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[٤]

[۱]گروه باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، [۲]گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، [۳]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران، .[٤]گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰٦/۰٤، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰۹/۲۱)

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 ۱٤ 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 فسکویی 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-۱و۵- بیس فسفات کربوکسیلاز (آنزیم روبیسکو) (لکه A13)، گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز (لکه C7) و سدوهپتولوز- ۱و۷- بیس فسفاتاز (لکه A1) بودند. گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز و سدوهپتولوز- ۱و۷- بیس فسفاتاز به ترتیب در شرایط تنش در گیاهان آلوده به قارچ اندوفایت (+E) نسبت به شرایط کنترل ۰/۱۸۳و ۰/۲۵برابر کاهش بیان داشته‌است ولی در گیاهان بدون اندوفایت (–E) نسبت به شرایط کنترل ۲/٤ و ۱۲/۱ برابر افزایش بیان داشته است از طرفی آنزیم روبیسکو در شرایط تنش خشکی نسبت به کنترل در گیاهان +E، ٦۱/۲ برابر افزایش بیان و در گیاهان -E ،۰/۷ کاهش بیان داشته است. 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، گلیسرآلدهید

مقدمه

گیاهی (*Festuca arundinacea schreb*) فسکیوی بلند سردسیری، دگرگشن، علوفه‌ای و چمنی می‌باشد که دارای ژنوم هگزاپلوئید است. در این گیاه و بعضی گیاهان مشابه

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mo_hatamzadeh@guilan.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

دسته‌ای از قارچ‌های اندوفایت متعلق به جنس نئوتیفودیوم به صورت همزیست‌های 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 فرایند 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 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 روبیسکو 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 آبسیزیک 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 فسکویی 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

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 رزبنگال صورت گرفت. بدین ترتیب که محلول رنگ آمیزی با حل کردن ۰/۵ گرم پودر رزبنگال در ۹۹/۵ میلی‌لیتر اتانول ۵ درصد تهیه گردید، سپس نمونه غلاف برگ از ٦ – 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 ۳۰ – ۲۰ 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 ١٤ 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 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 تغییریافته دامروال و همکارانش (۱۹۸٦) انجام شد (یامچی، ۱۳۸۹). برای سنجش مقدار پروتئین از کیت 2D Quant (GE Healthcare) و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج جذب ٤٨٠ نانومتر استفاده شد.

الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی ژل: نوارهای خشک (18 cm 3-11 NL, immobline dry stri, IPG Amersham Biosience) در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده حاوی ۲۰۰ میکروگرم پروتئین در دستگاه IPGphor (GE Healthcare) 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 ٦۰۰۰۰ ولت ساعت تنظیم شد (یامچی، ۱۳۸۹). نوارهای IPG بعد از الکتروفورز بعد اول به مدت ۱۵ دقیقه در بافر اشباع شامل اوره ٦ 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 برومونفل 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 ٤ 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 ٤۰ درصد) به مدت یک ساعت قرار گرفتند و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

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(GE Healthcare) Image master 2D platenium ver.6 برای تجزیه وتحلیل 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,BIMB1015) حاوی ٤٩٥ 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 ٥٦ 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 NH_4HCO_3 ۰/۱ مولار به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک قرار گرفت و نهایتاً با NH_4HCO_3 ۰/۱ مولار شستشو شدند. در ادامه آنزیم تریپسین (Promega Seq grade modified,V5111) با غلظت ٦ نانو گرم در هر میکرولیتر به هر لکه ژل افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه محلول تریپسین اضافی حذف شد و با ۳۰ میکرولیتر NH_4HCO_3 ۵۰ میلی مولار بدون تریپسین جایگزین شد و به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. ٢٤٥ میکرولیتر محلول ماتریکس (۵ میلی گرم در میلی لیتر آلفا سیانو + استونیتریل ۷۰٪ و تری فلوئوریک 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 متغییر به نرم افزار معرفی شدند.

نتایج و بحث

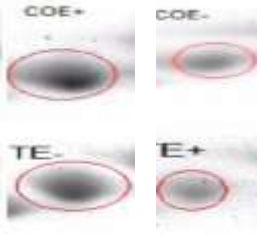
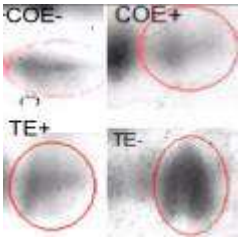
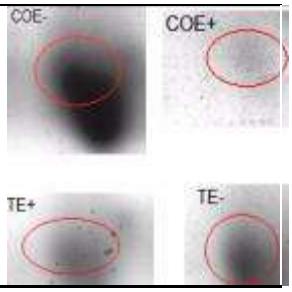
نتایج و آنالیز ژل‌های الکتروفورز: پس از انجام الکتروفورز دوبعدی الگوی پروتئوم گیاهان در شرایط تنش خشکی (T) و کنترل (CO) در گیاهان آلوده به قارچ اندوفایت (+E) و بدون اندوفایت (-E) در بررسی و آنالیز ژل‌های الکتروفورز با استفاده از نرم افزار 2D-Platenium نشان داده است (جدول ۱) که لکه C7 در شرایط تنش در 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 ٢/٤ 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، ٦١/٢ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

