

## بررسی پروتئین‌های مشترک پاسخ دهنده به تنش خشکی در دو رقم حساس و متحمل گندم بهاره

معروف خلیلی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا نقوی<sup>۱</sup>

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۲/۷)

### Evaluation of responsive common proteins in tolerant and sensitive spring wheat cultivars under drought stress

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

1. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697 Tehran, Iran  
(Received: Nov. 26, 2016 - Accepted: Feb. 26, 2017)

#### Abstract

In this research, proteome analysis was done by two-dimensional electrophoresis and staining by Commassie brilliant blue method for two cultivars of Kavir as tolerant and Bahar as susceptible was done. After of be quantitative spots with Same spot progenesis software, 10 common protein spots with significant difference between control and drought stress conditions in the Kavir and Bahar was diagnosed. Using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry of common proteins, nine common protein spots were identified and the type of activity and mode of action of these proteins in the cells was determined. Based on the results, proteins involved in light reactions of photosynthesis (three protein spots Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic, Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplasti and Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic) and Calvin cycle (two protein spots include Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic and ribulose-bisphosphate carboxylase small chain precursor) in both cultivars were the greatest functional groups and in other words, the most important common proteins for maintain of efficiency under drought stress were. Since these proteins in both tolerant and susceptible cultivars showed changes in expression, seems to be the most sensitive proteins in response to drought stress in wheat. In other words, these results show that it is important to maintain the efficiency of photosynthesis under drought stress.

**Keywords:** drought stress, photosynthesis, responsive common protein, wheat.

#### چکیده

در این پژوهش، تجزیه پروتئوم از طریق الکتروفورز دوبعدی و رنگ‌آمیزی آبی کوماسی برای دو رقم گندم بهاره شامل کویر به‌عنوان رقم متحمل و بهار به‌عنوان رقم حساس انجام شد. بعد از کمی کردن لکه‌ها توسط نرم‌افزار Same spot progenesis، تعداد ۱۰ لکه پروتئینی مشترک تکرارپذیر دارای تفاوت معنی‌دار بین شرایط شاهد و تنش خشکی در دو رقم کویر و بهار تشخیص داده شد. با استفاده از طیف‌سنجی جرمی MALDI-TOF/TOF از بین پروتئین‌های مشترک، نه لکه پروتئینی مشترک شناسایی و نوع فعالیت آنها و نحوه عمل این پروتئین‌ها در سلول مشخص شد. بر اساس نتایج بدست آمده پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری (سه لکه پروتئینی شامل Chlorophyll a-b، Cytochrome b6-f complex iron-binding protein 8، Peptidyl-prolyl cis- و sulfur subunit, chloroplasti) و (trans isomerase CYP38 و چرخه کالوین (دو لکه پروتئینی شامل Fructose-1,6-bisphosphatase و ribulose-bisphosphate carboxylase small chain precursor) در هر دو رقم به‌بیشترین گروه‌های عملکردی پروتئین و به عبارتی مهمترین پروتئین‌های مشترک جهت حفظ کارایی گندم تحت شرایط تنش خشکی بودند. از آنجایی که این پروتئین‌ها در هر دو رقم متحمل و حساس تغییر بیان نشان دادند، بنظر می‌رسد که حساس‌ترین پروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی در گندم بهاره باشند. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که حفظ کارایی فتوسنتز تحت تنش خشکی از اهمیت بالایی برخوردار است.

**واژه‌های کلیدی:** پاسخ مشترک پروتئینی، تنش خشکی، فتوسنتز، گندم.

رشته‌های DNA گرد (Mohanty, 2003). همچنین، تأثیرات بازدارندگی تنش‌های محیطی روی دستگاه فتوسنتزی گیاهان اثبات شده است. در میان تنش‌های غیرزیستی، تنش خشکی از لحاظ تأثیر روی سیستم فتوسنتزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Flexas and Medrano, 2002). به عبارت دیگر، در طی تنش خشکی نسبت فتوسنتز کاهش می‌یابد و این کاهش به تفاوت‌های ژنتیکی وابسته است (Amanu et al., 1997). مشخص شده است که تحت تنش خشکی میزان پروتئین متصل‌شونده به رویسکو کاهش می‌یابد (Aranjuelo et al., 2011). از طرف دیگر، تحت تنش کمبود آب انجام پاسخ به تنش از نظر پروتئین‌ها دارای تنوع می‌باشد و برخی پروتئین‌ها تنها در رقم متحمل دیده می‌شوند و پروتئین‌های مشترک نیز بین ارقام متحمل و حساس دارای تغییر در نوع بیان هستند (Riccardi et al., 2004). علاوه بر این ارقام متحمل‌تر به تنش خشکی، دارای فعالیت کنترل روزه‌ای بهتری، که در ارتباط با پروتئین‌های خاص می‌باشند، هستند که به آنها اجازه تثبیت کربن در شرایط تنش و بهبود کارایی مصرف آب و فعالیت فتوسنتزی را می‌دهد (Yordanov et al., 2000). در این راستا تجزیه و تحلیل پروتئینی روشی مستقیم برای تشخیص فعالیت ژن‌ها محسوب می‌شود و تجزیه ارتباط پروتئوم با اطلاعات توالی ژنوم راهبرد مهمی برای ژنومیک کاربردی به شمار می‌آید (Komatsu and Tanaka, 2004). مطالعه پروتئوم ابزار قدرتمندی برای تفکیک بافت‌های پروتئینی و روشی مناسب برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌ها و تغییرات محیطی به حساب می‌آید (Zang and Komatsu, 2007). به عبارت دیگر در بررسی پاسخ به تنش و افزایش تحمل در گیاهان، مطالعه پروتئوم ابزار مناسبی برای تفکیک، جداسازی و تشخیص پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش محسوب می‌گردد (Tamura et al., 2003). در مطالعات متعدد با

### مقدمه

پاسخ به تنش خشکی به سه مرحله یعنی تشخیص تنش، ترانس‌سای پیام و تولید اجزاء برای پاسخ فیزیولوژیکی نیاز دارد (Tamura et al., 2003). اخیراً نتایج تحقیقات نشان داده است که علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر کمبود آب در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسیداتیو نیز از عوامل مهم محدود کننده رشد و تولیدات گیاهی هستند که در اثر عدم وجود شرایط مناسب ایجاد می‌شود. همچنین اظهار شده است که بیشترین خسارت تنش‌های مختلف به گیاهان، در ارتباط با خسارت اکسیداتیو در سطوح مختلف سلولی است (Turkan et al., 2005). در شرایط تنش کمبود آب روزه‌ها در گیاه بسته می‌شوند و متعاقب آن غلظت  $CO_2$  در بافت مزوفیل کاهش می‌یابد و به دنبال این وضعیت واکنش‌های تاریکی فتوسنتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش‌های روشنایی، که شامل ATP و NADPH است، مصرف نمی‌شود. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف  $NADP^+$  جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می‌کند و منجر به شکل‌گیری رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^-$ )، پر اکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^-$ ) می‌گردد (Turkan et al., 2005). فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ممکن است سبب بروز صدماتی همچون اکسید شدن لیپیدها (که در نتیجه آن ساختار غشاء تغییر کرده و باعث از هم پاشیدگی یکپارچگی آن می‌شود)، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل ( $-SH$ )، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، بی‌رنگ شدن و یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای و همچنین حمله مداوم به مولکول‌های آلی مثل DNA و در نتیجه اختلال در

