مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز ۱۳۹۰ (۱۱-۱)

بررسی پروتئوم ریشه و برگ برنج تحت تنش شوری

قاسم حسینی سالکده[۱]* و داود نصرآبادی[۲]
۱، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنومیکس
۲، کارشناس‌ارشد پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی
(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۶ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

شوری خاک و آب یکی از عوامل محدودکننده کشت برنج در سراسر دنیا است و این گیاه خصوصاً در مرحله گیاهچه (seedling) حساسیت زیادی نسبت به شوری دارد. پروتئومیکس با دارا بودن توانایی کشف پروتئین و ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش از پتانسیل مطلوبی جهت استفاده در فرآیند به‌نژادی برای تنش‌ها به ویژه تنش شوری برخوردار است. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و الگوی بیان پروتئین‌های گیاه برنج، بذور دو رقم متحمل و حساس آن به ترتیب (*Oryza sativa* cv.IR651 and cv.IR29) در محیط کشت یوشیدا، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار کشت شدند. وزن خشک و تر و نسبت K^+/Na^+ در برگ سوم و ریشه گیاهان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، کاهش وزن کل ماده خشک گیاهچه‌ها در رقم حساس (IR29) نسبت به رقم متحمل (IR651) اثر معنی‌دار داشت. همچنین نسبت K^+/Na^+ در رقم IR651 بیش از دو برابر این نسبت در رقم IR29 بود. در این بررسی ۳۴۵ نقطه پروتئینی تکرارپذیر در برگ و ۴۶۸ نقطه در ریشه با استفاده از نرم‌افزار Melanie3 شناسایی شد. از این آن‌ها ۱۰۷پروتئین در ریشه و ۸۶ پروتئین در برگ هر دو ژنوتیپ پاسخ معنی‌داری به تنش از خود نشان دادند. توالی‌یابی نشان داد که مهم‌ترین پروتئین‌های شناسایی‌شده عبارتند از فریتین، آسکوربات‌پراکسیداز و روبیسکو اکتیواز در برگ و پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز در ریشه. پروتئین‌های مذکور همگی آنزیم بوده و در سازوکارهای سم‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)، هموستازی آهن (فریتین) و یا فعال‌سازی دیگر آنزیم‌ها (روبیسکو اکتیواز) نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش شوری، پروتئومیکس، الکتروفورز دو بعدی، تنش اکسیداتیو

* نویسنده مسئول: قاسم حسینی‌سالکده
E-mail: hsalekdeh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

برنج منبع اولیه غذایی بیش از نیمی از مردم جهان است به طوری‌که در آسیا ۲۰۰ میلیون نفر ۶۰ تا ۷۰ درصد کالری مورد نیاز خود را از برنج و فرآورده‌های آن به دست می‌آورند (FAO, 2004). نقش مهم برنج در تغذیه انسان‌ها و پتانسیل بالای آن برای افزایش عملکرد، می‌تواند سهم عمده‌ای در کاهش نگرانی‌های موجود و تضمین امنیت غذایی جهان در آینده داشته باشد. برنج متعلق به خانواده گرامینه و جنس *Oryza* است. از ۲۳ گونه جنس *Oryza* امروزه دو گونه *O. sativa* که منشأ آن را مناطق حاره‌ای و مرطوب آسیا می‌دانند و *O. gluberrima* که متعلق به غرب آفریقا است، مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (FAO 2004). برنج گیاهی تک‌لپه، دیپلوئید با ۲۴ عدد کروموزوم است (۲n =۲۴) که در مقایسه با دیگر غلات ژنوم کوچکتر (۴۳۰ Mb) و ژن‌های کمتری (۳۰۰۰۰ ژن) دارد.

شوری خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل نامساعد و تنش‌زای غیرزنده اثر نامطلوب بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارد و یکی از عوامل محدودکننده کشت برنج در سراسر دنیا است. شوری به دلایل مختلفی مانند استفاده از آب نامناسب برای آبیاری، زهکشی نامناسب زمین‌های مرطوب، واردشدن آب دریا به زمین‌های کنار دریا و در نواحی خشک به دلیل بالابودن میزان تبخیر نسبت به بارندگی، افزایش می‌یابد. در شرایط تنش شوری مسمومیت یونی (در اثر وجود یون‌های Na^+، Cl^- و SO_4^-)، استرس اسمزی و سوءتغذیه (در اثر کم‌شدن جذب فسفر، پتاسیم، نیترات و کلسیم) رشد گیاه را محدود نموده و باعث برهم‌خوردن تعادل متابولیک سلول و ایجاد تنش اکسیداتیو خواهد شد (Zhu JK, 2002).

استفاده بهینه از منابع آب و خاک در قالب طرح‌های به‌زراعی و بهبود صفت تحمل به شوری در قالب طرح‌های به‌نژادی، دو راهکار اساسی جهت افزایش تولید در زمین‌های شور می‌باشد. صفت تحمل به شوری در گیاهان پدیده‌ی پیچیده‌ای است که از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی قابل بحث و بررسی است.

پروتئومیکس ابزار قدرتمندی در شناسایی و بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از این راهکار به منظور شناخت ماهیت تنش‌های زنده و غیرزنده و کشف سازوکارهای دفاعی گیاهان به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاحی رشد چشم‌گیری یافته است. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه اثرات تنش شوری بر الگوی پروتئینی برگ و ریشه دو رقم متحمل و حساس برنج و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری با استفاده از راهکار پروتئومیکس است. استفاده از این اطلاعات در کنار داده‌های حاصل از سایر تکنیک‌های مولکولی می‌تواند بستر مناسبی جهت بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه برنج و دیگر گیاهان مشابه است.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی مواد گیاهی

