

## اثرات شوری بر الگوی پروتئین برگ در *Aegilops tauschii*

محمود ملکی<sup>\*</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۲</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>۳</sup>، کاظم پوستینی<sup>۴</sup>، سیروس عبدمیشانی<sup>۵</sup>

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 تأثیر 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 برسی 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 سنتاز، آسکوربات پراکسیداز، لیپوکالین و رابیسکو اکتیواز اشاره کرد که در فرآیندهایی مثل تنظیم متabolیسم کربوهیدرات، اسیدآمینه، نیتروژن و حذف گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند.

### واژه‌های کلیدی

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

### 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 مورفو‌لولوژیکی، 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).

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق گندم (*Aegilops tauschii*, DD) ( $2n=2x=14$ ) به عنوان مادهٔ زنگنه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. بذور نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی پرلیت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در گل خانه آزمایشی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شدند. بعد از مرحلهٔ دو برگی گیاهان با استفاده از محلول غذایی هوگلنند آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحلهٔ 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 بالاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا هنگام استخراج پروتئین در دمای -۸۰ 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 ۷۲°C وزن خشک آنها اندازه‌گیری شدند. به‌منظور تعیین غلظت سدیم و پتاسیم، مقدار یک گرم از نمونه‌ها در کورهٔ الکتریکی (دمای ۵۵۰°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 مادهٔ خشک محاسبه گردید:

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

میلی‌گرم بر گرم مادهٔ خشک درجه رقت،  $V$  حجم نهایی عصارهٔ تهیه شده بر حسب میلی‌لیتر و  $DM$  وزن خشک نمونه بر حسب گرم است.

استخراج پروتئین از بافت برگی (برگ پنجم) بر اساس روش دامرال و همکاران (۱۲) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه از روش برادرفورد (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 متأثر از تنش شوری، سهیم هستند (۱۷). لابهیلیکی 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 تسريع تولید گونه‌های اکسیژن فعال [ROS (Reactive Oxygen Species)] 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 پنجه منجر به افزایش فعالیت پراکسیداز و گلوتاتیون رداکتاز (GR) در ارقام متتحمل 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 همیستگی ندارند (۲۰). بنابراین تنها مطالعه خود پروتئین‌ها می‌تواند اطلاعاتی در مورد مقادیر واقعی و فعالیت‌شان را فراهم نماید (۴۸). کشاورزی در خاک‌های سور نیازمند افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری است. خویشاوندان و حشی گندم ممکن است منابع متتحمل به شوری مناسبی برای اصلاح گندم باشند (۱۰). در ک 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 هگزاپلولید است (۲۹)، به‌منظور شناسایی تغییرات پروتئینی بافت برگی توسط تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت.

رنگآمیزی 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 (MW) Molecular Weight (PI) و Isoelectric Point (pI) و تئوریکی 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، اسیدآمینه، 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 آئیون 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. علاوه‌بر این، ROS باعث تخریب پروتئین می‌شود. برای ختی کردن تخریب ROS، تغییر کمی پروتئین‌هایی که نقش مهمی در ROS Scavenging دارند، از قبیل آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کربونیک انھیدراز 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 اسیدآمینه‌ها و آمینه‌ها

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 رنگآمیزی طبق پروتوكل بلوم و همکاران انجام شد (۳). پس از رنگآمیزی، 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. لکه‌ایی 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.

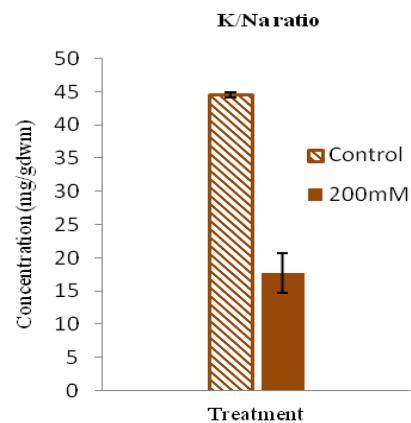
هضم پروتئین‌ها در ژل و تجزیه با طیف سنج جرمی لکه‌ایی که در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نشان دادند، جهت شناسایی با طیف سنج جرمی، از روی ژل‌های رنگآمیزی شده با کوماسی بلو جداسازی شدند. لکه‌های پروتئینی جدا شده پس از سه بار شستشو با آب خالص جهت تجزیه توسط طیف سنج جرمی (MALDI-TOF-TOF) به دانشگاه یورک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

