

## مطالعه تغییرات مورفو-فیزیولوژی و الگوی پروتئینی ارقام متحمل و حساس گندم تحت تنش شوری با استفاده از تجزیه پروتئوم

محمد رضا نقوی<sup>۱</sup>، معروف خلیلی<sup>۲\*</sup>

۱. استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانشیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳)

### Study morpho-physiological change and protein pattern of tolerant and susceptible wheat cultivars under salinity stress by using proteome analysis

Mohammad Reza Naghavi<sup>1</sup>, Marouf Khalili<sup>2\*</sup>

1. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: Nov. 8, 2017 - Accepted: Jan. 12, 2019)

#### Abstract

In order to investigate the mechanism of tolerance to salt stress in wheat, a factorial experiment basis of completely randomized design with four replications in greenhouse media were conducted. The factors of this experiment were included salinity of sodium chloride in four levels of zero (control), 100, 200 and 300 mM and two wheat cultivars namely Niknejhad and Pishtaz as a representative of tolerant and susceptible cultivars, respectively. Leaf samples were prepared two weeks after the starting of salt stress. Then, extraction of protein from leaf tissue was done and two-dimensional electrophoresis in control plants and under salt stress plants were carried out. The results of proteome analysis revealed that 15 replicated protein spots with different expression variations were common between two tolerant and susceptible cultivars, and five protein spots of unique to each tolerant and susceptible cultivar, had significantly expression variations under stress. Protein spots were detected by mass spectrometry and the results showed that more number from commonly detected proteins were classified in functional groups including antioxidant defense and Calvin cycle, while other proteins in each cultivar had more roles in antioxidant activity. Overall, the results showed that there was a significant difference between two cultivars in terms of morpho-physiological response to salt stress, and the Niknejhad cultivar showed a better protein response under stress.

**Keywords:** Proteome analysis, responsive proteins to stress, tolerance of salt stress, wheat

#### چکیده

به منظور بررسی مکانیسم تحمل به تنش شوری در ارقام گندم، آزمایشی فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در محیط گلخانه انجام شد. عوامل این آزمایش شامل تنش شوری از نوع کلرید سدیم در چهار سطح صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مول و دو رقم گندم نیک‌نژاد و پشتاز بترتیب بعنوان نماینده‌ای از ارقام متحمل و حساس بودند. نمونه‌های برگ، دو هفته پس از اعمال تنش شوری تهیه شدند. سپس استخراج پروتئین از بافت برگی صورت گرفت و الکتروفورز دوبعدی در گیاهان شاهد و تحت تیمارهای تنش شوری انجام شد. مقایسه نتایج تجزیه پروتئوم در سطوح تنش نشان داد که تعداد ۱۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر با تغییر بیان متفاوت بین دو رقم متحمل و حساس مشترک بوده و تعداد پنج لکه پروتئینی منحصر به هر رقم متحمل و حساس تحت تنش تغییر بیان معنی‌دار داشتند. لکه‌های پروتئینی با استفاده از طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند و نتایج نشان داد که پروتئین‌های مشترک شناسایی شده بیشتر در گروه‌های عملکردی شامل دفاع آنتی‌اکسیدانی و چرخه کالوین طبقه‌بندی شدند. در حالی که سایر پروتئین‌ها در هر رقم بیشتر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش داشتند. در مجموع نتایج نشان داد که بین دو رقم مورد مطالعه از لحاظ پاسخ مورفو-فیزیولوژیکی به تنش شوری تفاوت معنی‌دار وجود دارد و رقم متحمل نیک‌نژاد پاسخ پروتئینی مناسبتری تحت تنش نشان می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش، تجزیه پروتئوم، تحمل تنش شوری، گندم.

## مقدمه

گندم یکی از مهمترین محصولات زراعی جهان است و تنش شوری یک عامل محدودکننده مهم برای تولید آن در کشاورزی دیم و آبی محسوب می‌شود (Sairam et al., 2002). درک پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی، از جمله تنش شوری که منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌گردند، جهت تولید و اصلاح ارقام متحمل به تنش کاملاً ضروری است. از آنجا که شرایط تنش‌زای محیطی سبب اختلال در فعالیت‌های گیاهی می‌شوند لذا بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی به عنوان ابزاری برای مطالعه و شناخت مکانیسم‌های تحمل در گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Okcu et al., 2005). گیاهان با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و به واسطه تغییر در بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های ویژه‌ای را کد می‌کنند، در برابر تنش تحمل نشان دهند (Thiellement et al., 2002). تحمل به تنش شوری نیز با تغییر در سطح پروتئین‌ها همراه است. تنش شوری باعث کاهش یا افزایش بیان پروتئین‌ها، و یا به‌طور کامل باعث ناپدید شدن و یا ظاهر شدن برخی از پروتئین‌ها می‌شود (Yildiz, 2007). در این راستا تجزیه و تحلیل پروتئینی (پروتئومیکس) ابزار قدرتمندی برای تفکیک بافت‌های پروتئینی و روشی مناسب برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌ها و تغییرات محیطی به حساب می‌آید (Zang and Komatsu, 2007). به عبارت دیگر در بررسی پاسخ به تنش و افزایش تحمل در گیاهان، مطالعه پروتئوم ابزار مناسبی برای تفکیک، جداسازی و تشخیص پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش محسوب می‌گردد (Tamura et al., 2003). با توجه به اینکه در تنش شوری گیاهان تحت تنش اکسیداتیو نیز قرار می‌گیرند، در این راستا از اصلی‌ترین مسیرهای حذف

گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> (ROS) در گیاهان، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل پروتئین‌های گروه سوپراکسید دیسموتاز<sup>۲</sup> (SOD) هستند که در تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به اکسیژن مولکولی دخالت دارند (Cakmak, 2005). تجمع SOD در رقم متحمل گیاهان و کاهش فراوانی آن در رقم حساس در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu & Tanaka, 2004). از طرف دیگر، پروتئین‌های peroxiredoxin به‌صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی‌وم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان سلولی این پروتئین‌ها بیانگر آن است که نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندامک‌های سلولی که منبع اصلی ROS هستند، ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل انتقال سیگنال هم فعال هستند. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> انجام شده و آنزیم peroxiredoxin مولکول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را احیا می‌کند (Hashimoto et al., 2009). از طرف دیگر، فتوسنتز از فرایندهای بسیار مهم در گیاهان است و فاز نوری فتوسنتز مانند مرحله تاریکی آن از اهمیت بالایی برخوردار است که هر دو تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرند. پروتئین Oxygen evolving photosystem II protein از پروتئین‌های درگیر در مرحله نوری فتوسنتز می‌باشد که کمپلکس Oxygen evolving (OEC) جزء این پروتئین‌ها بوده و در پایداری فتوسیستم II (PSII) نقش دارد. علاوه بر این، این پروتئین نقش پایداری منگنز را از طریق ارتباط با کمپلکس منگنز OEC نیز برعهده دارد. به‌عبارت دیگر حاصل فعالیت این پروتئین تولید اکسیژن در چرخه انتقال الکترون

1. Reactive oxygen species

2. Superoxide dismutase

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و طرح آزمایشی

در این پژوهش دو رقم گندم بهاره بنام نیک‌نژاد بعنوان رقم متحمل و پیش‌تاز بعنوان رقم حساس در مرحله گیاهچه‌ای به روش کشت سیستم آبکشت (هیدروپونیک) در سال ۱۳۹۶ در گلخانه از نظر پاسخ به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتورهای آزمایش شامل تنش شوری از نوع کلرید سدیم در چهار سطح صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مول و ارقام گندم بودند. در مدت آزمایش، دوره روشنایی ۱۴ ساعت در نظر گرفته شد و برای تنظیم نور از روشنایی طبیعی و مصنوعی با استفاده از لامپ‌های فلورسانت و التهای استفاده شد. دمای روزانه  $25 \pm 3$  و شبانه  $15 \pm 3$  برای رشد گیاهچه‌ها فراهم گردید. رطوبت نسبی گلخانه در طول مدت انجام آزمایش بین ۴۵-۵۵ درصد در نوسان بود. تنش شوری به صورت تدریجی و هر روز به میزان ۱۰۰ میلی‌مولار اعمال گردید. غلظت نمک کلرور سدیم در تیمار شوری و همچنین هدایت الکتریکی محلول‌ها به‌طور روزانه کنترل می‌شد. دو هفته پس از اعمال تنش شوری آغاز شده از مرحله پنجه‌زنی، نمونه‌برداری برگ‌ها برای تجزیه پروتئوم انجام شد. از بقیه برگ‌ها برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ به روش Morant- *Manceau et al.* (2004) و پتانسیل اسمزی با اسمومتر استفاده شد. همچنین شاخص کلروفیل توسط SPAD و سطح ویژه برگ (SLA) از نسبت سطح برگ (سانتی‌متر مربع) به وزن خشک برگ (گرم) به دست آمد (Arias, 2007) و ارتفاع بوته با متر و وزن خشک بوته توسط آون و ترازو مشخص شدند.

### تجزیه پروتئوم

به‌منظور استخراج پروتئین، محلول شماره یک شامل ۹

است (Holmstrom *et al.*, 2000). براساس گزارش (Komatsu & Tanaka, 2004) در تجزیه پروتئوم غلاف برگ‌های برنج تحت تنش شوری کلرور سدیم، فراوانی Oxygen evolving photosystem II protein در پاسخ به تنش شوری افزایش یافته است که بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش است. مهمترین آنزیم فعال در چرخه کالوین رویسکو (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase) می‌باشد که این آنزیم دارای دو نوع عملکرد است و در مراحل اولیه دو مسیر متابولیکی متضاد، یعنی تثبیت کربن فتوستتزی (در چرخه کالوین) و فرایند تنفس نوری شرکت می‌کند. فرم یک این آنزیم در گیاهان و جلبک‌های سبز وجود دارد و دارای ۸ زیرواحد بزرگ و کوچک است. اگرچه زیرواحدهای بزرگ فعالیت این آنزیم را برعهده دارد ولی، نشان داده شده است که زیرواحدهای کوچک از طریق اعمال تغییراتی در ساختمان زیرواحدهای بزرگ، سرعت فعالیت آنها را افزایش می‌دهند (Vaidyanathan *et al.*, 2003). در مطالعه پروتئوم برگ در شرایط تنش شوری Yildiz *et al.* (2015) به افزایش بیان این آنزیم و همبستگی آن با مکانیسمی که قدرت فتوستتزی گیاه را افزایش می‌دهد، اشاره نموده‌اند. لازم به ذکر است که به‌دلیل این‌که در شرایط تنش فراوانی رادیکال‌های هیدروکسیل افزایش می‌یابد، این باعث شکسته شدن زیرواحد بزرگ می‌شود. اهداف این پژوهش مقایسه ارقام حساس و متحمل گندم از نظر برخی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و همچنین بررسی الگوی الکتروفورز دوبعدی آنها و در نهایت شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان تحت تنش شوری به‌روش تجزیه پروتئوم و بررسی نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای ترانس‌سانی مولکولی و ایجاد تحمل به تنش شوری بوده است.

