

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

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

آزاده بستانی<sup>۱</sup>، فoad فاتحی<sup>۲\*</sup>، رضا عزیزی نژاد<sup>۱</sup>

۱- بهترتب 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

تش شوری از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. گیاهان قادرند در پاسخ به تنش‌های محیطی مکانیسم‌های سازگاری خود را فعال کنند و با تغییر در بیان ژن‌هایشان به عوامل محیطی واکنش نشان دهند. در همین راستا از تکنیک پروتئومیکس به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده 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 بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بررسی شدند. اندازه‌گیری غلظت Na و K با روش هضم خشک و دستگاه فلیم فتومنتر انجام شد. نسبت پتانسیم به سدیم در شرایط کترول در کلیه نمونه‌ها بیش تر از شرایط تحت ۳ سطح تیمار شوری بوده و همچنین این نسبت در سطح شوری ۳۰۰ میلی‌مولا ر نسبت به ۲۰۰ میلی‌مولا NaCl بالاتر بوده است. در مرحله بعد پروتئین‌های برگ پس از استخراج و اندازه‌گیری غلظت، توسط الکتروفورز دوبعدی جداسازی شدند. با استفاده از طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF-TOF ۲۰ لکه پروتئینی شناسایی شدند. پروتئین‌های شناسایی شده شامل رویسکو، رویسکو اکتیواز، پروتئین‌های ریبوزومی، کولین فامیلی، پروتئین‌های متصل شونده به RNA، ملات دهیدروژناز سیتوزولی، فروکتوکیناز، تیوردوکسین، پروتئین‌های مرتبط با سیستین بودند. این پروتئین‌ها در مراحل نموی گوناگون و مسیرهای متابولیکی مختلف مانند متابولیسم انرژی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترجمه، پردازش، تجزیه پروتئین، فتوسترن، انتقال سیگنال نقش دارند.

### واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی

پروتئومیکس

تش شوری

**Hordeum marinum**

## مقدمه

گندم نان استفاده می شود) در نظر گرفته شده است (Colmer et al. 2005).

برخلاف اینکه شکل ثابتی از ژنوم در یک ارگانیسم وجود دارد، پروتئوم می تواند اشکال مختلفی داشته باشد و با تغییر فاکتورهای محیطی پروتئین ها تغییر می کنند. پروتومیکس زمینه بسیار گسترده تری نسبت به ژنومیکس دارد و به طور مستقیم برای بررسی اجزاء درگیر در یک پروسه بیولوژیکی و سطوح کمی آنها می تواند به کار گرفته شود. در واقع پروتئین هایی که نقش آنزیمی، تنظیمی و ساختاری را دارا می باشند و محصول نهایی ژنوم و رونویسی هستند در این روش قابل ارزیابی و شناسایی خواهد بود. با استفاده از الکتروفورز دو بعدی برای جداسازی لکه های پروتئینی و دستگاه طیف سنج جرمی برای شناسایی پروتئین ها، پرتو میکس به یک ابزار قادر تمند در شناسایی پروتئین های بیان شده در شرایط و تنش های مختلف گیاهی تبدیل شد. پروتومیکس برای بررسی اثر تنش های غیر زنده مانند شوری، خشکی، سرما، گرما، ازت، غلاظت محیط، فلزات سنگین و زنده مانند باکتری، قارچ و ویروس استفاده شده است (Rossignol et al. 2006). با این وجود در زمینه تغییرات الگوی بیان پروتئین های 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 Oxygen-evolving (Fatehi et al. 2012) پروتئین هایی شامل enhancer protein، Fسفات نوکلئوزیدی کیناز، سولفوکسید ردوکتاز، پروتئین های متصل شونده به RNA کلروپلاستی، سیکلوفیلین کلروپلاستی، رو بیسکو، اکتیواز رو بیسکو، Nascent TRX، polypeptide associated complex دهیدرو اسکوربات ردوکتاز، شیه جرمین، پروفیلین، دهیدرو رژنائز مالات، پروتئین عمومی تنش و پروتئین های ریبوزومی بودند که در مکانیزم فتوستراتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل هستند.

