

اثرات شوری بر الگوی پروتئین برگ در *Aegilops tauschii*

محمود ملکی^{*}، محمدرضا نقوی^۲، هوشنگ علیزاده^۳، کاظم پوستینی^۴، سیروس
عبدمیشانی^۵

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استادیار، استادان دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Maleki@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

چکیده

گندم یکی از مهم‌ترین غلات موجود در دنیا است که عملکرد آن تحت تنش شوری کاهش می‌یابد لذا افزایش تحمل گندم به شوری ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر اجداد وحشی گندم به دلیل دارا بودن ژن‌های مقاومت از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند، به همین خاطر شناسایی مکانیزم‌های تحمل به شوری در آن‌ها مهم است. در این تحقیق گندم *Aegilops tauschii* تحت تاثیر شوری طولانی مدت قرار گرفت. برای مقایسه تغییرات الگوی پروتئینی برگ در تیمار شوری و شاهد از تکنیک پروتئومیکس استفاده گردید. از میان تعداد ۱۳۵ لکه پروتئینی تکرار پذیر بررسی شده در ژل‌ها، تعداد ۱۸ لکه پاسخ دهنده به تنش شوری شناسایی گردیدند که از میان آن‌ها تعداد سه لکه پروتئینی دارای کاهش بیان و بقیه افزایش بیان داشتند. از جمله پروتئین‌های شناسایی شده می‌توان به گلوتامین سنتتاز، آسکوربات پراکسیداز، لیپوکالین و رابیسکو اکتیواز اشاره کرد که در فرآیندهایی مثل تنظیم متابولیسم کربوهیدرات، اسیدآمین، نیتروژن و حذف گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند.

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی جهان است. شوری یک محدود کننده مهم تولید گندم در کشاورزی دیم و آبی در سراسر جهان محسوب می‌شود (۱). پاسخ گیاهان به تنش شوری در دو فاز رخ می‌دهد، در فاز اول، کاهش رشد به واسطه تنش اسمزی رخ می‌دهد در حالی که فاز دوم بعد از تجمع بالای نمک‌ها در برگ‌ها اتفاق می‌افتد (۳۲). در واقع شوری بالا باعث کمبود آب، سمیت یونی و کمبود مواد غذایی در گیاه می‌شود که می‌تواند منجر به تخریب مولکولی، توقف رشد و حتی مرگ گیاه گردد (۱). گیاهان سعی می‌کنند با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی، به واسطه تغییر در بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های ویژه‌ای را کد می‌کنند، در برابر تنش مقاومت نشان دهند (۴). تحمل به تنش شوری نیز با تغییر در سطح پروتئین‌ها همراه است. تنش شوری باعث کاهش یا افزایش بیان پروتئین‌ها می‌شود و یا به‌طور کامل باعث ناپدید شدن و یا ظاهر شدن برخی از پروتئین‌ها می‌شود (۴۵).

واژه‌های کلیدی

چند شکلی،
ژن گرلین،
مرغان بومی،
PCR-RFLP

مواد و روش ها

در این تحقیق گندم *Aegilops tauschii* ($2n=2x=14$, DD) به عنوان ماده ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. بذور نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی پرلیت و کوکویت (به نسبت ۳ به ۱) در گل‌خانه آزمایشی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شدند. بعد از مرحله دو برگی گیاهان با استفاده از محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحله ۴ برگی ادامه یافت. برای اعمال تنش از سطوح صفر (به عنوان شاهد) و ۲۰۰ میلی مولار NaCl استفاده گردید. تنش شوری به مدت ۱۷ روز اعمال و در پایان روز هفدهم نمونه‌گیری از برگ پنجم انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا هنگام استخراج پروتئین در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم مقداری از برگ‌های جدا شده با آب مقطر شستشو و پس از خشک کردن به مدت ۴۸ ساعت در دمای 72°C وزن خشک آنها اندازه‌گیری شدند. به منظور تعیین غلظت سدیم و پتاسیم، مقدار یک گرم از نمونه‌ها در کوره الکتریکی (دمای 550°C) به مدت ۶ ساعت قرار داده شدند، تا به خاکستر تبدیل شوند. مقدار یون‌های سدیم و پتاسیم با روش فلیم فوتومتری و بر اساس منحنی استاندارد (بر حسب ppm) تعیین شدند (۳۸). با استفاده از فرمول زیر مقدار این یون‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک محاسبه گردید:

$$E = \frac{C \times D \times V}{10^6 \times DM} \times 1000$$

که در آن E مقدار عنصر بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک، C غلظت به میلی‌گرم بر لیتر، D درجه رقت، V حجم نهایی عصاره تهیه شده بر حسب میلی‌لیتر و DM وزن خشک نمونه بر حسب گرم است.

