جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ ویژه‌نامه زراعت و اصلاح نباتات ـ ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

بررسی اثر دمای بهاره‌سازی بر تغییرات کمی و الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگ ارقام بهاره و پاییزه کلزا (*Brassica napus*)

علی بیرانوند[1]، قاسم کریم زاده[2] و علی سروش زاده[3]
[1]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات، [2]و[3] به‌ترتیب اعضای هیأت علمی گروه اصلاح نباتات،
و زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۲/٦/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۰/۲٦

چکیده

تغییرات کمی و الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگی ارقام پاییزه و بهاره کلزا در دمای بهاره‌سازی (٤ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. بذور در اتاقک رشد در دمای شب / روز (۱۵/۱۰ درجه سانتی‌گراد؛ شاهد) با شدت نور $W\ m^{-2}$ ۱٤۰ و دورهٔ نوری ۱٦/۸ ساعت کشت شدند. گیاهان شاهد هر دو رقم تا آخر آزمایش (روز ٥٦) در این شرایط نگهداری شدند. گیاهچه‌های تیمار سرمایی ۲۲ روز در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند: از روز سی‌ام (مرحله ٤ برگی) تا روز ٥۲ و سپس مجدداً به شرایط اولیه برگردانده شدند. هر ٤۸ ساعت یکبار از برگ‌ها نمونه‌برداری و پس از استخراج پروتئین‌های محلول، مقدار پروتئین به روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید. داده‌های کمی به‌صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی: رقم (۲ سطح)، تیمار دمایی (۲ سطح) و زمان نمونه‌برداری (۱٤ سطح) در ۳ تکرار تجزیه آماری شدند. مقدار ٤٥ میکروگرم پروتئین روی ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۵ درصد بار گردید. نتایج نشان داد که اثرات ساده و اثرات متقابل آنها معنی‌دار بودند. تغییرات دما برروی مقدار پروتئین‌ها در برگ‌های رقم بهاره محسوس نبود ولی در رقم پاییزه تجمع قابل ملاحظه و معنی‌داری در پروتئین‌ها به‌وجود آورد. این تجمع از ۸ روز در ٤ درجه سانتی‌گراد شروع و تا ۲ روز بعد از انتقال گیاهچه‌های سرما دیده به دمای معمولی (روز ٥٤ آزمایش) در رقم پاییزه ادامه یافت. وقتی این رقم ۲ هفته در سرما قرار گرفت (روز ٤٤)، در برگ‌ها باند جدید سرما القایی ٤۷/۷ kDa ظاهر که در رقم بهاره سرما دیده ۲ روز دیرتر ظاهر گردید. این الگوی پروتئینی تا ۱۸ روز تحت تنش سرما (روز ٤۸) در برگ‌های هر دو رقم حضور داشت ولی بعد از انتقال به شرایط اولیه در رقم بهاره زودتر از پاییزه محو گردید. همچنین تغییراتی در غلظت باندهای دیگر در هر دو رقم در سرما مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، پروتئین‌های محلول، دمای بهاره‌سازی، کلزا (*Brassica napus L.*)، کمی

مقدمه

بسیاری از گیاهان به‌ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، در دماهای بالاتر از نقطه یخ‌زدگی و پایین‌تر از حدود ۱۵ درجه سانتی‌گراد خسارت می‌بینند. این حالت را سرمازدگی[1] نامیده و از یخ‌زدگی[2] متمایز

1- Chilling
2- Freezing

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

است. بسیاری از گیاهان زراعی اقتصادی و مهم مثل پنبه، سویا، ذرت، برنج و بسیاری از میوه‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جزو گیاهان حساس به سرما طبقه‌بندی می‌گردند (لیونز، ۱۹۷۳). خسارت ناشی از سرما در مراحل حساس رشد و نمو گیاهان یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد گیاهان زراعی در سطح جهان است (بدی و باسرا، ۱۹۹۳). احتمالاً تنش سرما، معمول‌ترین و رایج‌ترین تنش محیطی دوران جوانه‌زنی گیاه محسوب می‌شود. دمای پایین نه تنها باعث کاهش جوانه‌زنی، بلکه به دنبال آن باعث کاهش میزان رشد گیاهچه‌ها و میزان تجمع ماده خشک در آنها می‌گردد (سیمون، ۱۹۷۹). تطابق با سرما با تغییرات مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان همراه است. این تغییرات شامل تغییر در غشاء، ترکیب پروتئین، افزایش مقدار قند، سطوح فیتوهورمون و بیان ژن است (لانگ و همکاران، ۱۹۹٤). معمولاً شباهت‌های فراوانی بین سازش به سرما، شوری و نیز خشکی وجود داشته و بعضی از ژن‌ها در چندین تنش مشترکاً ایفای نقش نموده و در جریان سازش بیان می‌شوند، زیرا این استرس‌ها روی تنش آب سلولی عمل می‌نمایند (پیرس، ۱۹۹۹).

