



عکس العمل ریشه‌ی برنج به دوره‌های زمانی تنش کمبود آب با رویکرد الکتروفورز دو بعدی

محمود تورچی^{*۱}

چکیده

برنج (*Oryza sativa* L.) غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. تنش کمبود آب یکی از عمده‌ترین موانع برای تولید موفق محصولات زراعی است. برنج در طول دوره رشدی خود تحت تاثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرد که از جمله آنها می‌توان به تنش کمبود آب اشاره نمود. پیشرفت‌های اخیر در فیزیولوژی مولکولی این امید را به وجود آورده است که با شناسایی پروتئین‌های کاندیدای مقاومت به تنش کمبود آب، بتوان در افزایش عملکرد برنج گام‌های اساسی برداشت. به منظور بررسی اثر تنش کمبود آب بر الگوی تظاهر پروتئین‌های ریشه‌ی برنج، آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی و اجرا گردید. تیمارهای مورد مطالعه، شامل آبیاری عادی و تنش‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت قطع آبیاری بود. آزمایش در شرایط آزمایشگاهی و تحت شرایط کنترل شده در اتاقک رشد انجام گردید. پس از اعمال تنش نمونه‌های بافت ریشه به منظور آزمایش‌های الکتروفورز دو بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل پروتئوم بافت ریشه به روش الکتروفورز دو بعدی نشان داد که از بین ۱۳۵ لکه پروتئینی قابل تشخیص در رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی، تعداد ۱۴ لکه پروتئینی تغییرات بیان معنی‌داری از نظر آماری در شرایط تنش کمبود آب نشان دادند که تعداد ۷ پروتئین در سطح احتمال ۱ درصد و ۷ پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان، بر اساس نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی در بانک‌های اطلاعاتی مورد جستجو قرار گرفتند و پروتئین‌های احتمالی پاسخ دهنده به شرایط تنش شناسایی شدند. افزایش بیان فردوکسین اکسیدوردوکتاز ۲۴ ساعت پس از شروع تنش کمبود آب نمایانگر نقش این پروتئین در کاهش اثرات تنش کمبود آب است. در حالی‌که پروتئین‌های ریبوزومی، گلیسر آلدئید ۳-فسفات و ATP سنتتاز در طی تنش کمبود آب روند کاهشی داشتند. پروتئین‌های فروکتوز ۶-۱ بی‌فسفات آلدولاز، گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز، گلاسیسین دهیدروژناز و کتیناز پس از روند کاهشی تا ۳۶ ساعت تنش کمبود آب، با افزایش مدت تنش به ۴۸ ساعت مجدداً روند افزایشی نشان دادند که بیانگر تلاش گیاه برای کاهش اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو می‌باشد.

واژگان کلیدی: الکتروفورز دو بعدی، برنج، پروتئوم، تنش کمبود آب.

mtoorchi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۷

۱- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (* نگارنده‌ی مسئول)

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. بخش وسیعی از مزارع جهان و همچنین شمال ایران زیر کشت برنج قرار دارند. برنج نه تنها در عرصه‌ی کشاورزی بلکه در تحقیقات نیز به عنوان یک گیاه مدل مطرح است که به دلیل کوچک بودن ژنوم برنج نسبت به سایر غلات می‌باشد (Komatsu *et al.*, 2003). از عمده‌ترین محدودیت‌های تولید محصول برنج کمبود آب است. افزایش کمبود آب، توزیع نامناسب بارندگی و نیاز به آبیاری تکمیلی، هزینه‌های تولید برنج را در دنیا افزایش داده است. بنابراین، نیاز برای تولید ارقام برنج مقاوم به کمبود آب و پر محصول از مهم‌ترین اهداف مراکز تحقیقاتی برنج محسوب می‌شود. کشت برنج در نواحی حاشیه‌ای با خاک ضعیف و تحت تنش‌های مختلف از جمله کمبود آب کشت و کار می‌شود. برخی از گونه‌های محلی برنج جاپونیکا خودش را با شرایط تنش کمبود آب و شرایط خشک در نواحی آمریکای جنوبی و آفریقا وفق داده است. چنین گونه‌هایی ظرفیت آب مصرفی بالایی را نشان می‌دهند و برای مطالعات مکانیسم مقاومت به کمبود آب مطلوب می‌باشند (Rabello *et al.*, 2008). تنش کمبود آب یک مشکل جهانی در مناطق خشک و نیمه خشک است. بر اساس بررسی‌ها، درصد مناطق خشک در ۲۰۰ سال آینده دو برابر خواهد شد. کمبود آب ضربه اقتصادی عظیمی بر تولیدات کشاورزی دارد. مقابله با این معضل نیازمند به کارگیری راه‌کارهای مختلفی از جمله بهبود زیرساخت‌های مدیریت مزرعه، توسعه سیستم‌های آبیاری، استفاده بهینه از منابع آب و خاک و اصلاح ژنتیکی می‌باشد (Devienne *et al.*, 1999).

پروتئین‌ها به عنوان محصول نهایی ژن‌ها مسئول فرآیندهای سلولی هستند. اطلاعات حاصل از ژنوم

موجودات، برای تعیین ساختار و عمل پروتئین‌ها کافی نیست (Klug and Cumming, 2000). شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به کمبود آب از موضوعات چالش برانگیز در فیزیولوژی مولکولی است. شناسایی و جداسازی پروتئین‌های درگیر در مقاومت به کمبود آب اهمیت زیادی دارد و پروتئومیک یا مطالعه جامع پروتئین‌های یک بافت در یک مرحله از زندگی موجود زنده نقش محوری را در فیزیولوژی سلولی و مولکولی ایفا می‌کند. از آنجایی که بیان ژن‌ها در مراحل مختلفی تنظیم می‌شود، پیشگویی میزان پروتئین‌های یک سلول از روی مقادیر mRNA به‌ویژه در مورد پروتئین‌های نادر کار دشواری است. همچنین، تجمع پروتئین‌هایی که در ترانسکریپشن پیام درگیر هستند، دستخوش تغییرات پس از رونویسی و ترجمه می‌شوند (Huck, 2004). امروزه با گسترش تکنیک‌هایی چون الکتروفورز دو بعدی امکان تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر گردیده است و در حقیقت پروتئومیک دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند (Gygi *et al.*, 2000). رهیافت پروتئومیک امکان مطالعه بیان پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب و شناسایی مسیرهای مولکولی واکنش‌ها را فراهم می‌کند (Dubey and Grover, 2001).

