

## اثر تنش خشکی بر گیاهان تنباکوی تراریخت (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin) حاوی ژن P5CS در شرایط کشت در شیشه

۱- سمیه زارعی، کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

۲- علی اکبر احسانپور، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

ehsanpou@sci.ui.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۰۴

### چکیده

از آنجا که پرولین به عنوان یک اسمولیت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول‌های تحت تنش خشکی نقش اساسی دارد، در این پژوهش، اثر تنش خشکی بر گیاهان تراریخت حاوی ژن P5CS و غیرتراریخت تنباکو مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در محیط کشت MS پایه حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول به مدت ۲۸ روز کشت شد. به منظور تعیین گیاهان مقاوم و حساس به خشکی و مکانیسم‌های تحمل به خشکی، شاخص‌هایی از قبیل وزن تر و خشک، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید)، قندهای محلول و پروتئین محلول اندازه‌گیری شد. در آخر الگوی پروتئینی در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت بررسی شد. نتایج نشان داد که کاهش مولفه‌های فیزیولوژیکی وزن تر و خشک و نیز رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تراریخت کمتر از گیاهان غیرتراریخت بوده و تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفته است. میزان قندهای محلول نیز در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان داد. تجزیه و تحلیل حاصل از داده‌های پروتئینی نیز نشان داد که در گیاهان غیرتراریخت در غلظت ۳۰ درصد کاهش پروتئین محلول وجود داشته، در حالی که در گیاهان تراریخت پروتئین بدون تغییر و ثابت بود. نتایج SDS-PAGE برای بررسی تغییرات پروتئین‌های تحت تنش خشکی در برگ گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نشان‌دهنده تغییرات الگوی پروتئین‌های گیاهان شاهد با گیاهان تحت تنش بود. همچنین تفاوت آشکاری در برخی باندها به عنوان مثال در محدوده ۳۵ و ۴۵ کیلو دالتون بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت مشاهده شد.

واژگان کلیدی: تنش خشکی؛ تنباکو؛ P5CS؛ کربوهیدرات محلول؛ پروتئین؛ SDS-PAGE.

### مقدمه

گیاهان در طبیعت در معرض تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی قرار می‌گیرند. امروزه تنش خشکی از جدی‌ترین مشکلات در کشاورزی در سراسر دنیا است. تنش خشکی منجر به اختلال گرادیان‌های پتانسیل آب، کاهش فشار تورژسانس، اختلال در یکپارچگی غشا و تجزیه پروتئین‌ها می‌شود [۱۰]. انباشت اسمولیت‌ها در سیتوزول، امکان تعدیل فشار اسمزی را در سلول فراهم می‌آورد و نیز باعث پایداری آنزیم‌ها در حضور یون‌ها، تنش آبی و ترکیبات شیمیایی تجزیه‌کننده می‌شود [۵۳]. پرولین مهم‌ترین اسمولیت و یک چپرون شیمیایی است. چپرون‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی کوچکی هستند که به عنوان محافظان مولکولی عمل می‌کنند و باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل

طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌کنند [۴۸]. چندین مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی به پرولین نسبت داده و نقش جاروب‌کنندگی و عمل کردن آن به عنوان یک خاموش‌کننده اکسیژن یکتایی را پیشنهاد می‌کند [۳۷]. تیمار پرولین می‌تواند سطوح گونه‌های واکنشگر اکسیژن<sup>۱</sup> را در مخمر و قارچ کاهش دهد و بنابراین از مرگ سلولی ممانعت کند [۱۴]. سطوح رادیکال آزاد در جلبک و تنباکوی تراریخت مهندسی‌شده با بیان افزوده ژن ۱- پیروولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز<sup>۲</sup> برای تجمع بالا و افزایش سرعت مسیر بیوسنتز پرولین، کاهش یافت [۵۷]. یکی از ویژگی‌های مطلوب برای ارزیابی تأثیر تنش خشکی در

1- Reactive Oxygen Species (ROS)

2- 1-pyrroline 5-Carboxylate Synthetase (P5CS)

از آن جاکه پرولین نیز یکی از اسمولیت‌های مهم در افزایش تحمل گیاه به تنش است، دست‌ورزی ژنتیکی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آن به ویژه آنزیم ۱-پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز در گیاهان می‌تواند موجب افزایش تحمل به تنش شود. در این پژوهش نیز با توجه به نقش و تاثیر مهم پرولین در تعدیل اسموتیکی انتظار می‌رود که گیاهان تراریخت حاوی ژن P5CS دارای تحمل بالاتری به خشکی نسبت به گیاهان نوع وحشی باشند.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش، گیاهان تراریخت تنباکو وارپته Wisconsin حاوی ژن P5CS، ژن کدکننده آنزیم پرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز، هستند. گیاهان مادری از کشت بذر وارپته مورد نظر تهیه گردید. آنزیم P5CS، مهم‌ترین آنزیم در مسیر بیوسنتز پرولین است. ژن P5CS به همراه ژن NPTII<sup>۱</sup> تحت پروموتور ۳۵S توسط پلاسמיד باکتری آگروباکتریوم *A. tumefaciens* در یک پژوهش جدا به گیاه تنباکو منتقل گردید [۵۰]. NPTII سبب مقاومت به کانامایسین شده به طوری که گیاهان تراریخته بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین گزینش می‌شوند. گیاهان تراریخت و غیرتراریخت تنباکوی رشد یافته در شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای °C ۲۵، پس از ریشه‌دار شدن در محیط کشت MS<sup>۲</sup> [۱۲] مایع با غلظت‌های صفر (نمونه شاهد)، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول<sup>۳</sup> (اسموتیکوم) به مدت ۲۸ روز تیمار و در اتاق کشت با دمای °C ۲۵ و نور  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ۹۰ و رطوبت ۹۸-۹۵٪ قرار داده شد. پس از اتمام دوره تنش برخی از شاخص‌های رشد و نمو بررسی شد. تمام آزمایش‌ها بر اساس طرح کامل تصادفی در ۳ تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اصفهان انجام و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار Sigma satat2 انجام شد. مقایسه میانگین بر اساس آزمون Tukey صورت گرفت و سطوح معنی‌دار بودن تیمارها در سطح  $P \leq 0.05$  محاسبه گردید.

گیاهان عالی، تعیین وزن تر و خشک گیاه است [۳۰]. روند عمومی که گیاهان در شرایط تنش خشکی با آن روبرو هستند، کاهش تولید وزن تر و خشک است [۲۰]. تنش خشکی همچنین با افزایش برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اتیلن و اسید آبسزیک، فعالیت کلروفیلز را تحریک و باعث تجزیه کلروفیل می‌شود [۵۳]. انباشت قندهای محلول که در تنظیم اسمزی به منظور مقاومت به خشکی در گیاهان نقش ایفا می‌کند، اغلب تحت تنش خشکی و دهیدراسیون مشاهده می‌شود. جدا از نقش آن‌ها در تعدیل اسموتیکی، قندهای محلول در جنبه‌های دیگری مثل حفظ ثبات پروتئین‌ها نیز عمل می‌کنند [۶۰].