استخراج پروتئین از بافت برگی (برگ پنجم) بر اساس روش دامروال و همکاران (۱۲) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه از روش برادفورد (۵) استفاده شد. برای انتقال پروتئین‌ها به داخل ژل بعد اول، پروتئین‌ها در طول شب حدود ۱۴-۱۶ ساعت در محلول آبدهی (Rehydration) تیمار شدند. پروتئین‌ها همراه با عمل باز جذب وارد ژل می‌شوند. برای بعد اول از نوارهای IPG ۱۷ سانتی‌متری

برخی از ژن‌هایی که بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری فعال می‌شوند، پروتئین‌های حفاظتی از قبیل پروتئین اسموتین (۴۶)، پروتئین‌های LEA (۴۷) و انتقال دهنده‌های یونی (۴۰) را کد می‌کنند، سایر ژن‌ها آنزیم‌هایی را کد می‌کنند که در فرآیندهای متابولیکی، بویژه متاثر از تنش شوری، سهم هستند (۱۷). لاپهیللی و همکاران (۲۵) گزارش کردند که تنش‌های آبی، شوری یا سرما، تجمع پروتئین‌های LEA و شبه LEA القاء شده را تحریک کردند. همچنین تنش شوری باعث تسریع تولید گونه‌های اکسیژن فعال [Reactive Oxygen Species (ROS)] در سلول‌های گیاهی نیز می‌شود. تعادل بین تشکیل و تخریب ROS فاکتور تعیین کننده در شدت تنش اکسیداتیو و تخریب سلولی است. گیاهان می‌توانند سطح ROS را از طریق مکانیزم‌های پیچیده توسط چندین آنزیم تنظیم کنند. ثابت شده است که تیمار شوری در گیاهان پنبه منجر به افزایش فعالیت پراکسیداز و گلوکاتایون رداکتاز (GR) در ارقام متحمل به شوری شده بود، در حالی که فعالیت این آنزیم‌ها در ارقام حساس به شوری ثابت ماندند و یا کاهش یافتند (۱۸). در گیاهان ذرت و نخود نیز تحت تنش شوری افزایش در فعالیت GR و آسکوربات پراکسیداز (APX) مشاهده شد (۳۱). همچنین بیان آنزیم APX در گندم‌های دوروم نیز تحت تنش شوری افزایش یافت (۷).

تکنیک‌های پروتئومیکس روش‌های نیرومندی برای شناسایی پروتئین‌های مرتبط با یک سیگنال محیطی یا نموی ویژه را ارائه می‌کنند (۱۹). مطالعات نشان دادند که به علت تغییرات پس از ترجمه‌ای، فراوانی پروتئین‌ها همیشه با سطوح mRNA همبستگی ندارند (۲۰). بنابراین تنها مطالعه خود پروتئین‌ها می‌تواند اطلاعاتی در مورد مقادیر واقعی و فعالیت‌شان را فراهم نماید (۴۸). کشاورزی در خاک‌های شور نیازمند افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری است. خویشاوندان وحشی گندم ممکن است منابع متحمل به شوری مناسبی برای اصلاح گندم باشند (۱۰). درک مکانیسم‌هایی که گیاهان به هنگام مواجهه با تنش به کار می‌برند، کمک شایان توجهی به محققین اصلاح‌گر خواهد کرد. در این مطالعه، *Aegilops tauschii* که منشأ ژنوم D گندم هگزاپلوئید است (۲۹)، به منظور شناسایی تغییرات پروتئینی بافت برگی توسط تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت.