Kav et al. (2004) تحقیقی را به منظور شناسایی پروتئین های متأثر از تنش شوری در ریشه نخود انجام دادند. بعد از آنالیز

شوری یکی از مهم ترین تنش های غیر زیستی است که تولید محصولات کشاورزی را در خاک های مناطق خشک و نیمه خشک کاهش می دهد. مجموع مناطقی که در جهان تحت تأثیر نمک قرار دارند به طور مداوم در حال افزایش می باشند 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 می باشند و طبق آمار موجود، مجموع خاک های شور و سدیمی آن حدود ۲۷ میلیون هکتار تخمین زده می شود و پیش بینی می شود این رقم به علت 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 می شود. بنابراین تحمل گیاهان نسبت به شوری یک پدیده بسیار پیچیده است که با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط بوده و این منتج به تغییرات نمو و مورفولوژی می شود (Neto et al. 2015).

جو یکی از مهم ترین گیاهان زراعی است که به واسطه رشد آن در نواحی کم حاصل خیز ناشی از خشکی، دمای پایین و شوری دارای اهمیت شده است. سطح زیر کشت جو ایران معادل ۱/۷ میلیون هکتار بوده گونه های زیادی از جو قادر به جوانه زدن در غلاظت بالای نمک (۳۰۰ میلی مولار) هستند (Farnia 2011).

جو با از سه استراتژی برای تحمل نسبت به تنش شوری استفاده می کند: تجمع و یا ستر مولاد محلول سازگار، حفاظت آنتی اکسیدانی با ستر آنزیم های آنتی اکسیدان (مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، و پایداری یونی (Munns and Tester 2008)). بسیاری از گونه های وحشی جو در زیستگاه های با خاک های شور یافت شدند و ممکن است منابع خوبی برای تحمل به شوری باشند (Fatehi et al. 2012). گونه های وحشی *Hordeum marinum* در باتلاق های شور زندگی می کند و متحمل به شوری است و حتی متحمل تر از *Lophopyrum elongatum* (یکی از بستگان وحشی گندم، که به عنوان منبع ژن های جدید برای بهبود تحمل به شوری

Malekshah et al. (2007) 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، فولیدینگ پروتئی‌ها، ساخت پمپ‌ها و کانال‌های غشایی و سیکل متیل دخیل بودند.

Aghaei et al. (2007) 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 پیش‌الیستوری افزایش بیان یافته بودند. درحالی‌که بازدارنده پروتئازی، 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 به طور 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 پروتئین‌ها در دخیل در ایجاد تحمل به تنش شوری طولانی مدت در ژنوم X در جنس هوردولوم 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 PR10 شوند. پروتئین‌های شناسایی شده شامل پروتئین‌های ۱۰ آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز و نوکلوتیدیدی فسفات کینازها می‌شوند. نقش تعدادی از این پروتئین‌ها هنوز نامشخص است. این اولین گزارش در مورد تغییر اگلوی پرtein در ریشه گیاهان بود که نقش احتمالی پروتئین‌های PR10 در پاسخ به تنش شوری را نشان می‌داد.

Askari et al. (2006) *Suadeda aegyptiaca* را در اثر تنش شوری بررسی کردند. تعداد ۲۷ تا پروتئین شناسایی شد که در مقاومت به تنش اکسیداتیو، سترز گلیسین بتائین، فتوستترز، سترز ATP، تجزیه پروتئین، سمزدایی سیانید و فعالیت چاپرون‌ها دخیل بودند.

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

Jiang et al. (2007) تغییرات الگوی پروتئوم ریشه آرابیدوپسیس در شرایط هیدرопونیک 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، بیوسنترز دیواره سلول، تجزیه پروتئین‌ها، متابولیسم انژی، متابولیسم آمینو اسیدها و هورمون‌ها بودند.