بذور دو رقم متحمل (IR651) و حساس برنج (IR29) از مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI)[1] تهیه و به منظور جوانه‌زنی، بذور به مدت سه روز در دمای ۳۰° C روی کاغذ صافی مرطوب، درون پتری‌دیش در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بذور جوانه‌زده در تشت‌های حاوی محیط کشت یوشیدا (Yoshida *et al.* 1946) به روش هایدروپونیک در گلخانه در دمای ۳۰° C در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شدند. محیط کشت هر هفته تعویض وpH محیط با استفاده از

1. International Rice Research Institute

Archive of SID

www.SID.ir

KOH و HCl بین ۵ تا ۵/۵ تنظیم شد. ۲۵ روز پس از کشت، تنش شوری NaCl، ۱۰۰ mM اعمال گردید. نمونه‌برداری ۱۰ روز پس از اعمال تنش انجام شد. نمونه‌های مربوط به بررسی فیزیولوژیکی پس از اندازه‌گیری وزن‌تر بلافاصله به آون ۷۰ °C منتقل شدند و نمونه‌های مربوط به آزمایشات پروتئومیکس با استفاده از ازت مایع فریز شده و در دمای ۸۰ °C- نگهداری شدند.

استخراج سدیم و پتاسیم

برگ سوم و کل ریشه گیاهچه‌های برنج به مدت یک هفته در دمای ۷۰ °C در آون خشک شدند. برای هضم بافت‌های گیاهی به ۱۰۰mg از نمونه پودرشده، ۲۵ml محلول حاوی اسید استیک ۱۰٪ و اسید نیتریک ۰/۱٪ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت با دور ۱۸۰rpm در دمای محیط شیک شدند. پس از صاف‌نمودن محلول با کاغذ صافی، عصاره‌ی بدست آمده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد. مقدار سدیم و پتاسیم نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از برگ بر اساس روش TCA/Aceton با اندکی تغییر انجام شد (Damerval *et al*. 1986). با استفاده از نیتروژن مایع یک گرم بافت گیاهی (برگ و ریشه) را به صورت پودر یکنواخت درآورده و در درون لوله‌های مخصوص سانتریفوژ ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول TCA/Aceton ۱۰٪w/v به هر نمونه اضافه (دمای محلول باید ۲۰- درجه سانتی‌گراد باشد) و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد. از این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۳۵۰۰۰g سانتریفوژ، مایع‌رویی حذف و رسوب حاوی پروتئین در محلول ۰/۰۷٪ w/v DTT/Aceton (محلول شستشوی نمونه) به حالت سوسپانسیون درآمده و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. آنگاه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. به منظور برطرف‌نمودن آلودگی‌های غیرپروتئینی موجود در رسوب حاصل این مرحله ۲ بار تکرار گردید و در نهایت رسوب بدست‌آمده به‌وسیله دستگاه لیوفیلایزر خشک شد (تمامی مراحل روی یخ انجام گردید). به ۲۰ میلی‌گرم از پودر لیوفلایز شده ۲۵۰ مایکرولیتر بافر هضم‌کننده Urea, 2%w/v Chaps, 0.8 %w/v Pharmalyte, pH 3-10, 1% w/v. 9.5 M (DTT) اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. در طول این مدت به تناوب هر ۵ دقیقه تیوب اپندورف حاوی نمونه ورتکس شد، سپس سوسپانسیون حاصله در دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ و محلول رویی که حاوی پروتئین است برداشته شد و رسوب حذف گردید.

غلظت‌سنجی نمونه‌ها با استفاده از آزمون بردفورد انجام شد. برای انجام این آزمون از پودر پروتئینی BSA و محلول بردفورد (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) محلول‌های استاندارد پروتئینی با غلظت مشخص تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary300 در طول موج ۵۹۵nm تعیین غلظت شدند.

الکتروفورز دو بعدی

از ژل‌های نواری IPG[1] تهیه‌شده از شرکت (Amersham Pharmacia Biotech) با مشخصات (pH=۴-۷ و ۱۸ cm) برای الکتروفورز استفاده شد. در محلول آبگیری (8 M Urea, 0.5%Chaps, 20mM DTT, 0.5% v/v IPG buffer) به ترتیب ۱۲۵ میکروگرم و ۱/۵ میلی‌گرم پروتئین برای تهیه ژل‌های آنالیتیک (رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره) و آماده‌سازی (رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو) حل شد طوری که حجم کل محلول به ۳۵۰ مایکرو لیتر رسید. آنگاه در داخل سینی‌های

1. Immobilin pH Gradiant

Archive of SID

www.SID.ir

مخصوص بازجذب[1] ژل‌های نواری به مدت ۲۰ ساعت با این محلول تیمار و برای IEF[2] به دستگاه Multiphor II منتقل شده و الکتروفورز با برنامه (۳۰۰V به مدت ۱ ساعت، ۵۰۰V به مدت ۱ ساعت، ۱۰۰۰V به مدت ۱ ساعت و ۳۵۰۰V به مدت ۱۴ ساعت) در دمای ۲۰°C با برنامه‌ی (۳۰۰V به مدت یک ساعت، ۵۰۰V به مدت یک ساعت، ۱۰۰۰V به مدت یک ساعت و ۳۵۰۰V به مدت ۱۴ ساعت) انجام شد. پس از انجام IEF ژل‌های نواری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول متعادل‌کننده (SDS equilibration buffer) حاوی DTT، 6 Murea, 30% w/v glycerol, 2% w/vSDS, 1%w/v DTT, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8) قرار گرفته، پس از حذف بافر متعادل‌کننده مجدداً ۱۵ دقیقه دیگر در محلول متعادل‌کننده حاوی ایدواستاماید 2.5% w/v شناور شدند. پس از شستشو با بافر تانک در روی ژل‌های SDS-PAGE ۱۲٪ قرار داده شدند و از محلول آگارز ۰/۰۰۵٪ w/v جهت اتصال دو ژل استفاده گردید. سپس با استفاده از تانک الکتروفورز عمودی (PROTEIN II, Bio-Rad)، با جریان ۲۰۰v بعد دوم انجام شد. با پایان یافتن بعد دوم ژل‌ها از روی شیشه جدا شده و حداقل به مدت یک ساعت در سینی‌های مخصوص رنگ‌آمیزی حاوی محلول ثابت‌کننده[3] قرار داده شدند. ژل‌های آنالیتیک با استفاده از روش نیترات نقره و ژل‌های آماده‌سازی با استفاده از روش کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شدند (Blum *et al*. 1987; Smith *et al*. 1995).

