

ارزیابی واکنش پروتئوم ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود (*Cicer arietinum* L.) به تنش خشکی در مرحله زایشی

Evaluation of proteome response of tolerant and sensitive chickpea (*Cicer arietinum* L.) to drought stress in generative stage

خدابخش گودرزوند چگینی^{۱*}، رضا فتوت^۲، محمدرضا بی‌همتا^۳، منصور امید^۳ و علی‌اکبر شاه‌نجات
بوشهری^۳

۱- کارشناس پژوهش‌های کاربردی، مرکز تحقیقات حفاظت خاک و آب دانشگاه تهران در اراضی دیم (کوهین)

و دکتری ژنتیک بیومتری، دانشگاه زنجان، ایران

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

۳- استادن، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

Goodarzvand Chegini Kh^{*1}, Fotovat R², Bihamta MR³, Omid M³, Shahnejant
Boushehri AA³

1- Applied Research Expert, Soil and Water Conservation Research Center at
Tehran University in Dry Lands (Kuhin), PhD of Biometry Genetics, Zanjan
University, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of
Agriculture, University of Zanjan, Iran

3- Professors, Department of Plant Breeding and Agronomy, University College of
Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

به‌منظور مطالعه واکنش پروتئوم ژنوتیپ‌های نخود زراعی نسبت به تنش خشکی، دو ژنوتیپ متحمل و حساس در شرایط گلخانه تحت تیمار تنش و عدم‌تنش قرار گرفتند. پس از استخراج پروتئین و رسم منحنی استاندارد، الکتروفورز بعد اول منجر به تفکیک پروتئین‌ها از لحاظ بار الکتریکی و الکتروفورز بعد دوم پروتئین‌ها را از لحاظ وزن ملکولی تفکیک نمود. نتایج حاصل از تصویربرداری و آنالیز ژل‌های مربوط به دو ژنوتیپ متحمل (کرج ۳۶۲۸) و حساس (فسا ۶۸۸۰) در دو شرایط تنش و عدم‌تنش نشان داد که از میان ۴۰۱ لکه تکرارپذیر، تعداد ۳۱ لکه دارای اختلاف معنی‌داری بودند. ژنوتیپ متحمل در محیط عدم‌تنش و تنش به‌ترتیب ۱۱ و ۱۱ لکه افزایش بیان و ۱۳ و ۱۰ لکه کاهش بیان داشته و ژنوتیپ حساس نیز در محیط عدم‌تنش و تنش به‌ترتیب در ۱۶ و ۷ لکه افزایش بیان و ۷ و ۱۸ لکه کاهش بیان نشان داد. پروتئین‌های GAPDH type A در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان، Thioredoxin h1 در سطوح مختلف تنش افزایش بیان، EST mhl-0016-B10 در تیمار تنش کاهش بیان، زیر واحد کوچک آنزیم رویسکو در تنش افزایش بیان، 20S proteasome subunit alpha-1 در تیمار تنش افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان، putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 در تیمار تنش هم در ژنوتیپ متحمل و هم در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی سوپراکسید دیسموتاز در ژل‌های دو ژنوتیپ نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش بود.

واژه‌های کلیدی

پروتئومیکس

نخود

تنش خشکی

ژنوتیپ حساس و متحمل

سوپراکسید دیسموتاز

نخود زراعی دومین گیاه مهم از حبوبات در جهان است. با توجه به اهمیت نخود به عنوان یکی از منابع مهم پروتئین گیاهی در مناطق خشک و نیمه خشک، تلاش‌های زیادی در جهت تعیین تحمل خشکی بر اساس کاهش عملکرد در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شرایط آبیاری انجام شده است (Gunes et al. 2008). پتانسیل عملکرد نخود تحت شرایط مطلوب مدیریت شده، بیش از سه تن در هکتار گزارش شده (Dadi et al. 2005)، با این حال برخی عوامل محدودکننده و کاهش‌دهنده عملکرد از جمله تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارند که موجب کاهش عملکرد و پایداری عملکرد می‌شوند. در میان تنش‌های غیر زنده، خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید نخود به شمار می‌رود (Singh et al. 2008).

تا به امروز، اکثر مطالعات انجام شده در مورد تنش کم‌آبی به طور عمده بر تغییرات در بیان ژن متمرکز شده‌اند، در حالی که اطلاعات به مراتب کمتری در مورد فراورده‌های کارکردی ژن وجود دارد. تغییرات در بیان ژن از طریق مسیرهای مختلف و همپوشان بالقوه‌ی درک و انتقال پیام تنظیم می‌شوند (Seki et al. 2002). Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997). با این حال، سطح mRNA همیشه با سطح پروتئین به عنوان ایفاکننده نقش کلیدی در سلول، همبستگی خوبی ندارد (Tian et al. 2004؛ Gygi et al. 1999). بنابراین پیش‌بینی سطح بیان پروتئین از طریق داده‌های کمی mRNA کفایت نمی‌کند. مطالعات پروتئوم به تکمیل مجموعه‌ای از پروتئین‌های رمزگشایی شده توسط ژنوم و در جهت تکمیل مطالعات ترانسکریپتوم کمک می‌کند.

پروتئومیکس تا حد زیادی مطالعه واکنش‌های تنش سلولی محصولات را تسهیل نموده است (Komatsu et al. 2003). پیشرفت‌های حاصل شده در زمینه‌ی الکتروفورز دوبعدی، افزایش تعداد پروتئین‌های توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی و استفاده از دستگاه طیف‌سنج جرمی برای شناسایی پروتئین‌ها باعث شده است تا تکنیک پروتئومیکس در شناسایی پروتئین کل بیان شده در شرایط تنش‌های مختلف گیاهی به ابزاری قدرتمند تبدیل شود.

تغییرات بیان پروتئین در پاسخ به خشکی در ذرت (Riccardi et al. 1998)، برنج (Salekdeh et al. 2002؛ Ali and Komatsu

2006)، چغندر قند (Hajheidari et al. 2005)، گندم (Hajheidari 2005؛ et al. 2007 Fotovat) و آفتابگردان (Castillejo et al. 2008) مورد مطالعه قرار گرفته است. این تجزیه و تحلیل، تعدادی از پروتئین‌های ناشی از تنش و درگیر در فتوستز (Ali and Komatsu 2006)، مسیرهای ترانسامی (Salekdeh et al. 2002)، سم‌زدایی تنش اکسیداتیو (Ali and Salekdeh et al. 2002)، سم‌زدایی تنش اکسیداتیو (Ali and Salekdeh et al. 2002)، انتقال نوری (Nouri and Komatsu 2010) را شناسایی نموده است.

همان‌گونه که خشکی تأثیرگذارترین تنش غیر زیستی و کاهش‌دهنده عملکرد نخود در جهان به شمار می‌رود، لذا بررسی تنوع ژنتیکی از طریق صفات مورفولوژیک، زراعی، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی از ضروریات راهبردهای اصلاحی در این پدیده به شمار رفته، ولی مطالعه واکنش‌ها و الگوی بیان پروتئین‌ها در میان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در شرایط مختلف تنش علاوه بر درک دقیق‌تر ماهیت این پدیده طبیعی، ما را در شناسایی پروتئین‌های درگیر و ناشی از تنش خشکی و غربال‌گری توده‌ها، ژنوتیپ‌ها و ارقام حجیم قابل دسترس در مخازن بانک ژن یاری خواهد نمود. پروتئومیکس علمی نوظهور با توان و دقت بسیار بالا در شناسایی پروتئین‌ها، کاربرد و چگونگی کنترل بیان آن‌ها بوده و از بهترین روش‌های تعیین اطلاعات دقیق و با ارزش در طی انبوهی از فرآیندها می‌باشد. بنابراین می‌توان از آن در تجزیه و تحلیل فرآیندهای درگیر در تنش خشکی از آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

بر اساس نتایج آزمایش‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای بر روی ۶۴ ژنوتیپ تهیه شده از بانک ژن پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، بر اساس گروه‌بندی شاخص‌های تحمل و واکنش ژنوتیپ‌های نخود تیپ زراعی نسبت به تنش خشکی، ژنوتیپ کرج-۳۶۲۸ و ژنوتیپ فسا-۶۸۸۰ به ترتیب به عنوان متحمل‌ترین و حساس‌ترین ژنوتیپ گزینش شدند (Goodarzvand Chegini 2016). سپس این ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای با

موجود در پلیت لیوفیلایز شده میزان ۵۰ میکرولیتر به ازای هر یک میلی‌گرم (50µl/mg) پودر لیوفیلایز شده، محلول لیزیز (8M, Urea, 4%w/v CHAPS, 35mM, Tris, 1%w/v, DTT, 1%v/v, Ampholyte pH 3.5-10) اضافه شد. پس از یک ساعت ورتکس مداوم در دمای اتاق مجدداً در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰×g دور سانتریفیوژ انجام گرفت و سرانجام مایع رویی (سوپرناتانت) یا در حقیقت عصاره پروتئینی را برداشته و پلیت دور ریخته شد.

سنجش میزان پروتئین‌های نمونه در این آزمایش با استفاده از روش (Bradford 1976) انجام شد. برای تهیه محلول استوک رنگ^۱ میزان ۰/۱ گرم کوماسی بلو جی ۲۵۰ در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول حل شده، محلول تهیه‌شده از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵ درصد به آن اضافه شده، در نهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

جهت تهیه محلول سنجش^۲، یک حجم از محلول استوک رنگ با چهار حجم آب مقطر رقیق شده و برای آزمون مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه محلول استوک پروتئین BSA^۳ میزان ۰/۱ گرم از پروتئین آلبومین سرم گاوی در ۵۰ میلی‌لیتر NaCl ۰/۱۵ مولار حل شده تا به غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برسد. برای تهیه هر یک از غلظت‌های استاندارد جهت ترسیم منحنی استاندارد با توجه به رابطه $C_1V_1=C_2V_2$ عمل شد.

به‌منظور رسم منحنی استاندارد، میزان ۶۰ میکرو لیتر تهیه‌شده از هر یک از غلظت‌ها به سه میلی‌لیتر محلول سنجش اضافه شده و داخل سل کوارتز^۴ ریخته شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به‌ترتیب قرائت افزایش غلظت‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمودار خطی بر اساس غلظت‌ها ترسیم شد. در نهایت برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها میزان پنج میکرولیتر از عصاره پروتئین محلول در لیزیز بافر به ۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شده و به سه میلی‌لیتر محلول سنجش اضافه شد و پس از اندازه‌گیری جذب آن‌ها در برابر شاهد (۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه به‌علاوه پنج میکرولیتر محلول لیزیز و سه میلی‌لیتر محلول

اعمال تنش (۵۰ درصد رطوبت قابل دسترس) و بدون تنش (۱۰۰ درصد رطوبت قابل دسترس) در سال ۱۳۹۴ کشت شدند بدین ترتیب که بر اساس خاک آزمایش شده در آزمایشگاه گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، رطوبت قابل دسترس بر مبنای تفاضل ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی تعیین شده، سپس بر مبنای وزن خاک داخل گلدان میزان آب مصرفی جهت تأمین رطوبت قابل دسترس مشخص شد. تیمار بدون تنش ۱۰۰ درصد رطوبت قابل دسترس و تیمار تنش ۵۰ درصد رطوبت قابل دسترس را از طریق توزین کلیه گلدان‌ها دریافت نمودند. پس از گلدهی کامل، از برگ کلیه واحدهای آزمایشی شامل دو ژنوتیپ به تفکیک در دو شرایط تنش و عدم‌تنش با سه تکرار نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های برگ پس از برش بلافاصله درون فویل آلومینیومی برچسب خورده قرار داده شده و با فلاسک ازت مایع به فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج پروتئین از بافت برگ بر اساس روش (1986) Damerval et al. با اندکی تغییرات انجام گرفت. ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول استون حاوی ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۰/۵ درصد β-مرکاپتواتانول به پودر ساییده شده بافت گیاهی اضافه شده، مخلوط در هاون مجدداً ساییده شده و سپس به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل شد.

سپس مخلوط به‌دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل دو ساعت تیمار رسوب کامل پروتئین‌ها شدند. پس رسوب کامل پروتئین‌ها در حضور TCA، نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن آرام مایع، به پلیت حاوی پروتئین ۱۰ میلی‌لیتر محلول استون حاوی ۰/۱ درصد β-مرکاپتواتانول (محلول شستشوی) اضافه و پلیت در محلول به‌طور کامل شکسته و تبدیل به سوسپانسیون شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا پروتئین‌ها به‌طور کامل رسوب نمودند. مجدداً نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۵۰۰×g دور سانتریفیوژ شدند.

در نهایت حذف کامل بقایای استون، پلیت به‌دست آمده با استفاده از دستگاه لیوفیلایزر خشک شد. برای استخراج پروتئین‌های

¹ Dye Stock² Assay reagent³ Blood serum albumin⁴ Cuvette

تکمیل بُعد اول، ژل‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای بُعد دوم آماده شد.

برای انجام بُعد دوم (SDS-PAGE) از دستگاه ProteinII Xi Cell (ساخت شرکت بیورد)^۳ استفاده شد. پس از تیمار شیشه‌ها با الکل و قراردادن فاصله‌انداز، کاست ژل بسته شده و محلول اکریل آمید (۱۲/۵ درصد) تهیه شده در آن ریخته شد، سپس سطح آن با n- بوتانول اشباع جهت هموار شدن سطح ژل پوشانده شد. پس از آماده شدن ژل بُعد دوم، مقدار ۶-۷ میلی‌لیتر محلول متعادل‌سازی^۴ داخل لوله آزمایش ریخته، DTT نیز به صورت تازه^۵ اضافه شده و نوار ژل بُعد اول به مدت ۱۵ دقیقه درون لوله آزمایش روی شیکر قرارداده شد. جهت حذف بقایای n- بوتانول، سطح ژل بُعد دوم را با محلول بافر الکتروفورز شستشو داده و پس از خشک کردن چند ثانیه در محلول بافر الکتروفورز غوطه‌ور شد. در نهایت ژل نواری به آرامی روی سطح ژل بُعد دوم تا تماس کامل بین دو ژل و بدون حباب قرار داده شده و روی آن با آگارز ۰/۵ درصد ذوب شده پوشانده شد. کاست ژل در تانک بافر قرار گرفته، پس از ریختن مقدار کافی بافر الکتروفورز، پاور روشن شده و ژل با میلی‌آمپر ثابت در مرحله اول ۵ میلی‌آمپر برای ۲ ساعت، مرحله دوم ۱۰ میلی‌آمپر برای ۶ ساعت و مرحله سوم ۲۰ میلی‌آمپر برای ۳ ساعت ران شد. در طول ران شدن، دستگاه الکتروفورز به دستگاه خنک‌کننده متصل و دما روی ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

حدود ۸-۶ ساعت بعد با پایان یافتن الکتروفورز بُعد دوم، زمانی که رنگ به ۲ تا ۳ میلی‌متری انتهای ژل رسید، ژل‌ها از کاست ژل خارج شده و گوشه اسیدی آن‌ها را برای تشخیص راحت، کمی برش خورده و نشان‌دار شد. بلافاصله ژل در محلول تثبیت‌کننده قرار گرفته و مراحل رنگ‌آمیزی انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل‌های دو بعدی به روش نیترا نقره انجام شد.

پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر Gs800 (ساخت شرکت بیورد اسکن و به فرمت خام ژل‌های دو بُعدی (Raw 2d) ذخیره شدند و در نهایت به وسیله نرم‌افزار PDQuest به فرمت

سنگش) مقدار جذب به دست آمده در فرمول به دست آمده از منحنی استاندارد قرار گرفته و میزان غلظت هر نمونه بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در نهایت غلظت‌های به دست آمده به دلیل رقیق شدن، در عدد ۱۲ ضرب شد تا غلظت واقعی نمونه‌ها محاسبه شد.

در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل، پروتئین‌ها در استوک آب‌گیری^۱ حل و هم‌زمان با آن به داخل ژل لود شدند. برای آب‌گیری ژل‌ها، میزان ۳۲۰ میکرو لیتر از محلول آب‌گیری حاوی ۱۲۰ میکروگرم پروتئین به داخل شیار موجود در سینی آب‌گیری تراز شده پیپت شد. پس از قراردادن ژل‌های نواری IPG درون شیارهای سینی آب‌گیری، روی آن‌ها را با روغن معدنی پوشانیده و پس از ۱۴ تا ۱۶ ساعت آب‌گیری کامل، الکتروفورز بُعد اول صورت پذیرفت.

در این تحقیق از دستگاه مولتی‌فور II (ساخت شرکت آمرشام بیوساینس)^۲ برای انجام بُعد اول (IEF) استفاده شد. پس از آماده نمودن دستگاه، ژل‌ها مرتب کف شیارهای موجود در الاینر ردیف شد، به طوری که لبه ژل به سمت بالا باشد و انتهای اسیدی ژل به سمت قطب مثبت (به سمت الکتروود قرمز) قرار گیرد. در نهایت الکترودهای کاغذی مرطوب در دو انتهای ژل‌ها قرار گرفت، سپس گیره‌های الکتروود (قرمز و مشکی) روی سینی الاینر مماس شد. پس از قراردادن گیره‌های الکتروود، جهت جلوگیری از خشک شدن ژل‌ها در حین الکتروفورز، روی ژل‌ها به طور کامل با روغن معدنی پوشانده شد.

جهت ران نمودن ژل‌ها، برنامه دستگاه روی گرادینت تنظیم شد. میزان ۴۲ هزار ولت ساعت در چهار مرحله ۱۵۰ ولت ساعت در ۳۰۰ ولت، ۳۰۰ ولت ساعت در ۵۰۰ ولت، ۲۰۰۰ ولت ساعت در ۳۵۰۰ ولت و ۳۹۵۰۰ ولت ساعت در ولتاژ ۳۵۰۰ ولت تأمین شد. در تمام این مراحل شدت جریان روی یک میلی‌آمپر و توان روی پنج وات ثابت بود. پس از شروع الکتروفورز، رنگ آبی به تدریج به سمت قطب مثبت حرکت نموده و از انتهای ژل خارج شد تا در نهایت پس از ۱۵ تا ۱۶ ساعت، ژل کاملاً شفاف شد. پس از

³ Bio-Rad

⁴ Equilibration

⁵ Fresh

¹ Rehydration

² Amersham Bioscience

تیف^۱ درآورده شدند. پس از اکتساب تصاویر به فرمت دیجیتال، ژل‌ها لایه‌لای سلفون قرار گرفته و اطراف آن‌ها مهر و موم شد و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت طولانی نگهداری شدند.

برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار Melanie 6.2^۲ استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا لکه‌ها بر روی ژل‌ها شناسایی شده^۳، به‌طور دستی چندین لکه در ژل‌های مختلف باهم جفت^۴ و علامت^۵ زده شد. سپس با اطمینان از صحت عمل نرم‌افزار، ژل‌های مربوط به تیمارهای مختلف را باهم جفت نموده و مورد آنالیز آماری قرار گرفتند تا تفاوت‌های بین لکه‌های دو تیمار متفاوت با اختلاف دو برابری درصد حجمی به‌عنوان پروتئین‌هایی دارای تفاوت معنی‌دار بین دو تیمار شناخته شدند. جهت مقایسه میانگین و رتبه‌بندی تیمارها در سطوح تنش و عدم‌تنش از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار استفاده شد. پس از شناسایی لکه‌ها بر روی ژل‌ها و سپس ویرایش دستی نقاط، به‌طور دستی چندین لکه را در ژل‌های مختلف باهم جفت نموده و علامت زده شدند. سپس به‌وسیله نرم‌افزار لکه‌ها به‌طور اتوماتیک در ژل‌های مختلف باهم جفت شدند. پس از جفت نمودن، به‌طور دستی لکه‌ها بررسی شدند تا از صحت عمل نرم‌افزار در جفت نمودن لکه‌ها اطمینان حاصل شود. ژل‌های مربوط به تیمارهای مختلف را به هم جفت نموده و سپس دو به دو با هم مقایسه کرده و تفاوت‌های بین لکه‌های دو تیمار متفاوت را شناسایی شدند. طبق دستورالعمل ذکر شده در نرم‌افزار آموزشی ملانی به‌وسیله Inter Class Report لکه‌هایی که درصد حجمی آن‌ها بین دو تیمار به میزان دو برابر در Ratio با هم اختلاف داشتند به‌عنوان پروتئین‌های کاندیدا شناخته شدند که بین دو تیمار تفاوت معنی‌دار نشان می‌دادند. در حقیقت تعیین درصد حجمی لکه‌ها روش مناسبی برای بررسی تفاوت‌های کمی لکه‌ها بین ژل‌های مختلف یک تیمار و ژل‌های تیمارهای مختلف است. پس از گرفتن گزارش^۶ از کل لکه‌های جفت شده

در ژل‌های دو تیمار مورد مقایسه، مقادیر هر لکه در هر تیمار بر اساس Ratio مرتب شده و سپس لکه‌هایی با مقدار Ratio بالاتر از ۲ انتخاب و پروتئین‌های بیان‌شده به‌طور افتراقی نشان‌دار شدند. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی‌بلو نیاز به بارگذاری مقادیر زیادتری پروتئین است. بنابراین برای این منظور مقدار میکروگرم پروتئین به‌همراه محلول رهیدراسیون وارد ژل شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی‌بلو و تطبیق لکه‌ها باهم، لکه‌هایی که در ژل‌های تحلیلی به‌طور افتراقی بیان شده بودند را به‌طور دستی و با استفاده از اسکالپل تمیز از ژل کوماسی جدا نموده و در تیوپ‌های جداگانه قرار داده و تا زمان ارسال جهت طیف‌سنجی جرمی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نتایج و بحث

آنالیز ژل‌ها برای رقم مقاوم و حساس جداگانه انجام گرفت. در هر ژنوتیپ دو سطح متحمل و حساس و در هر تیمار آبیاری دو سطح عدم‌تنش و تنش با سه تکرار وجود داشت. شناسایی لکه‌ها و نرمالیزه کردن به‌وسیله نرم‌افزار melanie.6 انجام شد. در کلیه تیمارها تعداد ۴۰۱ لکه تکرارپذیر باهم جفت شدند (شکل ۱).

آزمون آماری t-استیودنت نشان داد که از تعداد ۳۱ لکه معنی‌دار، در سطوح عدم‌تنش و تنش، ۲۰ لکه در سطح یک درصد و ۴ لکه در سطح آماری پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در سطوح ژنوتیپ‌ها ۲۱ لکه در سطح یک درصد و پنج لکه در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. از نظر اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در بین سطوح عدم‌تنش و تنش، ۲۳ لکه در سطح یک درصد و یک لکه در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند.

نتایج حاصل از آنالیز Inter-classreport نشان داد که در ژنوتیپ متحمل کرج-۳۶۲۸ بین شرایط عدم تنش و تنش ۷ لکه کاهش بیان، در ژنوتیپ حساس فسا-۶۸۸۰ بین شرایط عدم تنش و تنش ۱۴ لکه کاهش بیان، بین ژنوتیپ‌های متحمل کرج-۳۶۲۸ و حساس فسا-۶۸۸۰ در شرایط عدم تنش ۱۰ لکه کاهش بیان، بین ژنوتیپ‌های متحمل کرج-۳۶۲۸ و حساس بین شرایط عدم تنش و تنش ۱۰ لکه کاهش بیان و در نهایت بین ژنوتیپ متحمل در شرایط تنش و ژنوتیپ حساس فسا-۶۸۸۰ در شرایط عدم‌تنش

¹ TIEF

² GeneBio, Geneva, Switzerland

³ Detect

⁴ Match

⁵ Land mark

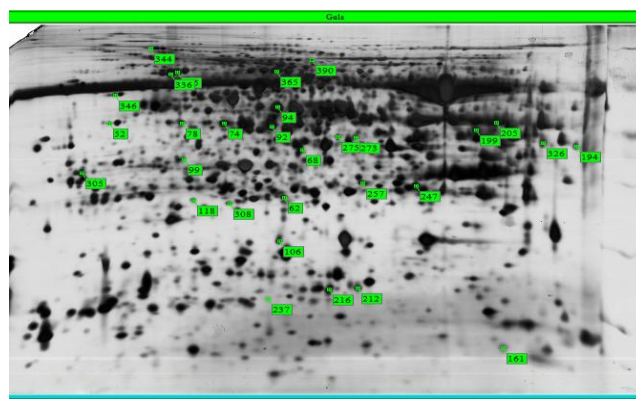
⁶ Report

پروتئین در همانندسازی و نسخه‌برداری ژن نقش دارد (شکل ۲). در GAPDH دو زیر واحد اصلی A و B وجود داشته و تنظیم مقادیر آن توسط ژن‌های مربوطه صورت می‌گیرد. بررسی توالی اسیدآمینه‌ها نشان داد که ژن‌های هسته‌ای GAPA و GAPB در قارچ‌ها و گیاهان مسئول ساخت این زیر واحدها هستند. پلی پپتیدهای ساخته‌شده توسط این ژن‌ها در مولکول بزرگ A8B8 به وزن ۶۰۰ کیلو دالتون تجمع شده و فعالیت آنزیمی‌شان را آغاز می‌کنند (Scagliarini et al. 1998).

باوجود معنی دار شدن اختلاف بین تیمارهای تنش خشکی در گندم، میزان تظاهر GAPDH معنی‌دار نبوده که علت آن کارایی سیستم دفاع آنتی اکسیداتیو جهت حفظ ساختار و فعالیت آنزیم GAPDH بود و تأثیر تنش خشکی بر این آنزیم در گندم ناچیز گزارش شد (Fotovat et al. 2007).

لکه شماره ۲۴۱ مربوط به پروتئین Thioredoxin h1 بود که در ژل‌های مربوط به ژنوتیپ حساس نسبت به ژنوتیپ متحمل افزایش بیان نشان داد. این پروتئین مرتبط با مسیر گونه‌های اکسیژن فعال است (شکل ۳). بیان این پروتئین در ژنوتیپ متحمل در شرایط تنش نسبت به عدم تنش تا حدودی کاهش ولی در ژنوتیپ حساس در شرایط تنش نسبت به عدم تنش بدون تغییر ماند که با توجه به ورود ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به مرحله زایشی و نمونه‌برداری در مرحله نموی، نشان‌دهنده لزوم وجود این پروتئین در پاسخ به افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان یک حامل پیام و عنصری متحرک است. تیوردوکسین سیتوسولی به‌نام Thioredoxin h نام‌گذاری شده و ابتدا در بافت‌های غیر فتوسنتز کننده یافت شد (Johnson et al. 1987). تیوردوکسین سیتوسولی به‌عنوان یک سیستم احیاکننده و شرکت‌کننده در تحرک ذخایر پروتئینی در طی جوانه‌زنی بذر عمل می‌کند و این واکنش‌ها ممکن است به احیای پروتئین‌های ذخیره‌ای و بازدارندگان آنزیمی لینک شوند و نیز به‌وسیله پروتئاز وابسته به ردوکس یعنی تیوکالسین^۱ همراهی شوند (Besse et al. 1996)، هم‌چنین ممکن است در آسیمیلایون سولفات و در بخشیدن مقاومت به پراکسید هیدروژن نقش بازی کند.

۱۰ لکه کاهش بیان نشان دادند. نتایج نتایج حاصل از جفت نمودن ژل‌ها نشان داد که از تعداد ۴۰۱ لکه تکرارپذیر در میان کلیه تیمارهای مورد بررسی، تعداد ۳۱ لکه دارای اختلاف معنی‌داری بودند. ژنوتیپ متحمل کرج-۳۶۲۸ در شرایط عدم‌تنش و تنش به‌ترتیب ۱۱ و ۱۱ لکه افزایش بیان و ۱۳ و ۱۰ لکه کاهش بیان نشان دادند. هم‌چنین ژنوتیپ حساس فسا-۶۸۸۰ نیز در شرایط عدم‌تنش و تنش به‌ترتیب ۱۶ و ۷ لکه افزایش بیان و ۷ و ۱۸ لکه کاهش بیان نشان دادند که برخی لکه‌ها نیز بیان مشترک داشتند (جدول ۱).



شکل ۱- وضعیت ۳۱ لکه دارای اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در میان کل ۴۰۱ لکه جفت شده تکرارپذیر

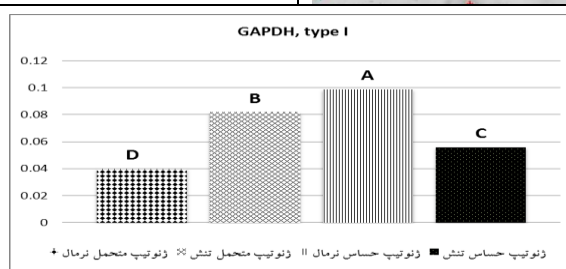
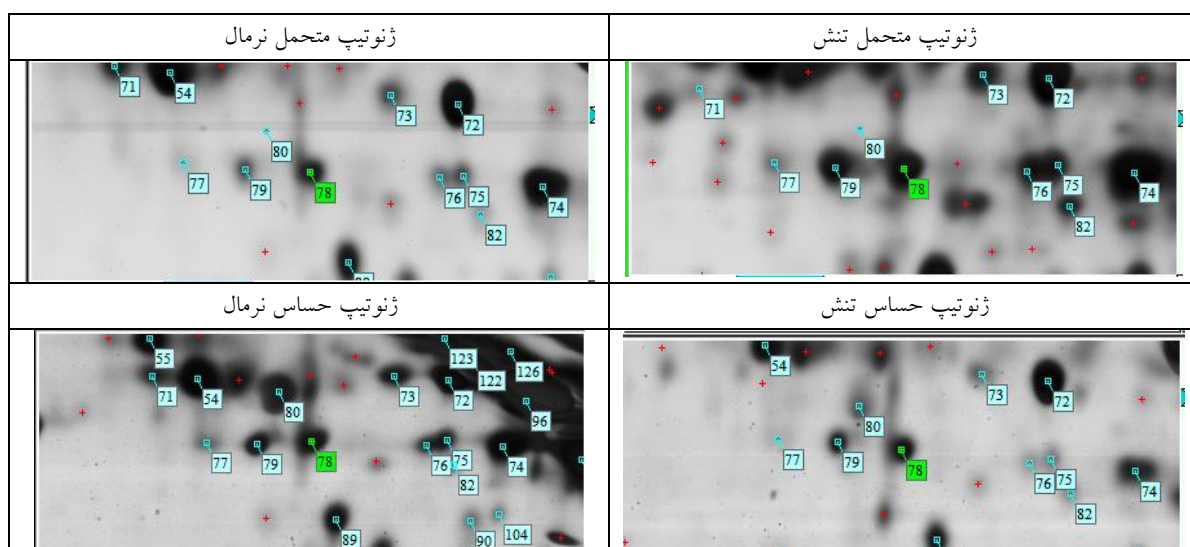
جدول ۱- جدول مربوط به تعداد کل لکه‌های معنی‌دار و چگونگی تغییرات پس از اعمال تنش

سطح خشکی	ژنوتیپ متحمل کرج-۳۶۲۸		ژنوتیپ حساس فسا-۶۸۸۰	
	عدم‌تنش	تنش	عدم‌تنش	تنش
افزایش بیان	۱۱	۱۱	۱۶	۷
کاهش بیان	۱۳	۱۰	۷	۱۸
بیان مشترک	۱۸	۱۷	۱۷	۱۵

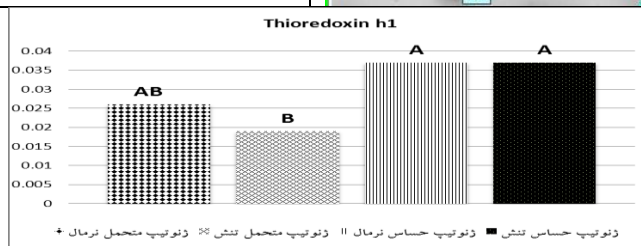
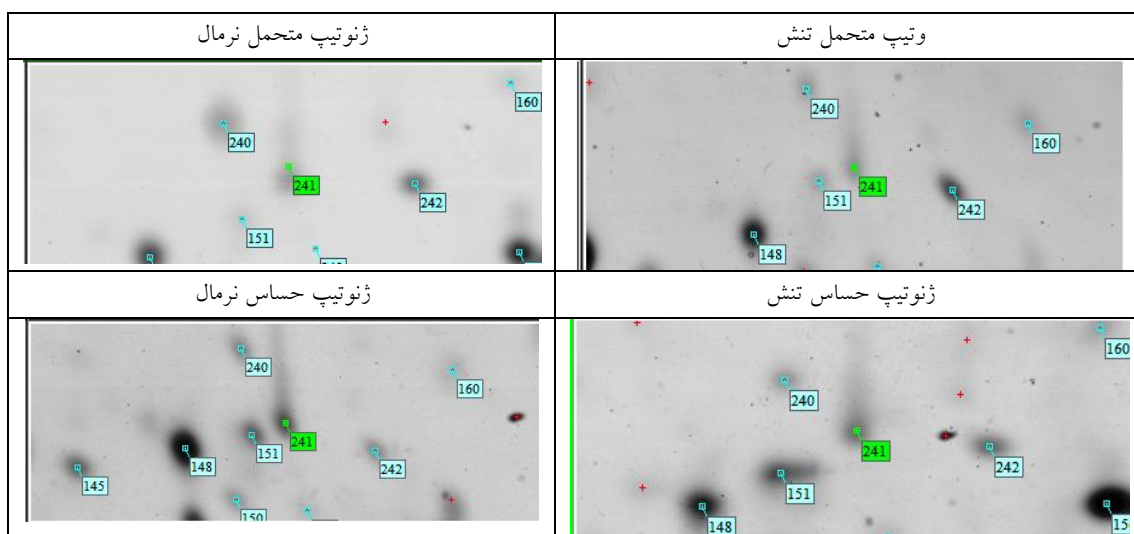
از ۳۱ لکه پروتئین معنی‌دار در بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس و در شرایط عدم تنش و تنش، پس از انطباق با پایگاه داده‌ها از نظر وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک و هم‌چنین تطبیق با تصاویر ژل از طریق تصویر ژل، وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک تعداد هفت لکه شناسایی شدند (جدول ۲).

لکه شماره ۷۸ مربوط به پروتئین GAPDH, type A بود. در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. این

¹ Thiocalcin



شکل ۲- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین GAPDH, type I در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد.



شکل ۳- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین Thioredoxin h1 در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد.

جدول ۲- پروتئین‌های شناسایی شده به همراه منشأ شناسایی، کد، نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی و بانک اطلاعاتی مربوطه

شناسه لکه	شماره دسترسی	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	نام پروتئین
A78	۹۲۷۸۵۱۱۰	۵۷	۴/۸۶	GAPDH, type I
A241	۷۴۰۵۸۵۱۲	۱۲	۵/۳۱	Thioredoxin h1
A118	۱۶۹۷۴۷۵۸۷	۳۲	۴/۹۲	EST mhl-0016-B10 Drought Stressed chickpea leave library cier arietinum cDNA clone
A237	۳۹۲۸۱۵۲	۱۵	۵/۳۰	ribulose 1.5- biphosphate carboxylase small subunit(<i>Cicer aritinum</i>)
A257	۲۰۱۱۹۰۶۴۶۸	۳۶	۵/۷۸	20S proteasome subunit alpha-1(<i>Gossypium hirsutum</i>)
A305	۲۲۲۹۶۴۱۹	۳۹	۴/۳۶	putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1
A106	T06258	۲۴	۵/۳۶	Superoxide dismutase

تیوردوکسین h هم‌چنین یک تنظیم‌کننده‌ی قوی کینازهای شبه گیرنده متصل به غشاء^۱ در گیاهان (Baier and Dietz 1996) است. برخی آن را به‌عنوان پروتئینی پیام‌رسان در گیاهان پیشنهاد نموده که آن را به‌عنوان یک پروتئین اصلی در شیره آوند آبکش یافت نمودند. ریز تزریقی تیوردوکسین h نو ترکیب ثابت نمود که خود پروتئین توانایی انتقال سلول به سلول خودش را از طریق پلاسمودسماتا دارد (Ishiwatari et al. 1998)، بنابراین یک عنصر متحرک در گیاهان بوده و می‌تواند به‌عنوان یک حامل پیام احتمالاً با تنظیم کردن گیرنده‌های غشایی عمل کند (Baier and Dietz 1996). بیان ژن‌های تیوردوکسین گیاهی توسط گونه‌های اکسیژن فعال القا می‌شوند. بیان تیوردوکسین h جهت احیای سطح گونه‌های اکسیژن فعال طی نمو گره در ریشه‌های سویا مورد نیاز است (Lee et al. 2005).

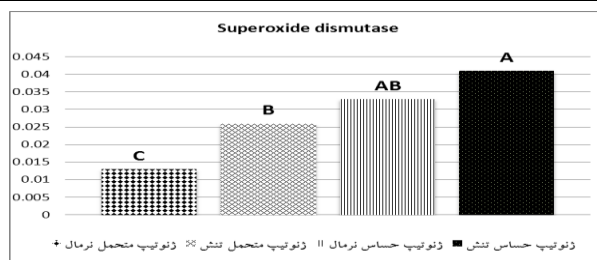
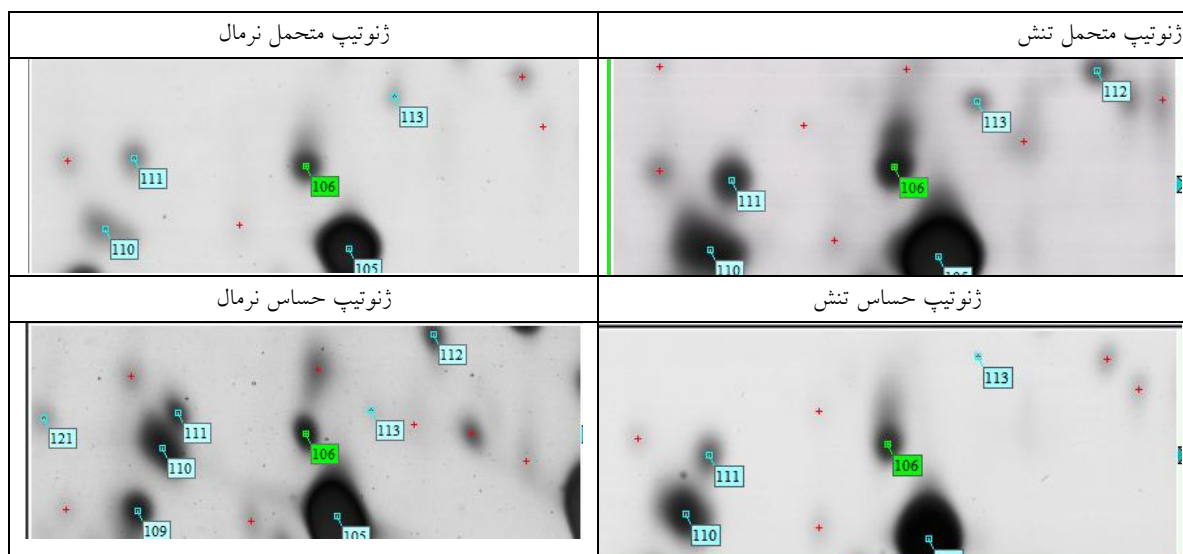
لکه شماره ۱۰۶ به‌عنوان سوپراکسید دیسموتاز شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش بود. در ژنوتیپ متحمل با وجود مقدار نسبی کمتر نسبت به رقم حساس این میزان افزایش دو برابر بوده است در حالی که در ژنوتیپ حساس حدود ۱/۲ برابر افزایش بیان دیده شد (شکل ۴). این آنزیم کاتالستی با قدرت بالا بوده که نقشی اصلی در مسیر آنتی‌اکسیدانی بر عهده دارد. سوپراکسید دیسموتاز همان‌طور که قبلاً ذکر شد در حذف سوپر اکسید نقش ایفا می‌کند. در تنش خشکی با وجود متغیر بودن در آزمایش‌های بیوشیمیایی میزان تولید سوپر اکسید افزایش می‌یابد در نتیجه اعداد به‌دست‌آمده در این تحقیق منطقی به‌نظر می‌رسند. افزایش بیان سطوح ایزو

¹ Membrane-bound, receptor-like kinases

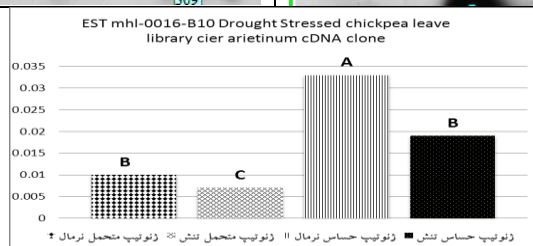
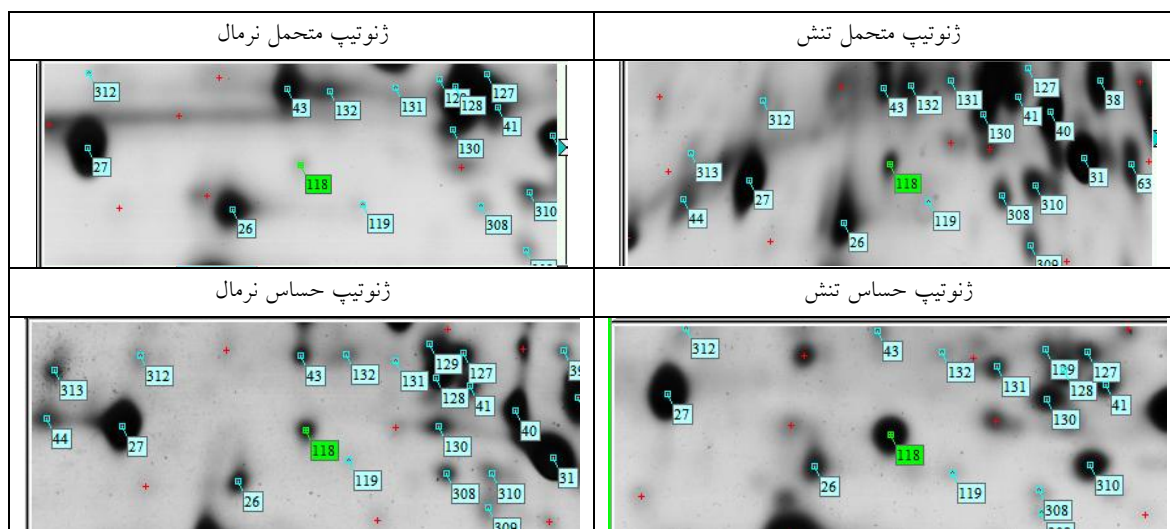
فرم‌های مختلف سوپراکسید دیسموتاز در تنش خشکی گندم و در تنش شوری چغندر قند (Hajheidari et al. 2005, Hajheidari et al. 2007) گزارش شده است. EST mhl-0016-B10 Drought Stressed chickpea leave library cDNA clone لکه شماره ۱۱۸ مربوط به EST mhl-0016-B10 Drought Stressed chickpea leave library cier arietinum cDNA clone است که در ژل‌های مربوط به ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش کاهش بیان نشان داد (شکل ۵).

از آنجایی که در پاسخ به تنش خشکی و سرما روند مشابهی در خصوص این EST مشاهده شده، احتمالاً مسیرهای مشترکی وجود دارد که با افزایش مدت تنش سرما کاهش روند در این پروتئین گزارش شد (Heidarvand 2012).

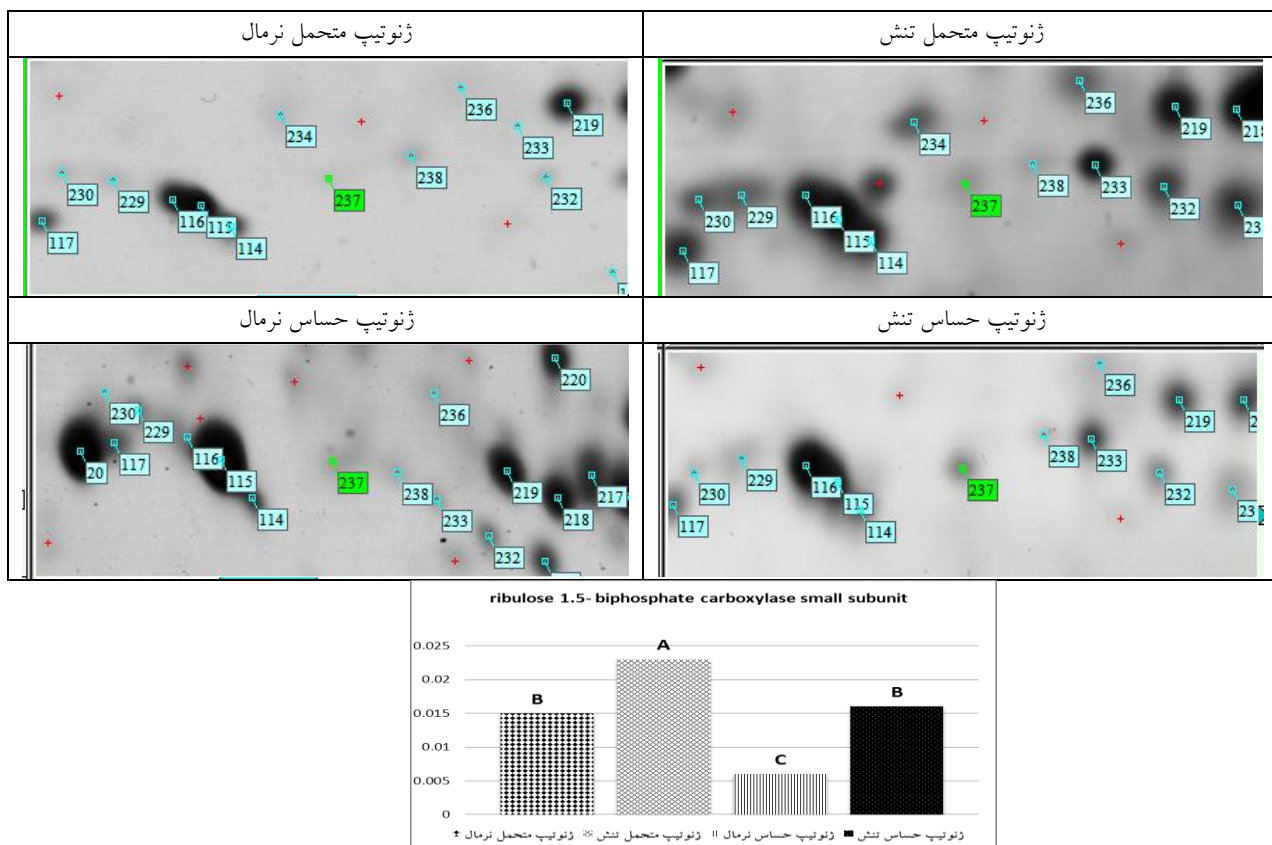
لکه شماره ۲۳۷ مربوط به پروتئین ribulose 1.5- biphosphate carboxylase small subunit (*Cicer aritinum*) زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو است. در ژل‌های مربوط به سطوح تنش این پروتئین افزایش بیان نشان داد (شکل ۶). آنزیم روبیسکو ۵۰-۳۰ درصد پروتئین کلروپلاست را تشکیل داده و فراوان‌ترین آنزیم روی کره زمین به‌شمار می‌رود. این آنزیم با ایفای نقش کلیدی در چرخه کالوین تثبیت‌کننده دی‌اکسید کربن هوا و تبدیل آن به مواد آلی و غذایی می‌باشد. ژن‌های رمز کننده زیر واحد کوچک روبیسکو (rbcL) در هسته قرار داشته و پس از ساخت در سیتوپلاسم به کلروپلاست مهاجرت نموده و در آنجا با زیر واحد بزرگ ترکیب می‌شود (Dhingra et al. 2004). پروتئین روبیسکو در کلروپلاست سلول گیاهی قرار دارد. این کمپلکس اولین و اصلی‌ترین واکنش مستقل نوری را در چرخه کالوین بر عهده دارد. تغییرات در سطح بیان این پروتئین‌ها در مراحل مختلف رشد زایشی آراییدوپسیس گزارش شده است (Kim et al. 2002).



شکل ۴- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی قادیبر برای پروتئین Superoxide dismutase در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد



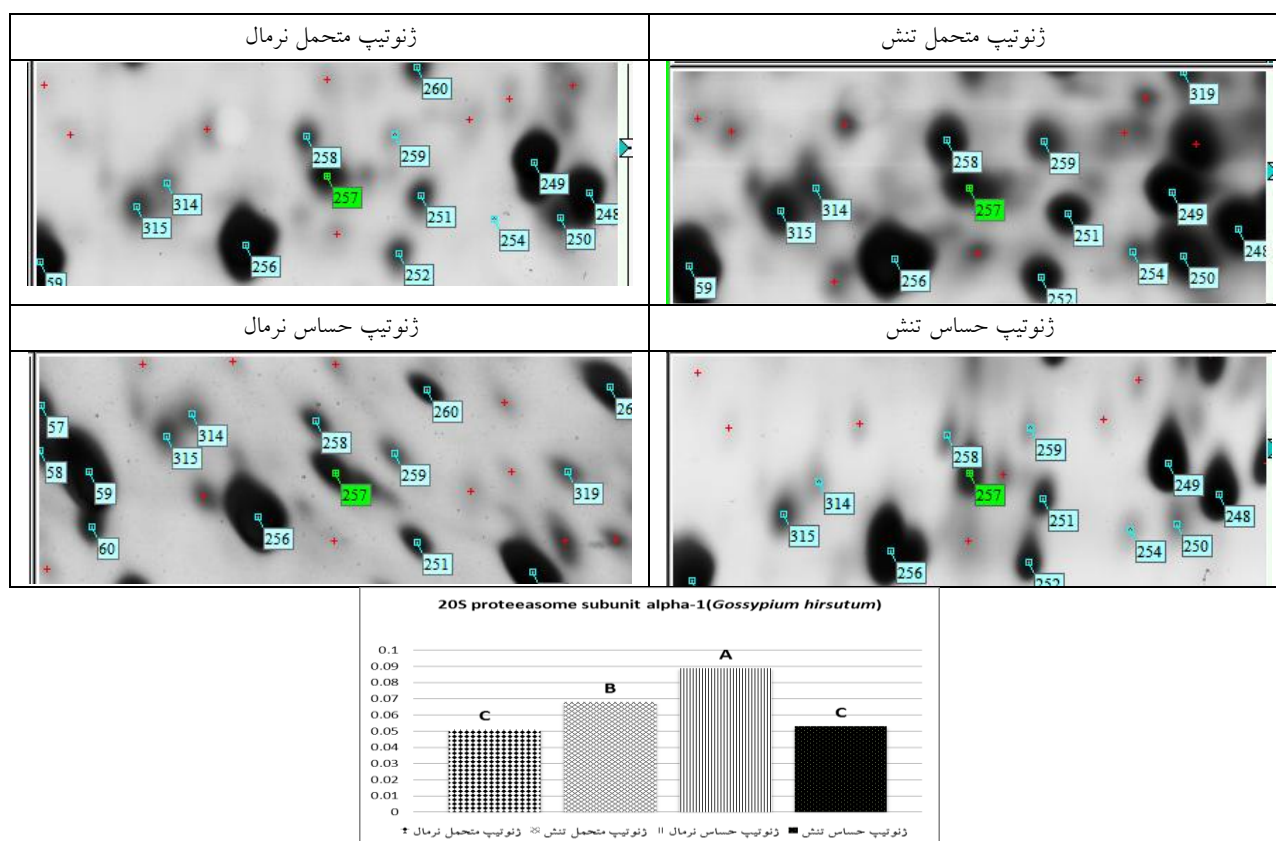
شکل ۵- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین EST mhl-0016-B10 در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد



شکل ۶- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین ribulose 1.5- biphosphate carboxylase small subunit در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد

تنش افزایش بیان این پروتئین مشاهده شد که در رقم متحمل به دلیل وجود مکانیسم تحمل این نرخ بیش‌تر بود. ساختار پروتئوزوم 20S از زیر واحدهای 26S بوده که در میان یوکاریوت‌ها به شدت حفاظت شده‌است. فعالیت پروتئوزوم 20S شناسایی و تجزیه پروتئین‌های بد تاخوردیده یا آسیب دیده‌ای که ساختار سه بعدی‌شان از دست رفته و هم‌چنین پروتئین‌های کارکردی دارای پیام‌های اختصاصی می‌باشد. بررسی‌ها نشان دادند که پروتئوزوم 20S و 26S می‌توانند مستقل از مسیر یوبی کوئیتین برخی پروتئین‌ها را تجزیه نمایند. پروتئین‌های اکسیده شده خطرناک برای سلول در اثر فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال با حضور پروتئوزوم 20S به‌تنهایی و بدون نیاز به ATP و Ub حذف شوند. البته سطوح بالای تنش اکسیداتیو باعث غیرفعال شدن این پروتئاز می‌شود. از طرفی اولئیک، لینولئیک و لینولئیک اسیدها نیز قادر به فعال نمودن مسیر هضم پروتئوزوم 20S هستند (Kurepa and Smalle 2008).

با وجودی که مقدار روبیسکو در برگ‌ها به‌واسطه میزان ساخت این آنزیم نسبت به مقدار تجزیه آن تعیین می‌شود، ولی در تنش خشکی در گندم، کاهش نسبی تظاهر این آنزیم در رقم حساس نشان داده شد که در رقم متحمل ثبات تظاهر بیش‌تری داشت (Fotovat 2007). گیاهان سه کربنه در نواحی گرم و خشک برای میزان بالاتری روبیسکو تکامل یافته‌اند و بر همین اساس یکی از راهکارهای اصلاح مقاومت به خشکی، گزینش برای روبیسکوی بالاتر و یا دست ورزی و افزایش بیان ژن‌های دخیل در ساخت روبیسکو با استفاده از مهندسی ژنتیک است (Parry et al. 2007). لکه شماره ۲۵۷ مربوط به پروتئین 20S proteasome subunit alpha-1 است که در بانک‌های اطلاعاتی به گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) منتسب شده‌است. در ژل‌های مربوط به سطوح تنش این پروتئین در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد (شکل ۷). این پروتئین در ژنوتیپ حساس و متحمل در حالت عدم تنش تفاوتی نشان نداده که دلیل آن محافظت آن در شرایط عدم تنش است. در حالت بروز



شکل ۷- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین 20S proteasome subunit alpha-1 در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد

مجدد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و خسارت غشایی مرتبط با تنش اکسیداتیو مرتبط دانست که در ژنوتیپ متحمل نیز با افزایش تنش بیش از آستانه تحمل، امکان کاهش این پروتئین محتمل است (Heidarvand 2012). بررسی‌ها روی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در اثر شوری در پروتئوم میتوکندریایی برنج (Chen et al. 2009) نشان‌دهنده کاهش بیان COX6b بوده که با افزایش تنش اکسیداتیو همراه بوده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از ژل‌های دوبعدی دو ژنوتیپ نخود در شرایط عدم تنش و تنش نشان داد که الگوی پروتئوم برگی در هنگام پاسخ گیاه به تنش خشکی در مقایسه با عدم تنش به‌طور وسیعی تغییر کرده است. این تغییرات حاکی از طیف وسیع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده پس از اعمال تنش خشکی بود. در بین پروتئین‌های شناخته‌شده، پروتئین GAPDH, type A در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان، پروتئین

در مطالعه‌ای بر روی آراییدوپسیس افزایش این پروتئین در پاسخ به تنش سرمایی گزارش شده و آن را با افزایش نرخ پروتئین تحت تنش مرتبط دانستند (Imin et al. 2004; Wagstaff et al. 2010).

لکه شماره ۳۰۵ مربوط به پروتئین putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 که در بانک‌های اطلاعاتی متناسب به گیاه برنج (*Oryza sativa japonica*) است. در ژل‌های مربوط به ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش این پروتئین هم در ژنوتیپ متحمل و هم در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. این پروتئین عنصر پایانی زنجیره تنفسی میتوکندری و گیرنده الکترون از سیتوکروم c جهت احیای اکسیژن است (شکل ۸).

تغییر نرخ این پروتئین رابطه معکوس با تنش اکسیداتیو داشته که با مکانیسمی متفاوت افزایش تنش اکسیداتیو^۱ موجب کاهش این پروتئین شد. هم‌چنین می‌توان کاهش این پروتئین را با افزایش

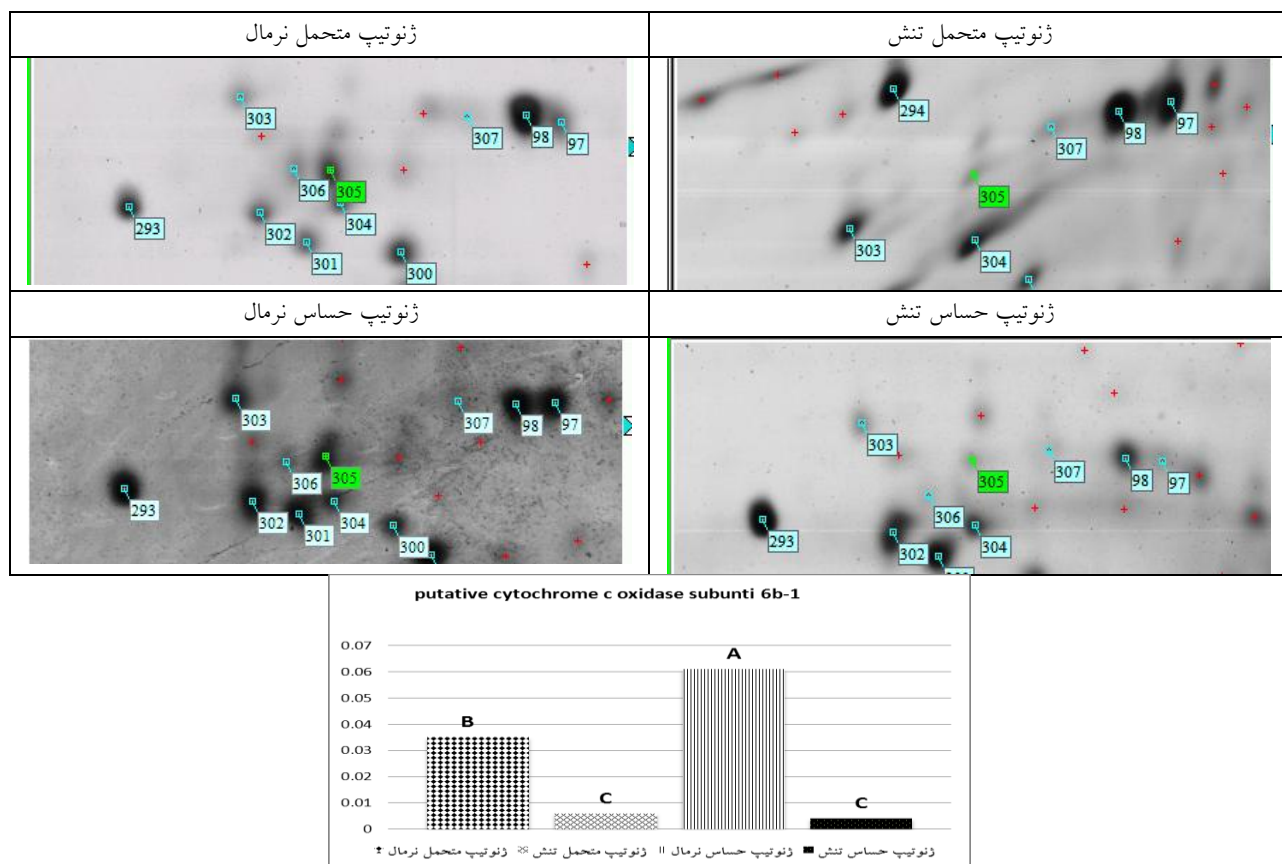
¹ Oxidative burst

و هم در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داده و مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی سوپراکسید دیسموتاز در ژل‌های دو ژنوتیپ نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش بود.

سپاسگزاری

از بانک ژن پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در تأمین مواد آزمایشی طرح نهایت سپاسگزاری را داریم.

Thioredoxin h1 در سطوح مختلف تنش افزایش بیان، پروتئین EST mhl-0016-B10 در ژل‌های مربوط به ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش کاهش بیان، پروتئین زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو در سطوح تنش افزایش بیان، پروتئین proteasome subunit alpha-1 در ژل‌های مربوط به سطوح تنش افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان، پروتئین putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 در ژل‌های مربوط به ژنوتیپ و سطوح مختلف تنش هم در ژنوتیپ متحمل



شکل ۸- الگوی پروتئوم و هیستوگرام مقادیر مربوط به درصد حجمی برای پروتئین putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 در دو ژنوتیپ حساس و متحمل تحت تنش خشکی. حروف نشان‌دهنده گروه‌بندی‌های مختلف آماری می‌باشد.

منابع

- Ali GM, Komatsu S (2006) Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Journal of Proteome Research* 5:396-403.
- Baier M, Dietz KJ (1996 a) 2-Cys peroxiredoxin bas 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology-Plant Gene Register* 111:651.
- Besse I, Wong JH, Kobrehel K, Buchanan BB (1996) Thiocalsin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America 93:3169.
- Castillejo MA, Maldonado AM, Ogueta S, Jorin JV (2008) Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. *Open Proteomics Journal* 1:59-71.
- Chen X, Wang Y, Li J, Jiang A, Cheng Y, Zhang W (2009) Mitochondrial proteome during salt stress-induced

programmed cell death in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:407-415.

Dadi L, Regassa S, Fikre A, Mitiku D, Gaur PM, Gowda CLL, Bantilan MSC (2005) Adoption studies on improved chickpea varieties in Ethiopia. EARO (Addis Abeba, Ethiopia) and ICRISAT (Patancheru, India).

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

Dhingra A, Portis AJR, Daniel H (2004) Enhanced translation of a chloroplast expressed RbcS gene restores SSU levels and photosynthesis in nuclear antisense RbcS plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:6315-6320.

Fotovat R (2007) Identification of drought tolerance candidate proteins and genes in wheat (*Triticum aestivum*). PHD thesis in plant breeding. University of Tabriz (In Farsi).

Goodarzvand Chegini K (2016) Study of drought stress in chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes using morphological traits and biochemical markers and detection of its proteome response. PHD thesis in plant breeding. University of Zanjan (In Farsi).

Gunes A, Inal A, Adak MS, Bagci EG, Cicek N, Eraslan F (2008) Effect of drought stress implemented at pre-or post-anthesis stage on some physiological parameters as screening criteria in chickpea cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology* 55:59-67.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19:1720-1730.

Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidai M, Sadeghian SY, Ober ES, Salekdeh GH (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* 5:950-960.

Hajheidari M, Eivazi A, Buchanan BB, Wong JH, Majidi I, Salekdeh GH (2007) Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research* 6:1451-460

Heidarvand L (2012) Evaluation of chickpea proteome in early stages of cold. PHD thesis in plant breeding. University of Tehran (In Farsi).

Imin N, Kerim T, Rolfe BG, Weinman JJ (2004) Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. *Proteomics* 4:1873-82.

Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ (1998) Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 205:12-22.

Johnson TC, Wada K, Buchanan BB, Holmgren A (1987) Reduction of purothionin by the wheat seed thioredoxin system. *Plant Physiology* 85: p. 446.

Kim HU, Hsieh K, Ratnayake C, Huang AHC (2002) Expression of Arabidopsis oleosin genes and characterization of their encoded oleosins. *Journal of Biology and Biochemistry* 277:22677-22684.

Komatsu S, Konishi H, Shen S, Yang G (2003) Rice proteomics: a step toward functional analysis of the rice genome. *Molecular and Cellular Proteomics* 2:2-10.

Kurepa J, Smalle JA (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90:324-35.

Lee MY, Shin KH, Kim YK, Suh JY, Gu YY, Kim MR, Hur YS, Son O, Kim JS, Song E, Lee MS, Nam KH, Hwang KH, Sung MK, Kim HJ, Chun JY, Park M, Ahn TI, Hong CB, Lee SH, Park HJ, Park JS, Verma DP, Cheon CI (2005) Induction of Thioredoxin Is Required for Nodule Development to Reduce Reactive Oxygen Species Levels in Soybean Roots. *Plant Physiology* 139:1881-1889.

Nouri MZ, Komatsu S (2010) Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics* 10:1930-1945.

Parry MAJ, Madgwick PJ, Carvahlo JFC, Andralojc PJ (2007) Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *Journal of Agricultural Science* 145:31-43.

Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D and Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* 117:1253-1263.

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

Scagliarini S, Trost P, Pupillo P (1998) The non-regulatory isoform of NAD(P)-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Spanish chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 52:1991-1997.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31:279-292.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334

Singh R, Sharma P, Varshney RK, Sharma SK, Singh NK (2008) Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 267:214-325.

Wagstaff C, Bermak I, Breeze Thornber S, Harrison E, Thomas B, Buchanan-Wollaston V, Stead T, Rogers H (2010) A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut Alstroemeria flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *Journal of Experimental Botany* 61:2905-2921.

Zhang X, Komatsu S (2007) A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry* 68: 426-437.