ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹
صفحه ۷۰-۶۱

مطالعه الگوی پروتئوم برگی رقم جوی افضل تحت تنش شوری

فواد فاتحی*[۱]، عبدالهادی حسین زاده[۲]، هوشنگ علیزاده[۳]، کاظم پوستینی[٤]، جواد قره چایی[٥]

۱،۲،۳و۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار، استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۵- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۳ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱)

چکیده

تنش شوری یکی از تنش‌های غیر زنده مهم و خسارت‌زا در کشاورزی است. در این تحقیق از روش پروتئومیکس به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده تنش شوری در رقم جوی افضل استفاده شد. به منظور مطالعه اثر تنش شوری طولانی مدت بر روی الگوی پروتئوم جو، بذور رقم افضل (تهیه شده از موسسه نهال و بذر بعنوان مقاوم شوری) در گلخانه آزمایشی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران کشت شدند. اعمال تنش بر روی گیاهان در مرحله ٤ برگی، با سطوح صفر (آب معمولی بعنوان شاهد) و ۳۰۰ میلی مولار NaCl صورت گرفت. نمونه-گیری با جدا کردن برگ چهارم گیاهان پس از ۲۱ روز بعد از اعمال تنش انجام شد.استخراج پروتئین کل بر اساس روش TCA-استون تغییر یافته انجام شد. پروتئین های استخراج شده از برگ جو در بعد اول به وسیله ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۷-٤ جداسازی شدند. در بعد دوم ژل‌های اکریل آمید با غظت ۱۲/۵ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه ژل‌ها نشان داد که از میان ۳۱۵ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، تعداد ۹۲ لکه دارای تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها بودند که از میان آنها ٦٨ لکه افزایش بیان و ٢٤ لکه کاهش بیان داشتند. تجزیه ۲۵ لکه پروتئینی با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF منجر به شناسایی پروتئین‌هایی از قبیل Oxygen-evolving enhancer protein 2، Rubisco، گلایسین دکربوکسیلاز، nucleoside diphosphate kinase، پلی آمین اکسیداز،پروتئین‌های ریبوزومی و Translationally-controlled tumor protein شد که در مکانیسم‌های فتوسنتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل هستند.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی،
پروتئومیکس،
شوری،
جو

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

مقدمه

تنش شوری از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و تولیدپذیری محصولات زراعی محسوب می‌شود. تخمین زده شده بیش از ۲۰٪ از کل زمین‌های جهان و نزدیک به نیمی از زمین‌های کشاورزی آبی از شوری متاثر هستند (۲۱). نزدیک به ۲٤ میلیون هکتار از اراضی ایران تحت تاثیر شوری است(۱). شوری باعث کمبود آب (تنش اسمزی)، سمیت یونی و کمبود مواد غذایی می‌شود. شوری بالاتر از حد آستانه (که بستگی به رقم و دیگر پارامترها دارد) رشد را متوقف و موجب نابودی گیاه می‌شود. پایین‌تر از این آستانه، رشد گیاه کند شده و عملکرد به شدت کاهش می‌یابد(۲۱). جو یکی از گیاهان مهم مورد استفاده در تغذیه دام، تولید مالت و غذای انسان می‌باشد. اهمیت جو بواسطه رشد آن در نواحی حاشیه‌ای با حاصلخیزی کم می‌باشد که معمولاً بوسیله خشکی، دمای پایین و شوری محدود شده است (۴). گیاهان قادرند تنش را دریافت کرده و سیگنال تنش را به درون سلول خود انتقال داده و مکانیسم‌های سازگاری خود را فعال کنند. مکانیسم سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی غالباً با تغییر بیان ژن‌هایشان همراه است. یکی از راه‌های بررسی الگوی بیان ژن‌ها اندازه گیری میزان رونوشت‌های mRNA کد شده از تک تک ژن‌ها به کمک روش‌هایی مانند ریزآرایه[1]، SAGE و-cDNA AFLP است. برای مثال با استفاده cDNA microarray ۱۹۴ رونوشت mRNA شناسایی شدند که بیانشان تحت تنش شوری در آرابیدوپسیس پنج برابر افزایش یافت (۲۰). در تحقیق مشابهی الگوی بیان ژن‌های برنج تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد بیش از ۱۰٪ ژن‌ها در فاز اولیه تنش شوری کاهش یا افزایش بیان نشان می‌دهند (۱۵). با وجود قدرت بالای روش‌های بالا در تجزیه بیان ژن‌ها، هیچ یک از این روش‌ها اطلاعاتی کمّی و کیفی از فراورده نهایی ژن‌ها (پروتئین‌ها) در اختیار ما قرار نمی‌دهند. بین میزان mRNA و پروتئین رابطه مستقیمی وجود ندارد بخصوص در مورد پروتئین‌های با فراوانی کم. از سوی دیگر بسیاری از پروتئین‌ها پس از ساخته شدن دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شوند که برای فعالیت زیستی و محل قرار گرفتن‌ها آنها در داخل سلول اهمیت زیادی دارند. لزوم بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطح پروتئین از اهمیت زیادی برخوردار است.

مطالعه تغییرات الگوی بیان پروتئین‌ها در طول تمایز و یا در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی منجر به شناسایی پروتئین‌هایی که بیانشان تحت این شرایط تغییر می‌کند شده است. پروتئین‌ها در مقایسه با سایر ماکرو مولکول‌ها در موقعیت ممتازی قرار دارند زیرا با آنکه ارتباط خود را با ژن‌ها حفظ کرده‌اند، از تمام خصوصیات کاتالیک، ساختمانی و دیگر لوازم ضروری برای انجام کنش خود برخوردارند. از این رو پروتئین‌ها می‌توانند بهترین توصیف برای عمل تک‌تک ژن‌ها در سطح مولکولی باشند. از طرف دیگر توجه به این نکته که واکنش به عوامل محیطی از طریق پروتئین انجام می‌شود، بر اهمیت نقش پروتئین‌ها در سلول می‌افزاید (۹).

پروتئومیکس در این راه کمک زیادی به ما کرده است. پروتئومیکس بسیاری از گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی انجام شده است. ماژول و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی اثر تنش شوری بر روی ریشه‌های دو رقم گندم مقاوم و حساس، ۹ پروتئین پاسخ دهنده را شناسائی کردند (۱۹).

داداشی دوکی و همکاران در سال ۲۰۰٦ به بررسی الگوی بیان پروتئین در پانیکول برنج تحت تنش شوری پرداختند. در این تحقیق ژنوتیپ IR٦٥١ به عنوان مقاوم به شوری انتخاب شده و ۱۲ روز پس از اعمال تنش شوری نمونه‌گیری از پانیکول‌های جوان برنج انجام گرفته است. نمونه‌های پانیکول در سه سطح از لحاظ اندازه تقسیم‌بندی شدند. الگوی بیان این سه گروه تجزیه شده و تعداد ۱۳ پروتئین در هر سه گروه دچار تغییر بیان قابل ملاحظه بودند. ۱٦ پروتئین دیگر نیز مشخص گردید که دچار تغییر در بیان شده‌اند. با شناسایی این پروتئین‌ها بوسیله طیف سنجی جرمی، مشخص گردید که آنها به عنوان آنتی اکسیدانت‌ها و پروتئین‌های درگیر در ترجمه، رونویسی، انتقال و سنتز ATP نقش ایفا می‌کنند (۷).

عسکری و همکاران (۲۰۰۵) الگوی پروتئوم برگ *Suadeda aegyptiaca* را تحت تنش شوری بررسی کردند. گیاهچه‌های ۱۰

[1] Microarray

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

روزه این گیاه در سطوح مختلف صفر، ۱۵۰، ۳۰۰، ٤٥٠ و ٦٠٠ میلی مولار کلرید سدیم تیمار شدند. پس از ۳۰ روز نمونه‌های برگی جمع آوری شده بوسیله الکتروفورز دوبعدی بررسی شدند. در مجموع ۱۰۲ لکه پروتئینی در مقایسه با شاهد (سطح صفر نمک) شناسایی شدند که دچار تغییر بیان شده بودند. این گروه بیشترین سطح تغییر در الگوی پروتئین‌ها را در سطح ٦٠٠ میلی مولار گزارش کردند. تعداد ۲۷ تا از این پروتئین‌ها شناسایی شد که در مقاومت به تنش اکسیداتیو، سنتز گلیسین بتائین، فتوسنتز، سنتزATP، تجزیه پروتئین، سم زدایی سیانید و فعالیت چاپرونی دخیل بودند. علاوه بر این گلیسین بتائین به عنوان یک اسموپروتکتانت نیز عمل می‌کند (۳).

یان و همکاران (۲۰۰٤) بر روی گیاه برنج واریته Nipponbare تنش شوری را اعمال کردند. در این آزمایش گیاهچه‌های این رقم که در هفته سوم رشد خود بودند، با غلظت ۱۵۰ mM نمک کلرید سدیم، تیمار شدند. در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش نمونه‌های ریشه گرفته شده و پروتئین کل را استخراج کردند. تعداد ۱۱۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر مورد تجزیه قرار گرفت. از این تعداد لکه، ۳٤ لکه پروتئینی افزایش بیان، و ۲۰ لکه پروتئینی کاهش بیان نشان دادند. به کمک طیف سنج جرمی و نیز جستجوی بانک‌های اطلاعاتی تعداد چهار لکه به عنوان پروتئین‌های دخیل در مقاومت به تنش شوری شناسایی شدند و دو پروتئین دیگر از این لکه‌ها به عنوان UDP–گلوکز پیروفسفریلاز[2] و سیتوکروم C اکسیداز[3] شناسایی و گزارش گردید. این پروتئین‌ها در تنظیم متابولیسم نیتروژن، کربوهیدرات و انرژی نقش ایفا می‌کنند (۲۹).

با توجه به اینکه اطلاعات موجود در زمینه پاسخ به تنش شوری در گیاه جو مفید و اندک می‌باشد، این تحقیق به منظور دستیابی به اطلاعات بیشتر در زمینه شناسایی پروتئین‌های دخیل در پاسخ به تنش شوری طولانی مدت در گیاه جو انجام شد.

مواد و روش‌ها

اعمال تنش و نمونه‌گیری

در این تحقیق رقم جوی افضل به عنوان ماده ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. بذور نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی پرلیت و کوکوبیت (به نسبت ۳ به ۱) در گلخانه آزمایشی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت شدند. بعد از مرحله دو برگی گیاهان با استفاده از محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند و این کار تا زمان اعمال تنش شوری یعنی مرحله ۴ برگی ادامه یافت. برای اعمال تنش از سطوح صفر (به عنوان شاهد)، و ۳۰۰ میلی مولار NaCl استفاده شد. تنش شوری به مدت ۲۱ روز اعمال و سپس نمونه گیری انجام گرفت. نمونه‌های برگی در نیتروژن مایع منجمد و تا هنگام استخراج پروتئین در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

اندازه گیری محتوای سدیم و پتاسیم

مقداری از برگ‌های (برگ چهارم) جدا شده با آب مقطر شستشو داده شد، نمونه‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲°C خشک شدند و وزن خشک برگ‌ها محاسبه شد. به منظور تعیین غلظت سدیم و پتاسیم از روش هضم خشک استفاده شد (۲۵).

استخراج پروتئین و الکتروفورز دو بعدی

استخراج پروتئین از بافت برگی (برگ چهارم) بر اساس روش دامروال و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییرات انجام گرفت (۸). برای اندازه گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌ها از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد (۶). در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۷-۴، پروتئین‌ها در استوک بازجذب[4] حل شده و همزمان با عمل بازجذب وارد ژل شدند. عمل باز جذب در طول شب و به طور متوسط ١٤ تا ١٦ ساعت طول کشید. در این تحقیق از دستگاه مولتی فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس برای انجام بعد اول (IEF) استفاده شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell

[2] UDP-glucose pyrophosphorylase
[3] Cytochrome C oxidase
[4] Rehydration

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

ساخت شرکت بیورَد استفاده شد. مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتوکل بِلوم و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد(۵). پس از رنگ آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیورد اسکن و به فرمت تیف ذخیره شدند. برای بررسی کمّی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار .Melanie 7 استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در ژل‌های تیمارهای مختلف را علامت زده و پس از استخراج مقدار کمّی درصد حجمی (%Vol) لکه‌ها داده‌ها مورد تجزیه آماری تی استیودنت قرار گرفتند. لکه‌هایی که مقادیر کمّی بیان آنها در سطح آمار ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند (به میزان بیش از ۱/۵ برابر افزایش یا کاهش بیان) به عنوان لکه‌های کاندیدا شناخته شدند.

هضم پروتئین‌ها در ژل و تجزیه با طیف سنج جرمی

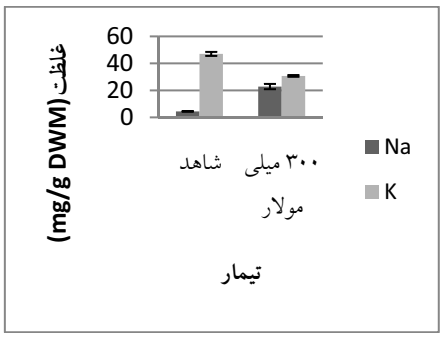
لکه‌هایی که در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نشان می دادند و تغییر بیان ۱/۵ برابری داشتند به منظور شناسایی بوسیله طیف سنج جرمی از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو جدا شدند.

لکه‌های پروتئینی جدا شده سه بار با آب خالص شستشو داده شدند، سپس با محلول ۵۰ میلی مولار NH_4HCO_3 در ۵۰٪ استونیتریل رنگ‌زدایی شدند. پس از این مرحله با استفاده از محلول ۱۰ میلی مولار DTT در ۵۰٪ استونیتریل احیاء و با محلول ۴۰ میلی مولار یدواستامید در ۵۰٪ استونیتریل آلکیله شدند. در نهایت دو بار با محلول ۱۰۰٪ استونیتریل خشک شدند. هضم آنزیمی در طول شب و در دمای ۳۷ درجه با استفاده از آنزیم تریپسین انجام گرفت. پپتیدها سپس با استفاده از محلول ۰/۱٪ TFA در ۵۰٪ استونیتریل اسخراج شدند. تجزیه طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF در دانشگاه یورک انگلستان انجام شد. داده‌های حاصل از طیف سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBInr مورد تجزیه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

مقدار سدیم و پتاسیم

به منظور اعمال تنش شوری گیاهچه‌های ۴ برگی به مدت ۲۱ در معرض غلظت ۳۰۰ میلی مولار NaCl قرار گرفتند. برای مقایسه تیمار شوری و کنترل از آزمون t استفاده شد و نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمار شوری و شاهد در سطح ۱ درصد وجود دارد. چنانکه مشاهده می‌شود مقادیر سدیم و پتاسیم پس از اعمال تنش به ترتیب افزایش و کاهش یافته‌اند (شکل۱).



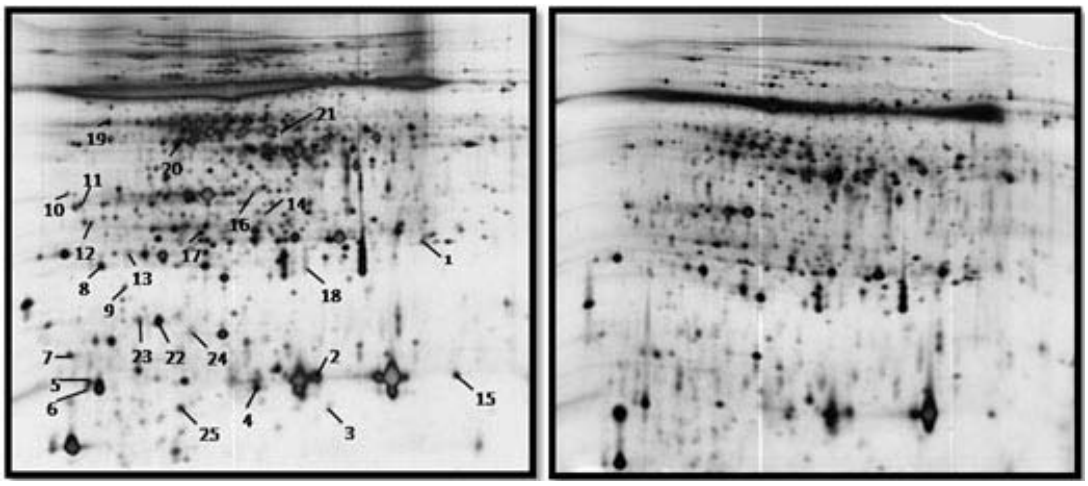
شکل ۱- میانگین و انحراف معیارغلظت سدیم و پتاسیم تحت شرایط کنترل (صفر) و ۳۰۰ میلی مولار NaCl

بررسی پروتئوم برگ

به منظور بررسی اثر تنش شوری بر روی الگوی پروتئوم برگ جوی رقم افضل گیاهچه‌های ۴ برگی تحت تنش شوری قرار گرفتند. پروتئین‌ها از برگ‌های چهارم گیاهچه‌های تحت تنش شوری و نرمال استخراج شدند. پس از تجزیه ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره تعداد ۳۱۵ لکه پروتئینی به طور تکرار پذیر در ژل‌ها شناسایی و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. به منظور بررسی تغییرات کمّی بیان پروتئین‌ها از مقدار درصد حجمی هر لکه به عنوان یک مقدار نرمالیزه شده استفاده شد. داده‌های حاصل سپس در نرم افزار اکسل تجزیه شدند. از آزمون آماری تی استیودنت برای شناسایی تغییرات بیان بین لکه‌ها در تیمارهای شاهد و تنش دیده در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون تی استیودنت نشان داد که تعداد ۹۲ لکه پروتئینی در مقایسه تیمار شوری با شاهد تغییر ۱/۵ برابری در بیان نشان می‌دهند. از بین این تعداد، ۶۸ لکه پروتئینی افزایش بیان و تعداد ۲۴ کاهش بیان نشان دادند. موقعیت تعدادی از این پروتئین‌ها در شکل۲ نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]



شکل۲- رقم افضل تحت شرایط نرمال (راست) و تنش (چپ)

شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری

از بین لکه‌های پروتئینی که تغییر ۱/۵ برابری در بیان داشتند تعداد ۲۵ لکه با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF شناسایی شدند. پروتئین‌های شناسایی شده در جدول-۲ آورده شده‌اند. در بین تمام پروتئین‌های شناسایی شده همبستگی خوبی بین مقادیر pI و MW تئوریکی و آزمایشی دیده می‌شود. برای غالب پروتئین‌های شناسایی شده hit های اول و با بالاترین میزان اسکور در نظر گرفته شدند.

در بین پروتئین‌های شناسایی شده ۴ پروتئین جزء زیرواحدهای کوچک رابیسکو بودند (لکه‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۸ و ۱۶). آنزیم رابیسکو یکی از پروتئین‌های چند زیر واحدی (۸ زیرواحد کوچک و ۸ زیر واحد بزرگ) کلیدی مسیر تثبیت کربن می‌باشد که اولین واکنش چرخه کالوین را کاتالیز می‌کند. زیر واحدهای کوچک این آنزیم توسط ژنوم کلروپلاست کد می‌شوند. لکه‌های ۲ و ۴ هر دو یک پروتئین با یک عدد gi هستند. همان طور که در شکل۲ دیده می‌شود بیان این پروتئین‌ها در تنش شوری به میزان زیادی افزایش داشته است. بنظر می‌رسد که گیاه بواسطه ناپدار بودن زیر واحدهای رابیسکو بیان آنها را تحت تنش افزایش داده است. لکه شماره ۲۱ به عنوان رابیسکو اکتیواز شناسایی شد. این پروتئین تحت تنش شوری به میزان ۳/۳ برابر افزایش بیان نشان داده است. رابیسکو اکتیواز یکی از اعضای خانواده پروتئینی AAA[5] است که نقش شبه چاپرونی دارند. نقش اصلی رابیسکو اکتیواز حفظ فعالیت کاتالیتیکی آنزیم رابیسکو با حذف قندهای مهار کننده از جایگاه فعال آن می‌باشد (۲۴). در تحقیق مشابهی که پارکر و همکاران (۲۰۰۶) بر روی لامینای برگ[6] برنج انجام دادند رابیسکو اکتیواز به ترتیب تحت تنش کوتاه مدت و بلند مدت شوری ۱/۷ و ۲/۵ برابر افزایش بیان نشان داد. یکی از دلایل افزایش فعالیت رابیسکو اکتیواز در تنش طولانی مدت بواسطه کاهش هدایت روزنه‌ای و کاهش سطح CO_2 می‌باشد. کاهش CO_2 استرومایی منجر به افزایش سرعت غیر فعال شدن رابیسکو بواسطه اتصال قندهای مهار کننده به جایگاه فعال آنزیم می‌باشد (۲۳).

یکی از پروتئین‌هایی که بیان آن تحت تنش طولانی مدت شوری کاهش نشان داد Oxygen-evolving enhancer protein 2 (لکه ۱) بود. در تحقیق مشابهی که توسط عباسی و کوماتسو (۲۰۰۴) انجام گرفت مشخص شد بیان OEE2 در ساعات اولیه (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش) تنش شوری در برگ برنج افزایش می‌یابد اما پس از گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد (۲). پروتئین‌های OEE شامل سه زیر واحد ((OEE1 (33 kDa، OEE2 (23 kDa) و OEE3 (16 kDa)) می‌باشند. این پروتئین‌ها توسط ژنوم هسته کد می‌شوند و در سطح لومینال غشاء کلروپلاست قرار می‌گیرند (۲۷). مشخص شده است که کمپلکس

[5] ATPase Associated with diverse cellular Activities
[6] leaf lamina

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

OEE به سهولت تحت تنش شوری از کمپلکس فتوسیستم II در غشاء تیلاکوئید جدا می‌شود. لکه‌های ۵ و ۶ به عنوان گلایسین دکربوکسیلاز شناسایی شدند. هر دو لکه به ترتیب ۴/۴ و ۳/۴ برابر افزایش بیان نشان می‌دهند. گلایسین دکربوکسیلاز با آزاد کردن CO_2 از گلایسین آن را به سرین تبدیل می‌کند. این واکنش جزئی از چرخه گلی اگسالات محسوب می‌شود. این چرخه در اثر فعالیت اکسیژنازی رابیسکو در سطوح پائین CO_2 آغاز می‌شود. در مطالعه‌ای که کیم و همکاران (۲۰۰۵) بر روی برگ برنج تحت تنش شوری داشتند مشخص شد بیان پروتئین‌های دخیل در چرخه گلی اگسالات از جمله گلایسین دکربوکسیلاز افزایش می‌یابد (۱۶).

لکه شماره ۱۳ به عنوان پروتئین Translationally controlled tumor protein (TCTP) شناسایی شد. این پروتئین یکی از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم می‌باشد اما به هیچ یک از خانواده‌ی پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم تعلق ندارد. افزایش بیان این پروتئین تحت تنش شوری در گیاهان برنج و آرابیدوپسیس گزارش شده است. این پروتئین در انتقال سیگنال در تنش شوری از طریق اتصال به کلسیم نقش دارد (۱۰).

نوکلئوزید دی فسفات کیناز (لکه ۱۵) یکی دیگر از پروتئین‌هایست که بیان آن در تنش شوری بیش از ۱/۵ برابر افزایش داشته است. نقش اصلی آن سنتز نوکلئوزید تری فسفات-های GTP، UTP، CTP و TTP است. افزایش بیان این پروتئین در پاسخ به تنش‌های مختلف مانند خشکی (۲۸ و ۱۱)، سرما (۱۴) و شوری (۱۶ و ۲۳) گزارش شده است. نوکلئوزید دی فسفات کیناز به عنوان یک پروتئین مرتبط با انواع تنش‌ها تلقی می‌شود (۱۸). داداشی دوکی و همکارن (۲۰۰۶) افزایش بیان این پروتئین را تحت تنش شوری در پانیکول برنج گزارش کردند (۷). افزایش بیان این پروتئین در آرابیدوپسیس منجر به کاهش گونه-های فعال اکسیژن (ROS) و بهبود مقاومت گیاه به انواعی از تنش‌های غیر زنده شده است.

پلی آمین اکسیداز (لکه ۱۷) به شدت تحت تنش شوری بیانش افزایش یافته است. پلی آمین اکسیدازها نقش عمده‌ای در تولید H_2O_2 در دیواره سلولی و در واکنش به صدمه دیدن یا حمله پاتوژن‌ها ایفا می‌کند. H_2O_2 در چندین واقعه فیزیولوژیکی از قبیل دفاع سلولی، مرگ سلولی، لیگنینی شدن و استحکام دیواره سلولی نقش دارد. cp31AHv و cp31BHv (لکه‌های ۱۱ و ۱۲) پروتئین‌های متصل شونده به RNA کلروپلاستی هستند. چورین و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند بیان این پروتئین‌ها با مراحل نموی برگ همبستگی دارد (۳۵). به نظر بیان cp31AHv تحت کنترل مثبت نور است.

پروتئین ES2A (لکه ۹) یکی از پروتئین‌های پاسخ دهنده به هورمون جیبرلیک اسید است که تحت تنش شوری افزایش ۱/۷ برابری در بیان نشان داده است. (۳۱). ES2A از یک موتانت (dbg576) جو که در مرحله رشد رویشی فنوتیپ کوتولگی نشان می‌دهد جدا شده است (۱۲).

لکه شماره ۱۸ به عنوان پروتئین شبه جرمین شناسایی شد. این پروتئین تحت تنش شوری افزایش ۲ برابری در بیان نشان داده است. جرمین‌ها در طی جوانه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و جو و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند و بیان آنها در تنش اسمزی در ریشه افزایش نشان داده است. برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبه اگزالات اکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز نشان می‌دهند. تولید H_2O_2 در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسمیوتازی حاکی از نقش این دسته از پروتئین‌ها در استحکام دیواره سلولی و مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های غیر زیستی است (۱۷). دنی و همکاران (۲۰۰۴) افزایش بیان این پروتئین را در آپوپلاست تنباکو تحت تنش شوری گزارش کردند (۳۱). کهر و همکاران (۲۰۰۵) حضور این پروتئین را در شیره آوند آبکش کلزا گزارش کردند (۱۴). در بین پروتئین‌های شناسایی شده دو پروتئین ریبوزومی به چشم می‌خورد (لکه‌های ۷، ۲۲ و ۲۳). سنتز پروتئین در سلول‌های گیاهی نقش فیزیولوژیکی مهمی در پاسخ گیاه به شرایط نامساعد محیطی دارد. بیان پروتئین‌های ریبوزومی در شرایط تحریک با هورمون گیاهی اکسین و تنش سرمایی دیده شده است (۳۲). بیان پروتئین ریبوزومی P1 با pI =۴/۱ و وزن مولکولی ۱۱/۲ به میزان ۲/۷ در

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

شرایط تنش افزایش یافته است. پروتئین S1 متعلق به زیر واحد کوچک ریبوزومی به میزان ۲/۳ افزایش بیان نشان می‌دهد. لکه‌های ۲۲ و ۲۳ هر دو یک پروتئین هستند (پروتئین ریبوزومی L12) که بواسطه تغییر اندک در میزان pI در دو موقعیت افقی در ژل ظاهر شده‌اند. این تغییر در موقعیت افقی ممکن است ناشی از تغییر بار خالص پروتئین بواسطه اضافه شدن گروه‌های باردار یا حذف بار صورت گرفته باشد.

لکه شماره ۱۰ به عنوان Predicted protein شناسایی شد. این پروتئین با ۷۳٪ همسانی توالی به nascent polypeptide associated complex alpha [*Solanum chacoense*] شباهت دارد. NAC یک هترودایمریک پروتئین متشکل از زیر واحدهای آلفا و بتا است. این پروتئین اولین پروتئین سیتوزولی است که به پلی پپتید در حال سنتز بر روی ریبوزوم متصل می‌شود. نقش اصلی این پروتئین هنوز تعیین نشده است. بنظر در انتقال پروتئین‌ها و در ترجمه نقش دارد. این پروتئین مانع از انتقال اشتباه زنجیره‌های پلی پپتیدی به شبکه آندوپلاسمی می‌شود (۲۶). شواهد زیادی نشان می‌دهد NAC- به عنوان کواکتیواتور رونوشت برداری عمل می‌کند (۳۲). یان و همکاران (۲۰۰۵) کاهش بیان این پروتئین را تحت تنش شوری در ریشه برنج گزارش کردند. نتایج این آزمایش نشان داد که بیان این پروتئین به میزان بیش از ۲ برابر تحت تنش افزایش داشته است. لکه شماره ۲۴ به عنوان Hypothetical protein شناسایی شد. همردیفی این پروتئین با پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBInr منجر به شناسایی هیچ پروتئین مشخصی نشد. Os04g0530600 لکه (۲۵) با ۷۱٪ همسانی توالی به thioredoxin M-type [*Zea mays*] شباهت دارد. لکه شماره ۱۴ پروتئینی را کد می‌کند که دارای دمن[7] (حوزه فعالیت) NADB-Rossmann supetfamily است. این پروتئین با ۸۲٪ همسانی توالی به NAD-dependent epimerase/dehydratase [*Zea mays*] شباهت دارد.

نتیجه گیری

حجم داده‌های حاصل از مطالعات الگوی پروتئوم با استفاده از ژل الکتروفورز دوبعدی به شدت در حال افزایش است. از این رو تلاش زیادی برای تفسیر و بکارگیری این داده‌ها در بهبود شناخت ما از فرایندهای زیستی و پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ضروری است. به منظور درک مکانیسم مقاومت گیاه به تنش شوری و شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری در این مطالعه پروتئوم برگی گیاهان تنش دیده و کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی الگوی پروتئوم تحت تنش شوری نشان می‌دهد بیان دسته خاصی از پروتئین‌ها در پاسخ به تنش تغییر نشان می‌دهد. در بین پروتئین‌های شناسایی شده در شرایط تنش تنها یک پروتئین کاهش بیان نشان می‌دهد. نتایج ما حاکی از آن است که فرایندهای مختلفی از تنش شوری متاثر می‌شوند. غالب پروتئین‌های شناسایی شده تحت تنش شوری افزایش بیان نشان می‌دهند، که بیانگر تلاش گیاه برای حفظ حالت تعادل فرایندهای زیستی که از تنش متاثر می‌شوند است. بیش از ۲۰ پروتئین پاسخ دهنده به تنش شوری شناسایی شد که در طیف وسیعی از فرایندهای زیستی نقش دارند. پاسخ به تنش شوری تعدادی از این پروتئین‌ها از قبل مشخص شده بود. تعدادی نیز پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری جدید بودند. پروتئین‌های بررسی شده در این تحقیق بخش کوچکی از کل پروتئوم گیاه را تشکیل می‌دهند بنابراین شناسایی کل پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری مستلزم مطالعات بیشتر است.

[7] Domain

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

جدول۲- پروتئین‌های شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF-TOF

Spot ID	The pI/MW(kDa)	Exp pI/MW(kDa)	MS Score	% Coverage	Identity	gi|Number
1	8.84/27.3	6.34/26	312	30	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplas	gi|131394
2	8.92/17.3	5.7/14	361	56	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi|4038699
3	8.98/19.4	5.7/10	287	41	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	gi|3914588
4	8.92/17.3	5.4/13	366	53	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subuni	gi|4038699
5	4.99/21.2	4.5/14	167	28	putative glycine decarboxylase subunit [Triticum aestivum]	gi|22204118
6	4.99/21.2	4.5/13	257	28	putative glycine decarboxylase subunit [Triticum aestivum]	gi|22204118
7	4.52/11.2	4.4/16	80	10	ribosomal protein P1 [Triticum aestivum]	gi|57471718
8	7.62/20.5	4.6/24	78	49	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	gi|585791
9	4.85/18.4	4.7/22	424	40	ES2A [Hordeum vulgare]	gi|929669
10	4.36/21.6	4.4/33	134	28	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	gi|168067984
11	4.61/31.9	4.5/31	164	25	cp31AHv protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	gi|3550467
12	4.76/30.6	4.5/29	410	37	cp31BHv [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	gi|3550483
13	4.53/18.9	4.7/25	120	27	Translationally-controlled tumor protein homolog	gi|20140865
14	5.68/27.1	5.4/29	112	14	predicted protein [Populus trichocarpa]	gi|222855040
15	6.30/16.5	6.5/14	256	35	nucleoside diphosphate kinase [Lolium perenne]	gi|9652119
16	5.84/13.3	5.3/32	188	49	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	gi|132107
17	6.19/65.5	5.1/27	81	26	polyamine oxidase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	gi|14485487
18	6.01/22.0	5.6/22	94	27	germin-like protein 1 [Oryza sativa]	gi|4239821
19	5.03/23.2	4.6/47	244	33	30S ribosomal protein S1 [Oryza sativa]	gi|149391139
20	5.24/8.1	4.9/42	73	42	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B, putative, expressed	gi|77556084
21	7.59/47.4	5.5/43	360	44	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	gi|10720253
22	5.36/16.3	4.9/19	324	44	ribosomal protein L12 homolog [Oryza sativa]	gi|2331135
23	5.36/16.3	4.8/19	433	50	ribosomal protein L12 homolog [Oryza sativa]	gi|2331135
24	4.43/12.6	5.1/17	60	69	hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]	gi|34393461
25	9.16/19.4	5.01/11	155	19	Os04g0530600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	gi|115459582

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

منابع

۱. عیوضی، ع.، ش. عبداللهی، س.ق. حسینی سالکده، ا. مجیدی هروان، س.ا. محمدی و ب.پیرایش‌فر.۱۳۸٤. اثر تنش شوری و خشکی بر خواص مرتبط با کیفیت ارقام نان. مجله علوم زراعی ایران. جلد هفتم،شماره ۳، صفحه ۲٦۷-۲۵۲.

2. Abbasi FM, Komatsu S. 2004. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. Proteomics. 4(7):2072-81.

3. Askari Hossein, Edqvist J., Hajheidari m., Kafi m., Hosseini Salekdeh G. (2006). Effects of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptiaca leaves. Proteomics. 6, 2542–2554.

4. Bau m, M., G rando, S., Ceccarelli, S (2004). Localization of quantitative trait loci for dry land characters in barley by linkage mapping. Challenges and Strategies for D ryland Agriculture, vol. 3 2. CSSA Special Publication, pp. 191–202.

5. Bloom, H., Beier, H. & Gross, H. S. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99

6. Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

7. Dadashi Dooki, A., Mayer-Posner, FJ., Askari, A., Zaiee, AA and G, Hosseini Salekdeh. (2006) Proteomic responses of rice young panicles to salinity. Proteomics 6: 6498–6507.

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

9. Gharehchahi J. (2007) Proteomic analysis of related wild wheat (*Triticum urartu*. L) under cold stresses. Thesis for M.S degree, University of Tehran.

10. Gong Z, Koiwa H, Cushman MA, Ray A, Bufford D, Kore-eda S, Matsumoto TK, Zhu J, Cushman JC, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. Plant Physiol.. 126(1):363-75.

11. Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian SY, Ober ES, Salekdeh GH. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress.Proteomics. 5(4):950-60.

12. Hentrich W,Bergner C, and Sembdner G (1985).Characterization of a gibberellin sensitive dwarf mutant of barley (hordeum vulgar L., Mut dornderg 576).plant growth regul.3, 103-110.

13. Imin N, Kerim T, Rolfe BG, Weinman JJ. 2004. Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. Proteomics. 4(7):1873-82.

14. Julia Kehr, Anja Buhtz and Patrick Giavalisco. Analysis of xylem sap proteins from Brassica napus. BMC Plant Biology 2005, 5:11.

15. Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. Plant Cell 2001, 13, 889–905.

16. Kim DW, Rakwal R, Agrawal GK, Jung YH, Shibato J, Jwa NS, Iwahashi Y, Iwahashi H, Kim DH, Shim IeS, Usui K. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. Electrophoresis. 2005 Dec;26(23):4521-39.

17. Lane, B. G., Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. FASEB J., 8: 294-301, 1994.

18. Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Lee BH. An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. C R Biol. 2007 Mar; 330(3):215-25.

19. Majoul T., Chahed K., Zamiti E., Quelhazi L., Ghrir R. (2000): Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. Electrophoresis, 21: 2562−2565.

20. Motoaki Seki1, Mari Narusaka1,², Junko Ishida1, Tokihiko Nanjo2,7, Miki Fujita1, Youko Oono, Asako Kamiya, Maiko Nakajima, Akiko Enju, Tetsuya Sakurai, Masakazu Satou1, Kenji Akiyama1, Teruaki Taji2,3, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki4, Piero Carninci, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki and Kazuo Shinozaki. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal (2002) 31(3), 279-292.

21. Munns, R. (2002). Comperative physiology of salt and water stress. Plants Cell Env iron. 25, 239–250.

22. Nat N V Kav1, Sanjeeva Srivastava, Laksiri Goonewardene And Stanford F Blade. Proteome-level changes in the roots of Pisum sativum in response to salinity. Ann. appl. Biol. (2004), 145:217-230.

23. Parker R, Flowers TJ, Moore AL, Harpham NV.An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. J Exp Bot. 2006;57(5):1109-18.

24. Portis Jr AR. 2003. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone. Photosynthesis Research 751, 11–27.

25. Robert, A. I. 1992. Official methods of analysis, 15th edition University of Georgia. Pp: 790-792

26. Rospert, S., a,Y. Dubaquiéb and M. Gautschia Nascent-polypeptide-associated complex. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 1632–1639.

27. Robinson, C. and Klosgen, R.B. (1994) Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane: a multitude of mechanisms. Plant Mol. Biol. 26: 15–24.

28. Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics. 2002 Sep; 2(9):1131-45.

29. Shunping Yan, Zhangcheng Tang, Weiai Su andWeining Sun. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 2005, 5, 235–244.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]

30. Tsuda K, Tsvetanov S, Takumi S, Mori N, Atanassov A, Nakamura C. New members of a cold-responsive group-3 Lea/Rab-related COR gene family from common wheat (triticum aestivum). Genes Genet syst (2000) 75,P 179-188.
31. Valeria Dani, William J. Simon, Marcello Duranti and Ron R. D. Croy. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. Proteomics 2005, 5, 737–745.
32. Wagner V. Yotov, Alain Moreau, And Rene St-Arnaud The Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Functions as a Transcriptional Coactivator. Molecular And Cellular Biology, Mar. 1998, p. 1303–1311.
33. Yuri Churin á Wolfgang R. Hess Thomas Borner (1999) Cloning and characterization of three cDNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins from barley (Hordeum vulgare L.): differential regulation of expression by light and plastid development. Curr Genet (1999) 36: 173±181

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.6.7]