Amini et al. (2007) برای بررسی الگوی تغییرات پروتئوم در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری، ازروش پروتئومیکس استفاده کردند. ۱۰ لکه پروتئین توسط طیف‌سنجه جرمی مورد شناسایی قرار گرفت که تعدادی از پروتئین‌ها شناسایی شد. انویل کوانزیم A هیدراتاز، پروتئین شبیه گیرنده‌ی 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 ۴-۷، 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 ۱۶ تا ۱۶ ساعت طول می‌کشید. 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 بیورک استفاده شد و لکه‌ها بر اساس تفاوت در وزن جدا سازی شدند. مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتوكل (Bloom et al. 1987) و به‌وسیله نیترات نقره انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیورک اسکن و به فرم 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 استیویوست 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) به عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

لکه‌های کاندیدا به منظور 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 میلی‌مولاًر بی کربنات آمونیوم ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) در ۵۰ درصد استونیتریل رنگ‌زدایی شدند. پس از این مرحله با استفاده از محلول ۱۰ میلی‌مولاًر DTT در ۵۰ درصد استونیتریل احیاء و با محلول ۴۰ میلی‌مولاًر یدواستامید در ۵۰ درصد استونیتریل آلکیله شدند. 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. پیتیدها سپس با استفاده از محلول ۰/۱ درصد TFA در ۵۰ درصد استونیتریل استخراج شدند. نمونه‌ها برای آنالیز و شناسایی پروتئین‌ها به دانشگاه بیورک انگلیس فرستاده شد و آنالیز طیف سنج جرمی با استفاده از

پرلیت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در محیط گلخانه کشت شدند. آزمایش به صورت 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 هوگلندر آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنفس شوری یعنی مرحله ۴ برگی ادامه یافت. تیمارهای شوری با استفاده از آبیاری با آب شور (NaCl) در سطح صفر (شاهد آب معمولی)، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولاًر به انجام رسیدند. برای اطمینان از اعمال شوری، از ابتدی شروع تا پایان تنفس هدایت الکتریکی (EC) محلول‌های تهیه شده و نیز آب خارج شده از گلدان‌ها اندازه‌گیری شدند. در هر سطح شوری ۹ گلدان و ۱۸ گلدان وجود داشت. تنفس شوری در مرحله ۴ برگی اعمال شد (اعمال تنفس به صورت تدریجی و بالا بردن EC به فاصله هر ۱۲ ساعت ۵۰ میلی‌مولاًر بود، زیرا اعمال تنفس ناگهانی شوری در سطوح بالا به احتمال زیاد منجر به از بین رفتن گیاهان می‌شد) و نمونه‌های تحت تنفس، سه هفته (۲۱ روز) تحت تنفس قرار گرفته و سپس به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران منتقل شدند. نمونه‌های گرفته شده بلافاصله در فویل آلومینیومی پیچیده شده و در ازت 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 پروتومیکس مورد استفاده قرار گرفتند (Fatehi et al. 2012).

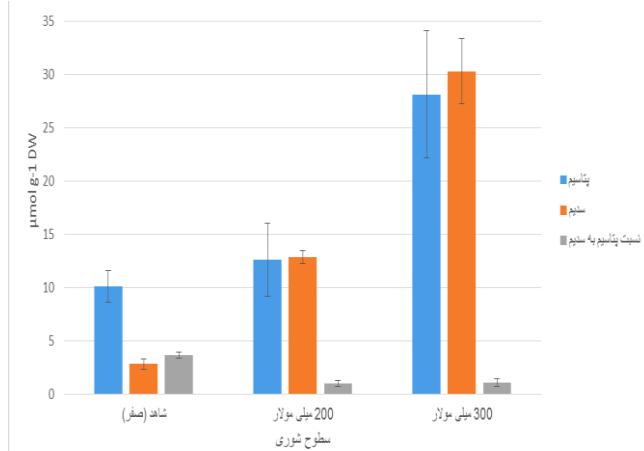
برای اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم مقداری از برگ‌های (برگ چهارم) جدا شده با آب مقطر شستشو شدند، نمونه‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲°C خشک شده و وزن خشک برگ‌ها محاسبه شد. به منظور تعیین غلظت سدیم و پتاسیم از روش هضم خشک و از دستگاه فلایم فتومنتر مدل Carl ziess PF5 (Germany) استفاده شد (Robert 1992).

