

مطالعه پاسخ پروتئوم برگ جو در شرایط تنش شوری

فواد فاتحی^{۱*}، عبدالهادی حسین زاده^۲، هوشنگ علیزاده^۳، محبوبه حاجی عباسی^۴ و اکبر شعبانی^۵
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق دکتری، دانشیار، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی
و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۵، کارشناسی ارشد مؤسسه تحقیقات دیم سرارود
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۷ - تاریخ تصویب: ۹۰/۴/۲۹)

چکیده

گیاهان قادرند در پاسخ به تنش‌های محیطی مکانیسم‌های سازگار خود را فعال کنند و با تغییر در بیان ژن‌هایشان به عوامل محیطی واکنش نشان دهند. لذا در همین راستا از تکنیک پروتئومیکس به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در جو لاین ۵۲۷ استفاده گردید. برای بررسی اثر تنش شوری طولانی مدت بر روی الگوی پروتئوم جو، بذور لاین ۵۲۷ (تهیه شده از مؤسسه نهال و بذر) در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران کشت شدند. اعمال تنش بر روی گیاهان در مرحله ۴ برگی، با سطوح صفر (آب معمولی بعنوان شاهد) و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl صورت گرفت. نمونه‌گیری با جدا کردن برگ چهارم گیاهان در ۲۱ روز بعد از اعمال تنش انجام شد. استخراج پروتئین کل بر اساس روش TCA-استون تغییر یافته انجام شد. پروتئین‌های استخراج شده از برگ جو در بعد اول به وسیله ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۴-۷ جداسازی شدند. در بعد دوم ژل‌های اکریل آمید با غظت ۱۲/۵ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها نشان داد که از میان بیش از ۵۰۰ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، تعداد ۱۲۴ لکه دارای تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها بودند. با استفاده از طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF-TOF ۲۱ لکه پروتئینی شناسایی شدند. این پروتئین‌هایی شامل Oxygen-evolving enhancer protein 2، متیونین سولفوکسید ردوکتاز، پروتئین‌های متصل شونده به RNA کلروپلاستی، سیکلوفیلین کلروپلاستی، رایبوسکو، فعال‌کننده رایبوسکو، Nascent polypeptide associated complex، تیوردوکسین، دهیدرواسکوربات ردوکتاز، شبه جرمین، پروفیلین، پروتئین عمومی تنش و پروتئین‌های ریوزومی بودند که در مکانیسم‌های فتوسنتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل هستند.

واژه‌های کلیدی: جو، پروتئومیکس، شوری، الکتروفورز دو بعدی.

مقدمه

زمین‌های کشاورزی آبی از شوری متأثر هستند (Motoaki et al., 2002). نزدیک به ۲۴ میلیون هکتار از اراضی ایران تحت تأثیر شوری است (Aivazi et al., 2005). شوری بالاتر از حد آستانه گیاه علاوه بر تنش

تنش شوری از مهمترین عوامل محدودکننده تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود. تخمین زده شده بیش از ۲۰٪ از کل زمین‌های جهان و نزدیک به نیمی از

(Gucciardo et al., 2006)، مطالعه الگوی پروتئین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای بررسی بیوشیمیایی محسوب می‌شود. از مطالعات پروتئومیکس برای بررسی پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی استفاده شده است. تغییرات الگوی پروتئوم در آپوپلاست برگ گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) تحت تنش شوری توسط Deni et al. (2005) بررسی شد. بر روی ژل‌های دو بعدی ۱۵۰ پروتئین به صورت تکرارپذیر ظاهر شد. تعداد ۲۰ لکه پروتئین دارای تغییر قابل ملاحظه، تشخیص داده شد. این نقاط توسط دستگاه طیف‌سنج جرمی مورد شناسایی قرار گرفتند. دو لکه پروتئین که جزء کتینازها بودند و یک لکه پروتئینی HP IQ-DNH* دچار افزایش بیان شده بودند. دو پروتئین دخیل در انتقال لیپیدها به صورت در شیشه (*de novo*) سنتز شده بودند.

Jiang et al. (2007) تغییرات الگوی پروتئوم ریشه آرابیدوپسیس در شرایط هیدروپونیک در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک را مورد بررسی قرار دادند. ۱۸ روز پس از سبز شدن پذیر تنش شوری اعمال شد و در زمان‌های ۶ و ۴۸ ساعت نمونه‌گیری انجام گرفت. بیش از ۱۰۰۰ لکه پروتئینی به صورت تکرارپذیر ظاهر شدند که تعداد ۱۱۲ لکه افزایش بیان و ۱۰۳ نقطه پروتئینی کاهش بیان را نشان دادند. از طریق LC/MS/MS، ۸۶ تا از این پروتئین‌ها شناسایی شدند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش و پروتئین‌های دخیل در چرخه‌های حذف ROS، انتقال پیام در سلول، ترجمه، بیوسنتز دیواره سلول، تجزیه پروتئین‌ها، متابولیسم انرژی، متابولیسم آمینو اسیدها و هورمون‌ها بودند.

