مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی ارقام کلزای بهاره از نظر برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک تحت تنش خشکی و تجزیه پروتئوم متحمل‌ترین و حساس‌ترین آنها

معروف خلیلی*[1]، محمدرضا نقوی[2]

[1]استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

[2]استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۹

چکیده

در این پژوهش با توجه به اهمیت تنش خشکی و همچنین گیاه کلزا، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از ده رقم کلزای بهاره در مرحلهٔ گیاهچه‌ای به روش کشت هیدروپونیک و با اعمال تنش خشکی ناشی از PEG_{6000} انجام شد. دو هفته پس از اعمال تنش و در پایان مرحله روزت نمونه‌برداری انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط تنش ارزش صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک کاهش یافت. همچنین بین ارقام مورد مطالعه از لحاظ پاسخ به تنش خشکی تنوع وجود داشت و در مجموع متحمل‌ترین و حساس‌ترین ارقام از نظر صفات مطالعه شده بترتیب رقم SW5001 و Sarigol بودند که برای مطالعات تکمیلی روی این دو رقم تجزیه پروتئوم انجام شد. برای بررسی الگوی پروتئینی، استخراج پروتئین از بافت برگی انجام و الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG و الکتروفورز بعد دوم با تکنیک SDS-PAGE اجرا شد و پس از رنگ آمیزی با آبی کوماسی تصویربرداری از ژل‌ها و تجزیه لکه‌های پروتئینی با نرم‌افزار PDQuest انجام شد. در نهایت تعداد ۲۵ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی برای هر دو رقم، تشخیص داده شدند که از این تعداد ۱۵ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و تعداد شش لکه پروتئینی منحصر به رقم متحمل و چهار لکه پروتئینی منحصر به رقم حساس بودند. پس از شناسایی این پروتئین‌ها با طیف‌سنجی جرمی، در مجموع بیشترین گروه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم، پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز، چرخه کالوین و پروتئین‌های سم‌زدا بودند. در مجموع مهمترین دلیل حساسیت و تحمل ارقام در کلزا بیان متفاوت و القای منحصر به فرد پروتئین‌ها و در نهایت تأثیر آنها روی سایر صفات بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: *پروتئومیک، تنش خشکی، صفات فیزیولوژیک، کلزا.*

* نویسنده مسئول: معروف خلیلی تلفن: ۰۴۴۴۲۳۳۵۰۹۰ Email: makhalily@yahoo.com

مقدمه

تنش خشکی یکی از علل اصلی خسارت به گیاهان زراعی در سرتاسر جهان از طریق کاهش میانگین عملکرد تا میزان ۵۰ درصد می باشد (Wange *et al*., 2003). تنش خشکی هنگامی افزایش می یابد که میزان تبخیر بالای برگها از ظرفیت و توانایی ریشه ها برای جذب آب از خاک تجاوز نموده و فراتر رود (Edmeads *et al*., 1989). با توجه به اینکه ایران جزء مناطق خشک و نیمه خشک دنیا محسوب می‌شود، در چنین مناطقی نوسانات بارندگی نیز زیاد بوده و ممکن است برخی از مراحل مهم رشدی گیاه به دلیل کم آبی تحت تأثیر کاهش پتانسیل آب خاک قرار گیرد (Noroozi & Kazemi, 2012). تحمل خشکی از نظر ژنتیکی یک صفت ساده نبوده، بلکه صفتی کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف می‌باشد که بطور مثال با صفات محتوای آب نسبی برگ، پتانسیل کل آب برگ، پتانسیل اسمزی، فلورسانس کلروفیل، تجمع پرولین، تجمع آبسیزیک اسید و تنظیم اسمزی ارتباط دارد (Reynolds *et al*., 1994). بعبارت دیگر، ویژگیهای فیزیولوژیکی متعددی می‌توانند در تداوم رشد تحت شرایط خشکی مشارکت کنند. فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان عمدتاً تابع آب در گیاه بوده و به طور غیرمستقیم تحت تأثیر تنش آب در خاک قرار دارند (Kramer, 1969). از طرف دیگر، مقدار آب نسبی برگ (RWC[1]) یک صفت فیزیولوژیکی است که بارها بعنوان معیار گزینش برای تحمل خشکی پیشنهاد شده است (Schonfeld *et al*., 1988). در مورد گونه‌های جنس *Brassica* اظهار شده است که ارتباط دقیقی بین تولید زیست توده و مقدار آب وجود دارد (Ashraf & Mehmood, 1990). همچنین، تنظیم اسمزی یک سازوکار سازگاری به کمبود آب می‌باشد که با افزایش میزان املاح در سلولها می تواند باعث حفظ تورم و فرآیندهای مربوطه در پتانسیل‌های آب پایین گردد (Kumar *et al*., 1984). حفاظت از پتانسیل اسمزی مثبت برگ با تجمع ترکیباتی مثل مانیتول، رافینوز، تری هالوز، پرولین و گلایسین بتائین که اصطلاحاً محلول‌های سازگار نامیده می‌شود بدست می اید (Verslues *et al*., 2007). اظهار شده است که پتانسیل آب بافت گیاهان در بین لاین های مقاوم و حساس به خشکی متفاوت است (Kumar & Elston, 1992). با توجه به نتایج آزمایشات مشخص شده است که پتانسیل آب برگ تحت شرایط تنش خشکی معمولاً افت می‌کند (Kumar & Elston, 1992). به نظر می‌رسد تنظیم اسمزی در گونه‌های جنس *Brassica* به صورت مثبت با عملکرد دانه در ارتباط می باشد. بعنوان مثال خردل هندی در شرایط تنش خشکی دانه‌های بیشتری در خورجین خود نگه می دارد که علت این امر وجود سازوکار تنظیم اسمزی در دوره بحرانی برای سقط دانه و نیز کارآیی بالاتر مصرف آب باشد (Orama & Kirk, 1993). از

[1] Relative Water Content

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

طرف دیگر، از جمله رویدادهای مهم بیوشیمایی در گیاهان تحت تنش، تغییرات به صورت کاهش یا افزایش پروتئین، محلولهای قندی و پرولین می‌باشد (Paleg & Aspinall, 1989). پرولین بعنوان یک اسمولیت برای تنظیم اسمزی است و توزیع آن ساختار دیواره سلولی و پروتئین‌ها را پایدار می کند و رادیکالهای آزاد را حذف می کند (Srnivas & Subramanian, 1993). میزان تجمع پرولین در تنش متوسط یا شدید نسبت به سایر اسید آمینه ها افزایش می یابد. پرولین بعنوان یک مخزن ذخیره نیتروژن و یا ماده محلولی که پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد عمل می‌نماید و گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌دهد (Srnivas & Subramanian, 1993). نشان داده شده است که وقتی برگهای کلزا بصورت جدا کشت در محیط آزمایشگاهی تحت تنش اسمزی بالایی قرار داده می‌شوند، میزان پرولین زیادی در برگها تجمع می‌یابد (Valeri *et al.*, 2002). هم چنین گزارش شده است که میزان پرولین تجمع یافته در برگهایی که تحت تنش ملایم بودند حدود ۲۰۰ میکرومول بر گرم وزن خشک افزایش یافته و ثابت باقی می‌ماند (Valeri *et al.*, 2002).

شاخص کلروفیل برگها یک شاخص مفید نشان‌دهنده پتانسیل فتوسنتزی و قدرت عمومی گیاه می‌باشد (Alonso *et al.*, 2002). در بافت سبز، پرتوهای فعال فتوسنتزی بوسیله کلروفیل و رنگدانه های جانبی جذب می شوند و به مرکز فعالیت فتوسیستم I و II، جائیکه تغییر و تبدیل فرآیندهای فتوسنتزی در آنجا اتفاق می‌افتد، حرکت می‌کنند (Horton *et al.*, 1996). اندازه گیری فلورسانس کلروفیل یک تکنیک نسبتاً جدیدی است که برای ارزیابی فعالیت‌های فتوسنتزی گیاهان در مزرعه بکار می‌رود (Kocheva *et al.*, 2004). این تکنیک بر اساس محاسبات فیزیولوژیکی پایه ریزی شده و بازده سازوکار برداشت و جذب نور را در ارتباط با فعالیت های فتوسیستم II کلروفیل اندازه گیری می‌کند (Maxwell & Johnson, 2000). گزارش شده است که میزان عملکرد فتوشیمیایی در فتوسیستم II (Fv/Fm) تحت شرایط غیر تنش بدون تغییر، اما تحت تنش خشکی کاهش یافت (Mohammadian *et al.*, 2003). همبستگی معنی‌داری بین Fv/Fm و پتانسیل آب برگ در گیاهان تحت تنش گزارش شده است. در این آزمایش وقتی پتانسیل آب برگ به کمتر از ۰/۹ مگا پاسگال رسید نسبت Fv/Fm کاهش یافت (Zulini *et al.*, 2002).