در سال‌های اخیر تکنیک الکتروفورز دو بعدی برای بیان پروتئین‌ها در اندام‌ها، بافت‌ها یا پاسخ به تنش‌ها استفاده شده است و این تکنیک روشی ایده‌آل برای مطالعه تنش‌های محیطی در سطح فیزیولوژی مولکولی محسوب می‌شود (Zivy and Devienne, 2000). پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکنیک الکتروفورز دوبعدی باعث توسعه روش‌های

استخراج پروتئین، الکتروفورز دو بعدی و تجزیه و تحلیل کمی پروتئین‌ها

استخراج پروتئین بر اساس روش تورچی و همکاران (Toorchi *et al.*, 2009) انجام شد. برای این منظور از یک گرم بافت ریشه، پروتئین استخراج شده و عصاره حاصل در الکتروفورز دوبعدی مورد استفاده قرار گرفت. بعد اول الکتروفورز به روش IEF (Isoelectric Focusing) با محدوده pH (3-10) و بعد دوم به وسیله ژل آکرلامید (SDS-PAGE) انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها توسط آبی کوماسی (CBB) و تصویربرداری از ژل‌ها پس از رنگ‌بری، با دستگاه چگالی سنج (GS-800, Bio-Rad) انجام شد. تغییرات کمی لکه‌های پروتئینی آشکار شده بر روی ژل‌ها توسط نرم‌افزار PDQuest مورد ارزیابی قرار گرفت. به طوری که، درصد حجمی نقاط توسط نرم‌افزار محاسبه و به عنوان میزان پروتئین تظاهر یافته در نظر گرفته شد. داده‌های کمی توسط نرم‌افزار EXCEL مرتب گردیده و تجزیه واریانس برای هر لکه پروتئینی با نرم‌افزار SAS انجام شد. نقاطی که دارای تغییرات بیان معنی‌داری از نظر آماری بودند مشخص و روی آنها تجزیه‌های اضافی صورت گرفت. روند افزایشی و یا کاهش بیانی لکه‌های پروتئینی بر اثر تیمارهای تنش کمبود آب به صورت نمودار با EXCEL مشخص گردید. شناسایی پروتئین‌ها با مراجعه به پایگاه‌های اطلاعاتی اینترنتی در سایت‌های NCBI و SWISS 2D-PAGE در Expasy و از طریق مقایسه نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌های شناسایی شده با پروتئین‌های موجود در این پایگاه‌های اطلاعاتی انجام گرفت.

استخراج پروتئین‌ها (Herbert, 1999) و بارگذاری عصاره پروتئینی در ژل‌ها و تجزیه آنها شده است (Molloy, 2000).

این پژوهش به منظور بررسی پاسخ بافت ریشه‌ی برنج به دوره‌های زمانی مختلف تنش کمبود آب با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی و نقش پروتئین‌های درگیر در تحمل تنش خشکی طراحی و به مورد اجرا گذاشته شد.

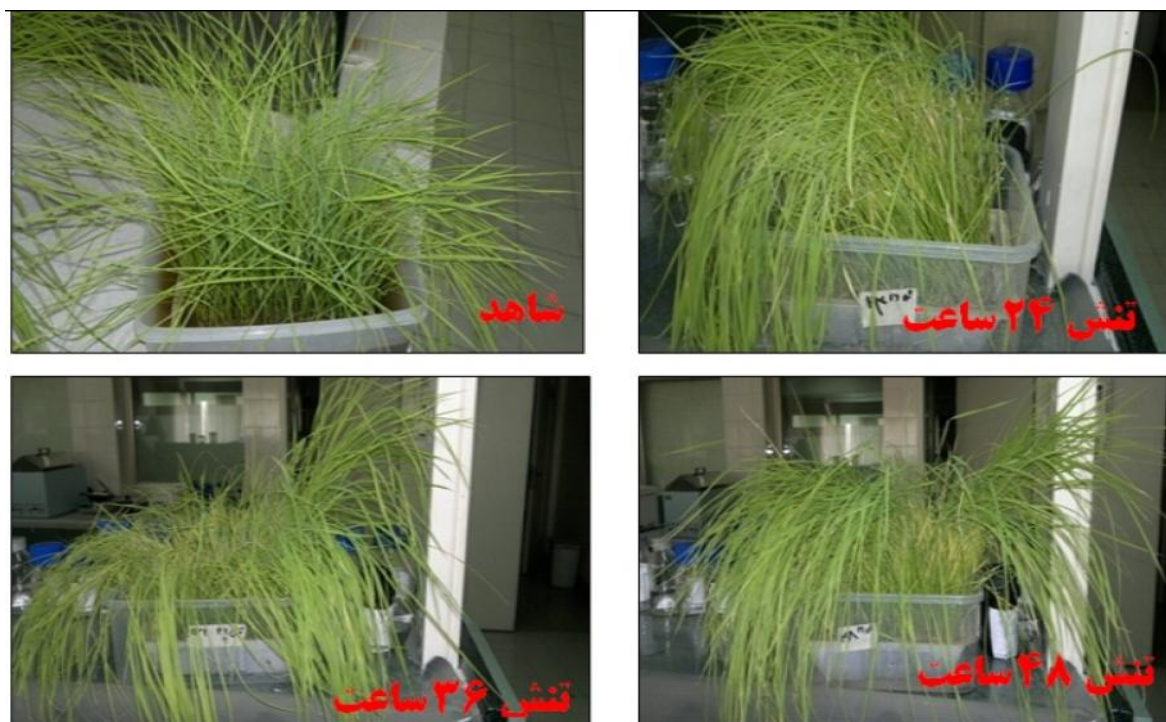
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و روش انجام آزمایش

رقم مورد استفاده در این آزمایش برنج هاشمی از ارقام محلی مورد کشت و کار در شمال کشور است. بذور این رقم در شرایط آزمایشگاهی تحت شرایط کنترل شده در اتاقک رشد پرورش یافتند. برای کاشت گلدان‌های یک لیتری به ارتفاع ۷ سانتی‌متر تهیه و با خاک زراعی و کود حیوانی به نسبت ۱:۱ پر شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده از نظر دما، رطوبت و روشنایی قرار گرفتند. به این ترتیب که دما ۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۹۵٪ و طول دوره روشنایی ۱۲ ساعت تعیین گردید.

نحوه کشت و اعمال تنش کمبود آب

بذور ۴۵ دقیقه بعد از ضدعفونی به مدت دو روز در لای پارچه خیس نگهداری شدند. بعد از مشاهده جوانه‌ها که ۲-۳ روز طول کشید، بذور به خاک منتقل شدند. ۲۱ روز بعد از انتقال و رشد گیاهان، تنش در دوره‌های زمانی ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با قطع آبیاری اعمال گردید. ضمن این که گیاهان شاهد همچنان به صورت غرقاب آبیاری شدند. آزمایش در سه تکرار در غالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و سه سطح تنش به همراه شاهد، تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند (شکل ۱).