اکتساب تصاویر، آنالیز ژل‌ها و شناسایی نقاط با MS

ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از دنسیتومتر GS-700 (Bio-Rad)، با وضوح ۶۰۰dpi اسکن و با فرمت Tiff ذخیره شدند، شناسایی و کمیت سنجی پروتئین‌ها (نقاط) و مقایسه ژل‌های کنترل با ژل‌های تحت تنش به وسیله نرم‌افزار (Gen Melanie3 Bio, Geneva, Switzerland) آنالیز شدند. بر پایه الگوریتم این نرم‌افزار می‌توان حجم نسبی هر نقطه را نسبت به حجم کل نقاط قابل تشخیص توسط نرم‌افزار ارائه کرد که بر این اساس عبارت درصد حجمی[4] به عنوان معیار کمیت پروتئین بر روی ژل در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق نقاط تکرار پذیر در سه تکرار به عنوان نقاط مورد نظر برای آنالیز آماری انتخاب شدند. برای تعیین کمیت مولکولی پروتئین‌ها از مارکرهای پروتئینی استاندارد استفاده می‌شود.

آنالیز آماری نقاط با استفاده از نرم‌افزار Jump4 استفاده شد و نقاط معنی‌دار در سطح ($P\leq$۰/۰۵) در صورتی که مقدار بیان آن‌ها حداقل یک و نیم برابر نسبت به شاهد تغییر داشت از روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو جدا و به کشور سوئد دانشگاه Upsala فرستاده شد.

نتایج و بحث

مقایسه وزن خشک ارقام

وزن خشک در هر دو رقم ۱۰ روز پس از اعمال تنش ۱۰۰mM NaCl به ترتیب ۳۷ و ۲۴ درصد کاهش یافت که این نتایج بیانگر تفاوت شدت اثر تنش بر دو رقم است (شکل ۱) که بر نقش توانمندی (Vigor) بیشتر و ژنتیکی رقم IR651 نسبت به رقم IR29 در محیط شاهد و اهمیت آن در حفظ عملکرد ماده خشک در محیط تنش تأکید می‌کند (شکل ۲).

روند جذب سدیم و پتاسیم

در اثر تنش NaCl، ۱۰۰mM میزان جذب سدیم

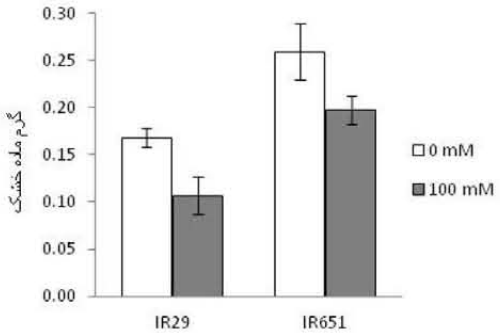
1. Reswelling Trays
2. Isoelectric focusing
3. Fixator Solution
4. Percent volume

Archive of SID

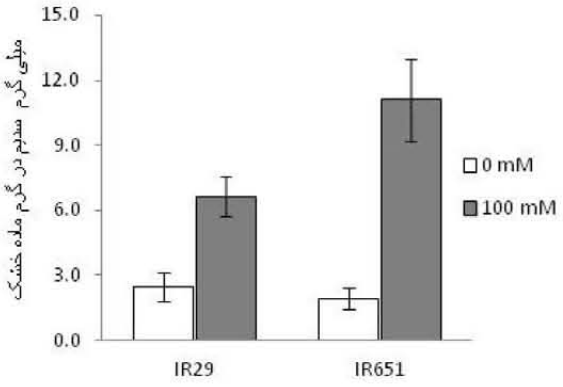
www.SID.ir

در ریشه رقم مقاوم ۵/۷۳ برابر و در رقم حساس ۲/۶۱ برابر، طی تیمار با NaCl، ۱۰۰mM افزایش می‌یابد (شکل ۳)، اما این روند افزایشی در برگ رقم IR29 پیشی می‌گیرد (شکل ۴)، به‌طوری که میزان جذب سدیم در برگ سوم رقم حساس ۹/۲۱ برابر و در رقم مقاوم ۳/۰۹ برابر می شود.

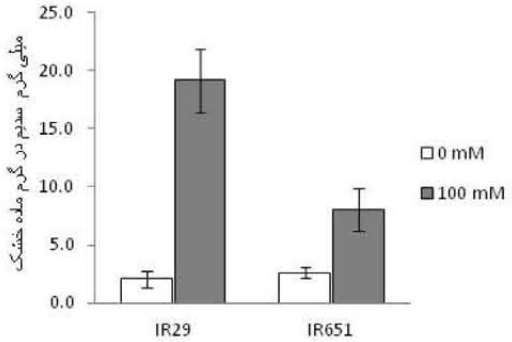
شکل ۱- رقم حساس IR29 (سمت راست) و رقم متحمل IR651 (سمت چپ) تحت شرایط تنش شوری



شکل ۲- اثر تنش شوری بر میانگین عملکرد ماده‌ی خشک ارقام در دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl



شکل ۳- میزان سدیم ریشه در دو رقم حساس (IR29) و مقاوم (IR651) در دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl



شکل ۴- میزان سدیم در برگ دو رقم حساس (IR29) و مقاوم (IR651)، در محیط کنترل و تنش شوری