برای ثبت و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Melanie و Excel ۷ (تجزیه و تحلیل لکه‌ها) استفاده شد. مقایسات میانگین به روش دانکن صورت گرفت.

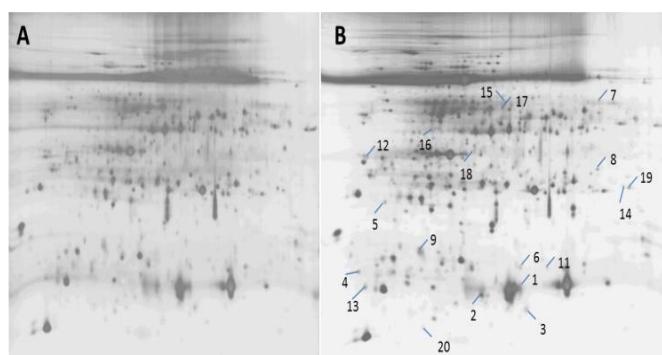
استخراج پروتئین از بافت برگی بر اساس روش Damerval et al. (1986) با اندکی تغییرات انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش Bradford

پروتئین‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. پروتئین‌های شناخته شده شامل ریبولوز-۱-۵ بیس فسفات کربوکسیلاز / اکسیژنаз (روبیسکو) (لکه‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۸)، رو بیسکو اکتیواز (لکه‌های ۱۵ و ۱۷)، پروتئین‌های ریبوزومی (لکه‌های ۴ و ۱۳)، پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی (لکه ۱۲)، سیستاتین (لکه ۶)، ملات دهیدروژناز (لکه ۱۴)، تیوردوکسین (TRx) (لکه ۲۰)، فروکتوکیناز (لکه ۱۶). تمامی لکه‌ها در اثر تنفس افزایش بیان نشان دادند به جز لکه ۱۰ که در شرایط تنفس ناپدید شد.

در بین لکه‌های شناسایی شده لکه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹ و ۱۸ مربوط به رو بیسکو بودند و به ترتیب افزایش ۳/۶، ۱/۹، ۱/۵، 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 هوردئوم مارینوم در سه سطح شوری.



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

MALDI-TOF-TOF در دانشگاه یورک انگلستان انجام شد. داده‌های حاصل از طیفسنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBInr 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* سدیم و پتاسیم تحت تنفس شوری افزایش یافت. بیشتر بودن میزان سدیم در شرایط تنفس با توجه به فنوتیپ خوب گیاه تحت استرس، نشان دهنده این است که گیاه با مکانیسم انباست سدیم در بخش‌هایی از ساختار خود، نسبت به آسیب شوری تحمل می‌کند. نسبت پتاسیم به سدیم کاهش یافت ولی از محدوده مطلوب خارج نشد. نتایج Khan et al. (2009) به وضوح نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به تنفس گندم، با نسبت پتاسیم به سدیم بیشتر، محتویات عملکرد دانه بالاتر داشتند. و عکس العمل بهتری در شرایط شوری نشان دادند. در یک واریته حساس برنج عملکرد فتوسیستم ۲ تحت شرایط تنفس 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 واریته متحمل اتفاق افتاد. بنابراین حفظ نسبت مناسب پتاسیم به سدیم می‌تواند منجر به سطوح بالاتری از تحمل به تنفس 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 تنفس 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 به طور تکرار پذیر در ژلهای 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 تنفس ناپدید شد. موقعیت این

