

اثر مصرف جیبرلین و اسید آبسزیک بر روند سنتز پروتئین‌ها در محور جنین بذر خواب و پس‌رس گندم نان (*Triticum aestivum* L. RL437)

محبوبه حاجی عباسی^۱، رضا توکل افشاری^{۲*} و هوشنگ علیزاده^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۷/۲۷)

چکیده

برای درک بهتر فرآیند شکست خواب در گندم نان (*Triticum aestivum* L.)، روند سنتز پروتئین‌ها در بذرهای خواب و پس‌رس و تأثیر تیمار هورمون‌های جیبرلین و اسیدآبسزیک در این مراحل بررسی شد. به این منظور از شش تیمار شامل بذر خواب، بذر خوابی که به مدت ۱۰ ساعت با جیبرلین تیمار شدند، بذرهایی که به مدت یک هفته، سه هفته، شش هفته پس‌رس شدند و بذرهایی که پس از شش هفته پس‌رسی به مدت ۱۰ ساعت با اسیدآبسزیک تیمار شدند، استفاده شد. جنین بذرهای تیمار شده استخراج شد و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی الگوی پروتئینی آنها مورد مقایسه قرار گرفت. حدود ۶۰۰ پروتئین روی ژل‌ها شناسایی شد که از آن میان در تیمارهای جیبرلین، یک هفته، سه هفته، شش هفته پس‌رس تیمار اسیدآبسزیک بر بذر پس‌رس به ترتیب ۱۲، ۴۰، ۱۸، ۱۵ و ۳۸ لکه افزایش بیان و ۴۰، ۳۲، ۱۰ و ۳۹ لکه کاهش بیان مشاهده گردید. ۱۵ لکه فقط در تیمار اسیدآبسزیک بر بذر پس‌رس مشاهده شد که در سایر تیمارها وجود نداشت. همچنین ۲۰ لکه فقط در تیمار خواب و ۲۳ لکه فقط در تیمار جیبرلین بیان شده بود. نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی با افزایش هفته‌های پس‌رسی روند افزایشی داشت. مصرف جیبرلین در بذر خواب مشابه بذرهای شش هفته پس‌رس سبب افزایش جوانه‌زنی شد. همچنین اثر جیبرلین بر روند سنتز پروتئین‌ها مشابه شش هفته پس‌رسی بود. اسیدآبسزیک سبب کاهش جوانه‌زنی در بذرهایی شد که شش هفته پس‌رسی را گذرانده بودند و نتایج درصد جوانه‌زنی این تیمار مشابه تیمار یک هفته پس‌رس بود. اثر مصرف اسیدآبسزیک بر افزایش و کاهش بیان پروتئین‌ها مشابه بذرهایی بود که یک هفته پس‌رسی را گذرانده بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که جیبرلین اثر مشابه با پس‌رسی را دارد و اسیدآبسزیک سبب افزایش خواب در بذر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خواب بذر، پس‌رسی، جیبرلین، اسیدآبسزیک، سنتز پروتئین

خواب بذر گیاهان شده است. افزایش سرعت جوانه‌زنی و کاهش خواب در مواردی می‌تواند تأثیر منفی هم داشته باشد. به عنوان مثال جوانه‌زنی قبل از برداشت گندم در

مقدمه

زراعی شدن گیاهان وحشی و فعالیت‌های اصلاح نباتات به منظور افزایش سرعت جوانه‌زنی سبب کاهش

پروتئین‌های Lemmi9 را در بذور افرای نروژی در طول شکست خواب و جوانه‌زنی کاهش داد. جیبرلین باعث افزایش بیان انولاز و کاهش بیان α -proteasome شد (Pawłowski et al., 2010). مقایسه پروتئین‌های بذره‌های خواب و پسرس آرابیدوپسیس تجمع متفاوت پروتئین‌ها را آشکار کرد و مشاهده شد که بیان پروتئین‌های LEA در بذور خواب، افزایش در حالی که در بذور پسرس کاهش می‌یابند. تیمار بذور پسرس با اسیدآبسیزیک به شدت از جوانه‌زنی جلوگیری کرد و منجر به کاهش ATPase و فرکتوکیناز شد (Gallardo et al., 2002). اثر منفی اسیدآبسیزیک بر پروتئین‌های دخیل در متابولیسم انرژی در آرابیدوپسیس در طول شکست خواب، مشابه بذور افرای نروژی بود. اسپاراتات آمینوترانسفراز، HSP، LEA، α -tubulin هم در بذور افرای نروژی و هم در آرابیدوپسیس خواب و جوانه‌زنی را کنترل می‌کنند. در بذور راش درحال جوانه‌زنی مشاهده شد که ATPase و فرکتوکیناز به طور قابل توجهی هم به وسیله اسیدآبسیزیک و هم به وسیله جیبرلین تعدیل می‌یابند (Pawłowski, 2007).