۳۶ لکه پروتئینی به صورت تکرارپذیر دارای تغییرات بیان معنی‌دار بین تنش و شاهد بودند. با گروه‌بندی این پروتئین‌ها مشخص شد که سهم نسبی این پروتئین‌ها به ترتیب بصورت دخالت در گلیکولیز، دخیل در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، دخیل در بیوستتاز اسیدهای آمینه، دخیل در چرخه کالوین، درگیر در مکانیسم‌های دفاعی، و دخیل در تنظیم پس از ترجمه بود (Caruso et al., 2009).

در مجموع هدف از پژوهش حاضر شناسایی پاسخ پروتئینی مشترک در ارقام متحمل و حساس گندم تحت تنش خشکی است که می‌تواند در جهت شناسایی مسیرهای متابولیکی مهم‌تر تحت تنش مؤثر باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و طرح آزمایشی

در این پژوهش، دو رقم گندم بهاره شامل ارقام کویر (به‌عنوان رقم متحمل) و بهار (به‌عنوان رقم حساس) (Firoozi et al., 2012; Naghavi et al., 2014) در اطاقک رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه Tuscia ایتالیا در ژانویه ۲۰۱۴ میلادی کشت شدند. بذور هر رقم در سه تکرار و دو سطح شاهد و تنش خشکی بصورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و درون ظروفی به ابعاد ۸×۱۰×۱۰ سانتی‌متر کشت شدند. خاک مورد استفاده از خاک‌های آماده و حاوی  $P_2O_5$  160 mg/kg،  $K_2O$  180 mg/kg،  $KCl$  0.9 g/kg و  $CaCl_2$  140 mg/kg بود و در هر واحد آزمایشی ۱۰ عدد بذر کاشته شد. دمای روز در محفظه رشد ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود و همچنین میزان رطوبت نسبی محفظه در طول آزمایش ۴۰ درصد بود. آبیاری بصورت روزانه برای کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد و روی گیاهچه‌های ده روزه، تنش خشکی از طریق قطع آبیاری به مدت یک هفته اعمال شد. برای تجزیه پروتئوم، از برگ گیاهچه‌های هر واحد آزمایشی

استفاده از روش پروتئومیک، پروتئین‌های القا پذیر از تنش خشکی در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال، Ali و Komatsu (2006) به‌منظور ارزیابی تأثیر تنش خشکی در مراحل اولیه رشد برنج بر تغییرات بیان پروتئین‌های غلاف برگ این گیاه آزمایشی انجام دادند. آنها گیاهچه‌های دو هفته‌ای برنج را به مدت دو تا شش روز تحت تنش خشکی قرار دادند و تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی با بعد اول IEF و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی آبی کوماسی و توالی‌یابی کروماتوگرافی مایع انجام دادند. نتایج نشان داد که تعداد ۱۰ پروتئین افزایش بیان و ۲ پروتئین کاهش بیان معنی‌داری دارند که با گروه‌بندی این پروتئین‌ها مشخص شد که در فعالیت‌های دفاعی، تأمین انرژی، متابولیسم، ساختار سلولی و ترانس‌سانی پیام نقش دارند. همچنین آنها اظهار داشتند که فاکتور actin depolymerizing یک پروتئین هدف القایی تحت تنش خشکی می‌باشد (Ali and Komatsu, 2006). Kausar و همکاران (2013) در تجزیه پروتئوم ژنوتیپ‌های جو به تنش خشکی اظهار داشتند که نتایج نشان داده است که در مطالعه ژنوتیپ‌های متحمل و حساس پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز همراه با سنتز آمینواسیدها و پروتئین‌های مرتبط با degradation بیان متفاوتی داشتند. این نتایج نشان‌دهنده این است که پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم کلروپلاستی و تولید انرژی نقش مهمی در سازگاری با شرایط تنش کمبود آب در مرحله گیاهچه‌ای جو دارند (Kausar et al., 2013). از طرف دیگر، در آزمایش دیگری روی گندم دوروم که توسط Caruso و همکاران (2009) انجام شد، تنش خشکی به مدت هفت روز بر گیاهچه‌های هفت روزه اعمال و با گیاهان شاهد مقایسه گردید. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی در بعد اول به صورت IPG و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی توسط کوماسی و طیف سنجی جرمی نشان داد که

لکه‌های پروتئینی معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد) به‌عنوان لکه‌های پروتئینی هدف مشخص شدند. سپس لکه‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار در زیر نور فلورسانت به دقت جدا شدند. فرآیند هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی با تریپسین انجام شد. شناسایی پروتئین‌ها با استفاده از روش طیف سنجی جرمی MALDI-TOF/TOF صورت گرفت. در ادامه شناسایی پروتئین‌های مربوطه با استفاده از برنامه اینترنتی MASCOT انجام شد. مبنای انتخاب، امتیاز بالای ۶۶ ( $p < 0.05$ ) بود و علاوه بر این حداقل ۱۰ درصد همپوشانی توالی‌های پروتئینی در انتخاب پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج حاصله با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی NCBI و Expasy مورد جستجو و بررسی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار توسط نرم افزار Same spot progenesis حجم نرمال شده لکه‌های پروتئینی بدست آمد و از طریق روش آماری ANOVA در سطح احتمال ۵٪ و مقایسه میانگین ( $p < 0.05$ ) LSD معنی‌داری لکه‌های پروتئینی بررسی شد. در نهایت پس از شناسایی پروتئین‌های مشترک توسط اسپکترومتری جرمی و مشخص کردن نوع فعالیت آنها، پروتئین‌های دارای حوزه فعالیت مشابه در گروه مشترک قرار گرفتند و با توجه به تعداد آنها نمودارهای گروه‌بندی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excell ترسیم شدند.

