a root proteomic study. *Proteomics* 9:420-433.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avicé, J. C. and Nogue, S. (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 62:111-123.
- Assuero, S. G., Matthew, C., Kemp, P. D., Latch, G. C. M., Barker, D. J., and Haslett, S. J. (2000) Morphological and physiological effects of water deficit and endophyte infection on contrasting tall fescue cultivars. *New Zeal. Journal of Agricultural Research* 43: 49-61.
- Bartholomew, D. M., Bartley, G. E. and Scolnik, P. A. (1991) Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves. *Plant Physiology* 96: 291-296.
- Bayramov, S. M., Babayev, H. G., Khaligzade, M. N., Guliyev, N. M. and Raines, C. A. (2010) Effect of water stress on protein content of some calvin cycle enzymes in different wheat genotypes. *Proceedings of ANAS. Biological Sciences* 65: 106-111.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D. (2003) The molecular analysis of leaf senescence- a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3-22.
- Candiano, G., Bruschi, L., Santucci, G., Ghiggeri, B., Carnemolla, P., Orecchia, L. and Zardi, P. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327-1333.
- Cheng, S., Maier, D., Neubueser, D. and Hipfner, D. R. (2010) Regulation of smoothened by Drosophila G-protein-coupled receptor kinases. *Developmental Biology* 337: 99-109.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R. and Lagana, A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science* 177:570-576.
- Cheng, L., Gao, X., Li, S., Shi, M., Javeed, H. and Jing, X. (2010) Proteomic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Meer.] seeds during imbibition at chilling temperature. *Molecular Breeding* 26:1-17.
- Elbersen, H. and West, C. (1996) Growth and water relations of field grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science* 51: 333-342.
- Gazanchian, A., Hajheidari, M., Khoshkholgh, N. and Salekdeh, Gh. (2007) Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *Journal of experimental botany* 58: 291-300.
- Giménez, C., Mitchell, V. J., Lawlor, D. W. (1992) Regulation of photosynthesis rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology* 98: 516-524.
- Harb, A., Krishnan, A., Madana, M. R., Ambavaram, A. (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154: 1254-1271.
- Hill, N., Belesky, D. and Stringer, W. (1991) Competitiveness of tall fescue as influenced by *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 31: 185-190.
- Jorge, I., Navarro, R. M., Lenz, C., Ariza, D., Jorin, J. (2006) Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* 6:207-214.
- Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D. and Lee, I. J. (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7:3369-3383.
- Long, R. L. G., Adams, L. T., Corley, J. D., Karlin, A. A., Parsons, Kleve, B. L., Henle, M. G. (1993) Stress induced protein changes in tall fescue. *Proceedings Arkansas Academy of Science* 47: 69-72.
- Manaa, A., Ahmed, H. B., Smiti, S., Faurobert, M. (2011) Salt-stress induced physiological and proteomic changes in Tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *OMICS Publishing Groups* 15:801-809
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbeormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Aparicotejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea-plants. *Planta* 194: 346-352.
- Piotr Rozpadek, K., Wezowicz, M., Nosek, R., Wazny, K., Tokarz, M., Lembicz, Z., Miszalski, and Turnau, K. (2015) The fungal endophyte *Epichloe typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Planta* 242: 1025-1035.
- Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat- Triboulot, M. B. *et al* (2006) Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought stress responsive proteins. *Proteomics* 6:6509-6527.
- Rahbarian, R., Khavari-nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A. R. and Najafi, F. (2011) Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 53: 4756.
- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., Azcon, C. and Aroca, R. (2012) Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *Journal of Experimental Botany* 63:4033-4044.
- Saha, D. C., Jackson, M. A., and Johnson-Cicalse, J. M. (1988) A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. *Phytopathology* 48: 237-239.
- Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L., Ghareyazie, B., Bennett, J. (2002) A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research* 76:199-219.

- Spiering, M. J. (2000) Distribution of *Neotyphodium lolii* Endophyte Metabolic Activity in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) and its Implications for Al-kaloid Distribution and Photosynthesis.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D. and Lawlor, D. W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914–917.
- Tian, Z., Huang, B., and Belanger, F. C. (2015) Effects of epichloe festucae fungal endophyte infection on drought and heat stress responses of strong creeping red fescue. *Journal of American Society for Horticulture Science* 140: 257–264.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. 2th Ed. Sinauer Associated, Inc., Publisher.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M. Z., Komatsu S (2009) Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides* 30:2108–2117.
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L., Zivy, M. (2005) Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves: a proteomic investigation. *Plant Physiology* 137:949–960.
- VuJ, C. V., Gesch, R. W., Allen, L. H., Boote, K. J., Bowes, G. (1999) CO₂ enrichment delays a rapid, drought induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. *Journal of Plant Physiology* 155: 139–142.
- Waraich, E. A., Ahmad, R., Saifullah Ashraf, M. and Ehsanullah, Y. (2011) Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Australian Journal of Crop Science* 5:764–777.
- WebberAN, G. Y. and Long, S. P. (1994) Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research* 39: 413–425.
- White, R. H., Engelke, M. C., Morton, S. J., Johnson-Cicalese, J. M., and Ruemmele, B. A. (1992) Acremonium Endophyte effects on tall fescue drought tolerance. *Crop Science* 32: 1392–1396.
- Williams, J., Bulman, M. P., Neill, S. J. (1994). Wilt induced ABA biosynthesis, gene expression and down regulation of *rbcS* messenger RNA levels in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 91: 177–182.