علت متفاوت‌بودن میزان جذب سدیم در برگ این دو رقم در زمان اعمال تنش شوری می‌تواند ناشی از هموستازی بهتر یون سدیم در ریشه همچنین حذف سدیم در قسمت‌های پایین ساقه و عدم انتقال آن به اندام‌های هوایی در رقم متحمل است. با توجه به حساس‌بودن گیاه برنج به شوری تنوع زیادی در تحمل به این تنش در بین ارقام مختلف این گیاه مشاهده شده است که به احتمال زیاد به خاطر تفاوت نسبت K/Na بوده است. نسبت مولی پتاسیم به سدیم در برگ‌های IR651، ۲/۶۱ برابر این میزان در رقم IR29 است که قسمت اعظم این تفاوت ناشی از وجود مقادیر بیشتر سدیم در برگ‌های IR29 نسبت به IR651 می‌باشد. عدم انتقال سدیم از ریشه به اندام‌های هوایی نقش مهم‌تری در افزایش نسبت K/Na در برگ‌های IR651 نسبت به IR29 دارد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که رقم IR29 از پتانسیل پایین‌تری نسبت به رقم IR651 جهت مدیریت مقادیر سدیم ورودی برخوردار است.

بررسی تغییرات الگوی پروتئوم ریشه و برگ تحت تنش

از تعداد ۴۶۸ نقاط آنالیزشده در ریشه که تکرارپذیر تشخیص داده شد، ۱۰۷ نقطه پروتئینی از نظر آماری در سطح ۵ درصد تغییر معنی‌داری در بیان خود (حداقل در یکی از ارقام) داشتند. ۵۰ نقطه در رقم IR29، ۳۸ نقطه در رقم IR651 و ۱۹ نقطه نیز

www.SID.ir

به طور مشترک در هر دو رقم نسبت به تیمار اعمال شده پاسخ معنی‌دار نشان دادند. در بین پروتئین‌هایی که بیان آن‌ها طی تیمار با NaCl تغییر یافته بود به ترتیب ۲۹ و ۲۱ لکه در IR29 و ۸ و ۳۰ نقطه نیز در IR651 افزایش و کاهش معنی‌داری در شدت بیان خود نشان دادند. از بین نقاط پاسخ‌دهنده به تنش دو نقطه (نقطه ۲۴۵ و نقطه ۳۶۷) که بیشترین تغییر بیان را حداقل در یکی از دو رقم نشان می‌دادند از روی ژل‌های ریشه جدا و با استفاده از روش ESI-Q-TOF MS/MS توالی‌یابی شدند (جدول۱). این ۲ پروتئین با نام‌های پراکسیداز (نقطه‌ی شماره ۲۴۵) و آسکوربات پراکسیداز (نقطه شماره‌ی ۳۶۷) شناسایی شدند (شکل ۵).

در ژل‌های حاصل از برگ (شکل ۶) و با کمک نرم‌افزار ۳۴۵ نقطه تکرارپذیر مشخص شد. پس از آنالیز آماری نقاط ۸۶ نقطه تغییر معنی‌داری در بیان خود حداقل در یکی از ارقام نشان دادند که از این میان ۵۵ نقطه در رقم IR29، ۲۱ نقطه در رقم IR651 و ۱۰ نقطه نیز به‌طور مشترک در هر دو رقم نسبت به تیمار اعمال‌شده پاسخ دادند. در رقم IR29 ۸۶٪ نقاط کاهش بیان و ۱۳٪ افزایش بیان نشان دادند. درحالی‌که در رقم IR651 ۸۴٪ نقاط افزایش بیان و ۱۶٪ نقاط کاهش بیان داشتند. در بین نقاطی که در هر دو ژنوتیپ پاسخ معنی‌دار نشان داده بودند، چهار نقطه روند مخالف و شش نقطه روند یکسانی در هر دو رقم در پاسخ به تنش داشتند. در برگ از بین پنج پروتئین ارسالی با استفاده از توالی‌یابی جزیی سه پروتئین به نام‌های فریتین (نقطه ۱۱۰)، روبیسکو اکتیواز (نقطه ۶۷) و آسکوربات پراکسیداز (نقطه۷۳) شناسایی شدند (جدول ۱).

جایگاه پروتئین‌های شناسایی‌شده در روی ژل دوبعدی در شکل ۶ نشان داده شده است.

پراکسیداز

نقط ۲۴۵ در ریشه تحت عنوان پراکسیداز شناسایی شد که بیان آن در بین دو رقم تفاوت معنی‌داری نشان نداد، اما اثر تیمار در هر دو رقم در سطح یک درصد معنی‌دار شد (شکل ۵). پراکسیدازها آنزیم‌های حاوی یون آهن هستند که پراکسیدهیدروژن را به عنوان پذیرنده‌ی الکترون جهت تسریع تعدادی از واکنش های اکسیداتیو بکار می‌گیرند. همچنین در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن، در بیوسنتز دیواره‌سلولی گیاهان با تسریع آخرین مرحله از سنتز لیگنین و سوبرین، نقش ایفا می‌کنند (Quiroga *et al*. 2000). شوری با تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب القاء فعالیت پراکسیداز می‌شود (Higa *et al*. 2001).