### نتایج و بحث

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده مشترک دو رقم متحمل و حساس به تنش خشکی

الکتروفورز دوبعدی با رنگ‌آمیزی به روش آبی کوماسی انجام شد (شکل‌های ۱ و ۲) و تجزیه واریانس مجزا برای لکه‌های پروتئینی، بعد از کمی کردن آن‌ها توسط نرم‌افزار، منجر به شناسایی تعداد

به‌طور تصادفی به مقدار ۰/۵ گرم وزن شد و درون فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### استخراج، محلول کردن و تعیین غلظت پروتئین‌ها

برای استخراج پروتئین از بافر استخراج پروتئین شماره یک که شامل DTT 0.007% (w/v)<sup>۱</sup>، TCA 10% (w/v)<sup>۲</sup> و PMSF ۱۰۰ میلی‌لیتر استون بود و بافر استخراج پروتئین شماره دو که شامل DTT 0.007% (w/v)<sup>۳</sup> در استون بود، استفاده شد. برای محلول کردن پروتئین‌ها از بافر محلول‌سازی<sup>۴</sup> پروتئین استفاده شد. ترکیب این بافر عبارت از 9M Urea 4%، 35mM Tris، 1% DTT (w/v)، CHAPS(w/v) 0.1mM و 1mM PMSF، HCl pH=8.9 EDTA بود. برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌ها از روش 2-D Quant Kit استفاده شد (et al., 1986).

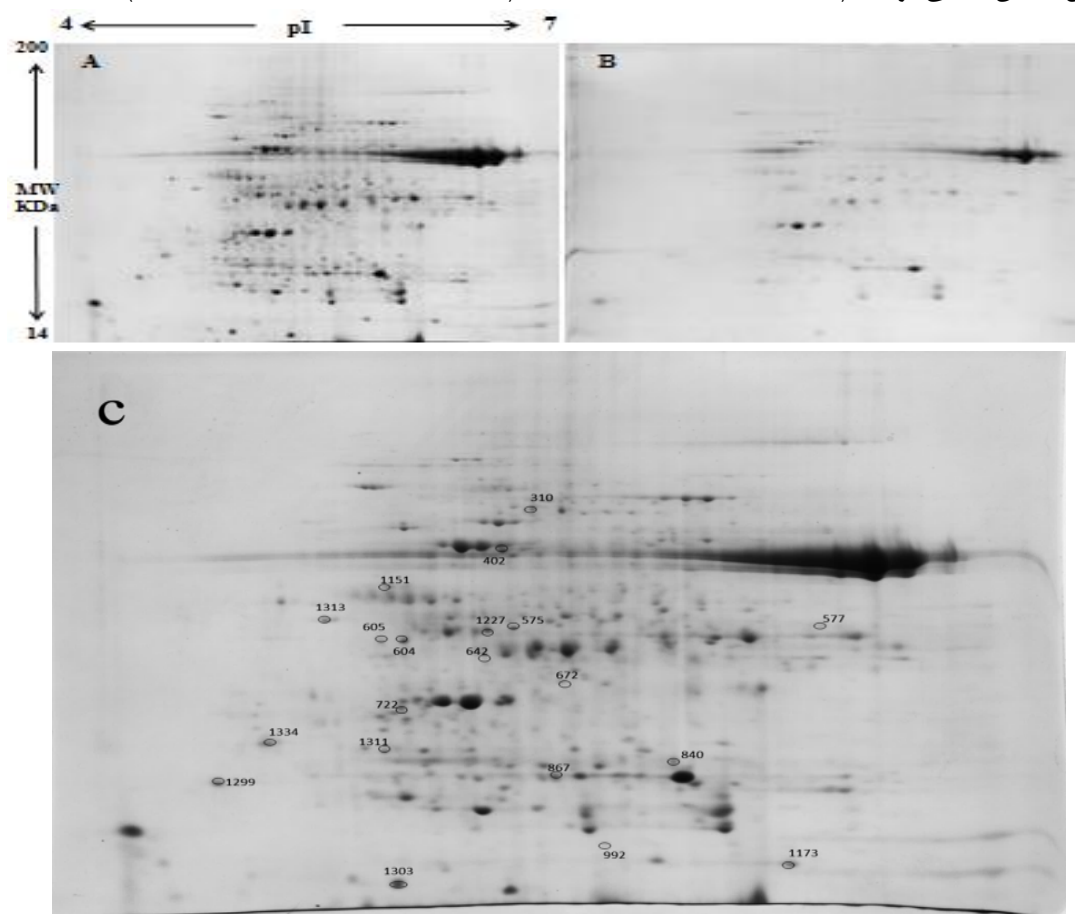
### الکتروفورز دوبعدی و تشخیص پروتئین‌ها

برای انجام الکتروفورز دوبعدی، بعد اول با استفاده از نوار IPG و بعد دوم با SDS-PAGE انجام شد. سپس رنگ‌آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی انجام شد. پس از آماده شدن کلیه ژل‌ها و اسکن کردن آنها، فایل‌های مربوط به اسکن ژل‌ها در نرم‌افزار Same spot progenesis اجرا شدند و پس از علامت‌گذاری لکه‌های مشترک و یا غیرمشترک تکرارپذیر و مشخص شدن حجم آنها توسط نرم‌افزار، تجزیه آماری روی آنها صورت گرفت و لکه‌هایی که مقدار معیار Fold آنها بزرگتر یا مساوی ۱/۵ بود (یا

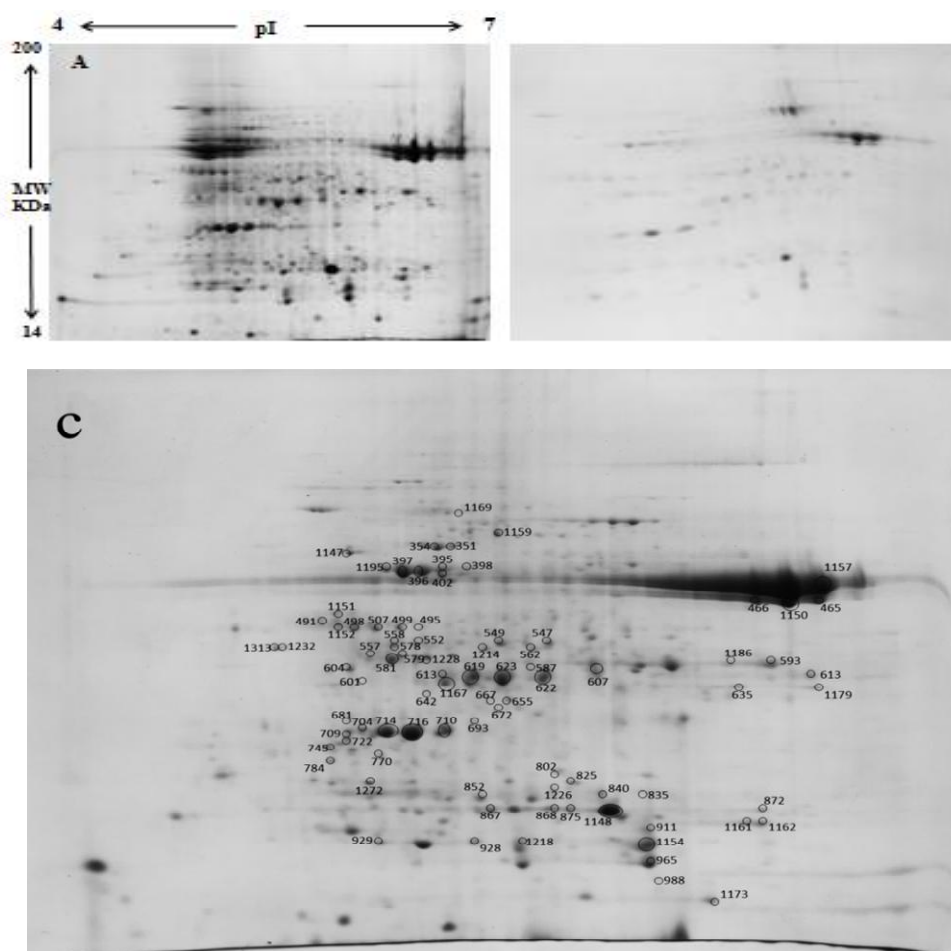
1. Dithiothreitol
2. Trichloroacetic acid
3. Phenylmethanesulfonyl fluoride
4. Solubilization buffer