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که تحمل خشکی در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است و با انواع سازوکارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در ارتباط است. در این راستا پروتئومیک یکی از رهیافتهای مهم برای درک اساس مولکولی تحمل تنش است تا تغییرات القا شده توسط تنش در سطح پروتئین‌ها مورد شناسایی و بررسی قرار گیرد (Thiellement *et*

al., 2002). بمنظور ارزیابی تأثیر تنش خشکی در مراحل اولیه رشد برنج بر تغییرات بیان پروتئین-های غلاف برگ این گیاه آزمایشی انجام شد (Ali & Komatsu, 2006). گیاهچه‌های دو هفته‌ای برنج به مدت دو تا شش روز تحت تنش خشکی قرار داده شد و تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی با بعد اول IEF و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی آبی کوماسی و توالی-یابی کروماتوگرافی مایع انجام گرفت. نتایج نشان داد که تعداد ۱۰ پروتئین افزایش بیان و ۲ پروتئین کاهش بیان معنی‌داری دارند که با گروهبندی این پروتئین‌ها مشخص شد که در فعالیت‌های دفاعی، تأمین انرژی، متابولیسم، ساختار سلولی و ترارسانی پیام نقش داشتند. همچنین اظهار شده است که فاکتور actin depolymerizing یک پروتئین هدف القایی تحت تنش خشکی می‌باشد (Ali & Komatsu, 2006). در آزمایش دیگری روی گندم دوروم که توسط Caruso *et al*. (2009) انجام شد، تنش خشکی به مدت هفت روز بر گیاهچه‌های هفت روزه اعمال و با گیاهان شاهد مقایسه گردید. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی در بعد اول به صورت IPG و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی توسط کوماسی و طیف سنجی جرمی نشان داد که ۳٦ لکه پروتئینی به صورت تکرارپذیر دارای تغییرات بیان معنی‌دار بین تنش و شاهد بودند. با گروهبندی این پروتئین‌ها مشخص شد که سهم نسبی این پروتئین‌ها بصورت دخالت در گلیکولیز، ۱۸٪؛ دخیل در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، ۱۵٪؛ دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه، ۱۲٪؛ در چرخه کالوین، ۹٪؛ در سازوکار-های دفاعی، ٦٪؛ و در تنظیم پس از ترجمه، ۳٪ بود. همچنین در تجزیه پروتئوم ژنوتیپ‌های جو تحت تنش خشکی اظهار شده است که در مطالعه ژنوتیپ‌های متحمل و حساس پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز همراه با سنتز آمینواسیدها و پروتئین-های مرتبط با degradation بیان متفاوتی داشتند (Kausar *et al*., 2013). این نتایج نشاندهنده نقش مهم پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم کلروپلاستی و تولید انرژی در سازگاری با شرایط تنش کمبود آب در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشد. در این راستا، هدف این پژوهش مقایسه و بررسی واکنش فیزیولوژیکی و مورفولوژیک ارقام کلزا تحت تنش خشکی و در نهایت بررسی الگوی الکتروفورز دوبعدی حساس‌ترین و متحمل‌ترین ارقام کلزا تحت تنش خشکی و در نتیجه شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار تحت تنش و بررسی نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای ترارسانی مولکولی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ده رقم کلزای بهاره در مرحلهٔ رشد رویشی (گیاهچه‌ای) به روش کشت سیستم آبکشت (هیدروپونیک) در سال ۱۳۹٤ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه مهاباد از نظر پاسخ به تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ارقام Olga، Sarigol، Heros،

Cracker، Option500، Comet، Hyola308 ، Amica، Eagle و SW500l بودند که جزو ارقام بهاره کلزا در کشور طبقه‌بندی می‌شوند. در این پژوهش تنش خشکی با استفاده از PEG_{6000} اعمال گردید. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمایش تنش خشکی فاکتور تنش شامل شاهد (بدون استفاده از PEG_{6000}) و 20% PEG_{6000} (-0.52MP) حجمی بودند. دو هفته پس از اعمال تنش خشکی و در پایان مرحله روزت نمونه‌برداری از کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد. سپس محتوای آب نسبی برگها به روش Morant-Manceau *et al.*, (2004) محاسبه شد. برای تعیین پتانسیل آب برگ از دستگاه محفظه فشار مدل (Soil Moistur Equipment crop, Sanat Barbara, CA) استفاده گردید. پتانسیل اسمزی نیز با استفاده از دستگاه اسمومتر(مدل Osmomat o10, Gonotec) اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان هدایت روزنه‌ای برگ از دستگاه پرومتر (Delta-T Devices, Cambridge, UK) استفاده گردید. از طرف دیگر برای اندازه‌گیری فلورسانس از دستگاه فلورومتر (مدل Opti Science, OS-3OMSA) استفاده شد. همچنین، شاخص کلروفیل برگها با استفاده از دستگاه کلروفیل متر(مدل SPAD-502, Mlolta, Japan) مشخص شد. غلظت پرولین برگ به روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) و میزان گلایسین بتائین نیز به روش گریو و گراتن (Grieve & Grattan, 1983) و با اسپکتروفتومتر تعیین شد. همچنین شاخص سطح ویژه برگ از طریق محاسبه نسبت سطح برگ دوم (سانتی‌متر مربع) به وزن خشک برگ (گرم) آن به دست آمد (Arias, 2007). پس از جمع‌آوری داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه، تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه بر اساس طرح آزمایشی و همچنین مقایسه میانگین برای سطوح تنش و ارقام به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

از طرف دیگر برای تجزیه پروتئوم، استخراج پروتئین کل برگ (Damerval *et al.*, 1986) از هر دو رقم Sarigol و SW5001 انجام شد و الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG (تهیه شده از شرکت Pharmacia) و الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE (Herbert, 1999) اجرا شد. رنگ آمیزی با استفاده از محلول آبی کوماسی انجام و در نهایت لکه‌های پروتئینی تکراردار در دو رقم متحمل و حساس توسط نرم‌افزار PDQuest شناسایی و برچسب زده شد. درصد حجمی این نقاط تکراردار که توسط نرم-افزار کمی شده بودند، مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. در تجزیه واریانس برای انتخاب نقاط پروتئینی که نسبت به تنش عکس‌العمل معنی‌دار نشان داده بودند، سطح احتمال معنی‌داری ۵٪ مد نظر قرار گرفت. از بین نقاط انتخاب شدهٔ معنی-

دار، نقاطی که IF (Induction Factor) آنها بزرگتر از ۲ و یا کوچکتر از ۰/۵ بود، مورد انتخاب نهایی قرار گرفتند. نقطه‌ای دارای IF بزرگتر از واحد است که تحت تنش خشکی افزایش بیان نشان داده است. برای کاهش ریسک این مقدار بزرگتر از ۲ گرفته شد. در مقابل، نقاط دارایIF کمتر از واحد دارای کاهش بیان تحت تنش خشکی هستند و در اینجا هم برای کاهش ریسک، مقدار کمتر از ۰/۵ مد نظر قرار گرفت. در نهایت پس از هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی هدف، از دستگاه طیف سنجی جرمی دو مرحله-ای (MS/MS) مدل Optizen 2120 UV plus مستقر در آزمایشگاه بیولوژی سلولی دانشگاه توشای ایتالیا برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد (Damerval *et al*., 1986).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین ارقام برای تمامی صفات مطالعه شده بجز فلورسانس کلروفیل و گلایسین بتائین نشان داد. بعلاوه، تفاوت معنی‌داری تحت تنش خشکی برای کلیه صفات بجز گلایسین بتائین مشاهده شد. در ضمن، برهمکنش ژنوتیپ×تنش برای هیچکدام از صفات مطالعه شده معنی‌دار نبود. علاوه بر آن، کمترین ضریب تغییرات مربوط به صفات مقدار آب نسبی برگ (٤/١٢٪) و پتانسیل کل آب برگ (٧/٠٩٪) و بیشترین آن مربوط به سطح ویژه برگ (١٦/٨٩٪) و وزن خشک برگ (١٥/٩٠٪) بود. به نظر می‌رسد که سطح ویژه برگ و وزن خشک برگ بیشتر از سایر صفات تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند (جدول ۱).