شکل ۱- ساعات‌های مختلف اعمال تنش کمبود آب در برنج رقم هاشمی

Figure 1- Imposition of water deficit stress under different time courses in rice Heshemi cv

مشابهی از نظر بیان پروتئینی تحت تنش داشتند به این ترتیب که در حالت شاهد بیشترین میزان بیان پروتئین و در ۳۶ ساعت حداقل بیان مشاهده شد ولی به تدریج روند افزایش بیان در تنش ۴۸ ساعت کمبود آب مشاهده گردید. پروتئین‌های شماره ۳۱۰۲، ۳۵۰۱، ۳۷۰۱، ۶۸۰۱ و ۶۸۰۴ روند مشابهی از نظر بیان پروتئین تحت تنش کمبود آب داشتند به این صورت که حداقل میزان بیان در ۲۴ ساعت تنش کمبود آب رخ داد. سپس میزان بیان در ۳۶ ساعت، تنش کم‌آبی افزایش و دوباره در ۴۸ ساعت کاهش نشان داد. پروتئین‌های ۶۲۰۱ و ۱۵۰۱ در ۲۴ ساعت تنش کمبود آب افزایش بیان نسبت به شاهد نشان دادند و میزان بیان در ۳۶ ساعت تنش کمبود آب کاهش یافت و دوباره در ۴۸ ساعت روند افزایشی مشاهده گردید. پروتئین شماره ۵۵۰۱ نسبت به شاهد

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل الکتروفورز دو بعدی ریشه برنج رقم هاشمی در سطوح مختلف تنش کمبود آب به همراه شاهد از طریق رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی و نرم افزار PDQuest، منجر به شناسایی ۱۳۵ لکه پروتئینی تکرار پذیر در هر کدام از ژل‌ها گردید. آزمون F برای شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار انجام شد. تعداد ۱۴ پروتئینی تغییرات معنی‌داری از نظر آماری در سطوح مختلف تنش کمبود آب نشان دادند. پروتئین‌های شماره ۱۵۰۱، ۳۱۰۲، ۳۵۰۱، ۶۸۰۱، ۶۸۰۴، ۷۳۰۳، ۹۲۰۲ در سطح احتمال ۵ درصد و پروتئین‌های شماره ۳۷۰۱، ۵۵۰۱، ۵۸۰۱، ۶۲۰۱، ۶۴۰۱، ۸۵۰۲ و ۹۲۰۱ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱). پروتئین‌های شماره ۵۸۰۱، ۶۴۰۱، ۷۳۰۳، ۸۵۰۲، ۹۲۰۱ روند

Fructose 1-6 bisphosphate aldolase

نتایج حاصل از شناسایی پروتئین‌ها نشان می‌دهد که پروتئین شماره (۷۳۰۳) احتمالاً فروکتوز ۱-۶ بیس فسفات آلدولاز هست. بیان این پروتئین با شروع تنش تا ۳۶ ساعت به‌طور معنی‌داری روند کاهشی نشان داد ولی با افزایش شدت تنش در ۴۸ ساعت مجدداً افزایش یافت (شکل ۴). تثبیت کربن مهم‌ترین فرایند فتوسنتز می‌باشد. آنزیم فروکتوز ۱-۶ بیس فسفات آلدولاز کلروپلاستی نقش مهمی در تثبیت کربن و انتقال الکترون فتوسنتزی در چرخه کالوین دارد. همچنین، در چندین مورد گزارش شده این آنزیم در تنظیم و ایجاد پاسخ به تنش‌های غیرزنده نقش ایفا می‌کند. لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2011) پنج cDNA کدکننده آنزیم فروکتوز ۱-۶ بیس فسفات آلدولاز کلروپلاستی از واریته‌های گندم زمستانه را جدا کرده و نشان دادند که سطح بیان آنزیم در واریته Aibian1 در ابتدا افزایش ولی بعد کاهش می‌یابد در حالی که در دمای پایین سطح بیان آن در واریته حساس Albinism line در ابتدا کاهش واضح‌تری داشته ولی بعداً به آرامی افزایش می‌یابد.

پروتئین‌های درگیر در تنفس نوری

بررسی‌های انجام گرفته دمیروسکاو و همکاران (Demirevska *et al.*, 2008) بر روی گیاهچه‌های گندم حساس و مقاوم به تنش کمبود آب نشان می‌دهد که تحت تنش کمبود آب سنتز هورمون آبسزیک اسید در این گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد. احتمالاً آبسزیک اسید موجب بسته شدن روزنه‌ها در شرایط تنش شود. در این حالت به علت وجود نور و عدم وجود CO₂ گیاه جهت جلوگیری از آسیب ROSها به ناچار مسیر تنفس نوری را در پیش می‌گیرد.

در کلیه تیمارهای تنش کمبود آب روند کاهشی نشان داد. پروتئین شماره ۹۲۰۲ روندی متفاوت از سایر لکه‌های پروتئینی نشان داد به‌طوری‌که میزان بیان در سطح شاهد با ۳۶ و ۴۸ ساعت تنش کمبود آب یکسان بود ولی تنش در ۲۴ ساعت اولیه باعث کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین گردید (شکل ۲).

پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز

ATP synthase cf1 alpha subunit

پروتئین شماره ۳۵۰۱ جزو پروتئین‌های ATP سنتاز، زیرواحد شناخته شد. سنتاز CF-CF1 موجود در غشای تیلاکوئید نقش کاتالیز مراحل انتهایی فسفریلاسیون نوری و تولید ATP از گرادیان الکتروشیمیایی پروتون در دو سمت غشا را بر عهده دارد. ساختار مولکولی این آنزیم در اندامک‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی به شدت محافظت شده است (Walker *et al.*, 1984). این آنزیم دارای دو بخش مجزا است، یک بخش هیدروفیل یا قسمت CF1 که دارای جایگاه اتصال نوکلئوتید بوده و تولید ATP را کاتالیز می‌کند و بخش هیدروفوب یا قسمت CF0 که کانالی برای حرکت پروتون‌ها از عرض غشا می‌باشد (Senior and Wise, 1983). ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2008) گزارش کردند که ژن جدا شده از آرابیدوپسیس به نام AtMtATP6 کدکننده پروتئین مزبور می‌باشد و بررسی‌های حاصل از لکه‌گذاری نورترن نشان داد که بیان این ژن در کشت سلول‌های سوسپانسیون آرابیدوپسیس توسط چندین تنش غیرزنده از جمله شوری، کمبود آب و سرما افزایش می‌یابد. در آزمایش سبحانین و همکاران (Sobhanian *et al.*, 2010) نیز در شرایط تنش شوری زیر واحد بتای ATP سنتاز CF1 کاهش بیان نشان داده است (شکل ۳).