با دامنه pH ۴-۷ استفاده گردید. در این تحقیق از دستگاه مولتی فور II برای انجام بعد اول (IEF) و از دستگاه ProteinII Xi Cell (شرکت بیورد) برای انجام بعد دوم استفاده شدند. در بعد دوم از ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد استفاده گردید. مراحل رنگ آمیزی طبق پروتوکول بلوم و همکاران انجام شد (۳). پس از رنگ آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر Gs800 (شرکت بیورد) اسکن و با فرمت تیف در کامپیوتر ذخیره شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار Melanie 7 استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در ژل‌های تیمارهای مختلف را علامت زده و پس از استخراج مقدار کمی درصد حجمی (%Vol) لکه‌ها داده‌ها مورد تجزیه آماری t-student قرار گرفتند. لکه‌هایی که مقادیر کمی بیان آن‌ها در سطح آمار ۵ درصد تفاوت معنادار و به میزان بیش از ۱/۵ برابر افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دادند، به عنوان لکه‌های کاندید شناخته شدند.

هضم پروتئین‌ها در ژل و تجزیه با طیف سنج جرمی

لکه‌هایی که در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نشان دادند، جهت شناسایی با طیف سنج جرمی، از روی ژل‌های رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو جداسازی شدند. لکه‌های پروتئینی جدا شده پس از سه بار شستشو با آب خالص جهت تجزیه توسط طیف سنج جرمی (MALDI-TOF-TOF) به دانشگاه یورک انگلستان فرستاده شدند. جهت شناسایی پروتئین‌ها، داده‌های حاصل از طیف سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBIInr مورد تجزیه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

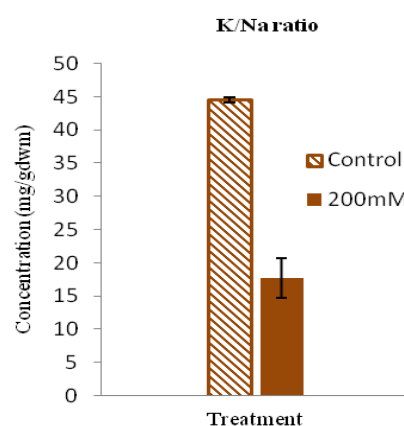
به منظور اعمال تنش شوری گیاهچه‌های ۴ برگی به مدت ۱۷ روز در معرض غلظت ۲۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. برای مقایسه تیمار شوری و کنترل از آزمون t استفاده شد و نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمار شوری و کنترل در سطح یک درصد وجود دارد (از نظر نسبت Na^+/K^+) (شکل ۱). به منظور بررسی اثر تنش شوری بر روی الگوی پروتئوم برگ *Aegilops tauschii* پروتئین‌ها از برگ‌های پنجم گیاهچه‌های تنش دیده و گیاهچه‌های تنش ندیده استخراج شدند. پس از تجزیه ژل‌های

رنگ آمیزی شده با نیترات نقره، تعداد ۱۳۵ لکه پروتئینی به طور تکرار پذیر در ژل‌ها شناسایی و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. از آزمون آماری تی استیودنت برای شناسایی تغییرات بیان بین لکه‌ها در تیمارهای شاهد و تنش دیده در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون تی استیودنت نشان داد، تعداد ۱۸ لکه پروتئینی در مقایسه تیمار شوری با شاهد تغییر ۱/۵ برابری در بیان نشان می‌دهند. از بین این تعداد ۱۵ لکه پروتئینی افزایش بیان و ۳ لکه کاهش بیان نشان دادند. موقعیت تعدادی از این پروتئین‌ها در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. از بین لکه‌های پروتئینی که تغییر ۱/۵ برابری در بیان داشتند، تعداد ۱۱ لکه با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF شناسایی شدند. پروتئین‌های شناسایی شده در جدول ۱ آورده شده‌اند. در بین تمام پروتئین‌های شناسایی شده همبستگی نسبتاً خوبی بین مقادیر Isoelectric Point (PI) و Molecular Weight (MW) تئوریک و آزمایشی دیده می‌شود. نقش برخی از پروتئین‌های شناسایی شده در تنش شوری و سایر تنش‌های محیطی به خوبی شناخته شده است. غالب این پروتئین‌ها در تنظیم متابولیسم کربوهیدرات، اسیدآمین، نیتروژن و مسیر ROS scavenging دخیل هستند، که در زیر به آن‌ها پرداخته می‌شوند:

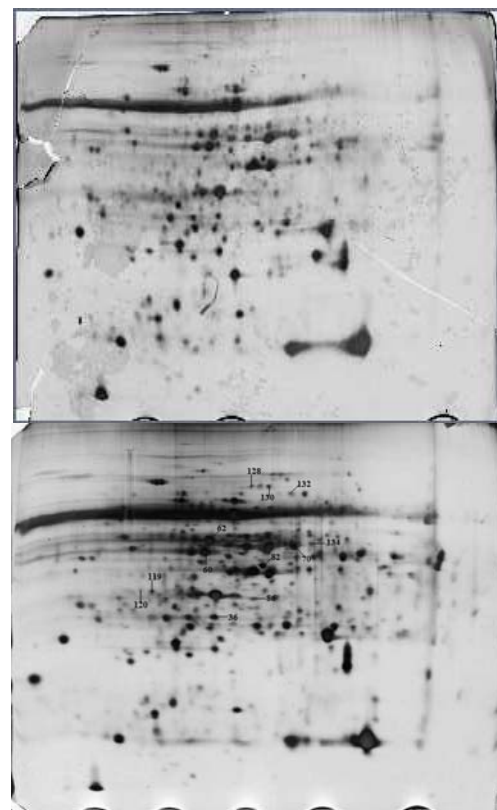
یکی از مکانیزم‌های مهمی که گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی به کار می‌برند، ROS Scavenging است. ROS شامل رادیکال‌های آنیون سوپراکساید، رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکساید هیدروژن و اکسیژن منفرد است که در گیاهان تحت تنش محیطی تولید می‌شوند و باعث چندین اثر منفی می‌شوند که از آن به عنوان تنش اکسیداتیو نام برده می‌شود. علاوه بر این، ROS باعث تخریب پروتئین می‌شود. برای خنثی کردن تخریب ROS، تغییر کمی پروتئین‌هایی که نقش مهمی در ROS Scavenging دارند، از قبیل آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کربونیک آنهیدراز نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۸). در این مطالعه نیز مقدار بیان آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شوری افزایش یافت. رونوشت-های آسکوربات پراکسیداز به صورت قوی تحت تنش شوری در نخود نیز القا شدند (۲۳)، هم چنین بیان این آنزیم در گندم‌های دوروم تحت تنش شوری نیز افزایش یافت (۷). یکی دیگر از اثرات تنش‌های محیطی افزایش در غلظت اسیدآمین‌ها و آمین‌ها

و آنزیم‌های دخیل در سنتز حفاظت کننده اسمزی و تنظیم کننده اسمزی انجام می‌گیرد (۸). نتایج ما نشان داد که سطح بیان آنزیم گلوتامین سنتاز تحت تنش شوری افزایش یافت که موافق با کار کاروسو و همکاران (۲۰۰۸) است (۷). لیپوکالین‌ها گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌های کوچک و اکثراً خارج سلولی هستند که در مهره‌داران و بی‌مهرگان، گیاهان و باکتری‌ها یافت می‌شوند. لیپوکالین‌ها در ابتدا به عنوان پروتئین‌های انتقال دهنده مشهور شدند، اما در حال حاضر مشخص شده است که برخی از آن‌ها در کارکردهای خیلی مهم دیگری از جمله مدولاسیون رشد سلولی و متابولیسم، اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی، رشد عصبی و تولید مجدد، تنظیم پاسخ ایمنی، گیرنده بو و بیوزنر غشا و تعمیر نقش دارند (۱۵). یک مطالعه در گیاهان، حضور دو پروتئین شبه لیپوکالین را نشان داد که این لیپوکالین‌ها آنزیم‌های کلیدی چرخه گرانوفیل برای حفاظت در برابر تخریب اکسیداتیو بودند (۶). در این مطالعه نیز افزایش در سطح بیان پروتئین لیپوکالین مشاهده گردید. پروتئین cp31AHv جزو پروتئین‌های متصل شونده به RNA پلاستییدی که در هسته کد می‌شوند Nuclear-encoded RNA-binding Proteins (RNBPs) (plastid)، به شمار می‌آید. تصور می‌شود که این RBNP‌ها در کنترل پایداری mRNA پلاستییدی به هنگام تبدیل پروپلاستیدها به کلروپلاست‌ها و نیز برای بلوغ صحیح RNA نقش مهمی را ایفا می‌کند (۲۲). در تحقیقی که در گیاه اسفناج بر روی این نوع پروتئین‌ها انجام گرفته است (۳۹) نقش‌های مذکور تایید شده‌اند. در مطالعه دیگری که بر روی گیاه جو انجام گرفته است، نشان داده شده است که بیان ژن کدکننده cp31AHv با نمو برگ جو همراه است، با این حال بیان این ژن تحت تاثیر نور قرار نمی‌گیرد و بدیهی است که یک فاکتور پلاستییدی مستقل از نور برای فعال‌سازی رونویسی این ژن ضروری است، که مشخص نشده است (۱۰). در این مطالعه بیان پروتئین cp31AHv تحت تنش شوری افزایش یافت. تیوردوکسین‌ها، رداکتازهای دی‌سولفیدی هستند که وضعیت اکسیداسیون احیا پروتئین‌های هدف را تنظیم می‌کنند. تیوردوکسین‌های گیاهی در بخش‌های اصلی سلول قرار دارند. حدود نیمی از آن‌ها در پلاستید هستند. مطالعات متعددی نشان