Zorb et al. (2004) به بررسی پروتئوم ساقه و ریشه ذرت (*Zea mays L.*) تحت تنش ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار نمک پرداختند. تعداد ۱۴ پروتئین از مجموع پروتئین‌ها به وسیله MALDI-TOF شناسایی شد. این ۱۴ پروتئین در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند. دسته اول پروتئین‌هایی بودند که در بیوسنتز پروتئین‌ها و تغییرات پروتئینی به وسیله کینازها نقش داشتند. گروه دوم،

اکسیداتیو منجر به سمیت یونی، کمبود آب و مواد غذایی، اختلال در رشد گیاه و نهایتاً نابودی گیاه می‌شود (Motoaki et al., 2002). جو یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است و در بین غلات دانه ریز غالباً به گرما، قلیاء و نمک مقاومت نشان می‌دهد. اهمیت جو به واسطه رشد آن در نواحی کم حاصلخیز می‌باشد که معمولاً بوسیله خشکی، دمای پایین و شوری محدود شده است (Baum et al., 2004). گیاهان قادرند در پاسخ به تنش‌های محیطی مکانیسم‌های سازگاری خود را فعال کنند و با تغییر بیان ژن‌هایشان به عوامل محیطی واکنش نشان دهند. مقاومت به شوری یک صفت پیچیده پلی‌ژنیک است، بنابراین ضروری است که پروتئین‌های مسئول مقاومت مورد شناسایی قرار گرفته و نقش آنها در مکانیزم مقاومت تعیین گردد تا به این طریق استراتژی مؤثر برای اصلاح مقاومت به شوری به کار گرفته شود. یکی از راه‌های بررسی الگوی بیان ژن‌ها اندازه‌گیری میزان رونوشت‌های mRNA کد شده از تک تک ژن‌ها می‌باشد (Kwon et al., 2007). اما این اطلاعات به دست آمده که مانند داده‌های خام می‌باشند، به اندازه‌ای نیست که بتوان به وظیفه و عمل ژن‌ها پی برد. بین فراوانی mRNA و فراوانی پروتئین‌ها در سلول علی‌الخصوص پروتئین‌های که فراوانی آنها کم می‌باشد ارتباط ضعیفی وجود دارد. از سوی دیگر در فاصله بین تبدیل اطلاعات نهفته در یک ژن به یک کنش بیوشیمیایی خاص مسیر نسبتاً طولانی طی می‌شود و وقایع مختلفی رخ می‌دهد که سرانجام شدت عمل ژن، محل ایفای نقش آن و نوع آن را تعیین می‌کند. این وقایع که به تغییرات پس از رونویسی و پس از ترجمه موسوم هستند به شکل پیرایش و تغییرات مختلف در سطح mRNA و پروتئین (مثل فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون) عمل می‌نمایند (Hajheidari et al., 2005). از این رو بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطح پروتئین از اهمیت زیادی برخوردار است

با توجه به اینکه بیان پروتئین‌ها در طول نمو، تحت شرایط محیطی مختلف و در بافت‌های مختلف متغیر می‌باشد، همچنین از آنجا که پروتئین‌ها بهترین توصیف برای عمل تک‌تک ژن‌ها در سطح مولکولی هستند

IPG با شیب PH ۷-۴، پروتئین‌ها در استوک بازجذب^۱ (8 M w/v urea, 2% w/v CHAPS, 20mM DTT, 2% v/v IPG buffers (pH 3-10), 0.002% Bromophenol blue) حل شده و همزمان با عمل بازجذب وارد ژل شدند. عمل باز جذب در طول شب و به طور متوسط ۱۴ تا ۱۶ ساعت به طول انجامید. در این تحقیق از دستگاه مولتی فور II (ساخت شرکت آمرشام بیوساینس) برای انجام بعد اول (IEF) استفاده شد. برای ران کردن ژل نیاز به ۴۲ هزار ولت هورس (42Kvh) است که این میزان ولت هورس در چهار مرحله 150vh تا ولتاژ 300v، 300v تا ولتاژ 500v، 2000vh تا ولتاژ 3500v و 39500vh در ولتاژ 3500v تأمین شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell (ساخت شرکت بیورد) استفاده شد. مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتوکول Bloom et al 1987 انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 (ساخت شرکت بیورد) اسکن و به فرمت تیف ذخیره شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار Melanie 7 استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در ژل‌های تیمارهای مختلف علامت‌گذاری و داده‌هایی که نشان‌دهنده مقدار کمی درصد حجمی (Vol%) لکه‌ها بودند مورد آنالیز آماری تی استیودنت قرار گرفتند. لکه‌هایی که در سطح آماری ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار نشان می‌دادند و تغییر بیان ۱/۵ برابری داشتند به عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

هضم پروتئین‌ها در ژل و آنالیز با طیف‌سنج جرمی

لکه‌هایی که در سطح آماری ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار نشان می‌دادند و تغییر بیان ۱/۵ برابری داشتند به منظور شناسایی بوسیله طیف‌سنج جرمی از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو جدا شدند. لکه‌های پروتئینی جدا شده سه بار با آب خالص شستشو داده شدند، سپس با محلول ۵۰ میلی‌مولار NH_4HCO_3 در ۵۰٪ استونیتریل رنگ زدایی شدند. پس از این مرحله با استفاده از محلول ۱۰ میلی‌مولار DTT در ۵۰٪ استونیتریل احیاء و با محلول ۴۰ میلی‌مولار یدواستامید در ۵۰٪ استونیتریل آلکیله شدند. در نهایت دو بار با

آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات بودند و دسته سوم دربرگیرنده آنزیم‌های دخیل در چرخه نیتروژن. تعداد ۸ پروتئین از مجموع ۱۴ پروتئین یاد شده در تنش ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان داشتند که در چرخه‌های رونویسی و ترجمه نقش ایفا می‌کردند. بر طبق این نتایج، مشخص گردید که ذرت مکانیسم سازگاری خاص برای تنش شوری نداشته و در سطوح پائین و یا بالای تنش شوری دچار آسیب می‌گردد.