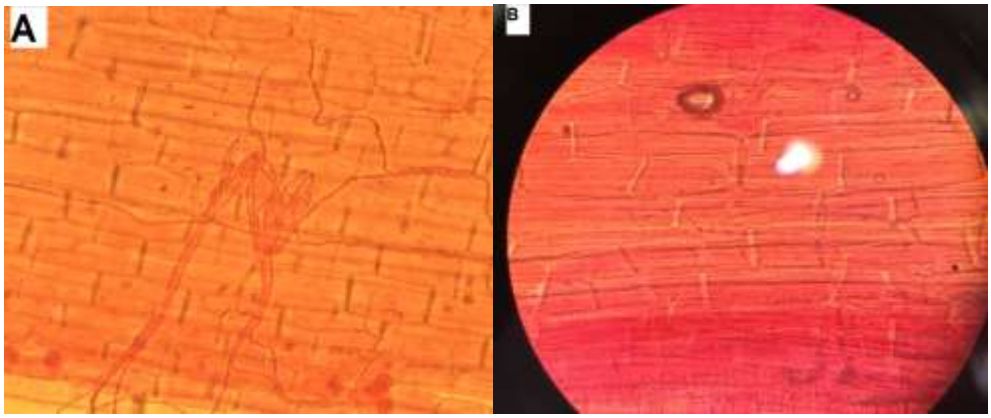
جدول ۱- نتایج مربوط به آنالیز طیف سنجی جرمی با استفاده از نرم افزار MASCOT و مقایسه لکه‌ها تحت شرایط تنش خشکی (T) و کنترل (co) مربوط به چمن های+E و –E

Spot	Genotype	Best matching gene product	Teoretical MW (KD)/PI	VOLE-T/CO	VOL E+ T/CO	Accssion Number	Identified fragment peptides sequence	Spots Fig.
C_7	Parent	glyceraldehydE-3-phosphate dehydrogenase 1	6.40 / 36509.85	2.4	0.183	ACV86034.1	VALQCPDVELVAVNDPFITTDYMTYMFK;NPEEIPWASAGADYVVESTGVFTDK;TVDGPSSQDWR;VPIVDVSVVDLTVRLEK	
A_{13}	Parent	ribulosE-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, partial	8.59 / 18810.74	0.697	61.2	AAF07942.1	SNAG LGSVSNGGR; WVPCLEFSK;EVEE VK;EYPDAYVR	
A_1	Parent	SedoheptulosE-1,7-bisphosphatase	5.04 / 56077.75	12/16	0.255	S17P_SPIOL	SSSLFGESLRMTTK;CELGDSLEEFLAK;TASCGGTQCVNTFGDEQLAIDVLADK;LTGVTGR;YTGGMVPDVNQIIVKEK	

نوع پروتئین بیشتر دخیل بوده‌اند به نام‌های: ریبولوز-۱و۵- بیس فسفات کربوکسیلاز (آنزیم روبیسکو) (لکه A13)، گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز (لکه C7) و سدوهپتولوز- ۱و۷- بیس فسفاتاز (لکه A1) (جدول ۱).

همانطور که نتایج آنالیز ژل‌های 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 گلیسرآلدهید-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 داشته‌اند. از طرفی 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 سنجی جرمی نشان داد که اعمال تنش در گیاهان فسکویی بلند تحت شرایط تنش خشکی در گیاهان +E نسبت به –E پروتئین‌هایی که تغییر بیان پیدا کردند در مسیر چرخه کالوین دخالت داشتند. کراسو و همکاران (۲۰۰۹) یافتند که در موقعیت‌های خشکی شدید پروتئین‌های پاسخگو در گلیکولیز، گلیکوژینزیس، چرخه کالوین، اکسیژن فعال مهارگونه، بیوسنتز آمینواسید، مکانیسم دفاعی و تنظیم ویرایش بعد از رونویسی دخیل هستند. به طور کلی تنش خشکی در گیاهان به سیستم فتوسنتز صدمه میزند یعنی پتانسیل چرخه کالوین را در گیاه کاهش می‌دهد ولی با