درجه حرارت زیر نقطه اپتیمم از تنش‌های اصلی محدودکننده رشد، تولید و توزیع گیاهان است. بسیاری از گونه‌های نواحی معتدل تحت دمای پایین غیریخ‌ساز، می‌توانند تحمل‌شان را به یخ زدن افزایش دهند که این فرایند تطابق سرمایی[1] نامیده می‌شود (لویت، ۱۹۸۰). طی انطباق با سرما تغییرات زیادی در پارامترهای فیزیولوژیکی و شیمیایی سلول‌های گیاهی رخ می‌دهد که منجر به حفظ سلول در مقابل آسیب‌های سرما می‌گردد. مثلاً پروتئین‌های بیان شده در اثر خوسرمایی، باعث حفاظت دستگاه فتوسنتزی کلزا و آرابیدوپسیس می‌شوند (دالباسکو و همکاران، ۲۰۰۳). افزایش هیدرات کربن (لویت، ۱۹۸۰)، تغییر فعالیت آنزیم‌ها و محتوی ترکیبات محلول، تغییر ترکیبات لیپیدی غشاء سلول، افزایش پروتئین‌های سلولی و تشکیل فرم‌های جدید mRNA و پروتئین از جمله تغییرات سلولی و متابولیکی می‌باشد (کریم زاده و همکاران، ۱۳۸۰الف، ب، ج، و هاگز و دان، ۱۹۹٦). در کلزا سازگاری با سرما پس از ۲ هفته در ٤ درجه سانتی‌گراد در مرحلهٔ اولین برگ لپه‌ای به وقوع می‌پیوندد. بعد از این گیاه می‌تواند سرمای شدید را تحمل نماید (بوث و همکاران، ۱۹۹۵). در کلزای پاییزه بهاره‌سازی قبل از آغازش گل‌آذین لازم است، بطوریکه گیاه به مدت ۲ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا بتواند در بهار به رشد خود ادامه داده و جریان گلدهی نیز بخوبی صورت پذیرد (حجازی، ۱۳۷۹). تحت تأثیر دماهای بهاره‌سازی، القاء و سنتز پروتئین‌های محلول برگ یا ریشه صورت می‌گیرد که این امر منجر به مقاومت گیاه به یخبندان می‌شود (مزاباسو و همکاران، ۱۹۸٦ و پراسیل و همکاران، ۲۰۰٤). از جنبه کاربردی می‌توان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سرما- القایی را از کلزای پاییزه مقاوم به سرما ایزوله و به کلزا یا ذرت حساس بهاره منتقل و باعث مقاومت آنها به سرماهای اواخر زمستان، و اوایل بهار شد. در کلزا رقم Vern- بهاره تولید شده که بهاره بوده و بسیار مقاوم به یخبندان است (جانسون فلانگان و همکاران، ۱۹۹۹). در این تحقیق تغییرات مقدار کمی و الکتروفورزی پروتئین‌های کل محلول برگی در گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L.)، یک رقم بهاره و یک رقم پاییزه، تحت تنش دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

دو رقم کلزا از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

۱- رقم پاییزه (*Brassica napus* L., cv.Symbol) مقاوم به سرما و بومی فرانسه، ۲- رقم بهاره (cv. Hyola 401)، نیمه‌حساس به سرما و بومی کانادا.

این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل سه عاملی؛ دما در ۲ سطح شاهد و بهاره‌سازی (۱۵/۱۰ و ٤/۲ درجه