استفاده شد. سپس متعادل‌سازی<sup>۱</sup> نوارها انجام شد (Herbert, 1999). ژل‌های بعد دوم به صورت دو تکه (شامل ژل جداکننده<sup>۲</sup> و ژل نگه‌دارنده<sup>۳</sup> تهیه شدند. ابتدا ژل جداکننده از ترکیب ( Acrylamide for separating gel buffer 8.5ml separating gel 10% 2ml distilled water 6.3ml (pH=8.8) 120µl APS، 20µl TEMED) تهیه گردید. سپس تهیه ژل نگه‌دارنده از ترکیب ( Acrylamide for stacking gel buffer 1ml stacking gel 10% 2ml distilled water 3ml (pH=6.8) 30µl APS، 20µl TEMED) انجام گرفت. در ادامه نوارهای بعد اول بر روی ژل‌های بعد دوم قرار گرفته و با استفاده از آگارز ۱٪ به آنها متصل شدند. در نهایت عملیات رانش با جریان ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل انجام شد. سپس رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول آبی کوماسی انجام شد و پس از رنگ‌بری<sup>۴</sup> ژل‌ها جهت تصویربرداری مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تصویربرداری ژل‌ها با استفاده از دستگاه اسکنر GS-800Bio-Rad، تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی با نرم‌افزار PDQuest انجام شد. در تجزیه واریانس برای انتخاب نقاط پروتئینی که نسبت به تنش عکس‌العمل معنی‌دار نشان داده بودند، سطح احتمال معنی‌داری ۵٪ مدنظر قرار گرفت. از بین نقاط انتخاب شده معنی‌دار، نقاطی که IF آنها بزرگ‌تر از ۲ و یا کوچکتر از ۰/۵ بود، مورد انتخاب نهایی قرار گرفتند. نقطه‌ای دارای IF بزرگ‌تر از واحد است که تحت تنش شوری افزایش بیان نشان داده است. برای کاهش ریسک این مقدار بزرگ‌تر از ۲ گرفته شد. در مقابل، نقاط دارای IF کمتر از واحد دارای کاهش بیان تحت تنش شوری هستند و در اینجا هم برای کاهش ریسک، مقدار کمتر از ۰/۵ مدنظر قرار گرفت. پس از

میلی‌لیتر استن، دو میلی‌لیتر TCA ۱۰٪ و ۱۴ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول تهیه شد. ۰/۵ گرم بافت برگ‌گی در ازت مایع خرد شده و سپس در دو میلی‌لیتر از محلول شماره یک هموژن گردید. در مرحله بعد، عصاره اولیه به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و هر ۱۵ دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه به طور کامل ورتکس شد. سپس سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، با دور ۹۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. با حذف روشناور، یک میلی‌لیتر از محلول شماره دو (مشکل از ۱۰ میلی‌لیتر استون و هفت میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول) به روی رسوب ریخته شده و ورتکس گردید. پس از این مرحله نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و هر ۱۵ دقیقه یک بار به مدت ۳۰ ثانیه (تا یک دقیقه) ورتکس شد. سپس سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰g و به مدت پنج دقیقه انجام شد؛ که با حذف روشناور، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره دو بر روی رسوب افزوده شده و ورتکس گردید. این مرحله، دو بار دیگر نیز تکرار شد. در نهایت با حذف روشناور، رسوب خشک شد و در بافر لیز حل گردید. رسوب حاصل از مرحله قبل توسط ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Ampholine 0.2ml NP-40 4.8 g Urea) (pH=3.5-10) Polyvinylpyrrolidone- 0.2ml) حل شده و یک ساعت در دمای اتاق ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد؛ با انتقال روشناور به تیوپ جدید، سانتریفیوژ با مشخصات قبل تکرار شده و در نهایت ۱۲۰ میکرولیتر از روشناور برای فراهم‌سازی ۴۰۰ میکروگرم پروتئین که بر اساس روش Bradford (2-D Quant Kit) (Bradford, 1976) مشخص شد، جهت بارگذاری در ژل‌های بعد اول به کار رفت. الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG (۱۷ سانتی‌متری) انجام شد. برای انجام بعد اول از (Bio Rad) PROTEAN IEF focusing tray و دستگاه PROTEAN IEF cell (Bio Rad)

1. Equilibration
2. Separating gel
3. Stacking gel
4. Destaining

سطوح تنش آورده شده است. همان طور که مشاهده می شود میانگین رقم نیک نژاد از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه بهتر از میانگین رقم پیشتاز می باشد.

نحوه تغییر مقدار صفات فیزیولوژی و مورفولوژی مورد مطالعه تحت تیمارهای مختلف شوری در دو رقم نیک نژاد (متحمل) و پیشتاز (حساس) در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود، در این آزمایش، سطح ویژه برگ از جمله صفاتی بود که تحت تنش شوری افزایش نشان داد و مقدار سطح ویژه برگ در رقم پیشتاز تحت سطوح بالاتر تنش شوری بیشتر از رقم نیک نژاد (شکل ۱) و مشابه گزارش *Araus et al.* (1997) بود. از طرف دیگر، شاخص کلروفیل، پتانسیل اسمزی و محتوای آب نسبی برگ تحت تنش شوری کاهش نشان دادند و مقدار شاخص کلروفیل و محتوای آب نسبی برگ در رقم نیک نژاد تحت سطوح بالاتر تنش شوری بیشتر از رقم پیشتاز بود. در حالی که در سطوح بالاتر تنش شوری در رقم نیک نژاد صفت پتانسیل اسمزی منفی تر از رقم پیشتاز بود (شکل ۱). بنابر نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین در مجموع رقم نیک نژاد بهتر از رقم پیشتاز بود. محتوای آب نسبی برگ یکی از مهمترین صفات فیزیولوژیک می باشد که تحت تنش شوری کاهش می یابد. در طی تنش شوری تعادل آب گیاهان بهم می خورد و در نتیجه محتوای آب نسبی برگ کاهش می یابد ( *Bajjii et al.*, 2001). گزارش های متعدد نشان می دهد که ارقام متحمل به تنش توانایی بالایی در حفظ محتوای آب نسبی برگ نسبت به ارقام حساس دارند ( *Martinez et al.*, 2004). از طرف دیگر، کاهش پتانسیل اسمزی که منجر به حفظ فشار تورمی برگ می گردد معمولاً از طریق افزایش و تجمع نمک های محلول در سلول های گیاهی صورت می گیرد ( *Hasegawa et al.*, 2000).

تعیین لکه های پروتئینی با تغییرات بیان معنی دار و هضم آنزیمی آنها از دستگاه طیف سنجی جرمی دو مرحله ای (MS/MS) در دانشگاه توشای ایتالیا برای شناسایی پروتئین ها استفاده شد. در این آزمایش برای طیف سنجی جرمی از منبع MALDI استفاده شد. بنابراین برای آماده سازی نمونه ها یک میکرولیتر از نمونه های پروتئینی هضم شده توسط تریپسین با حجم یکسان از  $\alpha$ -cyna-hydroxy-cinnamic acid (به عنوان ماتریکس) ترکیب شدند و روی صفحه مخصوص MALDI جهت تجزیه و تحلیل پتیدی و انگشت نگاری جرمی پتیدی قرار گرفتند. پتیدها توسط اشعه لیزر ۳۳۷ نانومتری یونیزه شدند. سپس با توجه به نسبت جرم به بار پتیدها در سیستم از یکدیگر جدا و در نهایت توسط Detector شناسایی شدند. در نهایت با استفاده از داده های حاصل از اسپکترومتری (طیف سنجی) جرمی و موتور جستجوگر مسکات پروتئین های مورد نظر شناسایی شدند ( *Twyman,* 2004). مبنای انتخاب پروتئین ها امتیاز بالای ۶۶ ( $p < 0.05$ ) بود و علاوه بر این حداقل ۱۰ درصد همپوشانی توالی های پروتئینی در انتخاب پروتئین ها در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