با توجه به اینکه اطلاعات موجود در زمینه پاسخ به تنش شوری در گیاه جو محدود می‌باشد، این تحقیق به منظور آنالیز پروتئین‌های دخیل در پاسخ به تنش شوری طولانی مدت در گیاه جو انجام شد.

مواد و روش‌ها

اعمال تنش و نمونه‌گیری

در این تحقیق بذور جو لاین ۵۲۷ (شناسایی شده به عنوان حساس به شوری توسط رسول نیا و همکاران، ۲۰۱۰) به عنوان ماده ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. بذور نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی پرلیت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شدند. بعد از مرحله دو برگی گیاهان با استفاده از محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحله ۴ برگی ادامه یافت. برای اعمال تنش از سطوح صفر (به عنوان شاهد)، و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl استفاده شد. تنش شوری به مدت ۲۱ روز اعمال و سپس نمونه‌گیری انجام گرفت. نمونه‌های برگی در نیتروژن مایع منجمد و تا هنگام استخراج پروتئین در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج پروتئین و الکتروفورز دو بعدی

استخراج پروتئین از بافت برگی (برگ چهارم) بر اساس روش Damerval et al. (1986) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌ها از روش Bradford (1976) استفاده شد. در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل‌های

حجمی هر لکه به عنوان یک مقدار نرمالیزه شده استفاده شد. داده‌های حاصل سپس در نرم‌افزار اکسل آنالیز شدند. از آزمون آماری تی‌استیودنت برای شناسایی تغییرات بیان بین لکه‌ها در تیمارهای شاهد و تنش دیده در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد. از بین لکه‌های شناسایی شده تعداد ۱۲۴ لکه پروتئینی در مقایسه تیمار شوری با شاهد در سطح آماری ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری را نشان دادند و تغییر بیان ۱/۵ برابری داشتند. از بین این تعداد ۵۵ لکه پروتئینی افزایش بیان و تعداد ۶۹ کاهش بیان نشان دادند.

شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری

از بین لکه‌های پروتئینی که تغییر ۱/۵ برابری در بیان داشتند تعداد ۲۱ لکه با استفاده از طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF-TOF شناسایی شدند. پروتئین‌های شناسایی شده در جدول ۱ آورده شده‌اند. در بین تمام پروتئین‌های شناسایی شده همبستگی خوبی بین مقادیر pI و MW تئوریک و آزمایشی دیده می‌شود. برای غالب پروتئین‌های شناسایی شده پروتئین‌های اول و با بالاترین میزان اسکور در نظر گرفته شدند.

محلول ۱۰۰٪ استونیتریل خشک شدند. هضم آنزیمی در طول شب و در دمای ۳۷ درجه با استفاده از آنزیم تریپسین انجام گرفت. سپس پپتیدها با استفاده از محلول ۱٪/۰/۱ TFA در ۵۰٪ استونیتریل استخراج شدند. آنالیز طیف‌سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF در دانشگاه یورک انگلستان انجام شد. داده‌های حاصل از طیف‌سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBI در آنالیز قرار گرفتند.

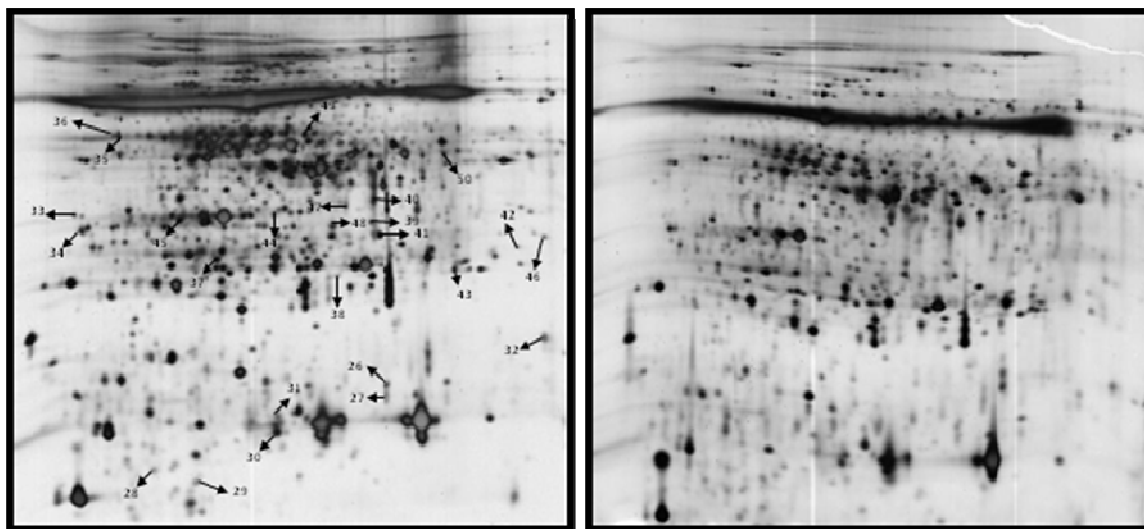
نتایج و بحث

بررسی پروتئوم برگ

به منظور بررسی اثر تنش شوری بر روی الگوی پروتئوم برگ جو لاین ۵۲۷ گیاهچه‌های ۴ برگی تحت تنش شوری قرار گرفتند. پروتئین‌ها از برگ‌های چهارم گیاهچه‌های تحت تنش شوری و نرمال استخراج شدند. پس از آنالیز ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره تعداد ۳۷۷ لکه پروتئینی به طور تکرارپذیر در ژل‌ها شناسایی و مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. به منظور بررسی تغییرات کمی بیان پروتئین‌ها از مقدار درصد

جدول ۱- پروتئین‌های شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF-TOF در لاین ۵۲۷ جو

Spot	The pI/MW	Exp pI/MW	MS	% Coverage	Identity	gi Number
26	5.8/13.3	5.9/15	121	30	USP family protein [<i>Triticum aestivum</i>]	gi 60100214
27	5.8/13.3	5.9/15	121	30	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	gi 132107
28	5.0/14.4	4.8/10	167	24	Profilin-1	gi 1709779
29	5.1/13.3	5.0/9	83	16	Chain A, Crystal Structure Of Barley Thioredoxin H Isoform 2	gi 186972808
30	8.9/17.5	5.4/13	366	53	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi 4038699
31	9.1/19.7	5.4/14	437	60	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi 11990893
32	8.5/16.5	6.8/18	362	40	chloroplast-localized cyclophilin [<i>Triticum aestivum</i>]	gi 83700338
33	4.36/21.6	4.4/33	134	28	predicted protein [<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>]	gi 168067984
34	4.6/31.9	4.4/29	475	31	cp31AHv protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>]	gi 3550467
35	5.0/23.2	4.6/46	244	33	30S ribosomal protein S1 [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	gi 149391139
36	5.0/23.3	4.6/47	224	26	30S ribosomal protein S1 [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	gi 149391139
37	7.7/29.8	5.1/27	80	22	Os06g0232600 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	gi 115467258
38	6.2/23.1	5.7/25	85	15	putative peptide methionine sulfoxide reductase [<i>Oryza sativa</i>]	gi 12597894
39	5.8/13.3	5.9/30	264	31	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	gi 132107
40	8.8/19.7	5.9/34	378	42	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi 11990897
41	8.9/19.7	5.9/28	132	40	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain,	gi 3914588
42	6.0/24.8	6.5/26	243	37	oxalate oxidase-like protein or germin-like protein [<i>Hordeum</i>]	gi 1070358
43	8.8/27.4	6.3/25	259	29	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplas	gi 131394
47	8.8/19.7	5.7/33	397	41	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi 11990897
48	8.8/19.7	5.7/31	377	41	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi 11990897
49	8.6/47.3	5.6/45	202	17	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform 1 [Ho]	gi 167096
50	8.9/19.7	6.3/39	142	26	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain,	gi 3914588



شکل ۱- الگوی پروتئوم برگ لاین ۵۲۷ جو تحت شرایط نرمال (راست) و تنش (چپ)

برگ‌های *Suaeda aegyptiaca* تحت تنش شوری مشاهده کردند. افزایش بیان پروفیلین می‌تواند عامل تغییرات سلولی برای نگهداری میزان نمک و کاهش سمیت آن در سلول‌ها باشد.

لکه شماره ۲۹ به عنوان ایزوفرم ساختار کریستالی تیوردوکسین h شناسایی شد و تحت تنش شوری افزایش ۲/۴ برابری را نشان داد. تیوردوکسین‌ها پروتئین‌های کوچکی هستند که در تنظیم کاهش-اکسایش سلولی نقش دارند. این پروتئین‌ها در کلیه موجودات یوکاریوت و پروکاریوت یافت شده و در موجودات فتوسنتز کننده دارای تنوع بالایی می‌باشند (Buchanan et al., 2002). ژن‌های کدکننده تیوردوکسین h در آرآبیدوپسیس در واکنش به پاتوزن و تنش اسمزی بیان شده‌اند (Arné et al., 2000). تیوردوکسین کاهش یافته می‌تواند به عنوان دهنده هیدروژن و یا یک فاکتور تنظیمی برای پروتئین‌های مختلفی مانند آنزیم‌های متابولیکی، پروتئین‌های ردوکس^۳، فاکتورهای رونویسی و MAP کینازها نقش ایفا کند.

در بین پروتئین‌ها لکه شماره ۳۷ به عنوان پروتئین پیش بینی شده شناسایی شد. این پروتئین با ۸۳ درصد همسانی توالی به دهیدروواسکوربات ردوکتاز شباهت دارد

در بین لکه‌های شناسایی شده، لکه شماره ۲۶ به عنوان پروتئین عمومی تنش^۱ شناخته شد و افزایش ۵/۲ برابری را در شرایط تنش نشان داد. پروتئین عمومی تنش یک پروتئین سیتوپلاسمی کوچک می‌باشد که در هنگام رویارویی سلول با تنش بیان آن افزایش می‌یابد. پروتئین عمومی تنش میزان زنده‌مانی سلول را در شرایط تنش افزایش می‌دهد (Nystrom & Neidhardt, 1992, 1993, 1994). همولوگ‌های آن به وفور در گیاهان یافت شده و بوسیله خانواده‌های ژنی کد می‌شوند، اما این پروتئین‌ها در گونه‌های جانوری وجود ندارند (Salekdeh et al., 2002).

یکی دیگر از پروتئین‌هایی که بیانش تحت شرایط تنش افزایش یافته بود پروفیلین^۲ (لکه شماره ۲۸) بود که افزایش ۳/۸ برابری را نشان داد. این پروتئین در تغییر و تبدیل اکتین در ساختار سیتوپلاسمی نقش دارد. پروفیلین به مونومر اکتین متصل شده و پلیمریزه شدن و دپلیمریزه شدن فیلامنت‌های اکتین را موجب می‌شود. پلیمریزه شدن فیلامنت‌های اکتین تغییرات اسکلت سیتوپلاسمی را موجب می‌شود و دپلیمریزه شدن آنها سلول‌های گیاهی را برای پاسخ به سیگنال‌های داخلی و خارجی القا می‌کند (Chen et al., 2007). Askari et al. (2006) افزایش بیان پروفیلین را در

1. Universal stress proteins
2. Profilin

3. Redox proteins

نشان داد. سیکلوفیلین‌ها پروتئین‌هایی هستند که در کلیه اجزاء سلولی وجود دارند و در فرایندهای متعددی از قبیل نمو و انتقال پروتئین نقش دارد. آنها گروه بزرگی از پروتئین‌های القا شده تحت شرایط تنش می‌باشند. به دلیل خصوصیات آنزیمی، فراوانی بالا، استقرار سلولی و نقش آنها در تا شدن پروتئین به گروهی از پروتئین‌ها تحت عنوان چاپرون‌ها تعلق دارند. Chen et al. (2007) نشان دادند که بیان ژن *ThCYP1* (ژن سیکلوفیلین پاسخ‌دهنده به تنش از *Thellungiella* (*halophila*) مقاومت به شوری را در سلول‌های حاصل از امتزاج مخمر و تنباکو القا می‌کند. اگرچه سیکلوفیلین‌های گیاهی در فرایندهای متعددی نقش دارند اما اساس مولکولی واکنش آنها ناشناخته است.

لکه شماره ۳۳ به عنوان پروتئین پیش بینی شده شناسایی شد. این پروتئین با ۷۳ درصد همسانی توالی به nascent polypeptide associated complex alpha (*Solanum chacoense*) شباهت دارد و بیان آن به میزان ۲ برابر تحت تنش افزایش داشت. NAC یک هتروداپمیریک پروتئین متشکل از زیر واحدهای آلفا و بتا است. این پروتئین اولین پروتئین سیتوزولی است که به پلی‌پپتید در حال سنتز بر روی ریبوزوم متصل می‌شود. Yan et al. (2005) کاهش بیان این پروتئین را تحت تنش شوری در ریشه برنج گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در انتقال پروتئین‌ها و در ترجمه نقش داشته باشد. این پروتئین مانع از انتقال اشتباه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی به شبکه آندوپلاسمی می‌شود. افزایش دو برابری این پروتئین بیانگر عملکرد صحیح فرایندهایی مانند رونویسی ژن، ترجمه و دسته‌بندی پروتئین‌ها می‌باشد که با نتایج Rospert et al. (2002) مطابقت و با نتایج Yan et al. (2005) مغایرت دارد.

پروتئین‌های متصل شونده به RNA کلروپلاستی (لکه شماره ۳۴) یکی دیگر از پروتئین‌هایی بود که افزایش بیان را نشان داد. پروتئین‌های متصل شونده به RNA، خانواده‌ای از پروتئین‌های دارای موتیف شناسایی RNA می‌باشند که در سنتز mRNA، پردازش hnRNA و کنترل پس از ترجمه ژن‌های کلروپلاستی نقش دارند. پروتئین متصل شونده به RNA کلروپلاستی cp29 در آرابیدوپسیس در اثر تنش سرما (Amme et al., 2006)

و بیان آن به میزان ۱۲/۲ برابر تحت تنش افزایش داشته است. تحت شرایط استرس که تولید ROS تحریک می‌شود، پروسه آنتی‌اکسیداسیون فعال است و اسکوربات را به دهیدرواسکوربات اکسید می‌کند. دهیدرواسکوربات ردوکتاز کاهش دوباره دهیدرواسکوربات به اسکوربات را بوسیله گلوکاتایون کاتالیز می‌کند. تجزیه سریع دهیدرواسکوربات به اسکوربات بوسیله دهیدرواسکوربات ردوکتاز برای حفظ مقدار کلی اسکوربات دارای اهمیت می‌باشد (Salekdeh et al., 2002). Ahmad et al. (2008) مشاهده کردند که میزان دهیدرواسکوربات ردوکتاز در دو واریته نخود تحت تنش شوری افزایش یافته است. افزایش بیان دهیدرواسکوربات ردوکتاز در لاین ۵۲۷ بیانگر فعال شدن چرخه گلوکاتایون-اسکوربات^۱ برای حذف H₂O₂ می‌باشد.