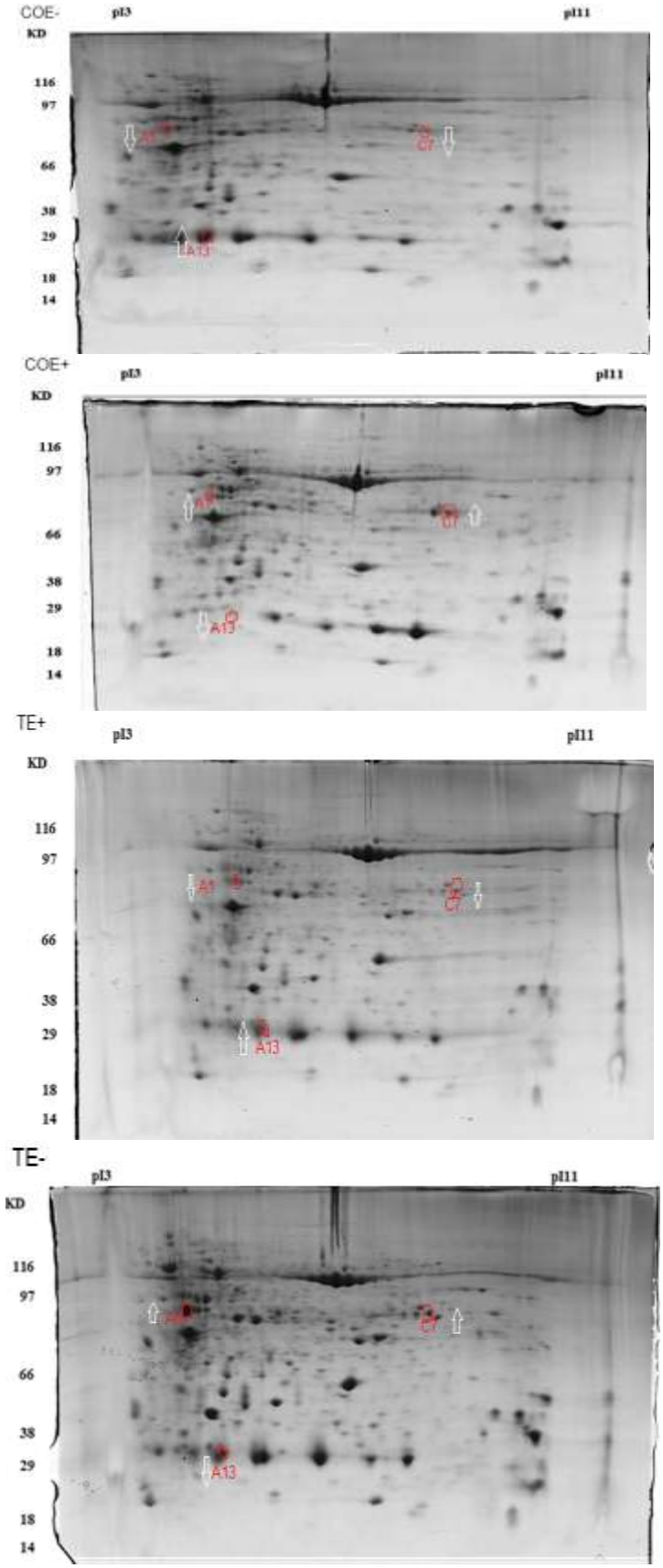
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]



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

همزیست شدن گیاه با موجودات میکوریزا مانند اندوفایت و ریزوبیوم این کاهش پتانسیل جبران می‌شود. با همزیست شدن اندوفایت در فسکویی 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 روبیسکو (RUBP) در گیاهان –E کاهش می‌یابد (این بیان در شرایط کنترل ۱/۴۳ برابر شرایط تنش می باشد) 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 روبیسکو تشکیل می‌دهد (Tiaz and zeiger, 1998). پاسخ‌های کوتاه مدت از روبیسکو 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 (CO_2) 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 روبیسکو شده یا باعث افزایش نیمه عمر روبیسکو 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 است که کاهش نتایج ظرفیت فتوسنتزی ناشی از بازسازی ریبولوز ۱و۵–بیس فسفات می‌باشد (Giménez *et al.*, 1992). مقدار روبیسکو در برگ‌ها با میزان سنتز و تخریب کنترل می‌شود. حتی در شرایط تنش خشکی هولو آنزیم روبیسکو 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 روبیسکو 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 فسکیویی 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 فتوسنتیک شامل سدو هپتولوز–۱و۷–بیس فسفات (SBP)، ترنس کتولاز (TK)، NADP –گلیسرآلدهید–۳–فسفات دهیدروژناز (NADP-

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]



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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

GAPDH) و ریبولوز-۱و۵-بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (روبیسکو) اکتیواز می‌باشد(Bayramov *et al*., 2010). با این حال اسپیرینگ (۲۰۰۰) اعلام کرد در تحقیقی به طرز شگفت انگیزی مقدار ریبولوز-۱و۵-بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (روبیسکو) 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 آرابیدوپسیس از روز ۳۲ بعد از کاشت (بعد از اینکه برگ‌ها کاملاً توسعه یافتند) میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو 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 میکوریزایی 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 آنتی اکسیدانی 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 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 روبیسکو است. افزایش کربوکسیلات ممکن است از افزایش فعالیت یا فراوانی روبیسکو حاصل شود (Piuter *et al*., 2015). همانطور که پیوتر و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که با توجه به مطالعات پروتئومیک و بیان ژن، بیان روبیسکو، 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 گلیسرآلدهید-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.

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

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., Avice, J. C. and Nogues, 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. Develpmental 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 botany58: 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., Jorrin, 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 Puplishing Groups 15:801–809

Moran, J. F., Becana, M., Iturbeormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Apariciotejo, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]

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) CO_2 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 CO_2. 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.29.24.6]