1- Cold acclimation

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سانتی‌گراد)، رقم در ۲ سطح (پاییزه و بهاره) و زمان‌های نمونه‌برداری در ۱٤ سطح: شامل روز ۳۰ (قبل از انتقال به سرما و در مرحله ٤ برگی)، روزهای زوج ۵۲-۳۲ (در خلال سرما) و روزهای ٥٤ و ٥٦ (بعد از انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد) با ۳ تکرار (گلدان) هر کدام شامل ۳ گیاهچه در طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. گیاهچه‌های شاهد در تمام آزمایش در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و همزمان با گیاهچه‌های تیمار سرمایی نمونه‌برداری شدند. ۵ قسمت خاک برگ + ۲ قسمت شن ریز (ماسه) + ۲ قسمت خاک رس + ۱ قسمت خاک باغچه با هم مخلوط گردید و در گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد قطر دهانه ۱٤ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر ریخته و کشت شدند. بذور هر دو نوع رقم را با محلول ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۳ درصد با چند قطره Tween 20 به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق ضدعفونی کرده و بعد از شستشو با آب مقطر تعداد ٦ عدد بذر در عمق ۲ سانتی‌متر در اتاقک رشد در دمای شاهد (۱۵/۱۰؛ شب/ روز درجه سانتی‌گراد) با شدت نور $۱٤۰\ W\ m^{-2}$ و دوره نوری (۱٦/۸ ساعت؛ شب/ روز) کشت گردیدند. آبیاری و نگهداری از گلدان‌ها به‌طور یکسان برای هر دو رقم تا اتمام آزمایش صورت گرفت. گیاهان شاهد تا آخر آزمایش (روز ٥٦ام) به رشد خود ادامه دادند. گلدان‌های تیمار سرمای بهاره‌سازی، روز سی‌ام به سرمای بهاره‌سازی منتقل شده و به‌مدت ۲۲ روز در این دما نگهداری و در روز ۵۲ به شرایط اولیه برگردانده و تا آخر آزمایش به رشد خود ادامه دادند.

بعد از استخراج پروتئین‌های کل محلول از برگ به روش (گای و همکاران، ۱۹۹۲)، مقدار کمی آنها به روش (برادفورد، ۱۹۷٦) و بوسیلهٔ اسپکتروفتومتر NUCAM 8620, UV/VIS در طول موج nm ۵۹۵ تعیین شد. روش برادفورد نسبت به دیگر روش‌های مختلف اندازه‌گیری مقدار کمی پروتئین‌ها، ساده‌تر، حساس‌تر، سریع‌تر و دقیق‌تر می‌باشد و برای اندازه‌گیری مقدار کمی در حد میکروگرم کاربرد دارد. اساس این روش اتصال ماده کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ با پروتئین در محیط اسیدی و تعیین جذب ماکزیمم در طول موج‌های nm ٤٦٥ تا ۵۹۵ می‌باشد (بیرانوند، ۱۳۸۱). آنالیز داده‌های کمی پروتئین‌ها شامل تجزیه اضافی[1] (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۷٦) و تجزیه واریانس توسط نرم‌افزار Minitab 13.1 انجام شد. سپس مقدار ٤٥ میکروگرم نمونه پروتئینی روی ژل الکتروفورز SDS-PAGE با غلظت ۱۵ درصد بار گردیده و بعد از الکتروفورز کار رنگ‌آمیزی، رنگ‌بری و در نهایت اسکن ژل انجام شد.

نتایج و بحث

در هر دو رقم، اثرات اصلی دما و زمان‌های نمونه‌برداری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول‌های ۱ و ۲). مقدار کمی پروتئین‌های محلول برگ، در سرمای بهاره‌سازی بیشتر از دمای شاهد، و در رقم پاییزه نیز بیشتر (در سطح ۱ درصد) از رقم بهاره بود. در رقم پاییزه نسبت به بهاره از روز ۳۸ (۸ روز در سرما) تا روز ٥٤ (۲ روز بعد از رفع سرما) بین دو سرمای بهاره‌سازی و شاهد تفاوت معنی‌داری موجود بوده و پروتئین بیشتری سنتز شده است (شکل ۱: A و B؛ جدول‌های ۱ و ۲). در رقم بهاره سرما دیده نیز مقدار پروتئین در سرمای بهاره‌سازی بیشتر از شاهد بهاره ولی کمتر از پاییزه سرما دیده بود. با شروع دوره سرما مقدار پروتئین در هر دو رقم شروع به افزایش نمود، و در رقم پاییزه با رقم بهاره تفاوت داشت و بعد از رفع سرما دوباره کاهش و به مقداری که قبل از سرما داشت رسید. دو رقم

۱- در مواردی که در جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل معنی‌دار شوند، آزمون اثرات اصلی از اعتبار کافی برخوردار نبوده و بایستی اثرات متقابل را تفکیک و بررسی نمود (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۷٦). در این آزمایش اثر متقابل دما و نمونه‌برداری در رقم پاییزه دارای درجه آزادی ۱۳ و معنی‌دار است. لذا حداقل یک جفت از ۱٤ جفت داده های شاهد و سرمایی (شکل۱) دو تیمار متفاوتند. تجزیه اضافی این تحلیل را انجام و نشان داد که در روزهای ۳۸ تا ٥٤ بین میزان پروتئین‌های شاهد و سرمایی رقم پاییزه تفاوت وجود داشت.

از این نظر با هم تفاوت معنی‌دار دارند. بین دو دما، بین زمان‌های نمونه‌برداری و نیز اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت.