تحت تنش همچنین تغییراتی در پروتئین‌ها مشاهده می‌شود. تنش‌های درجه حرارت بالا، شوری و خشکی می‌توانند سبب تجزیه و غیرفعال شدن بسیاری از پروتئین‌ها گردند. پاسخ به تنش در سطح مولکولی بویژه تغییرات ناگهانی در بیان ژن‌ها که افزایش در ساخت گروه‌های پروتئینی را نتیجه می‌دهد، در تمام موجودات زنده یافت می‌شود [۲۸ و ۳]. در واقع ساخت پروتئین‌های آبدوست بخش مهمی از پاسخ‌ها به شرایط کم‌آبی است [۴] یک گروه از این پروتئین‌ها پروتئین‌های شوک حرارتی هستند [۲۳]. همچنین عوامل تنش‌زا به بلوک شدن فوری فرآیندهای متابولیکی مثل رونویسی و همانندسازی DNA، ترجمه و صادرات mRNA تا زمان احیای سلول‌ها منجر می‌شوند [۸]. به دلیل اهمیت تنش خشکی و شوری در گیاهان و تولید گیاهان تراریخته‌ای که در شرایط چنین تنش‌هایی به رشد مناسب خود ادامه دهند، مسئله انتقال ژن P5CS به گیاهان مورد توجه قرار گرفته است [۶۲]. نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شرایط شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلفی همچون تنباکو (*Nicotiana tabacum*) [۶۱، ۲۹] و ذرت (*Zea mays*) [۴۹]، آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) [۶۱ و ۳۲]، برنج (*Oryza sativa*) و اطلسی (*Petunia hybrid*) [۶۱] گزارش شده است. انتقال و بیان ژن P5CS در تنباکو، منجر به تولید ۱۸-۱۰ برابری پرولین در گیاهان تراریخته نسبت به گیاهان شاهد شد و این گیاهان تنش آبی را تحمل کردند [۶۱ و ۲۹].

1- Neomycin phosphotransferase

2-Murashige and Skoog

3- Poly Ethylene Glycol(PEG)

### تهیه محیط کشت پایه MS

جهت تهیه محیط کشت MS [۴۲]، با توجه به غلظت هر یک از عناصر از محلول‌های پایه که حاوی عناصر ماکرو، عناصر میکرو، آهن و دیگر مواد آلی مانند ویتامین‌ها و ... بجز سوکروز هستند، به مقدار مورد نیاز در مقدار کمی آب مقطر ریخته و سپس ۳۰ گرم ساکاروز به آن افزوده شد. پس از حل شدن ساکاروز، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، pH محلول به دست آمده با HCl و NaOH یک نرمال در حدود ۵/۹- ۵/۷ تنظیم و سپس مقدار ۱۲ گرم آگار (نوع میکروبیولوژی شرکت مرک) به آن افزوده شد. محلول درون مایکروفر قرار داده شد تا آگار ذوب گردد. در آخر، ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مذاب به دست آمده درون شیشه‌های مخصوص کشت بافت گیاهی ریخته شد و در دمای  $121^{\circ}C$  و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید.

جهت ساخت محیط کشت مایع حاوی پلی‌اتیلن‌گلیکول، مقادیر مورد نظر (مطابق با غلظت پلی‌اتیلن‌گلیکول مورد نظر) توزین شده و در حجم خاصی از محیط MS (۵۰ میلی‌لیتر) پس از تنظیم pH آن، حل گردید. جهت بهتر حل شدن، محلول‌ها حرارت داده شد و حجم نهایی با محیط MS به حجم مورد نظر (۲۰۰ میلی‌لیتر) رسانده شد.

### اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک

پس از ۴ هفته گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد)، از محیط‌های کشت مایع خارج شد. پس از آبیگری ریشه آن‌ها توسط کاغذ صافی، وزن تر گیاهان اندازه‌گیری شد. سپس گیاهان در آون با دمای  $70^{\circ}C$  به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از خشک شدن مجموع وزن خشک بخش هوایی و ریشه به‌عنوان وزن خشک کل در هر تکرار یادداشت گردید [۵۰].

### استخراج و سنجش کلروفیل

نخست ۰/۱ گرم از بافت برگ گیاه و به تعداد سه تکرار وزن گردید و سپس با استفاده از ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪

در تاریکی یکنواخت گردید. میزان کلروفیل a و b و کلروفیل کل (a+b) و کارتنوئیدها با روش Arnon [۴] به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-160 Shimadzu در طول موج‌های ۶۶۳ nm، ۶۴۵ nm و ۴۷۰ nm اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات ۰/۰۵ گرم از نمونه‌های تازه گیاهی توزین گردید. سپس در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در هاون چینی به مدت ۵ دقیقه سائیده شد. کربوهیدرات موجود در عصاره به دست آمده با استفاده از معرف آنترون با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Pharmacia LKB- Novaspec در طول موج ۶۲۵ نانومتر بر اساس روش Fales [۱۹] اندازه‌گیری شد.

### استخراج و اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول

برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول از روش بردفورد [۱۰] استفاده شد. نخست ۰/۵ گرم بافت تازه گیاه با بافر استخراج در هاون سائیده شد (با نسبت ۱ به ۳: ۱ گرم بافت با ۳ حجم بافر استخراج). سپس عصاره‌ها به اپندورف منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای  $4^{\circ}C$  سانتریفیوژ گردید. سپس محلول‌های رویی جدا و به اپندورف‌های جدید منتقل گردید. به منظور اندازه‌گیری پروتئین، به یک لوله آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره مورد نظر منتقل شده و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد. ترکیب فوق به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. نمونه بلانک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد بود.

### تهیه ژل SDS-PAGE

ژل الکتروفورز به صورت ژل عمودی با شرایط دناتوره کننده غیر پیوسته<sup>۱</sup> انجام گرفت که در این سیستم ژل استفاده شده به صورت دو قسمتی (ژل پایین یا ژل جداکننده با غلظت اکریل‌آمید بیشتر و ژل بالایی یا ژل

کاهش در مقدار رنگیزه‌ها در گیاهان غیرتراریخت بیشتر از گیاهان تراریخت بود به ویژه در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد نسبت به گیاهان تراریخت معنی‌دار بود.

### کربوهیدرات محلول

نتایج اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات محلول در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت تنباکو نشان داد که در گیاهان تراریخت تا غلظت ۲۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول، مقدار قندهای محلول افزایش می‌یابد اما در غلظت ۳۰ درصد کاهش مقدار قندهای محلول مشاهده شد. در گیاهان غیرتراریخت افزایش محتوای قندهای محلول تا غلظت ۱۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول و بعد کاهش در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد مشاهده شد. در گیاهان غیرتراریخت مقدار قندهای محلول در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول نسبت به نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند و در سایر غلظت‌ها این اختلاف معنی‌دار نبود. به طور کلی، افزایش مقدار قندهای محلول در گیاهان تراریخت بیشتر از گیاهان غیرتراریخت بود به طوری که در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به ترتیب ۱/۳، ۱/۵۶ و ۱/۵ برابر بیشتر از گیاهان غیرتراریخت بود (شکل ۳).

### پروتئین‌های محلول

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول نشان داد که در گیاهان تراریخت با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول تغییر معنی‌داری در مقدار پروتئین محلول مشاهده نشد (شکل ۴). در گیاهان غیرتراریخت نیز با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول مقدار پروتئین تا غلظت ۱۰ درصد ثابت بود ولی در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد کاهش نشان داد. کاهش مقدار پروتئین در گیاهان غیرتراریخت بیشتر از گیاهان تراریخت بود به طوری که در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد با گیاهان تراریخت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۴).

متراکم‌کننده با غلظت اکریل آمید کمتر) است. رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام شد. پس از این مراحل، بررسی تغییرات الگوی پروتئینی و شدت نسبی باندهای پروتئینی بر روی ژل‌های به‌دست آمده به صورت کمی با استفاده از نرم افزار ImageJ انجام شد.

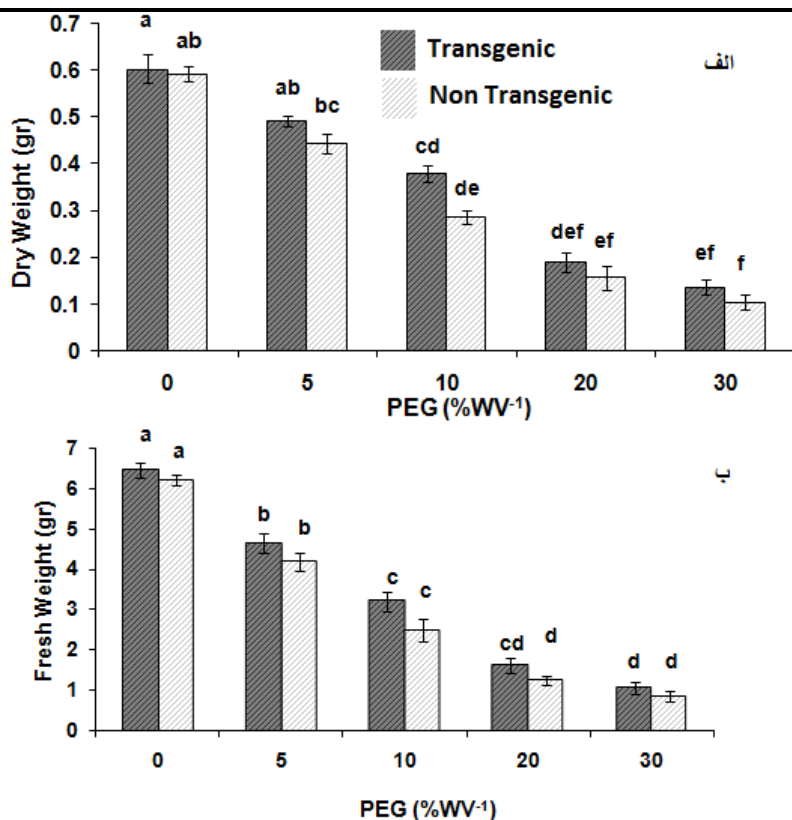
### نتایج

#### وزن تر و وزن خشک

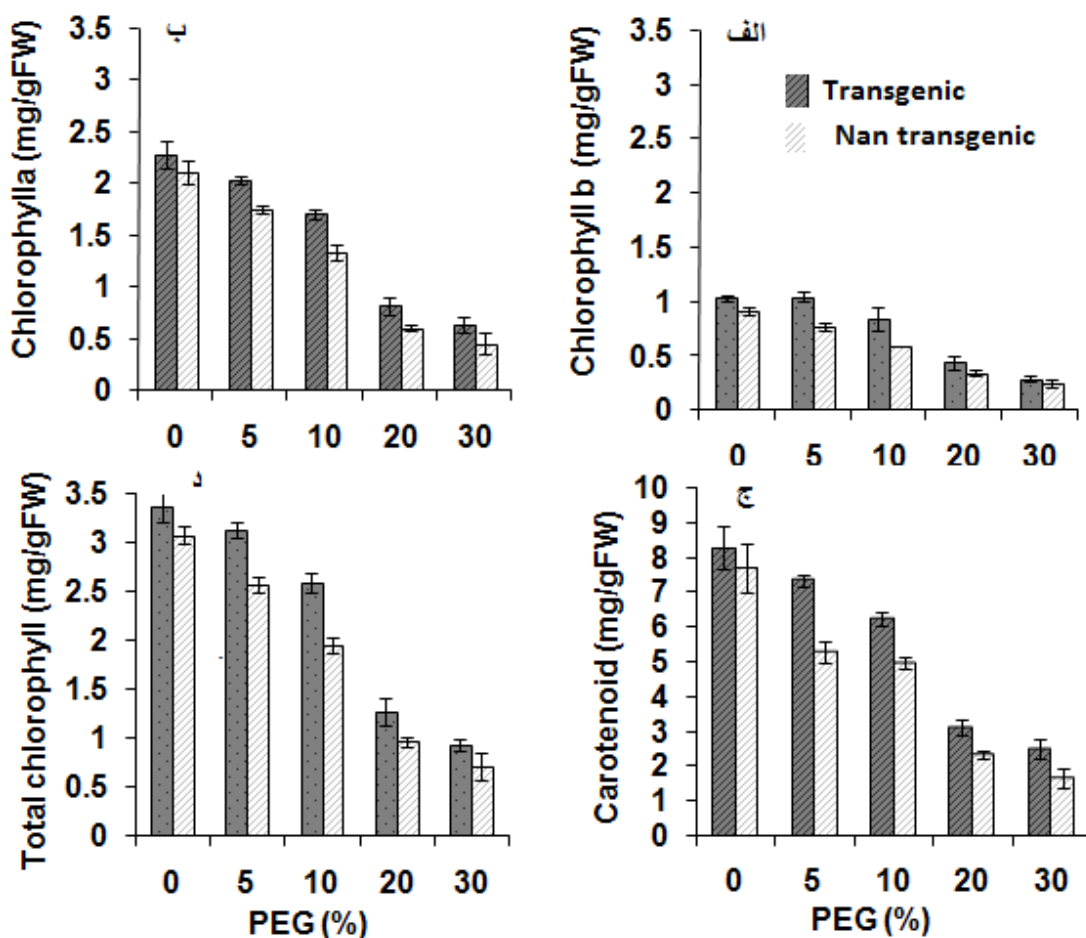
نتایج نشان داد که وزن تر در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در تمام تیمارها این کاهش نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود به طوری که در گیاهان تراریخت در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به ترتیب ۳۰، ۵۱، ۷۵/۸، ۸۴/۱ و در گیاهان غیرتراریخت به ترتیب ۳۳/۷، ۶۰/۶، ۸۰/۳ و ۸۶/۵ درصد کاهش نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نیز در غلظت ۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱ ب). نتایج اندازه‌گیری وزن خشک نشان داد که وزن خشک نیز مانند وزن تر تحت تأثیر تنش خشکی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این کاهش به ویژه در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول نسبت به غلظت صفر (شاهد) بیشتر بود. بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت ۲۰ درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۱ الف).

#### رنگیزه‌های فتوسنتزی

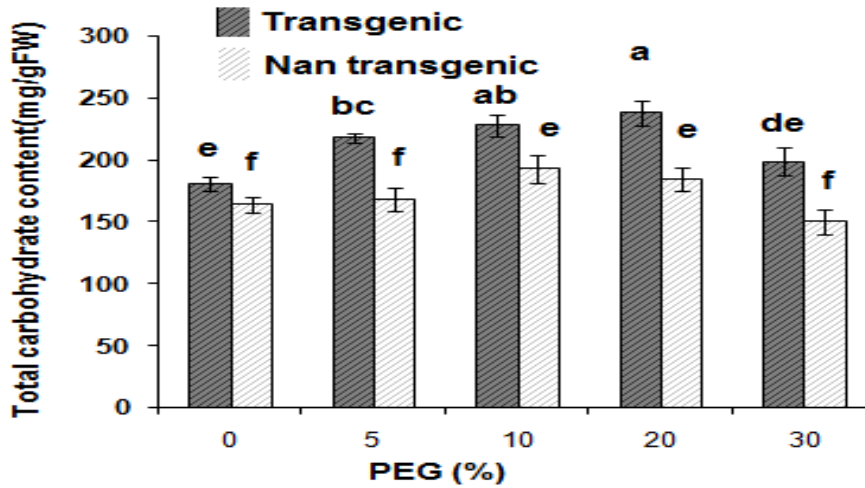
با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول مقدار هر سه نوع کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت کاهش یافت. در مقدار کلروفیل a در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد، در مقایسه با سایر غلظت‌ها، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و کمترین مقدار کلروفیل در این غلظت‌ها بود. کلروفیل b نیز الگوی تغییرات کلروفیل a را نشان داد. تغییرات در کلروفیل کل و کاروتنوئید (شکل ۲) نیز کم و بیش مشابه با کلروفیل a و b بود. کلروفیل کل و کاروتنوئید با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول به ویژه در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد کاهش معنی‌دار نشان داد. در مجموع



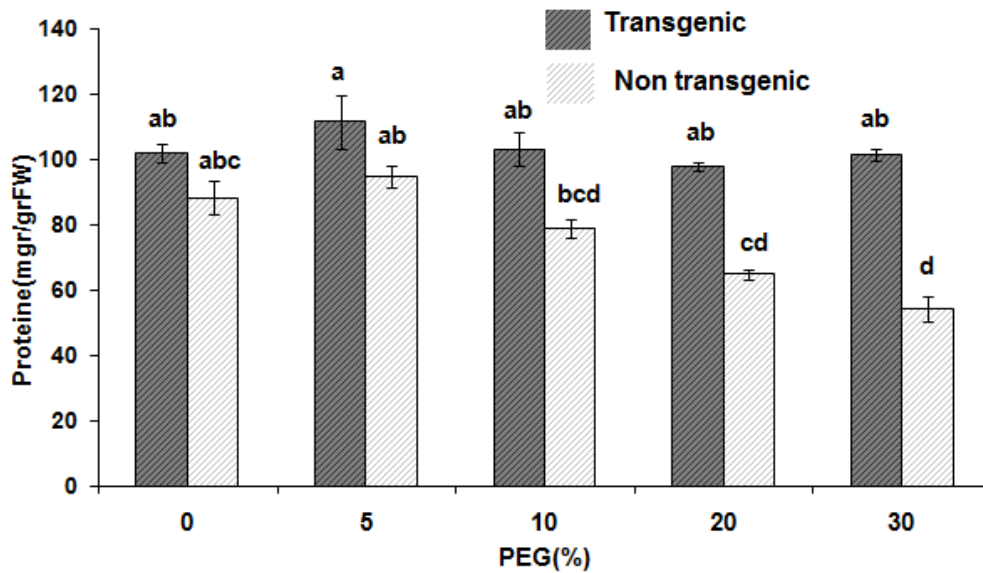
شکل ۱- اثر تنش خشکی بر وزن خشک (الف) و وزن تر (ب). داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) براساس آزمون توکی می‌باشد.



شکل ۲- اثر تنش خشکی بر مقدار کلروفیل a (الف)، b (ب)، کلروفیل کل (ج) و کاروتنوئید (د) داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD



شکل ۳- اثر تنش خشکی بر میزان کربوهیدرات محلول در برگ گیاهان تنباکو. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) براساس آزمون توکی می‌باشد.

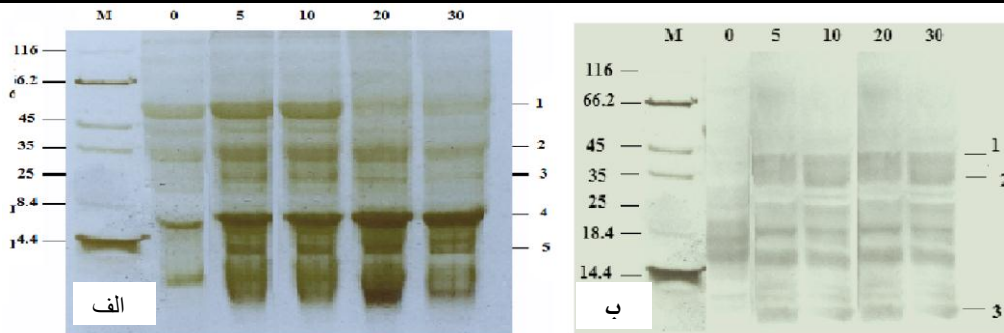


شکل ۴- اثر تنش خشکی بر میزان پروتئین در برگ گیاهان تنباکو. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) براساس آزمون توکی می‌باشد.

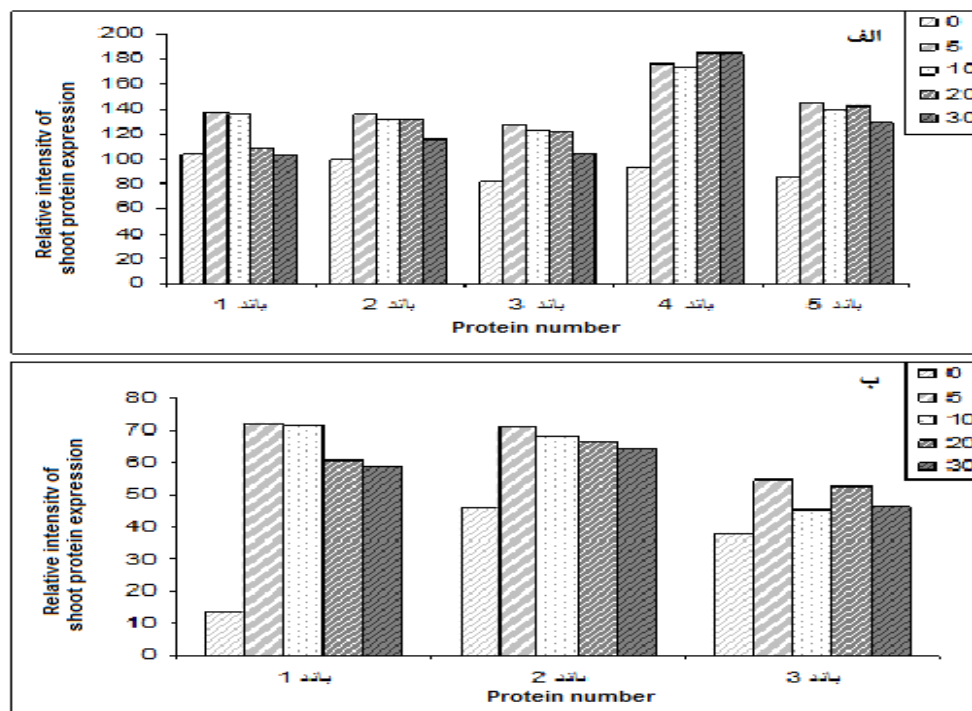
#### الکتروفورز پروتئین ساقه-برگ گیاهان تراریخت و غیرتراریخت

۲۲ کیلو دالتون نیز گیاهان تراریخت نسبت به شاهد افزایش تراکم باند را نشان می‌دهند. در سایر تیمارهای خشکی تغییر قابل ملاحظه‌ای از نظر باند پروتئینی مشاهده نشد.

بر اساس شکل ۵، در گیاهان تراریخت الگوی پروتئینی در تیمار ۵ و ۱۰ درصد نسبت به گیاه بدون تیمار (شاهد) در محدوده باند پروتئینی حدود ۵۵ کیلو دالتون افزایش تراکم نشان داد، در حالی که گیاهان غیر تراریخت الگوی نسبتاً یکسانی را نشان می‌دهند. علاوه بر این در محدوده



شکل ۵- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گیاهان تراریخت (الف) و غیرتراریخت (ب) تنباکو در غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول



شکل ۶- شدت بیان نسبی پروتئین در گیاهان تراریخت (الف) و غیرتراریخت (ب) تنباکو در غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول

### بحث و نتیجه‌گیری

اندامک‌ها و اختلال در عملکرد روزنه‌ها باعث کاهش نرخ فتوسنتز و کاهش رشد گیاه می‌شود [۱]. تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن نیز می‌تواند غیرفعال شدن آنزیم‌ها و یا تجزیه پروتئین‌های سلولی و کلروپلاستی و کاهش شدید میزان کلروفیل و در نهایت کاهش فتوسنتز شود. به طور کلی، در شرایط تنش خشکی رشد گیاه به واسطه محدود شدن تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله فتوسنتز، تنفس، انتقال و جذب یون‌ها، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و هورمون‌ها کاهش می‌یابد [۹]. با توجه به نتایج مذکور، می‌توان محدود شدن فتوسنتز را از علت‌های اصلی کاهش رشد و به عبارت دیگر، کاهش وزن تر و خشک گیاه در شرایط تنش دانست.

بر اساس نتایج این تحقیق وزن تر و خشک گیاهان تراریخت و غیرتراریخت تنباکو در غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن گلیکول کاهش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های شاهد نشان دادند. در پژوهش‌های انجام شده بر روی انواع گیاهان روند کاهش وزن تر و خشک در پتانسیل‌های منفی‌تر گزارش شده است [۵۹ و ۳۵]. همچنین کاهش بیومس به دلیل تنش کم‌آبی تقریباً در تمام ژنوتیپ‌های گیاه آفتابگردان مشاهده شده است [۵۸] که با نتایج این تحقیق که با پیشرفت تنش خشکی وزن کل گیاه کاهش می‌یابد، انطباق دارد. یکی از علت‌های کاهش وزن تر و خشک در گیاهان تحت تنش خشکی کاهش فتوسنتز است. در واقع تنش خشکی از طریق اختلال در ساختار غشاء، ایجاد بی‌نظمی در ساختار

گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت کمتر بود که این می‌تواند بیانگر این باشد که شاید گیاهان تراریخت با افزایش میزان پرولین و به کارگیری راهکارهای خاص توانسته‌اند بر تجزیه کلروفیل غلبه کنند. در واقع محلول‌های سازگار نقش مهمی در جلوگیری از تخریب غشا تیلاکوئید در زمان دهیدراته شدن و تنش اسمزی به عهده دارند و از آنجایی که پرولین به عنوان یک تثبیت کننده پروتئین نیز عمل می‌کند، می‌توان پیشنهاد کرد که ممکن است پرولین سبب حفاظت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز پیگمان‌ها در زمان تنش شود. علاوه بر این پرولین در حذف گونه‌های فعال اکسیژن نیز نقش دارد و می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و خسارت‌های ناشی از افزایش گونه‌های واکنشگر اکسیژن<sup>۱</sup> به سیستم فتوسنتزی و کلروپلاستی را کاهش دهد. همچنین فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز<sup>۲</sup> و آسکوربات پراکسیداز<sup>۳</sup> در گیاهان تراریخت و در نتیجه کاهش میزان گونه‌های فعال و اثرات مخرب آن‌ها بر رنگیزه‌ها می‌تواند از راهکارهای استفاده شده در این گیاهان باشد. قابل ذکر است که محتوای بالای کلروفیل و کاروتنوئید با تحمل به تنش همراه بوده است [۳۴ و ۵۳].

در این مطالعه مشاهده شد که تنش خشکی موجب افزایش قندهای محلول در گیاهان تحت تنش گردید. قندهای محلول از اسمولیت‌های مهمی هستند که افزایش آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی گزارش شده است. هرچند نتایج ضد و نقیضی در مورد اثر تنش خشکی و شوری بر انباشت قند در گیاهان وجود دارد. برخی از پژوهشگران ثابت کرده‌اند که محتوای قند تحت تنش افزایش می‌یابد [۲]، برخی دیگر معتقدند که محتوای قند کاهش می‌یابد [۲۵] و برخی نیز گزارش کرده‌اند که محتوای قند ثابت می‌ماند [۴۱]. در این آزمایش افزایش محتوای قندهای محلول تحت تنش خشکی مشاهده شد که با نتایج به‌دست آمده در دیگر گیاهان همچون *Lupinus albus* [۴۶] و آفتابگردان تحت تنش شوری مطابقت دارد [۵۵]. از دلایلی که می‌توان برای افزایش قندهای محلول ذکر کرد، توقف رشد گیاه و یا ساخت قندهای محلول از

در این پژوهش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در غلظت‌های بالای پلی اتیلن گلیکول کاهش یافت که این کاهش در گیاهان غیرتراریخت بیشتر بود. علت کاهش کلروفیل و کاروتنوئید طی تنش خشکی را می‌توان این گونه بیان کرد که تنش خشکی از یک طرف منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که این نیز به نوبه خود باعث تجزیه و در نتیجه کاهش رنگدانه‌ها می‌شود. در دوره تنش کلروفیل‌ها در کلروپلاست تجزیه شده و ساختارهای تیلاکوئید ناپدید می‌شوند [۵۳]. تنش خشکی همچنین با افزایش برخی از تنظیم کننده‌های رشد نظیر اتیلن و اسیدآبسیزیک، فعالیت کلروفیل‌ها را تحریک [۱] و باعث تجزیه کلروفیل و آزاد شدن کلروفیل می‌شود که در مراحل بعد با باز شدن حلقه پورفیرینی این محصولات به صورت فعال به واکوئل منتقل می‌شوند [۵۳]. از طرف دیگر، تنش خشکی باعث اختلال در سیستم‌های آنزیمی جاروب کننده گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و خسارت به غشای سلولی و تخریب رنگدانه‌ها می‌گردد [۴۷]. همچنین می‌توان گفت که کاهش کلروفیل کل در تنش خشکی به کاهش ظرفیت برای دریافت نور دلالت دارد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن به طور عمده توسط جذب مازاد انرژی در دستگاه فتوسنتزی اتفاق می‌افتد. بنابراین، می‌تواند به وسیله تجزیه و تخریب پیگمان‌های دریافت کننده نور از تولید بیشتر آن‌ها اجتناب شود [۲۷]. کاهش غلظت کلروفیل طی تنش خشکی در گیاه *Phragmites australis* [۴۳] و *Paulownia imperialis* [۴۰]، لوبییا [۶] و *Carthamus tinctorius* [۵۶] نیز گزارش شده است. کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی در برخی پژوهش‌ها دیگر نیز گزارش شده است که به طور عمده به دلیل تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی و فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، تخریب پیش‌ماده‌های ساخت کلروفیل و یا جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید است [۱۸ و ۲۱]. هرچند کاهش یا تغییر نکردن مقدار کلروفیل طی تنش خشکی در دیگر گونه‌ها نیز گزارش شده است که به مدت و شدت تنش بستگی دارد [۳۴]. کاهش میزان کلروفیل و کاروتنوئید در

1- Reactive Oxygen Species (ROS)

2- Catalase (CAT)

3- Ascorbate Peroxidase (APX)



در گیاهان تراریخت و هم در گیاهان غیرتراریخت ابتدا افزایشی و سپس کاهش در غلظت‌های بالا بود (شکل ۴). نتایج مشابه ارقام جو تحت تنش خشکی نیز مشاهده شده است که نخست افزایش پروتئین‌ها و سپس کاهش آن گزارش شده است [۳۹]. شاید دلیل کاهش محتوای پروتئین در غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن گلیکول به خاطر کاهش فتوسنتز و یا تخریب پروتئین‌ها باشد. با کاهش فتوسنتز در اثر تنش خشکی، مواد مورد نیاز برای ساخت پروتئین‌ها فراهم نمی‌شود و بنابراین ساخت پروتئین کاهش یافته و یا حتی متوقف می‌شود [۱۳]. از دلایل دیگری که می‌توان ذکر کرد، افزایش تشکیل و فعالیت گونه‌های فعال در غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن گلیکول است. رادیکال‌های آزاد باعث بازدارندگی سنتز پروتئین‌ها و یا منجر به دناتوراسیون آن‌ها می‌شوند [۱۷]. هرچند این اثر ممکن است به کاهش تعداد پلی‌زوم‌ها مرتبط باشد [۱۶]. افزایش و سپس کاهش در پروتئین‌های محلول تحت تنش خشکی با یافته‌های پژوهش بر روی جو و سویا سازگار است [۷]. تنش خشکی یک افزایش را در برخی پروتئین‌ها و یک کاهش را در برخی دیگر نتیجه می‌دهد. در این پژوهش، تغییرات در مقدار پروتئین در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت ناچیز و کم بود که شاید دلیل آن محتوای بالاتر پرولین در این گیاهان نسبت به گیاهان غیرتراریخت باشد. یکی از نقش‌های پرولین توانایی آن در تثبیت پروتئین‌ها و حفظ آن‌ها از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد ذکر شده است [۳۸]. در واقع پرولین به عنوان یک چپرون عمل می‌کند و باعث پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها می‌شود [۶۲ و ۴۴]. از دلایل دیگری که می‌توان برای کاهش پروتئین در غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن گلیکول بیان کرد، القای ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها در طول تنش خشکی است. ثابت شده است که تنش خشکی بیان تعداد زیادی از ژن‌ها را القا می‌کند که برخی از آن‌ها ژن‌هایی هستند که پروتئین‌ها را کد می‌کنند [۱۲]. پروتئین‌های درون سلولی نقش مهمی در تجزیه پروتئین‌های غیرضروری و آسیب دیده تحت شرایط تنش را دارند [۲۲].

در دوره تنش، گیاهان ممکن است بیان ژن‌ها و مقادیر پروتئین‌های خود را تغییر دهند. به خوبی مشخص

مسیرهای غیر فتوسنتزی و نیز تخریب قندهای نامحلول است. از آن‌جا که در گیاهان، پتانسیل اسمزی به تعداد مولکول‌های ماده محلول نیز بستگی دارد، تنظیم اسمزی از مسیر تبدیل پلی‌ساکاریدهای نامحلول همچون نشاسته و یا فروکتان به قندهای محلول مانند ساکاروز و گلوکز صورت می‌گیرد [۲۶]. افزون بر این، از مهم‌ترین منابع مواد محلول، ترکیبات فتوسنتزی هستند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم از هیدرولیز ترکیباتی مانند فروکتان حاصل می‌شود. فتوسنتز و رشد گیاه هر دو تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند اما رشد گیاه بیشتر متأثر می‌شود و با توقف رشد میزان محصولات فتوسنتزی افزایش می‌یابد [۱۳]. بررسی بر روی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم نشان داد که در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس به خشکی مقدار کربوهیدرات محلول بیشتری تجمع می‌یابد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. آن‌ها همچنین معتقد بودند که محتوای کربوهیدرات‌های محلول را می‌توان به عنوان یک شاخص جهت انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی به حساب آورد [۳۱]. در این پژوهش مقدار کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت بیشتر بود که شاید دلیل آن را این‌گونه بتوان عنوان کرد که در گیاهان تراریخت تنباکو میزان تثبیت  $CO_2$  به خاطر بالاتر بودن محتوای کلروفیل آن‌ها بیشتر از گیاهان غیرتراریخت بوده و به همین دلیل انباشت قندها در آن‌ها نیز بیشتر گردیده است. پیشنهاد شده است که کربوهیدرات‌ها از قبیل گلوکز، فروکتوز، فروکتان‌ها و نشاسته در حفاظت اسمزی نقش مهمی به عهده دارند. کربوهیدرات‌ها علاوه بر تطابق و حفاظت اسمزی در ذخیره کربن و تصفیه رادیکال‌های آزاد نقش مهمی به عهده دارند [۴۵].

تغییرات پروتئین‌ها تحت تنش خشکی به طور وسیعی در گونه‌های گیاهی زیادی مطالعه شده است. در این پژوهش در گیاهان تراریخت تحت غلظت‌های مختلف، پلی‌اتیلن گلیکول اختلاف معنی‌داری در مقدار پروتئین‌ها مشاهده نشد اما در گیاهان غیرتراریخت در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد نسبت به نمونه شاهد و گیاهان تراریخت کاهش معنی‌داری در مقدار پروتئین‌ها مشاهده شد. هرچند الگوی کلی تغییرات در مقدار پروتئین‌ها هم

به هر حال، تنش خشکی الگوی پروتئین‌ها را در هر دو گروه تغییر داده است. به طور کلی، تنش خشکی تغییرات متابولیکی مرتبط با Turnover پروتئین (تغییرات در ساخت، حفظ سطح برخی پروتئین‌ها و یا تجزیه برخی پروتئین‌های دیگر) را القا می‌کند [۱۱]. در مطالعه‌ای که بر روی گیاه تنباکو تحت تنش شوری صورت گرفته است الگوی ۱۱ باند در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در شرایط تنش نسبت به نمونه شاهد تغییر یافته است [۵۲]. در این پژوهش نیز بیان برخی پروتئین‌ها در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت افزایش یافته و برخی پروتئین‌ها نیز در دو گروه الگوی یکسانی داشته‌اند. این نتیجه می‌تواند بیان‌گر پیچیدگی اثرگذاری پلی‌اتیلن‌گلایکول، و نیز بیان افزوده ژن P5CS بر پروتئین‌ها و تغییر بیان آن‌ها باشد.

با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که انتقال ژن P5CS به گیاهان تنباکو باعث افزایش تحمل به تنش خشکی در این گیاهان شده است. در گیاهان تراریخت به دلیل بیان افزوده ژن P5CS و افزایش مقدار پرولین و نقش آنتی‌اکسیدانی این آمینواسید، اثر مخرب گونه‌های فعال اکسیژن بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه فتوسنتز کمتر است. نبود تغییر در پروتئین‌های گیاهان تراریخت نیز می‌تواند به خاطر محتوای بالای پرولین و نقش حفاظتی آن که حفاظت از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد، باشد.

### قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و قطب تنش‌های گیاهی به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نمایند.

شده است که پاسخ‌های موقتی متعددی در پاسخ به تنش‌های محیطی وجود دارد. همچنین الگوی بیان بسیاری از ژن‌ها در پاسخ به چندین نوع تنش از قبیل خشکی، سرما و شوری مشابه است [۲۴]. به عنوان مثال، مشخص شده که پروتئین‌های دهیدرین و رونوشت‌های آن‌ها در شرایط دهیدراسیون (خشکی، دمای پایین و شوری) تجمع یافته و نقش تثبیت‌کنندگی سلول‌ها را به عهده دارند. همچنین پروتئین‌های شوک حرارتی نیز زمانی که سلول تحت تنش باشد افزایش می‌یابد [۳۶]. نتایج بررسی الگوی پروتئین‌ها در این پژوهش نشان داد که در گیاهان تراریخت شدت بیان ۳ باند نسبت به نمونه کنترل تغییر یافته و ۲ باند نیز در اثر تنش القا شده‌اند. در گیاهان غیرتراریخت نیز شدت بیان ۳ باند نسبت به نمونه کنترل تغییر یافته است. افزایش بیان در پروتئین‌ها می‌تواند در اثر افزایش سرعت رونویسی و یا ترجمه، کاهش سرعت و میزان تخریب پروتئین‌های پاسخگو به تغییرات رخ داده و افزایش طول عمر آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها باشد. کاهش بیان پروتئین نیز می‌تواند ناشی از اثرات بازدارندگی تنش خشکی و یا تنش اکسیداتیو ناشی از آن بر رونویسی و یا فرآیند ترجمه باشد. تغییرات برخی از باندهای پروتئینی در برگ‌های گیاهان تراریخت و غیرتراریخت نیز ممکن است وابسته به بیان افزوده ژن P5CS در گیاهان تراریخت باشد. یعنی نه تنها تنش خشکی باعث القای تغییرات در میزان بیان پروتئین‌ها شده است بلکه افزایش بیان ژن P5CS تحت تنش خشکی نیز ممکن است از طریق مکانیسم‌های خاص بر بیان ژن‌های سازنده برخی پروتئین‌ها و ساخت آن‌ها اثر گذاشته باشد. در نتیجه شدت برخی باندهای پروتئینی در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت تغییر یافته است. بنابراین، تفاوت الگوی پروتئینی و اختلاف بیان پروتئین‌ها بین گیاهان تراریخت و غیرتراریخت دیده شد.

### References

[1]. Abaaszade, P., Sharifi, A., Lebaschi, H., & Moghadasi, F. (2007). Effect of drought stress on prolin, soluble sugars, Chlorophyll and RWC level in *Melissa oreganalis*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Researc*, 4, 504–513, (in farsi).

[2]. Aghaei, K., Ehsanpour, A. A., & Komatsu, S. (2008). Proteome Analysis of Potato under Salt Stress. *Journal of Proteome Research*, 7, 4858–4868, (in Parsi).

[3]. Allagulova, C. R., Gilamov, F. R., Shakirova, F. M., & Vakhitov, V. A. (2003).

- The plant dehydrins: structure and functions. *Biochemistry*, 68, 945-951.
- [4]. Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated thloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgans*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- [5]. Astorga, G. I., & Melendez, L.A. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* and *Paulowina fortune* grown in vitro. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 115.
- [6]. Beinsan, C., Camen, D., Sumalan, R., & Babau, M. (2003). Study concerning salt stress effect on leaf area dynamics and chlorophyll content in four bean local landraces from Banat areas. *Faculty of Horticulture*, 119, 416-419.
- [7]. Bensen, R. J., Boyer, J.S., & Mullet, J.E. (1988). Water deficit-induced changes in abscisic acid, growth, polyamines, translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiology*, 88, 289-294.
- [8]. Biamonti, G., & Caceres, J. F. (2009). Cellular stress and RNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 34, 146-153.
- [9]. Bjorkman, O., & Powles, S.B. (1998). Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta*, 161, 490-504.
- [10]. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [11]. Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sciences*, 2, 48-54.
- [12]. Bray, E.A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany*, 89, 803-811.
- [13]. Chaves, M.M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.
- [14]. Chen, C., & Dickman, M.B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen colletotrichum trifolii. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 102, 3459-3464.
- [15]. Cherian, S., Reddy, M.P., & Ferreira, R.B. (2006). Transgenic plants with improved dehydration stress tolerance: Progress and future Prospects. *Biologia Plantarum*, 50, 481-495.
- [16]. Creelman, R.A., Mason, H.G., Bensen, R.J., Boyer, J.S., & Mullet, J.E. (1990). Water deficit and abscisic acid causes inhibition of shoots versus root growth in soybean seedlings: Analysis of growth, sugar accumulation and gene expression. *Plant Physiology*, 92, 205-214.
- [17]. Cruz de Carvalho, M.H., Arcy-Lameta, A., Roy-Macauley, H., & Gareil, M. (2001). Aspartic proteinase in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters*, 492, 242-246.
- [18]. Egert, M., & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Expperimental Botany*, 48, 43-49.
- [19]. Fales, F.W. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 113-124
- [20]. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., & Fujita, D. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.
- [21]. Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental Experimental Botany*, 45, 105-114.
- [22]. Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 609-624.
- [23]. Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*, 86, 377-384.
- [24]. Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S., & Salekdeh, G. H. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5, 950-960, (in farsi).

- [25]. Hanson, A. D., & Hitz, W. D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficit. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 163-203.
- [26]. Hendry, G. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructanc. *New Phytologist*, 123, 3-14.
- [27]. Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A., & Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 691-696.
- [28]. Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403.
- [29]. Jinyo, D., Xiaoyang, C., Wei, L., & Qiong, G. (2004). Osmoregulation mechanism of drought stress and genetic engineering strategies for improving drought resistance in plants. *Forestry Studies in China*, 6, 56-62.
- [30]. Kage, H., Kochler, M., & Stutzel, H. (2004). Root growth and dry matter partitioning of Cauliflower under drought stress conditions: measurement and simulation, *European Journal of Agronom*, 20, 379-394.
- [31]. Kerepesi, I., & Galibra, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 44, 482-487.
- [32]. Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamagushi-Shinozalad, K., & Shinozaki, K. (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase. an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8, 323-1335.
- [33]. Kpyoarissis, A., Petropoulou, Y., & Manetas, Y. (1995). Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L.) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1825-1831.
- [34]. Kraus, T.E., Mckersie, B.D., & Fletcher, R.A. (1995). Paclobutrazole induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*, 145, 570-576.
- [35]. Leport, L., Turner, N.C., French, R.J., Barr, M.D., Duda, R., Davies, S.L., Tennant, D., & Siddique, K.H.M. (1999). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean type environment. *European Journal of Agronomy*, 11, 279-291.
- [36]. Lindquist, S., & Crig, E.A. (1998). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, 631-677.
- [37]. Matysik, J., Alia, B.B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82, 525-532.
- [38]. Mishra, S., & Dubey, R.S. (2006). Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology*, 163, 927-936.
- [39]. Mohammadkhani, N., & Heidari, R. (2008). Effect of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32, 23-30, (in farsi).
- [40]. Mohsenzade, S., Malboobi, M. A., Razavi, K., & Farrahi Aschtiani, S. (2006). Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (poaceas) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 374-322, (in farsi).
- [41]. Morgan, J. M. (1992). Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19, 67-76.
- [42]. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- [43]. Pagter, M., Bragato, C., & Brix, H. (2005). Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. *Aquatic Botany*, 81, 285-299.
- [44]. Paul, M., & Hasegava, A. (1996). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463- 499.
- [45]. Penna, S. (2003). Building stress tolerance drought over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in Plant Science*, 8, 355-357.
- [46]. Pinheiro, C., Chaves, M. M., & Ricardo, C. P. (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit

- in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1063-1070.
- [47]. Rahdari, P., & Hoseini, S.A. (2012). Drought Stress: A Review. *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3, 443-446.
- [48]. Ranganayakulu, G.S., Veeranagamallaiah, G., & Sudhakar, C. (2013). Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *African Journal of Plant Science*, 7, 586-592.
- [49]. Rayaptai, P.J., & Stewart, C.R. (1991). Solubilization of proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology*, 95, 787-791.
- [50]. Razavizade, R., Ehsanpour, A.A., Ahsan, A., & Komatsu, S. (2009). Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. *Peptides*, 30, 1651-1659, (in farsi).
- [51]. Razavizadeh, R., (2009) Effect of P5CS expression on some physiological and proteomics of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin) under *in vitro* salt stress. PhD Thesis, University of Isfahann
- [52]. Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189-1202.
- [53]. Sairam, R.K. (1994). Effect of moisture stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 32, 594-597.
- [54]. Sairam, R. K., Deshmukh, P.S., & Saxna, D.C. (1998). Role of antioxidant systems in Wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantrum*, 41, 387-394.
- [55]. Santos, C. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 103, 93-99.
- [56]. Sato, Y., Kawabuchi, S., Irimoto, Y., & Miyawaki, O. (2004). Effect of water activity and solvent-ordering on intermolecular interaction of high-methoxyl pectins in various sugar solutions. *Food Hydrocolloids*, 18, 527-534.
- [57]. Siddiqi, E.H., Ashraf, M., Hussain, M., & Jamil, A. (2009). Assessment of intercultivar variation for salt tolerance in safflower (*Carthamustinctorius* L.) using gas exchange characteristics as selection criteria. *Pakistan Journal of Botany*, 41, 2251-2259.
- [58]. Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, P.D.S., & Sayre, R.T. (2002). Molecular mechanism of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*, 14, 2837-2847.
- [59]. Tahir, M.H.N., & Mehdi, S.S. (2001). Evaluation of open pollinated sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under water stress and normal conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 3, 236-238.
- [60]. Tayebi, A., Afshari, H., Farahvash, F., Sinki, M.J., & Nezarat, S. (2012). Effect of drought stress and different planting dates on safflower yield and its components in Tabriz region'. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2, 445-453, (in farsi).
- [61]. Williams. J.H.H., William. S.A.L., Pollock. C.J., & Farrar. G.F. (1992). Regulation of leaf metabolism by sucrose. *Plant Physiology*, 39, 443-446.
- [62]. Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamagushi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Yoshiba, Y. (2005). Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1975-1981.
- [63]. Yamchi, A., Rastgar Jazzii, F., Ghobadi, C., Mousavi, A., & Karkhanehee, A.A. (2005). Increasing of tolerance to osmotic stresses in tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Xanti through overexpression of p5cs gene. *Journal of Science and Tecnologyof Agriculture and Natural Resources*, 8, 40-49, (in Farsi).

## Effect of drought stress on transgenic tobacco (*Nicotinia tabacum* L. cv. Wisconsin) plants containing P5CS gene under *in vitro* culture

1-S. Zarei, MSc Student of Plant Physiology, Department of Biology, University of Isfahan

2-A.A. Ehsanpour, Professor Department of Biology, University of Isfahan

ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 14 Jan 2016

Accepted: 25 Aug 2016

### Abstract

In this study, to evaluate the effects of drought stress on transgenic tobacco (*Nicotinia tabacum* L. cv. Wisconsin) containing P5CS gene and non transgenic plants under *in vitro* culture, these plants were grown on MS media containing 0, 5, 10, 20 and 30% PEG for 28 days. To select the drought tolerant and sensitive plants and also the mechanisms of drought tolerance in transgenic tobacco plants parameters such as wet and dry weight and photosynthetic pigments content (chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid), soluble sugars and total soluble protein content were measured 28 days after PEG treatment. Results indicated that reduction of wet and dry weights and photosynthetic pigments content in transgenic plants were lower than the non transgenic plants. Soluble carbohydrates in both plants in 10 and 20% concentrations, significantly increased. Total soluble protein content were decreased in non transgenic plants in 30% PEG, and remained unchanged in transgenic plants. SDS-PAGE results in leaves showed different protein patterns between transgenic and non transgenic plants and also between treated and non treated plants for example, protein bands about 35 and 45 KD, Proline as a key osmoregulating solute in plants play an overriding role in osmotic pressure adjustment of the cell under water stress condition. Thus transgenic plants containing P5CS gene might be resistant against drought stress.

**Keywords:** Drought stress; Tobacco; P5CS; Soluble carbohydrate; Protein; SDS-PAGE.