فریتین

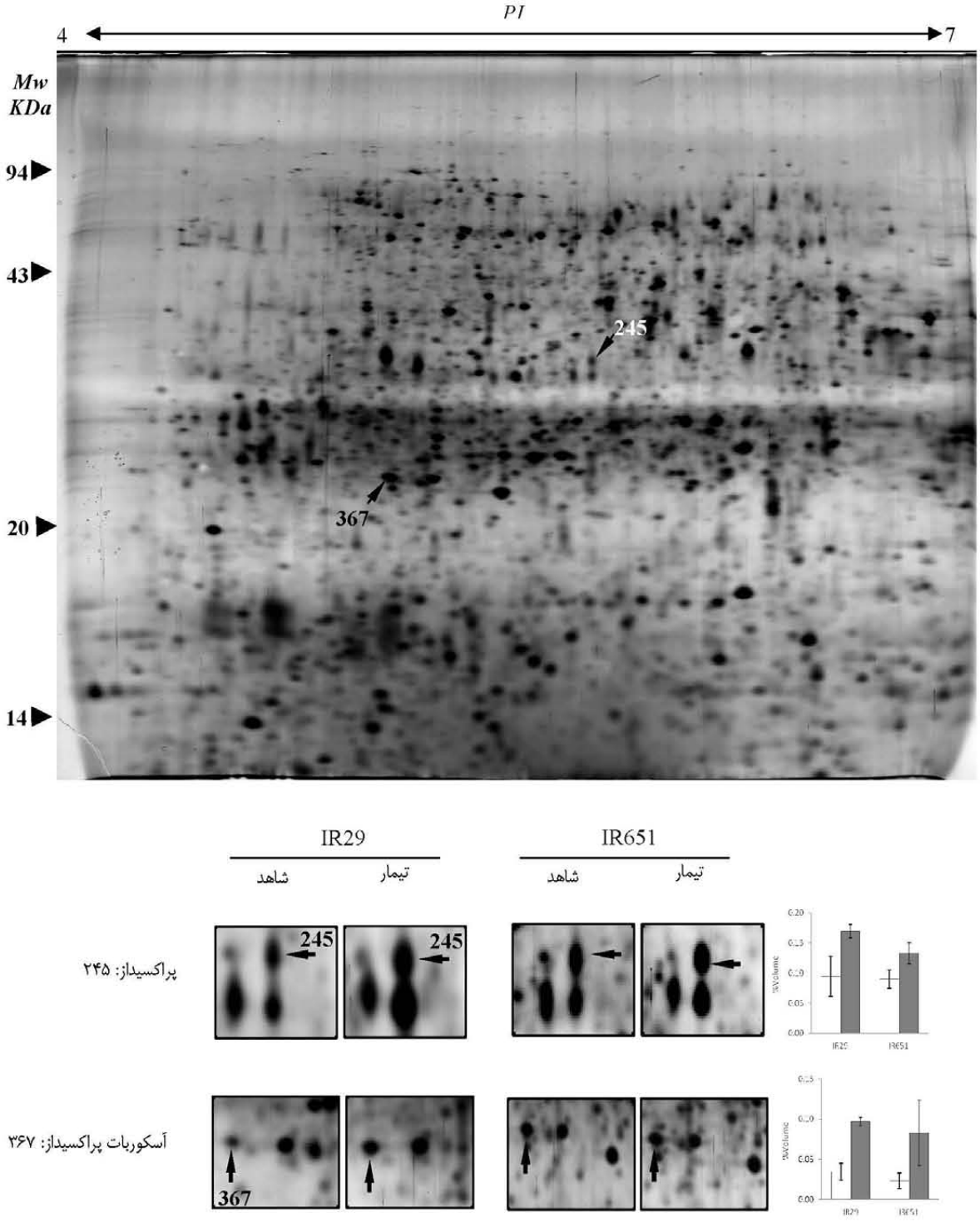
نقطه ۱۱۰ به عنوان پروتئین فریتین در برگ

جدول ۱- نتایج توالی‌یابی جزیی پروتئین‌های ریشه و برگ

Spot ID	Exp. Pi/Mw	Theo. Pi/Mw	Accession No. (Swiss prot)	Protein name	Partial sequence	Identity	Tissue
245	5.65/35	5.51/32	gi:50939971	Peroxidase	VALGGPSWTVLLGR	14/14	Root
301	6.07/30	5.42/27	gi:50920595	Putative ascorbate peroxidase	TPAELSHAANAGLDIAVRAL	19/20	Root
67	4.38/30	5.85/47	gi:1778414	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	LVDSFPGQSIDFFGALR	17/17	Leaf
73	4.73/30	5.21/27	gi:75308965	L-ascorbate peroxidase	EGLLQLPSDK	10/10	Leaf
110	5.33/29	5.28/28	gi:75306633	Ferritin	EVLSGVVFQPFEELKTPLT	17/19	Leaf

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- تصویر ژل دوبعدی ریشه برنج و بزرگنمایی نقاط شناسایی شده. در بعد اول ۱۲۵ میکروگرم پروتئین از هر نمونه روی ژل‌های نواری لود شد و برای بعد دوم از ژل‌های ۱۲ درصد SDS-PAGE استفاده شد. رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره برای ظاهرسازی نقاط به کار رفت. نقاط اشاره‌شده مجموعه پروتئین‌های ریشه برنج را نشان می‌دهد که بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری تغییر یافته است. نمودارهای مجاور هر پروتئین میزان بیان آن را در سطوح صفر میلی‌مولار (رنگ سفید) و ۱۰۰ میلی‌مولار (رنگ تیره) نشان می‌دهد.