از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگی، در روز ۳۰ قبل از انتقال به سرما، ٦ نوع پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۳/۷، ١٤ (زیر واحد کوچک روبیسکو؛ SSU[1])، ۲۹/٤، ۳۵/۵، ۵۵ (زیر واحد بزرگ روبیسکو؛ LSU[2]) و ٥٦/۳ kDa در هر دو رقم بهاره و پاییزه مشاهده شد (شکل‌های ۲، ۳). لذا وجود این پلی‌پپتیدها در دوره سرما (در هر دو رقم) دلیلی بر پروتئین خاص مقاومت به سرما نیست، بلکه احتمالاً مربوط به رشد و نمو بوده و در اثر سرما تراکم‌شان افزایش یافته است. تغییر در تراکم این پلی‌پپتیدها، شامل افزایش، کاهش تراکم و ناپدید شدن آنها، احتمالاً در اثر سرما به وقوع پیوسته است. در هفته اول اعمال سرمای بهاره‌سازی، مهم‌ترین تغییر مشاهده شده کاهش تراکم SSU در رقم پاییزه می‌باشد. این کاهش در مورد رقم بهاره نیز بعداً صورت گرفت. کاهش غلظت زیر واحد SSU معمولاً به مراتب بیش از زیر واحد بزرگ به وقوع پیوسته و این زیر واحد از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به LSU به سرما برخوردار است (مراباسو و همکاران، ۱۹۸٦). در کلزا نیز همانند برنج، تیمار سرما (٥-٤ درجه سانتی‌گراد)، باعث ممانعت از سنتز SSU و LSU در گیاهچه‌ها می‌شود (لنگ و همکاران، ۱۹۹٤).

از روز ۳٤ تراکم LSU در رقم پاییزه تا روز ٤٤ کاهش یافت (شکل‌های ۲ و ۳) و در روز ٤٤ (شکل ۳) همزمان با تولید پلی‌پپتید جدید با وزن ملکولی kDa ٤۷/۷ تراکم آن (LSU) دوباره افزایش یافت. زیر واحدهای روبیسکو بخصوص SSU در اوایل اعمال سرمای بهاره‌سازی تقریباً زودتر از دیگر پلی‌پپتیدهای گیاه واکنش داده و شروع به کاهش نمودند و ۱۰ روز بعد از این کاهش دوباره شروع به افزایش نمودند. این مسئله به واکنش کلروپلاست به دماهای پایین برمی‌گردد. زیرا، کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها اولین اندامک‌های سلولی گیاهی هستند که تحت تأثیر سرما قرار می‌گیرند (دالباسکو و همکاران، ۲۰۰۳). در اوایل سرما کاهش فعالیت زیر واحد SSU صورت گرفته و بعد از آن تراکم LSU نیز با تأخیر نسبت به SSU شروع به کاهش می‌کند که به حساسیت بیشتر آن نسبت به LSU مربوط می‌شود. در روزهای ٤٤- ٤٨ پلی‌پپتید جدید با وزن kDa ٤۷/۷ در رقم پاییزه سرما دیده تولید شده و به مدت ٦ روز دوام داشت. در رقم بهاره نیز در روز ٤٨ (٤ روز دیرتر از رقم پاییزه) تشکیل پلی‌پپتید مذکور صورت گرفته و در روز ٥٠ اثری از آن دیده نشد و لذا نسبت به رقم پاییزهٔ مقاوم به سرما از ثبات کمتری برخوردار بود. احتمالاً پلی‌پپتید جدید از نوع پروتین‌های سرما القایی بوده و بعد از سنتز در هسته، به کلروپلاست‌ها رفته و در آنجا کار محافظت از زیر واحدهای روبیسکو، دستگاه فتوسنتزی و کلروپلاست‌ها را در مقابل دماهای پایین بر عهده می‌گیرد (آرتوس و همکاران، ۱۹۹٦؛ تاماشاو، ۲۰۰۱؛ دالباسکو و همکاران، ۲۰۰۳؛ تاکومی و همکاران، ۲۰۰۳).