ارتفاع بوته و وزن خشک بوته جزء صفات مورفولوژیکی می‌باشند که تحت تأثیر تنش خشکی مقدار آنها کاهش یافت و بین سطوح تنش از لحاظ این صفات اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱). همچنین بین ارقام از نظر این صفات در میانگین سطوح تنش اختلاف معنی-داری مشاهده شد. در این مطالعه بیشترین میانگین ارتفاع بوته مربوط به ارقام Hyola308، SW5001، Olga و Cracker و کمترین آن مربوط به رقم Sarigol و Comet بودند. همچنین ارقام Hyola308 و SW5001 تحت شرایط تنش دارای بیشترین وزن خشک بوته و Sarigol کمترین وزن خشک بوته را داشت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده ارقام کلزا تحت تنش خشکی.

Table 1- Analysis of variance of studied traits for canola cultivars under drought stress.

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares						
		ارتفاع بوته Plant Height	وزن خشک بوته Plant Dry Weight	تعداد برگ در بوته Number of Leaf per Plant	وزن خشک برگ Leaf Dry Weight	سطح ویژه برگ Special Leaf Area	دمای برگ Leaf Temprature	هدایت روزنه‌ای برگ Stomata Conductivity
تکرار Replication	3	3.07	0.04	3.67	0.014	1544.78**	0.116	0.011
تنش Stress	1	723.76**	7.34**	21.36**	3.76**	1278.01**	24.87**	0.031**
رقم Cultivar	9	52.45**	6.89**	23.90**	0.274**	1263.92**	12.98**	0.043**
رقم × تنش Cultivar×Stress	9	6.13	0.024	1.70	0.014	289.21	0.103	0.021
خطا Error	57	10.93	0.045	1.98	0.029	756.51	0.198	0.017
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		8.12	11.10	13.50	15.90	16.89	14.85	9.38

ادامه جدول ۱

Continue Table 1

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares						
		شاخص کلروفیل Chlorophyll Index	فلورسانس کلروفیل Florescence of chlorophyll	**پتانسیل کل آب برگ** Leaf Water Potential	پتانسیل اسمزی Osmotic Potential	مقدار آب نسبی Relative Water Content	پرولین Proline	گلایسین بتائین Glycine Betaine
تکرار Replication	3	8.56	0.025	0.007	0.010	7.09	0.157*	0.011
تنش Stress	1	97.23**	0.122**	3.980**	2.098**	126.67**	36.11**	0.064
رقم Cultivar	9	28.87**	0.044	0.230**	0.129**	100.12**	7.56**	0.068
رقم × تنش Cultivar×Stress	9	5.34	0.034	0.008	0.006	5.09	0.030	0.013
خطا Error	57	7.97	0.045	0.008	0.009	9.89	0.065	0.049
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		8.52	9.13	7.09	8.45	4.12	12.56	12.09

***و ** بترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.**

*** and ** are significant diferrence at the probability levels 5 and 1% respectively**.

این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات Drecer *et al*., (2003) در کلزا مطابقت داشت. از طرف دیگر، تعداد برگ در بوته و وزن خشک برگ، سطح ویژه برگ و دمای برگ از جمله صفاتی بودند که در این آزمایش تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفتند. تعداد برگ در بوته و وزن خشک برگ تحت تنش خشکی کاهش یافتند در حالی که سطح ویژه برگ و دمای برگ تحت تنش خشکی افزایش نشان دادند و مقدار این صفات با توجه به معنی‌دار نبودن برهمکنش رقم در تنش، در سطوح تنش مقایسه شد و ارزش این صفات در ارقام Sarigol و SW5001 بترتیب کمترین و بیشترین مقدار بود. افزایش در سطح ویژه برگ تحت شرایط تنش خشکی ممکن است ناشی از، از دست دادن وزن برگ در مقایسه با کاهش سطح برگ باشد. اظهار شده است که افزایش سطح ویژه برگ در تنش خشکی ممکن است به جهت سازگاری با شرایط تنش اتفاق افتد (Araus *et al*., 1997). همچنین کاهش در وزن خشک برگ ممکن است ناشی از کاهش مواد خشک ناپایدار و یا افزایش ضخامت دیواره سلولی باشد (Lu & Neumann, 1999). Simane *et al*., (1993) گزارش کردند که همبستگی ضعیفی بین سطح ویژه برگ و عملکرد دانه وجود دارد. از طرف دیگر، Winter *et al*., (1988) تفاوت معنی‌داری بین شرایط آبیاری شده و تنش خشکی از نظر دمای برگ گزارش کردند. محققان نشان داده‌اند که گیاهانی که دمای برگ کمتری دارند، سرعت فتوسنتز بالاتری نشان می‌دهند. سرعت فتوسنتزی کم در گیاهانی که دمای برگ بالاتری دارند می‌تواند ناشی از افزایش تنفس باشد (Jones, 1983).

فلورسانس کلروفیل، شاخص کلروفیل و هدایت روزنه‌ای از جمله صفات فیزیولوژیکی هستند که در ارتباط با فتوسنتز گیاه می‌باشند. در این تحقیق، تحت شرایط تنش کمبود آب هدایت روزنه‌ای، فلورسانس کلروفیل و شاخص کلروفیل کاهش نشان دادند، در حالی که برای همه صفات بجز فلورسانس کلروفیل بین ارقام اختلاف معنی‌دار بدست آمد. ارقام SW5001 و Cracker دارای میانگین بالائی برای فلورسانس کلروفیل بودند، در حالیکه رقم Sarigol تحت شرایط تنش میانگین پایینی را به خود اختصاص داد (جدول ۲). برای شاخص کلروفیل نیز SW5001 و Cracker از جمله ارقامی بودند، که میانگین بیشتری را به خود اختصاص دادند، ولی Sarigol و Comet دارای میانگین پایین‌تری بودند (جدول ۲). از طرف دیگر، تحت شرایط تنش کمبود آب هدایت روزنه‌ای کاهش یافت که حاکی از بسته شدن روزنه‌ها و جلوگیری از خروج آب به صورت بخارآب می‌باشد. با این حال رقم SW5001 در سطوح تنش بالاترین هدایت روزنه‌ای را بخود اختصاص داد. در حالی که کمترین مقدار این صفت مربوط به رقم Sarigol بود (جدول ۲). برای این صفت نیز بین سطوح تنش اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱).

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

شاخص حساس تحمل سیستم فتوسنتزی به تنش‌های محیطی، فلورسانس کلروفیل می‌باشد (Maxwell & Johnson, 2000). Baker & Rosenquist, (2004) گزارش کردند که فلورسانس کلروفیل تحت شرایط تنش‌کمبود آب، کاهش نشان می‌دهد. الگوی تغییر فلورسانس کلروفیل مشاهده شده در این مطالعه، مشابه الگوی گزارش شده توسط برخی محققین می-باشد (Zlatev & Yordanov, 2004). از طرف دیگر، گزارشاتی در مورد کاهش میزان کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی وجود دارد (Kuroda *et al.*, 1990). همچنین گزارش شده است که میزان کلروفیل ارقام حساس و متحمل تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد ولی میزان کاهش این صفت برای ارقام حساس بیشتر است (Sairam & Tyagi, 2004).

تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش بر مقدار آب نسبی برگ، پتانسیل کل آب برگ و پتانسیل اسمزی معنی‌دار بود و بین ارقام از نظر همه صفات فوق اختلاف معنی‌داری وجود داشت ولی برهمکنش رقم×خشکی برای این خصوصیات غیر معنی‌دار بود (جدول ۱). مقدار آب نسبی برگ با افزایش تنش خشکی کاهش نشان داد (جدول ۲) و تفاوت بین دو سطح تنش معنی دار بود. اگرچه بین ارقام کلزا از نظر این خصوصیت اختلاف معنی‌داری وجود داشت ولی بیشتر ارقام دارای مقدار آب نسبی برگ بالایی بودند (جدول ۲). رقم SW5001 همراه با ارقام Cracker و Hyola308 ارقام برتر از لحاظ این ویژگی بودند و ارقام Sarigol، Heros و Olga کمترین محتوای آب نسبی برگ را داشتند (جدول ۲). گزارش های مختلف نشان داده اند که ژنوتیپ های مقاوم به تنش شوری و خشکی دارای مقدار آب نسبی برگ بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های حساس هستند (Morant-Manceau *et al.*, 2004). از طرف دیگر کاهش پتانسیل آب برگ و پتانسیل اسمزی برگ مکانیسم‌هایی برای بقای گیاه به هنگام مواجه شدن با تنش کمبود آب محسوب می‌شوند (Chimenti *et al.*, 2002). کاهش پتانسیل اسمزی که منجر به حفظ فشار تورمی برگ می‌گردد معمولاً از طریق افزایش و تجمع نمک‌های محلول در سلول‌های گیاهی صورت می‌گیرد (Hasegawa *et al.*, 2000). با مطالعه روی چند گونهٔ جنس براسیکا نشان داده شد که پتانسیل آب گیاه به طور مستقیم با تورژسانس سلول و پتانسیل اسمزی ارتباط دارد و تورژسانس نیز در ارتباط با توسعه و تقسیم سلولی دارای اهمیت است (Kumar & Singh, 1998).