www.SID.ir

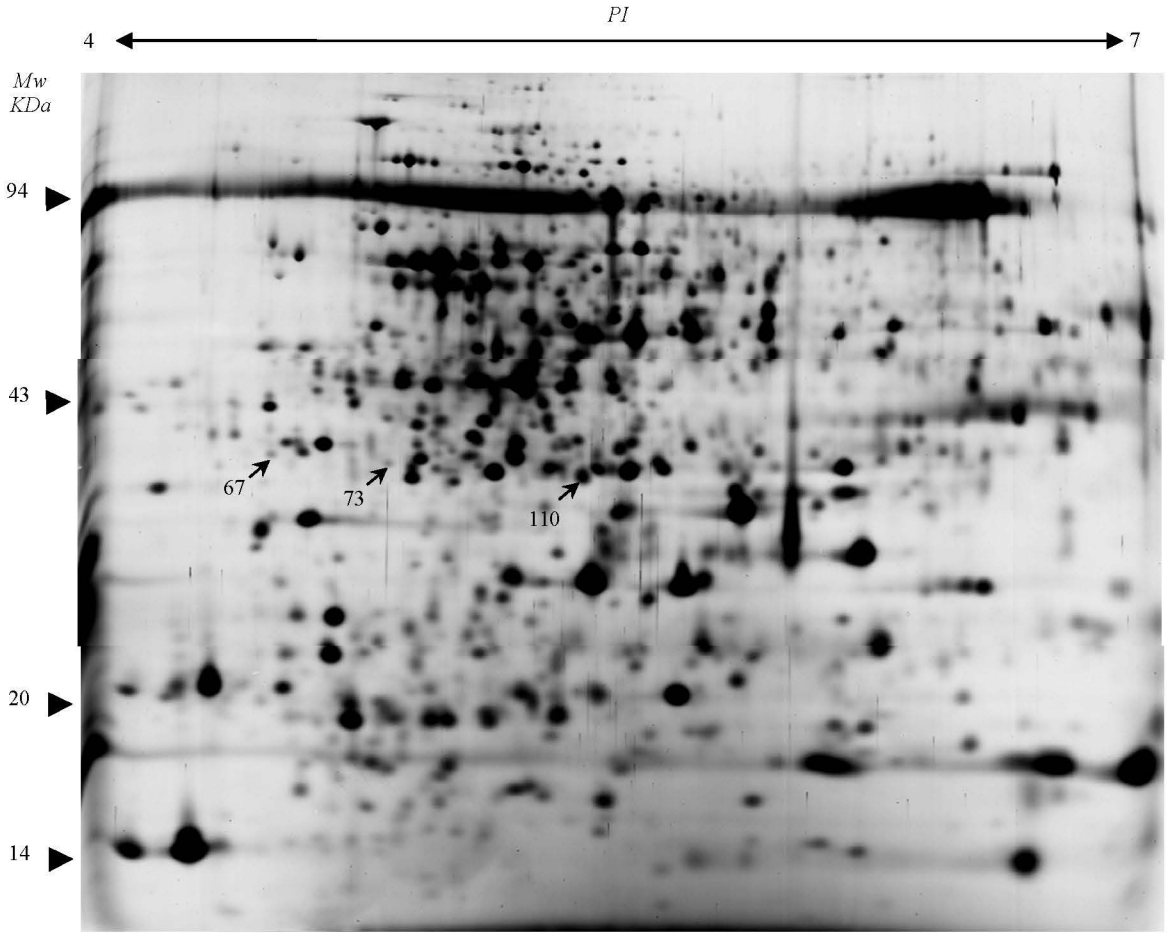
شناسایی شد (شکل ۶). فریتین پروتئین ذخیره‌ای آهن است که در تمام یوکاریوت‌ها وجود دارد و از ۲۴ زیرواحد تشکیل شده است (Sickmann *et al*. 2003). در گیاهان این پروتئین توسط هسته کد شده و به پلاستیدها منتقل می‌شود. اهمیت بیولوژیکی این عنصر در ثابت نگه‌داشتن غلظت مورد نیاز آهن (تقریباً 10^{-7}M) در سلول است. آهن یکی از عناصر اصلی انتقال الکترون در سیستم‌های بیولوژیکی است و برای حیات ضروری می‌باشد. حلالیت کم این عنصر و رسوب آن در pH فیزیولوژیک موجب شده این عنصر به‌راحتی قابل دسترس سلول نباشد. علاوه بر این آهن آزاد به دلیل داشتن دو سطح پتانسیل ردکس مختلف با شرکت در واکنش فنتون موجب احیاء اکسیژن و تولید گونه‌های فعال آن می‌شود. بنابراین هموستازی آهن در سلول بایستی به‌دقت کنترل شود. فریتین با توانایی ذخیره ۴۵۰۰ اتم آهن در هر مولکول خود نقش ارزنده‌ای در هموستازی این عنصر در سلول دارد (Harrison and Arosio. 1996). مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند در تنظیم بیان ژن فریتین نقش فعال داشته باشند (Lobreaoux *et al*. 1995). مطالعات مختلفی که به منظور بررسی اثرات بیان بیشتر فریتین در سیتوپلاسم و یا پلاستیدها در گیاهان تراریخت صورت گرفته است بیانگر افزایش توان گیاه به هنگام مواجه با تنش‌ها است. توتون تراریخت با ژن فریتین که سطح بیشتری از فریتین را در خود بیان می‌نمود، نسبت به تنش سرما مقاومت بیشتری نشان داد (Hegeduse. 2002). با توجه به نقش غیرمستقیم این پروتئین در کاهش میزان رادیکال‌های اکسیژن از طریق حذف سوبسترای واکنش فنتون و نقش مستقیم آن در هموستازی آهن، افزایش بیان این پروتئین را می‌توان یکی از علل مقاومت به تنش در رقم متحمل در این مطالعه به حساب آورد.