در این تحقیق، بیان ژن‌های کدکننده بعضی پلی‌پپتیدها کاهش، افزایش یا متوقف شده و در صورت ناپدید شدن آنها، احتمالاً ژن‌های دیگری عمل مشابه آنها را در استرس سرما انجام می‌دهند. افزایش، کاهش و یا ناپدید شدن پلی‌پپتیدهای موجود نیز، جزء واکنش‌های گیاه در مقابل سرما محسوب می‌شود. گیاه در اوایل دوره سرمایی به سرما واکنش نشان داده که این واکنش با کاهش، افزایش و یا ناپدید شدن پلی‌پپتیدها صورت می‌گیرد. بعد از مدتی که در سرما گذشت گیاه شروع به بازیابی خود نموده که این بازیابی احتمالاً به دلیل دخالت ژن‌های القاء سرمایی می‌باشد (هاگز و دان، ۱۹۹٦). در آزمایش‌های دیگری که بر روی گیاهان گندم و جو تحت تیمارهای سرمایی انجام پذیرفت نتایجی مشابه به‌دست آمد. به‌طوری‌که تیمار سرما باعث افزایش معنی‌دار در مقدار کمی پروتئین‌های محلول گردید. تحت این تیمار بیان پروتئین‌های محلول در ژل الکتروفورز مشاهده گردید (کریم‌زاده و همکاران، ۲۰۰۳).

1- SSU, small subunit of Rubisco
2- LSU, large subunit of Rubisco

می‌توان نتیجه‌گیری نمود که هر دو رقم برای مقاومت نمودن در برابر سرما با افزایش تراکم پروتئین‌های محلول در برگ اقدام می‌کنند که این مسئله در الگوی الکتروفورزی نیز مشهود است، و با احتمال زیاد ژن‌های درگیر در پدیده مقاومت به سرما به‌طور تدریجی شروع به فعالیت می‌نمایند، نه اینکه به‌طور ناگهانی و سریع ایجاد مقاومت به سرما نمایند.

سپاسگزاری

مؤلفین از پروفسور مارسین راپاژ از دانشگاه کراکو لهستان و پروفسور اولدا ندوید از دانشگاه ساوت بوهیمیا جمهوری چک به‌خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌نماید.

جدول ۱- تجزیه واریانس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار مقدار پروتئین‌های کل محلول در برگ کلزا رقم پاییزه Symbol و رقم بهاره Hyola 401 .

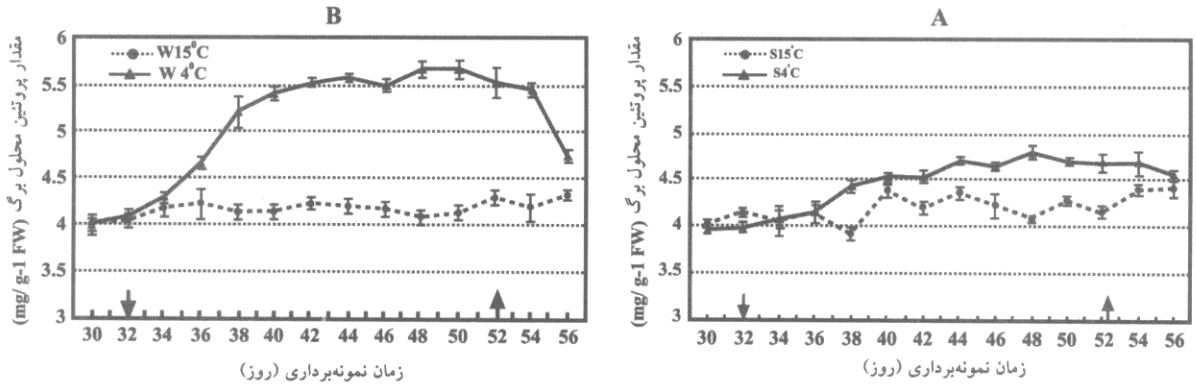
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۱	۷۳۳۹/۱۲**
رقم	۱	۱۹۷/۵۶**
نمونه برداری	۱۳	۹/۳۵***
دما × نمونه برداری	۱۳	۱/۳۳**
دما × رقم	۱	۰/۰۲*
رقم× نمونه برداری	۱۳	۰/۰۰***
دما × رقم × نمونه برداری	۱۳	۰/۰۰***
خطا	۱۱۲	۰/۰۳
کل	۱۶۷	۹۹۳۷/۰۹

جدول ۲- اثر متقابل دما × نمونه‌برداری به همراه میانگین و انحراف استاندارد در کلزای پاییزه Symbol برای مقدار کمی پروتئین‌های محلول برگی ($Mg\ g^{-1}$ Fw).

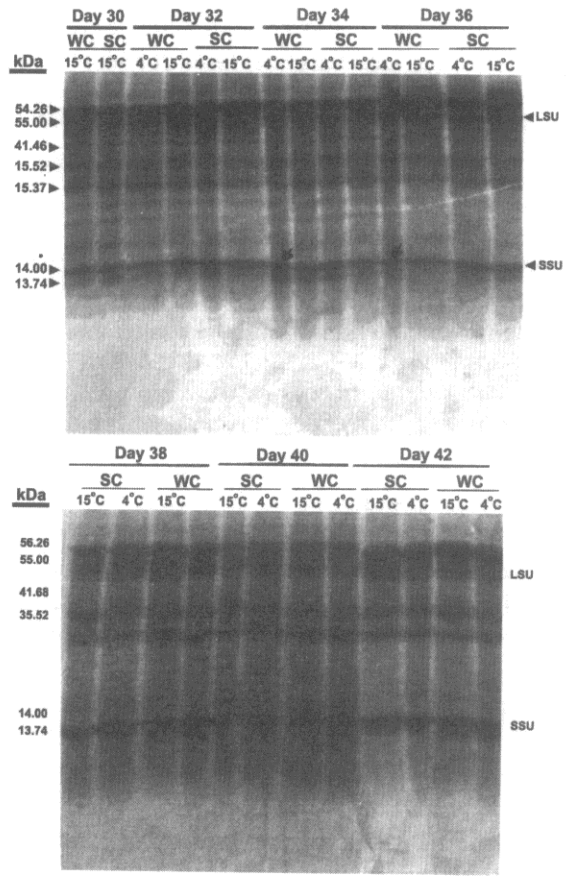
روزهای نمونه برداری	تیمار شاهد (۱۵/۱۰°C؛شب/روز) SE ± میانگین	تیمار سرما (۴/۲ °C؛شب/روز) SE ± میانگین	میانگین مربعات
۳۰	۳/۹۸ ± ۰/۵۴۸^{e}	۳/۹۹ ± ۰/۲۹۳^{e}	۰/۰۰۰۶۰^{ns}
۳۲	۴/۰۳ ± ۰/۶۳۰^{e}	۴/۰۶ ± ۰/۰۸۶^{e}	۰/۰۰۰۱۵^{ns}
۳۴	۴/۱۶ ± ۰/۲۱۱^{ed}	۴/۲۸ ± ۰/۰۵۶^{ecd}	۰/۰۰۲۴۰^{ns}
۳۶	۴/۲۱ ± ۰/۷۸۱^{ecd}	۴/۶۶ ± ۰/۱۱۹^{cd}	۰/۰۳۳۷۵^{ns}
۳۸	۴/۱۲ ± /۶۵۲^{ed}	۵/۲۲ ± ۰/۱۱۹^{ab}	۰/۲۰۱۶۷*
۴۰	۴/۱۲ ± ۰/۸۰۷^{ed}	۵/۴۲ ± ۰/۷۱۰^{a}	۰/۲۸۱۶۷**
۴۲	۴/۲۱ ± ۰/۲۵۴^{ecd}	۵/۵۳ ±۰/۳۳۶^{a}	۰/۲۹۰۴۰***
۴۴	۴/۱۹ ± ۰/۸۱۵^{ed}	۵/۵۸ ±۰/۳۳۹^{a}	۰/۳۲۲۰۰***
۴۶	۴/۱۶ ± ۱/۲۸۰^{ed}	۵/۵۱ ±۰ /۰۷۰^{a}	۰/۳۰۳۷۵***
۴۸	۴/۰۸ ± ۰/۷۴۸^{ed}	۵/۶۸ ± ۰/۷۰۰^{a}	۰/۴۲۶۶۷***
۵۰	۴/۱۲ ± ۰/۰۸۸^{ed}	۵/۶۸ ± ۰/۶۳۰^{a}	۰/۴۰۵۶۰***
۵۲	۴/۲۹ ± ۰/۷۶۰^{ecd}	۵/۵۴ ± ۰/۲۳۱^{a}	۰/۲۶۰۴۲***
۵۴	۴/۱۸ ± ۰/۵۶۵^{ed}	۵/۴۷ ± ۰/۷۲۲^{a}	۰/۲۷۷۳۵**
۵۶	۴/۳۲ ± ۱/۰۳۵^{ecd}	۴/۷۵ ± ۷۰۵^{bc}	۰/۰۳۰۸۲^{ns}