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

نام پروتئین و تقسیم بندی 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
<i>Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase</i>		
<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 روپیسکو در گیاهان مختلفی که در معرض تنش فلزی و شرایط تنش خشکی قرار گرفتند، گزارش شد (Salekdeh et al. 2002). افزایش بیان روپیسکو در رقم متتحمل پنهان تحت تنش شوری مشاهده شد، در حالی که قطعه‌های روپیسکو در انواع حساس به شوری کاهاش بیان پیدا کردند (Cui et al. 2015). روپیسکو در رقم حساس به شوری لوبیا چشم بلبلی تحت تنش شوری مهار شد و این منجر به کاهاش رشد و عملکرد گیاه زراعی شد (De Abreu et al. 2014). پروتئین متصل شونده به زیر واحد بزرگ روپیسکو در گندم متتحمل 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 روپیسکو 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 روپیسکو در *H. marinum* مشاهده شد. این افزایش بیان قطعات روپیسکو در تحقیقات روی ارقام دیگر جوشی و اهلی جو کشت شده نیز مشاهده شد (Fatehi et al. 2012)، برآیند نتایج نشان می‌دهد که بسیاری از ژنتوپیت‌های جو می‌توانند با تغییر بیان زیر واحدهای

روپیسکو یک آنزیم حیاتی در جذب کربن فتوستتری است و افزایش جذب کربن فتوستتری در گیاهان C3 می‌تواند باعث بهبود عملکرد محصول شود (Raines CA 2011). آنزیم روپیسکو یکی از پروتئین‌های چند زیر واحدی (۸ زیر واحد 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. روپیسکو یک منبع اصلی پروتئین در برگ‌ها و در نتیجه یک منبع آمینواسید برای اجزای زایشی می‌باشد. تجزیه روپیسکو 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 روپیسکو شوند. روپیسکو غیرفعال شده غیر قابل برگشت به سیله 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 روپیسکو دارند، عملکرد بالاتر و تحمل بیشتری تحت استرس‌های محیطی نشان می‌دهند. افزایش

فتوستتر و عملکرد محصول را افزایش داده و آسیب تنش سوری را کمتر کنند.

در بین پروتئین‌ها لکه‌های شماره ۴ و ۱۳ با عنوان پروتئین‌های ریبوزومی شناسایی شدند و تحت شرایط تنش سوری به ترتیب افزایش ۳/۲ و ۱/۶ برابر 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 ستتر 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 ستتر پروتئین می‌باشد. چندین نوع پروتئین ریبوزومی از جمله پروتئین ریبوزومی P1 در ژنتیپ‌های متحمل به سوری جو در مطالعات مشاهده شد. افزایش بیان پروتئین ریبوزومی P1 در رقم "پالاس" (*Hordeum vulgare* "Pallas") تحت تنش شدید سوری (Alikhani et al. 2013) گزارش شده است. 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 دالگارنو متصل می‌شود و اهمیت خاصی برای شروع پیغام‌ها با توالی‌های بسیار ضعیف یا قوی شاین دالگارنو دارد. ستتر 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 شده است. افزایش پروتئین ریبوزومی Ma et al. (2007) در انواع برنج جهش یافته با عملکرد بالا مشاهده شد (S1). در این مطالعه ما بر روی *H. marinum* نیز افزایش بیان پروتئین ریبوزومی S1 مشاهده شد. هر دو نوع پروتئین ریبوزومی یافت شده (P1 و S1) در گونه‌ی مارینوم تحت تنش سوری افزایش یافتند. افزایش در میزان بیان پروتئین‌های ریبوزومی را می‌توان افزایش در تعداد و میزان ریبوزوم‌های

روبیسکو میزان فتوستتر محصول و عملکرد را افزایش داده و آسیب تنش سوری را کمزنگ کنند.