## نتایج و بحث

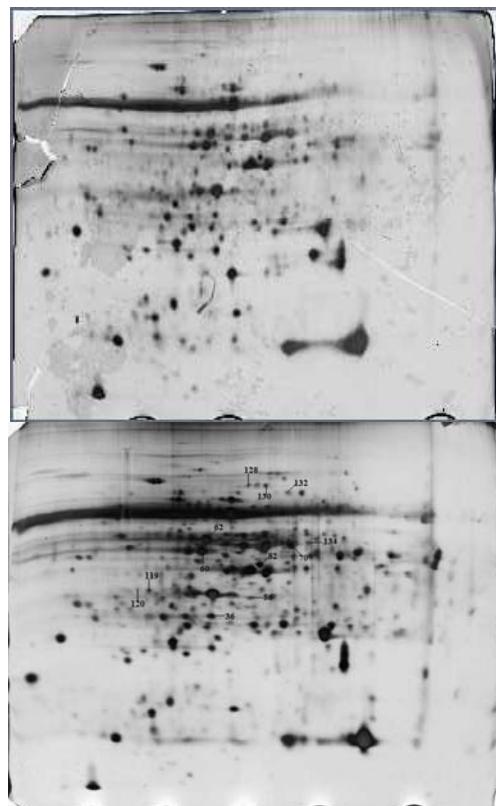
به منظور اعمال تنش شوری گیاهچه‌های ۴ برگی به مدت ۱۷ روز در معرض غلظت ۲۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. برای مقایسه تیمار شوری و کنترل از آزمون t استفاده شد و نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمار شوری و کنترل در سطح یک درصد وجود دارد (از نظر نسبت  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (شکل ۱). به منظور بررسی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

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 موفق 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 بیوژن غشا و تعمیر نقش دارند (۱۵). یک مطالعه در گیاهان، حضور دو پروتئین شبه لیپوکالین را نشان داد که این لیپوکالین‌ها آنزیم‌های کلیدی چرخه گزانوفیل 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 Nuclear-encoded RNA پلاستیدی که در هسته کد می‌شوند (plastid RNA-binding Proteins (RNBP)، به شمار می‌آید. تصور می‌شود که این RNBP‌ها در کنترل پایداری mRNA پلاستیدی 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 پلاستیدی 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، رداکتاژهای 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 اسید‌آمینه‌ها و آمینه‌ها (که به عنوان حفاظت کننده اسمزی و تنظیم کننده اسمزی عمل می‌کنند) را افزایش دهند که این افزایش به واسطهٔ افزایش در سطوح بیان پروتئین‌ها



شکل ۱- مقادیر میانگین و انحراف معیار نسبت پتانسیم به سدیم تحت شرایط کنترل (صفرا) 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 [Hordeum vulgare]	3.004	44	257	5.1.27.964	5.04419.28
2	82	gi 255568816 alcohol dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	2.94	11	95	.41.607 8.61	5.44066.39
3	62	gi 71362640 plastid glutamine synthetase isoform GS2c [Triticum aestivum]	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 [Hordeum vulgare]	0.52	44	571	.47.341 8.62	5.70728.45
7	134	gi 116059952 Thioredoxin-related:Thioredoxin domain 2 (ISS) [Ostreococcus tauri]	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 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	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 [Triticum aestivum]	2.24	30	79	5.5.21.809	5.60152.21

شرایط تنش تسریع تخمیر اتانولی استه تا گلیکولیز به خاطر مصرف پیروات و تولید دوباره NAD<sup>+</sup> ادامه یابد (۳۷). اگر چه نقش بیوشیمیایی ADH تنها تحت شرایط اکسیژن کم آشکار می‌شود، با این حال ژن‌های الكل دهیدروژناز تحت تنش اکسیژن کم، خشکی و دمای پایین در آرابیدوپسیس و ذرت القا شدند (۹) و (۱۴). به علاوه کاربرد خارجی هورمون اسید آبیزیک در آرابیدوپسیس ژن‌های الكل دهیدروژناز را القاء کرد (۱۳). در این آزمایش هم بیان ژن آنزیم الكل دهیدروژناز القا گردید. فتوسیستم II که واکنش بیوشیمیایی اولیه فتوستز را انجام می‌دهد، یکی از سوپرکمپلکس‌های چند زیر واحدی در غشاء تیلاکوپلیدی است. ثابت شده است که پروتئین D1 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).

داده‌اند که ژن‌های تیوردوکسین تحت شرایط تنش زنده و غیر زنده افزایش بیان نشان می‌دهند (۳۵). به عنوان مثال ژن‌های *Trx* و *h8* و *h5* به طور قوی با تنش زنده و غیر زنده القا می‌شوند و بیشتر ژن‌های کدکننده *Trx* پلاستیدی ترجیحاً در برگ‌ها در پاسخ به تغییرات غلظت و کیفیت نور بیان می‌شوند (۳۰). همچنین در یک مطالعه دیگر مقدار رونوشت *Trx h5* آرابیدوپسیس به طور معنی‌داری در واکنش با یک پاتوژن و به طور کلی تحت تنش اکسیداتیو افزایش یافت (۲۶). در سیب زمینی نیز محدودیت‌های شدید غیر زنده و عواملی که به طور 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 الكل دهیدروژناز (ADH) در بسیاری از گیاهان تحت تنش اکسیژن کم، القا می‌شود (۲۴). اهمیت القا ADH در

عملکرد گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. درک ساز و کارهایی که گیاهان به هنگام مواجهه با تنفس به کار می‌برند، کمک شایان توجهی به محققین اصلاح‌گر خواهد کرد. در گندم نان با اعمال تنفس شوری و با استفاده از روش پروتومیکس نشان داده شده است که آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز، پروتئین فریتین،  $H^+$ -تریوز فسفات ایزومراز، متیونین سیستاز، و پروتئین ناقل-ATPase افزایش بیان و پروتئین آکونیتات هیدراتاز کاهش بیان نشان دادند (۱۶). آنزیم‌های فسفوپیروات هیدراتاز، تریوز فسفات ایزومراز و گلوکوز ۶-فسفات دهیدروژناز که در تنظیم متabolیسم کربوهیدراتات دخیلاند و آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گندم‌های دوروم تحت تنفس شوری نیز افزایش یافتند (۷). هم‌چنین زمانی که رقم شانرونگ ۳ که اخیراً اصلاح شده است، تحت تنفس شوری قرار گرفت و پروتئوم کل آن بررسی گردید، مشخص شد که زیر واحد ۷۰ پراکسیداز، ۹ آسکوربات پراکسیداز و پروتئین شوک حرارتی  $OEE_2$  پراکسیداز، ۹ آسکوربات پراکسیداز و پروتئین شوک حرارتی  $OEE_2$ ، ۲۶S، پیش ماده پراکسیداز، 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 فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف و دفاعی دخیلاند و برخی احتمالاً پخشی از یک پاسخ کلی به تنفس هستند، که به گیاه کمک می‌کنند، تا در شرایط زیر اپتیم زنده بماند، سایر پروتئین‌ها در کاهش اثرات فیزیولوژیکی منفی تیمار شوری سهیم هستند. تکنیک پروتومیکس، تکنیک بسیار خوبی جهت ارزیابی زمینه رژنیکی گیاهان زراعی است. پروتئین‌های شناسایی شده در این تحقیق می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش مقاومت به شوری، مورد توجه اصلاح‌گران قرار گیرند.

در شرایط تنفس زا، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و رادیکال‌های کاتیونی داخلی (ECR) از قبیل  $P680^+$  در فتوسیستم II تولید می‌شوند که در مرحله<sup>a</sup> 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 درنتیجه 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 تنفس شوری سطح بیان این آنزیم افزایش پیدا کرد (۲۷). در این تحقیق فراوانی  $OEE_2$  کلروپلاستی Oxygen-Evolving Enhancer Protein<sub>2</sub> (OEE<sub>2</sub>) نیز افزایش یافت، در یک مطالعه که بر روی *Chlamydomonas reinhardtii* انجام گرفت، از موتانتی که فقد  $OEE_2$  بود استفاده گردید و نشان داده شد که در غیاب  $OEE_2$  میزان آزادسازی اکسیژن فتوستتری کاهش یافت، اما هم‌چنان سلول‌های فقد این پروتئین قادر به فتوستتر بودند (۲۸). سطح بیان آنزیم فسفوریبولوکیناز نیز که باعث فسفوریلاسیون ریبولوز ۵-فسفات به ریبولوز ۱ و ۵ فسفات می‌شود (مرحله کلیدی در مسیر پتوز فسفات) در این تحقیق افزایش یافت. در این تحقیق مشخص شد، که زیر واحد بزرگ رایسکو تحت شرایط شوری بیان شان افزایش یافت. هاجداج و همکاران (۲۱) گزارش کردند، که بیان زیر واحد بزرگ رایسکو در برگ‌های برنج تحت تنفس فلزات سنگین افزایش می‌یابد. رایسکو اکتیواز، متعلق به پروتئین-های خانواده AAA<sup>+</sup> 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 رایسکو با حذف قندهای بازدارنده از جایگاه فعل رایسکو کاربامایل شده یا غیر کاربامایل شده است (۳۴). با این حال بیان این آنزیم در پاسخ به تنفس شوری کاهش پیدا کرد. در حال حاضر تنفس شوری یکی از تنفس‌های مهمی است، که

## 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, Jenson 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, Laganà 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) Abscisic 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, Millholland 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, Franzia 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, Grussem 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. Labhilili 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, Laloi 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<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> 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 putativeATPases 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.