است. که این امر احتمالاً به علت دخالت‌شان در تنفس نوری برای حفظ جریان الکترون جهت جلوگیری از بازدارندگی نوری تحت شرایط تنش است (۴۳). واقع گیاهان در واکنش به تنش ممکن است تجمع اسیدآمین‌ها و آمین‌ها (که به عنوان حفاظت کننده اسمزی و تنظیم کننده اسمزی عمل می‌کنند) را افزایش دهند که این افزایش به واسطه افزایش در سطوح بیان پروتئین‌ها



شکل ۱- مقادیر میانگین و انحراف معیار نسبت پتاسیم به سدیم تحت شرایط کنترل (صفر) و تیمار شده با ۲۰۰ میلی مولار NaCl



شکل ۲- الکتروفورز دو بعدی گیاه شاهد (بالا) و تیمار شده با ۲۰۰ میلی مولار NaCl (پایین)

جدول ۱- پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF-TOF

	Spot ID	gi Number	Identity	Average ratio	% Coverage	MS Score	Exp pI/MW(kDa)	The pI/MW(kDa)
1	36	gi 15808779	ascorbate peroxidase [<i>Hordeum vulgare</i>]	3.004	44	257	5.1 , 27.964	5.04419 , 28
2	82	gi 255568816	alcohol dehydrogenase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	2.94	11	95	41.607 , 8.61	5.44066 , 39
3	62	gi 71362640	plastid glutamine synthetase isoform GS2c [<i>Triticum aestivum</i>]	1.65	33	563	47.016 , 5.75	5.02094 , 45
4	60	gi 125580	RecName: Full=Phosphoribulokinase, chloroplastic; Short=PRKa	2.88	52	436	45.512 , 5.72	4.99769 , 41
5	120	gi 170293925	ribulose-15-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	1.62	25	89	7.31 , 42.4	4.64705 , 33
6	70	gi 167096	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform 1 [<i>Hordeum vulgare</i>]	0.52	44	571	47.341 , 8.62	5.70728 , 45
7	134	gi 116059952	Thioredoxin-related: Thioredoxin domain 2 (ISS) [<i>Ostreococcus tauri</i>]	1.77	24	61	38.225 , 5.34	5.8165 , 46
8	126	gi 75114857	RecName: Full=Cell division protease ftsH homolog 2, chlorop	1.61	23	262	72.607 , 5.54	5.17475 , 54
9	128	gi 3550467	cp31AHv protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>]	2.33	30	343	4.61 , 31.903	5.26667 , 54
10	114	gi 131394	RecName: Full=Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplas	3.56	17	90	27.424 , 8.84	5.76068 , 26
11	103	gi 18650668	temperature stress-induced lipocalin [<i>Triticum aestivum</i>]	2.24	30	79	5.5 , 21.809	5.60152 , 21

داده‌اند که ژن‌های تیوردوکسین تحت شرایط تنش زنده و غیر زنده افزایش بیان نشان می‌دهند (۳۵). به‌عنوان مثال ژن‌های *Trx* *h5* و *h8* به‌طور قوی با تنش زنده و غیر زنده القا می‌شوند و بیشتر ژن‌های کدکننده *Trx* پلاستییدی ترجیحا در برگ‌ها در پاسخ به تغییرات غلظت و کیفیت نور بیان می‌شوند (۳۰). هم‌چنین در یک مطالعه دیگر مقدار رونوشت *Trx h5* آرابیدوپسیس به‌طور معنی‌داری در واکنش با یک پاتوژن و به‌طور کلی تحت تنش اکسیداتیو افزایش یافت (۲۶). در سیب‌زمینی نیز محدودیت‌های شدید غیر زنده و عواملی که به‌طور مستقیم سطح بالایی از ROS را تولید می‌کنند، باعث افزایش زیاد تیوردوکسینی به نام CDS32 گردیدند (۳۶). در این مطالعه نیز بیان تیوردوکسین افزایش پیدا کرد. تولید آنزیم الکل دهیدروژناز (ADH) در بسیاری از گیاهان تحت تنش اکسیژن کم، القا می‌شود (۲۴). اهمیت القا ADH در