لکه‌های شماره ۱۵ و ۱۷ مربوط به روبیسکو اکتیواز بودند و به ترتیب افزایش ۱/۹ و ۲/۴ برابری تحت تنش سوری نشان دادند. روبیسکو باید بهوسیله آنزیم روبیسکو اکتیواز وابسته به ATP فعال شود. نقش آنزیم اکتیواز روبیسکو حذف ریبولوز ۱۰۵ 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 محل را برای فعال‌سازی بهوسیله CO<sub>2</sub> و Mg<sub>2</sub>C آزاد می‌سازد. با مطالعه الگوی بیان ژن‌ها در جو تحت تنش سوری 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 سوری) تحت تنش سوری کوتاه مدت گزارش شد (Sobhanian et al. 2010). روبیسکو اکتیواز بهشت در ژنتیپ حساس به سوری (Beritognolo et al. 2011) *Populus alba* داده شد که بیان روبیسکو اکتیواز در رقم متتحمل به سوری لوبیا چشم بلبلی (De Abreu et al. 2014) تحت تنش سوری افزایش می‌یابد. افزایش بیان روبیسکو اکتیواز در ژنتیپ‌های متتحمل به Budak et al. (2013) گزارش شد. 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 متتحمل را می‌توان ناشی از این دانست که در گیاهان تحت تنش سوری روزنه‌ها بسته شده و میزان CO<sub>2</sub> داخل سلول و متعاقباً میزان فتوستتر کاهش می‌یابد، در این شرایط روبیسکو اکتیواز میزان روبیسکو فعال شده برای ثبت CO<sub>2</sub> و نهایتاً راندمان فتوستتر را در شرایط تنش سوری افزایش می‌دهد. در نتیجه مقدار بیشتری از روبیسکو اکتیواز می‌تواند منجر به جذب کربن بیشتر و عملکرد بالاتر محصول شود و بسیاری از ژنتیپ‌های جو می‌توانند با افزایش بیان روبیسکو اکتیواز،

می باشد 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. پروتئین های Cullin نقش مهمی در تعییرات پس از ترجمه ای پروتئین های سلولی شامل ubiquitin از کمپلکس های حلقوی کولین (CRL) Cullin-RING (UPS) نماینده ای گروه غالب لیگاز E3 یوبیکوئین در سیستم (UPS) یک گروه غالب گسترده ای در تمام فرایندهای رشد و نمو و پاسخ های فیزیولوژیک گیاهان، از جمله سازگاری با تنش های غیر زندگ محيطی (Guo et al. 2013) مورد استفاده قرار می گیرد. گزارش شده است که برای بیان نرمال ژن در نیشکر تحت تنش clathrin adaptor (Guo et al. 2014) می باشد. (CAC) و (CUL) ضروری می باشد 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) می باشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که گیاهان با تولید بیشتر کولین می توانند به شرایط تنشی پاسخ داده و خود را با استرس های مختلف زیست محیطی تطبیق دهن. لکه شماره ۱۴ به عنوان مالات دهیدروژنانز سیتوزولی شناسایی شد و تحت شرایط تنش ۱/۸ برابر افزایش داشت. مالات دهیدروژنانز 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 می کند که منجر به تولید مولکول حامل انرژی ATP می شود. ATP حمل و نقل انرژی شیمیایی درون سلول ها برای سوخت و ساز را انجام می دهد و به وسیله ای آنزیم ها و پروتئین ساختاری مورد استفاده قرار می گیرد تا بسیاری از فرایندهای سلولی، از جمله واکنش های بیوستزی، 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 می تواند تحمل به استرس های همراه با تنش اسمزی از قبیل شوری، سرما و خشکی را افزایش دهد (Yao et al. 2011). افزایش فعالیت مالات دهیدروژنانز را در