مقدار پرولین و گلایسین بتائین بر اثر تنش خشکی افزایش یافت (جدول ۲). در بین ده رقم کلزا از لحاظ غلظت پرولین تفاوت معنی‌داری وجود داشت ولی برای گلایسین بتائین تفاوت بین سطوح تنش و ارقام غیرمعنی‌دار بود (جدول۲). مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان داد که افزایش پرولین در ارقام SW5001،

Option500، Cracker و Hyola308 بیشتر از بقیه ارقام بود و اختلاف آنها با Sarigol، Comet، Amica و Eagle معنی‌دار بود. در شرایطی که سلول‌ها در معرض دهیدراسیون آرام قرار می‌گیرند محلول‌های سازگارکننده در سلول‌ها تجمع می‌یابند و در نتیجه محتوای آب سلولی با وجود کاهش پتانسیل آبی بافت حفظ می‌شود. گونه‌ها و ارقام مختلف با توجه به نوع محلول‌هایی که در خود انباشته می‌کنند با یکدیگر فرق می‌کنند (Chaparzadeh etal., 2003) و اسمولایت‌هایی که نقش مهمی در تنظیم اسمزی ایفا می‌کنند وابسته به نوع گونه گیاهی هستند. پرولین و گلایسین بتائین محلول‌های سازگاری هستند که در پاسخ به تنش اسمزی انباشته می‌شوند و تجمع این محلول‌ها یک عکس‌العمل مهم سازشی است (Allen *et al*., 1985). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که میزان پرولین یکی از مهمترین معیارهای تحمل تنش در اغلب گونه‌های گیاهی است و گزارش کرد که میزان پرولین در ارقام حساس به خشکی یک دوم تا یک سوم غلظت این اسمولایت در ارقام مقاوم بود (Allen *et al*., 1985). در رابطه با گلایسین بتائین که در بین ارقام اختلاف معنی‌داری نشان نداد، به نظر می‌رسد که برخلاف پرولین، تولید این ماده و افزایش آن تحت تنش خشکی یک پاسخ غیراختصاصی است. عدم دخالت گلایسین بتائین در تحمل تنش و اثر مثبت بر میزان رشد گیاه تحت تنش شوری در گونه‌های *Brassica*، *Triticum*، *Agropyron* و *Elymus* (Allen *et al*., 1985) گزارش شده است.

بنابر نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین در مجموع رقم SW5001 متحمل‌ترین و رقم Sarigol حساس‌ترین ارقام شناخته شدند که برای مطالعه تکمیلی تجزیه پروتئوم روی این دو رقم انجام شد که نتایج آن در ادامه مقاله آورده شده است.

از مجموع لکه‌های شناسایی شده تعداد ۲۵ لکه پروتئینی بر روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده و با توجه به مقدار IF آنها انتخاب شدند. از بین این لکه‌های پروتئینی، ۱۵ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و شش لکه فقط در رقم SW5001 تغییر بیان داشتند و چهار لکه هم تنها در رقم Sarigol تحت تنش تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند و در مجموع ۲۵ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در هر دو رقم شناسایی شد.

تصویر ژل الکتروفورز دوبعدی مربوط به دو رقم SW5001 و Sarigol تحت شرایط شاهد و تنش در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج می‌توان اظهار داشت که در رقم متحمل کلزا تعداد پروتئین‌های دارای افزایش بیان، در شرایط تنش خشکی نسبت به رقم حساس بیشتر بود (جدول ۳ و ٤).

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مطالعه شده کلزا برای سطوح تنش خشکی و ارقام کلزا.

Table 2- Comparison of mean of studied traits for drought stress levels and canola cultivars.

سطوح خشکی Drought levels	ارتفاع بوته (سانتی متر) Plant Height (cm)	وزن خشک بوته (گرم) Plant Dry Weight (g)	تعداد برگ در بوته Number of Leaf per Plant	وزن خشک برگ (گرم در بوته) Leaf Dry Weight (g/plant)	سطح ویژه برگ (سانتی متر مربع بر گرم) Special Leaf Area (cm^2/g)	دمای برگ (درجه سانتی گراد) Leaf Temprature (^0C)	هدایت روزنه‌ای برگ (سانتی‌متر بر ثانیه) Stomata Conductivity (cm^2/s)
شاهد Control	74.45a	10.08a	17.22a	1.63a	135.90a	22.95a	0.83a
تنش خشکی (PEG20%) Drought stress	61.09b	7.56b	12.98b	1.39b	162.31b	26.99b	0.48b
رقم Cultivar							
Cracker	74.09a	8.89b	15.76b	1.59ab	145.34a	24.60a	0.68a
Sarigol	61.31b	7.12d	12.92d	1.38c	168.03c	26.21c	0.49b
Heros	67.41ab	7.89c	12.95d	1.45b	149.98ab	25.39b	0.50b
Olga	74.93a	9.33ab	14.76c	1.57ab	152.04b	24.99ab	0.60ab
Option500	67.07ab	7.85c	12.93d	1.42c	149.89ab	25.76b	0.61ab
Comet	64.56b	7.36c	12.92d	1.42c	162.50c	24.63b	0.58ab
SW5001	75.40a	10.03a	16.89a	1.65a	142.39a	24.58a	0.71a
Amica	68.90ab	9.01ab	14.72c	1.54b	155.27b	25.59b	0.61ab
Hyola308	76.09a	9.98a	16.88a	1.61a	143.62a	24.90a	0.61ab
Eagle	70.12ab	8.93b	15.43b	1.51b	156.71b	25.99c	0.63ab

بیشتر بودن تعداد پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش در رقم SW5001 و همچنین افزایش بیان اکثر پروتئین‌های معنی‌دار در این رقم نسبت به رقم حساس بیانگر این است که این رقم با دخالت دادن پروتئین های مختلف و بیشتر بیان کردن آنها تحت تنش خشکی، عکس‌العمل بهتری نسبت به رقم حساس جهت حفظ رشد خود داشته است. در مطالعه پروتئوم ارقام حساس و متحمل برنج نسبت به تنش خشکی، زیاد بودن تعداد پروتئین‌های دارای افزایش بیان در رقم متحمل را گزارش شده است و این نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر روی دو رقم کلزا می‌باشد (Hosseini Salekdeh *et al*. 2002).

از بین پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی آنهایی که بر روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با آبی کوماسی قابل مشاهده بودند، جدا شده و برای شناسایی با استفاده از طیف‌سنجی جرمی استفاده شدند. ۲۵ پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با استفاده از روش MALDI TOF/TOF MS مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۳ و ٤).