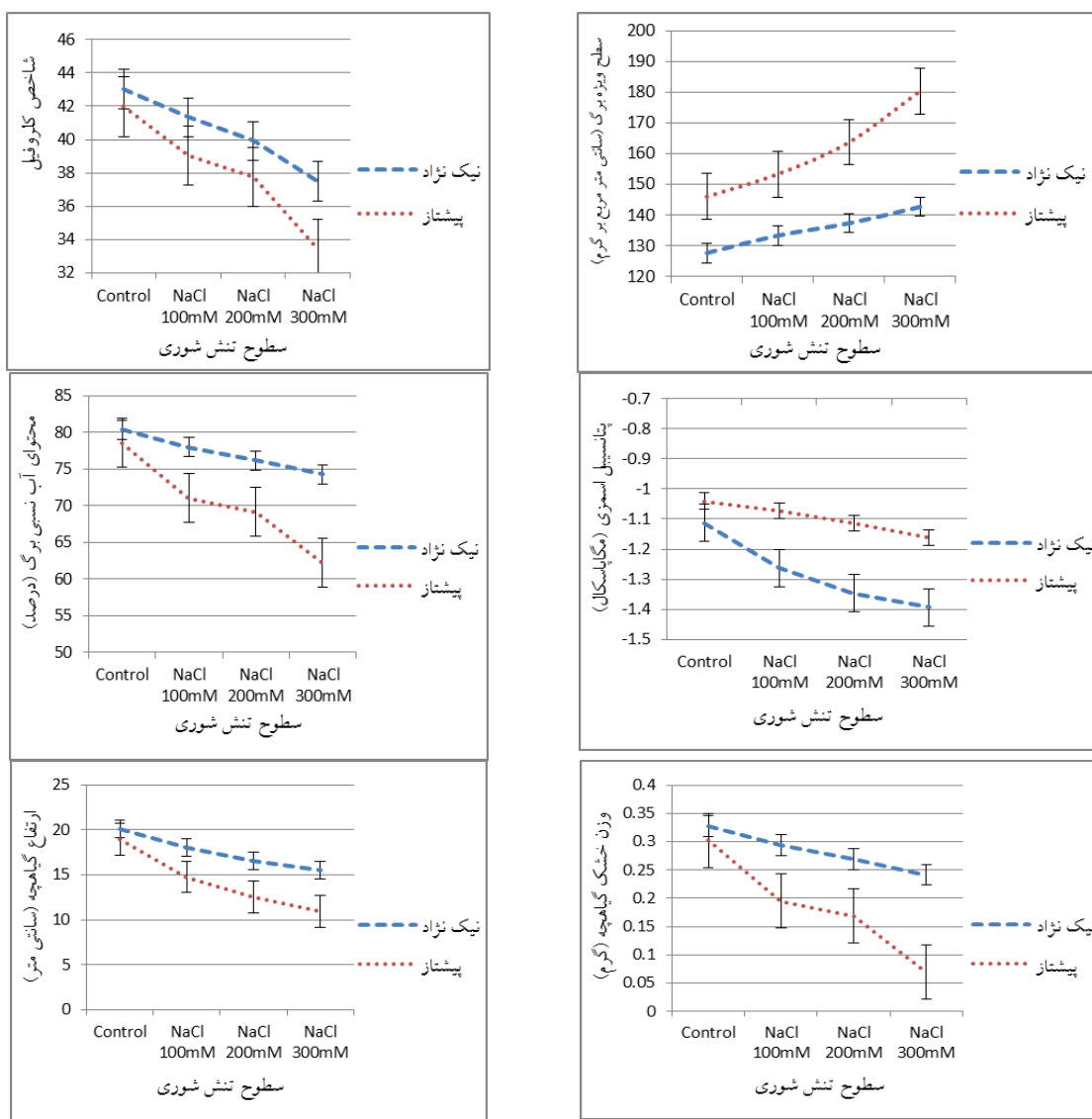
### تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها

نتایج تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در جدول ۱ آمده است. طبق نتایج به دست آمده بین ارقام و سطوح تنش از نظر کلیه صفات ارزیابی شده تفاوت معنی داری وجود داشت. در ضمن، اثر متقابل رقم با تنش برای صفات تمامی صفات مطالعه شده معنی دار بدست آمد. علاوه بر آن، کمترین و بیشترین مقدار ضریب تغییرات مربوط به صفات شاخص کلروفیل (۶/۶۹) و سطح ویژه برگ (۱۸/۱۶) بود. در شکل ۱ مقایسه میانگین ارقام و

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مطالعه شده ارقام گندم تحت تنش شوری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن خشک گیاهچه (گرم)	ارتفاع گیاهچه (سانتی متر)	محتوای آب نسبی برگ (%)	پتانسیل اسمزی (مگاپاسکال)	شاخص کلروفیل	سطح ویژه برگ (سانتی متر مربع بر گرم)
تنش	3	0.08**	8.12**	43.14**	0.162**	13.05**	303.68**
رقم	1	0.05**	7.98**	35.08**	0.065**	7.12**	411.23**
رقم × تنش	3	0.03**	5.43**	8.14**	0.022**	5.19**	78.14**
خطا	24	0.001	0.94	3.95	0.004	0.91	8.44
ضریب تغییرات (%)		15.67	9.93	8.90	7.87	6.69	18.16

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.



شکل ۱. نحوه تغییر صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مطالعه شده در دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز تحت تیمارهای مختلف تنش شوری



روش MALDI TOF/TOF MS مورد شناسایی قرار گرفت (جدول‌های ۲ و ۳). جایگاه پروتئین‌های شناسایی شده در ژل الکتروفورز دوبعدی و روند تغییرات آنها تحت تنش‌های مختلف در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.

#### طبقه‌بندی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده در برگ‌های دو رقم گندم

در مجموع ۱۵ لکه پروتئینی که مشخصات آنها در جدول ۲ نشان داده شده است به‌طور مشترک بین دو رقم متحمل و حساس شناسایی شد که تحت تنش شوری تغییر بیان نشان دادند. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است بر طبق عملکرد این پروتئین‌ها در داخل سلول و براساس روش *Berardini et al.* (2004) گروه‌بندی پروتئین‌ها انجام شد و بیشترین درصد پروتئین‌های مشترک بترتیب مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۴۶٪)، چرخه کالوین (۲۷٪)، واکنش نوری (۱۳٪)، انتقال پروتون (۷٪) و سیستم شاتلینگ (۷٪) بودند.

علاوه بر آن پنج لکه پروتئینی تنها در رقم متحمل و پنج لکه پروتئینی دیگر تنها در رقم حساس تظاهر داشتند که، از پنج لکه غیرمشترک در رقم نیک‌نژاد دو لکه پروتئینی در فعالیت آنتی-اکسیدانی دخیل بوده و سایر لکه‌ها در چرخه کالوین، واکنش نوری و بیوسنتز نشاسته فعالیت داشتند و از بین پنج لکه پروتئینی غیرمشترک در رقم پیش‌تاز سه لکه پروتئینی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دیگر لکه‌ها در واکنش نوری فتوسنتز و پایداری ساختار پروتئین درگیر بودند.

بنابراین بیشتر پروتئین‌های منحصر به فرد در ارقام مربوط به پروتئین‌های سم‌زدا بودند که با توجه به افزایش آنها در رقم متحمل و کاهش آنها در رقم

از طرف دیگر، وزن خشک بوته و ارتفاع بوته تحت غلظت‌های مختلف شوری روند کاهشی نشان داد و رقم نیک‌نژاد نسبت به رقم پیش‌تاز کاهش کمتری تحت تنش داشت. *Sairam et al.* (2002) نیز کاهش این صفات را تحت تنش شوری گزارش کرده‌اند.

#### پروتئومیکس به روش الکتروفورز دوبعدی

پس از استخراج پروتئین کل برگ از هر دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز و انجام الکتروفورز دو بعدی و رنگ آمیزی با آبی کوماسی، کار تجزیه ژل‌ها و شناسایی نقاط انجام گرفت. در مجموع ۹۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر توسط نرم‌افزار شناسایی و برچسب زده شد. درصد حجمی این نقاط تکراردار که توسط نرم‌افزار کمی شده بودند، مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. از ۹۴ لکه پروتئینی شناسایی شده، تعداد پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش شوری در هر دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز، ۲۵ لکه پروتئینی بود که از این تعداد ۱۵ لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و پنج لکه فقط در رقم نیک‌نژاد تغییر بیان داشت و پنج لکه هم تنها در رقم پیش‌تاز تحت تنش تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند. تصویر ژل مرجع مربوط به دو رقم نیک‌نژاد و پیش‌تاز در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج می‌توان اظهار داشت که در رقم متحمل گندم تعداد پروتئین‌های دارای افزایش بیان در شرایط تنش شوری نسبت به رقم حساس بیشتر بود (جدول‌های ۲ و ۳، شکل‌های ۴ و ۵). افزایش بیان اکثر پروتئین‌های معنی‌دار در رقم نیک‌نژاد نسبت به رقم حساس بیانگر این است که این رقم با بیشتر بیان کردن پروتئین‌های مختلف تحت تنش شوری عکس‌العمل بهتری نسبت به رقم حساس جهت حفظ رشد خود داشته است که این نتایج مشابه نتایج *Hosseini Salekdeh et al.* (2002) می‌باشد.

در مجموع در این آزمایش ۲۵ پروتئین دارای تغییرات معنی‌دار بین شرایط شاهد و تنش با استفاده از

1. Detoxifying proteins

(2011) گزارش کردند که میزان این پروتئین (لکه مشترک شماره ۷) در ارقام متحمل افزایش یافته است و در ارقام حساس گندم به تنش مقدار این پروتئین کاهش نشان داده است.

از لحاظ عمل، GSTs آنزیم‌های سم‌زدای وابسته به گلوپتاتینون<sup>۱</sup> هستند که گلوپتاتینون را با محصولات طبیعی مختلف و توکسین‌های محیطی مانند علف‌کش‌ها درآمیخته می‌کنند.

سپس گلوپتاتینون‌های درآمیخته شده به واکوئل‌ها برای متابولیسم‌های بعدی که شامل سولفور است، انتقال می‌یابند (Edwards *et al.*, 2000). همچنین میزان گلوپتاتینون ترانسفراز<sup>۲</sup> (لکه مشترک شماره ۵) در طی تنش در ارقام متحمل جهت مقابله با تنش افزایش و در ارقام حساس کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد که این آنزیم همراه با ملات دهیدوژناز می‌تواند فعالیت پاک‌سازی ROS را بهتر انجام دهند (Kausar *et al.*, 2013). افزایش میزان گلوپتاتینون ترانسفراز در طی تنش کمبود آب در جهت خنثی کردن تأثیر سوء ROS می‌باشد (Dhindsa, 1991).

حساس یکی از مکانیسم‌های تحمل ارقام بدست آمدند. در مجموع بر اساس الگوی بیان پروتئین‌ها در شرایط بدون تنش و همچنین تنش شوری می‌توان چهار گروه (حالت) بیان پروتئین را مشاهده کرد: الف- پروتئین-هایی که در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش بیان نشان دادند (مانند پروتئین شماره ۱).

الف- پروتئین‌هایی که در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش بیان نشان دادند (مانند پروتئین شماره ۱).

ب- پروتئین‌هایی که در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش بیان از خود نشان دادند (مانند پروتئین شماره ۵).

ج- پروتئین‌هایی که فقط در رقم متحمل تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد B). د- پروتئین‌هایی که فقط در رقم حساس تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد G).

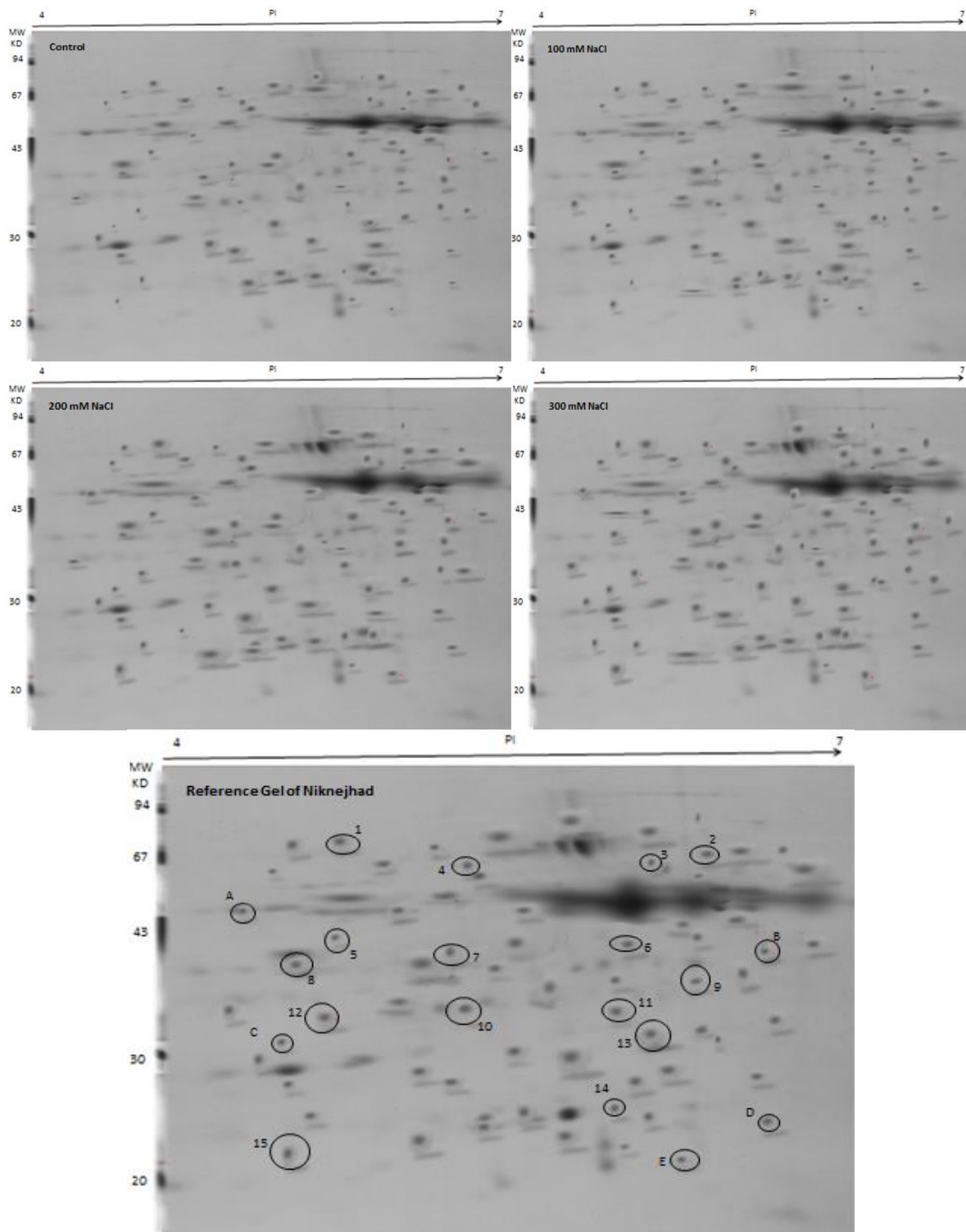
#### دفاع در برابر تنش اکسایشی

منبع اولیه گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS، کلروپلاست و میتوکندری می‌باشند که این مولکول‌ها توسط اکسیدکردن نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و چربی‌ها منجر به آسیب سلول می‌شوند. با این وجود، غلظت پایین ROS در حفاظت پیام‌های مولکولی که در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی مؤثرند، نقش دارند (Petrov & Van Breusegem, 2012). بنابراین، تعادل بین تولید ROS و پاک‌سازی<sup>۱</sup> آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند توسط اشکال مختلف تنش مختل شود (Gill & Tuteja, 2010).

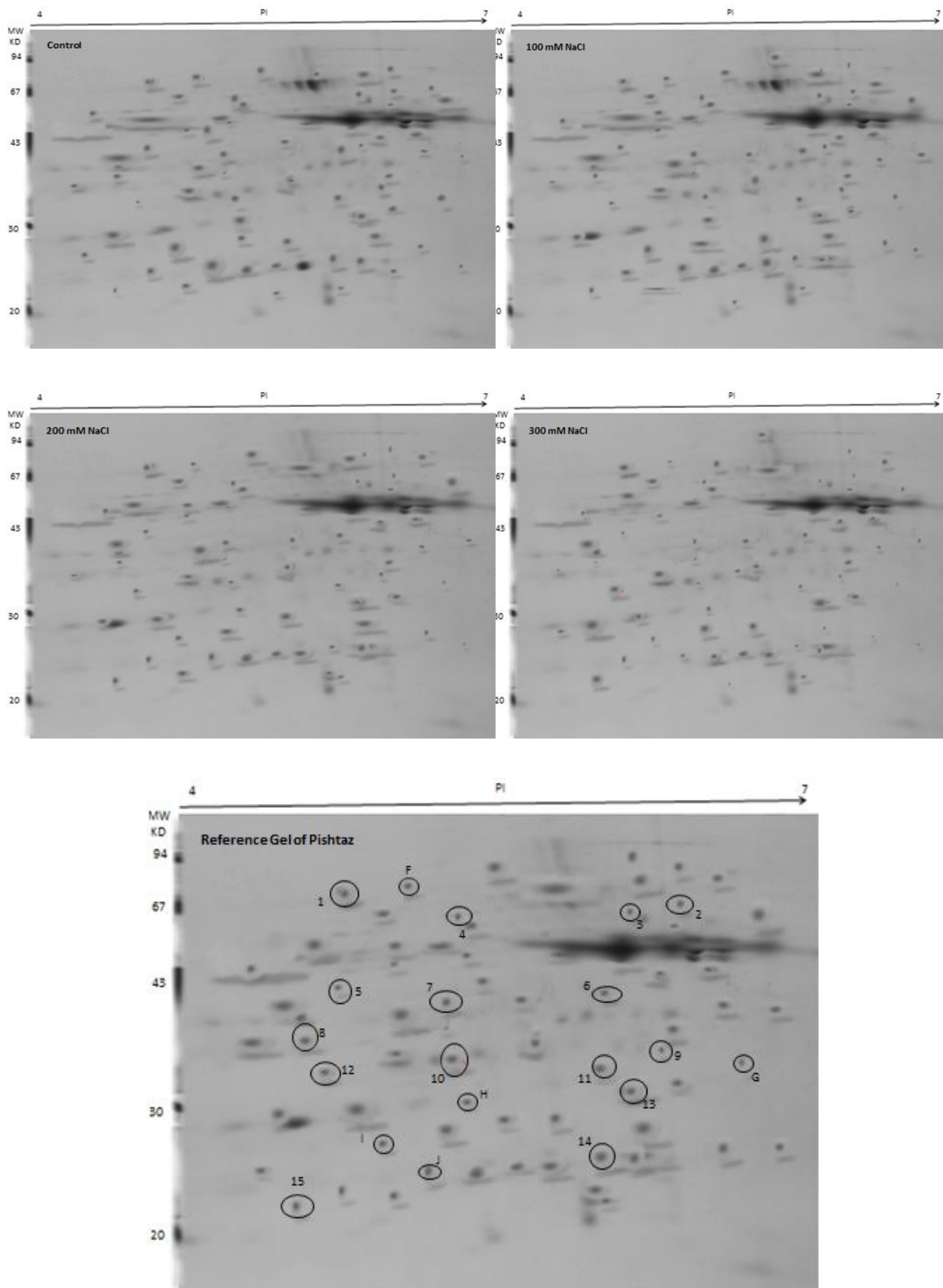
Glyoxalase I در سم‌زدایی methylglyoxyl نقش دارد و افزایش بیان این پروتئین در طی تنش غیرزیستی در گیاهان نشان داده شده است (Yadav *et al.*, 2005). Ford *et al.*

1. Scavenging





شکل ۲. الگوی الکتروفورز دوبعدی در تیمارهای مختلف تنش شوری (اشکال بالا) و ژل مرجع (شکل پایین) رقم نیک‌نژاد که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ دهنده به تنش شوری با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.



شکل ۳. الگوی الکتروفورز دوبعدی در تیمارهای مختلف تنش شوری (اشکال بالا) و ژل مرجع (شکل پایین) رقم پیشتاز که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.

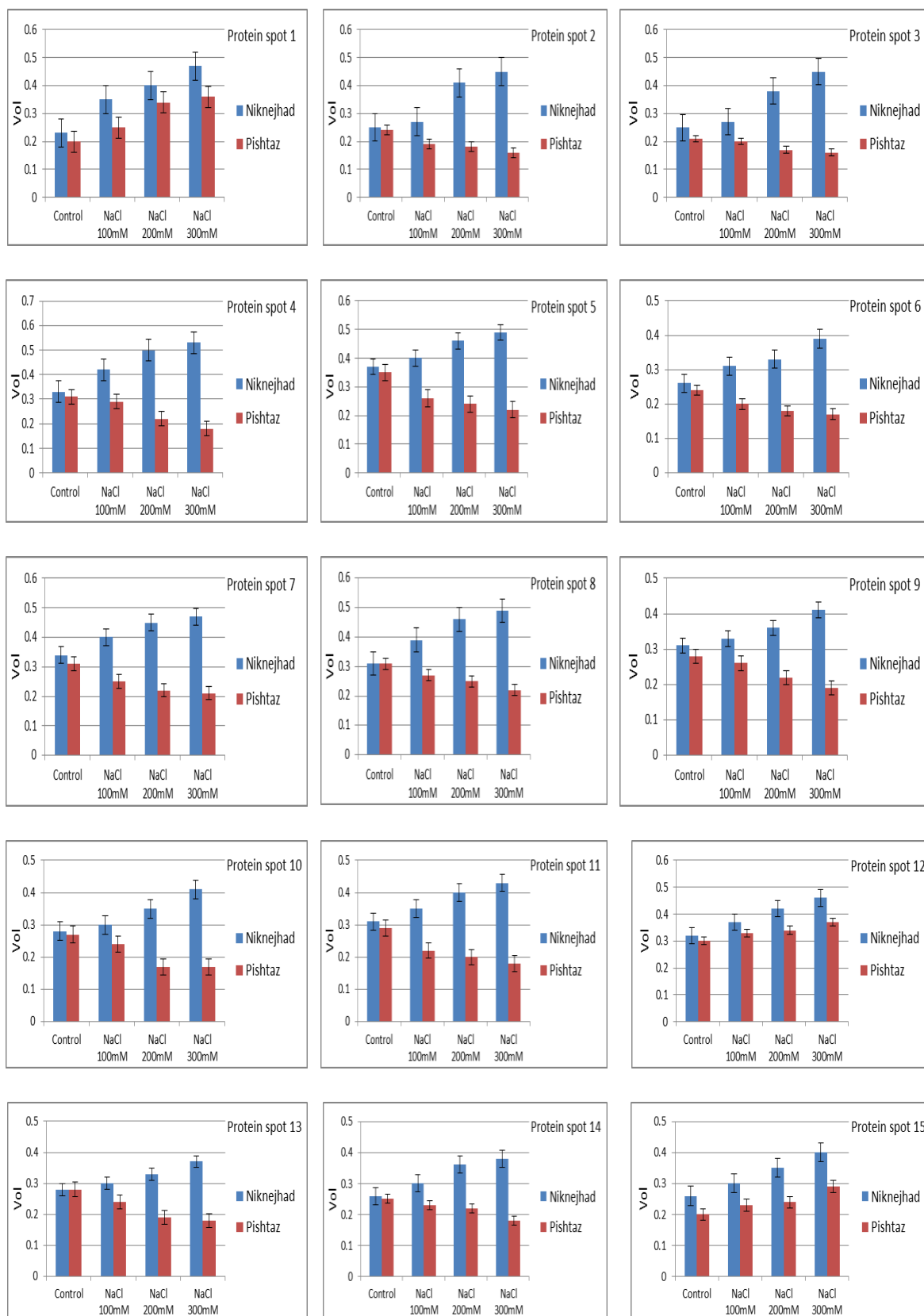
جدول ۲. مشخصات ۱۵ لکه پروتئینی مشترک شناخته شده از کل لکه‌های معنی‌دار در ارقام گندم تحت تنش شوری

گروه عملکردی پروتئین Functional group of protein	شماره لکه Spot number	امتیاز Score	درصد همپوشانی Overlap%	تجربی Experimental		تئوری Theoretical		اسم پروتئین name of protein	Accession number	روند کلی بیان در رقم متحمل General trend Expression in Niknejhad	بیان در رقم حساس General trend of Expression in Pishtaz
				MW	pI	MW	pI				
انتقال پروتون Proton transfer	1	16	113	68.02	4.71	59.33	5.56	ATP synthase beta subunit	gi 525291	Further increase	Increased less
چرخه کالوین Calvin cycle	2	23	127	67.14	6.43	47.33	6.03	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplatic	gi 473912215	Up-regulated	Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	3	21	135	66.92	6.03	42.55	6.04	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplatic	gi 1173347	Up-regulated	Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	4	26	147	66.84	5.31	42.21	5.90	chloroplast fructose-bisphosphate aldolase	gi 223018643	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	5	32	252	42.87	4.62	45.26	8.30	Glutathione S-transferase DHAR2	gi 474023258	Up-regulated	Down-regulated
سیستم شاتلینگ Shuttling system	6	21	290	42.63	5.80	34.93	5.26	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	gi 475577109	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	7	13	115	42.41	5.16	31.83	5.39	putative glyoxalase I	gi 7619802	Up-regulated	Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز of photosynthesis	8	20	119	39.50	4.54	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, (OEE2) chloroplatic	gi 131394	Up-regulated	Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز of photosynthesis	9	20	119	35.64	6.12	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, (OEE2) chloroplatic	gi 131394	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	10	21	97	34.87	5.20	27.96	5.00	ascorbate peroxidase	gi 15808779	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	11	17	124	33.21	5.75	23.39	5.40	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplatic	gi 2499477	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	12	38	264	33.05	4.55	22.20	6.28	Copper/Zinc superoxide dismutase	gi 3273753	Further increase	Increased less
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	13	17	124	31.24	5.95	23.39	5.40	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplatic	gi 2499477	Up-regulated	Down-regulated
چرخه کالوین Calvin cycle	14	25	128	26.05	5.70	18.80	8.83	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	gi 4038719	Up-regulated	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	15	37	260	23.16	4.45	20.35	5.30	Cu/Zn superoxide dismutase	gi 1572627	Further increase	Increased less

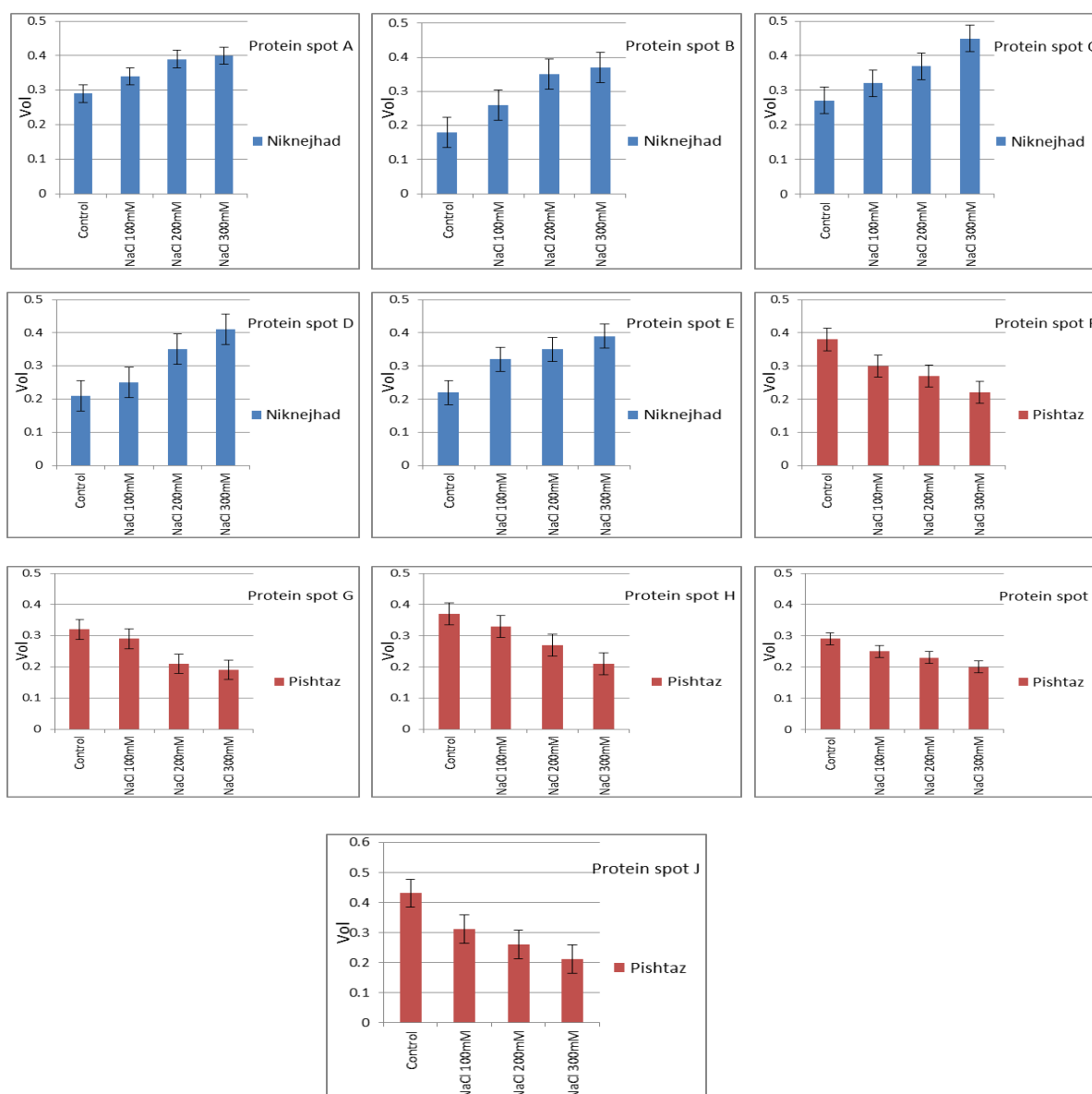
جدول ۳. مشخصات پنج لکه غیر مشترک در رقم نیک‌نژاد و پنج لکه غیر مشترک در رقم پیشتاز گندم تحت تنش شوری

گروه عملکردی پروتئین Functional group of protein	شماره لکه Spot number	امتیاز Score	درصد همپوشانی Overlap%	تجربی Experimental		تئوری Theoretical		اسم پروتئین name of protein	Accession number	روند کلی بیان در رقم متحمل General trend Expression in Niknejhad	روند کلی بیان در رقم حساس General trend Expression in Pishtaz
				MW	pI	MW	Pi				
چرخه کالوین Calvin cycle	A	31	241	44.91	4.35	47.34	8.62	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform	gi 167096	Up-regulated	-
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	B	20	279	42.53	6.62	37.01	5.40	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplatic-like	gi 357117071	Up-regulated	-
بیوسنتز نشاسته Strach biosynthesis	C	12	104	31.52	4.42	21.97	5.68	adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase	gi 21322655	Up-regulated	-
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	D	19	108	24.35	6.58	27.90	5.60	Acidic endochitinase	gi 116346	Up-regulated	-
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	E	15	123	22.91	6.03	17.00	5.37	Type 2 peroxiredoxin	gi 473787383	Up-regulated	-
پروتئین شوک حرارتی Heat shock protein	F	20	86	68.84	4.98	73.72	4.90	70kDa heat shock protein	gi 254211611	-	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	G	16	113	33.51	6.59	29.50	10.20	Harpin binding protein 1	gi 38679331	-	Down-regulated
واکنش نوری فتوسنتز photoreaction of photosynthesis	H	20	119	30.80	5.38	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplatic	gi 131394	-	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	I	25	136	28.63	4.81	29.50	10.20	Harpin binding protein 1	gi 38679331	-	Down-regulated
دفاع آنتی‌اکسیدانی antioxidant defense	J	37	260	25.67	5.06	20.35	5.30	Cu/Zn superoxide dismutase	gi 1572627	-	Down-regulated

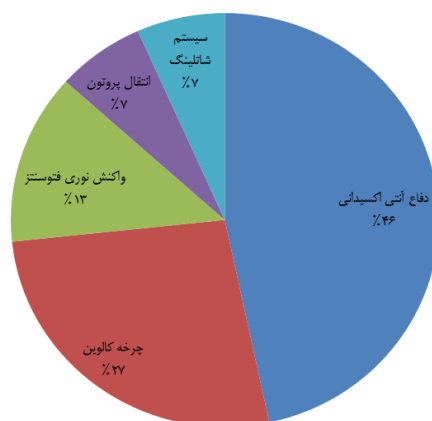
1. Glutathione-dependent detoxifying enzymes
2. Glutathione transferase



شکل ۴. نحوه تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم نیک‌نژاد و پیشتاز تحت تیمارهای مختلف تنش شوری



شکل ۵. نحوه تغییر مقدار لکه‌های پروتئینی غیرمشترک در دو رقم نیک‌نژاد و پیشناز تحت غلظت‌های مختلف تنش شوری



شکل ۶. گروه‌بندی عملکردی پروتئین‌های مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری در دو رقم متحمل و حساس گندم

حضور پروتئین‌های (لکه مشترک شماره ۱۲ و ۱۵ و لکه پروتئینی با کد I در رقم پیشناز) copper/zinc



انتقال سیگنال هم فعال هستند. انتهای N این پروتئین که حاوی سیستئین می‌باشد، به اسید سولفونیک اکسیده شده که این خود پلی برای واکنش با پراکسیدها است. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> انجام شده و آنزیم type 2 peroxiredoxin مولکول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را احیا می‌کند و در بسیاری از مطالعات پروتئین peroxiredoxin به‌عنوان پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش مطرح شده است ( Hashimoto *et al.*, 2009). حضور بیشتر و فعالتر این پروتئین در رقم متحمل نیک‌نژاد نقش این پروتئین را در تحمل تنش شوری نشان می‌دهد. از طرف دیگر، دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (لکه مشترک شماره ۱۰) از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که باعث شکسته شدن H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به آب و مولکول اکسیژن می‌شوند (Yong *et al.*, 2008). در کلروپلاست، آسکوربات پراکسیداز H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تولیدشده را از طریق چرخه آسکوربات-گلوتاتیون سم‌زدایی می‌کند ( Asada, 1992). غلظت این آنزیم تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف از جمله تنش شوری و در ارقام متحمل افزایش می‌یابد (Tewari *et al.*, 2013).

#### فتوسنتز و متابولیسم کربن

تجزیه شیمیایی آب در اثر نیروی تابشی در مجموعه درگیر اکسیژن (OEC) (Oxygen-evolving complex) (پروتئین شماره ۸، ۹ و پروتئین با کد H) مرکز واکنش فتوسیستم II انجام می‌شود (Heide *et al.*, 2004). زیرواحد فرعی کمپلکس PSII پروتئین‌هایی هستند که در سیستم فتوسنتزی نقش دارند و بعنوان پروتئین‌های OEC شناخته می‌شوند و در پایداری کمپلکس PSII نقش دارند (Ifuku *et al.*, 2008) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به فتوسیستم II می‌شود (Takahashi &

superoxide dismutase و (لکه شماره ۱۱، ۱۳ و لکه E در رقم پیش‌تاز) type 2 peroxiredoxin دلالت بر القای تنش اکسایشی به همراه تنش شوری است (جدول‌های ۲ و ۳، شکل‌های ۲ و ۳). پروتئین‌های گروه superoxide dismutase (SOD) در واقع اولین خط دفاعی در برابر ROS محسوب می‌شوند که سوپر اکسید را به مولکول‌های پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌کنند. در عدم وجود دی‌اکسیدکربن کافی به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون، الکترون‌ها از غشا فتوسنتزی به سمت مولکول‌های اکسیژن از طریق واکنش Mehler جاری شده و یون‌های سوپر اکسید را به‌وجود می‌آورند (Cakmak, 2005). در پاسخ به تنش شوری، فراوانی Cu-Zn SOD کلروپلاستی لکه پروتئینی شماره ۱۵ در رقم حساس (پیش‌تاز) افزایش بیان کمتری داشت اما افزایش بیان در رقم متحمل نیک‌نژاد بیشتر از رقم حساس بود. همسو با این نتایج، تجمع SOD در رقم متحمل برنج و کاهش فراوانی آن در رقم حساس در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu & Tanaka, 2004). کمتر بودن این پروتئین در برگ‌های تحت تنش پیش‌تاز بیانگر سطح بالای تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در کلروپلاست‌های این رقم می‌باشد. به‌عبارت دیگر، در شرایط تنش شوری که میزان تولید ROS افزایش می‌یابد، تعادل بین تولید و حذف آن میزان اثر تنش اکسایشی و همچنین میزان حساسیت نسبت به آن را می‌رساند (Sun *et al.*, 2006). از طرف دیگر، پروتئین‌های peroxiredoxin به‌صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان سلولی این پروتئین‌ها بیانگر آن است که نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندامک‌های سلولی که منبع اصلی ROS هستند، ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل

که با افزایش استفاده دی‌اکسیدکربن و کارایی ماده-سازی فتوسنتز بر تنش غلبه کند. Wan & Liu (2008) و Naghavi (2014) نیز مشابه این نتایج افزایش این آنزیم را به ترتیب در برگ گیاهچه‌های برنج و گندم تحت تنش پراکسید هیدروژن و خشکی گزارش کردند. از طرف دیگر، گزارش شده است که پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز مانند پروتئین اتصال یافته به رویسکو و رویسکو اکتیواز (لکه A در رقم متحمل با افزایش بیان تحت تنش) در رقم حساس جو کاهش بیان نشان دادند (Kausar *et al.*, 2013). در نتیجه افزایش بیان پروتئین رویسکو اکتیواز در این فرآیند در رقم متحمل منجر به افزایش کارایی چرخه کالوین و افزایش تولید قند می‌گردد. از لحاظ وظیفه، پروتئین‌های رویسکو واکنش‌های تثبیت کربن (کربوکسیلاسیون) که در چرخه کالوین گیاهان فتوسنتزکننده انجام می‌شود را کاتالیز می‌کنند. در چرخه کالوین آنزیم‌ها و پروتئین‌های مختلفی فعالیت دارند که یکی از آنها گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) می‌باشد که نقش کلیدی در کاهش گلیسرات ۳- فسفات به گلیسرآلدهید-۳- فسفات بر عهده دارد. گلیسرآلدهید-۳- فسفات تنها یک محصول فتوسنتزی نیست و به‌عنوان پیش‌ماده ریبولوز ۵- فسفات هم عمل می‌کند (Ye *et al.*, 2013). GAPDH B (لکه پروتئینی مشترک شماره ۲) توسط Yang (2008) شناسایی و گزارش شده است که این پروتئین در واکنش نوری، روی کارایی چرخه کالوین تأثیر می‌گذارد و موجب تجمع محصولات فتوسنتزی و محصولات گیاهی می‌شود (Pillai *et al.*, 2002). Fructose-1,6-bisphosphatase که به Fructose-6-phosphate را به کاتالیز می‌کند، نقش تنظیمی مهمی در چرخه کالوین و انتقال میانجی‌های فتوسنتزی بازی می‌کند (Kiddle *et al.*, 1999). در چرخه کالوین، transketolase کاتالیز glycerate 3-phosphate

(Murata, 2008). بنابراین با توجه به کاهش بیان یا عدم بیان این پروتئین‌ها در رقم حساس پیش‌تاز، باعث اختلال در فعالیت فتوسیستم II شده و در نهایت کارایی واکنش نوری کاهش می‌یابد. در حالی که در رقم متحمل نیک‌نژاد این پروتئین‌ها افزایش بیان داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که تنش شوری یکی از اجزای مهم ماشین فتوسنتز، یعنی چرخش اکسیژن و کمپلکس فتوسیستم II را به شدت تحت تأثیر قرار داده است و از این‌رو، در پیری برگ‌ها و احتمالاً مرگ تدریجی سلولی مشارکت خواهد داشت. براساس گزارش Komatsu & Tanaka (2004) در تجزیه پروتئوم غلاف برگ‌های برنج تحت تنش شوری کلرور سدیم، فراوانی این گروه از پروتئین‌ها در پاسخ به تنش شوری افزایش یافته است که بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش است. از طرف دیگر، پروتئین HCF136 که یک پروتئین اساسی برای تعمیر، ساخت و پایداری کمپلکس فتوسیستم II می‌باشد (Plucken *et al.*, 2002) و در تجزیه پروتئوم گندم تحت تنش کاهش بیان آن گزارش شده است (Ford *et al.*, 2011)، در این آزمایش نیز در رقم نیک‌نژاد (لکه پروتئینی با کد B) افزایش بیان نشان داد (جدول ۳ و شکل ۵). رویسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز است که از چندین زیرواحد بزرگ کاتالیزکننده (Catalytic large subunits) و چند زیرواحد کوچک تنظیم‌کننده (Regulative small subunits) (لکه پروتئینی مشترک شماره ۱۴) تشکیل شده است (Spreitzer & Salvucci, 2002). در این آزمایش لکه شماره ۱۴ در رقم نیک‌نژاد افزایش بیان و در رقم پیش‌تاز کاهش بیان نشان داد (جدول ۲ و شکل ۴). Ye *et al.* (2013) گزارش کردند که بعد از تنش ۷۲ ساعته پلی‌اتیلن‌گلیکول میزان رویسکو در برگ‌های گندم افزایش نشان داد و آنها اظهار کردند که این افزایش و تغییر، گندم را در طی تنش اسمزی کمک می‌کند

می‌شود. بعضی از تریوزفسفات‌های تولید شده در چرخه کالوین برای بیوسنتز قند و نشاسته استفاده می‌شوند (Tamoi *et al.*, 2005).

### انتقال پروتون

گروه دیگر از پروتئین‌ها از نظر نوع عمل که شامل لکه پروتئینی مشترک ۱ و نشان‌دهنده زیرواحد بتای ATP synthase complex می‌باشد، مربوط به پروتئین‌های دخیل در انتقال پروتون است. اجزای زیرواحد مختلف کمپلکس ATP synthase در مطالعه پروتئوم برخی گیاهان شناسایی شده‌اند (Albertin *et al.*, 2009). از نظر ساختاری ATP سنتاز کلروپلاستی دارای دو جزء اصلی  $CF_0$  و  $CF_1$  می‌باشد که،  $CF_1$  یک کمپلکس آنزیمی<sup>۱</sup> با پنج زیرواحد آلفا، بتا (لکه شماره ۱)، گاما، دلتا و اپسیلون است در حالی که  $CF_0$  دارای سه زیرواحد a، b و c می‌باشد (von Ballmoos & Dimroth, 2007). یکی از زیرواحدهای  $CF_1$  زیرواحد  $\beta$  است، که یک catalytic and ADP-binding unit می‌باشد و نقش مهمی در متابولیسم انرژی بواسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون درون غشایی<sup>۲</sup> دارد (Ye *et al.*, 2013). وظیفه فیزیولوژیکی اصلی ATP سنتاز کلروپلاستی تولید ATP از ADP در حضور شیب پروتون از طریق غشای تیلاکوئید می‌باشد (von Ballmoos & Dimroth, 2007). افزایش سطح بیان پروتئین‌هایی نظیر ATP سنتاز بر نقش غیر مستقیم آن در جهت همئوستازی یون تحت تنش (مخصوصاً تنش شوری) دلالت می‌کند، زیرا افزایش سطوح ATP تحریک‌کننده  $H^+$ -ATPases برای ایجاد شیب

و fructose-6-phosphate را به xylose-5-phosphate و erythrose-4-phosphate و همچنین phosphate sedoheptulose 7- و glycerate 3-phosphate را به phosphate xylose-5-phosphate و erythrose-4-phosphate انجام می‌دهد (Ye *et al.*, 2013). اظهار داشتند که بیان GAPDH در ریشه‌های گندم تحت تنش شوری اعمال شده با NaCl افزایش بیان نشان داده است در حالی که بعد از آبیاری دوباره گیاهان بیان fructose-1,6-biphosphatase و transkrtolase B کاهش یافته است. این کاهش بیان به‌طور معنی‌داری نسبت تبدیل گلیسرآت ۳-فسفات را کاهش می‌دهد و ممکن است منجر به بیان خاص GAPDH B شود. کاهش بیان transketolase می‌تواند کارایی چرخه کالوین و مسیرهای کامل فتوسنتزی را کاهش دهد (Ye *et al.*, 2013).

در مرحله یا فاز سوم مولکول‌های RuBP دوباره ساخته می‌شوند و چرخه کالوین از ابتدا شروع می‌شود. فاز احیاء توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (Heldt, 1997; Macdonald & Buchanan, 1997). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این فاز شامل sedoheptulose-1,7-biphosphate (لکه پروتئینی مشترک شماره ۳) و fructose 1,6-biphosphate aldolase (لکه شماره ۴) در این آزمایش شناسایی شدند. این دو آنزیم با همدیگر واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت نتیجه آن تشکیل ribulose-5-phosphate می‌باشد. سپس ribulose-5-phosphate فسفریله شده و RuBP را تشکیل دهد که این فسفریله شدن توسط فسفوریبولوکیناز انجام می‌شود که در مطالعه حاضر شناسایی شد. برای تکمیل چرخه RuBP به عنوان ماده هدف، توسط RuBisCo استفاده شده و دوباره فاز اول که همان تثبیت کربن است، انجام

1. Enzyme complex

2. Transmembrane

می‌یابد (Guicherd *et al.*, 1997). همان‌طور که در این آزمایش نیز مشاهده شد، افزایش سطح آنزیم مالات دهیدروژناز در طی تنش در ارقام متحمل (مانند افزایش مقدار لکه پروتئینی شماره ۶ در رقم نیک‌نژاد) نشان‌دهنده نقش این آنزیم برای سازگاری با تنش می‌باشد، درحالی‌که در ارقام حساس سطح این آنزیم تحت تنش کاهش نشان داده است (مانند کاهش مقدار لکه پروتئینی شماره ۶ در رقم پیش‌تاز) (جدول ۲ و شکل ۴) که این نتایج مشابه نتایج Kausar *et al.* (1997) و Guicherd *et al.* (2013) می‌باشد.

#### سایر پروتئین‌ها

تولید پروتئین‌های شوک حرارتی (Ali & Komatsu, 2006) و پراکسی ردوکسین (Gelhay *et al.*, 2005) که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد و همچنین تجزیه RuBisCO از طریق تجزیه پیش‌ماده‌های آن در بسیاری از مطالعات تجزیه پروتئوم تحت تنش‌های غیرزیستی اظهار شده است (Samaj & Thelen, 2007). پروتئین‌های شوک حرارتی (لکه F در رقم حساس پیش‌تاز با کاهش بیان (جدول ۳ و شکل ۵)) در زمرهٔ چاپرون‌های مولکولی بوده و باعث پایداری و بهبود پیچ‌خوردگی دوباره پروتئین‌هایی که در طی تنش‌های گوناگون باز و تجزیه شده‌اند می‌گردد و نقش تعیین‌کننده در حفاظت گیاه علیه تنش برای برگرداندن پروتئین‌ها به شکل طبیعی اولیه آنها و در نتیجه هم‌وستازی سلول برعهده دارند (Wang *et al.*, 2004). این پروتئین‌ها مسئول پیچش پروتئین<sup>۳</sup>، بازسازی آنها<sup>۴</sup>، ترامکانی<sup>۵</sup>، پایداری پروتئین‌ها و غشاء‌ها می‌باشند و همچنین به پیچش دوباره پروتئین‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کنند.

پروتون می‌باشد و این عمل آنتی‌پورترهای  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  را برای انتقال یون‌های  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  به واکوئل و تونوپلاست تحریک می‌کند (Gao *et al.*, 2011). در این راستا، افزایش بیان لکه پروتئینی مشترک شماره ۱ در هر دو رقم نشان‌دهنده نقش مهم پروتئین ATP سنتاز در هم‌وستازی سلولی دارد که با توجه به افزایش بیشتر مقدار این پروتئین در رقم متحمل نیک‌نژاد نشان‌دهنده سازگاری مطلوب‌تر این رقم با شرایط تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری است (جدول ۲ و شکل ۴).

#### سیستم شاتلینگ مالات/اگزالواستات

در سلول‌های گیاهی ایزوفرم‌های گوناگونی از MDHs (مالات دهیدروژناز) (لکه مشترک شماره ۶) شناسایی شده است که تفاوت آنها در کوآنزیم اختصاصی، مکان زیرسلولی و عمل بیولوژیکی می‌باشد (Ding & Ma, 2004; Minarik *et al.*, 2002). در گیاهان پنج گروه مختلف MDH وجود دارد که عبارتند از: chloroplast NADP-dependent MDH، mitochondrial NAD-dependent MDH، microbody NAD-dependent MDH، chloroplast NAD-dependent MDH و cytosolic NAD-dependent MDH (Ding & Ma, 2004). به‌طور کلی MDHs تبدیل داخلی اگزالواستات و مالات را با استفاده از سیستم کوآنزیم NAD/NADP کاتالیز می‌کنند (Minarik *et al.*, 2002). مالات دهیدروژناز یک آنزیم مهم متابولیسم سلولی می‌باشد که تبدیل<sup>۲</sup> اگزالواستات و مالات را کاتالیز می‌کند (Musrati *et al.*, 1998). مقدار این آنزیم در شرایط تنش برای فراهم کردن انرژی مضاعفی که گیاه در طی تنش نیاز دارد، افزایش

<sup>r</sup>Folding

<sup>ε</sup> Assembly

<sup>ه</sup> Translocation

1. Antiporters

2. Conversion

حال رشد انتقال می‌دهد و باعث طولیل شدن زنجیره گلوکان  $\alpha$ -1,4 می‌شود. در مرحله سوم آنزیم انشعاب-دهنده نشاسته زنجیره گلوکان  $\alpha$ -1,4 طولیل شده را جدا کرده و همزمان آن را به یک زنجیره گیرنده برای تشکیل لینکاز  $\alpha$ -1,6 انتقال می‌دهد ( Guan & Keeling, 1998). همچنین اظهار شده است که AGPase یک آنزیم محدودکننده نسبت آبیوستتز است که شامل دو زیرواحد بزرگ (I-AGPase) و دو زیرواحد کوچک (s-AGPase) می‌باشد که زیرواحدهای کوچک آن نقش catalytic برعهده دارند و نقش کلیدی در سنتز نشاسته اجرا می‌کنند (Kim et al., 2002). Ye et al. (2013) گزارش کردند که در طی تنش اعمال شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول، فعالیت آنزیم AGPase کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد که در طی تنش محدودیت‌های بیوستتزی در جهت افزایش کارایی فتوستتزی برداشته می‌شود.

در این آزمایش رقم نیک‌نژاد از نظر صفات مورفولوژی و فیزیولوژی تحت تنش شوری عکس‌العمل مناسب‌تری نسبت به رقم پیش‌تاز نشان داد. همچنین این رقم، افزایش بیان بیشتری در ارتباط با پروتئین‌های مؤثر در پاسخ به تنش شوری نشان داد. در ضمن اغلب پروتئین‌های شناسایی شده، در فرایند دفاع آنتی‌اکسیدانی و چرخه کالوین حضور داشتند و در شرایط تنش‌زا، این مسیرهای متابولیکی در رقم متحمل نسبت به رقم حساس بیشتر تقویت شدند و در مجموع رقم متحمل نیک‌نژاد دفاع در برابر تنش اکسایشی ناشی از شوری را بهتر از رقم حساس انجام داد. همچنین در پاسخ اختصاصی در مقابل تنش، مسیر متابولیکی تعیین‌کننده، دفاع آنتی‌اکسیدانی بود که در رقم متحمل افزایش و تقویت پروتئین‌های مربوطه و در رقم حساس کاهش و تضعیف آن‌ها را در شرایط تشدید تنش شوری نشان داد.

این پروتئین‌ها اغلب درگیر پیچش پلی‌پپتیدهای مجدد سنتز شده و انتقال یا وارد کردن پروتئین‌های مورد نیاز برای سنتز آنها می‌باشند ( Wang et al., 2004). القای زیاد پروتئین شوک حرارتی در طی تنش گرما توسط Han et al. (2009) گزارش شده است. Cui et al. (2005) پروتئین شوک حرارتی را به عنوان یکی از پروتئین‌های مهم و مؤثر در تحمل به تنش سرما عنوان کردند. در عین حال ( Naghavi 2014) کاهش بیان این پروتئین را در رقم حساس گندم تحت تنش خشکی گزارش کرد. از طرف دیگر پروتئین Heat shock cognate 70KDa در مطالعه پروتئوم ارقام جو تحت تنش در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش نشان داد که با توجه به نقش این پروتئین‌ها می‌تواند نشان‌دهنده نقش آنها در تحمل به تنش باشد (Kausar et al., 2013).

نشاسته یک پلی‌ساکارید ذخیره‌ای مهم در گیاهان محسوب می‌شود که منبع انرژی برای فرآیندهای متابولیکی مختلف می‌باشد (Kruger, 1997). در سنتز نشاسته سه آنزیم: آدنوزین بی‌فسفات گلوکز پیروفسفاتاز (AGPase)، نشاسته سنتاز و آنزیم منشعب‌کننده فعالیت دارند ( Guan & Keeling, 1998). در این آزمایش تنها یکی از این آنزیم‌ها شناسایی شد (لکه پروتئینی با کد C در رقم نیک‌نژاد) که AGPase بود. واکنش تشکیل ADP-glucose و پیروفسفات غیرآلی را از ATP و glucose-1-phosphate کاتالیز می‌کند. محصول نهایی این واکنش که ADP-glucose می‌باشد پیش‌ماده برای سنتز نشاسته است ( Tetlow et al., 2003). سپس نشاسته سنتاز، گلوکز را از ADP-glucose به انتهای غیر کاهنده زنجیره پذیرای در

1. ADP-glucose pyrophosphorylase
2. Branching enzyme
3. Precursor



## REFERENCES

- Albertin W, Langella O, Joets J, Negroni L, Zivy M, Damerval C, Thiellement H (2009) Comparative proteomics of leaf, stem, and root tissues of synthetic *Brassica napus*. *Proteomics*, 9: 793-799.
- Ali GM, Komatsu S (2006) Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. *J. Proteome Res.* 5(2): 396-403.
- Araus JL, Ceccarelli S, Grando S (1997) Relationship between leaf structure and carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 533-541.
- Arias D (2007) Calibration of LAI-2000 to Estimate Leaf Area Index and Assessment of its Relationship with stand productivity in six Native and Introduced tree Species in costarica. *Forest Ecol. Manag.* 247: 85-193.
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologica Plantarum*, 85: 235-241.
- Bajji M, Lutts S, Kinet KM (2001) Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three *durum* wheat (*Triticum durum* Desf) cultivars performing in arid conditions. *Plant Sci.* 60: 669-681.
- Berardini TZ, Mundodi S, Reiser R, Huala E, Garcia-Hernandez M, Zhang P, Mueller LM, Yoon J, Doyle A, Lander G, Moseyko N, Yoo D, Xu I, Zoeckler B, Montoya M, Miller N, Weems D, Rhee SY (2004) Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol.* 135:745-755.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7(72): 248-254.
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 521-530.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12): 3162-3172.
- Dhindsa RS (1991) Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 95: 648-651.
- Ding Y, Ma QH (2004) Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie*, 86: 509-518.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193-198.
- Ford KL, Cassin A, Bacic A (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Plant Sci.* 2(44): 1-11.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W, Yan Y (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Photochem.* 72(10): 1180-1191.
- Gelhay E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system, *Cell Mol. Life Sci.*, 62:24-35.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12): 909-930.
- Guan HP, Keeling PL (1998) Starch Biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple



- isoenzymes of starch synthase and branching enzyme. Trends Glycosci Glyc. 10: 307-319.
- Guicherd, P., Peltier, J.P., Gout, E., Bligny, R. and Marigo, G. (1997) Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L. malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. Trees, 11: 155-161.
- Han F, Chen H, Yan MF, Liu GS, Shen SH (2009) A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. Biochimica et Biophysica Acta., 1794: 1625-1634.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463-499.
- Hashimoto M, Toorchi M, Matsushita K, Iwasaki Y, Komatsu S (2009) Proteome analysis of rice root plasma membrane and detection of cold stress responsive proteins. Protein Pept. Lett. 16: 685-697.
- Heide H, Kalisz HM, Follmann H (2004) The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. J. Plant Physiol. 161: 139-149.
- Heldt HW (1997) Plant biochemistry and molecular biology. Oxford: Oxford University Press.
- Herbert B (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis, 20(4-5): 660-663.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Manda A, Palva TE, Welin B (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. J. Exp. Bot. 51: 177-185.
- Hosseini Salekdeh Gh, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics, 2: 1131-1145.
- Ifuku K, Ishihara S, Shimamoto R, Ido K, Sato F (2008) Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants. Photosynth. Res. 98: 427-437.
- Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S (2013) Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. Amino Acids, 44: 345-359.
- Kiddle G, Bennett R, Hick A, Wallsgrove R (1999) C-S lyase activities in leaves of crucifers and non-crucifers, and the characterization of three classes of C-S lyase activities from oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Environ. 22: 433-445.
- Kim SH, Mizuno K, Fujimura T (2002) Regulated expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and chalcone synthase during root development in sweet potato. Plant Growth Regul. 38: 173-179
- Komatsu S, Tanaka N (2004) Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. Proteomics, 4: 938-949.
- Kruger NJ (1997) Carbohydrate synthesis and degradation. In: Dennis, D.T., Turpin, D.H Lefebvre, D.D. and Layzell, D.B. (Eds.), Plant Metabolism (2<sup>nd</sup> ed., pp. 83-104). Essex: Addison Wesley Longman.
- Macdonald, F.D. and Buchanan, B.B. (1997) The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Eds.), Plant Metabolism (2<sup>nd</sup> ed., pp. 299-313). Essex: Addison Wesley Longman.
- Martinez JP, Luttus S, Schanck A, Banjji M (2004) Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L. J. Plant Physiol. 16: 1041-1051.
- Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M,

- Antalik M (2002) Malate dehydrogenases-structure and function. *General Physiol. Biophys.* 21: 257-265.
- Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin A (2004) Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species salt stress. *J. Plant Physiol.* 169: 25-33.
- Musrati RA, Kollarova M, Mernik N, Mikulasova D (1998) Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 17: 193-210.
- Naghavi MR (2014) Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. PhD Thesis. Faculty of Agriculture. University of Tabriz. Iran (in Farsi)
- Okcu G, Kaya MD, Atak M (2005) Effect of salt and drought stress on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum*). *Turk. J. Agric.* 29: 137-243.
- Petrov VD, Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB plants* 2012. pls014.
- Pillai MA, Lihuang Z, Akiyama T (2002) Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal location of OsGAPDH, a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 34-42
- Plucken H, Muller B, Grohmann D, Westhoff P, Eichacker LA (2002) The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 532: 85-90.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163: 1037-1046.
- Samaj J, Thelen JJ (2007) Plant proteomics. In: Samaj J, Thelen JJ (Eds.). *Plant proteomics*. Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Republic.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449-475.
- Sun Y, Ahokas RA, Bhattacharya SK, Gerling IC, Carbone LD, Weber KT (2006) Oxidative stress in aldosteronism. *Cardiovasc. Res.* 71: 300-309.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photo inhibition? *Trends Plant Sci.* 13: 178-182.
- Tamoi M, Nagaoka M, Yabuta Y, Shigeoka S (2005) Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnol.* 22: 355-360.
- Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131: 454-462.
- Thiellement H, Zivy M, Plomion C (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *Chromatography B.* 782: 137-149.
- Tetlow IJ, Davies EJ, Vardy KA, Bowsher CG, Burrell MM, Emes MJ (2003) Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J. Exp. Bot.*, 54: 715-725.
- Tewari RK, Hadacek F, Sassmann S, Lang I (2013) Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environ. Exp. Bot.* 91: 74-83.
- Twyman RM (2004) Principles of

- proteomics. BIOS Scientific Publishers.
- Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci.* 165: 1411-1418.
- von Ballmoos C, Dimroth P (2007) Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochem.* 46: 11800-11809.
- Wan XY, Liu JY (2008) Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol. Cell Proteomics*, 7: 1469-1488.
- Wang MC, Peng ZY, Li Cl, Li F, Liu C, Xia GM (2008) Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/ Thinopyrum ponticum*. *Proteomics*, 8: 1470-1489.
- Wang W, Vinocur B, Soseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-52.
- Yadav SK, Singla-Pareek SL, Ray M, Reddy MK, Sopory SK (2005) Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337: 61-67.
- Yang YJ (2008) Proteome comparative analysis of Cryptochromes of *Arabidopsis*. Hunan University, Changsha.
- Ye J, Wang S, Zhang F, Xie D, Yao Y (2013) Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG<sub>6000</sub> stress and rewatering. *Plant Omics Journal*, 6(4): 286-294.
- Yildiz M (2007) Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Soluble Leaf Proteins of a Salt-sensitive (*Triticum aestivum*) and a Salt-tolerant (*T. durum*) Cultivar in Response to NaCl Stress. *J. Integr. Plant Biol.* 49(7): 975-981.
- Yıldız M, Akçalı N, Terzi H (2015) Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid. *J. Plant Physiol.* 179: 90-99.
- Yong Z, Hao-Ru T, Ya L (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbree cultivars with short-term low temperature stress. *J. Agric. Sci.* 4: 456-462.
- Zang X, Komatsu S (2007) A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochem.* 68: 426-437.