ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰
صفحه ۹۶-۸۷

تجزیه پروتئوم دو رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش شوری

فرناز فرهادی[۱]، محمدرضا نقوی[۲]، حسن زینالی‌خانقاه[۳]، کاظم پوستینی[۴]، فریبا ابوئی-مهریزی[۵]، بهمن یزدی‌صمدی[۶]، هوشنگ علیزاده*[۷]

۱،۲،۳،۴،۵،۶و۷- به ترتیب کارشناس ارشد، استاد، دانشیار، استاد، دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری سبب کاهش تولید محصولات زراعی می‌شوند. آسیب ایجاد شده در اثر تنش شوری، شامل اختلال در عمل غشاء پلاسمایی، افزایش میزان متابولیت-های سمی، ممانعت از جذب مواد غذایی و فتوسنتز، ایجاد گونه فعال اکسیژن (ROS) و در نهایت مرگ سلول و گیاه است. در این تحقیق اثر شوری در ساعات اولیه تنش بر الگوی پروتئوم برگی گیاهچه‌های گندم (*Triticum aestivum* L.) مورد بررسی قرار گرفت. بذور دو رقم متحمل به شوری (رقم روشن) و حساس به شوری (رقم فلات) در گلخانه کشت شدند. در مرحله پنجه‌زنی، گیاهچه‌ها تحت تنش شوری با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم قرار گرفتند و نمونه‌برداری ۳، ٦، ۱۲ و ٢٤ ساعت پس از اعمال تنش از برگ‌ها انجام شد. الگوی پروتئوم برگ گندم به وسیله تکنیک الکتروفورز دو بعدی بدست آمد. نتایج نشان داد که در رقم مقاوم به طور متوسط ٨٦ لکه پروتئینی در مقایسه با شاهد تغییرات معنی‌داری داشتند که بیان ۷۸ درصد پروتئین‌ها افزایش و ۱۳/۵ درصد کاهش یافت. در رقم حساس به طور متوسط ٩٤ لکه پروتئینی تغییرات معنی‌داری داشته و در این رقم ۲۵ درصد پروتئین‌ها افزایش بیان و ۵۸/۵ درصد کاهش بیان نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز ژل دو بعدی، پروتئومیکس، تنش شوری، گندم نان

مقدمه

غلات نقش ویژه و مهمی در الگوی مصرف هر کشوری دارند و یکی از مهمترین تولیدات غـــذایی برای انسان می‌باشند. تقریباً ۵۵ درصد از پروتئین‌ها، ۱۵ درصد چربی‌ها، ۷۰ درصد گلوسیدها و به طور کلی ۵۵-۵۰ درصد کالری مصرف شده توسط انسان در دنیا به وسیله غلات تأمین می‌گردد. در این میان گندم به عنوان یک کالای مهم تجاری در دنیا و همچنین به عنوان سلاحی برتر در مناسبات سیاسی و جهانی است و روز به روز بر اهمیت استراتژیک آن افزوده می‌شود. گندم نان بعنوان اصلی‌ترین غذای مردم از اهمیت ویژه‌ای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

برخوردار می‌باشد (۱). از جمله محدودیت‌های موجود در رشد گیاهان، وجود تنش‌های غیر زنده همچون تنش شوری می‌باشد. اگرچه آب و نمک‌های حل شده برای رشد گیاه ضروری هستند، اما استفاده مجدد آب و میزان تبخیر بالای آن در نواحی خشک و نیمه خشک باعث تجمع نمک شده که به عنوان یک پدیده عمومی شوری تلقی می‌شود (۲). به هر حال در کشاورزی یکی از مشکلات عمده شوری، به علت تجمع نمک در اثر آب آبیاری است (۳) و امروزه تنش شوری به عنوان یک تنش غیر زنده اصلی، اثرات زیانباری بر تولید و کیفیت محصولات زراعی بر جای گذاشته است (۸) که موجب وارد آمدن تنش به گیاه می‌شود. تنش در نتیجه روند غیرعادی فرآیندهای فیزیولوژیکی و از تأثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می‌شود و با توان آسیب‌رسانی، موجب متابولیسم غیرعادی شده و ممکن است به صورت افت رشد، مرگ گیاه و یا مرگ بخشی از گیاه بروز کند (۲). بنابراین شوری خاک به دلیل جلوگیری از جذب آب و عناصر به درون گیاه یکی از مهمترین محدودیت‌های رشد گیاهان زراعی محسوب می‌شود (۸).

یکی از مشکلات تنش شوری، وجود غلظت بالای یون‌های سدیم و کلر است (۹) وقتی سدیم وارد سلول‌ها شده و در اثر تجمع به سطح بالایی برسد، برای آنزیم‌ها سمی خواهد بود (۱۰)، پس شوری خاک را می‌توان بر اساس میزان سمیت ناشی از کلریدها و سولفات‌های سدیم مشخص کرد. هدایت الکتریکی در عصاره اشباع خاک شور، بیش از ۴ دسی زیمنس بر متر (تقریبا معادل ۴۰ میلی مولار کلرید سدیم) است (۱۱) و شوری در مراحل مختلف رشد از جوانه‌زنی گرفته تا گلدهی بر گیاهان مؤثر است (۵) برخی از پیامدهای تنش شوری، آبگیری سلولی (۹) و تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد که به نوبه خود بر سلول متابولیسم سلولی تاثیر می‌گذارند (۹، ۱۲). برای حفاظت گیاهان در مقابل این اثرات مضر، گیاهان سطوح مولکولی پاسخ را به خدمت گرفته (۱۳) و مسیرهای سیگنالینگ با تغییر پروتئین‌ها یا متابولیت‌های مختلف به تنش پاسخ می‌دهند (۱۵، ۱٤، ۱۲، ۹). از پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری، دو گروه اصلی قابل ذکر هستند، (۱۶) دسته اول پروتئین‌های ساختاری، شامل HSP[1] و LEA[2] هستند که در حفاظت گیاه در برابر تنش و بازسازی خسارات وارده فعالیت دارند. از جمله دیگر پروتئین‌های این گروه می‌توان به پروتئینازها، پروتئین‌های دفاعی گیاه، پروتئین‌های غشایی مثل انتقال دهنده‌ها، پروتئین‌های سنتز کننده، پروتئین‌های دخیل در سنتز اسموپروتاکتانت‌ها، پروتئین‌های دخیل در پروسه متابولیک سلولی مثل متابولیسم کربوهیدرات، متابولیسم ثانویه، الکل دهیدروژناز و آلدئید دهیدروژناز اشاره کرد. دسته دوم پروتئین‌های تنظیمی هستند، مثل فاکتورهای پروتئینی دخیل در تنظیم انتقال پیام و بیان ژن که به احتمال قوی به تنش شوری پاسخ می‌دهند. (۱۷، ۱۶، ۱۲) این پروتئین‌ها شامل، انواع فاکتورهای رونویسی، پروتئین کینازها مانند MAPK[3]، MAPKKK[4]، S6K[5] (۱۸)، HK[6] (۱۹) و RPK[7] (۲۰)، پروتئین فسفاتازها مثل پروتئین فسفاتاز 2C[8]، PI turnover-related proteins مثل فسفولیپاز C (۲۱)، فسفولیپاز D (۲۲) و فسفاتیدیل اینوزیتول-۴-فسفات-۵-کیناز[9]، پروتئین‌های متصل شونده به کالمودولین و پروتئین‌های متصل شونده به Ca^{++} می‌باشند (۲۳).

در حال حاضر از میکرو اری و پروتئومیکس برای آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح mRNA و پروتئین و تعیین نقش ژن‌ها در سطح ژنومیک در شرایط نموی و محیطی مختلف استفاده می‌شود. این روش‌ها امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی خاص را فراهم می‌کنند و درک بهتری از تحمل به شوری را موجب می‌شوند. مهم‌ترین روشی که در حال حاضر به بررسی پروتئین‌ها در مقیاس وسیع می‌پردازد، پروتئومیکس است. (۲٤) پروتئومیکس رهیافت مناسبی را برای کشف ژن‌ها و مسیرهای پاسخ به تنش مهیا می‌کند و در سال‌های اخیر پیشرفت‌های

[1] Heat shock proteins
[2] Late embryogenesis abundant
[3] Mitogen-activated protein kinase
[4] Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
[5] Ribosomal S6 kinase
[6] Histidine kinase
[7] Receptor-like protein kinase
[8] PP2C
[9] PIP5K

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

تکنیکی در استخراج، تفکیک، کمی سنجی و شناخت پروتئین‌های گیاه، این روش را برای آنالیز مناسب کرده است (۲۵). به این ترتیب، توجهی که مفهوم پروتئوم در حال حاضر به خود جلب کرده است (۲۵، ۲۴)، با هدف شناسایی و تشریح پاسخ‌های پیچیده در یک سیستم بیولوژیکی مقابل محرک‌های مختلف می‌باشد و اطلاعات زیادی می‌تواند از طریق مجموعه‌ای از آزمایش‌ها در مقایسه با روش‌های کلاسیک مشاهده‌ی تغییر غلظت‌ها یا تغییرات سطوح یک پروتئین خاص بدست آید (۲۶). با استفاده از تکنیک الکتروفورز ژل دو بعدی[10] در حاضر می‌توان بیش از دو هزار پروتئین را به طور همزمان در یک ژل از هم تفکیک نمود (۲٤) و از سال ۱۹۹۰ به بعد، با ابداع روش‌هایی برای شناسایی پروتئین‌ها بر پایه طیف سنجی جرمی، کارایی الکتروفورز دو بعدی دو چندان شده است (۲۷) به این ترتیب تنش شوری به دلیل اهمیتی که به عنوان یک عامل محدود کننده در دست یابی به عملکرد مطلوب دارد در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار داشته است که البته استفاده از پروتئومیکس می‌تواند کمک موثرتری به بررسی پاسخ گیاه در مقابل تنش شوری باشد.

در بررسی اثر شوری آب بر برخی صفات فیزیولوژیک چهار رقم گندم زراعی، محلوجی و همکاران (۴) بیان داشتند که با افزایش EC آب آبیاری، درصد سدیم برگ، افزایش و درصد پتاسیم برگ، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک، وزن هزار دانه و تعداد دانه در سنبله، کاهش معنی‌داری داشت. پوستینی (۵) در ارزیابی ۳۰ رقم گندم از نظر واکنش به تنش شوری، رقم روشن را به عنوان رقم متحمل و رقم فلات را رقم حساس به شوری معرفی نمود. میقانی و همکاران (۶)، در بررسی اثر تیمارهای متفاوت سدیم کلرید در مراحل مختلف رشد و نمو (پنجه‌زنی، تورم غلاف، گلدهی و گرده افشانی) در دو رقم گندم حساس و متحمل به شوری بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گندم، اظهار داشتند که کاهش شدت و حذف باندهای پروتئینی در رقم حساس چشمگیرتر بوده و رقم متحمل توانایی بیشتری در حفظ پروتئین‌های برگ در پاسخ به تنش شوری دارد. دانلی و همکاران (۲۸)، در بررسی الگوی پروتئینی برگ گندم، ۱۴۲ پروتئین را بوسیله تکنیک الکتروفورز ژل دوبعدی و اسپکترومتری جرمی[11] به روش MALDI-TOF شناسایی و طبقه‌بندی کرده و بعنوان یک مرجع در تحقیقات گندم ارائه دادند. یلدیز و همکاران (۲۹) الگوی پروتئینی دو رقم گندم زراعی تتراپلوئید و هگزاپلوئید و سه رقم گندم وحشی دیپلوئید را تحت تنش شوری، بوسیله الکتروفورز ژل دوبعدی بررسی کرده و اظهار داشتند، بیشترین تغییرات مربوط به پروتئین‌هایی در محدوده pH= ۵/۱-۶/۹ و وزن مولکولی پائین[12] (MW= ۲۰/۳-۳۰/۶ kDa) بوده و تحمل به تنش شوری بیشتر به ژنوم A نسبت داده می‌شود.

هدف از این مطالعه، بررسی و مقایسه اثرات شوری در مراحل اولیه تنش بر الگوی پروتئینی برگ دو رقم گندم متحمل و حساس به شوری و شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش با استفاده از راهکار پروتئومیکس می‌باشد. استفاده از این اطلاعات در کنار داده‌های حاصل از سایر تکنیک‌های مولکولی، ضمن شناسایی دقیق تر اثرات شوری بر گیاه و مکانیزم‌های مولکولی مقاومت به شوری، می‌تواند بستر مناسبی را جهت بهبود صفت مقاومت به شوری در گندم و سایر گیاهان مشابه فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

شرایط گیاه و نحوه اعمال تیمار

بذور گندم رقم روشن (رقم متحمل به شوری) و رقم فلات (رقم حساس به شوری) (۵) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید و در ۵ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار گرفت. بذور در مخلوطی از پرلیت و کوکوپیت و ورمی کولیت به نسبت ۳:۲:۱ کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه که با پلاستیک جهت کنترل آفت و بیماری ایزوله شده بودند قرار گرفته و جهت کنترل دما از کولر استفاده شد.(متوسط دما ۲۲ درجه سانتی‌گراد و متوسط رطوبت ۸۰ درصد). آبیاری با آب خالص و محلول هوگلند انجام شد. به منظور جلوگیری از تنش در ابتدا از محلول هوگلند $\frac{1}{8}$ و سپس به فاصله هر ۵ روز یک بار غلظت محلول به $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{2}$ و ۱ افزایش یافت. پیش از مرحله نمونه‌گیری و برای جلوگیری از خطای تجمع املاح که می‌تواند در شدت و یا عدم

[10] Two-dimensional (2D) gel electrophoresis.

[11] Mass spectrometer

[12] Low-molecular weight (LMW)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

یکنواختی تنش اعمال شده اثر بگذارد، EC ورودی و خروجی گلدان‌ها اندازه‌گیری و در موارد لازم به وسیله آب مقطر، املاح اضافی از محیط خارج شد. ۲۰ روز پس از جوانه زنی بذور، در مرحله چهار برگی گیاهچه‌ها، آبیاری با آب حاوی NaCl به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار انجام شد. در بازه زمانی ۳ و ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش از برگ‌ها نمونه‌گیری به عمل آمد و نمونه‌ها به سرعت در نیتروژن مایع فریز و برای نگهداری تا زمان استخراج پروتئین به فریزر با دمای ۸۰- سانتی گراد منتقل شدند (۳۰).

اندازه گیری غلظت سدیم و پتاسیم

به منظور بررسی اثر تنش شوری اعمال شده بر ارقام روشن و فلات، اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم به روش فلیم فتومتری انجام شد (۳۱).

استخراج پروتئین‌ها

استخراج پروتئین از بافت برگی به روش دامروال و همکاران (۳۲) با اندکی تغییرات انجام گرفت و در نهایت رسوب بدست آمده با استفاده از دستگاه لیوفیلایزر خشک گردید و پودر پروتئین بدست آمده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

به منظور استخراج پروتئین، ۵۰ میکرو لیتر به ازاء هر یک میلی گرم (۵۰µl/mg) پودر لیوفیلاز[13] شده، محلول لیزکننده[14] (8 M, Urea., 4% w/v CHAPS., 35 mM, Tris., 1% w/v, DTT., 1% v/v, Ampholyte pH 3.5-10) اضافه شد. پس از یک ساعت ورتکس مداوم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مجدداً سانتریفیوژ در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد و دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت. مایع روئی (سوپرناتانت) جمع‌آوری و در دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

تعیین غلظت پروتئین‌ها

برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش برادفورد (۳۳) استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفوتومتر با محلول BSA[15] کالیبره و منحنی استاندارد رسم گردید، سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. میانگین غلظت پروتئین‌ها $\frac{\mu g}{\mu l}$ ۱۲ بود.

الکتروفورز

در بعد اول به منظور انجام الکتروفورز، از ژل نواری (IPG Strip) ۱۷ سانتی متری با pH=۴-۷ تهیه شده از شرکت BioRad برای بعد اول استفاده شد. ژل نواری در ۳۰۰ میکرولیتر از محلول آبدهی مجد د[16] (8 M Urea., 2% CHAPS., 0.002 % Bromophenol Blue., 2 % IPG Buffer., 0.018 M DTT) حاوی ۱۲۰ میکرو گرم پروتئین به مدت ۱۲ ساعت درون سینی ریهایدریشن قرار داده شد. این بعد در دستگاه مولتی فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس (Amersham Bioscienc) و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد انجام شد. به جریان درآوردن یک ژل ۱۷ سانتی متری با pH 4-7 نیاز به ۴۲ هزار ولت هورس (42KVh) داشت که این میزان ولت هورس در چهار مرحله (150 Vh تا ولتاژ 300 V)، (300 Vh تا ولتاژ 500 V)، (2000 Vh تا ولتاژ 3500 V) و (39500 Vh در ولتاژ 3500 V) تامین شد. این مرحله با شدت جریان ۱ mA و توان ۵ W، پانزده ساعت به طول انجامید. به منظور انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت Bio-Rad استفاده شد. قبل از انجام بعد دوم، نوار ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول متعادل کننده[17] (50 mM Tris-HCl, pH 8.8., 6 M, Urea., 2 %, SDS., 30 %, Glycerol., 1 %, DTT., 0.002 %, Bromophenol Blue) شناور گردید. سپس نوار ژل بر روی ژل اکریل آمید با غلظت ۱۲/۵ درصد و با اندازه ۲۰×۱۶ سانتی‌متر قرار گرفته و با محلول آگارز ۰/۵ درصد پوشانده شد. ران نمودن ژل در سه مرحله (۲ساعت، ۵ میلی آمپر)، (۶ساعت، ۱۰ میلی آمپر)، (۳ساعت، ۲۰ میلی آمپر) و با دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمانی که رنگ برموفنل بلو به ۲ تا ۳ میلی متری انتهای ژل رسید، ادامه یافت.

رنگ آمیزی و تصویر برداری

پس از رنگ آمیزی ژل‌ها با محلول نیترات نقره طبق پروتکل بلوم (۳۴)، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت Bio-

[13] Lyophilized
[14] Lysis
[15] Blood Serum Albumin
[16] Rehydration
[17] Equilibration

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

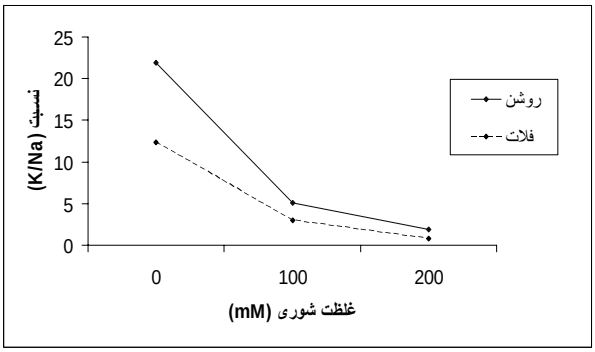
Rad و بوسیله نرم افزار PDQuest اسکن شد و به منظور بررسی کمّی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار Melanie7.0 (Melanie7.0,Switzerland) استفاده شد. لکه‌هایی که تغییرات معنی‌داری در روند تنش داشتند از روی ژل جدا شدند.

نتایج و بحث

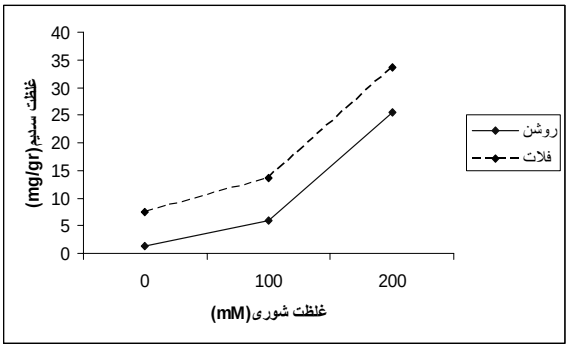
همانطور که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد، غلظت سدیم برگی و نسبت K^+/Na^+ بین ارقام و بین سطوح شوری و اثر متقابل رقم در شوری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. دو رقم در اثر تنش شوری افزایش غلظت سدیم و کاهش نسبت K^+/Na^+ را نشان دادند. در رقم حساس میزان جذب سدیم (شکل ۱) و در رقم متحمل، نسبت K^+/Na^+ بیشتر از رقم دیگر بود (شکل ۲)، که این نتایج، نشان دهنده وجود مکانیسم‌های تحمل به صورت عدم جذب انتخابی سدیم و جذب فعال پتاسیم توسط ریشه‌هاست. نتایج، نشان دهنده اعمال تنش و تأثیر شوری بر روی گیاه بوده و با نتایج بنده حق و همکاران (۷) در مورد گیاه گندم منطبق است. بررسی نتایج الکتروفورز دو بعدی و تغییر در تعداد و حجم لکه-های مشاهده شده در این تحقیق، نشان داد که در رقم روشن، در تمام تیمارها تعداد لکه‌ها نسبت به شاهد افزایش یافته است و در رقم فلات، روند کاهشی در تعداد لکه‌های مشاهده شده نسبت به شاهد دیده شد. به عنوان مثال، در شکل ۳، در رقم روشن (متحمل به شوری)، افزایش بیان لکه ٦١٤ نسبت به شاهد در زمان ۳ ساعت پس از اعمال تنش (تیمار 100mM) نشان داده شده است. بررسی وضعیت همین لکه در رقم فلات (حساس به شوری) نشان می‌دهد که در تیمار 100mM پس از ۱۲ ساعت افزایش بیان قابل توجهی داشته و این پاسخ در تیمار 200mM خیلی سریع‌تر، یعنی پس از ۳ ساعت مشاهده می شود. (شکل ۳).

جدول۱- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف شوری روی غلظت سدیم و Na^+/K^+ در برگ گندم

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		غلظت سدیم	(K/Na)
رقم	۱	٣٤/٥٣**	٦٨/٤٧٢٤**
شوری	۲	١١٤٣/٠٣٣**	٤٣٤/٤٩**
رقم× شوری	۲	٥/٧٣**	٣٧/٢٥**
خطا	١٢	٠/٣٧٤٥	٠/٠٢٦٧٥

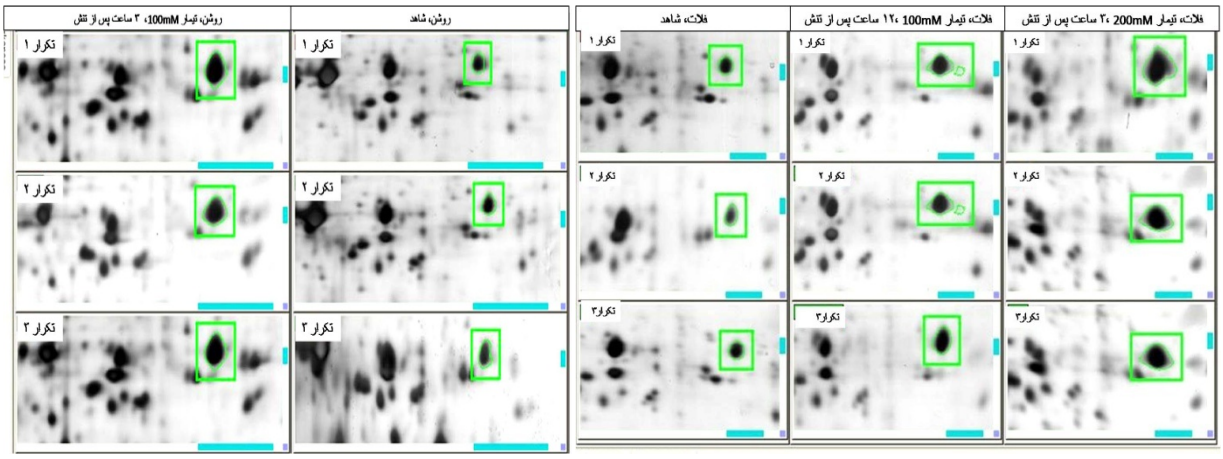


شکل ۱- اثر سطوح شوری بر غلظت سدیم برگی گیاه گندم



شکل۲- اثر سطوح شوری بر نسبت (K/Na) برگی گیاه گندم

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]



شکل۳- همان‌طور که در شکل سمت راست، دیده می‌شود، در رقم روشن، لکه شماره ٦١٤ در تیمار تنش (۱۰۰ میلی مولار، ۳ ساعت) نسبت به شاهد به طور تکرارپذیری افزایش بیان نشان داده است. همچنین در شکل سمت چپ، افزایش بیان لکه شماره ۶۱۴ در تیمارهای تنش نسبت به شاهد در رقم حساس فلات دیده می‌شود.



شکل٤- نمونه‌ای از ژل دو بعدی با رنگ‌آمیزی نیترات نقره استخراج شده از برگ گندم (رقم روشن، سطح ۲۰۰ میلی مولار، ۳ ساعت بعد از تنش)

بررسی تغییرات لکه‌های دیگر نیز، نشان داد که در کل، تعداد و بیان لکه‌ها در رقم روشن در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد و این پاسخ در همان ساعات اولیه تنش، خود را نشان می‌دهد، در حالیکه تعداد و بیان لکه‌ها در رقم فلات یک روند کلی کاهشی را نشان می‌دهد و در مواردی هم که در پاسخ به تنش افزایش بیان نشان می‌دهد، نسبت به رقم روشن روند کندتری دارد. به همین ترتیب با بررسی تغییرات مشاهده شده، لکه‌هایی که تغییرات معنی‌داری نشان دادند انتخاب و در مقایسه با ژل رفرنس (۲۸) تعدادی از لکه‌ها شناسایی شدند. پس از انجام اسپکترومتری جرمی، پروتئین‌های موثر در تنش شوری شناسایی شدند که تعدادی از آنها در جدول شماره ۲ آمده است. یکی از لکه‌های شناسایی شده در پاسخ به تنش شوری، لکه شماره ۷۶ بود که همان آنزیم Glycine decarboxylase می‌باشد. محل فعالیت این آنزیم در میتوکندری است و یکی از آنزیم‌های چرخه گلی اکسالات می‌باشد که با مصرف NADPH از تولید سوپراکسید جلوگیری می‌کند (شکل۵) (۳۵)، و در بیوسنتز اسیدآمینه هم نقش دارد (۳۶). گلایسین به عنوان پیش ساز گلایسین بتائین شناخته شده است و با دکربوکسیله شدن توسط آنزیم *GCS*[18] به سرین و در ادامه به اتانول آمین تبدیل می‌شود. اتانول آمین نیز تحت تاثیر

[18] Glycine decarboxylase

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

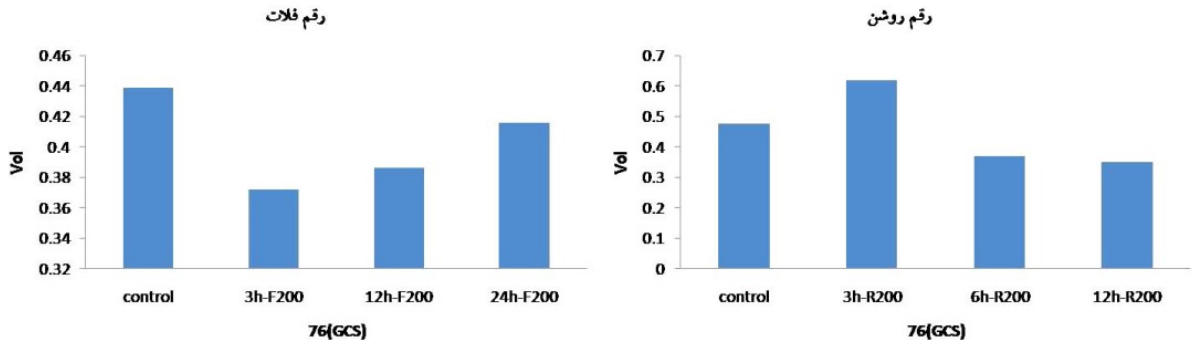
متیلاسیون، به کولین و سرانجام گلایسین بتائین تبدیل می‌شود. (۳۷، ۳۶). بررسی پروتئوم برگ گندم دوروم در پاسخ به تنش شوری نشان از افزایش بیان این آنزیم دارد (۳۶). همان طور که در شکل دیده می‌شود، در رقم فلات کاهش در میزان این آنزیم اتفاق می‌افتد، اما در رقم روشن که متحمل به شوری می‌باشد، ۳ ساعت پس از اعمال تنش ۲۰۰ میلی مولار، بیشترین افزایش بیان مشاهده می‌شود.

از دیگر لکه‌های شناسایی شده، لکه شماره ۱۴۲ مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد و روند تغییرات آن در شکل ٦ مشاهده می‌شود. آنزیم SOD[19] نیز به عنوان یکی از انواع آنزیم-های برطرف کننده گونه‌های اکسیژن فعال بوده (۳۸، ۳۶) و در پاسخ به شوری افزایش آن گزارش شده است (۳۶). این آنزیم به عنوان اولین خط دفاعی در مقابل رادیکال‌های سوپراکسید عمل کرده و آنها را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند (۳۸). طبق شکل ۶، آنزیم SOD در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری (سطح ۲۰۰ میلی مولار) در رقم فلات بیشترین افزایش را نشان داد و این تغییر برای رقم متحمل در زمان ۳ ساعت اتفاق افتاد. افزایش سریع‌تر میزان این آنزیم در رقم متحمل، با در نظر گرفتن نقش این آنزیم، می‌تواند یکی از دلایل برتری رقم روشن در پاسخ به تنش باشد.

لکه شماره ۲۳۳۱ مربوط به زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو[20] می‌باشد. روبیسکو یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر چرخه کالوین است (۳٦). تغییرات این پروتئین، کاهش در میزان بیان آن را در رقم روشن و در سطح ۲۰۰ میلی مولار نشان میدهد، همان طور که در شکل ۷ دیده می‌شود، در رقم فلات هم به دنبال یک افزایش در ساعات اولیه تنش، کاهش بیان اتفاق می‌افتد. مطابق با نتایج مشاهده شده در این تحقیق، کاهش بیان این زیرواحد در پروتئوم برگ گندم دوروم نیز گزارش شده است (۳٦).

به همین ترتیب پروتئین‌های مختلفی در نتیجه بررسی پروتئوم برگ گندم نان (ارقام متحمل و حساس به شوری) شناسایی شدند که روند و سرعت این تغییرات در ارقام مورد بررسی تا حدودی متفاوت با یکدیگر بود. بررسی و شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری درک ما را از فرایند مقاومت در برابر تنش شوری توسعه خواهد داد و زمینه را برای بهبود ژنتیکی گیاهان در مقابل تنش برای اصلاحگران هموار خواهد کرد. بررسی الگوی پروتئوم در رقم مقاوم، حاکی از افزایش تعداد لکه‌های پروتئین و افزایش بیان آنها در مقایسه با شاهد می‌باشد. اما در رقم حساس لکه‌های پروتئینی تیمار تنش در مقایسه با شاهد در اکثر موارد کاهش نشان می‌دهد گرچه در برخی موارد نیز افزایش بیان هم مشاهده شده است. به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که گیاه در برابر تنش شوری با بیان پروتئین‌های جدید و افزایش بیان پروتئین‌های در حال بیان به تنش شوری پاسخ می‌دهد. اما نتایج مطالعات قبلی در مورد سایر گیاهان نشان می‌دهد که طیف وسیعی از پروتئین‌ها (پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیکی، پروتئین‌های دخیل در کنترل بیان ژن، پروتئین‌های دخیل در سیستم فتوسنتزی، پروتئین‌های درگیر در مسیر متابولیسم هیدرات‌کربن) در پاسخ به تنش شوری تغییر بیان نشان می‌دهند.

[19] Cu/Zn superoxide dismutase
[20] Ribulose bisphosphate carboxylase(small subunit)

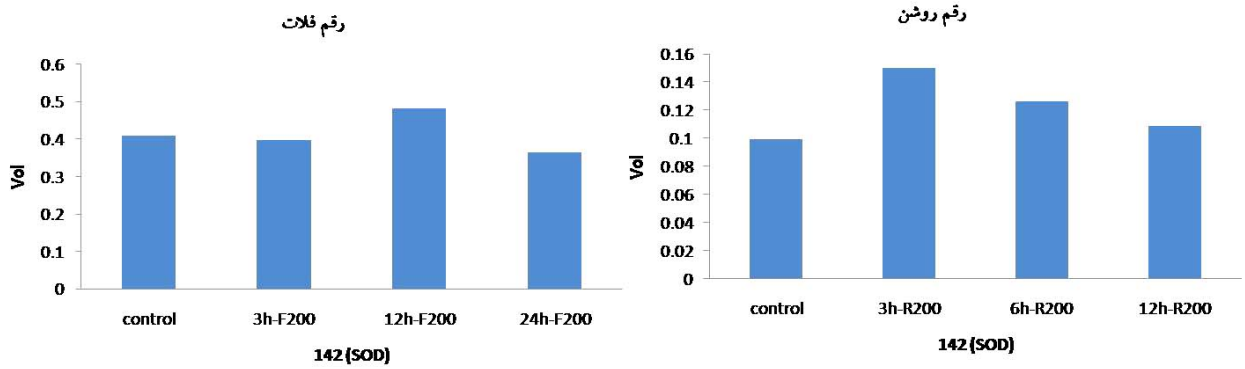


شکل ۵- تغییرات لکه شماره ۷٦ در رقم متحمل و حساس در سطح ۲۰۰ میلی مولار در دو رقم روشن و فلات.

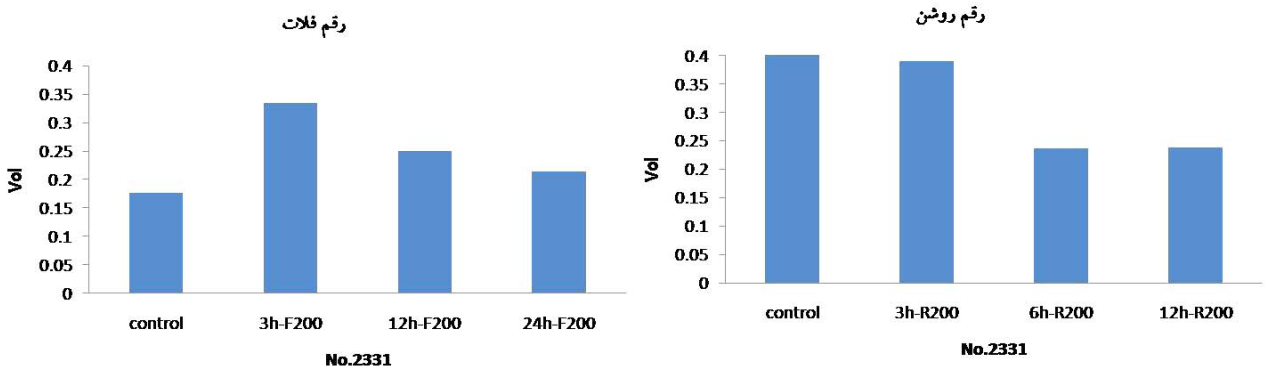
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

جدول ۲- برخی پروتئین‌های شناسایی شده پس از اسپکترومتری جرمی در تجزیه پروتئوم ارقام گندم.

شماره لکه	نام پروتئین	منبع پروتئین	gi Number	Predicted Protein MW	M. Score
۱۵	cold-responsive LEA/RAB-related COR protein	*Triticum aestivum*	gi|7716956	17150	187
76	putative glycine decarboxylase subunit	*Triticum aestivum*	gi|22204118	21578	232
182	group3 late embryogenesis abundant protein	*Triticum aestivum*	gi|157073742	18314	318
614	fructose-bisphosphate aldolase	*Arabidopsis thaliana*	gi|15227981	38805	119
337	triosephosphat-isomerase	*Triticum aestivum*	gi|11124572	27014	354
2319	nucleic acid binding protein1	*Zea mays*	gi|162463757	33154	335
95	Ras-related protein RIC1	*Elaeis guineensis*	gi|192910784	22784	55
153	temperature stress-induced lipocalin	*Triticum aestivum*	gi|18650668	21809	330
142	Cu/Zn superoxide dismutase	*Triticum aestivum*	gi|1572627	20352	448



شکل ٦- تغییرات میانگین لکه شماره۱٤۲ در رقم متحمل و حساس در سطح ۲۰۰ میلی مولار در ارقام گندم.



شکل ۷- روند تغییرات لکه شماره ۲۳۳۱، در ساعات مختلف پس از اعمال تنش (۲۰۰ میلی مولار) در ارقام گندم.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

منابع

۱. فراهانی،الف. ۱۳۸۷. اهمیت تنظیم کمباین در جهت رفع ریزش گندم در حین برداشت. مدیریت ترویج و نظام بهره برداری استان مرکزی

۲. میرمحمدی میبدی،ع.م.، قره یاضی،ب.، ۱۳۸۱. جنبه های فیزیولوژیک و به نژادی تنش شوری گیاهان.انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲۷۴ صفحه.

۳. کافی،م.، زند،الف.، کامکار،ب.، شریفی،ح.، گلدانی،م.، ۱۳۸۵. فیزیولوژی گیاهی. ترجمه، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۷۸ صفحه.

۴. محلوجی، م.، اکبری، م. ۱۳۸۰. اثر شوری آب بر عملکرد ارقام مختلف گندم در آبیاری بارانی. مجله نهال و بذر. ۱۷(۲).

۵. پوستینی،ک.۱۳۸۱. ارزیابی ۳۰ رقم گندم از نظر واکنش به تنش شوری. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۳: ۵۷-۶۴ (۱).

۶. میقانی، ف.، ابراهیم زاده، ح.۱۳۸۲. پاسخ پروتئین های برگ دو رقم گندم به تنش شوری. رستنیها. جلد٤.

۷. بنده حق،ع.، کاظمی، ح.، ولی زاده، م.، جوانشیر،ع. ۱۳۸۳. مقاومت ارقام گندم بهاره *triticum aestivum* نسبت به تنش شوری در مراحل رویشی و زایشی. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۵. شماره۱. سال (۷۱-۶۱)

8. Boyer, J.S., (1982) Plant productivity and environment. Science. 218:443-448.

9. Dorothea Bartels, Ramanjulu Sunkar,(2005) Drought and Salt Tolerance in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23–58.

10. Jian-Kang Zhu,(2003)Regulation of ion homeostasis under salt stress, Current Opinion in Plant Biology, 6:441–445.

11. Marshner, H.,(1995) Mineral nutrition of higher plant. Academic Press, London. 2nd edition.889 pp.

12. Jian-Kang Zhu,(2001) Plant salt tolerance, TRENDS in Plant Science Vol.6 No.2 .

13. Scheideler, M., Schlaich, NL., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, NC., Vingron, M., Slusarenko, AJ and JD, Hoheisel,(2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in Arabidopsis thaliana using cDNA arrays. J Boil Chem. 277: 10555- 1056.

14. Dorothea Bartels, (2005) Desiccation Tolerance Studied in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*, INTEGR. COMP. BIOL., 45:696–701.

15. Shuji Yokoi, Ray A. Bressan and Paul Mike Hasegawa , (2002) Salt Stress Tolerance of Plants, JIRCAS Working Report 25-33.

16. Seki, M. et al., (2003) Transcriptome analysis in abiotic stress conditions in higher plants. In Plant Responses to Abiotic. Springer. pp. 271–294.

17. Narinder Kaur and Anil K. Gupta,(2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants, CURRENT SCIENCE, 88(11).

18. Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsudo, K. and Shinozaki, K.,(1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 765–769.

19. Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N. and Shinozaki, K. (1994) Two genes that encode Ca+ dependent protein kinases are induced by drought and high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet., 244: 331–340.

20. Hong, S. W., Jon, J. H., Kwak, J. M. and Nam, H. G.,(1997) Identification of receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsi thaliana*. Plant Physiol. 113: 1203–1212.

21. Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T. and Shinozaki, K.,(1995) A gene encoding a phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3903–3907.

22. Katagiri, T., Takashhi, S. and Shinozaki, K.,(2001) Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLDELTA, in dehydrationinducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. Plant J. 26: 595–605.

23. Seki, M. et al.,(2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J. 31: 279–292.

24. O'Farrell, P.H.,(1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. Biol Chem. 250(10):4007-21.

25. Ghasem Hosseini Salekdeh and Setsuko Komatsu,(2007) Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics.* DOI 10.1002/pmic.200700181.

26. Jan Hirsch, Kirk C. Hansen, Alma L. Burlingame, and Michael A. Matthay, (2004) Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1–L23.

27. Yates, J.R., (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. Mass Spectrom. 33:1–19.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]

28. Donnelly, B.E., Madden, R.D., Ayoubi, P., Porter, D.R., Dillwith, J.W, (2005) The wheat (*Triticum aestivum L.*) leaf proteome.Proteomics. 5:1624-1633.

29. Yıldız, M., Terzi, H., (2008) Effects of NaCl on protein profiles of tetraploid and hexaploid wheat species and their diploid wild progenitors. PLANT SOIL ENVIRON. 54: 227–233(6)

30. Galvez, AF., Gulick, P.J., Dvorak, J., (1993) Characterization of the Early Stages of Genetic Salt-Stress Responses in Salt-Tolerant Lophopyrum elongatum, Salt-Sensitive Wheat, and Their Amphiploid. Plant Physiol. 103(1):257-265

31. Mohabati, F., (2005) Effects of Salinity on Synthetic Wheat Genotypes. Czech J. Genet. Plant Breed. 41, (Special Issue)

32. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., (1986) *Electrophoresis*, *7*, 52–54.

33. Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

34. Blum, H., Beier, H., Bremer, E., (1987) *Electrophoresis*, *8*, 93– 99.

35. Vauclare, P., (1996) Regulation of the expression of the Glycine Decarboxylase complex during Pea leaf Development. Plant physiol. 112:523-1530.

36. Giuseppe Caruso & Chiara Cavaliere & Chiara Guarino & Riccardo Gubbiotti & Patrizia Foglia & Aldo Laganà,(2008). Identification of changes in Triticum durum L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, Anal Bioanal Chem ,391:381–390.

37. Takuro Kisaki, Noriko Yoshida and Ayako Imai,(1971) Glycine decarboxylase and serine formation in spinach leaf mitochondrial preparation with reference to photorespiration, Plant and Cell Physiology,12(2):275-288.

38. Ramanjulu Sunkar, Avnish Kapoor, and Jian-Kang Zhu. (2006) Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance, The Plant Cell, 18: 2051–2065.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.10.8]