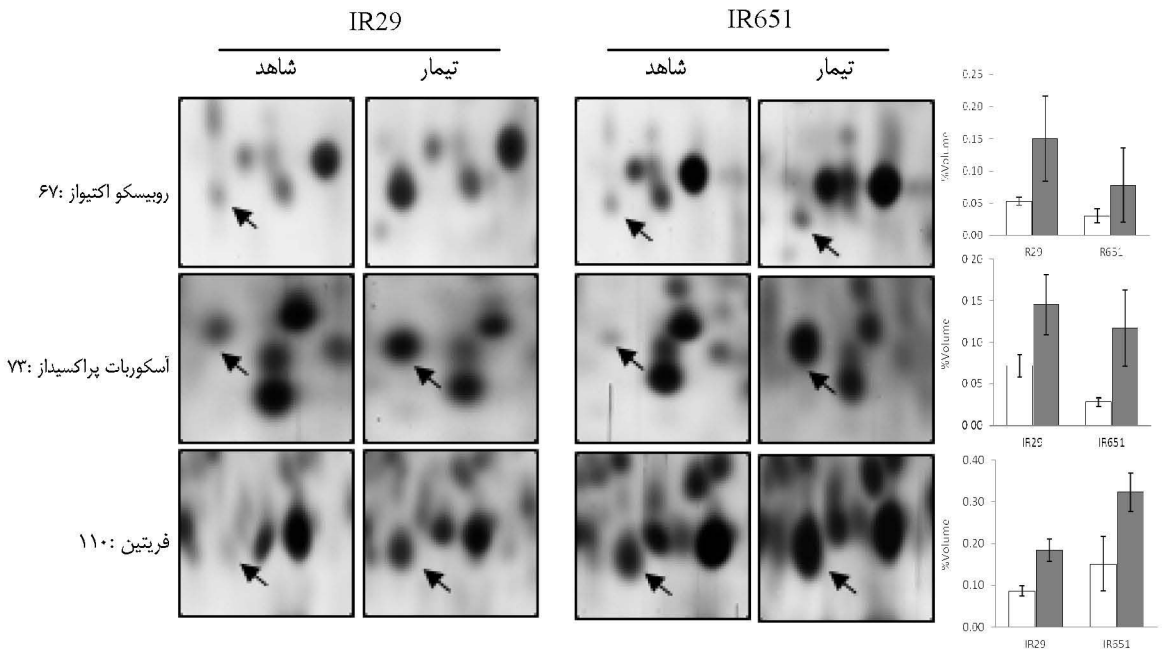
روبیسکو اکتیواز

نقطه ۶۷ پس از انجام توالی‌یابی به‌عنوان روبیسکو اکتیواز شناسایی شد (شکل ۶)، در گیاهان آنزیم روبیسکو یا ریبولوزبیس‌فسفات‌کربوکسیلاز نقش کلیدی در تثبیت کربن و فتوسنتز دارد. تحقیقات نشان‌داده که آنزیم روبیسکو اکتیواز دارای نقش چپرونی است و در پروسه‌ی فتوسنتز نقش مهمی دارد. وظیفه اصلی روبیسکو اکتیواز فعال کردن و تنظیم روبیسکو است. این مسأله برای روبیسکو ضروری است زیرا تنها این فرم روبیسکو (روبیسکو اکتیواز) در فتوسنتز نقش فعال دارد. اگر سلول‌های گیاه از روبیسکوی غیرفعال بیش از فرم فعال آن برخوردار باشند، سرعت فتوسنتز کاهش می‌یابد. تبدیل فرم غیرفعال روبیسکو به فرم فعال آن که برای هر دو واکنش کربوکسیلاسیون و اکسیژناسیون لازم است، نیازمند کربامیلاسیون واحد لیزین خاصی بر روی این آنزیم می‌باشد. وظیفه روبیسکواکتیواز جدانمودن قند بیس‌فسفات از سایت غیرکربامیدی روبیسکو و فراهم‌کردن زمینه برای کربامیلاسیون آنزیم و کربوکسیلاسیون بیس فسفات می‌باشد (Craft-Brandner and Salvucci. 2000). این آنزیم در مقایسه با روبیسکو به دمای بالا و افزایش غلظت CO_2 حساس‌تر بوده و سریع‌تر غیرفعال می‌شود. تحقیقات برای یافتن آیزوزایم‌های مقاوم این آنزیم در منابع گوناگون برای افزایش پتانسیل فتوسنتز گیاه و افزایش تحمل آن به تنش گرما ادامه دارد. در مطالعات دیگر نیز دو فرم از آنزیم روبیکسو اکتیواز در دو رقم برنج که تحت تنش شوری افزایش بیان بیشتری داشته‌اند گزارش شده است (Salekdeh *et al*. 2002). در این تحقیق بیان این پروتئین در هر دو رقم به هنگام تنش افزایش نشان داد. اما این میزان تنها در رقم حساس معنی‌دار بود (شکل۶) که خود می‌تواند ناشی از تاثیر بیشتر استرس بر رقم حساس و نیاز بیشتر این رقم در جبران فرم فعال آنزیم از دست‌رفته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir





شکل ۶- تصویر ژل دوبعدی برگ برنج و بزرگنمایی نقاط

www.SID.ir

آسکوربات پراکسیداز

اسید آسکوربیک آنتی‌اکسیدانی قوی بوده که در تنظیم رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن منفرد[1] بسیار مؤثر است. آسکوربات پراکسیدازها (APX) مهم‌ترین و مؤثرترین آنزیم‌های درگیر در فرایند حذف پراکسیدهیدروژن در کلروپلاست و سیتوسول سلول‌های گیاهی می‌باشند و به صورت ایزوآنزیم‌های مختلف[2] یافت می‌شوند. این آیزوزایم‌ها از آسکوربات به عنوان دهنده‌ی الکترون برای احیاء پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کند.

ایزوآنزیم‌های APX در اجزای مختلف سلول مانند استروما، غشای تیلاکوئیدی، کلروپلاست‌ها، غشای اندامک‌ها، سیتوسول و غشای میتوکندریایی وجود دارند و در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند (Shigeoka, 2001). در این مطالعه این پروتئین به صورت دو ایزوفرم مختلف در برگ (نقطه ۷۳) و در ریشه (نقطه ۳۰۱) مشاهده شدند (شکل ۵ و ۶). میزان بیان این پروتئین در هر دو بافت ریشه و برگ در هر دو رقم به هنگام تنش افزایش معنی‌داری از خود نشان داد. آیزوزایم‌های APX به‌وسیله سازوکارهای تنظیمی مجزا در پاسخ به تنش‌های محیطی متفاوت با شرایط سلولی تنظیم می‌شوند تا از هر اندامکی محافظت کنند و صدمه به بافت را به حداقل برسانند. پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) یکی از این تنظیم‌کننده‌ها است که به عنوان یک پیامبر ثانویه جهت تنظیم بیان ژن برای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های گیاهی عمل می‌کند. به همین دلیل معمولاً فعالیت APX به طور جالبی همراه با دیگر آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، سوپراکسیداز دسموتاز و GSH ردوکتاز در پاسخ به فاکتورهای مختلف تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود (Mano, 1997).