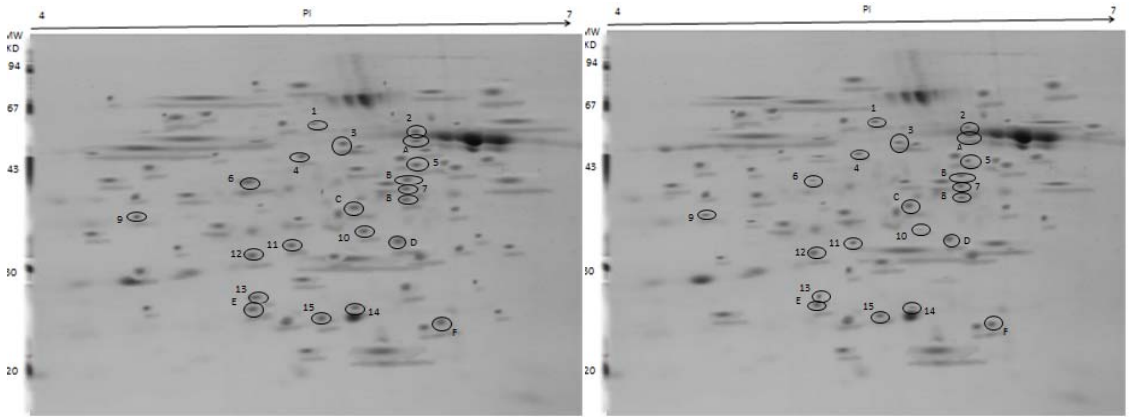
ادامه جدول ۲

Continue Table 2

سطوح خشکی Drought levels	شاخص کلروفیل Chlorophyll Index	فلورسانس کلروفیل Florescence of chlorophyll	**پتانسیل کل آب برگ (مگاپاسکال)** Leaf Water Potential	پتانسیل اسمزی (مگاپاسکال) Osmotic Potential (MPa)	مقدار آب نسبی (٪) Relative Water Content (%)	پرولین (µmol/g fw) Proline	گلایسین بتائین (µmol/g fw) Glycine Betaine
Control شاهد	40.78a	0.8207a	-1.13a	-0.98b	79.03a	5.95b	3.87a
تنش خشکی (PEG20%) Drought stress	38.12b	0.7980b	-1.78b	-1.43a	69.45b	11.08a	4.56a
Cultivar **رقم**							
Cracker	40.64a	0.8134a	-1.32a	-1.41a	76.09a	10.09a	4.35a
Sarigol	38.15b	0.7984a	-1.73d	-1.17b	70.43b	6.43c	4.03a
Heros	39.56ab	0.8009a	-1.45b	-1.29ab	71.94b	9.09ab	4.07a
Olga	39.43ab	0.7990a	-1.65c	-1.27ab	72.03b	8.78ab	4.17a
Option500	39.87ab	0.8028a	-1.61c	-1.29ab	73.96ab	9.93a	4.23a
Comet	38.41b	0.7981a	-1.71d	-1.31ab	74.38ab	7.54b	4.35a
SW5001	40.76a	0.8154a	-1.22a	-1.40a	77.90a	10.23a	4.48a
Amica	39.42ab	0.7996a	-1.47b	-1.28ab	74.18ab	7.90b	4.09a
Hyola308	40.58a	0.8163a	-1.28a	-1.40a	75.99a	10.11a	4.44a
Eagle	39.62ab	0.8062a	-1.49b	-1.28ab	73.89ab	7.98b	4.25a

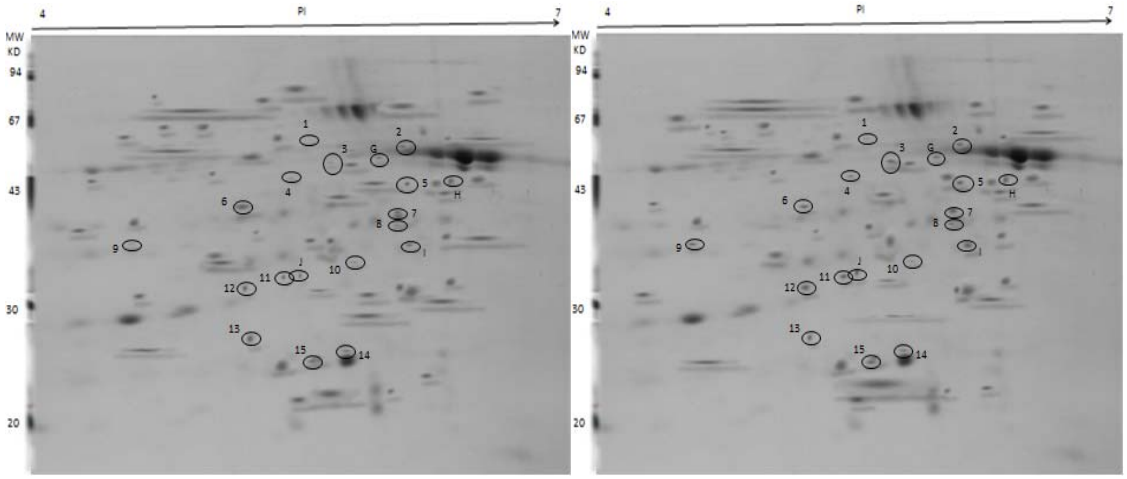
میانگین‌های با حروف مشابه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means with the same letters are statistically not significant at the 5% level.



شکل ۱- الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم SW5001 در شرایط شاهد (سمت راست) و در شرایط تنش خشکی (سمت چپ) که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با شماره و لکه‌های غیرمشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.

Figure 1- 2D electrophoresis pattern of SW5001 cultivar in control (right) and drought stress (left) where responsive common protein spots to drought stress with Sarigol cultivar by numbers and non-common protein spots with English letters are marked.



شکل ۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم Sarigol در شرایط شاهد (سمت راست) و در شرایط تنش خشکی (سمت چپ) که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش خشکی با شماره و لکه-های غیرمشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.

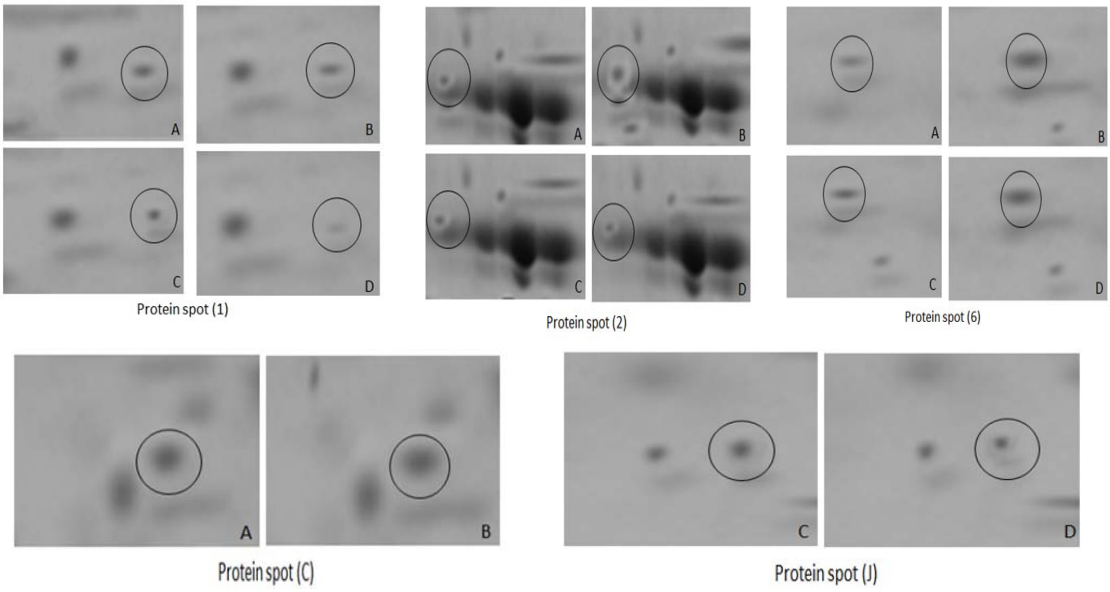
Figure 2- 2D electrophoresis pattern of Sarigol cultivar in control (right) and drought stress (left) where responsive common protein spots to drought stress with SW5001 cultivar by numbers and non-common protein spots with English letters are marked.

در روش MALDI TOF، شناسایی پروتئین‌ها بروش انگشت نگاری جرم پپتید (PMF[1]) صورت می‌گیرد (Twyman, 2004). جایگاه پروتئین‌های شناسایی شده در ژل در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. در مجموع پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی-دار با استفاده از طیف سنجی جرمی، ۱۱ پروتئین دخیل در فتوسنتز شناسایی شد که در دو گروه مشترک و غیرمشترک قرار گرفتند (جدول ۳ و ٤). علاوه بر آن، ۱۵ لکه پروتئینی بطور مشترک بین دو رقم متحمل و حساس شناسایی شد که تحت تنش خشکی تغییر بیان نشان دادند (جدول ۳). بر طبق عملکرد این پروتئین‌ها در داخل سلول، گروهبندی پروتئین‌ها انجام شد و بیشترین درصد پروتئین‌های مشترک بترتیب مربوط به واکنش نوری فتوسنتز (شش پروتئین)، چرخه کالوین (چهار پروتئین)، پروتئین‌های سم‌زدا (دو پروتئین)، سنتز یا تجزیه پروتئین، انتقال پروتون و پروتئین شوک گرمایی هر کدام یک پروتئین بودند (جدول ۳). علاوه بر آن، شش لکه پروتئینی تنها در رقم متحمل تظاهر داشتند که بیشتر مربوط به چرخه کالوین و واکنش نوری فتوسنتز بودند که با توجه به افزایش آنها در جهت تقویت جذب و استفاده از نور، تحت تنش فعالیت داشتند. در حالی که چهار لکه پروتئینی

[1] Peptide mass fingerprinting

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تنها در رقم حساس دیده شدند که بیشتر مرتبط با چرخه کالوین بودند که با توجه به کاهش بیان آنها نشاندهنده کاهش روند تولید قند تحت تنش در رقم حساس است (جدول ٤). علاوه بر آن، در مجموع بر اساس الگوی بیان پروتئین‌ها در شرایط نرمال و همچنین تنش خشکی، می‌توان پنج گروه (حالت) را برای پروتئین‌ها مشاهده کرد: الف- پروتئین‌هایی که در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش بیان داشتند و مقدار کاهش بیان آن در رقم حساس بیشتر بود (مانند پروتئین شماره ۱). ب- پروتئین‌هایی که در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش بیان داشتند (مانند پروتئین شماره ۲). ج- پروتئین‌هایی که در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش بیان داشتند و مقدار افزایش بیان آن در رقم متحمل بیشتر بود (مانند پروتئین شماره ٦). د- پروتئین‌هایی که فقط در رقم متحمل تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد C) و ه- پروتئین‌هایی که فقط در رقم حساس تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد J) (شکل ۳).



