

آنالیز پروتئوم برگ پرچم گندم در پاسخ به تنش خشکی

محمد رضا عظیمی^{۱،۲}، سید قاسم حسینی سالکده^{۱*}

۱. بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۲. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۱۰)

Proteome Analysis of Wheat Flag Leaf Response to Drought Stress

M. R. AZIMI^{1,2}, GH. HOSSEINI SALKDEH¹

1. Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: Sep. 9, 2014 – Accepted: Dec. 9, 2014)

Abstract

Water shortage is one of the most important environmental factors in limiting plant production worldwide. Molecular breeding may help to develop drought tolerant plants. Proteomics approach can help in comprehensive analysis of stress responsive genes and identification of drought signaling pathways. These drought tolerance candidate genes or their regulatory genes may be further analyzed for their possible implication in increase plant tolerance to drought stress. In this studied we analyzed the changes in proteome of wheat flag leaf in response to drought. We compared a drought tolerant with drought susceptible genotypes under normal and stress well-watered and stress conditions. Stressed plants were exposed to 50% field capacity before anthesis. Out of 900 proteins analyzed across two dimensional gels, 57 protein spots showed significant differences in response to stress. Of these, 42 protein spots could be identified using mass spectrometry analysis. Differentially expressed proteins and enzymes could be grouped in different functional groups. Our results showed that tolerant genotype may use various mechanisms particularly the up-regulation of genes involved in oxidative stress defense in flag leaf. This may help the tolerant genotypes to better remove reactive oxygen species generate by stress in flag leaf and maintain its physiological and photosynthetic activities.

Keywords: wheat, proteomics, drought stress, flag leaf.

چکیده

کمبود آب و دمای بالا مهم‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولید گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا است. خشکی با ممانعت از بیان پتانسیل ژنتیکی گیاهان زراعی، تولید را محدود می‌کند. ژن‌های زیادی در شرایط خشکی تحریک می‌شوند که برای مطالعه نحوه بیان این ژن‌ها از ابزارهای گوناگونی نظیر الگوی تظاهر بیان ژنی و آنالیز پروتئوم بافت‌های مختلف گیاهی (پروتئومیکس) استفاده شده است. در این آزمایش با استفاده از راهکار پروتئومیکس، مطالعه جامعی برای بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و تغییرات ملکولی ایجاد شده در اثر این تنش در سطح پروتئین‌های برگ پرچم انجام شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل ۲×۲ انجام گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل (رقم مقاوم Babex و رقم حساس Seri) و آبیاری با دو سطح (آبیاری نرمال و اعمال تنش) بودند. اعمال تنش قبل از شروع مرحله گل شکفتگی و میزان آن ۵۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای در نظر گرفته شد. با آنالیز پروتئوم، آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی که در اثر اعمال تنش تغییر بیان نشان دادند، در گروه‌های پروتئینی مختلف طبقه‌بندی شدند. نتایج نشان داد که رقم مقاوم مکانیسم‌های متفاوتی را برای تحمل خشکی مورد استفاده قرار می‌دهد، اما بیشترین پروتئین‌های شناسایی شده در گروه پروتئین‌های دخیل در تنش اکسیداتیو قرار داشتند. پروتئین‌هایی که در دفاع اکسیداتیو نقش دارند با سم‌زدایی و زدودن رادیکال‌های آزاد، از مرگ سلولی جلوگیری کرده و با کمک به بقای سلول‌های برگ، آنها را در انجام فعالیت‌های بیولوژیکی و به ویژه فتوسنتز پویا و فعال نگه می‌دارد. این موضوع با توجه به ماهیت بافت قابل توجهی می‌باشد، زیرا تراکم رادیکال‌های آزاد در برگ بیشتر بوده ولی با فعالیت آنزیم‌های دفاعی، رقم مقاوم توانسته است به خشکی مقاومت نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: گندم، پروتئومیکس، تنش خشکی، برگ پرچم.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) گسترده‌ترین محصول در جهان بوده و تقریباً یک ششم کل زمین‌های قابل کشت در دنیا زیر کشت این محصول قرار دارد (Sattar *et al.*, 2003). بیش از نیمی از این اراضی به صورت دوره‌ای تحت تاثیر خشکی قرار می‌گیرد (Kumar, 2004). حداقل در ۶۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشورهای در حال توسعه، عملکرد گندم در اثر خشکی به اندازه ۵۰ تا ۹۰ درصد از پتانسیل خود نسبت به شرایط بدون تنش کاهش می‌یابد (Skovmand *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 1999). میانگین عملکرد گندم در دنیا نزدیک ۳۰ تا ۶۰ درصد حداکثر عملکرد قابل حصول می‌باشد که بطور عمده در اثر تنش‌های محیطی و بویژه خشکی اتفاق می‌افتد. خشکی خطری جدی برای تولید موفقیت آمیز محصولات زراعی در سرتاسر جهان است (Boyer, 1982; Araus *et al.*, 2002, 2002; Chaves, 2002; Ashraf and Harris, 2005). در شرایط مزرعه اغلب گیاهان در معرض تنش‌های محیطی به ویژه خشکی، نور زیاد، دمای بالا و پایین قرار دارند (Yordanov *et al.*, 2001). اما کمبود آب و دمای بالا مهم‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولید گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا محسوب می‌شوند (Levitt *et al.*, 1980; Boyer, 1982). خشکی با ممانعت از بیان پتانسیل ژنتیکی گیاهان زراعی، تولید را محدود می‌کند (Mitra, 2010). طبق اظهارات Blum (1996)، خشکی تنشی چند بعدی است که سازماندهی گیاه را در سطوح مختلف تحت تاثیر قرار می‌دهد.

درک اثرات رژیم‌های تنش آبی بر عملکرد؛ برای تولید ارقام زراعی پایدارتر و با عملکرد بالا ضروری بوده (Moral *et al.*, 2003) و بدست آوردن ژنوتیپ‌های با ارزش اقتصادی پایدار و بالا هم به عنوان رقم زراعی و هم به عنوان والدین اصلاحی

مطلوب می‌باشد (Guttieri *et al.*, 2001). در مقابله با تنش خشکی اصلاح ژنتیکی یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای بدست آوردن گیاهانی است که قادر به تولید رضایت‌بخش تحت شرایط تنش خشکی باشند (Bajji *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 1991). با استفاده از راهکار پروتئومیکس^۱ این امکان وجود دارد که بتوان بطور جامع به مطالعه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش پرداخت و مسیر واکنش‌ها یا ترانسکریپشنی‌های ملکولی^۲ را شناسایی نمود (Dubey & Grover, 2001). این ژن‌ها کاندیدهایی برای افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی خواهد بود که یا خود آنها و یا ژن‌های کنترل‌کننده تغییرات آنها می‌توانند در تحمل گیاه به خشکی دخیل باشند. از طرف دیگر با شناسایی مکانیسم‌های مختلف تحمل در ژنوتیپ‌ها می‌توان در جهت جمع‌آوری آنها در یک ژنوتیپ گام برداشت (Salekdeh *et al.*, 2002).

در دهه‌های اخیر آزمایشات و مطالعات زیادی در خصوص کنترل ثبات آبی گیاه در شرایط خشکی صورت گرفته و فرآیندهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاهان در شرایط تنش آبی مورد آزمایش و تحقیق قرار گرفته است (Schulze, 1986; Chaves *et al.*, 2003). با وجود این تحقیقات گسترده و توجه بسیار محققین به فرآیندهای مولکولی دخیل در مقاومت و تحمل به تنش‌های محیطی، هنوز دانش کافی در مورد مکانیسم‌های مولکولی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی به ویژه زمانی که اثرات متقابل پیچیده‌ای در نتیجه ترکیب دو یا سه تنش محیطی ظاهر می‌شوند، در دسترس نیست (Ingram & Bartles, 1996; Chaves & Oliveira, 2004). امروزه ژن‌های زیادی که در شرایط خشکی تحریک می‌شوند، مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. برای مطالعه نحوه بیان این ژن‌ها از ابزارهای گوناگونی نظیر

1. Proteomics

2. Molecular signal transduction

که در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهد (حذف پپتید راهنما، فسفوریلاسیون، گلیکوزیلاسیون) برای فعالیت زیست‌شناختی آن‌ها ضروری می‌باشد، مطالعه پروتئین‌ها برای بررسی فعالیت‌شان در بافت‌های خاص یا در پاسخ به شرایط محیطی خاص از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است. همچنین این روش بینش لازم را در مورد کمیت و کیفیت فرآورده نهایی ژن‌ها یعنی پروتئین‌ها در اختیار محقق قرار می‌دهد (Zivy & De Vienne, 2003).

هدف تحقیق انجام شده استفاده از راهکار پروتئومیکس برای مطالعه جامع بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و تغییرات ملکولی ایجاد شده در اثر این تنش در سطح پروتئین‌های برگ پرچم است. با مطالعه کل پروتئوم بافت‌های گیاهی گندم می‌توان امیدوار بود که با درک عمیق‌تر تاثیرات خشکی در گیاه از پیچیدگی و مشکلات مربوط به اصلاح برای تحمل به خشکی و افزایش عملکرد گندم در مناطق خشک کاسته شده و راهی برای تولید ارقام متحمل جدید ایجاد شود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش بصورت فاکتوریل ۲×۲ با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل رقم (رقم مقاوم Babex و رقم حساس Seri) و آبیاری با دو سطح (آبیاری نرمال و اعمال تنش) بودند. رقم‌های مورد آزمایش از نتایج آزمایش‌های انجام شده در سیمیت انتخاب و از همان مرکز تهیه گردید. آزمایش داخل گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید و کرت‌های آزمایشی عبارت از گلدان‌های ۱۷ کیلویی مربع شکل با ابعاد ۲۵ سانتی‌متر بودند که داخل هر گلدان ۳۰ عدد بذر کاشته شد و در مرحله دو برگی به بیست بوته تنک گردید.

الگوی تظاهر ژنی و نیز گیاهان تراریخته استفاده شده است. با این کار می‌توان عمل ویژه هر ژن و نقش آن را در اعطای سازگاری به گیاه در شرایط خشکی بررسی کرد. در هر حال به علت پیچیدگی پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی، وظایف بسیاری از آنها هنوز مشخص نشده است (Bray, 1997). بسیاری از صفات مؤثر در سازگاری گیاهان به خشکی، مربوط به شکل ظاهری و نمو گیاهی از قبیل فنولوژی، عمق و اندازه سیستم ریشه‌ای، خصوصیات بافت آوندی و یا ذخیره‌سازی منابع می‌باشد. این صفات اغلب بیش از آن که ناشی از تنش محیطی باشند، ویژگی‌های ساختاری گیاه را تشکیل می‌دهند (Passioura, 2002).

مطالعه پروتئوم و تغییرات آن در محیط را پروتئومیکس می‌نامند. به عبارت دیگر وقتی آنالیز پروتئومیکس خشکی یا شوری مطرح می‌شود، منظور تجزیه و تحلیل پاسخ سلول یا گیاه به تیمار مورد نظر در سطح پروتئین است (Salekdeh et al., 2002). تنظیم الگوی بیان ژن‌ها، روشی است که گیاهان از آن طریق به شرایط نامساعد محیطی پاسخ می‌دهند. روش‌هایی مثل ریزآرایه، نمایش افتراقی و پروتئومیکس روش‌هایی هستند که برای آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح mRNA و پروتئین و تعیین نقش ژن‌ها در سطح ژنوم در شرایط نمو و محیطی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول بافت یا اندامک معینی تحت شرایط محیطی خاص را فراهم می‌کنند. پروتئومیکس در مقایسه با ریزآرایه در بررسی الگوی بیان ژن دارای مزایایی است. برای مثال ژنوم دارای اطلاعات کدمانندی است که برای رشدونمو جاندار کفایت می‌کند اما پروتئین‌ها به عنوان محصول ژن‌ها از اجزا کلیدی مسئول اعمال سلولی هستند. چون مقدار پروتئین اغلب از میزان mRNA تولید شده در سلول قابل پیش‌بینی نیست و از طرفی تغییرات پس از ترجمه‌ای

شستشو برای حذف پسمان‌های TCA دوبار تکرار شد. به منظور حذف استون موجود در نمونه رسوب حاصل از شستشو به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه فریزر درایر قرار گرفت. به منظور استخراج پروتئین کل محلول از ماده حاصل از بافر لیز کننده^۲ با ترکیب شیمیایی (Urea 9M; CHAPS 4%; DTT 1%; pH 3-10 ampholytes 1%; Tris base 35mM) استفاده گردید. در نتیجه افزودن بافر لیزکننده به پودر حاصل از مرحله قبل و نگهداری نمونه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت و نهایتاً سانتریفیوژ مخلوط حاصل عصاره پروتئینی نمونه گیاهی بدست آمد.

تعیین غلظت پروتئین

تعیین غلظت پروتئین‌های بدست آمده با استفاده از روش برادفورد و با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتر Carry 300 ساخت کشور استرالیا انجام گردید. بدین منظور از کیت خریداری شده از شرکت Bio-Rad استفاده شد.

تفکیک و آشکارسازی پروتئین

برای جداسازی پروتئین‌ها از الکتروفورز دوبعدی استفاده شد. در بعد اول از ژلهایی از پیش آماده با شیب pH مشخص با عنوان Immobiline pH (IPG) gradient استفاده شد. این ژل‌ها در pHهای مختلف بصورت تجاری عرضه می‌شود و تکرارپذیری تحقیق بر پایه آنها بسیار بالا و قابل اعتماد است. استفاده از ژل‌های مختلف با دامنه pH متفاوت نشان داد که ژل‌های با دامنه pH ۴-۷ با طول ۲۴ سانتی‌متر برای انجام تحقیق مناسب می‌باشد. مقدار پروتئین بهینه برای این مرحله ۲۵۰ میکروگرم در هر ژل بود که برای رنگ‌آمیزی با نیترات نقره کفایت می‌کرد. این ژل‌ها به مدت ۱۴ ساعت با بافر آبدی که متشکل از Urea 8M; CHAPS 2%; Bromophenol blue; IPG

اعمال تنش قبل از شروع مرحله گل‌شکفتگی^۱ و میزان آن، ۵۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای در نظر گرفته شد. در این آزمایش ظرفیت مزرعه‌ای خاک مورد آزمایش بر اساس وزن خاک اشباع و خشک تعیین گردید. گلدان‌ها هر دو روز یکبار توزین و بر اساس وزن آبیاری می‌شدند. مقدار آب اضافه شده به گلدان‌های نرمال تا رسیدن وزن آنها به حد ظرفیت مزرعه‌ای و برای گلدان‌های تحت تنش ۵۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای بود و این کار تا آخر آزمایش نیز ادامه داشت. نمونه‌های برگ پرچم، پانزده روز بعد از اعمال تنش برداشت و بلافاصله بعد از جدا شدن از گیاه داخل پاکت‌های آلومینیومی قرار گرفته و درون ازت مایع قرار گرفتند و سپس به فریزر ۸۰- درجه منتقل شدند.

برای استخراج پروتئین از روش *Damerval et al.* (1986) با تغییرات اندک استفاده شد. در این روش بعد از اینکه نمونه‌ها در ازت مایع کاملاً ساییده و پودر شدند به لوله‌های سانتریفیوژ ۱۰ میلی‌لیتری منتقل گردیده و محلول استخراج TCA/acetone که بصورت ۱۰ درصد وزنی به حجمی تهیه شده و کاملاً سرد بودند به نمونه‌ها اضافه شد. این محلول شامل تری‌کلرو استیک اسید (TCA)، استون و دی‌تیو تریول (DTT) بوده، و بعد از اینکه بافت پودر شده در آن بصورت سوسپانسیون در آمد به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مخلوط مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل از این مرحله در ۱۰ میلی‌لیتر محلول شستشو (Acetone/DTT 0.07% w/v) قرار گرفت و پس از یک ساعت نگهداری در دمای ۲۰- C درجه در دور ۱۲۰۰۰ جی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فرآیند

گرفتند. این نرم افزار قدرت تعیین اندازه و حجم نقاط را دارد. بر پایه الگوریتم این نرم افزار می توان حجم نسبی هر نقطه را نسبت به حجم کل نقاط قابل تشخیص ارائه کرد. بر این اساس درصد حجمی^۱ نقاط (%Vo) به عنوان معیار کمیت پروتئین بر روی ژل در نظر گرفته می شود. در این تحقیق نقاط تکرارپذیر به عنوان نقاط مورد نظر برای آنالیز آماری انتخاب شدند. در هر بافت و مرحله حدود ۹۰۰ نقطه تکرارپذیر شناسایی و برجسب زده شدند و داده های مورد نظر از نرم افزار فوق الذکر گرفته شده و توسط نرم افزار Excel مرتب و ذخیره شدند. تجزیه و تحلیل نهایی داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. نقاط معنی دار در سطح اطمینان ۵٪ و با تغییر میزان تظاهر ۱/۵ برابر انتخاب شدند. مقایسه میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۵٪ انجام گردید. همچنین برای هر رقم، تفاوت بین شرایط تنش و نرمال با استفاده از آزمون t انجام شد. اشکال مربوط به میانگین ها و خطوط اشتباه معیار مربوط به هر میانگین توسط نرم افزار Excel ترسیم گردید.

بعد از تجزیه و تحلیل ژل های دوبعدی و انتخاب نقاط پروتئینی دارای تغییرات معنی دار در تنش خشکی ژل مقدماتی به منظور جداسازی و ارسال نمونه ها جهت شناسایی تهیه گردید. نظر به اینکه رنگ آمیزی سازگار با طیف سنجی جرمی روش آبی کوماسی^۲ می باشد، میزان پروتئین بیشتری برای بارگذاری در این قسمت لازم است که این میزان ۲۵۰۰ الی ۳۰۰۰ میکروگرم تعیین شد. با توجه به مقدار زیاد پروتئین بارگذاری شده میزان محلول آبدی کاهش یافت این کاهش به منظور سیالیت پروتئین ها از ۳۵۰ میکرولیتر نباید کمتر شود. میزان ولتاژ بکار رفته در بعد اول نیز با توجه به مقدار

buffer; DTT 7 mg/2.5 ml of IPG buffer بودند در سینی های مخصوص آبدی شدند. ژل های تیمار شده پس از این مرحله وارد دستگاه الکتروفورز بعد اول موسوم به Multiphor II شدند. در این سیستم ژل ها در وضعیتی خوابیده در دامنه الکتروفورتیک تا ۳۵۰۰ ولت ساعت قرار داده می شوند. در مرحله بعد ژل های IPG به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده قرار گرفتند. جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی در بعد دوم بوسیله SDS-PAGE و در صفحات عمودی ژل اکریلامید صورت گرفت. در این مرحله از جریانی با شدت ۲۰۰ ولت و به مدت تقریبی ۸ ساعت استفاده گردید. ژل ها از دستگاه خارج و به درون محلول تثبیت کننده منتقل و بعد از یک ساعت آماده رنگ آمیزی شدند.

رنگ آمیزی با روش نیترات نقره

روش رنگ آمیزی نیترات نقره بعلا حساسیت فوق العاده آن در حد نانوگرم پروتئین در محلول روش بسیار مناسبی برای ژل های مورد تجزیه در پروتئومیکس به شمار می رود (Penington and Dunn, 2001). نظر به حساسیت برخی مراحل رنگ آمیزی و سختی کار در تعداد زیاد ژل از دستگاه مخصوص رنگ آمیزی ساخت کارخانه بیوراد (Dodeca Stainer, 165-3400, Bio-Rad) که دارای ظرفیت همزمان ۱۲ ژل است، استفاده شد. با توجه به اینکه ژل های دوبعدی بلافاصله بعد از رنگ آمیزی دارای حداکثر وضوح و کیفیت می باشند و استفاده از این کیفیت به هنگام تجزیه ژل ها ضروری بود. تصویربرداری بلافاصله بعد از رنگ آمیزی توسط دستگاه اسکنر چگالی سنج (GS-800, Bio-Rad) علاوه بر حفظ تصاویر ژل در رایانه امکان تبدیل نقاط پروتئینی به داده های کمی را توسط نرم افزارهای تجزیه ژل فراهم کرد. تصاویر ژل های دوبعدی مربوط به بافت های مختلف با استفاده از نرم افزار Melanie-3 مورد تجزیه و تحلیل قرار

1. Percent volume

2. Coomassie Blue (CBB)

پروتئین به ۷۹۰۰۰ ولت ساعت افزایش یافت. همچنین در بافر متعادل کننده قبل از بعد دوم از iodoacetamide به جای DTT با (W/v) ۲/۵٪ استفاده گردید.

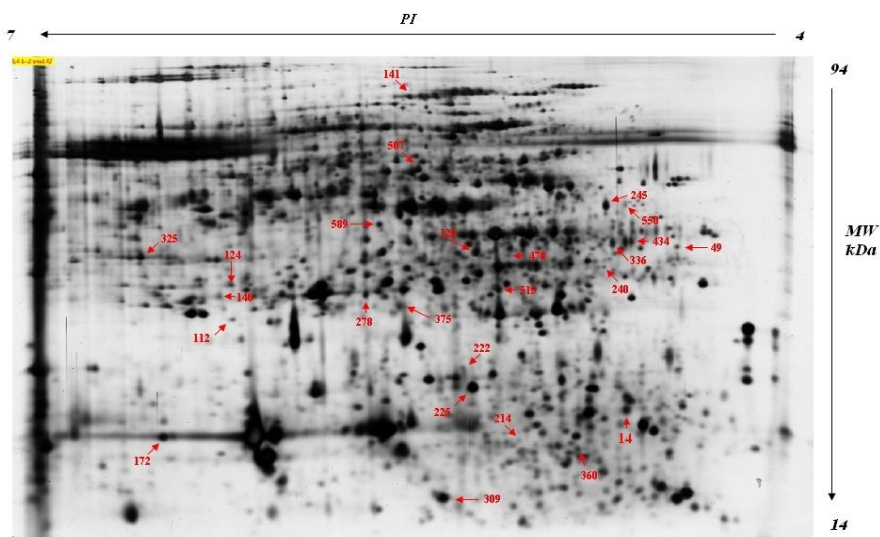
ژل‌های حاصل بعد از تثبیت توسط محلول تثبیت کننده، با روش کوماسی رنگ آمیزی شدند هر ژل به مدت ۲۴ ساعت در این محلول قرار گرفته و سپس با آب دیونیزه شستشو شد. در این مرحله ژل با میزان بسیار کمی آب دیونیزه در روی آن که از خشک شدن ژل جلوگیری می کند، قابل نگهداری است. به منظور تشخیص نقاط جهت جداسازی، ژل مورد تجزیه مجدد قرار گرفته و نقاط مورد نظر پس از جداسازی توسط نوک تیپ (سر سمپلر)، داخل لوله های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفته و جهت شناسایی به دانشگاه یورک انگلستان ارسال شدند. شناسایی پروتئین ها با استفاده از روش طیفسنجی جرمی MALDI-TOF/TOF صورت گرفت و نتایج حاصله با استفاده از بانک های اطلاعاتی NCBI و ExPasy مورد جستجو و بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

در آنالیز ژل الکتروفورزی بیش از ۹۰۰ نقطه پروتئینی که دارای تکرارپذیری نیز بودند مشخص شدند (شکل ۱). این نقاط برچسب خورده و درصد حجمی نقاط به عنوان میزان تظاهر پروتئین ها در نظر گرفته شد. این داده ها توسط نرم افزار SAS تحت تجزیه واریانس قرار گرفتند. هم زمان با این کار داده های مربوط به هر رقم در شرایط تنش و نرمال نیز برای همه نقاط تحت آزمون t قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصله از این دو تجزیه ۵۷ نقطه که دارای افزایش یا کاهش معنی داری بین دو رقم بودند و یا اثر متقابل معنی داری را نشان می دادند، انتخاب شدند. برای انجام طیفسنجی جرمی مجدداً مراحل الکتروفورزی انجام و ژل ها با کوماسی بلو رنگ آمیزی گردیدند. نقاطی که قبلاً توسط تجزیه های آماری تفاوت های معنی دار نشان داده بودند بر روی ژل مقدماتی مشخص و برای شناسایی به دانشگاه یورک^۲ انگلستان ارسال شدند.

2. University of York

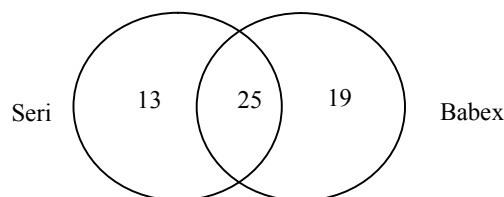
1. Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight



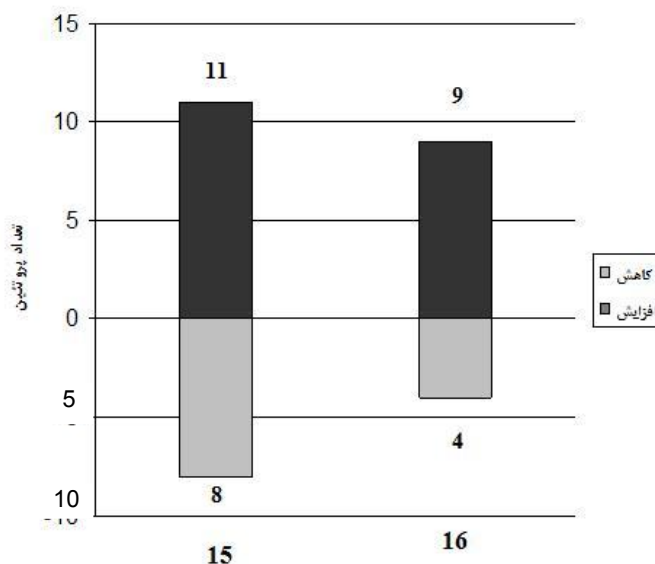
شکل ۱- تصویر ژل دوبعدی برگ پرچم گندم برای رقم مقاوم و نقاط پروتئینی معنی دار مورد بررسی در تنش خشکی

از بین ۱۹ پروتئین که در رقم Babex تغییر رقم شماره ۱۵، ۱۳ پروتئین در رقم Seri تغییرات معنی‌داری را نشان دادند و ۲۵ پروتئین نیز در هر دو رقم دارای تغییرات بیان بودند (شکل ۲).

از بین ۱۹ پروتئین که در رقم Babex تغییر رقم شماره ۱۵، ۱۳ پروتئین در رقم Seri تغییرات معنی‌داری را نشان دادند و ۲۵ پروتئین نیز در هر دو رقم دارای تغییرات بیان بودند (شکل ۲).



شکل ۲- دیاگرام پراکنش پروتئین های مورد بررسی

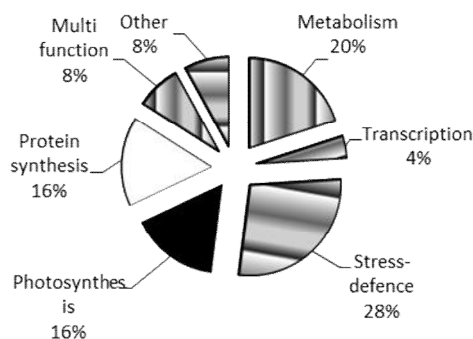


شکل ۳- تعداد پروتئین‌های بافت برگ گندم که در ارقام مورد مطالعه افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند.

نسخه‌برداری، پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای انرژی و پروتئین‌های ساختاری^۱. شکل ۴ درصد پروتئین‌های منتسب به هر گروه را نشان می‌دهد. اسامی پروتئین‌های شناسایی‌شده بر اساس گروه‌بندی انجام شده و سایر مشخصات مربوطه در جدول ۱ آورده شده است.

از تعداد ۵۷ نقطه ارسالی جهت انجام طیف‌سنجی جرمی، تعداد ۱۵ پروتئین که دارای mascot score کمتر از ۷۰ بودند حذف و مابقی (۴۲ پروتئین) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پروتئین‌های شناسایی‌شده بر اساس فعالیت مربوطه و طبق الگوی پیشنهادی *Bevan et al.* (1998) گروه‌بندی شدند. گروه‌های پروتئینی عبارت بودند از پروتئین‌های دخیل در متابولیسم، پروتئین‌های درگیر در دفاع اکسیداتیو و مقابله با تنش، پروتئین‌های درگیر در

1. Protein synthesis



شکل ۴- گروه بندی پروتئین های بافت برگ پرچم بر اساس بیون و همکاران (۱۹۹۸)

جدول ۱- لیست پروتئین های شناسایی شده بافت برگ پرچم توسط طیف سنجی جرمی

Spot ID	Exp. Pi/Mw ¹	Theo. Pi/Mw ¹	Accession No.	Protein name	Score ² / coverage% ³	PMF/ MS-MS ⁴
Multi function						
172	6.39/17	6.4/16.4	gi 71040669	Nucleoside diphosphate kinase	167/26	2/2
214	5.05/17	4.4/18.9	gi 15228276	TCTP	72/11	1/2
Transcription						
49	4.37/33	4.5/31.9	gi 3550467	Cp31AHv protein	196/31	3/5
Protein synthesis/degradation						
112	6.11/26	10/24.4	gi 218192573	50S ribosomal protein L10	129/26	3/1
240	4.68/30	4.6/26.1	gi 195635461	Proteasome subunit alpha type 5	154/37	2/6
336	4.67/33	6.5/39.9	gi 111073719	Triticain gamma	133/17	3/1
375	5.45/27	6.8/32.6	gi 195640820	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	77/17	2/5
Photosynthesis						
222	5.24/22	6/34.7	gi 147945622	Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein	175/20	3/1
278	5.57/28	7.7/28.6	gi 195656049	Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein	224/24	4/1
309	5.32/14	5.8/13.3	gi 132107	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Small subunit	294/48	3/7
325	6.47/33	6.2/53.4	gi 61378609	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Large subunit	359/34	4/17
Stress/defense response						
124	6.14/30	5.8/27.5	gi 3688398	Ascorbate peroxidase	384/50	5/7
140	6.17/29	5.8/23.6	gi 5923877	Glutathione S-transferase	243/34	3/2
225	5.23/21	5.3/20.4	gi 1572627	Cu/Zn superoxide dismutase	457/43	3/1
360	4.81/16	4.8/15.1	gi 1346803	Profillin-1	164/49	3/2
434	4.56/33	4.8/11.6	gi 1841466	Putative pre-pro-cystein proteinase	86/13	1/0
478	5.06/32	10.2/29.5	gi 38679331	Harpin binding protein 1	213/28	4/4
515	5.09/29	5.6/27.9	gi 116346	Acidic endochitinase	91/6	1/0
Metabolism						
14	4.58/19	0/19.7	gi 11135474	Thioredoxin M-type	177/39	2/6
126	5.18/33	5/53.7	gi 21684925	ATP syntase beta subunit	684/49	9/14
141	5.39/73	5.3/29.6	gi 32400802	Phosphoglyceratemetase	122/32	3/5
245	4.67/38	5.7/47	gi 71362640	Plastidglutaminesynthetaseisoform GS2c	205/25	4/6
550	4.59/38	5.7/37.6	gi 881594	Cytosolic glutamine synthetase	60/4	1/0
Other						
589	5.53/36	9.7/39.2	gi 115478314	Os09g0277800	97/34	1/10
507	5.37/44	5.3/33.3	gi 159885648	Putative chloroplast inner envelope protein	124/30	3/5

1. PI و وزن مولکولی تئوری / 2. امتیاز Mascot / 3. در صد همپوشانی توالی / 4. تعداد پپتیدهای شناسایی شده بوسیله MS/MS

پروتئین‌های درگیر در مسیر فتوسنتزی

در این گروه لکه‌های شماره ۳۰۹، ۳۲۵ و ۲۲۲ برای رقم Babex افزایش معنی‌داری را نشان داده در حالی که برای رقم حساس Seri کاهش مقدار مشاهده گردید. این مسئله در مورد لکه شماره ۲۷۸ برعکس بود به گونه‌ای که در هر دو رقم کاهش میزان پروتئین دیده شد که این کاهش در رقم حساس Seri بیشتر بود. نتایج فوق با نتایج حاصل از تحقیقات Caruso و همکاران (۲۰۰۹) و Parry و همکاران (۲۰۰۲) در گندم، Bartholomew و همکاران (۱۹۹۱) در گوجه‌فرنگی، Williams و همکاران (۱۹۹۴) در آراییدوپسیس، Vu و همکاران (۱۹۹۹) در برنج منطبق می باشد.

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی دخیل در دفاع اکسیداتیو و مقابله با استرس

تعداد هفت آنزیم در گروه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دخیل در دفاع اکسیداتیو و مقابله با استرس قرار گرفتند. در آنزیم‌های مختلف این گروه، روندهای متفاوتی در دو رقم دیده شد به نحوی که در لکه‌های شماره ۲۲۵، ۴۷۸ و ۴۳۴ با اعمال تنش میزان این آنزیم در رقم مقاوم Babex افزایش نشان داد. در حالی که در بقیه لکه‌های این گروه کاهش مقدار آنزیم در رقم مقاوم Babex دیده شد. لکه شماره ۲۲۵ در بررسی پروتئوم برگ مربوط به سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد که یک آنزیم میتوکندریایی است و همراه با آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز نقش اساسی را در پیشگیری از اکسایش و تخریب غشای میتوکندری‌ها ایفا می‌کند. نقش این آنزیم غیرسمی کردن رادیکال آزاد سوپراکسید (O_2) می‌باشد. علی‌رغم گزارشات متعدد مبنی بر القا این آنزیم در شرایط مختلف تنش‌های محیطی (Bowler *et al.*, 1992)، نقش آن به عنوان بخشی از مکانیسم دفاعی در شرایط استرس هنوز مورد بحث است (Scandalios, 1997). بیان این آنزیم در رقم مقاوم Babex در دو حالت تنش و نرمال تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در رقم Seri، این آنزیم، کاهش معنی‌دار ۱۶ درصدی را نشان داد.

آنزیم‌های دخیل در متابولیسم

از پنج آنزیم دخیل در متابولیسم، سه آنزیم تیوردوکسین (لکه شماره ۱۴)، Plastid glutamine synthetase (لکه شماره ۲۴۵) و سیتوسولیک گلوتامین سینتتاز (لکه شماره ۵۵۰)، با اعمال تنش در رقم Babex افزایش بیان معنی‌دار داشته در حالی که رقم Seri تغییر معنی‌داری را نشان ندادند. کاهش آنزیم‌های تیوردوکسین موجب غیرفعال شدن آنزیم‌های فعال‌شونده توسط نور شده و در نتیجه در چرخه کالوین ایجاد اختلال می‌نماید. دو آنزیم بعدی نیز در چرخه تثبیت نیتروژن نقش داشته و گزارش‌های زیادی مبنی بر اینکه این ایزوفرم‌ها تنظیمات متفاوت بیان ژنی را در شرایط نور، نیتروژن غیر آلی، اسیدهای آمینه و قندهای قابل حل مختلف از خود نشان می‌دهند، وجود دارد (Sakakibara *et al.*, 1996; Ishiyama *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2008). در لکه‌های شماره ۱۲۶ و ۱۴۱ بر خلاف سه آنزیم ذکر شده رقم مقاوم تغییرات معنی‌دار نشان نداده ولی افزایش بیان در رقم Seri معنی‌دار بوده است. تغییر در بیان پروتئین‌های دخیل در متابولیسم در پاسخ به تنش خشکی در مطالعات مختلف گزارش شده است (Salekdeh *et al.*, 2002).

آنزیم‌های دخیل در سنتز یا اضمحلال پروتئین‌ها

سلول‌ها برای تجزیه پروتئین‌ها (پروتئین‌های دناتوره‌شده، پروتئین‌هایی که اشتباهی تاخوردند، پروتئین‌هایی که غلظت آن‌ها باید در سلول کاهش یابد و پروتئین‌های خارجی که توسط سلول جذب شده اند) از مسیرهای متفاوتی استفاده می‌کنند. یک مسیر عمده درون سلولی، تجزیه شدن پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های لیزوزومی در محیط اسیدی می‌باشد. علاوه بر این مسیر، مکانیسم‌های درون سیتوزولی نیز وجود دارند. مسیری که بهتر از همه شناخته شده، مسیر یوبی‌کیتین^۱ می‌باشد که خود شامل دو مرحله

1. Ubiquitin

آنزیم، سیگنال‌های متفاوتی در پروتئین هدف را شناسایی می‌کنند. به عنوان مثال توالی Arg-X-X- Cyclin در Leu-Gly-X-Ile-Gly-Asx میتوزی توسط آنزیم E1 شناسایی می‌شود. توالی‌های غنی از پرولین، گلوتامیک اسید، سرین و ترئونین توسط آنزیم‌های دیگر شناسایی می‌شوند. لکه‌های شماره ۳۷۵، ۱۱۲، ۳۳۶ و ۲۴۰ در دسته‌ای گروه‌بندی گردیدند که عمده فعالیت آنها در زمینه سنتز یا اضمحلال پروتئین می‌باشد. به جز پروتئین شماره ۱۱۲ در مابقی پروتئین‌ها رقم Babex افزایش بیان معنی‌داری را در اثر تنش نشان داده است در حالیکه رقم Seri تفاوت معنی‌داری را نداشته است. در لکه شماره ۱۱۲ تغییرات معنی‌داری در دو رقم مشاهده نشد.

است: اضافه‌شدن زنجیره‌ای از مولکول‌های یوبی‌کیتین به زنجیره جانبی لیزین در داخل پروتئین هدف و پروتئولیز پروتئین حاصل توسط پروتازوم^۱ که کمپلکسی چند زیرواحدی و بزرگ با شکل استوانه‌ای مانند است. پروتازوم‌های متعدد موجود در سیتوزول سلول با فعالیت خود طی فرآیند وابسته به ATP، از پروتئین‌هایی که دارای برچسب یوبی‌کیتین می‌باشند، پپتیدهای کوتاه و مولکول‌های دست نخورده یوبی‌کیتین حاصل می‌کنند. برای آن که پروتئینی بتواند طی مکانیسم بالا تجزیه شود باید دارای ساختاری باشد که توسط کمپلکس آنزیم یوبی‌کیتینه‌کننده شناسایی شود. انواع متفاوتی از این

1. Proteasome

REFERENCES

- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* 89: 925-940.
- Ashraf M, Harris PJC (2005) Abiotic stresses: Plant resistance through breeding and molecular approaches. Haworth Press Inc. New York.
- Bajji M, Bertin P, Lutts S, Kinet JM (2004) Evaluation of drought resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected in vitro. *Australian J. Experimental Agricultura.* 44: 27-35.
- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA (1991), Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves, *Plant Physiol.*, 96: 291-296.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 391: 485-493
- Blum A (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plan Growth. Regul.* 20: 135-148.
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science.* 218: 443-448.
- Bray E (1997) Plant response to water-deficit. *Trends in plant Science.* 2: 48-54.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*
- Chaves M (2002) Water stress in the regulation of photosynthesis in the field. *Annals of Botany.* 89: 907-916.
- Chaves MM, Maroco JP, Periera S (2003) Understanding Plant responses to drought – From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology.* 30: 239-264.
- Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resistance to water deficits: prospects for water-saving agriculture, *J. Exp.*

- Bot. 55: 2356-2348.
- Damerval C, Le Guilloux M (1998) Characterization of novel proteins affected by the o_2 mutation and expressed during maize endosperm development. *Molecular and General Genetics*. 257: 354-361.
- Dubey H, Grover A (2001) Current initiatives in proteomics research: The plant perspective, *Current Sci*. 80(2): 262-269.
- Guttieri MJ, Stark JC, Obrien K, Souza E (2001) Relative sensitivity of spring wheat grain yield and quality parameters to moisture deficit. *Crop Sci*. 44: 327-335.
- Ingram J, Bartles D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plant. *Annual Review of Plant Physiol. Plant Mol. Bio*. 47: 377-403.
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H (2004) Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem*. 279: 16598-16605.
- Kumar D (2004). Breeding for drought resistance. In: *Abiotic stress: Plant resistance through breeding and molecular approaches*. Ashraf, M., and P.J.C. Harris, (eds.). pp: 145-175. Food Products Press.
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses, Vol. II, Academic Press, New York, pp: 3-211.
- Mitra J (2001) Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr. Sci*. 80: 758-763.
- Moral LFG, Rharrabti Y, Villegas D, Royo C (2003) Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: An ontogenic approach. *Agron. J*. 95: 266-274.
- Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress, *Annals of Botany*, 89: 833-839.
- Passioura JB (2002) Environmental biology and crop improvement. *Funct. Plant Biol*. 29: 537-546.
- Penington SR, Dunn MJ (2001) Proteomics from protein sequence to function. *Bios*. 313 pp.
- Rana NK, Mohanpuria P, Yadav SK (2008) Expression of tea cytosolic glutamine synthetase is tissue specific and induced by cadmium and salt stress. *Biologia Plantarum*. 52(2): 361-364
- Reynolds MPS, Rajaram S, Sayre KD (1999) Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Sci*. 39: 1611-1621.
- Sakakibara H, Shimizu H, Hase T, Yamazaki Y, Takao T, Shimonishi Y, Sugiyama T (1996) Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J. Biol. Chem*. 271: 29561-29568.
- Salekdeh Gh. H, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomics approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice. *Field Crop Research*. 76: 199-219.
- Sattar A, Chowdhry MA, Kashif M (2003) Estimation of heritability and genetic gain of some metric traits in six hybrid population of spring wheat. *Asian J. Plant Sci*. 2: 495-497.
- Scandalios J (1997) Molecular genetics of superoxide dismutases in plants, in: J. Scandalios (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 527-568.
- Schulze SD (1986) Whole-plant responses to drought, *Aust. J. Plant Physiol*. Vol 13, 127-141.
- Skovmand B, Reynolds MP, Delacy IH

- (2001) Searching genetic resources for physiological traits with potential for increasing yield. In: Application of physiology in wheat breeding. (eds.) Reynolds, M.P., J.I.Ortiz-Monasterio, and A. McNab. pp: 17-28. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Turner LB (1991) The effect of water stress on the vegetative growth of white clover (*Trifolium repens* L.) comparative of long-term water deficit and short-term developing water stress. J. Exp. Bot. 42: 311-316.
- Vu JCV, Gesch RW, Allen LHJr, Boote KJ, Bowes G (1999) CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in rubisco small subunit transcript abundance, J.of Plant Physiol. 155: 139-142.
- Williams J, Bulman MP, Neill SJ (1994) Wilt-induced ABA biosynthesis, gene expression and down-regulation of rbcS mRNA levels in *Arabidopsis thaliana*, Physiologia Plantarum, 91(2): 177-182.
- Yordanov I, Tsonko T, Velikova V, Georgieva K, Ivanov P, Tsenov N, Petrova T (2001) Changes in CO₂ assimilation, transpiration and stomatal resistance to different wheat cultivars expressing drought under field conditions. BULG. J. Plant Physiol. 27: 20-33.
- Zivy M, De Vienne D (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. Plant Molecular Biology. 44: 575-580.