1. Singlet oxygen
2. Isoenzymes

نتیجه‌گیری

تاکنون روش‌های اصلاحی برای صفت تحمل به شوری به دلایل مختلف از جمله پیچیدگی و تنوع سازوکارهای پاسخ‌دهنده به تنش مفید نبوده است. پروتئومیکس با دارابودن توانایی کشف پروتئین و ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش از پتانسیل مطلوبی جهت استفاده در فرآیند اصلاح برای تنش‌ها به‌ویژه تنش شوری برخوردار است. بررسی و مقایسه روند پروتئین‌های رقم حساس و مقاوم در برگ نشان می‌دهد که در رقم حساس پروتئین‌های بیشتری به هنگام تنش تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در این مطالعه تنها سازوکار متفاوت بین دو رقم بیان بیشتر پروتئین فریتین در رقم متحمل نسبت به رقم حساس است که می‌تواند یکی از چندین سازوکار ممکن تحمل به تنش شوری در رقم متحمل نسبت به رقم حساس باشد. بدون شک سازوکارهای متفاوت و متعددی (حداقل در سطح مولکولی) بین دو رقم وجود دارد که موجب مقاومت بیشتر رقم IR651 در مقایسه با رقم IR29 نسبت به تنش شوری می‌شود. توجه به این نکته ضروری است که بررسی جامع سازوکارهای مقاومت به تنش از طریق تلفیق روش‌های مختلف ژنومیکس کاربردی نظیر ترانس‌کریپتومیکس و پروتئومیکس با مطالعه فیزیولوژی گیاه و تنش‌ها و نیز بیوشیمی متابولیت‌ها امکان‌پذیر خواهد بود و بدین ترتیب است که فرآیند پیچیده نحوه‌ی مقابله گیاهان با تنش‌ها روشن خواهد شد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از اطلاعات طرح پژوهشی به شماره مصوب: ۸۴۰۰۱-۸۴۰۱-۰۳-۱۴۰۰۰۰-۰۱۳-۱ است که با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام گردیده است. از تمامی عزیزانی که نگارندگان مقاله را درانجام این امر یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

Blum H, Beier H, Bremer E (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 8: 93-99.

Concept paper, the international Year of rice, Food and agricultural organization of the united nation. At http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/concept.pdf

Craft-Brandner SI, Salvucci ME (2000) Rubisco activase consentrations the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO_2. PNAS. 97: 13430-13435.

Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986) The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis. 7: 52-54.

Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochem. Biophys. Acta. 1275: 161-203.

Hegeduse A, Erde S, Janda T, Szalai J, Dubits D, Horrath G (2002) Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. Acta. Biol. Szeged. 46: 97-98.

Higa A, Hidaka T, Minai Y, Matsuka Y, Haga M (2001) Active oxygen radicals induce peroxidase activity in rice blade tissues. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1852-1855.

Lobreaoux S, Thoiron S, Briat JI (1995) Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. Plant. Jour. 8: 443-449.

Mano S, Ymaguchi K, Hayashi M, Nishimura M (1997) Stromal and thylakoid-bound ascorbate perocxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. FEBS Letters. 413: 21-26.

Quiroga M, Guerro C, Botell MA, Brracello A, Amoya I, Medina MI, Alonso FJ, Forchetti SL, Tigier H, Valpuesta R (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiol. 122: 1119-1127.

Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennet J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics. 2: 1131-1145.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2001) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoforms. Jur. Exp. Bot. 53: 1305-1319.

Sickmann A, Rienders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schöfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. PNAS. 23: 13207-13212.

Smith DM, Tran HM, Epstein LB (1995) Two-dimensional electro-… (Balkwill, F. R., ed.), IRL Press *at* Oxford University Press, Oxford, pp 111-128.

Takashi I, Shimamoto K (1996) Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. Trends in Plant, Science. 1: 95-99.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Los Báos, Filipinas.

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. Trends. Plant. Sci. 6: 66-71.

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol. 53: 247-27.

Archive of SID

www.SID.ir

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2011

Proteomic Analysis of Root and Leaf in Rice under Salinity Stress

GH. HOSSEINI SALKDEH[1]* AND D. NASRABADI[2]
1, Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
2, M. Sc. Student, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran
(Received: Nov. 17, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

Rice is currently the main staple food for more than 2 billion people in Asia, Africa and Latin America. It is also an excellent model cereal for molecular biology and genetics research. Salinity is a major factor limiting rice production worldwide. The analysis of stress-responsiveness in plants is an important route to the discovery of genes conferring stress tolerance which could be then uses in breeding programs. To further understand the mechanism of plant response to salinity, we employed a proteomic approach to profile the protein changes of the third leaf of rice and root under salt stress. Plants were grown in Yoshida nutrient solution and salt was stress imposed after 25 days. Plants were treated by 100 mM NaCl for10 Days. After that, third leaves and total root were collected from the control and salt stressed plants. The Na^+ and K^+ content of the leaves/roots and several yield components changed significantly in response to short-term salt stress and their proteome patterns were analyzed using 2-DE in triplicates. The expression pattern of proteins changed in all the leaves/roots in response to stress considerably. More than 488 and 345 proteins were detected repeatedly in the 2Dgels for root and leaf, respectively. 107 proteins in the root and 86 proteins in the leaf of two genotypes showed significant response to stress. Three proteins in leaf gels and 2 proteins in root gels were selected and identified by ESI-Q-TOF. The most important ones included ferritin, rubisco activase and ascorbat peroxidase in leaf and peroxidase and ascorbat peroxidase in root. All of those were enzymes and involved in detoxification and removal of reactive oxygen species (peroxidase, ascorbat peroxidase), iron homeostasis (ferritin) or were involved in the activation of other enzymes (rubisco activase).

Keywords: Rice, *Oryza sativa*, Salinity, Proteomics, 2D, Oxidative stress

* Corresponding author: GH. Hosseini Salekdeh E-mail: hsalekdeh@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir