

## مطالعه پاسخ پروتئوم برگ جو وحشی *H. marinum* در شرایط تنش

### شوری

#### Study on leaf proteome response of *H. marinum* to salinity stress

آزاده بوستانی<sup>۱</sup>، فواد فاتحی<sup>۲\*</sup>، رضا عزیزی نژاد<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه اصلاح نباتات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

تهران، ایران

۲- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Boustani A<sup>1</sup>, Fatehi F<sup>\*2</sup>, Azizinezhad R<sup>1</sup>

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

### چکیده

تنش شوری از مهم ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید محصولات زراعی محسوب می شود. گیاهان قادرند در پاسخ به تنش های محیطی مکانیسم های سازگاری خود را فعال کنند و با تغییر در بیان ژن هایشان به عوامل محیطی واکنش نشان دهند. در همین راستا از تکنیک پروتئومیکس به منظور شناسایی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش شوری در یک گونه وحشی متحمل به شوری جو به نام "*Hordeum marinum*" استفاده شد. گیاهان در گلخانه تحت ۳ سطح تیمار شوری قرار گرفتند و در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار بررسی شدند. اندازه گیری غلظت Na و K با روش هضم خشک و دستگاه فلیم فتومتر انجام شد. نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط کنترل در کلیه نمونه ها بیش تر از شرایط تنش بوده و هم چنین این نسبت در سطح شوری ۳۰۰ میلی مولار نسبت به ۲۰۰ میلی مولار NaCl بالاتر بوده است. در مرحله بعد پروتئین های برگ پس از استخراج و اندازه گیری غلظت، توسط الکتروفورز دوبعدی جداسازی شدند. با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF ۲۰ لکه پروتئینی شناسایی شدند. پروتئین های شناسایی شده شامل روبیسکو، روبیسکو اکتیواز، پروتئین های ریبوزومی، کولین فامیلی، پروتئین های متصل شونده به RNA، ملات دهیدروژناز سیتوزولی، فروکتوکیناز، تیوردوکسین، پروتئین های مرتبط با سیستمین بودند. این پروتئین ها در مراحل نموی گوناگون و مسیرهای متابولیکی مختلف مانند متابولیسم انرژی، فعالیت آنتی اکسیدانی، ترجمه، پردازش، تجزیه پروتئین، فتوستت، انتقال سیگنال نقش دارند.

### واژه های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی

پروتئومیکس

تنش شوری

*Hordeum marinum*

## مقدمه

گندم نان استفاده می‌شود) در نظر گرفته شده‌است (Colmer et al. 2005).

برخلاف اینکه شکل ثابتی از ژنوم در یک ارگانیزم وجود دارد، پروتئوم می‌تواند اشکال مختلفی داشته باشد و با تغییر فاکتورهای محیطی پروتئین‌ها تغییر می‌کنند. پروتئومیکس زمینه بسیار گسترده‌تری نسبت به ژنومیکس دارد و به‌طور مستقیم برای بررسی اجزاء درگیر در یک پروسه بیولوژیکی و سطوح کمی آن‌ها می‌تواند به‌کار گرفته شود. در واقع پروتئین‌هایی که نقش آنزیمی، تنظیمی و ساختاری را دارا می‌باشند و محصول نهایی ژنوم و رونویسی هستند در این روش قابل ارزیابی و شناسایی خواهند بود. با استفاده از الکتروفورز دوبعدی برای جداسازی لکه‌های پروتئینی و دستگاه طیف سنج جرمی برای شناسایی پروتئین‌ها، پروتئومیکس به یک ابزار قدرتمند در شناسایی پروتئین‌های بیان شده در شرایط و تنش‌های مختلف گیاهی تبدیل شد. پروتئومیکس برای بررسی اثر تنش‌های غیر زنده مانند شوری، خشکی، سرما، گرما، ازت، غلظت محیط، فلزات سنگین و زنده مانند باکتری، قارچ و ویروس استفاده شده‌است (Rossignol et al. 2006). با این وجود در زمینه تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های برگ گونه وحشی جو *Hordeum marinum* با ژنوم پایه X (Taketa et al. 1999) به تنش شوری طولانی مدت تحقیقی صورت نگرفته است. برخی از تحقیقات صورت گرفته در این زمینه و نیز در گیاهان دیگر در ادامه آمده است.

در مطالعه‌ی پاسخ پروتئوم برگ جو در شرایط تنش شوری توسط (Fatehi et al. 2012) پروتئین‌هایی شامل Oxygen-evolving enhancer protein، فسفات نوکلئوزیدی کیناز، سولفوکسید ردوکتاز، پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA کلروپلاستی، سیکلوفیلین کلروپلاستی، رویسکو، اکتیواز رویسکو، Nascent polypeptide associated complex، تیوردوکسین (TRX)، دهیدرواسکوربات ردوکتاز، شبه جرمین، پروفیلین، دهیدروژناز مالات، پروتئین عمومی تنش و پروتئین‌های ریبوزومی بودند که در مکانیزم فتوسنتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل هستند.

(Kav et al. 2004) تحقیقی را به‌منظور شناسایی پروتئین‌های متأثر از تنش شوری در ریشه نخود انجام دادند. بعد از آنالیز

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که تولید محصولات کشاورزی را در خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک کاهش می‌دهد. مجموع مناطقی که در جهان تحت تأثیر نمک قرار دارند به‌طور مداوم در حال افزایش می‌باشند و بر اساس برآوردهای انجام یافته حدود ۳۰-۵۰ درصد از اراضی دنیا تحت تنش شوری قرار دارند و در ایران حدود ۵۰ درصد از اراضی تحت کشت با مشکل شوری مواجه می‌باشند و طبق آمار موجود، مجموع خاک‌های شور و سدیمی آن حدود ۲۷ میلیون هکتار تخمین زده می‌شود و پیش‌بینی می‌شود این رقم به‌علت استفاده نادرست از منابع آب و خاک افزایش یابد (Fatehi et al. 2012). اثرات تنش شوری بر گیاهان شامل تنش اسمزی، سمیت یونی، کمبود و عدم تعادل مواد غذایی است که منجر به آسیب غشایی، کاهش رشد و تقسیم سلولی می‌شود. بنابراین تحمل گیاهان نسبت به شوری یک پدیده‌ی بسیار پیچیده است که با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط بوده و این منتج به تغییرات نمو و مورفولوژی می‌شود (Neto et al. 2015).

جو یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که به‌واسطه رشد آن در نواحی کم حاصل‌خیز ناشی از خشکی، دمای پایین و شوری دارای اهمیت شده‌است. سطح زیر کشت جو ایران معادل ۱/۷ میلیون هکتار بوده گونه‌های زیادی از جو قادر به جوانه زدن در غلظت بالای نمک (۳۰۰ میلی‌مولار) هستند (Farnia 2011).

جو با از سه استراتژی برای تحمل نسبت به تنش شوری استفاده می‌کند: تجمع و یا سنتز مواد محلول سازگار، حفاظت آنتی‌اکسیدانی با سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPX))، و پایداری یونی (Munns and Tester 2008). بسیاری از گونه‌های وحشی جو در زیستگاه‌های با خاک‌های شور یافت شدند و ممکن است منابع خوبی برای تحمل به شوری باشند (Fatehi et al. 2012). گونه‌ی وحشی *Hordeum marinum* در باتلاق‌های شور زندگی می‌کند و متحمل به شوری است و حتی متحمل‌تر از *Lophopyrum elongatum* (یکی از بستگان وحشی گندم، که به‌عنوان منبع ژن‌های جدید برای بهبود تحمل به شوری

(2007) Malekshah et al. الگوی تغییرات پروتئینی غشاء پلاسمایی ریشه برنج (رقم ۶۵۱ IR) را تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بررسی کردند. این پروتئین‌ها در سازگار کردن گیاه به تنش‌های محیطی نقش داشتند. در واقع این پروتئین‌ها که در غشاء پلاسمایی قرار داشتند در انتقال پیام، فولدینگ پروتئین‌ها، ساخت پمپ‌ها و کانال‌های غشایی و سیکل متیل دخیل بودند.

(2007) Aghaei et al. بر روی تغییرات الگوی پروتئوم در هیپوکوتیل و ریشه سویا تحت تنش شوری آزمایشات پروتئومیکس را انجام دادند. از بین این پروتئین‌ها، B-کونگلاسینین و یک پروتئین پیش البستوری افزایش بیان یافته بودند. درحالی‌که بازدارنده پروتئاز، لکتین و ساقه ۳۱ کیلو دالتونی پیش‌ساز گلیکو پروتئین، کاهش بیان را نشان می‌دادند. این نتایج نشان می‌دهد که تنش شوری می‌تواند باعث تغییر در الگوی بیان پروتئین‌های خاصی در هیپوکوتیل و نیز ریشه گیاه سویا شود و ایجاد سازگاری با محیط رخ دهد.

با توجه به اینکه تنش شوری یکی از تنش‌های پلی ژن می‌باشد و به‌طور وسیع مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نیز تحقیقات صورت گرفته در گیاهان مختلف و تنش‌های متفاوت تاکنون تحقیقی در زمینه شناسایی پروتئین‌های دخیل در ایجاد تحمل به تنش شوری طولانی مدت در ژنوم X در جنس هوردوم صورت نگرفته است، تحقیق حاضر انجام شد و تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های برگ گونه وحشی *Hordeum marinum* گیاه جو به تنش شوری طولانی مدت مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. اهداف این تحقیق مقایسه الگوی تظاهر پروتئین در تیمارهای تنش و شاهد، شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری و کمک به درک بهتر عملکرد آن‌ها می‌باشد. به کارگیری این اطلاعات در کنار داده‌های حاصل از سایر تکنیک‌های مولکولی می‌تواند بستر مناسبی جهت بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه جو و دیگر گیاهان مشابه باشد.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق پنجاه عدد بذر مربوط به گونه *Hordeum marinum* (جمع‌آوری شده از کرمانشاه و خراسان) پس از ضد عفونی با محلول هیپوکلریت یک درصد در گلدان‌های حاوی

داده‌ها ۳۵ لکه پروتئین که دارای تغییرات قابل تشخیص بودند، جداسازی و انتخاب شدند تا به کمک ESI-Q-Tof شناسایی شوند. پروتئین‌های شناسایی شده شامل پروتئین‌های PR10، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز و نوکلئوتیدی فسفات کینازها می‌شوند. نقش تعدادی از این پروتئین‌ها هنوز نامشخص است. این اولین گزارش در مورد تغییر الگوی پروتئوم در ریشه گیاهان بود که نقش احتمالی پروتئین‌های PR10 در پاسخ به تنش شوری را نشان می‌داد.

(2006) Askari et al. الگوی پروتئوم برگ گیاه هالوفیت *Suaeda aegyptiaca* را در اثر تنش شوری بررسی کردند. تعداد ۲۷ پروتئین شناسایی شد که در مقاومت به تنش اکسیداتیو، سنتز گلیسین بتائین، فتوسنتز، سنتز ATP، تجزیه پروتئین، سم‌زدایی سیانید و فعالیت چارپرون‌ها دخیل بودند.

(2006) Dadashi et al. به بررسی الگوی بیان پروتئین در پانیکول برنج تحت تنش شوری پرداختند. با شناسایی این پروتئین‌ها توسط طیف‌سنجی جرمی، مشخص گردید که این پروتئین‌ها در افزایش بیان آنتی اکسیدانت‌ها، پروتئین‌های دخیل در ترجمه، رونویسی، انتقال و سنتز ATP نقش ایفا می‌کنند.

(2007) Jiang et al. تغییرات الگوی پروتئوم ریشه آرابیدوپسیس در شرایط هیدروپونیک در غلظت ۱۵۰ میل‌مولار نمک را بررسی نمودند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش و پروتئین‌های دخیل در چرخه‌های حذف ROS، انتقال پیام در سلول، ترجمه، بیوسنتز دیواره سلول، تجزیه پروتئین‌ها، متابولیسم انرژی، متابولیسم آمینو اسیدها و هورمون‌ها بودند.

(2007) Amini et al. برای بررسی الگوی تغییرات پروتئوم در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری، از روش پروتئومیکس استفاده کردند. ۱۰ لکه پروتئین توسط طیف‌سنج جرمی مورد شناسایی قرار گرفت که تعدادی از پروتئین‌ها شناسایی شد. انویل کوآنزیم A هیدراتاز، پروتئین شبه گیرنده EGF، و فسفو گلیسرات موتاز تحت تنش شوری دچار افزایش بیان شده بودند. این گزارش نیز تأییدی بر مشاهدات قبلی است که در تنش شوری چرخه‌های بیوشیمیایی مختلفی در گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرند.

(1976) استفاده شد. در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها (۱۲۰ میکروگرم) به داخل ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۷-۴، پروتئین‌ها در استوک باز جذب حل شده و هم‌زمان با عمل باز جذب وارد ژل شدند. عمل باز جذب در طول شب و به‌طور متوسط ۱۴ تا ۱۶ ساعت طول می‌کشد. از دستگاه مولتی فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس برای انجام بعد اول (IEF) استفاده شد، و لکه‌های پروتئینی بر اساس بار الکتریکی جداسازی شدند. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت بیورد استفاده شد و لکه‌ها بر اساس تفاوت در وزن جدا سازی شدند. مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتوکل (Bloom et al. 1987) و به‌وسیله نیترا نقره انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیورد اسکن و به فرمت تیف ذخیره شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار 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 آنالیز آماری تی استیوندت قرار گرفتند. لکه‌هایی که مقادیر کمی بیان آن‌ها در سطح آمار ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند (به میزان بیش از ۱/۵ برابر افزایش یا کاهش بیان) به‌عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

لکه‌های کاندیدا به‌منظور شناسایی به‌وسیله طیف‌سنج جرمی از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو جدا شدند. لکه‌های پروتئینی جدا شده سه بار با آب خالص شستشو و سپس با محلول ۵۰ میلی‌مولار بی کربنات آمونیوم ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) در ۵۰ درصد استونیتریل رنگ‌زدایی شدند. پس از این مرحله با استفاده از محلول ۱۰ میلی‌مولار DTT در ۵۰ درصد استونیتریل احیاء و با محلول ۴۰ میلی‌مولار یدواستامید در ۵۰ درصد استونیتریل آلکیل‌شدند. در نهایت دو بار با محلول ۱۰۰ درصد استونیتریل خشک شدند. هضم آنزیمی در طول شب و در دمای ۳۷ درجه با استفاده از آنزیم تریپسین انجام گرفت. پپتیدها سپس با استفاده از محلول ۰/۱ درصد TFA در ۵۰ درصد استونیتریل استخراج شدند. نمونه‌ها برای آنالیز و شناسایی پروتئین‌ها به دانشگاه یورک انگلیس فرستاده شد و آنالیز طیف سنج جرمی با استفاده از

پرلینت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در محیط گلخانه کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این آزمایش که در گلخانه انجام شد، گیاهان تا مرحله دو برگی با آب معمولی و بعد از آن با استفاده از محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحله ۴ برگی ادامه یافت. تیمارهای شوری با استفاده از آبیاری با آب شور (NaCl) در سه سطح صفر (شاهد آب معمولی)، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار به انجام رسیدند. برای اطمینان از اعمال شوری، از ابتدای شروع تا پایان تنش هدایت الکتریکی (EC) محلول‌های تهیه شده و نیز آب خارج شده از گلدان‌ها اندازه‌گیری شدند. در هر سطح شوری ۹ گلدان و در مجموع ۱۸ گلدان وجود داشت. تنش شوری در مرحله ۴ برگی اعمال شد (اعمال تنش به‌صورت تدریجی و بالا بردن EC به فاصله هر ۱۲ ساعت ۵۰ میلی‌مولار بود، زیرا اعمال تنش ناگهانی شوری در سطوح بالا به احتمال زیاد منجر به از بین رفتن گیاهان می‌شد) و نمونه‌های تحت تنش، سه هفته (۲۱ روز) تحت تنش قرار گرفته و سپس به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران منتقل شدند. نمونه‌های گرفته شده بلافاصله در فویل آلومینیومی پیچیده شده و در ازلت مایع فریز شدند. نهایتاً در فریزر با دمای ۸۰- تا زمان استخراج پروتئین نگهداری شدند. پس از انتخاب گیاهان متحمل نمونه‌های نگهداری شده در فریزر جهت بررسی پروتئومیکس مورد استفاده قرار گرفتند (Fatehi et al. 2012).

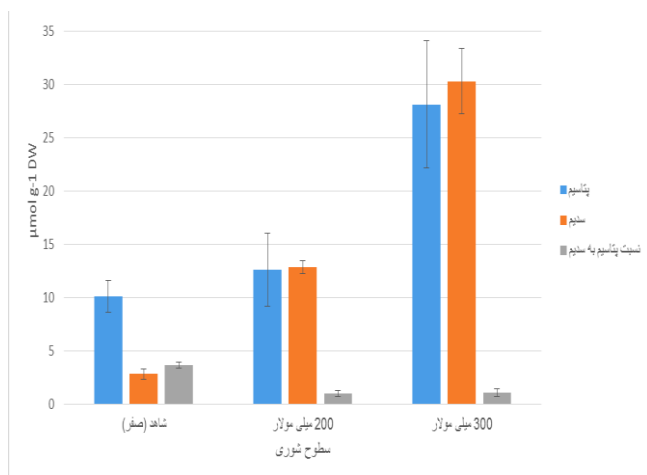
برای اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم مقداری از برگ‌های (برگ چهارم) جدا شده با آب مقطر شستشو شدند، نمونه‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $72^\circ\text{C}$  خشک شده و وزن خشک برگ‌ها محاسبه شد. به منظور تعیین غلظت سدیم و پتاسیم از روش هضم خشک و از دستگاه فلایم فتومتر مدل Carl zies PF5 (Germany) استفاده شد (Robert 1992).

برای ثبت و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Excel و Melanie 7 (تجزیه و تحلیل لکه‌ها) استفاده شد. مقایسات میانگین به روش دانکن صورت گرفت.

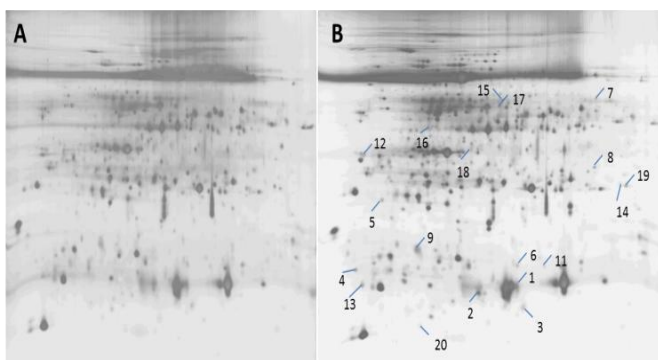
استخراج پروتئین از بافت برگ بر اساس روش Damerval et al. (1986) با اندکی تغییرات انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش Bradford

پروتئین‌ها در شکل ۲ نشان داده شده‌است. پروتئین‌های شناخته شده شامل ریبولوز ۱-۵ بیس فسفات کربوکسیلاز / اکسیژناز (روییسکو) (لکه‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۸)، روییسکو اکتیواز (لکه‌های ۱۵ و ۱۷)، پروتئین‌های ریبولوزومی (لکه‌های ۴ و ۱۳)، پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی (لکه ۱۲)، سیستاتین (لکه ۶)، مالات دهیدروژناز (لکه ۱۴)، تیوردوکسین (TRX) (لکه ۲۰)، فروکتوکیناز (لکه ۱۶). تمامی لکه‌ها در اثر تنش افزایش بیان نشان دادند به جز لکه ۱۰ که در شرایط تنش ناپدید شد.

در بین لکه‌های شناسایی شده لکه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۸ مربوط به روییسکو بودند و به ترتیب افزایش ۱/۹، ۳/۶، ۴/۳، ۱/۵، ۱/۹، ۲/۴، ۱/۸ و ۳/۱ برابری داشتند.



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین مقادیر سدیم و پتاسیم بر حسب میکرومول در گرم وزن خشک برگ شماره ۴ هوردنوم مارینوم در سه سطح شوری.



شکل ۲- لکه‌های شناسایی شده در برگ شماره ۴ *H. marinum* در شرایط کنترل (A) و شرایط تنش (B).

MALDI-TOF-TOF در دانشگاه یورک انگلستان انجام شد. داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBI nr مورد آنالیز قرار گرفتند که این کار توسط دانشگاه یورک صورت گرفت.

## نتایج و بحث

شکل ۱ نشان می‌دهد که در برگ شماره ۴ *H. marinum* مقادیر سدیم و پتاسیم تحت تنش شوری افزایش یافت. بیش‌تر بودن میزان سدیم در شرایط تنش با توجه به فنوتیپ خوب گیاه تحت استرس، نشان دهنده‌ی این است که گیاه با مکانیسم انباشت سدیم در بخش‌هایی از ساختار خود، نسبت به آسیب شوری تحمل میکند. نسبت پتاسیم به سدیم کاهش یافت ولی از محدوده‌ی مطلوب خارج نشد. نتایج Khan et al. (2009) به وضوح نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش گندم، با نسبت پتاسیم به سدیم بیش‌تر، محتویات عملکرد دانه بالاتر داشتند. و عکس‌العمل بهتری در شرایط شوری نشان دادند. در یک وارته حساس برنج عملکرد فتوسنتز ۲ تحت شرایط تنش شوری به صفر رسید، غلظت پتاسیم در ساقه و برگ‌های مسن‌تر نیز کاهش یافته و نسبت پتاسیم به سدیم به حداقل میزان رسید، که این درست عکس فرآیندی بود که در وارته‌ی متحمل اتفاق افتاد. بنابراین حفظ نسبت مناسب پتاسیم به سدیم می‌تواند منجر به سطوح بالاتری از تحمل به تنش بشود (Morales et al. 2012). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط کنترل در کلیه نمونه‌ها بیش‌تر از شرایط تنش بوده و در مجموع این نسبت در مقایسه با گیاهان حساس به شوری بسیار بالاتر بوده که نشان دهنده‌ی یکی از دلایل متحمل بودن این گونه نسبت به شوری است. این با نتایج دیگر محققان نیز هماهنگی داشت.

پس از تجزیه ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره به در گونه تعداد ۲۹۹ لکه پروتئینی به‌طور تکرار پذیر در ژل‌ها شناسایی شد. تعداد ۲۰ لکه پروتئینی در مقایسه تیمار شوری با شاهد تغییر ۱/۵ برابری در بیان نشان دادند تعداد ۱۹ لکه پروتئینی افزایش بیان نشان داده و ۱ لکه هم در شرایط تنش ناپدید شد. موقعیت این

جدول ۱- پروتئین‌های شناسایی شده در برگ چهارم هوردنوم مارینوم تحت تنش شوری بلند مدت

نام پروتئین و تقسیم‌بندی بر اساس نقش‌ها	Spot ID	gi number
<i>Photosynthesis-related proteins</i>		
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	1, 2, 3, 5, 8, 9, 11, 18	gi 4038699, gi 156143189, gi 46325906, gi 57052785, gi 168312, gi 132107
Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	15, 17	gi 3687676, gi 10720253
<i>Protein translation and processing</i>		
ribosomal protein P1 [Triticum aestivum]	4, 13	gi 57471718
cullin-4 [Vitis vinifera]	7	gi 147775823
cp31AHv protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	12	gi 3550467
RNA recognition motif (RRM) superfamily	19	gi 125591465
<i>Energy metabolism</i>		
cytosolic malate dehydrogenase [Triticum aestivum]	14	gi 37928995
Fructokinase	16	gi 158564085
<i>defense and ROS scavenging</i>		
cystatin Hv-CPI2 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	6	gi 109238749
Chain A, Crystal Structure Of Barley Thioredoxin H Isoform2	20	gi 186972808
<i>Evolution</i>		
Ty3/Gypsy family of RNase HI in long-term repeat retroelements	10	gi 147768278

فراوانی رویسکو در گیاهان مختلفی که در معرض تنش فلزی و شرایط تنش خشکی قرار گرفتند، گزارش شد (Salekdeh et al. 2002). افزایش بیان رویسکو در رقم متحمل پنبه تحت تنش شوری مشاهده شد، در حالی که قطعه‌های رویسکو در انواع حساس به شوری کاهش بیان پیدا کردند (Cui et al. 2015). رویسکو در رقم حساس به شوری لوبیا چشم بلبلی تحت تنش شوری مهار شد و این منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاه زراعی شد (De Abreu et al. 2014). پروتئین متصل شونده به زیرواحد بزرگ رویسکو در گندم متحمل به خشکی افزایش بیان پیدا کرد، اما هیچ تفاوت مشخصی در بیان این آنزیم در رقم حساس به خشکی مشاهده نشد (Cheng et al. 2015). در ارقام گیاه جو قطعات رویسکو تحت تنش شوری افزایش بیان نشان دادند، این ممکن است در اثر تجزیه‌ی پروتئین تولید شده توسط ROS و یا در طول انحلال پروتئین رخ داده باشد (Fatehi et al. 2012). در تحقیق پیش رو افزایش قابل توجهی در فراوانی قطعات رویسکو در *H. marinum* مشاهده شد. این افزایش بیان قطعات رویسکو در تحقیقات روی ارقام دیگر وحشی و اهلی جو کشت شده نیز مشاهده شد (Fatehi et al. 2012)، برآیند نتایج نشان می‌دهد که بسیاری از ژنوتیپ‌های جو می‌توانند با تغییر بیان زیرواحدهای

رویسکو یک آنزیم حیاتی در جذب کربن فتوسنتزی است و افزایش جذب کربن فتوسنتزی در گیاهان C3 می‌تواند باعث بهبود عملکرد محصول شود (Raines CA 2011). آنزیم رویسکو یکی از پروتئین‌های چند زیر واحدی (۸ زیرواحد کوچک و ۸ زیر واحد بزرگ) کلیدی مسیر تثبیت کربن می‌باشد که اولین واکنش چرخه کالوین را کاتالیز می‌کند. زیر واحدهای کوچک این آنزیم توسط ژنوم کلروپلاست کد می‌شوند. رویسکو یک منبع اصلی پروتئین در برگ‌ها و در نتیجه یک منبع آمینواسید برای اجزای زایشی می‌باشد. تجزیه رویسکو حداقل در دو پروسه نقش ایفا می‌کند. اول در طی پیر شدن برگ انتقال مواد غذایی از برگ‌ها به قسمت‌های زایشی، که قسمت زیادی از این متابولیت‌ها از تجزیه پروتئین برگ می‌باشد. دوم، تنش‌های محیطی می‌توانند موجب غیرفعال شدن قابل برگشت یا غیر قابل برگشت رویسکو شوند. رویسکو غیرفعال شده غیر قابل برگشت به‌وسیله نسخه‌های جدید سنتز شده جایگزین می‌شود. یک واکنش آشکار در گیاهان در طی این فرایندهای فیزیولوژیکی گسترش فرایندهای اکسیداسیون ناشی از انواع اکسیژن فعال می‌باشد. گیاهانی که میزان بیش‌تری رویسکو دارند، عملکرد بالاتر و تحمل بیش‌تری تحت استرس‌های محیطی نشان می‌دهند. افزایش

فتوستتوز و عملکرد محصول را افزایش داده و آسیب تنش شوری را کمتر کنند.

در بین پروتئین‌ها لکه‌های شماره ۴ و ۱۳ با عنوان پروتئین‌های ریبوزومی شناسایی شدند و تحت شرایط تنش شوری به ترتیب افزایش ۳/۲ و ۱/۶ برابری نشان دادند. پروتئین‌های ریبوزومی بخش عمده‌ای از پروتئین‌های سلولی یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها (بیش از ۱۵ درصد) را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌ها در مرحله طویل شدن سنتز پروتئین نقش دارند و در بافت‌های مختلف و تیمارهای مختلف بیان می‌شوند (Hulm et al. 2005). پروتئین ریبوزومی P1 بخشی از زیر واحد بزرگ ریبوزومی 60S در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد و فسفوریله شدن این پروتئین‌ها مکانیسم مهمی در تنظیم سنتز پروتئین می‌باشد. چندین نوع پروتئین ریبوزومی از جمله پروتئین ریبوزومی P1 در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری جو در مطالعات (Fatehi et al. 2012) مشاهده شد. افزایش بیان پروتئین ریبوزومی P1 در رقم "پالاس" (*Hordeum vulgare* (Pallas) تحت تنش شدید شوری (Alikhani et al. 2013) گزارش شده‌است. در این مطالعه نیز افزایش بیان پروتئین ریبوزومی P1 مشاهده شد. پروتئین ریبوزومی S1 از نظر ساختاری مشابه دومین‌های شوک گرمایی می‌باشد. در آغاز رونویسی بسیاری از mRNAها شرکت دارد و همچنین ممکن است در طویل شدن رونویسی نقش ایفا کند. در طی مرحله آغاز رونویسی پروتئین ریبوزومی S1 به mRNA بالادست توالی شاین دالگارانو متصل می‌شود و اهمیت خاصی برای شروع پیغام‌ها با توالی‌های بسیار ضعیف یا قوی شاین دالگارانو دارد. سنتز پروتئین در سلول‌های گیاهی نقش فیزیولوژیکی مهمی در پاسخ گیاه به شرایط نامساعد محیطی دارد. بیان پروتئین‌های ریبوزومی در شرایط تحریک با هورمون گیاهی اکسین و تنش سرمایی دیده شده‌است. افزایش پروتئین ریبوزومی S1 در انواع برنج جهش یافته با عملکرد بالا مشاهده شد (Ma et al. 2007). در این مطالعه ما بر روی *H. marinum* نیز افزایش بیان پروتئین ریبوزومی S1 مشاهده شد. هر دو نوع پروتئین ریبوزومی یافت شده (S1 و P1) در گونه‌ی مارینوم تحت تنش شوری افزایش یافتند. افزایش در میزان بیان پروتئین‌های ریبوزومی را می‌توان افزایش در تعداد و میزان ریبوزوم‌های

روبیسکو میزان فتوستتوز محصول و عملکرد را افزایش داده و آسیب تنش شوری را کم‌رنگ کنند.

لکه‌های شماره ۱۵ و ۱۷ مربوط به روبیسکو اکتیواز بودند و به ترتیب افزایش ۱/۹ و ۲/۴ برابری تحت تنش شوری نشان دادند. روبیسکو باید به وسیله آنزیم روبیسکو اکتیواز وابسته به ATP فعال شود. نقش آنزیم اکتیواز روبیسکو حذف ریبولوز او ۵ بی فسفات‌هایی (از طریق هیدرولیز ATP در نور) می‌باشد که به طور غیرفعال به محل فعال‌سازی روبیسکو در تاریکی متصل شده و در نتیجه این محل‌ها را برای فعال‌سازی به وسیله  $\text{CO}_2$  و  $\text{Mg}_2\text{C}$  آزاد می‌سازد. با مطالعه الگوی بیان ژن‌ها در جو تحت تنش شوری افزایش بیان روبیسکو اکتیواز را مشاهده کردند. این پروتئین هم‌چنین به عنوان یک نگهبان در طول استرس عمل می‌کند. مهار روبیسکو اکتیواز در سویا (به عنوان یک گیاه حساس به شوری) تحت تنش شوری کوتاه مدت گزارش شد (Sobhanian et al. 2010). روبیسکو اکتیواز به شدت در ژنوتیپ حساس به شوری *Populus alba* کاهش یافت (Beritognolo et al. 2011). نشان داده شد که بیان روبیسکو اکتیواز در رقم متحمل به شوری لوبیا چشم بلبلی (De Abreu et al. 2014) تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. افزایش بیان روبیسکو اکتیواز در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در سطوح تنشی مختلف گزارش شد (Budak et al. 2013). افزایش روبیسکو اکتیواز ممکن است ناشی از نقش مراقبتی این پروتئین در حین تنش باشد که خود نیاز به مطالعه بیش‌تری دارد. در این تحقیق پیش رو افزایش قابل توجهی در فراوانی قطعات روبیسکو اکتیواز در *H. marinum* مشاهده شد. این افزایش بیان در تحقیقات روی ارقام دیگر وحشی و اهلی جو نیز مشاهده شد (Fatehi et al. 2012). افزایش بیان این آنزیم در رقم حساس و متحمل را می‌توان ناشی از این دانست که در گیاهان تحت تنش شوری روزه‌ها بسته شده و میزان  $\text{CO}_2$  داخل سلول و متعاقباً میزان فتوستتوز کاهش می‌یابد، در این شرایط روبیسکو اکتیواز میزان روبیسکو فعال شده برای تثبیت  $\text{CO}_2$  و نهایتاً راندمان فتوستتوز را در شرایط تنش شوری افزایش می‌دهد. در نتیجه مقدار بیش‌تری از روبیسکو اکتیواز می‌تواند منجر به جذب کربن بیش‌تر و عملکرد بالاتر محصول شود و بسیاری از ژنوتیپ‌های جو می‌توانند با افزایش بیان روبیسکو اکتیواز،

می‌باشد که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد. کاهش بیان پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی در یک رقم حساس به شوری در جو دیده شد (Fatehi et al. 2012) که ممکن است یکی از دلایل حساسیت گیاه به تنش همین کاهش بیان پروتئین ذکر شده باشد. پروتئین‌های Cullin نقش مهمی در تغییرات پس از ترجمه‌ی پروتئین‌های سلولی شامل ubiquitin دارند. کمپلکس‌های حلقوی کولین (CRL) Cullin-RING نماینده‌ی یک گروه غالب لیگاز E3 یوبیکوئین در سیستم (UPS) ubiquitin-proteasome system هستند. UPS نوعی مکانیسم است که به‌طور گسترده‌ای در تمام فرایندهای رشد و نمو و پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان، از جمله سازگاری با تنش‌های غیر زنده محیطی (Guo et al. 2013) مورد استفاده قرار می‌گیرد. گزارش شده‌است که برای بیان نرمال ژن در نیشکر تحت تنش شوری و خشکی، حضور ترکیبی از کمپلکس clathrin adaptor (CAC) و cullin (CUL) ضروری می‌باشد (Guo et al. 2014). در این تحقیق نیز افزایش بیان کولین در *H. marinum* تحت شرایط تنش مشاهده شد که در توافق با نتایج گزارش شده توسط Guo et al. (2013) می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان با تولید بیش‌تر کولین می‌توانند به شرایط تنشی پاسخ داده و خود را با استرس‌های مختلف زیست محیطی تطبیق دهند. لکه شماره ۱۴ به‌عنوان ملات دهیدروژناز سیتوزولی شناسایی شد و تحت شرایط تنش ۱/۸ برابر افزایش داشت. ملات دهیدروژناز سیتوزولی (cyMDH) یک آنزیم حیاتی برای سنتز اسید مالیک در سیتوزول است (Yao et al. 2011). این آنزیم نقش مهمی در چرخه اسید سیتریک (کربس) بازی می‌کند که منجر به تولید مولکول حامل انرژی ATP می‌شود. ATP حمل و نقل انرژی شیمیایی درون سلول‌ها برای سوخت و ساز را انجام می‌دهد و به وسیله‌ی آنزیم‌ها و پروتئین ساختاری مورد استفاده قرار می‌گیرد تا بسیاری از فرایندهای سلولی، از جمله واکنش‌های بیوسنتزی، تحرک و تقسیم سلولی را انجام دهد. علاوه بر این، cyMDH نقش مهمی برای حفاظت از غشاء با بهبود بخشیدن به فعالیت پمپ پروتون دارد. به این ترتیب می‌تواند تحمل به استرس‌های همراه با تنش اسمزی از قبیل شوری، سرما و خشکی را افزایش دهد (Yao et al. 2011). افزایش فعالیت ملات دهیدروژناز را در

سلولی دانست که این افزایش بیان در کلیه نمونه‌های مورد مطالعه جو (حساس و متحمل) مشاهده شده (Fatehi et al. 2012) و بیانگر یک فرآیند عمومی برای مقابله با شوری می‌باشد. یکی از اثرات اصلی تنش شوری ایجاد مسمومیت یونی است. افزایش غلظت یون‌های سدیم و کلر در سلول باعث می‌شود تا پروتئین‌های داخل سلول نیز دچار تغییر در ساختار و شکل فضایی شوند و یا در حین تا شدن (folding) عمل تا خوردن پروتئین صحیح صورت نگیرد. در این حالت پروتئین تولید شده کارایی خود را از دست خواهد داد و سلول با افزایش تعداد پروتئین‌های تولیدی خود نیاز خود را به پروتئین‌ها و آنزیم‌های فعال رفع می‌کند. پروتئین‌های صدمه دیده نیز توسط مکانیسم‌های دخیل در تجزیه پروتئین در سلول تجزیه شده و دوباره به چرخه تولید پروتئین برگردانده می‌شوند. لکه‌ی شماره ۱۲ مربوط به Cullin (نوعی پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی) بوده و تحت تنش افزایش ۱/۵ برابری نشان داد. پروتئین‌های متصل شونده به RNA، خانواده‌ای از پروتئین‌های دارای موتیف شناسایی RNA می‌باشند که در سنتز mRNA، پردازش hnRNA و کنترل پس از ترجمه ژن‌های کلروپلاستی نقش دارند و بیان آن با مراحل نموی برگ همبستگی دارد. cp31AHv نوعی پروتئین متصل شونده به RNA (RBPs) است. به‌نظر می‌رسد بیان cp31AHv تحت کنترل مثبت نور است. دو نوع پروتئین متصل شونده به RNA (Cp31AHv و Cp31BHv)، تحت کمبود طولانی مدت نیتروژن در رقم متحمل به شوری *H. vulgare* افزایش بیان نشان دادند (Møller et al. 2011). افزایش پنج پروتئین متصل شونده به RNA در کلروپلاست در تنباکو یافت شده که در مراحل پس از رونویسی بیان ژن‌های کلروپلاستی نقش دارند. هم‌چنین یک پروتئین متصل شونده به RNA در کلروپلاست در اسفناج شناسایی شده که در پردازش و یا ثبات انتهای mRNA نقش دارد (Barta and Lorkovic 2002). پروتئین متصل شونده به RNA ی کلروپلاستی cp29 در آرآبیدوپسیس در اثر تنش سرما و نیز تنش طولانی مدت شوری (Fei et al. 2008) افزایش یافته است. افزایش بیان این پروتئین در دو رقم افضل و لاین ۵۲۷ جو (Fatehi et al. 2012) و هم‌چنین گونه *H. marinum* در تحقیق پیش رو، بیانگر حفظ کارایی ترجمه پروتئین‌های کلروپلاستی



قتد، افزایش در فعالیت فروکتوکیناز در پاسخ به زخم مشاهده شد (Klotz et al. 2006). (Sobhanian et al. 2010) گزارش کردند که فروکتوکیناز 2 در هیپوکوتیل و ریشه‌های سویا (حساس به شوری) تحت تنش شوری کاهش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان فروکتوکیناز در سلول‌ها تواند تحمل به تنش غیر زنده را با تاثیر روی سیستم حمل و نقل و تولید انرژی بهبود ببخشد.

لکه شماره ۶ به‌عنوان سیستمین شناسایی شد و افزایش ۲/۷ برابری در شرایط تنش نشان داد. سیستمین نقش اساسی در ایمنی گیاه ایفا می‌کند. سیستمین یک مهارکننده سیستمین پروتئاز است که در دفاع درگیر است، و بیان آن توسط تنش زنده و غیر زنده تحریک می‌شود (Romero et al. 2014). بازدارنده‌های پروتئیناز گروه بزرگی از پروتئین‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند و دارای نقش‌های متفاوتی در تنظیم فعالیت پروتئولیتیکی پروتئازهای هدف می‌باشند. مشخص شده که بازدارنده‌های پروتئیناز گیاهی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و نموی نقش دارند. سیستمین (بازدارنده سیستمین پروتئاز) یکی از انواع بازدارنده‌های پروتئیناز است. داده‌های تجربی نشان می‌دهد که سیستمین‌ها می‌توانند در تنظیم گردش پروتئین‌های درونی، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی کلروپلاست و هم‌چنین پروتئین‌های دفاعی در برابر آفات ایفای نقش کنند. سطوح سیستمین در سیتوزول تاثیر بسزایی در پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش غیر زنده می‌گذارد، و آشکار است که افزایش سیستمین (تا حدود کمتر از آستانه سمی) منجر به افزایش توان تحمل به استرس می‌شود (Romero et al. 2014). سیستمین در شاه بلوط و جو در پاسخ به تنش خشکی، شوری، اسید ایزویک و سرما افزایش یافته اند (Huang et al. 2007). به استثنای HvCPI-7، تمام سیستمین‌های ارقام جو مورد مطالعه قادر به مهار رشد قارچ‌های *B. cinerea* و *F. oxysporum* بودند (Abraham et al. 2006). بیان سیستمین در طول زخمی شدن و تیمار متیل جاسمونات در سویا، هم‌چنین تنش خشکی در *Arabidopsis thaliana* گزارش شد (Gosti et al. 1995). هم‌چنین در این تحقیق افزایش مقدار یک پروتئین بازدارنده سیستمین HV-CPI2 در *H. marinum* مشاهده شد، در نتیجه

برخی از هالوفیت‌ها گزارش شده‌است (Von willert 1974). هم‌چنین نتایج مشابهی در جو و ذرت گزارش شده‌است. افزایش بیان ملات دهیدروژناز در آراییدوپسیس تحت تنش شوری و نیز افزایش بیان این آنزیم در برگ‌های *Thellungiella halophila* تحت تنش شوری طولانی مدت (Fei et al. 2008) مشاهده شد. (Yao et al. 2011) نشان دادند که بیان بیش از حد cyMDH می‌تواند رشد و تحمل به شوری بالا و سرما را در کالوس سیب و گوجه‌فرنگی بهبود ببخشد. افزایش MDH در *H. spontaneum* (یک رقم متحمل به شوری جو) تحت تنش شوری دیده شد (Fatehi et al. 2012). هم‌چنین گزارش شده که MDH به‌عنوان یک پروتئین آنتی اکسیدان به‌منظور تحمل شوری ایفای نقش می‌کند (Fatehi et al. 2012). نشان داده شد که TaMDH نیز در بافت‌های مختلف تولید مثلی و بافت‌های تحت بسیاری از استرس‌های مختلف بیان می‌شود. افزایش مقدار cyMDH در این پژوهش نیز مشاهده شد که در توافق با نتایج گزارش شده توسط دیگر نویسندگان در مورد تحمل به تنش غیر زنده بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، cyMDH تحمل سلول و بوته را به تنش شوری شدید از طریق افزایش تجمع یونی و تولید بیشتر ATP، افزایش می‌دهد.

لکه شماره ۱۶ مربوط به فروکتوکیناز می‌باشد که در شرایط تنش شوری میزان آن ۱/۹ برابر افزایش داشت. فروکتوکیناز یک آنزیم حیاتی برای فرایندهای فیزیولوژیکی و رشد و نمو در سطح کل بوته، با هماهنگی کربوهیدرات می‌باشد. فروکتوکینازها فرایندهای توسعه‌ای بلند مدت مهم برای حمل و نقل شکر، آب و مواد معدنی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، و هم‌چنین نقش خاصی در توسعه بافت‌های عروقی گیاه دارند (Granot et al. 2013). فروکتوکینازها احتمالا در واکنش گیاهان به تنش‌های غیر زنده نقش دارند. در این پژوهش افزایش مقدار فروکتوکیناز تحت تنش شوری در گونه *H. marinum* نشان داده شده‌است. در ذرت، فروکتوکیناز 2 در پاسخ به تنش شوری کوتاه مدت، تنظیم مثبت دارد (Zorb et al. 2011). در آفتابگردان (*Helianthus annuus*)، افزایش میزان یک فروکتوکیناز پلاستییدی همراه با سایر پروتئین‌های مربوط به سوخت و ساز کربن، در پاسخ به تنش خشکی دیده شده‌است (Fulda et al. 2011). در ریشه چغندر

خاص و منحصر به فرد هر یک از ایزوفرم‌های تیوردوکسین در پاسخ به استرس‌ها می‌باشد. و در مجموع با توجه به افزایش بیان تیوردوکسین در نمونه‌های حساس و مقاوم می‌توان گفت که این گیاهان با افزایش بیان این پروتئین به عنوان عاملی برای تحمل به شوری استفاده می‌کنند.

لکه پروتئینی شماره ۱۰ به‌عنوان رتروترانسپوزون شناسایی شد و تحت شرایط تنش شوری ناپدید شد. رتروالمنت‌ها (رتروترانسپوزون و رتروویروس) به چهار سیستم یا گروه تقسیم می‌شوند، که عبارتند از تکرار ترمینال طولانی long terminal repeat retroelements (LTR) non-LTR retroelements و tyrosine recombinase (YR) retroelements رتروترانسپوزون‌های Penelope. رتروالمنت‌های Ty3/Gypsy LTR یک خانواده از رتروویروس و رتروترانسپوزون‌های LTR هستند که به‌طور گسترده‌ای در گیاهان توزیع شده‌اند و در درک تاریخ تکامل سیستم LTR retroelement بسیار حائز اهمیت هستند. چرا که وابستگی به اصل و نسب، روابط در شباهت توالی و ساختار ژنومی با خانواده‌های باقی‌مانده از LTR retroelements نشان می‌دهند (Llorens et al. 2008). این عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که از طریق رونویسی معکوس RNA واسطه حرکت می‌کنند. اگر چه رتروترانسپوزون از اجزای مهم ژنوم گیاهی هستند و در بسیاری از گونه‌های گیاهی شناخته شده‌اند، بیشتر آن‌ها در طول رشد و نمو طبیعی خاموش و ساکن باقی می‌مانند. غیر فعال بودن رتروترانسپوزون گیاه نشان می‌دهد خاموش کردن ژن ممکن است مکانیسم کلیدی کنترل فعالیت این عناصر باشد (Casacuberta and Santiago 2003). با این حال بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که چند رتروترانسپوزون پاسخگو به تنش وجود دارد، و رونویسی و جابجایی در این پژوهش لکه پروتئینی رتروترانسپوزونی تحت تنش شوری در *H. marinum* ناپدید شد. جابجایی رتروترانسپوزون‌های فعال می‌تواند با ایجاد جهش و باعث بازآرایی‌های کروموزومی شود (Kobayashi et al. 2004). بنابراین، آن‌ها ممکن است در پاسخ به تنش نقش مهمی داشته باشند.

نتایج حاکی از آن است که برخی پروتئین‌های مربوط به پردازش پروتئین، فتوسنتز، متابولیسم انرژی، مهار گونه‌های اکسیژن فعال

افزایش میزان این پروتئین‌ها می‌تواند تحمل گیاهان به استرس شوری شدید را با تقویت سیستم ایمنی آن‌ها بهبود ببخشد. در میان نمونه‌ها لکه شماره ۲۰ مربوط به تیوردوکسین بود و تحت تنش شوری افزایش ۱/۶ برابری در میزان آن مشاهده شد. تیوردوکسین‌ها پروتئین‌های کوچکی هستند که در تنظیم کاهش-اکسایش سلولی نقش دارند. این پروتئین‌ها به طور کلی در ذخیره سازی، شروع سوخت و ساز و مهار گونه‌های اکسیژن فعال ایفای نقش می‌کنند (Renard et al. 2011). تیوردوکسین کاهش‌یافته می‌تواند به‌عنوان دهنده هیدروژن و یا یک فاکتور تنظیمی برای پروتئین‌های مختلفی مانند آنزیم‌های متابولیکی، پروتئین‌های ردوکس، فاکتورهای رونویسی و MAP کینازها نقش ایفا کند. OsTRXh1 نوعی تیوردوکسین H در برنج است که بیان آن توسط تنش شوری و آبسزیک اسید تحریک شده‌است، ژن‌های کد کننده تیوردوکسین h در آرابیدوپسیس نیز در واکنش به پاتوژن و تنش اسمزی بیان شده‌اند (Zhang et al. 2011). (2011) Chattopadhyay et al. نیز گزارش دادند که آنزیم‌های مهار کننده‌ی گونه‌های اکسیژن فعال، مانند آسکوربات پراکسیداز، ردوکتاز dehydroascorbate، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسی ریدوکسین و تیوردوکسین H توسط تنش شوری در خلر القا شدند. در مطالعات دیگر نشان داده شد پراکسی ریدوکسین (PRX) و تیوردوکسین نقش مهمی در طول تنش‌های خشکی و اکسیداتیو بازی می‌کنند (Miller et al. 2010). تجزیه و تحلیل کمی RT-PCR در سویا نشان داد که بیان برخی از پروتئین‌ها مانند a14-3-3، MMK2، PP1، تیوردوکسین H، توسط تنش شوری تنظیم می‌شوند (Ji et al. 2016) نشان داد. در تحقیق بر روی ارقام جو، ۳ ایزوفرم ساختار کریستالی تیوردوکسین h در ژنوتیپ‌های لاین ۵۲۷ و هوردوم بولبوزوم به ترتیب افزایش ۲/۴، ۲/۷ و ۲/۷ برابری و تیوردوکسین نوع M در رقم افضل افزایش ۲/۱ برابری را تحت تنش شوری نشان دادند (Fatehi et al. 2012). هم‌چنین در این تحقیق افزایش ایزوفرم تیوردوکسین تحت تنش شوری مشاهده شده‌است. این نتایج نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌ها احتمالاً به تنش‌های زنده و غیر زنده مختلف به‌وسیله‌ی الگوهای بیان متمایز و پاسخ‌های متفاوت به تنش محیطی عکس‌العمل نشان می‌دهند. این نتیجه حاکی از عملکرد

پروتئین‌های کلروپلاستی تحمل به شوری را در گیاه جو *H. marinum* افزایش داد. همچنین فروکتوکیناز با نقش خاصی که در توسعه بافت‌های عروقی گیاه و متابولیسم انرژی ایفا می‌کند نسبت به تنش شوری واکنش نشان داد.

به این ترتیب پروتئین‌های مسئول تحمل در گیاه جو وحشی *H. marinum* شناسایی شدند. همچنین نقش آن‌ها در مکانیزم مقاومت تعیین شد که می‌تواند برای اصلاح تحمل به شوری به کار گرفته شوند. در ادامه تحقیق، با مطالعات ترانسکریپتومیکس و ژنومیکس مسیر برعکس پروتئین به ژن را پیمود و با یافتن و انتقال ژن‌های مسئول در برابر تنش شوری، تولید لاین‌های ایزوژن و برنامه اصلاحی مناسب به یک رقم جو بسیار متحمل به شوری رسید.

#### منابع

Abraham Z, Martinez M, Carbonero P, Diaz I (2006) Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare*. *Journal of Experimental Botany* 57:4245-4255.

Alikhani M, Khatabi B, Sepehri M, Khayam Nekouei M, Mardi M, Hosseini Salekdeh G (2013) A proteomics approach to study the molecular basis of enhanced salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) conferred by the root mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *Molecular BioSystems* 1:498-510.

Aghaei K, Ehsanpour AA, Shah AH, Komatsu S (2009) Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids* 36:91-98.

Amini F, Ehsanpour AA, Hoang QT (2007) Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:464.

Askari Hossein, Edqvist J, Hajheidari M, Kafi M, Hosseini Salekdeh G (2006) Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics* 6:2542-2554.

Beritognolo I, Harfouche A, Brilli F, Prosperini G, Gaudet M, Brosché M, Salani F, Kuzminsky E, Auvinen P, Paulin L, Kangasjärvi J, Loreto F, Valentini R, Mugnozza GS, Sabatti M (2011) Comparative study of transcriptional and physiological responses to salinity stress in two contrasting *Populus alba* L. genotypes. *Tree Physiology* 13:35-55.

Bloom H, Beier H, Gross HS (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

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.

نقش بسیار مهمی در پاسخ *H. marinum* به تنش شوری ایفا کرده‌اند. در واقع فرایندهای مختلفی از تنش شوری متاثر می‌شوند و این تغییر میزان پروتئین‌ها بیانگر تلاش گیاه برای حفظ حالت تعادل فرآیندهای زیستی است که از تنش متاثر می‌شوند. به صورت دقیق‌تر در این تحقیق، پروتئین‌های روبیسکو، روبیسکو Activase با تاثیر مثبتی که بر راندمان فتوسنتز اعمال می‌کند با افزایش بیان به تنش شوری پاسخ می‌دهند. پروتئین‌های ریبوزومی، MDH، سیستاتین و TRX تحت شرایط تنش میزان آن‌ها افزایش یافتند، که به ترتیب در سنتز پروتئین، تولید ATP، تقویت سیستم ایمنی و مهار گونه‌های اکسیژن فعال نقش مفیدی داشتند. علاوه بر این، cullin با تاثیر بر پردازش پروتئین‌های سلولی شامل ubiquitin در پاسخ به استرس نقش داشت. افزایش میزان Cp31AHv به صورت محسوسی با حفظ کارایی ترجمه

Budak H, Akpınar BA, Ünver T, Turktas M (2013) Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS. *Plant Molecular Biology* 83:89-103.

Casacuberta J M, Santiago N (2003) Plant LTR-retrotransposons and MITES: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* 311:1-11.

Chattopadhyay A, Subba P, Pandey A, Bhushan D, Kumar R, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2011) Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. *Phytochemistry* 72:1293-1307.

Cheng T, Chen J, Zhang J, Shi S, Zhou Y, Lu L, Wang P, Jiang Z, Yang J, Zhang S, Shi J (2015) Physiological and proteomic analyses of leaves from the halophyte Tangut *Nitraria* reveals diverse response pathways critical for high salinity tolerance. *Frontiers in Plant Science* 10:6-30.

Colmer TD, Munns R, Flowers TJ (2005) Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45:1425-1443.

Cui YP, Lu XK, Wang DL, Wang JJ, Yin ZJ, Fan WL, Wang S, Ye WW (2015) Comparative Analysis of Salinity-Induced Proteomic Changes in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural Science* 6:78-86.

Dadashi Dooki A, Mayer-Posner FJ, Askari A, Zaiee AA and G Hosseini Salekdeh (2006) Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics* 6:6498-6507.

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 proteins. *Electrophoresis* 7:52-54.
- De Abreu CE1, Araújo Gdos S, Monteiro-Moreira AC, Costa JH, Leite Hde B, Moreno FB, Prisco JT, Gomes-Filho E (2014) Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. *Plant Cell Reports* 33:1289-306.
- Fatehi F, Hosseinzadeh A, Alizadeh H, Brimavandi T, Struik PC (2012) The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. *Molecular Biology Reports* 39:6387-6397.
- Farnia A (2011) Evaluation of mixed cultures of barley and chickpea as a forage product on weather conditions Boroujerd. Dissertation. Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Iran. (In Farsi)
- Fei G, YiJun Z, LingYun H, DaCheng H, GenFa Z (2008) Proteomic analysis of long-term salinity stress-responsive proteins in *Thellungiella halophila* leaves. *Chinese Science Bulletin* 53:3530-3537.
- Fulda S, Mikkat S, Stegmann H, Horn R (2011) Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biology (Stuttgart)* 13:632-642.
- Gosti F, Bertauche N, Vartanian N, Giraudat J (1995) Abscisic acid-dependent and -independent regulation of gene expression by progressive drought in *A. thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 246:10-18.
- Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R (2013) Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany* 65:809-19.
- Guo L, Nezames CD, Sheng L, Deng X, Wei N (2013) Cullin-RING ubiquitin ligase family in plant abiotic stress pathways. *Journal of Integrative Plant Biology* 55:21-30.
- Guo J, Ling H, Wu Q, Xu L, Que Y (2014) The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Scientific Reports* 4:7042.
- Huang Y, Xiao B, Xiong L (2007) Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta* 226:73-85.
- Hulm JL, Mcintosh KB, Bonham-smith PC (2005) Variation in transcript abundance among the four members of the *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S15a gene family. *Plant Science* 169:267-278.
- Ji W, Cong R, Li S, Li R, Qin Z, Li Y, Zhou X, Chen S, Li J (2016) Comparative Proteomic Analysis of Soybean Leaves and Roots by iTRAQ Provides Insights into Response Mechanisms to Short-Term Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* 7:573-577.
- Jiang Y, Yang B, Harris NS and Deyholos MK (2007) Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* 58:3591-3607.
- Kav N, Sanjeeva Srivastava, Laksiri (2004) Goonewardene and Stanford F Blade. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Annals of Applied Biology* 145:217-230.
- Khan MA, Shirazi MU, Mujtaba SM, Islam e, Mumtaz S, Shereen A, Ansari RU, Yasin Ashraf Y (2009) role of proline, K/Na ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 4: 633-638.
- Klotz KL, Finger FL, Anderson MD (2006) Wounding increases glycolytic but not soluble sucrolytic activities in stored sugarbeet root. *Postharvest Biology and Technology* 41:48-55.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 14:73-82.
- Llorens C, Fares MA, Moya A (2008) Relationships of gag-pol diversity between Ty3/Gypsy and Retroviridae LTR retroelements and the three kings hypothesis. *BMC Evolutionary Biology* 8:248-276.
- Lorkovic ZJ, Barta A (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 30:623-635.
- Ma Y, Cheng Z, Wang W, Sun Y (2007) Proteomic analysis of high yield rice variety mutated from spaceflight. *Advances in Space Research* 40:535-539.
- Malekshah SN, Rezaei HM, Heidari M, Salekdeh GH (2007) Proteomics reveals new salt responsive proteins associated to rice plasma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71:2144-2154.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-yilmaz, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33: 453-467.
- Møller ALB, Pedas P, Andersen B, Svensson B, Schjoerring JK, Finnie C (2011) Responses of barley root and shoot proteomes to long-term nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant Cell and Environment* 34: 2024-2037.
- Morales SG, Trejo-Téllez LI, Gómez Merino FC, Caldana C, Espinosa-Victoria D, Herrera Cabrera BE (2012) Growth, photosynthetic activity, and potassium and sodium concentration in rice plants under salt stress. *Maringá* 34:317-324.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59:651-681.
- Neto AP, Favarin JL, Reis AR, Tezotto T, Almeida REM, Lavres JR, Gallo LZ (2015) Nitrogen metabolism in coffee plants in response to nitrogen supply by fertigation. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 27:41-50.
- Raines CA (2011) Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C3 Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. *Plant Physiology* 155:36-42.
- Renard M, Alkhalifioui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Montrichard F (2011) Identification and characterization of thioredoxin h isoforms differentially expressed in germinating seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 155: 1113-1126.
- Robert AI (1992) Official methods of analysis. In: 15th Edition University of Georgia, 790-792.
- Romero LC, Aroca MA, Laureano-Marín AM, Moreno I, García I, Gotor C (2014) Cysteine and Cysteine-Related

Signaling Pathways in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant 7:264-276.

Rossignol M, Peltier JB, Mock H, Matros A, Maldonado A, Jorrín J (2006) Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. Proteome 6:5529-5548.

Roy S, Chakraborty U (2014) Salt tolerance mechanisms in Salt Tolerant Grasses (STGs) and their prospects in cereal crop improvement. Botanical Studies 55:31.

Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteome 2:1131-45.

Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, Ehsanpour A, Rastgar Jazii F, Motamed N, Komatsu S (2010) Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Science 10:8-19.

Von Willert DJ (1974) Der einfluss von NaCl auf die Atmung und Activitatder Malatdehydrogenase bei einigen halophyten und glycopyhten. Oecologia 14:127-37.

Yao YX, Dong QL, Zhai H, You CX, Hao YJ (2011) The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. Plant Physiology and Biochemistry 49:257-264.

Zhang CJ, Zhao BC, Ge WN, Zhang YF, Song Y, Sun DY, Guo Y (2011) An Apoplastic H-Type Thioredoxin Is Involved in the Stress Response through Regulation of the Apoplastic Reactive Oxygen Species in Rice. Plant Physiology 157:1884-1899.

Zorb C, Schmitt S, Muhling KH (2011) Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. Proteome 10:4441-4449.