گلايسين دهيدروژناز

Glycine dehydrogenase

پروتئين‌های شماره ۵۸۰۱، ۶۸۰۱ به‌عنوان پروتئين گلايسين دهيدروژناز مشخص شدند. پروتئين ۵۸۰۱ ضمن کاهش بيان اوليه ۲۴ ساعت بعد از تنش کمبود آب، با افزايش طول تنش تا ۴۸ ساعت افزايش بيان نشان دادند (شکل ۷-الف). لکه شماره ۶۸۰۱ کاهش بيان اوليه در ۲۴ ساعت تنش کمبود آب نشان داد که افزايش بيان چشم‌گیر در ۳۶ ساعت تنش رویت شد و دوباره تا ۴۸ ساعت تغيير چندانی دیده نشد (شکل ۷-ب). آزمایش‌های دمیروسکاو و همکاران (Demirevska *et al.*, 2008) بر روی گیاهچه‌های گندم حساس و مقاوم به تنش کمبود آب نشان می‌دهد که تحت تنش کمبود آب سنتز هورمون آبسزیک اسید در این گیاهچه‌ها افزايش می‌یابد. احتمالاً آبسزیک اسید موجب بسته شدن روزنه‌ها در شرایط تنش نقش ایفا می‌کند.

پروتئين‌های درگیر در کاهش اثرات تنش

اکسیداتیو

مشاهده شده است که سرب در سلول‌ها به طور مستقیم و غیر مستقیم از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از قبیل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و سوپراکسید (O_2^-) موجب تخریب مولکولی می‌شوند (Lin and Kao, 2000). این گونه‌های فعال با لیپیدها، پروتئين‌ها، رنگدانه‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان داده و موجب پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب غشا و غیرفعال شدن آنزیم‌ها و در نهایت موجب عدم پایداری سلول‌ها می‌شود. اثرات تنش اکسیداتیو در سطح سلولی ممکن است از طریق مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در بسیاری از گیاهان افزايش پیدا کند.

گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهيدروژناز

Glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase

پروتئين‌های شماره ۳۷۰۱ و ۶۸۰۴ به‌عنوان آنزیم گلیسرآلدئید ۳- فسفات شناسایی شدند. بیان این لکه‌ها از سطح شاهد به تیمار ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. افزايش شدت تنش تا ۳۶ ساعت موجب افزايش و تداوم آن به ۴۸ ساعت موجب کاهش بيان مجدد آن گردید (شکل ۵- الف و ب). پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده به‌وسیله تغییر در بیان ژن‌های دخیل در تنش صورت می‌گیرد و تنش‌های محیطی موجب القای بیان آنزیم گلیسرآلدئید ۳- فسفات می‌شود. سبحانیان و همکاران (Sobhanian *et al.*, 2010) از طریق تجزیه الکتروفورز دو بعدی حاصل از برگ، هیپوکوتیل و ریشه سویا تحت تنش شوری گزارش کردند که میزان بیان آنزیم گلیسر آلدئید ۳- فسفات در برگ‌ها و هیپوکوتیل به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.

گلوکز ۶- فسفات دهيدروژناز

Glucose-6 phosphate dehydrogenase

پروتئين شماره ۸۵۰۲ جزو پروتئين‌های گلوکز ۶- فسفات دهيدروژناز است. این پروتئين ضمن کاهش بيان اوليه، ۲۴ ساعت بعد از تنش کمبود آب، با افزايش مدت تنش تا ۴۸ ساعت افزايش بيان نشان دادند (شکل ۶) که نشانگر کاهش در تولید NADPH در مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات مسیر اصلی تولید NADPH جهت بیوسنتز و کاهش تعادل سلول‌های گیاهی است (Hutchings *et al.*, 2005). مطالعه پروتئين‌های دیواره سلولی ریشه گندم تحت تاثیر تنش غرقابی توسط زانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2009) نشان داد که فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهيدروژناز در اثر تنش کاهش می‌یابد.

کلروپلاست است. GSH یکی از عوامل مقاومت به تنش اکسیداتیو می باشد. اکسیداز GSH به وسیله DHA ردوکتاز که خود نیز با NADPH کاهش می یابد، تولید می شود. دمای بالا باعث افزایش فعالیت آنزیم DHA ردوکتاز می شود (Urao *et al.*, 2000). در گونه های مختلف گیاهی میزان آنتی اکسیدان در پاسخ به تنش کمبود آب افزایش می یابد (Smirnoff, 1996 and Pallanca, 2001 and Schwanz).

پروتئین هایی که نقش آنها در تنش کمبود

آب به درستی مشخص نشده است

علاوه بر پروتئین های اشاره شده، پروتئین های دیگری نیز در این تحقیق شناسایی شدند که نقش و ارتباط آنها با تنش کمبود آب به درستی مشخص نگردیده است که می توان به موارد زیر اشاره نمود:

Ribosomal protein L11

پروتئین های شماره ۵۵۰۱ و ۶۴۰۱ به عنوان Ribosomal protein L11 احتمالی شناسایی شدند. بیان این پروتئین ها در پژوهش حاضر با اعمال تنش کمبود آب روند کاهشی نشان داد به طوری که با افزایش ساعت تنش تا ۴۸ ساعت بیان هر دو پروتئین کاهش یافت (شکل ۱۰- الف و ب). تاکنون اطلاعاتی در زمینه نقش این پروتئین ها در تنش های محیطی در سطح مولکولی ارائه نشده است.

Hypothetical protein

پروتئین شماره ۱۵۰۱ در این گروه قرار گرفت. بیان این پروتئین با اعمال تنش کمبود آب تا ۳۶ ساعت تغییر معنی داری نشان نداد ولی با افزایش مدت تنش کم آبی به ۴۸ ساعت به طور معنی داری افزایش بیان نشان داد (شکل ۱۱). عملکرد این پروتئین به درستی شناخته نشده، ولی در ایجاد مقاومت به تنش کمبود آب نقش دارد. این پروتئین ها کاندیدای مناسبی برای مطالعات آتی و شناسایی

فرودوکسین NADPH اکسیدردوکتاز

Ferredoxin NADPH oxydoreductase

پروتئین های شماره ۹۲۰۲ و ۶۲۰۱ جزو پروتئین های خانواده اکسیدردوکتازها می باشند. پروتئین ۶۲۰۱ در ۲۴ ساعت تنش کمبود آب افزایش بیان نسبی نشان داده ولی تداوم تنش به ۳۶ ساعت موجب کاهش بیان آن گردید. تشدید تنش تا ۴۸ ساعت باعث افزایش بیان مجدد این آنزیم ها شده است (شکل ۸- الف). پروتئین ۹۲۰۲ در ۲۴ ساعت تنش کمبود آب کاهش بیان داشته و با تداوم تنش تا ۳۶ ساعت افزایش بیان و سپس تا ۴۸ ساعت کاهش نسبی در بیان آن دیده شد (شکل ۸- ب). از آن جایی که عدم انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی موجب ایجاد تنش اکسیداتیو می شود، این فرآیند با افزایش بیان آنزیم فرودوکسین اکسیدردوکتاز همراه است تا از ایجاد (ROS) ها در مراحل اولیه تنش کمبود آب ممانعت شده و از این طریق آسیب وارده به غشای سلولی را کاهش دهد. فرودوکسین NADP اکسیدردوکتاز انتقال الکترون ها را بین فرودوکسین و NADP انجام می دهد. از دیگر آنزیم های این گروه می توان به نیتريت ردوکتاز، سولفید ردوکتاز، گلوتامات سنتتاز و فرودوکسین تیوردوکسین ردوکتازها اشاره کرد که الکترون ها را از فرودوکسین به پروتئین های انتقال دهنده الکترون در استروما منتقل می کنند (Higichi- Takeuchi *et al.*, 2011).