Komatsu, 2007; Zang and Komatsu, 2007). همچنین گزارش شده است که در برنج تحت تنش کمبود آب تعداد لکه‌های دارای کاهش بیان بیشتر از لکه‌های دارای افزایش بیان است (Mushtaq *et al.*, 2008). از طرف دیگر، مشخص شده است که تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطوح بالاتر تنش بیش از سطوح پائین است. به عبارتی هر چه سطح تنش بیشتر شود پروتئین‌های بیشتری برای مقابله با تنش واکنش نشان می‌دهند و همچنین رقم متحمل کمتر از رقم حساس تحت تأثیر سوء تنش قرار می‌گیرد (Hashimoto and Komatsu, 2007).

۱۰ لکه پروتئینی مشترک تکرارپذیر دارای تفاوت معنی‌دار بین دو شرایط شاهد و تنش خشکی در دو رقم کویر و بهار شد. از بین این پروتئین‌ها با استفاده از اسپکترومتری جرمی تعداد نه پروتئین که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است، شناسایی شد. در مجموع این نتایج دلالت بر این دارد که تحت شرایط تنش پروتئین‌های خاصی تحت تنش خشکی به‌طور مشترک بین دو رقم متحمل و حساس پاسخ داده و بیشترین تأثیر را در تحمل تنش برعهده دارند. بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که در طی تنش یکسری از پروتئین‌ها افزایش بیان یا کاهش بیان می‌یابند و برخی از پروتئین‌ها در طی تنش بیان نمی‌شوند ( Hashimoto and



شکل ۱. مقایسه الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم کویر در شرایط شاهد (A) با تنش خشکی (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار روی ژل مرجع آنها (C)

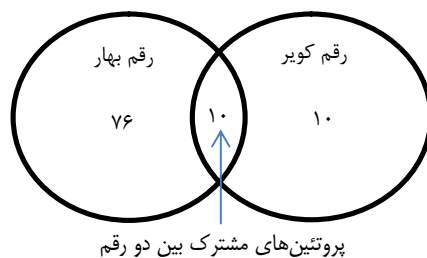


شکل ۲. مقایسه الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم بهار در شرایط شاهد (A) با تنش خشکی (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار روی ژل مرجع آنها (C)

رقم تحت تأثیر قرار گرفته‌اند بنظر می‌رسد که حساس‌ترین پروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی در گندم بهاره باشند. همچنین، رقم حساس بهار بدلیل کاهش بیان بیشتر پروتئین‌های مشترک (که نمونه‌ای از این پروتئین‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است) و همچنین در مجموع تعداد بیشتر پروتئین‌های تحت تأثیر تنش خشکی که اکثر آنها کاهش بیان داشتند، عملکرد کمتری داشت.

به عنوان نماینده‌ای از لکه‌های پروتئینی مشترک، نحوه تغییر بیان لکه پروتئینی شماره ۶۰۴ که گلوتامین سینتتاز است در شکل ۴ نشان داده شده است.

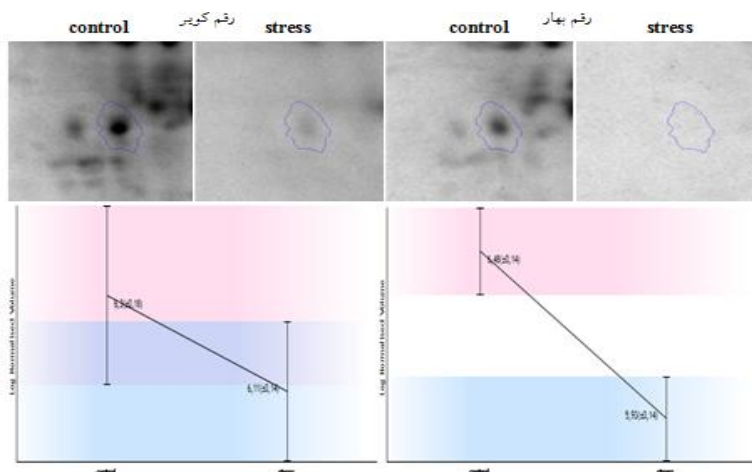
همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است علاوه بر ۱۰ پروتئین مشترک، تعداد ۷۶ لکه پروتئینی فقط در رقم بهار و ۱۰ لکه پروتئینی فقط در رقم کویر تغییر بیان نشان دادند که با توجه به اهمیت پروتئین‌های مشترک پاسخ‌دهنده به تنش خشکی بین دو رقم متحمل و حساس، در مقاله حاضر به بررسی پروتئین‌های مشترک پرداخته شده است. بر اساس نتایج بدست آمده پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری (سه پروتئین) و چرخه کالوین (دو پروتئین) در هر دو رقم بیشترین تغییرات را نشان دادند و مهمترین پروتئین‌ها جهت حفظ عملکرد تحت شرایط تنش خشکی می‌باشند و چون در هر دو



شکل ۳. نمودار تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در دو رقم کویر و بهار