سلولی دانست که این افزایش بیان در کلیه نمونه های مورد مطالعه جو (حساس و متحمل) مشاهده شده (Fatehi et al. 2012) و بیانگر یک فرآیند عمومی برای مقابله با شوری می باشد. یکی از اثرات اصلی تنش شوری ایجاد مسمومیت یونی است. افزایش غلظت یون های سدیم و کلر در سلول باعث می شود تا پروتئین های داخل سلول نیز دچار تغییر در ساختار و شکل فضایی شوند و یا در حین تاشدن (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 پروتئین های تولیدی خود نیاز خود را به پروتئین ها و آنزیم های فعال رفع می کند. پروتئین های صدمه دیده نیز توسط مکانیسم های دخیل در تجزیه پروتئین در سلول تجزیه شده و دوباره به چرخه تولید پروتئین برگردانده می شوند. لکه شماره ۱۲ مربوط به Cullin (نوعی پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی) بوده و تحت تنش افزایش ۱/۵ برابر نشان داد. پروتئین های متصل شونده به RNA، خانواده ای از پروتئین های دارای موتیف شناسایی RNA می باشند که در سنتز mRNA، پردازش hnRNA و کترول pss از ترجمه ژن های کلروپلاستی نقش دارند و بیان آن با مراحل نمایی برگ همبستگی دارد. cp31AHv نوعی پروتئین متصل شونده به RNA (RBPs) است. به نظر می رسد بیان cp31AHv تحت کترول مثبت نور است. دو نوع پروتئین متصل شونده به Cp31BHv و Cp31AHv RNA افزایش بیان *H. vulgare* نیتروژن در رقم متتحمل به شوری (Møller et al. 2011). افزایش پنج پروتئین متصل شونده به RNA در کلروپلاست در تباکو یافت شده که در مراحل پس از رونویسی بیان ژن های 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 در آراید پسیس در اثر تنش سرما و نیز تنش کلروپلاستی 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 پروتئین های کلروپلاستی

قند، 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 به عنوان سیستئین شناسایی شد و افزایش ۲/۷ برابری در شرایط تنش نشان داد. سیستئین نقش اساسی در اینمی گیاه ایفا می‌کند. سیستاتین یک مهارکننده سیستئین 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 پروتولیتیکی پروتازهای هدف می‌باشند. مشخص شده که بازدارنده‌های پروتئیناز گیاهی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و نموی نقش دارند. سیستاتین (بازدارنده سیستئین پروتئاز) یکی از انواع بازدارنده‌های پروتئیناز است. داده‌های تجربی نشان می‌دهد که سیستاتین‌ها می‌توانند در تنظیم گردن پروتئین‌های درونی، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی کلروپلاست و هم‌چنین پروتئین‌های دفاعی در برابر آفات ایفای نقش کنند. سطوح سیستئین در سیتوزول تاثیر بسزایی در پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش غیر زنده می‌گذارد، و آشکار است که افزایش سیستئین (تا حدود کمتر از آستانه سمية) منجر به افزایش توان تحمل به استرس می‌شود (Romero et al. 2014). سیستاتین در شاه بلوط و جو در پاسخ به تنش خشکی، شوری، اسید ابزیک و سرما افزایش یافته اند (Huang et al. 2007). به استثنای HvCPI-7، تمام سیستاتین‌های ارقام جو مورد مطالعه قادر به مهار رشد قارچ‌های *B. cinerea* و *F. oxysporum* بودند (Abraham et al. 2006). بیان سیستاتین در طول زخمی‌شدن 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 سیستاتین 2 در *H. marinum* HV-CPI2 در مطالعه مشاهده شد، در نتیجه