در بین پروتئین‌های شناسایی شده دو پروتئین جزء پروتئین‌های ریبوزومی بودند (لکه‌های شماره ۳۵، ۳۶) که هر دو افزایش بیان را داشتند. سنتز پروتئین در سلول‌های گیاهی نقش فیزیولوژیکی مهمی در پاسخ گیاه به شرایط نامساعد محیطی دارد. بیان پروتئین‌های ریبوزومی در شرایط تحریک با هورمون گیاهی اکسین و تنش سرمایی دیده شده است (Yuri et al., 1999). افزایش در میزان بیان پروتئین‌های ریبوزومی به علت افزایش در تعداد و میزان ریبوزوم‌های سلولی برای مقابله با شوری می‌باشد. پروتئین ریبوزومی P1 یکی از سه پروتئین فسفوریله شده (P0، P1 و P2) زیر واحد بزرگ ریبوزومی S ۶۰ در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد. پروتئین ریبوزومی P1 و P2 با فاکتورهای طویل شدن^۲ ۱ و ۲ ترکیب شده و اجزای مهم کمپلکس ترجمه در ریبوزوم‌های یوکاریوتی می‌باشند. پروتئین‌های P0، P1 و P2 پروتئین‌های اسیدی بوده که دارای باقیمانده فسفوریله شده می‌باشند و فسفوریله شدن این پروتئین‌ها مکانیسم مهمی در تنظیم سنتز پروتئین می‌باشد (Murota et al., 1994).

لکه شماره ۳۲ به عنوان سیکلوفیلین کلروپلاستی شناسایی شد و افزایش ۲ برابری را در شرایط تنش

1. Glutathione-ascorbate cycle
2. Elongation factors EF1 and EF2

داده است. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند. برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبه اگسالات اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نشان می‌دهند. تولید H_2O_2 در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسموتازی حاکی از نقش این دسته از پروتئین‌ها در استحکام دیواره سلولی و مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های غیر زیستی است (Kawasaki et al., 2001; Deni et al., 2004) افزایش بیان این پروتئین را در آپوپلاست تنباکو تحت تنش شوری گزارش کردند. (Kehr et al., 2005) حضور این پروتئین را در شیره آوند آبکش کلزا گزارش کردند. برخی از پروتئین‌های شبه جرمین دارای فعالیت مشابه سوپراکسید دیسموتاز (SOD) می‌باشند. افزایش بیان پروتئین شبه جرمین را می‌توان عاملی برای تولید پروکسید هیدروژن (H_2O_2) (با توجه به فعالیت شبه اگسالات اکسیدازی یا سوپراکسید دیسموتازی) دانست که می‌تواند به عنوان مولکول سیگنالیینگ نقش ایفا کند. یکی از پروتئین‌هایی که بیان آن تحت تنش طولانی مدت شوری کاهش نشان داد Oxygen-evolving enhancer protein 2 (لکه ۴۳) بود. در تحقیق مشابهی که توسط Abbasi & Komatsu (2004) انجام گرفت مشخص شد بیان OEE2 در ساعات اولیه (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش) تنش شوری در برگ برنج افزایش می‌یابد اما پس از گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد. پروتئین‌های OEE شامل سه زیرواحد (OEE1 (33kDa), OEE2 (23kDa) و OEE3 (16 kDa) می‌باشند. این پروتئین‌ها توسط ژنوم هسته کد می‌شوند و در سطح لومینال غشاء کلروپلاست قرار می‌گیرند (Nystrom & Neidhardt, 1994). مشخص شده است که کمپلکس OEE به سهولت تحت تنش شوری از کمپلکس فتوسیستم II در غشاء تیلاکوئید جدا می‌شود. لکه شماره ۴۹ جزء فعال‌کننده رابیسکو^۲ شناسایی شد که تحت تنش شوری افزایش ۵ برابری را نشان داده است. نقش آنزیم فعال‌کننده رابیسکو حذف ریبولوز ۱۵ بیس فسفات‌هایی (از طریق هیدرولیز ATP در نور)

و نیز تنش طولانی مدت شوری (Fei et al., 2008) افزایش یافته است. افزایش بیان این پروتئین در لاین ۵۲۷ بیانگر حفظ کارایی ترجمه پروتئین‌های کلروپلاستی می‌باشد که با نتایج (Amme et al., 2006) و (Fei et al., 2008) مطابقت دارد.

لکه شماره ۳۸ به عنوان متیونین سولفوکسید ردوکتاز شناسایی شد و بیان آن به میزان ۲/۱ برابر تحت تنش افزایش داشته است. متیونین در پروتئین‌ها یک جزء مهم می‌باشد که بوسیله گونه‌های اکسیژن فعال اکسید شده و تبدیل به متیونین سولفوکسید می‌شود. (Kwon et al., 2007) اهمیت متیونین سولفوکسید ردوکتاز MsrB3 را در سازگاری به سرما در آرآبیدوپسیس نشان دادند. افزایش بیان متیونین سولفوکسید ردوکتاز می‌تواند به سلول در برابر خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو کمک کرده و قادر است رادیکال‌های اکسیژن را که موجب خسارت به DNA می‌شوند، غیرفعال سازد.

در بین پروتئین‌های شناسایی شده ۹ پروتئین جزء زیرواحدهای کوچک رابیسکو بودند (لکه‌های شماره ۲۷، ۳۰، ۳۱، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۷، ۴۸، ۵۰). در ۳ مورد (لکه‌های شماره ۲۷، ۴۱ و ۵۰) کاهش بیان و در سایر لکه‌ها افزایش بیان مشاهده شد. آنزیم رابیسکو یکی از پروتئین‌های چند زیر واحدی است که نقش مهمی در چرخه کالوین دارد. افزایش بیان رابیسکو در برنج تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Robinson & Klossgen, 1994). به نظر می‌رسد که گیاه به واسطه ناپایدار بودن زیر واحدهای رابیسکو بیان آنها را تحت تنش افزایش داده است. البته کاهش موارد یاد شده را می‌توان به حساس بودن لاین ۵۲۷ نسبت داد که بیانگر استفاده از مکانیسم‌های متفاوت در گیاهان حساس برای مقابله با شوری است. همچنین ممکن است که این تناقضها ناشی از خطاهایی همانند رنگ‌آمیزی یا میزان زیاد پروتئین بارگذاری شده باشد.

لکه شماره ۴۲ به عنوان پروتئین شبه جرمین یا پروتئین شبه اگسالات اکسیداز^۱ شناسایی شد. این پروتئین تحت تنش شوری افزایش ۳/۷ برابری را نشان

2. Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase

1. Germin-like protein or oxalate oxidase-like protein

زیستی می‌کند. به منظور درک مکانیسم مقاومت گیاه تحت تنش شوری و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در این مطالعه الگوی پروتئوم برگ گیاهان تنش دیده و شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که بیان دسته خاصی از پروتئین‌ها در پاسخ به تنش تغییر می‌کند. نتایج ما نشان می‌دهند که فرایندهای مختلفی از تنش شوری متأثر می‌شوند. اکثر پروتئین‌های شناسایی شده تحت تنش شوری افزایش بیان نشان می‌دهند، که بیانگر تلاش گیاه برای حفظ حالت تعادل فرایندهای زیستی که از تنش متأثر می‌شوند است. ۲۱ پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش شوری شناسایی شد که در طیف وسیعی از فرایندهای زیستی نقش دارند. پاسخ به تنش شوری تعدادی از این پروتئین‌ها از قبل مشخص شده بود. تعدادی نیز پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به شوری جدید بودند. پروتئین‌های بررسی شده در این تحقیق بخش کوچکی از کل پروتئوم گیاه را تشکیل می‌دهند بنابراین شناسایی کل پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

می‌باشد که بطور غیرفعال به محل فعال‌سازی رابیسکو در تاریکی متصل شده و در نتیجه این محل‌ها را برای فعال‌سازی بوسیله CO_2 و Mg_2C آزاد می‌سازد. جو دارای دو ژن فعال‌کننده رابیسکو می‌باشد که یکی پروتئینی با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتن و دیگری پروتئین‌های ۴۲ و ۴۶ کیلودالتن را کد می‌کند (Rundle & Zielinski, 1991). Walia et al. (2007) با مطالعه الگوی بیان ژن‌ها در جو تحت تنش شوری افزایش بیان فعال‌کننده رابیسکو را مشاهده کردند. افزایش بیان این آنزیم را می‌توان ناشی از این دانست که در گیاهان تحت تنش شوری روزنه‌ها بسته شده و میزان CO_2 داخل سلول و متعاقباً میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد، در این شرایط فعال‌کننده رابیسکو میزان رابیسکو فعال شده برای تثبیت CO_2 و نهایتاً راندمان فتوسنتز را در شرایط تنش شوری افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

مطالعات الگوی پروتئوم با استفاده از ژل الکتروفورز دویبعدی به سرعت در حال افزایش است. نتایج این مطالعات کمک قابل توجهی به شناخت واکنش‌های

REFERENCES

1. Abbasi, F. M. & Komatsu, S. (2004). A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*, 4(7), 2072-81.
2. Ahmad, P., John, R., Sarwat, M. & Umar, S. (2008). Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, 2(4), 353-366.
3. Aivazi, A., Abdollahi, S., Hoseinin Salekdeh, G., Majidi, A., Mohammadi, S. A. & Pirayeshfar, B. (2005). Effect of salinity and drought stress on the quality of bread wheat. *Iranian Journal of Crop Science*, 7(3), 252-267. (In Farsi).
4. Amme, S., Matros, A., Schlesier, B. & Mock, H. P. (2006). Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *J Exp Bot*, 57(7), 1537-1546
5. Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 267, 6102-6109.
6. Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. & Hosseini Salekdeh, G. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics*, 6, 2542-2554.
7. Baum, M., Grando, S. & Ceccarelli, S. (2004). *Localiz ation of quantitative trait loci for dryland characters in barley by linkage mapping*. Challen ges and Strategies for Dryland Agriculture, vol. 32. CSSA Special Public ation, pp. 191-202.
8. Bloom, H., Beier, H. & Gross, H. S. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
9. Bradford, M. M. (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.
10. Buchanan, B. B., Schürmann, P., Wolosiuk, R. A. & Jacquot, J. P. (2002). The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth Res*, 73, 215-222
11. Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K. & Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268(22), 16815-16821.
12. Chen, A. P., Wang, G. L., Qu, Z. L., Lu, C. X., Liu, N. & Wang, F. (2007). Ectopic expression of ThCYP1, a stress-responsive cyclophilin gene from *Theilungiella halophila*, confers salt tolerance in

- fission yeast and tobacco cells. *Plant Cell Rep*, 26, 237-245.
13. 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.
 14. Das, S., Bose, A. & Ghosh, B. (1995). Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*. *Phytochemistry*, 39, 283-285.
 15. Fei, G., YiJun, Z., LingYun, H., DaCheng, H. & GenFa, Z. (2008). Proteomic analysis of long-term salinity stress-responsive proteins in *Thellungiella halophila* leaves. *Chinese Science Bulletin*, 53(22), 3530-3537.
 16. Gharehchahi, J. (2007). *Proteomic analysis of related wild wheat (Triticum urartu L.) under cold stresses*. M. Sc. thesis, University of Tehran.
 17. Gucciardo, S., Wisniewski, J., Brewin, N. & Bornemann, S. (2006). A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany*, 1-11
 18. Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S. & Salekdeh, G. H. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), 950-60.
 19. Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S. & Deyholos, M. K. (2007) Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *J Exp Bot*, 58, 3591-3607.
 20. Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M. & Wang, H. (2001). Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *Plant Cell*, 13, 889-905.
 21. Kehr, J., Buhtz, A. & Givalisco, P. (2005). Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 5, 11.
 22. Kwon, S. J., Kwon, S., Seok Bae, M. S., Cho, E. J. & Park, O. K. (2007). Role of the methionine sulfoxide reductase msrb3 in cold acclimation in arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 48(12), 1713-1723.
 23. Lane, B. G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J*, 8, 294-301.
 24. Motoaki Seki, M., Narusaka, M., Junko Ishida, J. & et al. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 31(3), 279-292.
 25. Murota, K. I., Ohshita, Y., Watanabe, A., Aso, S., Sato, F. & Yamada, Y. (1994). Changes related to salt tolerance in thylakoid membranes of photoautotrophically cultured green tobacco cells. *Plant Cell Physiol*, 35, 107-113.
 26. Nystrom, T. & Neidhardt, F. C. (1992). Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 6, 3187-98.
 27. Nystrom, T. & Neidhardt, F. C. (1993). Isolation and properties of a mutant of Escherichia coli with an insertional inactivation of the uspA gene, which encodes a universal stress protein. *J Bacteriol*, 175, 3949-56.
 28. Nystrom, T. & Neidhardt, F. C. (1994). Expression and role of the universal stress protein, UspA, of Escherichia coli during growth arrest. *Mol Microbiol*, 11, 537-44.
 29. Rasoulnia, A., Peyghambari, S. A., Rahnema, A., Bihamta, M. R. & Alizadeh, H. (2010) Proteomic response of barley leaves to salinity. *Mol Biol Rep*, doi: 10.1007/s11033-010-0651-8
 30. Rich, B. E. & Steitz, J. A. (1987). Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 7(11), 4065-74.
 31. Robert, A. I. (1992). *Official methods of analysis*. (15th ed.). University of Georgia. Pp: 790-792
 32. Robinson, C. & Klosgen, R. B. (1994). Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane: a multitude of mechanisms. *Plant Mol Biol*, 26, 15-24.
 33. Rospert, S., Dubaquié, Y. & Gautschia, M. (2002). Nascent-polypeptide-associated complex. CMLS, Cell. *Mol Life Sci*, 59 1632-1639.
 34. Rundle, S. J. & Zielinski, R. E. (1991). Alterations in barley ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene expression during development and in response to illumination. *J BiolChem*, 266, 14802-14807
 35. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B. & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2(9), 1131-45.
 36. Sauter, M., Rzewuski, G., Marwedel, T. & et al. (2002). The novel ethyleneregulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J Exp Bot*, 53 379, 2325-31.
 37. Shunping, Y., Tang, Z., Su, W. & Sun, W. (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5, 235-244.
 38. Urano, J., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N. & et al. (2000). Molecular

- cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett*, 466, 107-11.
39. Valeria, D., William, J. S., Duranti, M. & Croy, R. D. (2005). Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, 5, 737-745.
 40. Wagner, V., Moreau, Y. A. & St-Arnaud, R. (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Molecular and Cellular Biology*, 1303-1311.
 41. Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X. & Ismail, A. M. (2007). Close T J. Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant Cell and Environment*, 30, 410-421.
 42. Yan, S., Tang, Z., Su, W. & Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5, 235-244.
 43. Yuri Churin, A., Wolfgang, R. & Borner, H. T. (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.
 44. Zorb, C., Schmitt, S., Neeb, A., Karl, S., Linder, M. & Schubert, S. (2004). The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Sci*, 167, 91-100.

Archive of SID