جدول ۱. اسامی و خصوصیات پروتئین‌های مشترک دو رقم در پاسخ به تنش خشکی

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	score	Theoretical MW (kDa)	Theoretical pI	Experimental MW (kDa)	Experimental pI	مقدار تغییرات در کویر	مقدار تغییرات در بهار	Taxonomy	
واکنش نوری	867	gi 474121685	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	510	29.3	8.69	30.24	5.78	1.5	2.1	<i>Triticum urartu</i>	
	1173	gi 68566191	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic	357	24.11	8.47	16.78	6.63	3.1	3.6	<i>Triticum aestivum</i>	
	1313	gi 474219338	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	741	46.1	4.82	58.62	4.97	4.6	5.1	<i>Triticum urartu</i>	
چرخه کالوین	1151	gi 119745	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	261	44.7	5.16	64.88	5.20	1.8	2.3	<i>Triticum aestivum</i>	
	672	gi 82619	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone 234) - wheat (fragment)	68	15.57	8.95	47.51	5.80	1.7	2.4	<i>Triticum aestivum</i>	
اسمیلایسین	604	gi 121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	684	47.41	5.11	55.09	5.25	1.6	3.6	<i>Hordeum vulgare</i>	
نیتروژن	انتقال پروتون	402	gi 525291	ATP synthase beta subunit	1265	59.33	5.56	71.65	5.60	1.6	2.8	<i>Triticum aestivum</i>
بیوستز نشاسته		722	gi 473787383	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic	369	31.7	5	42.77	5.24	2.3	2.6	<i>Triticum urartu</i>
گلیکولیز	840	gi 1174749	Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic	149	27.14	5.24	32.67	6.21	1.6	3.0	<i>Secale cereale</i>	
	642	-					51.05	5.54	1.9	2.2		



شکل ۴. روند تغییر لکه پروتئینی شماره ۶۰۴ مشترک بین دو رقم کویر و بهار تحت تنش خشکی

### بررسی گروه‌های عملکردی پروتئینی

#### پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز

تعداد سه پروتئین مشترک در این گروه قرار گرفتند که شامل لکه‌های پروتئینی ۸۶۷ (Chlorophyll a) و ۱۱۷۳ (Cytochrome b binding protein 8) و ۱۳۱۳ (b6-f complex iron-sulfur subunit Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (CYP38) بودند. تجزیه شیمیایی آب در اثر نیروی تابشی در مجموعه درگیر اکسیژن (OEC) مرکز واکنش فتوسیستم II انجام می‌شود (Heide *et al.*, 2004). مجموعه درگیر اکسیژن مرکز فتوسیستم II از ۴ یون منگنز، کلسیم و احتمالاً یون کلرید تشکیل شده است که با پروتئین‌های فرعی دیگر ترکیب شده‌اند (Heide *et al.*, 2004). پروتئین‌های OEC فتوسیستم II در نگهداری و حفظ یون‌های کلسیم و کلرید نقش دارند که این یون‌ها دو کوفاکتور غیرآلی برای واکنش تجزیه آب می‌باشند (Ifuku *et al.*, 2005). اعتقاد بر این است که پروتئین‌های اینهنسر درگیر اکسیژن دو وظیفه را بر عهده دارد: اولین وظیفه بهینه‌سازی گروه منگنز در طی تجزیه فتوشیمیایی آب می‌باشد و دومین وظیفه آن حفاظت از پروتئین‌های مرکز واکنش II در برابر خسارت ناشی از تشکیل رادیکال‌های اکسیژن در اثر نور می‌باشد (Heide *et al.*, 2004). عبارت دیگر زیرواحد فرعی کمپلکس PSII پروتئین‌هایی هستند که در سیستم فتوسنتزی نقش دارند و به‌عنوان پروتئین‌های OEC شناخته می‌شوند و در پایداری کمپلکس PSII نقش دارند (Ifuku *et al.*, 2008) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به فتوسیستم II می‌شود (Takahashi and Murata, 2008). الکترون‌های جدا شده از مولکول آب توسط فتوسیستم II در نهایت از طریق فتوسیستم I به  $\text{NADP}^+$  انتقال یافته و NADPH تولید می‌شود. این فرآیند انتقال خطی الکترون نامیده می‌شود.

همزمان با این فرآیند و در نتیجه انتقال الکترون از کمپلکس Cytochrome b6/f (لکه پروتئینی مشترک ۱۱۷۳) شیب پروتون در غشای تیلاکوئیدها ایجاد می‌شود (Allen, 2003). گزارشات نشان داده است که کاهش میزان کمپلکس Cytochrome b6/f سبب کاهش در نسبت انتقال الکترون و نسبت تولید دی‌اکسیدکربن می‌شود (Ruuska *et al.*, 2000). از طرف دیگر، پروتئین‌های متصل شونده به کلروفیل توسط مولکول‌های پیش‌ماده در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند و باید به کلروپلاست انتقال یافته و وارد تیلاکوئیدها شوند و در ساختمان کلروفیل قرار گیرند (Bassi *et al.*, 1997). این پروتئین‌ها چندین وظیفه مهم از قبیل دریافت نور، انتقال انرژی و ذخیره رنگیزه‌ها را بر عهده دارند. به‌عنوان اجزای دریافت کننده نور در گیاهان، وظیفه اولیه پروتئین‌های اتصال یافته به کلروفیل a/b جذب نور و انتقال انرژی برانگیزش به مراکز واکنش فتوشیمیایی می‌باشد (Bassi *et al.*, 1997). در برخی موارد گیاهان با شدت نور بیشتر از نیاز فتوسنتزی مواجه می‌شوند. بنابراین برای جلوگیری از بازدارندگی نوری و عدم خسارت به دستگاه فتوسنتزی، توسط این پروتئین‌های دریافت کننده نوری انرژی اضافه تلف می‌شود و از بین می‌رود. علاوه بر این اعتقاد بر این است که پروتئین‌های اتصال یافته با کلروفیل a/b در ذخیره رنگیزه‌ها فعالیت دارند (Bassi *et al.*, 1997). عبارت دیگر، انرژی نوری جذب شده توسط پروتئین‌های متصل شده به کلروفیل a/b (لکه مشترک شماره ۸۶۷) در فعال‌سازی اکسیداسیون وابسته به نور آب استفاده شده و مولکول اکسیژن آزاد می‌شود. از طرف دیگر، فعالیت پروتئین peptidyl-prolyl cis-trans isomerase یا CYP38 گاهی با فعالیت پروتئین‌های شوک گرمایی مقایسه می‌شود (Ji *et al.*, 2012). در حالی که بر اساس مطالعات درون



آزمایش لکه مشترک ۶۷۲ در هر دو رقم نشاندهنده پیش‌ماده تشکیل دهنده زیرواحد کوچک آنزیم روییسکو بود. در تجزیه پروتئوم غلاف برگ برنج در طی تنش کمبود آب گزارش شده است که زیر واحد بزرگ روییسکو کاهش یافته است (Ali and Komatsu, 2006). در ضمن، گزارش شده است که شواهدی مبنی بر تجزیه زیر واحد بزرگ روییسکو در طی تنش کمبود آب مشاهده شده است (Costa et al., 1998). همچنین، در آزمایش Han و همکاران (2009) نیز در شرایط تنش گرما زیرواحد بزرگ روییسکو کاهش بیان نشان داد. افزون بر این در طی تنش آسبیزیک‌اسید این پروتئین‌ها کاهش بیان نشان دادند (Zhu et al., 2010). همچنین کاهش بیان زیرواحد بزرگ روییسکو در طی تنش خشکی در لاین‌های حساس گندم گزارش شده است که نشاندهنده نقش آن در تحمل به تنش خشکی در گندم می‌باشد (Demireska et al., 2009). از طرف دیگر همانطور که ذکر شد چرخه کالوین دارای سه فاز است که در مرحله یا فاز سوم چرخه کالوین مولکول‌های RuBP دوباره ساخته می‌شوند و چرخه از ابتدا شروع می‌شود که این مرحله را فاز احیاء می‌نامند. فاز احیاء توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (Heldt, 1997; Macdonald and Buchanan, 1997). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این فاز شامل sedoheptulose-1,7-biphosphate و fructose 1,6-biphosphate aldolase (لکه مشترک ۱۱۵۱ در هر دو رقم) می‌باشند. این دو آنزیم با همدیگر واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت نتیجه آن تشکیل ribulose-5-phosphate می‌باشد. سپس ribulose-5-phosphate فسفریله شده و RuBP را تشکیل دهد که این فسفریله شدن توسط فسفوریبولوکیناز انجام می‌شود. برای تکمیل چرخه RuBP به عنوان ماده هدف، توسط RuBisCo استفاده شده و دوباره فاز

شیشه‌ای در *Arabidopsis thaliana* مشخص شده است که پروتئین CYP38 (لکه مشترک شماره ۱۳۱۳) تنظیم فعالیت فسفاتاز پروتئین D1 داخل غشای تیلاکوئید را بر عهده دارد. بنابراین با توجه به نقش این پروتئین فسفاتاز در تجمع و سنتز زیر واحد D1 فتوسیستم II می‌توان ادعان داشت که پروتئین CYP38 در تجمع و ساخت فتوسیستم II نقش دارد (Lepedu et al., 2009).

در مجموع در این گروه پروتئینی با توجه به تغییر بیان پروتئین‌ها در رقم متحمل و حساس بنظر میرسد کارایی رقم حساس در حفظ ساختار و فعالیت مسیر متابولیکی واکنش نوری فتوسنتز کمتر از رقم متحمل می‌باشد.

### چرخه کالوین

در این گروه پروتئینی در مجموع دو پروتئین مشترک ribulose-bisphosphate carboxylase small Fructose-chain precursor (لکه شماره ۶۷۲) و 1,6-bisphosphatase (لکه شماره ۱۱۵۱) شناسایی شدند. چرخه کالوین که مسیر فسفات کاهشی قند پنج کربنه هم نامیده می‌شود یک مسیر متابولیکی است که قندهای پنتوز یا پنج کربنه تولید می‌کند (Heldt, 1997). چرخه کالوین دارای سه فاز یا مرحله می‌باشد که عبارتند از فاز کربوکسیلاسیون، فاز کاهشی و فاز احیاء. کمبود آب موجب بسته شدن روزنه‌های برگ می‌شود و این امر باعث کاهش جریان دی‌اکسیدکربن به داخل برگ شده و باعث افزایش هیدرولیز نشاسته و تجمع قندها و همچنین کاهش بازدهی محصولات فتوسنتزی می‌گردد. همه این تغییرات در نتیجه کاهش فتوسنتز اتفاق می‌افتد (Yordanov et al., 2003). روییسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز است که از چندین زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده و چند زیر واحد کوچک تنظیم‌کننده تشکیل شده است (Spreitzer and Salvucci, 2002). در این

اول که همان تثبیت کربن است، انجام می‌شود. بعضی از تریوزفسفات‌های تولید شده در چرخه کالوین برای بیوسنتز قند و نشاسته استفاده می‌شوند (Tamoi *et al.*, 2005).

**اسمیلایسیون نیتروژن و انتقال پروتون**

در این دو گروه پروتئینی لکه پروتئینی مشترک شماره ۶۰۴ به‌عنوان Glutamine synthetase (GS) دخیل در اسمیلایسیون نیتروژن و لکه پروتئینی شماره ۴۰۲ به‌عنوان زیر واحد بتای ATP سنتتاز دخیل در انتقال پروتون گروه پروتئینی شناسایی شدند. نیتروژن عنصر کلیدی رشد و تولیدمثل می‌باشد و برای ساخت پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ضروری است. گیاهان می‌توانند مقادیر بالایی از نیتروژن را درون آنزیم‌های درگیر در تثبیت کربن مانند روبیسکو ذخیره کنند. مسیر اصلی ساخت نیتروژن معدنی و remobilization آن در گیاهان در سطح بیوشیمیایی به اثبات رسیده است. GS (لکه مشترک ۶۰۴) آنزیم کلیدی این مسیر است و آدنوزین تری فسفات وابسته به تثبیت آمونیوم را به گروه  $\delta$ -carboxyl گلوتامات برای تشکیل گلوتامین کاتالیز می‌کند و برعکس آن توسط آنزیم گلوتامات سنتتاز انجام می‌شود که تبدیل گلوتامین و ۲-oxoglutarate را به دو مولکول گلوتامات برعهده دارد (Stéphanie *et al.*, 2009). گزارش شده است که در پاسخ به تنش خشکی و شوری فراوانی پلی‌پپتیدهای آنزیم GS و فعالیت آن کاهش می‌یابد، در حالی که GS سیتوسولی افزایش بیان نشان داده و یا مقدار سطح بیان خود را در طی تنش در برگ حفظ می‌کند (Santos *et al.*, 2004). از طرف دیگر، از نظر ساختاری ATP سنتتاز کلروپلاستی دارای دو جزء اصلی می‌باشد که عبارتند از extrinsic CF1 و CF0 که ATP سنتتاز با کمک آنها باعث انتقال پروتون از غشای تیلاکوئید می‌شوند. CF1 دارای پنج زیر واحد آلفا، بتا (لکه مشترک ۴۰۲)، گاما، دلتا و

اپسیلون است در حالی که CF0 دارای سه زیر واحد a, b و c می‌باشد (von Ballmoos and Dimroth, 2007). CF1، یک کمپلکس آنزیمی است که از پنج زیرواحد ساخته شده است. یکی از این زیرواحدها زیرواحد  $\beta$  است، که یک catalytic and ADP-binding unit می‌باشد و نقش مهمی در متابولیسم انرژی به‌واسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون درون غشایی دارد (Ye *et al.*, 2013). وظیفه فیزیولوژیکی اصلی ATP سنتتاز کلروپلاستی تولید ATP از ADP در حضور شیب پروتون از طریق غشای تیلاکوئید می‌باشد (von Ballmoos and Dimroth, 2007). این شیب پروتون در نتیجه واکنش نوری فتوسنتز ایجاد می‌شود. سپس ATP پروسه سلولی مصرف انرژی را مانند چرخه کالوین در طی رشد و نمو سلولی گیاهان فعال می‌کند (von Ballmoos and Dimroth, 2007). مطالعات نشان داده است که در طی تنش خشکی بیان ATP synthase کاهش می‌یابد (Tezara *et al.*, 1999) و همچنین کاهش بیان زیرواحد بتای ATP synthase در طی تنش خشکی اعمال شده توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول گزارش شده است و اظهار شده است که این امر موجب کاهش تولید ATP و کاهش نسبت فتوسنتزی و کارایی چرخه کالوین می‌شود (Ye *et al.*, 2013). همچنین گزارش شده است در تجزیه پروتئوم گندم تحت تنش کاهش بیان CF1 ATP synthase subunit و atp1 (که همچنین F1-ATP synthase subunit  $\alpha$  هم نامیده می‌شود) که در تولید ATP نقش دارند، منجر به کاهش نسبت فتوسنتزی می‌گردد (Caruso *et al.*, 2009). به‌طور کلی در چند پژوهش قبلی کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با تولید ATP تحت تنش گزارش شده است (Caruso *et al.*, 2009; Kausar *et al.*, 2013).

### اسمیلایسیون نیتروژن و انتقال پروتون

### بیوسنتز نشاسته و مسیر گلیکولیز

در این دو گروه پروتئینی لکه پروتئینی مشترک شماره ۷۲۲ دخیل در بیوسنتز نشاسته و لکه پروتئینی شماره ۸۴۰ درگیر در مسیر گلیکولیز شناسایی شدند. نشاسته یک پلی‌ساکارید ذخیره‌ای مهم در گیاهان محسوب می‌شود که منبع انرژی برای فرآیندهای متابولیکی مختلف می‌باشد (Kruger, 1997). در سنتز نشاسته سه آنزیم: آدنوزین بی‌فسفات گلوکز پیروفسفات (AGPase)، نشاسته سنتاز و آنزیم منشعب کننده فعالیت دارند (Guan and Keeling, 1998). در آزمایش ما تنها یکی از این آنزیم‌ها شناسایی شد (لکه مشترک ۷۲۲ در دو رقم) که AGPase بودند و آنها وزن تقریبی یکسان (۲۰ کیلودالتون) داشتند اما pI آنها به ترتیب ۵/۶ و ۶/۱ بود. همچنین AGPase گیاهان ساختار نوع چهارم دارد و دارای دو زیر واحد متفاوت است که توسط ژن‌های متفاوت کد می‌شوند. زیر واحد کوچک و بزرگ آن به ترتیب دارای وزن مولکولی در دامنه ۵۰ تا ۵۴ کیلودالتون و ۵۱ تا ۶۰ کیلودالتون می‌باشند (Guan and Keeling, 1998). واکنش تشکیل ADP-glucose و پیروفسفات غیرآلی را از ATP و glucose-1-phosphate کاتالیز می‌کند (Boehlein et al., 2005). محصول نهایی این واکنش که ADP-glucose می‌باشد پیش‌ماده برای سنتز نشاسته است (Tetlow et al., 2003). سپس نشاسته سنتاز، گلوکز را از ADP-glucose به انتهای غیر کاهنده زنجیره پذیرای در حال رشد انتقال می‌دهد و باعث طولیل شدن زنجیره گلوکان  $\alpha$ -1,4 می‌شود. در مرحله سوم آنزیم انشعاب دهنده نشاسته زنجیره گلوکان  $\alpha$ -1,4 طولیل شده را جدا کرده و همزمان آن را به یک زنجیره گیرنده برای تشکیل لینکاز  $\alpha$ -1,6 انتقال می‌دهد (Guan and Keeling, 1998). همچنین اظهار شده است که AGPase یک آنزیم محدود کننده نسبت بیوسنتز است که شامل دو زیر واحد بزرگ (I-AGPase) و

دو زیر واحد کوچک (s-AGPase) می‌باشد که زیرواحدهای کوچک آن نقش catalytic برعهده دارند و نقش کلیدی در سنتز نشاسته اجرا می‌کنند (Kim et al., 2002). Ye و همکاران (2013) گزارش کردند که در طی تنش خشکی اعمال شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول، فعالیت آنزیم AGPase کاهش می‌یابد و بنظر می‌رسد که در طی تنش خشکی محدودیت‌های بیوسنتزی در جهت افزایش کارایی فتوسنتزی برداشته می‌شود.

Triosephosphate isomerase (لکه مشترک شماره ۸۴۰) یک آنزیم درگیر در مسیر گلیکولیز (مرحله اولیه تولید انرژی) می‌باشد که ایزومریزاسیون dihydroxyacetone phosphate و D-glyceraldehyde-3-P را کاتالیز می‌کند (Cui et al., 2005). Xue و همکاران (2008) گزارش کردند که در تجزیه پروتئوم گندم این آنزیم در طی تنش خشکی کاهش بیان نشان داده است. در این آزمایش نیز تحت شرایط تنش در رقم متحمل مقدار بیان آن کاهش و در رقم حساس این پروتئین دیده نشد. در حالی که، گزارش شده است که در طی تنش غیرزیستی و در گیاهانی مانند گندم این آنزیم افزایش بیان داشته است (Moller et al., 2011).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۰ لکه پروتئینی مشترک تکرارپذیر که نیمی از آنها به‌طور مستقیم درگیر در فرآیند فتوسنتز بودند، بین شرایط شاهد و تنش خشکی در دو رقم کویر و بهار شناسایی شدند. بعبارت دیگر، پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز شامل پروتئین‌های Chlorophyll a-b binding protein 8، Cytochrome b6-f complex iron-sulfur Peptidyl-prolyl cis- و subunit, chloroplasti و trans isomerase CYP38, chloroplastic پروتئین‌های درگیر در چرخه کالوین شامل دو لکه پروتئینی Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic و ribulose-bisphosphate

داد که حفظ کارایی فتوسنتز در گندم بهاره تحت تنش خشکی دارای اهمیت بالایی است و شناخت ژن‌های بیان‌کننده این پروتئین‌ها می‌تواند در اصلاح مولکولی گندم موثر واقع شود.

### سپاسگزاری

از بخش پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران برای فراهم نمودن هزینه انجام آزمایش سپاسگزاری می‌گردد.

carboxylase small chain در هر دو رقم بیشترین تغییرات را نشان دادند و مهم‌ترین پروتئین‌های مشترک جهت حفظ عملکرد تحت شرایط تنش خشکی بودند. در ضمن، بنظر می‌رسد به‌علت تغییر بیان این پروتئین‌ها در هر دو رقم، به‌عنوان حساس‌ترین پروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی محسوب شوند و یکی از دلایل حساس بودن رقم بهار تحت تنش کاهش بیان بیشتر این پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین در مجموع نتایج نشان

### REFERENCES

- Ali GM, Komatsu S (2006) Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. *J. Proteome Res.* 5(2): 396-403.
- Allen JF (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.* 8: 15-19.
- Aranjuelo I, Molero G, Erice G, Christophe Avice J, Nogues S (2011) Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 62(1): 111-123.
- Arnau GP, Monneveux D, This D, Alegre L (1997) Photosynthesis of six barley genotypes as affected by water stress. *Photosynthetica*, 34: 67-76.
- Bassi R, Sandona D, Croe R (1997). Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiol. Plantarum*, 100: 769-779.
- Boehlein SK, Sewell AK, Cross J, Stewart JD, Hannah LC (2005) Purification and characterization of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase from maize/potato mosaics. *Plant Physiol.* 138: 1552-1562.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Sci.* 177: 570-576.
- Costa R, Bahrman N, Frigerio JM, Kremer A, Plomion C (1998) Water deficit-response proteins in maritime pines. *Plant Mol. Biol.* 38: 587-596.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12): 3162-3172.
- 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 roteins. *Electrophoresis*, 7: 52-4.
- Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, Simova-Stoilova L, Stamenova M, Feller U (2009) Drought stress effects on rubisco in wheat: Changes in the rubisco large subunit. *Acta Physiol. Plantarum*, 31: 1129-1138.
- Firoozi B, Sofalian O, Shokrpour M, Rasoulzadeh A, Ahmadpoor F (2012) Assessment of Drought Tolerance Indices and their Relation with ISSR Markers in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Not. Sci. Biol.* 4(3): 143-150.
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 89(2): 183-189.
- Guan HP, Keeling PL (1998). Starch Biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple

- isoenzymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends Glycosci. Glyc.* 10: 307-319.
- Han F, Chen H, Yan MF, Liu GS, Shen SH (2009) A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(11): 1625-1634.
- Hashimoto M, Komatsu S (2007) Proteomic analysis of rice seedling during cold stress. *Proteomics*, 7: 293-302.
- Heide H, Kalisz HM, Follmann H (2004) The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *J. Plant Physiol.* 161: 139-149.
- Heldt HW (1997) *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Ifuku K, Ishihara S, Shimamoto R, Ido K, Sato F (2008) Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants. *Photosynth. Res.* 98: 427-437.
- Ifuku K, Nakatsu T, Shimamoto R, Yamamoto Y, Ishihara S, Kato H, Sato F (2005) Structure and function of the PsbP protein of photosystem II from higher plants. *Photosynth. Res.* 84: 251-255.
- Ji K, Wang Y, Sun W, Lou Q, Mei H, Shen S, Chen H (2012) Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *J Plant Physiol.* 169: 336-344.
- Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44: 345-359.
- Kim SH, Mizuno K, Fujimura T (2002) Regulated expression of ADPglucose pyrophosphorylase and chalcone synthase during root development in sweet potato. *Plant Growth Regul.* 38: 173-179.
- Komatsu S, Tanaka N (2004) Rice proteome analysis: A step toward function analysis of the rice genome. *Proteomics*, 4: 938-949.
- Kruger NJ (1997) Carbohydrate synthesis and degradation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Eds.), *Plant Metabolism*, 2<sup>nd</sup> Ed, Essex: Addison Wesley Longman, pp 83-104.
- Lepedu H, Toma A, Juri SA, Katani Z, Cesar V, Fulgosi H (2009). Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana*. *Food Technol. Biotechnol.* 47(3): 275-280.
- Macdonald FD, Buchanan BB (1997) The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (Eds.), *Plant Metabolism*, 2<sup>nd</sup> Ed. Essex: Addison Wesley Longman, pp 299-313.
- Mohanty N (2003) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of (*Triticum aestivum* L.) exposed to warmer growth conditions. *J Plant Physiol.* 160: 71-74.
- Moller AL, Pedas P, Andersen B, Svensson B, Schjoerring JK, Finnie C (2011) Responses of barley root and shoot proteomes to longterm nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant Cell Environ.* 34(12): 2024-2037.
- Mushtaq R, Katiyar S, Bennett J (2008) Proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in rice endosperm affecting grain quality. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 11: 227-232.
- Naghavi MR, Moghaddam M, Toorchi M, Shakiba MR (2014) Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. PhD Thesis, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran. (In Persian).
- Riccardi F, Gazeau P Jacquemot M-P,

- Vincent D, Zivy M (2004) Deciphering genetic variation of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 1003-1011.
- Ruuska SA, Andrews TJ, Badger MR, Price GD, von Caemmerer S (2000) The role of chloroplast electron transport and metabolites in modulating Rubisco activity in tobacco: insights from transgenic plants with reduced amounts of cytochrome b/f complex or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol.* 122: 491-504.
- Santos C, Pereira A, Pereira S Teixeira J (2004) Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Sci. Hort.* 103: 101-111.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449-475.
- Stéphanie M, Bernard Z, Habash D (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol.* 182: 608-620.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photo inhibition? *Trends Plant Sci.* 13: 178-182.
- Tamoi M, Nagaoka M, Yabuta Y, Shigeoka S (2005) Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnol.* 22: 355-360.
- Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131: 454-462.
- Tetlow IJ, Davies EJ, Vardy KA, Bowsher CG, Burrell MM, Emes MJ (2003) Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J. Exp. Bot.* 54: 715-725.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll S, Lawlor D (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401: 914-917.
- Turkan I, Bor M, Ozdemir F, Koca H (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.* 168: 223-231.
- von Ballmoos C, Dimroth P (2007) Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry*, 46: 11800-11809.
- Xue G-P, McIntyre CL, Glassop D, Shorter R (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Mol. Biol.* 67: 197-214.
- Ye J, Wang S, Zhang F, Xie D, Yao Y (2013) Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG6000 stress and rewatering. *Plant Omics J.* 6(4): 286-294.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38: 171-186.
- Yordanov I, Velikova V, Tsoney T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian J. Plant Physiol. Special Issue.* 187-206.
- Zang X, Komatsu S (2007) A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochem.* 68: 426-437.
- Zhu M, Simons B, Zhu N, David G, Oppenheimer M, Chen S (2010) Analysis of abscisic acid responsive proteins in *Brassica napus* guard cells by multiplexed isobaric tagging. *J. Proteomics*, 73:790-805.