برخی از هالوفیت‌ها گزارش شده است (Von willert 1974). هم‌چنین نتایج مشابهی در جو و ذرت گزارش شده است. افزایش بیان ملالات دهیدروژناز در آرابیدوپسیس تحت تنش شوری و نیز افزایش بیان این آنزیم در برگ‌های *Thellungiella halophila* (Fei et al. 2008) مشاهده شد. تحت تنش شوری طولانی مدت (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 به عنوان یک پروتئین آنتی اکسیدان به‌منظور تحمل شوری ایفای نقش می‌کند (Fatehi et al. 2012). نشان داده شد که TaMDH نیز در بافت‌های مختلف تولید مثلى 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 نویسنده‌گان 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 کربوهیدرات‌های 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 احتمالاً در واکنش گیاهان به تنش‌های غیر زنده نقش دارند. در این پژوهش افزایش مقدار فروکتوکیناز تحت تنش شوری در گونه *H. marinum* نشان داده شده است. 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 پلاستیدی همراه با سایر پروتئین‌های مربوط به سوخت و ساز کربن، در پاسخ به تنش خشکی دیده شده است (Fulda et al. 2011).

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 به عنوان رتروترانسپوزون شناسایی شد و تحت شرایط تنش شوری ناپدید شد. رتروالمنت‌ها (Retrotransposons و Retrovirores) به چهار سیستم یا گروه تقسیم می‌شوند، که عبارتند از تکرار ترمینال طولانی long terminal non-LTR retroelements، repeat retroelements (LTR) tyrosine recombinase (YR) retroelements و Ty3/Gypsy Penelope. رتروالمنت‌های LTR یک خانواده از رتروویروس و رتروترانسپوزون‌های LTR هستند که به طور گسترده‌ای در گیاهان توزیع شده‌اند و در درک تاریخ تکامل سیستم LTR retroelement باسیار حائز اهمیت هستند. چرا که وابستگی به اصل و نسب، روابط در شباهت توالی و ساختار ژنومی با خانواده‌های باقی‌مانده از LTR 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، فتوستتر، متابولیسم انرژی، مهار گونه‌های اکسیژن فعال

افزایش میزان این پروتئین‌ها می‌تواند تحمل گیاهان به استرس شوری شدید را تقویت سیستم ایمنی آن‌ها بهبود بینشند. 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 به عنوان 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 آبزیک اسید تحریک شده‌است، ژن‌های کد کننده تیوردوکسین h در آراییدوپسیس نیز در واکنش به پاترژن و تنش اسمزی بیان شده‌اند (Zhang et al. 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، PP1، MMK2، *H. marinum*، تیوردوکسین H، توسط تنش شوری تنظیم می‌شوند (Ji et al. 2016). در تحقیق بر روی ارقام جو، ۳ ایزوفرم ساختار کریستالی تیوردوکسین h در ژنوتیپ‌های لاین ۵۲۷ و هوردم بولبوزوم به ترتیب افزایش ۲/۴ 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 به وسیله‌ی 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 می‌توانند برای اصلاح تحمل به شوری به کار گرفته شوند. در ادامه تحقیق، با مطالعات ترانسکریپتومیکس و ژنومیکس مسیر بر عکس پروتئین به زن را پیمود و با یافتن و انتقال زن‌های مسئول در برابر تنش شوری، تولید لاین‌های ایزوژن و برنامه اصلاحی مناسب به یک رقم جو بسیار متحمل به شوری رسید.

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 رو بیسکو، رو بیسکو Activase با تاثیر مثبتی که بر راندمان فتوستتر اعمال می‌کند با افزایش بیان به تنش شوری پاسخ می‌دهند. پروتئین‌های ریبوزومی، MDH، سیستاتین و TRX تحت شرایط تنش میزان آن‌ها افزایش یافته‌اند، که به ترتیب در سترز پروتئین، تولید ATP تقویت سیستم ایمنی و مهار گونه‌های اکسیژن فعال نقش مفیدی داشته‌اند. 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

### 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.
- Budak H, Akpinar BA, Unver 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 stressresponsive 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, Alkhalioui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenhaler 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 glycophyten. 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.