شکل ۳- نحوه تغییر بیان لکه‌های پروتئینی شماره ۱، ۲، ٦ و لکه‌های C و J. در این اشکال قسمت A و B بترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم SW5001 و قسمت C و D بترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم Sarigol می‌باشد.

Figure 3- How to change the expression of protein spots 1, 2, 6 and C and J. In this figures A and B are related to control and stress conditions in SW5001 and C and D are related to control and stress condition in Sarigol respectively.

بطور کلی در هر دو رقم بیشترین تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش، مربوط به واکنش نوری فتوسنتز و چرخه کالوین بود. بعبارت دیگر، در مجموع بیشترین تعداد پروتئین-ها مربوط به پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات بودند. در این گروه عملکردی، بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی از قبیل واکنش نوری فتوسنتز، چرخه کالوین، بیوسنتز قندها، گلیکولیز و سیستم شاتلینگ مالات/اگزالواستات و غیره وجود داشتند. در نتیجه میزان مشارکت بالای پروتئین‌ها در این گروه نشاندهنده اهمیت بالای این دسته از پروتئین‌ها در رشد و نمو گیاه و مقابله با تنش خشکی است. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده در مطالعه پروتئوم ذرت (Proubleva *et al.*, 2001)، برنج (Nozu *et al.*, 2006)، گندم (Naghavi *et al.*, 2014) و کلزا (Naghavi *et al.*, 2010) می‌باشد. در مجموع، در دو رقم SW5001 و Sarigol بیشترین پروتئین‌های مشترک در گروه واکنش نوری فتوسنتز مربوط به پروتئین‌های OEC (شامل لکه‌های پروتئینی مشترک ۲، ۵ و ۱۱، لکه پروتئینی C و B در SW5001 و همچنین لکه پروتئینی H در Sarigol) بودند. پروتئین‌های OEC در پایداری کمپلکس PSII نقش دارند (Ifuku *et al.*, 2008) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به فتوسیستم II می‌شود (Takahashi & Murata, 2008). بنابراین، با توجه به کاهش بیان این پروتئین‌ها در رقم حساس Sarigol، باعث اختلال در فعالیت فتوسیستم II شده و در نهایت کارایی واکنش نوری کاهش می‌یابد. در حالی که در رقم متحمل SW5001 این پروتئین‌ها افزایش بیان داشتند. از طرف دیگر، پروتئین HCF136 (لکه مشترک ۹) که یک پروتئین اساسی برای تعمیر، ساخت و پایداری کمپلکس فتوسیستم II می‌باشد (Plucken *et al.*, 2002) و در تجزیه پروتئوم گندم تحت تنش خشکی کاهش بیان آن گزارش شده است (Ford *et al.*, 2011)، در این آزمایش در رقم SW5001 نسبت به رقم Sarigol کاهش بیان کمتری نشان داد.

در طی فتوسنتز، انرژی نوری توسط رنگیزه‌های فتوسنتزی در کلروپلاست جذب شده و از طریق دستگاه فتوسنتزی به انرژی شیمیایی تبدیل می‌شود و این انرژی شیمیایی در تثبیت دی‌اکسیدکربن طی چرخه کالوین استفاده می-گردد. تحت شرایط تنش کمبود آب، غلظت دی-اکسیدکربن در برگ‌ها در اثر بسته شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد (Kieselbach *et al.*, 2000) در نتیجه منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در چرخه کالوین می‌شود (Chaves *et al.*, 2002). در گیاهان مواجه شده با تنش کمبود آب، انرژی نوری جذب شده از طریق رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشتر از نسبت مصرف آن در چرخه کالوین است که علت آن کاهش فعالیت چرخه کالوین و

کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در این چرخه می‌باشد. در نتیجه به دستگاه فتوسنتزی مخصوصاً پروتئین‌های هسته‌ای D1 و D2 مرکز واکنش فتوسیستم II (PSII) زیان نوری وارد می‌شود (Aro *et al*., 1993). گیاهان برای جلوگیری از زیان نوری به دستگاه فتوسنتزی، چندین مکانیسم شامل تعدیل آنتن‌های جذب کننده نور (که پروتئین‌ها در این آنتن‌ها LHC نامیده می‌شوند) (لکه پروتئینی مشترک شماره ۱) و کاهش اندازه آنتن‌ها برای کاهش جذب نور را انجام می‌دهند (Ebarhard *et al*., 2008). از طرف دیگر، TL29(لکه پروتئینی مشترک شماره ۱۰) که یک پروتئین ۲۹ کیلودالتونی است و در غشاء تیلاکوئید قرار گرفته است (Kieselbach *et al*., 2000)، بر اساس همولوژی بالایی که با اسکوربات پراکسیداز (APX) دارد APX4 نیز گفته می‌شود و قبلاً تصور بر این بود که در حفاظت سلول‌ها علیه گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد (Punchuk *et al*., 2005). اخیراً بر اساس آزمایشات گزارش شده است که این پروتئین‌ها در ارتباط با فتوسیستم II و بازدارندگی زیان نوری به این فتوسیستم نقش دارند (Granlund *et al*., 2009).

از طرف دیگر، در دو رقم SW5001 و Sarigol بیشترین پروتئین‌ها درگروه چرخه کالوین زیرواحد بزرگ روبیسکو بودند. روبیسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز است که از چندین زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده (شامل لکه‌های پروتئینی مشترک ۳ و ۱۳ و همچنین لکه پروتئینی D در SW5001) و چند زیر واحد کوچک تنظیم کننده (شامل لکه پروتئینی A در SW5001) تشکیل شده است (Santos *et al*., 2004). در تجزیه پروتئوم غلاف برگ برنج در طی تنش کمبود آب، گزارش شده است که زیر واحد بزرگ و کوچک روبیسکو کاهش یافته است (Ali & Komatsu, 2006). همچنین کاهش بیان زیرواحد کوچک روبیسکو در طی تنش خشکی در لاین‌های حساس گندم گزارش شده است که نشاندهنده نقش آن در تحمل به تنش خشکی در گندم می‌باشد (Demirevska *et al*., 2009). از طرف دیگر، گزارش شده است که پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز مانند پروتئین اتصال یافته به روبیسکو، روبیسکو اکتیواز (شامل لکه پروتئینی مشترک ٦ و همچنین لکه پروتئینی J در Sarigol) در رقم حساس جو کاهش بیان نشان دادند، در حالی که این پروتئین‌ها در رقم متحمل جو تغییر بیان نداشته و یا افزایش بیان نشان دادند (Kaiser & Kappen, 1997). از طرف دیگر، مرحله سوم چرخه کالوین توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (Macdonald & Buchanan, 1997). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این مرحله شامل sedoheptulose-1,7-biphosphate و fructose 1,6-biphosphate aldolase (لکه مشترک شماره ٤، لکه پروتئینی E در SW5001 و همچنین لکه پروتئینی G در Sarigol) می‌باشند. این دو آنزیم با همدیگر

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت نتیجه آن تشکیل ribulose-5-phosphate می‌باشد. سپس ribulose-5-phosphate فسفریله شده و RuBP را تشکیل دهد که این فسفریله شدن توسط فسفوریبولوکیناز انجام می‌شود که در مطالعه حاضر شناسایی شد. بعضی از تریوزفسفات‌های تولید شده در چرخه کالوین برای بیوسنتز قند و نشاسته استفاده می‌شوند (Tamoi *et al.*, 2005). در مجموع، با توجه به کاهش بیان پروتئین‌های ذکر شده، رقم Sarigol در مسیر متابولیکی چرخه کالوین تحت تنش خشکی آسیب بیشتری می‌بیند و تفاوت در الگوی پاسخ پروتئینی ارقام متحمل و حساس باعث میشود که این ارقام از لحاظ ارزش سایر صفات تحت تنش خشکی نیز متفاوت باشند.

نتیجه‌گیری کلی

بر طبق نتایج بدست آمده رقم SW5001 نسبت به سایر ارقام مطالعه شده از لحاظ صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، فتوسنتزی، روابط آبی و تجمع محلول‌های آلی تحت تنش خشکی در وضعیت مطلوبتری قرار داشت و رقم Sarigol از این نظر جایگاه نامطلوبتری را نسبت به سایر ارقام نشان داد. بنابراین این دو رقم بعنوان متحمل‌ترین و حساس‌ترین ارقام، برای تجزیه پروتئوم استفاده شدند. با تجزیه پروتئوم ارقام متحمل و حساس تعداد ۲۵ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمار تنش خشکی تشخیص داده شدند که از این تعداد ۱۵ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و تعداد شش و چهار لکه پروتئینی بترتیب منحصر به رقم متحمل و حساس بودند. رقم SW5001 با دخالت دادن پروتئین‌های بیشتر و با بیان بیشتر برخی ژن‌ها تحت تنش خشکی عکس‌العمل بهتری نسبت به رقم حساس Sarigol جهت حفظ رشد خود داشته است. همچنین در پاسخ اختصاصی، رقم متحمل تحت تنش بیشتر در مسیر پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز فعالیت داشته و رقم حساس با آسیب بیشتری در مسیر چرخه کالوین مواجه می‌شود. بر اساس نتایج بدست آمده، ارقام متحمل و حساس با داشتن تغییر بیان پروتئینی متفاوت و اثر این پروتئین‌ها در ساختار سلولی و صفات کلزا بنحوی متفاوت به مقابله با تنش خشکی می‌پردازند.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری دکتر سارا لینالدوچی متخصص بخش پروتئومیک دانشگاه توشای ایتالیا تشکر و قدردانی می‌کنند.

جدول ۳- مشخصات ۱۵ لکه پروتئینی مشترک شناخته شده از کل لکه‌های معنی‌دار در رقم SW5001 و Sarigol تحت تنش خشکی.

Table 3- Characteristics of 15 common protein known spots of the significant spots in the SW5001 and Sarigol under drought stress.

گروه عملکردی پروتئین Functional group of protein	شماره لکه Spot number	تجربی Experimental		تئوری Theoretical		نام پروتئین name of protein	Accession number	روند بیان در رقم متحمل Expression in SW5001	روند بیان در رقم حساس Expression in Sarigol
		MW	pI	MW	pI				
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	1	62	5.53	24.44	8.69	light-harvesting complex I, partial (chloroplast)	gi|544700	کاهش کمتر Decreased less	کاهش بیشتر Further decrease
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	2	61	6.10	14	9.71	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	gi|474352688	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	3	53.1	5.72	53.4	6.2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Large subunit	gi|61378609	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	4	45.5	5.44	42.21	5.94	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	gi|473848356	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	5	43.9	6.10	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	gi|131394	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	6	42.1	5.30	47.34	8.62	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	gi|167096	افزایش بیشتر Further increase	افزایش کمتر Increased less
سنتز یا تجزیه پروتئین Synthesis/Degradation of protein	7	40.5	6.25	39.9	6.5	Triticain gamma	gi|111073719	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
انتقال پروتون Proton transport	8	40.2	6.02	53.88	5.06	ATP synthase CF1 beta subunit	gi|14017579	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	9	39	4.65	37.01	5.4	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like	gi|357117071	کاهش کمتر Decreased less	کاهش بیشتر Further decrease
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	10	38.8	5.80	28.6	7.7	Thylakoid lumenal 29.8 kDa	gi|195656049	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	11	35.6	5.50	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, (OEE2) chloroplastic	gi|131394	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
سم‌زدا Remove of antioxidant	12	33.5	5.31	23.39	5.4	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic	gi|2499477	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	13	27.5	5.34	17.7	5.43	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	gi|156143205	افزایش بیشتر Further increase	افزایش کمتر Increased less
سم‌زدا Remove of antioxidant	14	25.2	5.80	20.35	5.3	Cu/Zn superoxide dismutase	gi|1572627	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated
پروتئین شوک گرمایی Heat shock protein	15	25	5.55	73.72	4.9	70kDa heat shock protein	gi|254211611	افزایش Up-regulated	کاهش Down-regulated

جدول ٤- مشخصات شش لکه پروتئینی غیر مشترک در رقم SW5001 و چهار لکه پروتئینی غیر مشترک در رقم Sarigol تحت تنش خشکی.

Table 4- Characteristics of six non-common spots in SW5001 cultivar and four non-common spots in Sarigol under drought stress.

گروه عملکردی پروتئین Functional group of protein	شماره لکه Spot number	تجربی Experimental		تئوری Theoretical		نام پروتئین name of protein	Accession number	روند بیان در رقم حساس Expression in Sarigol	روند بیان در رقم متحمل Expression in SW5001
		MW	pI	MW	pI				
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	A	55.6	6.10	18.80	8.83	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	gi|4038719	–	افزایش Up-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	B	43.5	6.03	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	gi|131394	–	افزایش Up-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	C	40.0	5.75	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, (OEE2) chloroplastic	gi|131394	–	افزایش Up-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	D	35.8	5.90	52.5	6.09	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-large subunit	gi|52001641	–	افزایش Up-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	E	27.2	5.30	42.21	5.94	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	gi|473848356	–	افزایش Up-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	F	24.5	6.15	73.72	4.9	70kDa heat shock protein	gi|254211611	–	افزایش Up-regulated
سنتز یا تجزیه پروتئین Synthesis/Degradation of protein	G	53.7	5.93	42.21	5.9	chloroplast fructose-bisphosphate aldolase	gi|223018643	کاهش Down-regulated	-
انتقال پروتون Proton transport	H	44.5	6.40	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	gi|131394	کاهش Down-regulated	-
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	I	39.0	6.12	24.4	10.1	50S ribosomal protein L10	gi|218192573	کاهش Down-regulated	-
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	J	35.8	5.45	47.34	8.62	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	gi|167096	کاهش Down-regulated	-

منابع

Ali GM, Komatsu S (2006). Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. Journal of Proteome Research 5: 396-403.

Alonso M, Rozados MJ, Vega JA, Perez-Gorostiaga P, Cuinas P, Fonturbel MT, Fernandes C (2002). Biochemical responses of Pinus Pinaster tree to fire- induced trunk girdling and crown scorch: secondary metabolites and pigments as needle chemical indicators. Journal of Chemical Ecology 28: 687-700.

Araus JL, Ceccarelli S, Grando S (1997). Relationship between leaf structure and carbon isotope discrimination in field-grown barley. Plant Physiology and Biochemistry 35: 533-541.

Arias D (2007). Calibration of LAI-2000 to Estimate Leaf Area Index and Assessment of its Relationship with stand productivity in six Native and Introduced tree Species in costarica. Forest Ecology and Management 247: 85-193.

Aro EM, Virgin I, Andersons B (1993). Photo inhibition of photosystem-II–inactivation, protein damage and turnover. Biochimistry and Biophysics Acta 1143: 113-134.

Ashraf M, Mehmood S (1990). Response of four *Brassica* species to drought stress. Journal of Experimental Botany 30: 93-100.

Baker NR, Rosenquist E (2004). Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55: 1607-1627.

Bates IS, Waldern RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and Growth Annual Botany 89: 907-916.

Chimenti CA, Pearson J, Hall AJ (2002). Osmotic adjustment in Maize: Genetic variation and association with water uptake, In: Edmeades GO (Ed.). Developing Drought and Low N-Tolerant Maize. CIMMYT, Mexico, pp. 200-203.

Damerval C, De Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling roteins. Electrophoresis 7: 52-4.

Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, Simova-Stoilova L, Stamenova M, Feller U (2009). Drought stress effects on rubisco in wheat: Changes in the rubisco large subunit. Acta Physiologiae Plantarum 31: 1129-1138.

Drecer F, Rodriguaz D, Leon M (2003). Interactive effects of and N stress on wheat and canola. http://www. Regional. Org. aulasa/2003/p/7/drecer. Htm.

Eberhard S, Finazzi G, Wollman FA (2008). The dynamics of photosynthesis. Annual Review of Genetics 42: 463-515.

Edmeads GO, Bolanos J, Laffite HR, Rajaram S, Preffer W, Fisher RA (1989). Traditional approaches to breeding for drought resistance in cereals. CABI, 52pp.