شرایط تنش تسریع تخمیر اتانولی استء تا گلیکولیز به خاطر مصرف پیروات و تولید دوباره NAD^+ ادامه یابد (۳۷). اگر چه نقش بیوشیمیایی ADH تنها تحت شرایط اکسیژن کم آشکار می‌شود، با این حال ژن‌های الکل دهیدروژناز تحت تنش اکسیژن کم، خشکی و دمای پایین در آرابیدوپسیس و ذرت القا شدند (۹) و (۱۴). به‌علاوه کاربرد خارجی هورمون اسید آبسزیک در آرابیدوپسیس ژن‌های الکل دهیدروژناز را القاء کرد (۱۳). در این آزمایش هم بیان ژن آنزیم الکل دهیدروژناز القا گردید. فتوسیستم II که واکنش بیوشیمیایی اولیه فتوستز را انجام می‌دهد، یکی از سوپرکمپلکس‌های چند زیر واحدی در غشاء تیلاکویدی است. ثابت شده است که پروتئین D_1 متصل به مرکز واکنش، به تنش محیطی خیلی حساس است و در بین زیرواحدهای پروتئینی کمپلکس فتوسیستم II این پروتئین هدف اصلی تنش است (۳۳).

در شرایط تنش‌زا، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و رادیکال‌های کاتیونی داخلی (ECR) از قبیل $P680^+$ در فتوسیستم II تولید می‌شوند که در مرحله بعد باعث آسیب اکسیداتیو پروتئین D_1 می‌شوند که این امر باعث تخریب پروتئین D_1 (۲) و تشکیل تجمعات پروتئینی بین پروتئین D_1 و پلی پپتیدهای اطرافش (۴۴) می‌شود. تجمع پروتئین D_1 ممکن است منجر به تغییر ساختاری کمپلکس فتوسیستم II و در نتیجه مرگ کلروپلاست و مرگ سلول شود (۴۴). اخیراً با به دست آمدن مدارک زیادی پیشنهاد شده است که پروتئاز FtsH در شکست اولیه پروتئین D_1 تخریب شده، دخیل است. FtsH یک متالوپروتئاز غشایی وابسته به ATP است (۴۱). در آرابیدوپسیس نشان داده شده است که FtsH نقش مهمی را در تخریب قطعه ۲۳ کیلودالتونی حاصل از تخریب اولیه پروتئین D_1 را بازی می‌کند. نتایج ما نیز نشان داد که تحت تنش شوری سطح بیان این آنزیم افزایش پیدا کرد (۲۷). در این تحقیق فراوانی Oxygen-Evolving Enhancer Protein₂ (OEE₂) نیز افزایش یافت، در یک مطالعه که بر روی *Chlamydomonas reinhardtii* انجام گرفت، از موتانتی که فاقد ژن *OEE₂* بود استفاده گردید و نشان داده شد که در غیاب *OEE₂* میزان آزادسازی اکسیژن فتوستیزی کاهش یافت، اما همچنان سلول‌های فاقد این پروتئین قادر به فتوستتیز بودند (۲۸). سطح بیان آنزیم فسفوریبولوگیناز نیز که باعث فسفوریلاسیون ریبولوز ۵-فسفات به ریبولوز ۱ و ۵ فسفات می‌شود (مرحله کلیدی در مسیر پنتوز فسفات) در این تحقیق افزایش یافت. در این تحقیق مشخص شد، که زیرواحد بزرگ رابیسکو تحت شرایط شوری بیان‌شان افزایش یافت. هاجداچ و همکاران (۲۱) گزارش کردند، که بیان زیرواحد بزرگ رابیسکو در برگ‌های برنج تحت تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابد. رابیسکو اکتیواز، متعلق به پروتئین‌های خانواده AAA^+ است، که نقش‌های اساسی در همه سلسله‌های موجودات زنده ایفا می‌کند. این آنزیم احتمالاً به عنوان چپرون‌های مولکولی عمل می‌کند. نقش اصلی اکتیواز حفظ فعالیت کاتالیتیکی رابیسکو با حذف قندهای بازدارنده از جایگاه فعال رابیسکو کاربامایل شده یا غیر کاربامایل شده است (۳۴). با این حال بیان این آنزیم در پاسخ به تنش شوری کاهش پیدا کرد. در حال حاضر تنش شوری یکی از تنش‌های مهمی است، که

عملکرد گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. درک ساز و کارهایی که گیاهان به هنگام مواجهه با تنش به کار می‌برند، کمک شایان توجهی به محققین اصلاح‌گر خواهد کرد. در گندم نان با اعمال تنش شوری و با استفاده از روش پروتئومیکس نشان داده شده است که آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز، پروتئین فریتین، تریوز فسفات ایزومراز، متیونین سیتاز، و پروتئین ناقل H^+ ATPase افزایش بیان و پروتئین آکونیتات هیدراتاز کاهش بیان نشان دادند (۱۶). آنزیم‌های فسفو پیروات هیدراتاز، تریوزفسفات ایزومراز و گلوکوز ۶ فسفات دهیدروژناز که در تنظیم متابولیسم کربوهیدرات دخیل‌اند و آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گندم‌های دوروم تحت تنش شوری نیز افزایش یافتند (۷). همچنین زمانی که رقم شانرونک ۳ که اخیراً اصلاح شده است، تحت تنش شوری قرار گرفت و پروتئوم کل آن بررسی گردید، مشخص شد که زیرواحد ATPase E پروتئونی واکوئلی، پروتئین مرتبط با ناقل ABC، زیرواحد ۷ تنظیم‌کننده پروتئاز 26S، پیش ماده پراکسیداز، پراکسیداز ۹، آسکوربات پراکسیداز و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ سیتوسولی افزایش بیان نشان دادند (۴۲). با مطالعه گندم تائوشی که ژنوم DD گندم نان و دوروم به آن نسبت داده می‌شود، علاوه بر پروتئین‌هایی که در مطالعات مختلف در گندم شناسایی شده‌اند، یکسری پروتئین‌های جدید دیگری نیز شناسایی شدند، از جمله پروتئاز FtsH و پروتئین لیپوکالین. این امر نشان‌دهنده پتانسیل خوب گندم تائوشی است. این مطالعه نشان داد که پروتئین‌های شناسایی شده در برگ گندم *Aegilops tauschii* در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف و دفاعی دخیل‌اند و برخی احتمالاً بخشی از یک پاسخ کلی به تنش هستند، که به گیاه کمک می‌کنند، تا در شرایط زیر اپتیمم زنده بماند، سایر پروتئین‌ها در کاهش اثرات فیزیولوژیکی منفی تیمار شوری سهیم هستند. تکنیک پروتئومیکس، تکنیک بسیار خوبی جهت ارزیابی زمینه ژنتیکی گیاهان زراعی است. پروتئین‌های شناسایی شده در این تحقیق می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش مقاومت به شوری، مورد توجه اصلاح‌گران قرار گیرند.

منابع

1. Askari H, Edqvist J, Hajheidari M, Kafi M and Hosseini Salekdeh G (2006) Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda baegyptiaca* leaves, *Proteomics*, 6: 2542–2554
2. Barber J and Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 61–66.
3. Bloom H, Beier H, Gross H S (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 8: 93–99.
4. Bohnert H J, Nelson D F, Jensen R G (1995) Adaptation to environmental stresses, *Plant Cell*, 7:1099–1111.
5. Bradford MM (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.
6. Bugos R C, Hieber A D and Yamamoto H Y (1998) Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants, *J. Biol. Chem.* 273: 15321–15324.
7. Caruso G, Cavaliere C, Guarino C, Gubbiotti R, Foglia P & Laganà A (2008) Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 391:381–390.
8. Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry, *Plant Science*, 177: 570–576.
9. Christie PJ, Hahn M and Walbot V (1991) Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings, *Plant Physiol*, 95: 699–706.
10. Churin Y, Wolfgang R, Hess T, BoÈrner (1999) Cloning and characterization of three cDNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.): differential regulation of expression by light and plastid development, *Curr Genet*, 36: 173–181
11. Colmer TD, Flowers TJ, Munns R (2006) Use of wide crosses and wild relatives to improve salt tolerance of wheat, *Journal of Experimental Botany*, 57: 1059–1078.
12. Damerval C, de Vienne D, Zivy M, and Thiellement H (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins, *Electrophoresis*, 7: 52–54.
13. de Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES and Dolferus R (1996) Absciscic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 111: 381–391.
14. Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ and Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* Adh gene, *Plant Physiol*, 105: 1075–1087.
15. Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem. J.*, 318: 1–14.
16. Gao L., Yan X., Li X., Guo G., Hua Y., Ma W., Yan Y. 2011. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*. article in press.
17. Gong Z, Koiwa H, Cushman MA, Ray A, Bufford D, Kore-Eda S, Matsumoto TK, Zhu J, Cushman JC, Bressan RA and Hasegawa PM (2001). Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants, *Plant Physiol*, 126: 363–375.
18. Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton, *Crop Sci*, 34: 706–714.
19. Gygi SP, Aebersold R (2000) Mass spectrometry and proteomics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:489–494.
20. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Molecular and Cellular Biology*, 19:1720–1730.
21. Hajduch M, Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M, Pretova A (2001) High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/ fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins, *Electrophoresis*, 22:2824–2831.
22. Hayes R, Kudla J, Gruissem W (1999) Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation, *Trends Biochem*, 24:199–202
23. Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses, *Plant Cell Environ*, 23:853–862.
24. Kennedy RA, Rumpho ME and Fox TC (1992) Anaerobic metabolism in plants, *Plant Physiol*, 100: 1–6.
25. Labhili M, Joudrier P, Gautier MF (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance, *Plant Science*, 112: 219–230.
26. Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y and Reichheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor, *Plant Physiol*, 134: 1006–1016.
27. Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB and Adam Z (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein, *Plant Cell*, 12: 419–431.
28. Mayfield SP, Rahire M, Frank G, Zuber H and Rochaix JD (1987b) Expression of the nuclear OEE2 gene is required "for high levels of photosynthetic

- oxygen evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 749-753.
30. McFadden ES, Sears ER (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives, Journal of Heredity, 37: 81-89.
 31. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M and Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants, Trends Plant Sci., 9: 490-498.
 32. Mittova VO, Lgamberdiev AU, (1998) 11TH Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, 7-11 September, Varna, Bulgaria.
 33. Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses, Plant Cell Environ, 16: 15-24.
 34. Ohad I, Kyle DJ and Arntzen CJ, (1984) Membrane protein damage and repair: Removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes, J. Cell Biol., 270: 14919-14927.
 35. Portis Jr AR (2003) Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone, Photosynthesis Research, 751: 11-27.
 36. Reichheld JP, Mestres-Ortega D, Laloï C and Meyer Y (2002) The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response, Plant Physiol, Biochem, 40: 685-690.
 37. Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier G (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, Plant J, 13: 97-107.
 38. Rivoal J, and Hanson AD (1994) Metabolic control of anaerobic glycolysis: Overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts hypothesis and points to a critical role for lactate secretion, Plant Physiol, 106: 1179-1185.
 39. Robert A I (1992) Official methods of analysis, 15 thend University of Georgia. Pp: 790-792.
 40. Schuster G, Gruissem W (1991) Chloroplast mRNA 3' end-processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein, EMBO J, 10:1493-1502
 41. Tester M, Davenport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, Ann. Bot, 91: 503-527.
 42. Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Mori H, Yamanaka K, Niki H, Hiraga S and Ogura T (1993) The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression, J. Bacteriol, 175: 1344-1351.
 43. Wang M.C., Peng, Z.Y, Li C.L., Li F., Liu C., Xia G.M. 2008. Proteomics analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/Thinopyrum ponticum. Proteomics. 8: 1470-1489.
 44. Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection, Trans. R. Soc, B 355: 1517-1529.
 45. Yamamoto Y (2001) Quality control of photosystem II, Plant Cell Physiol, 42: 121-128.
 46. Yıldız M (2007) Two-dimensional electrophoretic analysis of soluble leaf proteins of a salt-sensitive (*Triticum aestivum*) and a salt-tolerant (*Triticum durum*) cultivar in response to NaCl stress, J. Integr. Plant Biol, 49: 975-981.
 47. Zhu B, Chen TH, Li PH (1995) Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato, Plant Mol. Biol, 28: 17-26.
 48. Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 53: 247-273.
 49. Zivy M, de Vienne D (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology, Plant Molecular Biology, 44:575-580.