GSH-dependent DHA reductase

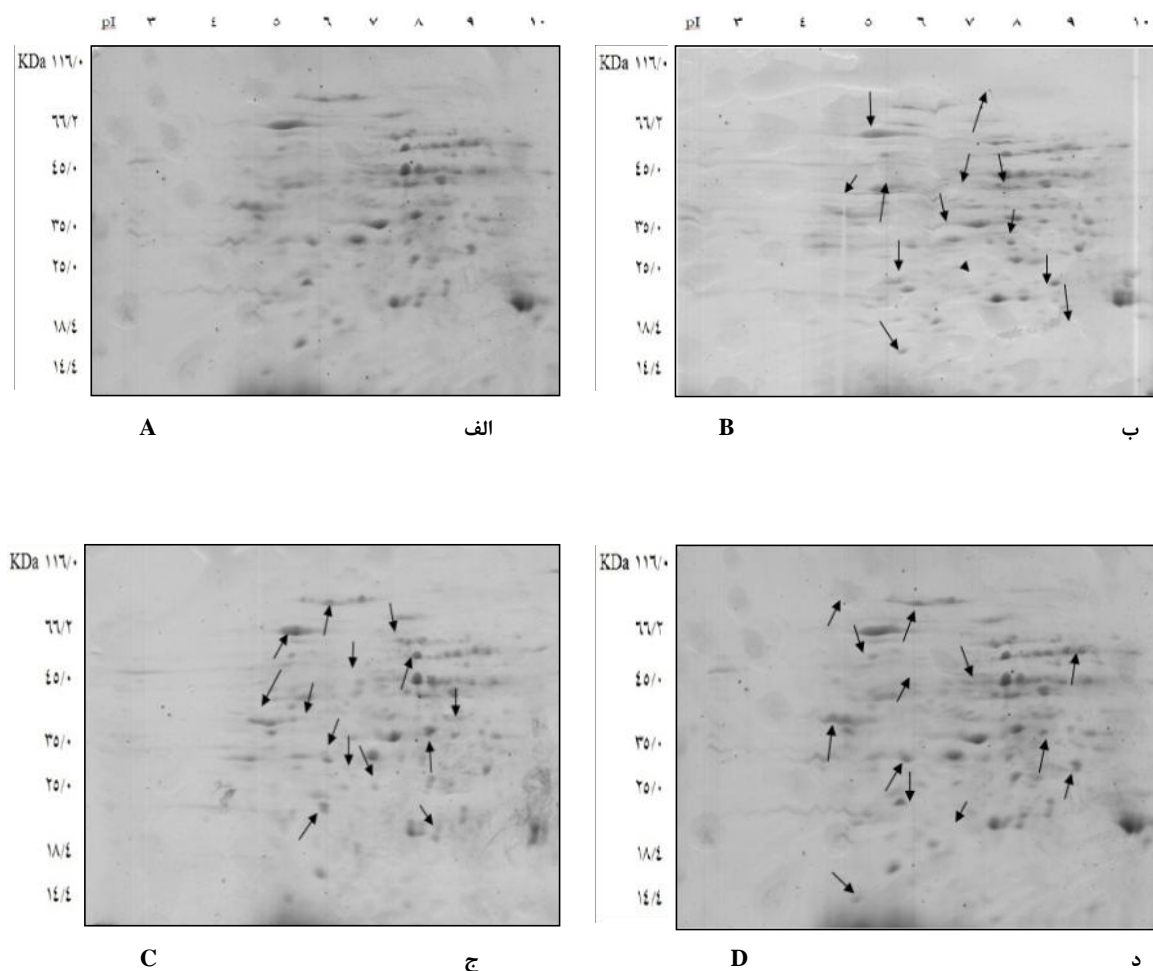
لکه پروتئینی شماره ۳۱۰۲ در این گروه جای دارد. طی ۲۴ ساعت تنش کمبود آب این پروتئین به طور معنی داری کاهش بیان داشت و تداوم مدت زمان تنش به ۳۶ و ۴۸ ساعت تغییرات چندانی در بیان پروتئین نشان نداد (شکل ۹). گلوکاتیون دهیدرو اسکوربات ردوکتاز DHA، این آنزیم کاتالیزور

که در شرایط پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بیان می‌شوند و در علوفه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این پروتئین در چاودار در پاسخ به سرما و تنش کمبود آب بیان می‌شود. در گوجه‌فرنگی نیز کیتیناز در گونه‌های مقاوم به کمبود آب نسبت به گونه‌های حساس کاهش نشان داده است (Rabello *et al.*, 2008).

نقش فیزیولوژیکی آنها به‌شمار می‌رود (Rabello *et al.*, 2008).

Chitinase chain A

پروتئین شماره ۹۲۰۱ ساختاری از کیتیناز دارد که تحت تنش کمبود آب تا ۳۶ ساعت بیان آن کاهش یافت و سپس مجدداً با افزایش مدت زمان تنش کمبود آب به ۴۸ ساعت روند افزایشی از خود نشان داد (شکل ۱۲). کیتینازها پروتئین‌هایی هستند



شکل ۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی ریشه برنج رقم هاشمی در شرایط شاهد (الف) و تنش کمبود آب ۲۴ (ب)، ۳۶ (ج) و ۴۸ (د)

ساعت

Figure 2- Two-dimensional electrophoresis pattern of rice root under control condition (A) and 24(B) , 36 (C) and 48 (D) hours water deficit stress

جدول ۱- مشخصات پروتئین‌های شناسایی شده در ریشه برنج رقم هاشمی تحت تنش کمبود آب

Table 1- Identification of proteins in rice root Hashemi cv under water deficit stress

شماره پروتئین Protein No.	نام پروتئین Protein	pI, MW(kDa)		شماره دسترسی Accession Number
		تئوری Theory	تجربی Experimental	
1501	Hypothetical Protein	5.2, 60	6.17, 56.4	115465323
3102	GSH-dependent DHareductase	6.3, 27	7.0, 28.9	BAA90672
3501	ATP synthase cf1 alpha chain	6.11, 55.30	6.95, 54.43	17371040
3701	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase	4.0, 82	6.8, 74.1	20455490
5501	Ribosomal PrL11	7.49, 55.8	7.0, 50	226533453
5801	Glycine dehydrogenase	7.4, 108.5	6.3, 112	356514615
6201	Ferredoxin- NADPH oxydoreductase	7.24, 38.9	7.62, 38.53	20302473
6401	Ribosomal PrL11	7.49, 55.8	7.75, 44.87	226533453
6801	Glycine dehydrogenase	7.57, 108.5	6.3, 112	356514615
6804	Glyceraldehyde3-Phosphate dehydrogenase	4.0, 82	7.8, 83.8	20455490
7303	Fructosel-6bisphosphatealdolase	8.3, 42.08	9.0, 41	256152303
8502	Glucose 6-Phosphate dehydrogenase	5.92, 59	8.7, 56	3023817
9201	Chitinase	4.2, 34.3	9.3, 34.14	561873
9202	Ferredoxin NADPH oxydoreductase	8.2, 9.39	9.3, 39	20302473

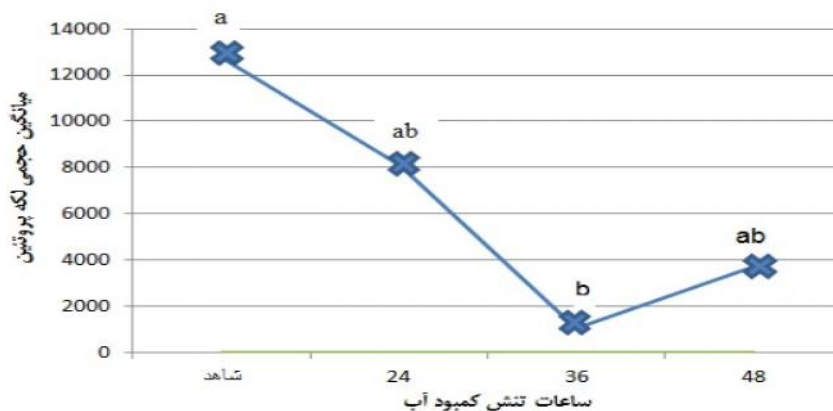


شکل ۳- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۳۵۰۱ (ATP synthase cf1 alpha subunit)

Figure 3- Expression changes of protein No. 3501 (ATP synthase cf1 alpha subunit)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

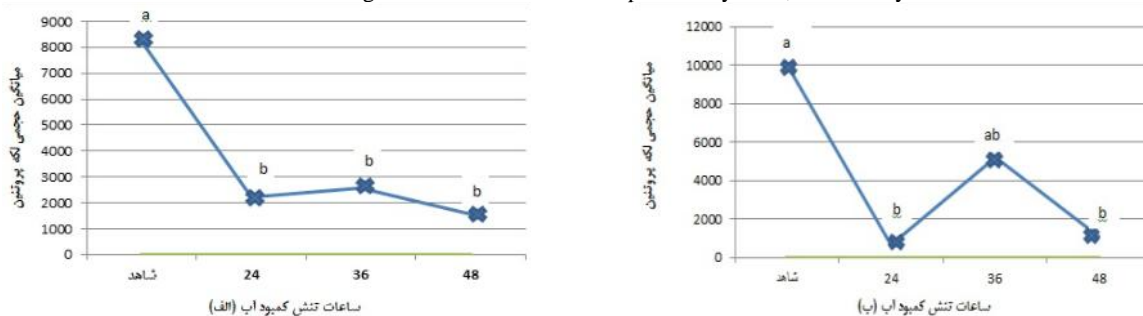


شکل ۴- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۷۳۰۳ (Fructose 1-6 bisphosphate aldolase)

Figure 4- Expression changes of protein No. 7303 (Fructose 1-6 bisphosphate aldolase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

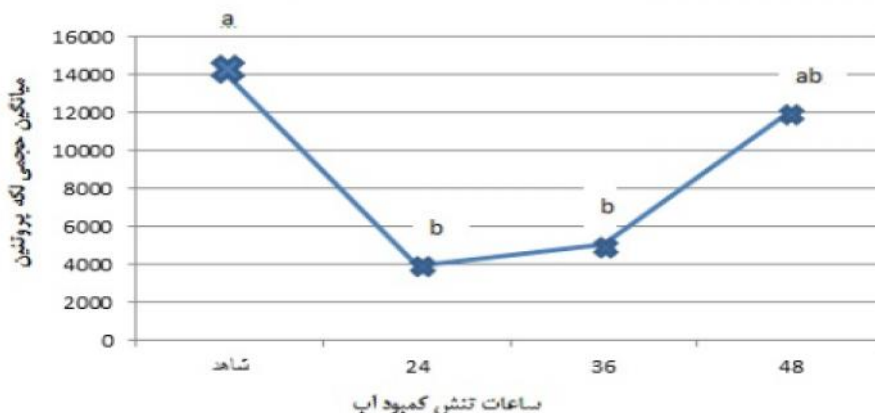


شکل ۵- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۳۷۰۱ (الف) و ۶۸۰۴ (ب) (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

Figure 5- Expression changes of proteins No. 3701 (a) and 6804 (b) (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

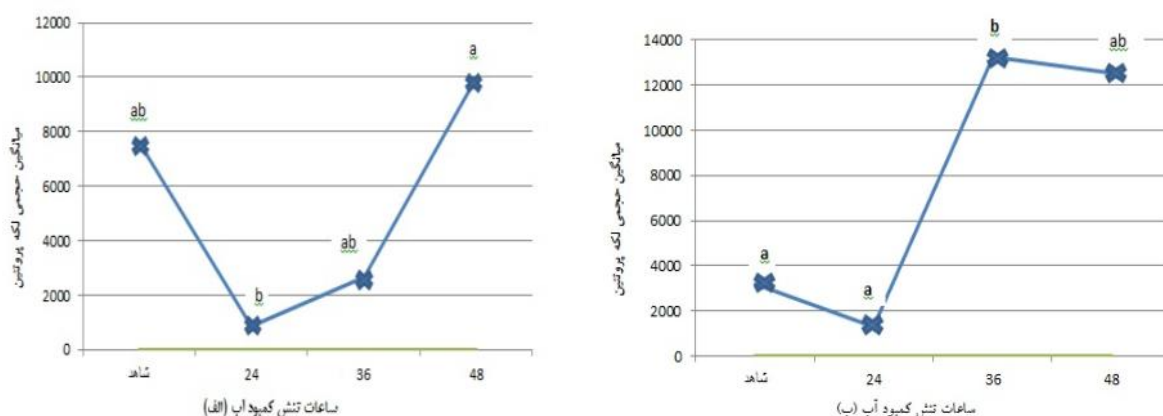


شکل ۶- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۸۵۰۲ (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

Figure 6- Expression changes of proteins No. 8502 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

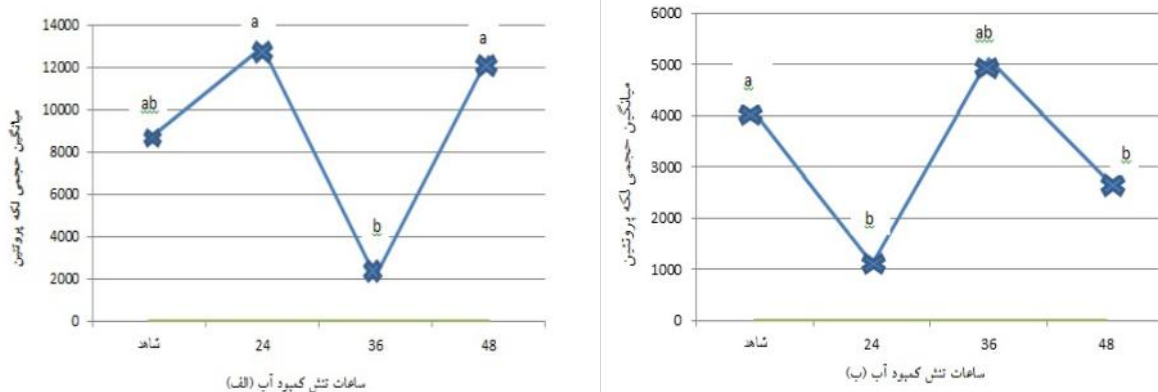


شکل ۷- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۵۸۰۱ (الف) و ۶۸۰۱ (ب). (Glycine dehydrogenase)

Figure 7- Expression changes of proteins No. 5801 (a) and 6801 (b) (Glycine dehydrogenase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

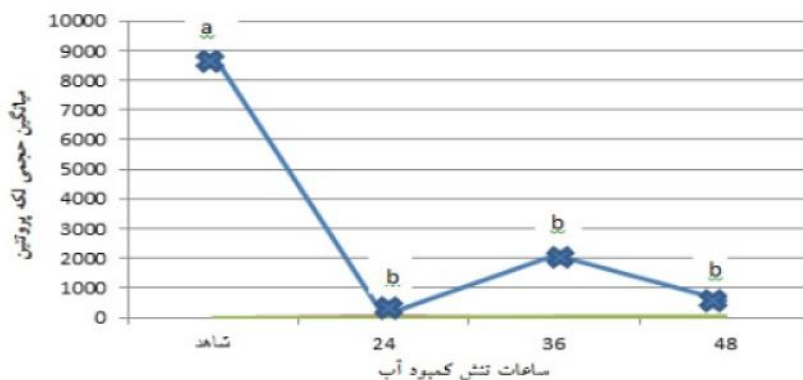


شکل ۸- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۶۲۰۱ (الف) و ۹۲۰۲ (ب). (Ferredoxin NADP(H) oxydoreductase)

Figure 8- Expression changes of proteins No. 6201 (a) and 9202 (b) (Ferredoxin NADPH oxydoreductase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

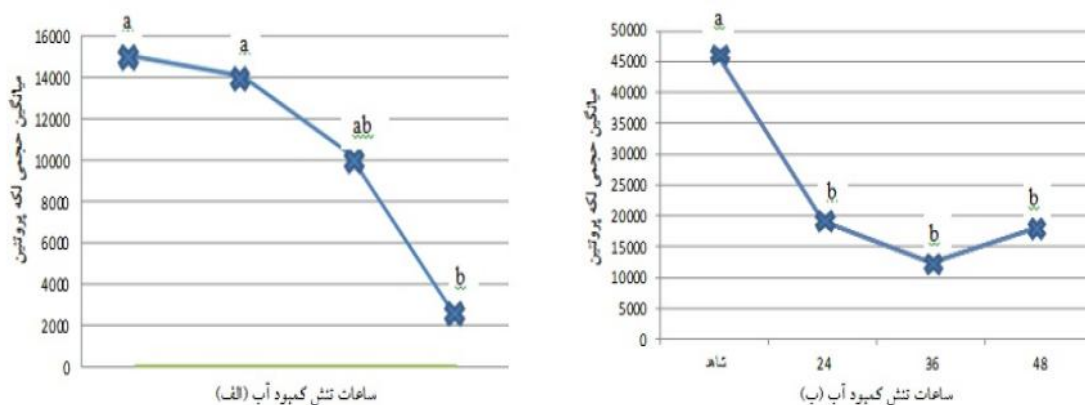


شکل ۹- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۳۱۰۲ (GSH-dependent DHA reductase)

Figure 9- Expression changes of protein No. 3102 (GSH-dependent DHA reductase)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

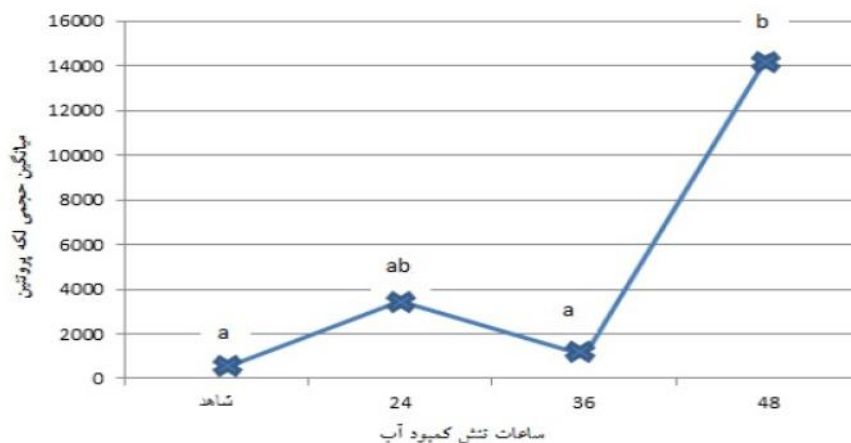


شکل ۱۰ - روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۵۵۰۱ (الف) و ۶۴۰۱ (ب). (Ribosomal protein L11)

Figure 10- Expression changes of proteins No. 5501 (a) and 6401 (b) (Ribosomal protein L11)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

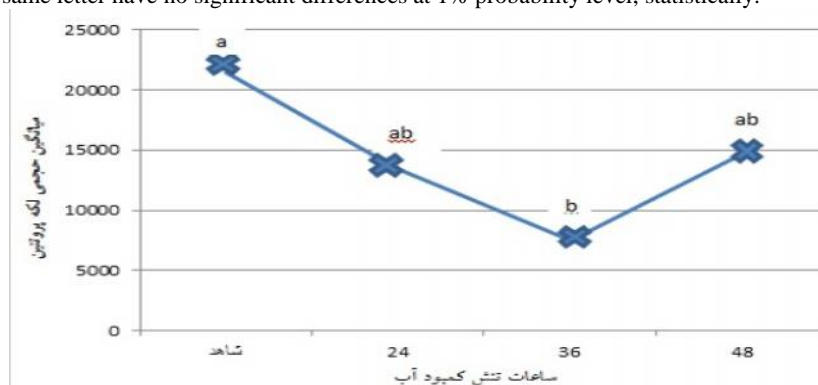


شکل ۱۱- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۱۵۰۱ (Hypothetical protein)

Figure 11- Expression changes of protein No. 1501 (Hypothetical protein)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.