هدف این تحقیق بررسی روند سنتز پروتئین‌های دخیل در خواب و جوانه‌زنی می‌باشد تا بتوان از آن در شناخت بهتر فرآیند خواب، پسرسی و جوانه‌زنی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از بذور گندم نان *Triticum aestivum* رقم RL4137 که از دانشگاه ساسکاچوان کانادا در سال ۱۳۸۷ تهیه شده بود استفاده گردید. این رقم دارای سطوح بالای خواب در مرحله رشدی زادکس ۹۲ می‌باشد. پس از انجام آزمون جوانه‌زنی و تترازالیوم و اطمینان از وجود خواب در بذرها ۶ تیمار اعمال شد. تیمار اول شامل بذور خواب بدون دوره پسرسی (D)، تیمار دوم بذور خوابی که به مدت ۱۰ ساعت در جیبرلین با غلظت ۲۵۰ میکرومولار تیمار شده بود (D+GA)، تیمار سوم شامل بذرها با یک هفته دوره پسرسی (W₁)، تیمار چهارم بذرها با سه هفته دوره پسرسی (W₃)، تیمار پنجم بذرها با شش هفته دوره پسرسی

مرحله پس از رسیدگی و قبل از برداشت محصول، هنگامی که بذور بر روی گیاه مادری قرار دارد و در صورتی که رطوبت و دما بالا باشد سبب کاهش عملکرد و کیفیت بذور می‌گردد. هر چند که موقعیت بذور روی خوشه، ضخامت پوسته، وجود ریشک و به طور کلی وضعیت مرفولوژیک بذور بر روی گیاه در جوانه‌زنی قبل از برداشت می‌تواند تأثیر داشته باشد، اما عامل اصلی جوانه‌زنی قبل از برداشت به کاهش خواب نسبت داده شده است (Benech-Arnold et al., 2004). تعدادی از گونه‌ها بعد از بلوغ و رسیدگی برای این که خواب آنها شکسته شود نیاز دارند که مدت زمانی را در معرض خشکی و دمای بالا قرار بگیرند. به این دوره زمانی متغییر پسرسی^۱ گفته می‌شود (Bradford et al., 2007). در شرایط طبیعی پسرسی ممکن است در گونه‌های یکساله درختی به وسیله دمای بالا در تابستان به منظور جوانه‌زنی در پاییز انجام شود. سرعت پسرسی با افزایش دما افزایش می‌یابد. از دیدگاه اکولوژیکی نیاز به پسرسی در طول دوره گرم تابستان یعنی زمانی که بارندگی کافی برای استقرار وجود ندارد جهت جلوگیری از جوانه‌زنی بذور در این دوره مطلوب می‌باشد. (Fenner & Thompson, 2005).

هورمون‌های آبسسیزیک اسید (ABA) و جیبرلین (GA) در تنظیم خواب و جوانه‌زنی دخالت دارند. شرایط محیطی که طول دوره پسرسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد بسته به گونه گیاهی متغیر است. از آن جایی که هر تغییری در طول نمو از طریق بیان ژن‌ها صورت می‌گیرد، ارزیابی محصولات بیان ژن‌ها مانند پروتئین‌ها در بررسی خواب و جوانه‌زنی بذور اهمیت دارد (Bewley, 1997). ارزیابی الگوی پروتئینی جنین‌های خواب و غیرخواب یولاف وحشی نشان داد که سطح بیان پروتئین‌های خاص بین جنین‌های بذور خواب و غیرخواب در طی مراحل اولیه جذب آب متفاوت بود و اکثر پروتئین‌های سنتز شده یکسان بودند (Li & Foley, 1994). در الگوی پروتئینی محورهای جنینی بذور شاه‌بلوط هندی در طول دوره استراتیفیکاسیون تغییر معنی‌داری وجود نداشت. اسیدآبسیزیک میزان بیان

1. After-ripening

حداقل باید ۲ بار انجام گیرد. در نهایت پودر پروتئینی با استفاده از دستگاه لیوفیلاز خشک گردید.

انتقال پروتئین‌ها از فاز جامد به مایع

برای انتقال پروتئین‌ها از فاز جامد به مایع به ۲۰ میلی‌گرم از نمونه پودری ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزیز اضافه شد. بافر لیزیز شامل اوره ۹ مولار، ۴ درصد چپس، ۱ درصد دی تیوتریتول، ۲ درصد آمفولیت با پی اچ ۳ تا ۱۰، تریس ۳۵ میلی مولار است. سپس نمونه‌ها در ترمو میکسر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند و در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حاوی عصاره پروتئینی است که برای اندازه‌گیری میزان غلظت آن از روش Bradford (1976) استفاده شد.

الکتروفورز دو بعدی

بعد اول

برای انجام بعد اول پروتئین‌ها در استوک بازجذب^۱ حل شدند. این محلول شامل اوره ۸ مولار، ۲ درصد چپس، ۰/۰۰۲ درصد بروموفنول بلو، ۷ میلی‌گرم دی تیوتریتول برای هر ۲/۵ میلی‌لیتر محلول استوک بازجذب و ۵۰۰ میکرولیتر بافر IPG برای غلظت ۰/۵ درصد است. دی تیوتریتول و بافر IPG درست قبل از استفاده به محلول آبیگری اضافه شدند. در این آزمایش از نوارهای IPG هفده سانتی‌متری با پی اچ ۴ تا ۷ استفاده شد. این مرحله پس از ۱۴ ساعت تکمیل شد. سپس الکتروفورز بعد اول انجام گرفت. برای انجام بعد اول از دستگاه مولتی‌فور شرکت Amersham Bioscience استفاده شد. دمای خنک‌کننده دستگاه روی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و با ۴۲ کیلو ولت ساعت انجام گرفت.