EL-Sharkawi I, Springuele V, EL-sharkawi HM (1999). Germination of some crop plant seeds under salinity stress. Seed Science and Technology 7: 27-37.

Ford KL, Cassin A, Bacic A (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Plant Science 2: 1-11.

Granlund I, Storm P, Schubert M, Garcia-Cerdi JG, Funk C, Wolfgang PS (2009). The TL29 Protein is Lumen Located, Associated with PSII and Not an Ascorbate Peroxidase. Plant Cell Physiology 50: 1898-1910.

Grieve CM, Grattan SR (1983). Rapid assay for determination of water solublequaternary ammonium compounds. Plant and Soil 70: 303-307.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 51: 463-499.

Herbert B (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 20: 660-663.

Horton P, Ban AVR, Walters RG (1996). Regulation of light harvesting in green plants. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 4: 655-684.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

Hosseini Salekdeh Gh, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002). Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2: 1131-1145.

Ifuku K, Ishihara S, Shimamoto R, Ido K, Sato F (2008). Structure, function, and evolution of the *PsbP* protein family in higher plants. Photosynthesis Research 98: 427-437.

Jones HG (1983). Plants and Microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University. Press, Cambridge London.

Kaiser H, Kappen L (1997). In situ observations of stomatal movements in different light-dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments. Journal of Experimental Botany 48: 1583-1589.

Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S, (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. Amino Acids 44: 345-359.

Kieselbach T, Bystedt M, Zentgraf U (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the Arabidopsis chloroplast thylakoid lumen. Febs Letters 480: 271-276.

Kocheva K, Lambrev P, Georgiev G, Goltsev V, Karabaliev M (2004). Evaluatlon of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. Bioelectrochemistry 63: 127-124.

Kramer PJ (1969). Plant and soil water relationships. Modem synthesis. Mc Graw-Hill Book co, New York. 84pp.

Kumar, A. and Elston, J. (1992). Genotypic difference in leaf water relations between *Brassica juncea* and *B. napus*. Annals of Botany 70: 3-9.

Kumar A, Singh DP (1998). Use of physiological indices as a screening technique for drought tolerance in oilseed *Brassica* species. Annals of Botany 81: 413-420.

Kumar A, Singh P, Singh DP, Singh H, Sharma HC (1984). Difference in osmoregulation in *Brassica* species. Annals of Botany 54: 537-541.

Kuroda M, Qzawa T, Imagawa H (1990). Changes in chloroplast peroxidase activities in relation to chlorophyll loss in barley leaf segments. Physiologia Plantarum 80: 555-560.

Lu Z, Neumann PM (1999). Low cell-wall extensibility can limit maximum leaf growth rates in rice. Crop Science 39: 126-130.

Macdonald FD, Buchanan BB (1997). The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Eds.), Plant Metabolism. 2nd edn. Essex: Addison Wesley Longman. pp. 299-313.

Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-668.

Mohammadian R, Rahimian H, Moghaddam H, Sadeghian SY (2003). The effect of early season drought on chlorophyll a fluorescence in sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) Pakistan Journal of Biological Science 6: 1763-1769.

Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin G (2004). Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. Journal of Plant Physiology 161: 25-33.

Naghavi MR, Moghaddam M, Toorchi M, Shakiba MR (2014). Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. Ph.D. Thesis. Department of Plant Breeding and Biotechnology. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Iran (In Farsi).

Naghavi MR, Toorchi M, Moghaddam M, Neyshabouri MR, Bandeh hagh, A (2010). Response and 2-Dimensional electrophoresis pattern of spring rapeseed genotypes

under osmotic stress. M.Sc. Dessertation. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran (In Farsi).

Noroozi M, Kazemini SAR (2012). Effect of water stress and plant density on growth and seed yield of safflower. Iranian Journal of Field Crops Research 10: 781-788. (In Farsi).

Nozu Y, Tsugita A, Kamijo K (2006). Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. Proteomics 6: 3665-3670.

Orama RN, Kirk JTO (1993). Breedig indian mustard for australian condition: In: Huchinson K, Viclery PJ (Eds.). Proceedings of the sixth australian agronomy conference. Aust. Coc. Of Agron. Armidal. New south wales. pp. 467-470.

Paleg LG, Aspinall D (1989). The physiology and biochemistry of drought resistance in plant (chapter 1 and 2) Academic press sydng, pp. 1-24.

Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA (2005). Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. Planta 222: 926-932.

Plucken H, Muller B, Grohmann D, Westhoff P, Eichacker LA, (2002). The HCF136 proteinis essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana.* FEBS Letters 532: 85-90.

Porubleva L, Vander Velden K, Kothari S, Oliver DJ, Chitnis PR (2001). The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. Electrophoresis 22: 1724-1738.

Reynolds MP, Balota M, Delgado MIB, Amani I, Fischer RA (1994). Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, dry irrigated conditions. Australian Journal of Plant Physiology 21: 717-730.

Sairam RK, Tyagi A (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86: 407-422.

Santos C, Pereira A, Pereira S, Teixeira J (2004). Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. Scientia Horticulturae 103: 101-111.

Schonfeld MA, Johnson RC, Carver BF, Mornhinweg DW (1988). Water relation in winter wheat as drought resistance indicators. Crop Science 28: 526-531.

Simane B, Peacock JM, Stuiki PC (1993). Difference in developmental plasticity and growth rate among drought resistant and susceptible cultivars of durum wheat. Plant and Soil 157: 155-166.

Srinivas V, Bala Subramanian D (1995). Proline is a protein compatible hydrotrope. Langmuir 11: 2830-2833.

Takahashi S, Murata N (2008). How do environmental stresses accelerate photo inhibition? Trends Plant Science 13: 178-182.

Tamoi M, Nagaoka M, Yabuta Y, Shigeoka S (2005). Carbon metabolism in the Calvin cycle. Plant Biotechnology 22: 355-360.

Thiellement H, Zivy M, Plomion C (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. Chromatography B 782: 137-149.

Twyman RM (2004). Principles of proteomics. BIOS Scientific Publishers.

Valeri HR, Sulpice R, Lefort C, Maerskack V, Emery N, Larher FR (2002). The suppression of osmoinduced praline response of *Brassica napus* L. var olefera leaf discs by poly unsatutated fatty acids and methyl-jasmonate. Plant Science 164: 119-127.

Verslues PE, Kim YS, Zhu JK (2007). Alterrd ABA, Proline and hydrogen peroxide in an Arabidopsis glutamate: glyoxylate aminotrasferase mutant. Plant Molecular Biology 64: 205-217.

Wange W, Inocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14.

Winter SR, Musick JT, Porter KB (1988). Evaluations of screening techniques for breeding drought-resistant winter wheat. Crop Science 28: 512-516.

Zlatev Z, Yordanov IT (2004). Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology 30: 3-18.

Zulini L, Rubinigg M, Zorer R, Bertamini M (2002). Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence and photosynthetic pigment in grapevine leaves. www.actahort.org/html.

Evaluation of spring canola cultivars in terms of some morphological and physiological traits under drought stress and proteome analysis of the most tolerant and susceptible ones

Khalili M.[*1], Naghavi M.R.[2]

[1]Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Iran.

Abstract

In this research, considering the importance of drought and canola, an experiment was done as factorial in a Randomized Complete Block Design using ten spring canola cultivars with hydroponic method in seedling stage and with induced of drought stress by PEG_{6000}. Two weeks after of the stress induction and at the end of the rossete stage, samples were taken. The results showed that the value of morphological and physiological traits was declined under drought stress. Also the studied cultivars were varied in response to drought stress and in general, the most tolerant and sensitive cultivars for studied traits were SW5001 and Sarigol cultivars, respectively that to graduate studies on these two cultivars proteome analysis was performed. To study the pattern of protein, extraction of protein from leaf tissue was performed and the first dimension electrophoresis using IPG strips and second dimension electrophoresis was performed by SDS-PAGE technique and after the gels staining with commassie blue, gels imaging with scanner and protein analysis with PDQuest software was done. Finally a total of 25 protein spots between control plants and under drought stress for both cultivars were detected that of these, 15 protein spots were common between two cultivars and six unique protein spots for tolerant cultivar and four unique protein spots for susceptible cultivar. After detection these proteins with mass spectrometry, overall, the most common protein groups between two cultivars were involved proteins in photo-reaction of photosynthesis, Calvin cycle and detoxifying enzymes. In total, the most important cause of the sensitivity and tolerance of canola cultivars different expression and unique expression of proteins into cultivars and finally effects of them on other were obtained.

Keywords: *Canola, drought stress, physiological traits, proteomics*.

[*] Corresponding Author: Khalili M. Tel: 04442335090 Email: makhalily@yahoo.com