^{ns} (non significant) اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

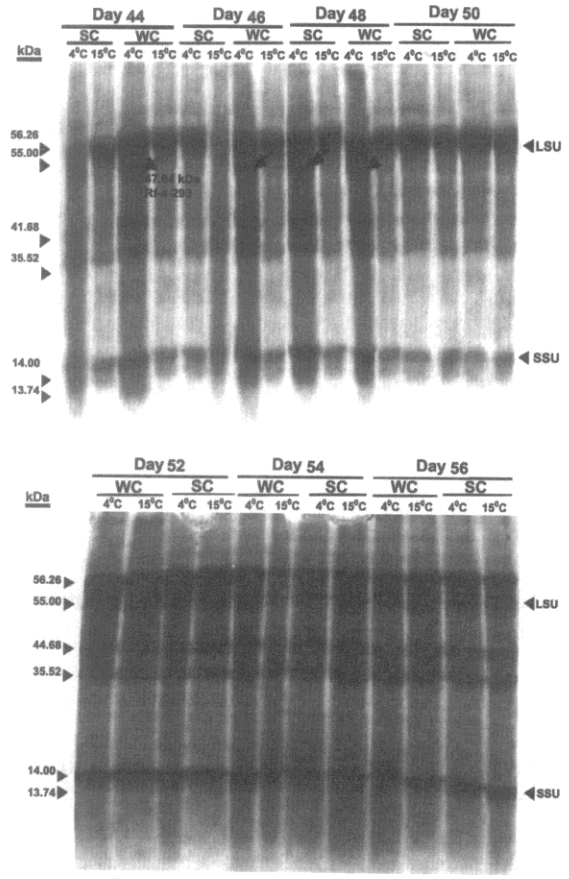
*,**,*** اختلاف معنی‌دار به‌ترتیب در سطوح احتمال ۵، ۱ و ۰/۱ درصد



شکل ۱- نمودار اثر متقابل دما *زمان‌های نمونه‌برداری در مقدار پروتئین محلول در برگ کلزا A: رقم بهاره (Hyola 401)، B : رقم پاییزه W: Winter canola, S: Spring canola ↑↓ (Symbol) روزهای ورود و خروج از سرما.



شکل ۲- تغییرات در الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های کل محلول برگ کلزاهای بهاره (Hyola 401) و پاییزه (Symbol) در تیمار سرمایی (۴°C) و شاهد (۱۵°C) در روزهای ۴۲-۳۰ نمونه‌برداری. WC, Winter canola; SC, Spring canola.



شکل ۳- تغییرات در الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های کل محلول برگ کلزاهای بهاره (Hyola 401) و پاییزه (Symbol) در تیمار سرمایی (۴°C) و شاهد (۱۵°C) در روزهای ۵۶-۴۴ نمونه‌برداری. WC, Winter canola; SC, Spring canola.

منابع

۱.بیرانوند، ع. ۱۳۸۱. بررسی اثر سرمای بهاره سازی روی مقدار کمی و الگوی الکتروفورزی پروتئینهای محلول برگی و فلوئورسانس کلروفیل ارقام بهاره و پاییزه کلزا. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس، ۱۷۰ ص.

۲.حجازی، ا. ۱۳۷۹. کلزا، چاپ اول، انتشارات روزنه، ۱۵۷ ص.

۳.کریم‌زاده، ق.، باقری، خ. و جلالی جواران، م. ۱۳۸۰الف. بررسی اثر تنش سرما برروی الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های محلول کالوس‌های جنینی گندم. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ۱۹-۱۷ مهر ماه ، ۱: ۷۵۹-۷۵۲.

٤.کریم‌زاده، ق.، شریفی، غ.، جلالی جواران، م. و دهقانی، ح. ۱۳۸۰ب. تغییرات القاء سرمایی الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگی در ارقام گندم در فصل اول رشد. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ۱۹-۱۷ مهرماه، ۱: ٤۳۰-٤۲۳.

٥.کریم‌زاده، ق.، درویش زاده، ر.، جلالی جواران، م. و دهقانی، ح. ۱۳۸۰ج. تغییرات الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های محلول در برگ ارقام جو در پاسخ به سرمای بهاره کردن. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ۱۹-۱۷ مهر ماه ، ۱: ۷٦٥-۷٦۰.

٦.یزدی صمدی، ب.، رضایی، ع. م. و ولی زاده، م. ۱۳۷٦. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی، انتشارات دانشگاه تهران، ۷٦٤ ص.

7.Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.G., Lin, C.T., and Tomashow, M.F. 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. The Proceedings of the National Academy of Science, USA, 39: 13404-13409.

8.Bedi, S., and Basra, A.S. 1993. Chilling injury in germinating seeds: Basic mechanism and agricultural implications. Seed Science Research, 3: 219-229.

9.Boothe, J.G., De Beus, M., and Johnson-Flangan, A.M. 1995. Expression of a low- temperature-induced protein in *Brassica napus* L. Plant Physiology, 108: 795-803.

10.Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram principle of protein dye binding. Annals of Biochemistry, 72: 248-254.

11.Dal Bosco, C., Busconi, M., Govoni, C., Baldi, P., Stanca, A.M., Crossati, C., Bassio, R., and Cattivelli, L. 2003. *cor* Gene expression in barley mutants affected in chloroplast development and photosynthetic electron transport. Plant Physiology, 131: 793–802.