شکل ۱۲- روند تغییرات بیان پروتئین شماره ۹۲۰۱ (Chitinase chain A)

Figure 12- Expression changes of protein No. 1501 (Chitinase chain A)

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means with the same letter have no significant differences at 1% probability level, statistically.

References

منابع مورد استفاده

- Demirevska, K., L. Simova-Stoilova, V. Vassileva, I. Vaseva, B. Grigorova, and U. Feller. 2008. Drought-induced leaf Protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Genetic Application Plant Physiology*. 34: 79-102.
- Devienne, D., A.S. Leonardi, C. Damerval, and M. Zivy. 1999. Genetics of proteome variation for QTL characterization: Application to drought- stress responses in maize. *Journal of Experimental Botany*. 50: 303-309.
- Dubey, H., and A. Grover. 2001. Current initiatives in Proteomics research. *The Plant Perspective Current Science*. 80: 262-269.
- Gygi, S.P., B. Rist, and R. Aebersold. 2000. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion Biotechnology*. 396-401.
- Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilization for two- dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 2: 660-663.
- Higuchi- Takeuchi, M., T. Ichikawa, Y. Kodou, K. Matsui, Y. Hasegawa, M. Kawashima, K. Sonoike, M. Mori, H. Hirochika, and M. Matsui. 2011. Functional analysis of two isoforms of leaf-type ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in rice using the heterologous expression system of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 157: 96-108.
- Huck, C.J. 2004. Integrated transcriptome and proteome data, the challenges ahead. *Brief Functional Genomics and Proteomics*. 3: 212-219.
- Hutchings, D., S. Rawsthorne, and M.J. Emes. 2005. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*. 56: 562-577.
- Klug, W.S., and M.R. Cumming. 2000. Concepts of genetics. Sixth edition. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Komatsu, S., H. Konish, S. Shen, and G. Yang. 2003. Rice proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2: 2-10.
- Lin, C.C., and C.H. Kao. 2000. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*. 30: 151-155.
- Liu, Y., K. Lv, D. Hou, W. Huang, Q. Hua, X. Liu, Z. Liu, H. Xu, and H. Xu. 2011. The molecular characterization of wheat CpFBA genes and its expression model in cold acclimation. *The Plant Cell*. 2: 371-410.
- Molloy, M.P. 2000. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized PH gradients. *Analytical Biochemistry*. 280: 1-10.
- Rabello, A.R., C.M. Guimaraes, P.H. Rangel, F.R. da Silva, D. Seixas, E. de Souza, A.C. Brasileiro, C.R. Spehar, M.E. Ferreira, and A. Mehta. 2008. Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryzae sativa* L.). *BMC Genomics*. 9: 485.

- Schwanz, P., and A. Polle. 2001. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany*. 52: 133-143.
- Senior, A.E., and J.G. Wise. 1983. The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. *Journal of Membrane Biology*. 73: 22-33.
- Smirnoff, N., and J.E. Pallanca. 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 24: 472-478.
- Sobhanian, H., R. Razavizadeh, Y. Nnju, A.A. Ehsanpour, F.R. Jazii, N. Motamed, and S. Komatsu. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*. 8: 1-15.
- Toorchi, M., K. Yukawa, M.Z. Nouri, and S. Komatsu. 2009. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related protein in soybean roots. *Peptide*. 30: 2108-2117.
- Urao, T., S. Myata, K. Yamaguchi-shinozaki, K. Shinozaki, and K. Shinozaki. 2000. Possible His to Asp Phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Letters*. 478: 227-232.
- Walker, J.E., M. Saraste, and N.J. Gay. 1984. The UNC operon nucleotide sequence regulation and structure of ATP synthase. *Biochemical et Biophysical Acta*. 768: 164-200.
- Zhang, X., S. Liu, and T. Takano. 2008. Over expression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*AtMtATP6*) confers tolerance to several abiotic stresses in *saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters*. 30: 1289-1294.
- Zhang, Y., D. XI, J. Wang, D. Zhu, and X. Guo. 2009. Functional analysis reveals effects of tobacco alternative oxidase gene (*NtAOX1a*) on regulation of defense responses against abiotic and biotic stresses. *Bioscience Reports*. 29: 375.
- Zivy, M., and D. Devienne. 2000. Proteomics: A link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*. 44: 575-580.

The Response of Rice Root to Time Course Water Deficit Stress- Two Dimensional Electrophoresis Approach

Toorchi, M.^{1*}

Received: April 2015, Accepted: 8 August 2015

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food of more than half of the population worldwide. Water deficit stress is one of the harsh limiting factors for successful production of crops. Rice during its growing period comes a cross different environmental hazards like drought stress. Recent advance in molecular physiology are promising for more progress in increasing rice yield by identification of novel candidate proteins for drought tolerance. To investigate the effect of water deficit on rice root protein expression pattern, an experiment was conducted in completely randomize design with four replications. With holding water for 24, 36 and 48 hours along with control constituted the experimental treatments. The experiment was conducted in growth chamber under controlled condition and root samples, after stress imposition, were harvested for two-dimensional electrophoresis (2-DE). Proteome analysis of root tissue by 2-DE indicated that out of 135 protein spots diagnosed by Coomassie blue staining, 14 spots showed significant expression change under water deficit condition, seven of them at 1% and the other seven at 5% probability levels. Differentially changed proteins were taken into account for search in data bank using isoelectric point and molecular weight to identify the most probable responsive proteins. Up- regulation of ferredoxin oxidoreductase at first 24 hour after applying stress indicates the main role of this protein in reducing water deficit stress effects. On the other hand ribosomal proteins, GAP-3 and ATP synthase were down regulated under water deficit stress. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, glucose- 6-phosphate dehydrogenase and chitinase down regulated up to 36 h of stress imposition but, were later up- regulated by prolonging stress up to 48 h. It could be inferred the plant tries to decrease the effect of oxidative stress.

Key words: Proteome, Rice, Two dimensional electrophoresis, Water deficite stress.

1- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

* Corresponding Author: mtoorchi@tabrizu.ac.ir