بعد دوم

نوار ژل بعد اول در ۷ میلی‌لیتر محلول متعادل‌سازی (۵۰ میلی مولار Tris-HCl با اسیدیته ۸/۸، اوره ۶ مولار، ۳۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد سدیم دودسیل سولفات، ۰/۰۰۲ درصد بروموفنول بلو) به مدت ۱۵ دقیقه شناور گردید. سپس الکتروفورز بعد دوم انجام شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت

(W₆)، تیمار ششم بذرها با شش هفته دوره پس‌رسی که به مدت ۱۰ ساعت در محلول اسید آبسزیک با غلظت ۲۵۰ میکرومولار تیمار شده بودند (W₆+ABA). لازم به ذکر است اعمال پس‌رسی با قرار دادن بذرها در انکوباتر (شرکت ایران خودروساز مدل IKH RH) با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت ذکر شده در هر تیمار صورت گرفته است. همزمان با اعمال تیمارها آزمون جوانه‌زنی استاندارد انجام گرفت و جنین بذرها نیز استخراج گردید.

آزمون جوانه‌زنی

آزمون جوانه‌زنی استاندارد در ظروف پتری ۹ سانتی‌متری با ۲ لایه کاغذ صافی در انکوباتر با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد در ۴ تکرار ۲۵ بذری در محیط تاریک انجام گرفت. بذرها طبق قوانین انجمن بین‌المللی آزمون بذر پس از ۸ روز شمارش شدند و درصد جوانه‌زنی تعیین شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از بافت جنین بذر بر اساس روش Damerval et al. (1986) با اندکی تغییرات در ۳ تکرار انجام گرفت. ابتدا مقدار ۱ گرم از بافت جنین در هاون با استفاده از ازت مایع به خوبی ساییده شد. سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از بافر استخراج که حاوی ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۰/۰۷ درصد دی تیوتریتول (DTT) در استون بود به بذرها ساییده شده اضافه گردید. مخلوط بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت تا پروتئین به طور کامل رسوب کند. نمونه‌ها به سانتریفیوژ منتقل شدند و به مدت ۱۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۹۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و به رسوب حاوی پروتئین ۱۰ میلی‌لیتر بافر شست و شو که حاوی ۰/۰۷ درصد دی تیوتریتول در استون بود اضافه گردید و رسوب در محلول شکسته شد و به سوسپانسیون تبدیل شد. در طول این مدت نمونه‌ها بر روی یخ قرار داشتند. نمونه‌ها سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا پروتئین‌ها رسوب کنند. مجدداً نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ دقیقه در دور ۹۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مرحله شست و شو

و پس از شش هفته پس‌رسی تقریباً خواب شکسته شد و جوانه‌زنی به ۹۶ درصد رسید. همچنین خواب بذرهای که هفته‌های پس‌رسی را طی نکرده بودند با استفاده از جیبرلین با غلظت ۲۵۰ میکرومولار به طور کامل شکسته شد و جوانه‌زنی به ۱۰۰ درصد رسید. بذرهای که شش هفته پس‌رسی طبیعی را طی کرده بودند در اثر استفاده از اسیدآبسیزیک با غلظت ۲۵۰ میکرومولار جوانه‌زنی آنها کاهش پیدا کرد و نتایجی مشابه تیمار یک هفته پس‌رس را نشان دادند.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ژل‌ها

پس از شناسایی لکه‌ها توسط نرم افزار حدود ۶۰۰ لکه به طور تکرارپذیر در تمام تیمارها باهم جفت شدند. آزمون آماری تی استیودنت در سطح ۵ درصد نشان داد که ۱۲ لکه در تیمار جیبرلین نسبت خواب افزایش بیان و ۱۳ لکه نیز کاهش بیان داشتند. در تیمار یک هفته پس‌رس ۴۰ لکه در سطح آماری ۵ درصد نسبت به تیمار خواب کاهش و ۴۰ لکه نیز افزایش بیان داشتند. در تیمار سه هفته پس‌رس ۳۲ لکه در سطح آماری ۵ درصد نسبت به تیمار خواب کاهش بیان و ۱۸ لکه افزایش بیان داشتند. در تیمار شش هفته پس‌رس ۱۵ لکه در سطح آماری ۵ درصد افزایش بیان و ۱۰ لکه کاهش بیان نشان دادند. در بذرهای شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک در مقایسه با تیمار خواب ۳۹ لکه در سطح ۵ درصد کاهش بیان و ۳۸ لکه افزایش بیان را داشتند. همچنین در این تیمار ۱۵ لکه مشاهده شد که در سایر تیمارها وجود نداشت. ۲۰ لکه فقط در تیمار خواب بیان شده بود و ۲۳ لکه فقط در تیمار جیبرلین بر بذرهای خواب بیان شده بود. روند سنتز پروتئین‌ها در بذرهای شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک با تیمار یک هفته پس‌رس مطابقت داشت و روند سنتز پروتئین‌ها در بذرهای خواب تیمار شده با جیبرلین با بذرهای تیمار شش هفته پس‌رس مطابقت داشت.

افزایش و کاهش بیان لکه‌ها در شکل ۳ آورده شده است. همان طور که در شکل ۳ دیده می‌شود از تیمار یک هفته پس‌رس تا شش هفته پس‌رس بیان لکه‌ها یک روند نزولی را داشته است. با مقایسه تیمار شش هفته پس و بذرهای شش هفته پس‌رس تیمار شده با

بیورد استفاده شد. ضخامت ژل بعد دوم با توجه به نوع کار ۱/۵ میلی‌متر انتخاب شد و درصد ژل نیز ۱۱ بود. بعد از ران شدن ژل رنگ‌آمیزی طبق پروتکل (Blum et al., 1987) انجام گرفت.

اکتساب تصاویر

بعد از انجام رنگ‌آمیزی، ژل‌ها را با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیورد به فرمت خام ژل‌های دوبعدی (Raw 2d) ذخیره شدند و به وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت TIEF تبدیل شدند.

تجزیه و تحلیل ژل‌ها با نرم‌افزار

برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارها از نرم‌افزار Melanie 7 (GeneBio, Geneva, Switzerland) استفاده شد به این ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در ژل‌های تیمارهای مختلف را علامت زده شد و پس از استخراج مقدار کمی درصد حجمی لکه‌ها مورد آنالیز آماری تی استیودنت قرار گرفتند. لکه‌هایی که مقادیر کمی بیان آنها در سطح آمار ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند به عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

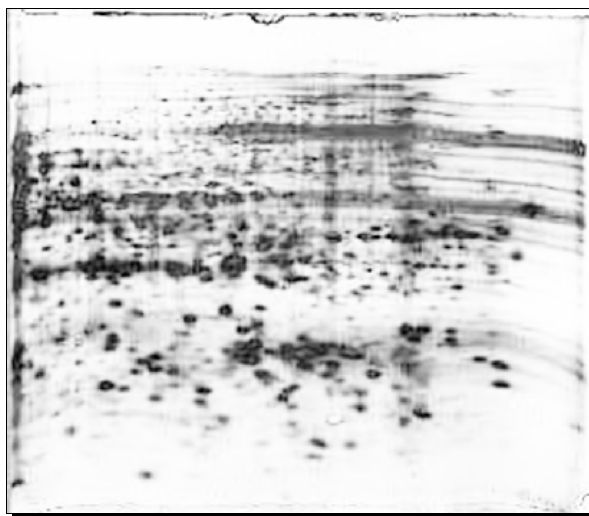
نتایج

نتایج آزمون جوانه‌زنی

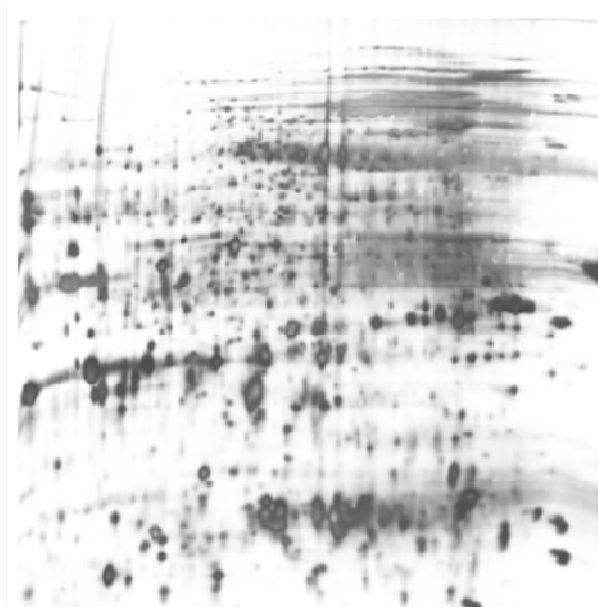
جدول ۱- درصد جوانه‌زنی تیمارهای بذر خواب و پس‌رس گندم نان و اثر جیبرلین و آبسیزیک اسید بر درصد جوانه‌زنی آنها

تیمارها	جوانه‌زنی (درصد)
بذر خواب (D)	۳
یک هفته پس‌رس (W ₁)	۱۴
سه هفته پس‌رس (W ₃)	۳۲
شش هفته پس‌رس (W ₆)	۹۶
بذر خواب تیمار شده با جیبرلین (D+GA)	۱۰۰
شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک (W ₆ +ABA)	۱۲

نتایج حاصل از جوانه‌زنی تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بذر خواب جوانه‌زنی ناچیزی داشت (۳ درصد). با افزایش هفته‌های پس‌رسی جوانه‌زنی افزایش یافت به طوری بذرهای یک هفته و سه هفته پس‌رس به ترتیب ۱۴ و ۳۲ درصد جوانه‌زنی را داشته‌اند



شکل ۱- تصویر بعد دوم ژل تیمار خواب از پروتئوم محور جنینی بذر گندم نان



شکل ۲- تصویر بعد دوم ژل تیمار شش هفته پس‌رس از پروتئوم محور جنینی بذر گندم نان

پس‌رس (۹۶ درصد) مشابه میزان جوانه‌زنی بذرهای خواب تیمار شده با جیبرلین (۱۰۰ درصد) می‌باشد (جدول ۱). می‌توان گفت که احتمالاً جیبرلین اثر مشابه با شش هفته پس‌رسی را داشته است.

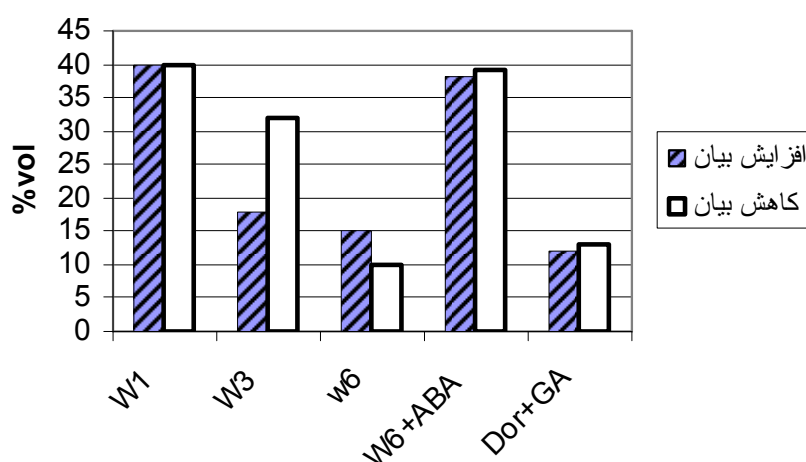
در جدول‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ میانگین درصد‌های حجمی، میزان فاکتور القا (IF)^۱، تی استیودنت، پی اچ ایزوالکتریک و وزن مولکولی برحسب کیلودالتن برخی از لکه‌ها در تیمارهای مختلف آورده شده است. فاکتور القا

اسیدآبسیزیک مشاهده می‌شود که افزودن اسیدآبسیزیک سبب شده که بیان لکه‌ها مشابه تیمار یک هفته پس‌رس شود (شکل ۳). همچنین میزان جوانه‌زنی تیمار یک هفته پس‌رس (۱۴ درصد) مشابه بذرهای شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک (۱۲ درصد) می‌باشد (جدول ۱). ۱۴ درصد جوانه‌زنی تیمار یک هفته پس‌رس بیانگر این است که مدت زمان یک هفته پس‌رسی برای شکست خواب کافی نبوده است. تغییر در بیان لکه‌های تیمار شش هفته پس‌رس و بذرهای خواب تیمار شده با جیبرلین مشابه می‌باشند (شکل ۳). همچنین میزان جوانه‌زنی تیمار شش هفته

1. Induction factor

می‌دهد این لکه در تیمار جیبرلین نسبت به تیمار خواب به میزان ۱/۳۶ برابر افزایش بیان داشته است. تی‌استیوندت که در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده، نشان می‌دهد که بیان لکه فوق در دو تیمار خواب و بذر خواب تیمار شده با جیبرلین بایکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار هستند. پی اچ ایزوالکتریک و وزن مولکولی در میان لکه‌ها از تنوع بالایی برخوردار بود. قابل ذکر است که به علت حجم بالای کار فقط مشخصات برخی نقاط آورده شده است.

عبارت است از میانگین درصد حجمی هر لکه در تکرارهای مختلف یک تیمار نسبت به میانگین درصد حجمی همان لکه در تکرارهای مختلف تیمار شاهد. برای محاسبه فاکتور القا تیمار بذر خواب به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به عنوان مثال در جدول ۲ در ردیف ۲ میانگین درصد حجمی لکه شماره ۲۴ در بذرهای تیمار شده با جیبرلین در سه تکرار ۰/۱۵ بوده و میانگین درصد حجمی همان لکه در سه تکرار در تیمار خواب ۰/۱۱ بوده است و فاکتور القا ۱/۳۶ بوده است که نشان



شکل ۳- مقایسه افزایش و کاهش بیان لکه‌های پروتئینی محور جنین بذر گندم نان نسبت به تیمار بذر خواب. W₁: تیمار یک هفته پس‌رس، W₃: تیمار سه هفته پس‌رس، W₆: تیمار شش هفته پس‌رس، W₆+ABA: بذرهای شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک. Dor+GA: بذرهای خوابی که با جیبرلین تیمار شده اند. افزایش و کاهش بیان لکه‌ها نسبت به بذر خواب سنجیده شده است. از تیمار W₁ تا W₆ افزایش و کاهش بیان لکه‌ها یک روند نزولی را داشته در حالی تیمار W₆+ABA اثر مشابه با تیمار W₁ را داشته و تیمار Dor + GA اثر مشابه با تیمار W₆ را داشته است.

جدول ۲- درصد حجمی لکه‌ها در تیمار GA و Dor، فاکتور القا، تی‌استیوندت، pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها بر حسب کیلوالتون. GA: بذرهای خواب تیمار شده با جیبرلین. Dor: تیمار خواب

ردیف	شماره نقاط	درصد حجمی لکه‌ها		فاکتور القا	تی‌استیوندت	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (KDa)
		در تیمار GA	در تیمار Dor				
۱	۳	۰/۱۰	۰/۲۹	۰/۳۴	۱۳/۳۳**	۴/۹۹	۶۶
۲	۲۴	۰/۱۵	۰/۱۱	۱/۳۶	۷/۴۱**	۵/۷۲	۶۵
۳	۵۴	۰/۳۱	۰/۲۵	۱/۲۴	۴/۰۱**	۵/۰۳	۶۵
۴	۶	۰/۴۵	۱/۰۱	۰/۴۴	۱۴/۳۷**	۵/۴۲	۷۰
۵	۸	۰/۱۵	۰/۲۲	۰/۶۸	۶/۱۶**	۵/۵۱	۷۱
۶	۹	۰/۰۹	۰/۴۶	۰/۲	۱۶/۸۵**	۵/۵۷	۷۰
۷	۱۰	۰/۰۷	۰/۵۸	۰/۱۲	۸/۷۳**	۵/۱۴	۵۹
۸	۱۱	۰/۱۱	۰/۲۲	۰/۵	۱۰/۲۸**	۴/۹۴	۷۴
۹	۱۳	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۷۸	۴/۶۴**	۵/۳۹	۷۷

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

جدول ۳- در صد حجمی لکه‌ها در تیمار W_1 و Dor، فاکتور القا، تی استیودنت، pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها بر حسب کیلودالتون. W_1 : تیمار یک هفته پس‌رس. Dor: تیمار خواب

ردیف	شماره نقاط	درصد حجمی لکه‌ها در W_1 تیمار	درصد حجمی لکه‌ها در Dor تیمار	فاکتور القا	تی استیودنت	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (KDa)
۱	۱	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۳۳	۱۳/۰۲**	۵/۶۸	۱۰۳
۲	۱۴۱	۰/۳۲	۰/۲۲	۱/۴۵	۸/۴۵**	۴/۳۹	۸۷
۳	۸	۰/۱۵	۰/۲۱	۰/۷۱	۶/۳۸**	۴/۴۹	۸۷
۴	۴۹	۰/۰۵	۰/۲۲	۰/۲۲	۱۶/۲۴**	۵	۷۳
۵	۱۹	۰/۱۵	۰/۳۶	۰/۴۲	۱۱/۸۵**	۵/۳۹	۷۷
۶	۲۱	۰/۱۱	۰/۰۹	۱/۲۲	۳/۷۸**	۴/۹۴	۷۴
۷	۲۳	۰/۲۲	۰/۱۵	۱/۴۷	۹/۳۸**	۵	۷۳
۸	۲۶	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۷۵	۴/۹۴**	۵/۳۹	۷۶
۹	۳۰	۰/۰۶	۰/۲۷	۰/۲۲	۱۶/۴۹**	۵/۴۴	۷۷

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

جدول ۴- در صد حجمی لکه‌ها در تیمار W_3 و Dor، فاکتور القا، تی استیودنت، pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها بر حسب کیلودالتون. W_3 : تیمار سه هفته پس‌رس. Dor: تیمار خواب

ردیف	شماره نقاط	درصد حجمی لکه‌ها در W_3 تیمار	درصد حجمی لکه‌ها در Dor تیمار	فاکتور القا	تی استیودنت	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (KDa)
۱	۹۹	۰/۵۶	۱/۴۷	۰/۳۸	۱۴/۵۷**	۶/۲۹	۱۷
۲	۱۹	۰/۰۹	۰/۱۵	۰/۶	۷/۵۷**	۵/۸۲	۱۸
۳	۱۲	۰/۰۳	۰/۰۸	۰/۳۸	۱۳/۱۶**	۶/۱۳	۱۸
۴	۱۱۳	۰/۱۳	۰/۰۹	۱/۴۴	۶/۱۶**	۶/۸	۲۰
۵	۱۵	۰/۰۹	۰/۱۷	۰/۵۳	۹/۷۸**	۵/۰۱	۲۱
۶	۱۶	۰/۰۳	۰/۲۸	۰/۱۱	۱۸/۵۰**	۶/۲۹	۲۷
۷	۳۹	۰/۱۲	۰/۳۶	۰/۳۳	۱۳/۹۷**	۵/۲۶	۲۶
۸	۲۰	۰/۱۵	۰/۲۷	۰/۵۶	۸/۹۹**	۵/۲۹	۳۹
۹	۲۸	۰/۴۵	۱/۰۲	۰/۴۴	۱۵/۲۷**	۵/۳۶	۵۵

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

جدول ۵- در صد حجمی لکه‌ها در تیمار W_6 و Dor، فاکتور القا، تی استیودنت، pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها بر حسب کیلودالتون. W_6 : تیمار شش هفته پس‌رس. Dor: تیمار خواب

ردیف	شماره نقاط	درصد حجمی لکه‌ها در W_6 تیمار	درصد حجمی لکه‌ها در Dor تیمار	فاکتور القا	تی استیودنت	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (KDa)
۱	۶۴	۰/۴۴	۱/۰۱	۰/۴۳	۱۴/۳۷**	۴/۴۹	۸۷
۲	۱۴	۰/۰۲	۰/۱۰	۰/۲	۲۰/۹۶**	۵	۲۳
۳	۱۵	۰/۰۹	۰/۱۷	۰/۵۳	۸/۵۳**	۵/۱۲	۶۵
۴	۱۹	۰/۲۷	۰/۳۹	۰/۷۰	۱۳/۸۰**	۵/۳۶	۵۵
۵	۸۲	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۱۸	۲۰/۹۶**	۴/۵۸	۲۸
۶	۶۲	۰/۱۹	۰/۱۳	۱/۰۵	۸/۴۶**	۶/۲۹	۲۷
۷	۲۵	۰/۲۱	۰/۱۵	۱/۴	۶/۲۵**	۵/۰۱	۷۳
۸	۳۵	۰/۰۹	۰/۲۲	۰/۴۱	۱۲/۴۰**	۶/۱۳	۱۸
۹	۴۰	۰/۰۸	۰/۰۶	۱/۳۳	۶/۱۳**	۵/۴۷	۲۳

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

جدول ۶- در صد حجمی لکه‌ها در تیمار ABA و Dor، فاکتور القا، تی استیودنت، pH ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها بر حسب کیلودالتون. ABA: بذره‌های شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک. Dor: تیمار خواب

ردیف	شماره نقاط	درصد حجمی لکه‌ها در تیمار ABA	درصد حجمی لکه‌ها در تیمار Dor	فاکتور القا	تی استیودنت	pH ایزوالکتریک	وزن مولکولی (KDa)
۱	۳۶	۰/۰۳	۰/۲۹	۰/۱۰	۷/۱۶**	۵/۳۶	۵۵
۲	۱۳۹	۰/۲	۰/۱۵	۱/۳۳	۶/۵۲**	۵/۶۶	۵۴
۳	۵۱۱	۰/۰۱	۰/۲۲	۰/۰۵	۱۸/۴۰**	۵/۴۴	۷۷
۴	۱۱۵	۰/۰۲	۰/۱۷	۰/۱۲	۸/۵۳**	۴/۹۴	۸۷
۶	۱۰۱	۰/۰۳	۰/۳۶	۰/۰۸	۱۳/۸۰**	۵/۳۸	۲۶
۷	۲۰۱	۰/۱۱	۰/۰۹	۱/۲۲	۳/۷۸**	۶/۲۹	۲۷
۸	۱۲۳	۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۲۱	۶/۵۰**	۶/۴	۵۱
۹	۱۲۷	۰/۰۱	۰/۱۴	۰/۰۷	۱۲/۶۹**	۶/۰۹	۳۹

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

بحث

شده گندم نان همراه با افزایش سرعت جوانه‌زنی بیان پروتئین‌های ATPase و HSP70 افزایش یافت (Abbas et al., 2011). مشخص شد که الگوی پپتیدی کل محورهای جنینی بذر (*Aesculus hyppocastanum*) در طول خواب و شکست خواب تغییر پیدا نمی‌کنند (Pawłowski, 2010). در طول خواب و شکست خواب در بذر شاه بلوط هندی هیچ تغییری در الگوی پپتیدی پروتئین کل مشاهده نشد. تغییرات اساسی پروتئین در طول خروج ریشه‌چه و مخصوصاً در طول رشد محور اولیه قابل مشاهده است (Gumilevskaya et al., 2001). نتایج بدست آمده از محورهای جنینی بذر سیب در طول شکست خواب بیان می‌کند که الگوی پپتیدی پروتئین کل به طور قابل توجهی متفاوت می‌باشد (Eichholtz et al., 1983). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد که روند سنتز پروتئین‌ها در طول پس‌رسی و شکست خواب به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت می‌باشد. Pawłowski (2009) با استفاده از روش پروتئومیکس مکانیزم شکست خواب را در بذر افرای نروژی به وسیله استراتیغیکاسیون و مشارکت اسیدآبسیزیک و جیبرلین مورد بررسی قرار داد و اکثر تغییرات معنی‌دار مشاهده شده در پروتئین‌ها مربوط به پروتئین‌ها مرتبط با متابولیسم انرژی بودند. آنالیز جوانه‌زنی بذر افرای نروژی بعد از استراتیغیکاسیون در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد مشخص کرد که استفاده از اسیدآبسیزیک (با غلظت ۵۰ میکرومولار) یک اثر منفی بر درصد جوانه‌زنی دارد. بعد از ۱۰ هفته استریغیکاسیون در حضور آب جوانه‌زنی به

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش هفته‌های پس‌رسی سطوح خواب کاهش یافت به طوری که پس از شش هفته پس‌رسی جوانه‌زنی به ۹۶ درصد رسید. جیبرلین نیز اثر مشابه هفته‌های پس‌رسی را داشت. استفاده جیبرلین در بذر خواب سبب شکست خواب گردید. استفاده از اسیدآبسیزیک در بذرهایی که شش هفته پس‌رسی را طی کرده‌اند موجب کاهش جوانه‌زنی شد و مشابه جوانه‌زنی بذرهایی که یک هفته پس‌رسی را طی کرده بودند، گردید. روند سنتز پروتئین‌ها با اعمال هورمون‌ها و همچنین هفته‌های پس‌رسی تغییر کرد و تغییر بیان پروتئین‌ها در بذره‌های خواب تیمار شده با جیبرلین با بذره‌های شش هفته پس‌رس مطابقت داشت و بیان پروتئین‌ها در بذره‌های شش هفته پس‌رس تیمار شده با اسیدآبسیزیک با بیان تیمار یک هفته پس‌رس مطابقت کرد.

در بررسی جنین‌های خواب و غیرخواب در ارقام گندم نان توسط الکتروفورز یک بعدی تفاوت‌هایی در الگوی باندهای پروتئینی در ساعات اولیه جذب آب مشاهده شد و شدت بیان آلفاآمیلاز در میان ارقام بدون خواب بیشتر بود (Etezadi et al., 2004). به وسیله الکتروفورز دوبعدی مشاهده شد که اکثر پروتئین‌های جدا شده طی شکست خواب بذر گندم نان در رقم RL4137 مشابه اند و تعداد کمی از پروتئین‌ها وجود دارند که در طی دوران پس‌رسی ظهور، افزایش یا کاهش می‌یابند (Alidosti et al., 2005). در بذر پرایم

پروتئین‌ها مشابه اثر پسرسی است و اثری که جیبرلین بر جوانه‌زنی در بذر گندم نان دارد، مشابه بذرهایی است پسرسی را کامل (شش هفته) طی کرده‌اند در واقع جیبرلین و پسرسی هر دو سبب افزایش جوانه‌زنی می‌شوند. همچنین چنانچه مشاهده شد اسیدآبسیزیک سبب افزایش خواب می‌شود. وقتی بذرهایی که پسرسی را کامل طی کرده‌اند (شش هفته) و قادر به جوانه‌زنی به میزان بالایی (۹۶ درصد) هستند با اسیدآبسیزیک تیمار شدند، خواب در آنها افزایش یافت و جوانه‌زنی در آنها کاهش پیدا کرد و مشابه بذرهایی شد که پسرسی را کامل طی نکرده بودند (یک هفته) همچنین اثری اسیدآبسیزیک بر روند سنتز پروتئین‌ها داشت مشابه بذرهایی بود که پسرسی را کامل طی نکرده بودند (یک هفته) و جوانه‌زنی پایینی داشتند.

۴۶ درصد رسید. در حالی که بعد از ۱۰ هفته استرئیفیکاسیون در حضور اسیدآبسیزیک جوانه‌زنی به ۲۹ درصد کاهش یافت. ماکزیمم جوانه‌زنی در حضور اسیدآبسیزیک در ۱۵ هفته ۷۱ درصد (۷۶ درصد برای آب) بدست آمد. استفاده از جیبرلین (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) شکست خواب را سرعت بخشید و جوانه‌زنی را به ۸۲ درصد (برای ۱۵ هفته) افزایش داد. بیشترین تغییرات در فراوانی پروتئین‌ها در بذر افرای نروژی در انتهای دوره استرئاتفیکاسیون و در بذرهایی جوانه زده مشاهده شد. فعال ترین دوره شکست خواب بذر وقتی است که بذر از مرحله خواب به جوانه‌زنی می‌رود (Pawlowski, 2009). نتایج پاولوسکی با نتایج تأثیر هورمون‌ها در تحقیق حاضر مطابقت می‌کند. نتایج حاضر نشان می‌دهد که اثر جیبرلین بر کاهش و افزایش بیان

REFERENCES

1. Abbasbadi, M., Tavakkol Afshari, R., Chamankhah, M. & Alizadeh, H. (2011). Proteomic comparison of primed and unprimed wheat (*Triticum aestivum* L.) seed embryo during germination. *Journal of Iranian Field Crop Science*, 42, 91-103. (In Farsi)
2. Alidosti, L. (2005). *Proteome contrast of dormant and after-ripened seed embryo of bread wheat (Triticum aestivum)*. Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology. University of Tehran. 112 pp.
3. Bradford, K. & Nongaki, H. (2007). Seed development, dormancy and germination. *Annual Plant Reviews*, 27, 76-78.
4. Bewley, J. (1997). Seed germination. *J the Plant Cell*, 9, 1055-1056.
5. Benech-Arnold, R. L. & Sanchez, R. A. (2004). *Handbook of seed physiology applications to agriculture*. Food Products Press. 199-214.
6. Eichholtz, D. A., Robintaille, H. A. & Herrmann, K. M. (1983). Protein changes during the stratification of *Malus domestica* Seed. *Plant Physiology*, 72, 750-753.
7. Etezadi Jam, J., Tavakkol Afshari, R., Yazdi Samadi, B. & Shah Nejat Bousheri, A. (2004). Study of seed dormancy, length of after-ripening time and protein synthesis pattern in dormant and non-dormant seed embryo of bread wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Iranian Agricultural Science*, 36, 859-860. (In Farsi)
8. Fenner, M. & Thompson, K. (2005). *The ecology of seed*. Cambridge University Press. 97-104.
9. Gallardo, K., Job, C., Groot, S., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. & Job, D. (2002). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology*, 129, 823-837.
10. Gumilevskaya, N., Azarkovich, M., Komarova, M. & Obroucheva, N. (2001). Proteins of axial organs of dormant and germinating horse chestnut seeds: I. General characterization. *Plant Physiology*, 48, 1-11.
11. Pawłowski, T. (2007). Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: Influence of abscisic and gibberellic acids. *Proteomics*, 7, 2246-2257.
12. Pawłowski, T. (2009). Proteome analysis of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancy breaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. *Plant Biology*, 48, 1-13.
13. Pawłowski, T. (2010). Proteomics approach to analyze dormancy breaking of tree seeds. *Plant Molecular Biology*, 73, 15-25.
14. Li, B. & Foley, M. E. (1994). Differential polypeptide patterns in imbibed dormant and after-ripening *Avena fatua* embryos. *Journal of Experimental Botany*, 45, 275-279.