12.Guy, C.L., Haskell, D., Neven, L., Klein, P., and Smelser, C. 1992. Hydration state-responsive protein like cold and drought stress in spinach. Planta, 188: 265-270.

13.Hughes, M.A., and Dunn, M.A. 1996. The molecular biology of plant acclimation to temperature. Journal of Experimental Botany, 47: 291-305.

14.Johnson-Flanagan, A.M., Deng, Z., Go, N.E., and Hawkins, G.P. 1999. VERN-: Bridging the gap between winter and spring canola. The Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

15.Karimzadeh, G., Bagheri, K., and Jalali-Javaran, M. 2003. Changes in the callus soluble proteins of winter and spring wheat cultivars following cold treatment. Plant Tissue Culture, 13 (2): 135-144.

16.Karimzadeh, G., Francis, D., and Davies, M.S. 2000. Low temperature-induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat. Annals of Botany, 85: 769-777.

17.Lang, S.P., Humphries, S., and Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Bilology, 45: 633-662.

18.Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. I: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. 2nd edn. New York: Academic Press, USA, 468 pp.

19.Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. Annual Review of Plant Physiology, 4: 445-466.

20.Meza-Basso, L., Alberdi, M., Raynal, M. Ferreo-Cadinanos, M., and Delseny, M. 1986. Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings during low temperature treatment. Plant Physiology, 82: 733-738.

21.Pearce. R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regulation. 29: 47-76.

22.Prasil, I.T., Prasilova, P., and Pankova, K. 2004. Relationships among vernalization, shoot apex development and frost tolerance in wheat. Annals of Botany, 94: 413–418.

23.Simon, E.W. 1979. Seed germination at low temperatures. In: Low Temperature Stress in Crop Plants, The Role of the Membrane. Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. eds., NewYork: Academic Press, USA, 37 pp.

24.Takumi, S., Koike, A., Nakata, M., Kume, S., Ohno R., and Nakamura, C. 2003. Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein. Journal of Experimental Botany, 54 (391): 2265-2274.

25.Tomashow, M.F. 2001. So what`s new in the field of cold acclimation? lots! Plant Physiology, 125: 89-93.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(5), Jan - Feb 2006
www.magiran.com/jasnr

Study of a vernalization temperature on quantitative and electrophoretic changes of leaf soluble proteins in winter and spring canola (*Brassica napus*) cultivars

A. Beyranvand[1], G. Karimzadeh[2] and A. Sorooshzadeh[3]
[1]Former M.Sc. Student, [2] & [3] Faculty Members of Plant Breeding and Agronomy Departments, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University

Abstract

Quantitative and electrophoretic patterns of leaf soluble proteins of canola (*Brassica napus* L.) winter (cv. Symbol) and spring (cv. Hyola 401) cultivars were assessed in response to a vernalization temperature (4°C). Seeds were grown in a growth chamber at 15/10°C (day/night), with 140 W m^{-2} light density and 16/8 h photoperiod. Control plants were grown continuously in these conditions until day 56. On day 30 (4th fully expanded leafy stage), cold treated seedlings were transferred to 4°C, followed by transfer to original conditions. Seedlings were sampled every 48 h for leaf fresh weight measurements. Soluble proteins were extracted from the leaves, and their amounts were measured, using spectrophotometery. Proteins data were analysed as 3-factorial experiment on the basis of completely random design (CRD): cultivar (2 levels), temperature (2 levels), and sampling time (14 levels) in 3 replications. Then, 45 µg of proteins was loaded on SDS-PAGE gel with 15% density. ANOVA results showed that all main effects and their interactions were highly significant. Temperature alterations showed no substantial effects on proteins amount in the cold-treated leaves of spring canola but, considerable accumulation of proteins was recognized in those of winter canola. This accumulation was detected from 8 day at 4°C continuing until 2 day of transfer from cold to the 15°C-conditions (day 54) in the winter cultivar. In the latter cultivar, the 2-week cold-treated seedlings (day 44) produced a new 47.7 kDa cold-induced polypeptide in their leaves compared with the controls: such response was identified 2 d later in the cold-treated seedlings of spring cultivar. This pattern was lasted until 18 d at 4°C (day 48) in the leaves of both cultivars but, after the return to 15°C, it disappeared in the spring earlier than the winter canola. Moreover, changes in the intensity of some protein patterns were distinguished in both cultivars at 4°C compared with those in the controls.

Keywords: Canola (*Brassica napus* L.); Electrophoresis; Quantitative; Soluble proteins; Vernalization temperature

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی