

## بررسی پروتئوم ریشه و برگ برنج تحت تنش شوری

قاسم حسینی سالکده<sup>\*</sup> و داود نصرآبادی<sup>۱</sup>

۱، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه ژنومیکس

۲، کارشناس ارشد پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی

(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۶ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

### چکیده

شوری خاک و آب یکی از عوامل محدودکننده کشت برنج در سراسر دنیا است و این گیاه خصوصاً در مرحله گیاهچه (seedling) حساسیت زیادی نسبت به شوری دارد. پروتئومیکس با دارا بودن توانایی کشف پروتئین و ژنهای پاسخ‌دهنده به تنش از پتانسیل مطلوبی جهت استفاده در فرآیند بهنژادی برای تنش‌ها به ویژه تنش شوری برخوردار است. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و الگوی بیان پروتئین‌های گیاه برنج، بذور دو رقم متتحمل و حساس آن به ترتیب (*Oryza sativa* cv.IR651 and cv.IR29) در محیط کشت یوشیدا، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار کشت شدند. وزن خشک و تر و نسبت  $K^+/Na^+$  در برگ سوم و ریشه گیاهان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، کاهش وزن کل ماده خشک گیاهچه‌ها در رقم حساس (IR29) نسبت به رقم متتحمل (IR651) اثر معنی‌دار داشت. همچنین نسبت  $K^+/Na^+$  در رقم IR651 بیش از دو برابر این نسبت در رقم IR29 بود. در این بررسی ۳۴۵ نقطه پروتئینی تکرارپذیر در برگ و ۴۶۸ نقطه در ریشه با استفاده از نرم‌افزار Melanie3 شناسایی شد. از این آن‌ها ۱۰۷ پروتئین در ریشه و ۸۶ پروتئین در برگ هر دو ژنوتیپ پاسخ معنی‌داری به تنش از خود نشان دادند. توالی‌یابی نشان داد که مهم‌ترین پروتئین‌های شناسایی‌شده عبارتند از فریتین، آسکوربات‌پراکسیداز و روپیسکو اکتیواز در برگ و پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز در ریشه. پروتئین‌های مذکور همگی آنزیم بوده و در سازوکارهای سمزدایی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز)، هموستازی آهن (فریتین) و یا فعال‌سازی دیگر آنزیم‌ها (روپیسکو اکتیواز) نقش دارند.

**واژه‌های کلیدی:** برنج، تنش شوری، پروتئومیکس، الکتروفورز دو بعدی، تنش اکسیداتیو

قالب طرح‌های بهترادی، دو راهکار اساسی جهت افزایش تولید در زمین‌های شور می‌باشد. صفت تحمل به شوری در گیاهان پدیده‌ی پیچیده‌ای است که از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی قابل بحث و بررسی است.

پروتئومیکس ابزار قدرتمندی در شناسایی و بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از این راهکار به منظور شناخت ماهیت تنش‌های زنده و غیرزنده و کشف سازوکارهای دفاعی گیاهان به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاحی رشد چشم‌گیری یافته است. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه اثرات تنش شوری بر الگوی پروتئینی برگ و ریشه دو رقم متحمل و حساس برنج و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری با استفاده از راهکار پروتئومیکس است. استفاده از این اطلاعات در کنار داده‌های حاصل از سایر تکنیک‌های مولکولی می‌تواند بستر مناسبی جهت بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه برنج و دیگر گیاهان مشابه است.

## مواد و روش‌ها

### تهییه مواد گیاهی

بذور دو رقم متحمل (IR651) و حساس برنج (IR29) از مؤسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI)<sup>۱</sup> تهییه و به منظور جوانه‌زنی، بذور به مدت سه روز در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  روی کاغذ صافی مرطوب، درون پتی دیش در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بذور جوانه‌زده در تست‌های حاوی محیط کشت بذور (Yoshida *et al.* 1946) به روش یوشیدا (Yoshida *et al.* 1946) به روش هایدروپونیک در گلخانه در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شدند. محیط کشت هر هفته تعویض و pH محیط با استفاده از

### مقدمه

برنج منبع اولیه غذایی بیش از نیمی از مردم جهان است به طوری که در آسیا ۲۰۰ میلیون نفر ۶۰ تا ۷۰ درصد کالری مورد نیاز خود را از برنج و فرآورده‌های آن به دست می‌آورند (FAO, 2004). نقش مهم برنج در تغذیه انسان‌ها و پتانسیل بالای آن برای افزایش عملکرد، می‌تواند سهم عمده‌ای در کاهش نگرانی‌های موجود و تضمین امنیت غذایی جهان در آینده داشته باشد. برنج متعلق به خانواده گرامینه و جنس *Oryza* است. از ۲۳ گونه جنس *Oryza sativa* امروزه دو گونه *Oryza sativa* که منشأ آن را مناطق حاره‌ای و مرطوب آسیا می‌دانند و *O. gluberrima* که متعلق به غرب آفریقا است، مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (FAO 2004). برنج گیاهی تک‌لپه، دیپلوفیل با ۲۴ عدد کروموزوم است ( $2n=24$ ) که در مقایسه با دیگر غلات ژنوم کوچکتر ( $430\text{ Mb}$ ) و ژن‌های کمتری ( $30000\text{ ژن}$ ) دارد.

شوری خاک به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل نامساعد و تنش‌زای غیرزنده اثر نامطلوب بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارد و یکی از عوامل محدودکننده کشت برنج در سراسر دنیا است. شوری به دلایل مختلفی مانند استفاده از آب نامناسب برای آبیاری، زهکشی نامناسب زمین‌های مرطوب، واردشدن آب دریا به زمین‌های کنار دریا و در نواحی خشک به دلیل بالابودن میزان تبخیر نسبت به بارندگی، افزایش می‌یابد. در شرایط تنش شوری مسمومیت یونی (در اثر وجود یون‌های  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$  و  $\text{SO}_4^{2-}$ ), استرس اسمزی و سوء‌تغذیه (در اثر کم‌شدن جذب فسفر، پتاسیم، نیترات و کلسیم) رشد گیاه را محدود نموده و باعث برهم‌خوردن تعادل متابولیک سلول و ایجاد تنش اکسیداتیو خواهد شد (Zhu JK, 2002).

استفاده بهینه از منابع آب و خاک در قالب طرح‌های بهزراعی و بهبود صفت تحمل به شوری در

دماهای ۴°C با دور ۱۲۰۰ g سانتریفیوژ شد. به منظور برطرف نمودن آلودگی‌های غیرپروتئینی موجود در رسوب حاصل این مرحله ۲ بار تکرار گردید و در نهایت رسوب بدست آمده بهوسیله دستگاه لیوفیلایزر خشک شد (تمامی مراحل روی یخ انجام گردید). به ۲۰ میلی‌گرم از پودر لیوفلایز شده ۲۵۰ مایکرولیتر Urea, 2%w/v Chaps, 0.8 %w/v Pharmalyte, pH 3-10, 1% w/v Pharmalyte, pH 3-10, 1% w/v DTT (اضافه و به مدت یک ساعت در دماهای ۳۷°C قرار گرفت. در طول این مدت به تناوب هر ۵ دقیقه تیوب اپندورف حاوی نمونه و رتکس شد، سپس سوسپانسیون حاصله در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی که حاوی پروتئین است برداشته شد و رسوب حذف گردید.

غلاظت‌سنگی نمونه‌ها با استفاده از آزمون برdfورد انجام شد. برای انجام این آزمون از پودر پروتئینی (Bio-Rad, Hercules, USA) و محلول برdfورد BSA و محلول برdfورد CA, USA) محلول‌های استاندارد پروتئینی با غلاظت مشخص تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Cary300 در طول موج ۵۹۵nm تعیین غلاظت شدند.

#### الکتروفوروز دو بعدی

از ژل‌های نواری IPG<sup>1</sup> تهیه شده از شرکت (Amersham Pharmacia Biotech) با مشخصات (pH=۴-۷ و ۱۸ cm) برای الکتروفوروز استفاده شد. در محلول آبگیری (8 M Urea, 0.5%Chaps, 20mM DTT, 0.5% v/v IPG buffer) به ترتیب ۱۲۵ میکروگرم و ۱/۵ میلی‌گرم پروتئین برای تهیه ژل‌های آنالیتیک (رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره) و آماده‌سازی (رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو) حل شد طوری که حجم کل محلول به ۳۵۰ مایکرو لیتر رسید. آنگاه در داخل سینی‌های

KOH و HCl بین ۵ تا ۵/۵ تنظیم شد. ۲۵ روز پس از کشت، تنش شوری mM NaCl ۱۰۰ اعمال گردید. نمونه‌برداری ۱۰ روز پس از اعمال تنش انجام شد. نمونه‌های مربوط به بررسی فیزیولوژیکی پس از اندازه‌گیری وزن‌تر بالاصله به آون C ۷۰° متنقل شدند و نمونه‌های مربوط به آزمایشات پروتئومیکس با استفاده از ازت مایع فریز شده و در دماهای -۸۰°C نگهداری شدند.

#### استخراج سدیم و پتاسیم

برگ سوم و کل ریشه گیاهچه‌های برقج به مدت یک هفته در دماهای ۷۰°C در آون خشک شدند. برای هضم بافت‌های گیاهی به ۱۰۰mg از نمونه پودرشده، ۲۵ml محلول حاوی اسید استیک ۱۰٪ و اسید نیتریک ۰/۱٪ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت با دور ۱۸۰rpm در دماهای محیط شیک شدند. پس از صاف نمودن محلول با کاغذ صافی، عصاره‌ی بدهست آمده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد. مقدار سدیم و پتاسیم نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومر اندازه‌گیری شد.

#### استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از برگ بر اساس روش TCA/Aceton (Damerval *et al.* 1986) با اندکی تغییر انجام شد. با استفاده از نیتروژن مایع یک گرم بافت گیاهی (برگ و ریشه) را به صورت پودر یکنواخت درآورده و در درون لوله‌های مخصوص سانتریفیوژ ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول TCA/Aceton به هر نمونه ۱۰w/v٪ اضافه (دماهای محلول باید -۲۰- درجه سانتی‌گراد باشد) و به مدت یک ساعت در دماهای ۲۰°C-۴°C نگهداری شد. از این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه در دماهای ۴°C دور ۳۵۰۰ g سانتریفیوژ، مایع رویی حذف و رسوب حاوی پروتئین در محلول ۰/۰۷ w/v٪ DTT/Aceton (محلول شستشوی نمونه) به حالت سوسپانسیون درآمده و به مدت یک ساعت در دماهای ۲۰°C- نگهداری گردید. آنگاه به مدت ۱۵ دقیقه در

1. Immobilin pH Gradiant

GS-700 (Bio-Rad) با وضوح ۶۰۰ dpi اسکن و با فرمت Tiff ذخیره شدن، شناسایی و کمیت سنجی پروتئین‌ها (نقاط) و مقایسه ژل‌های کنترل با ژل‌های (Gen Melanie3 Bio, Geneva, Switzerland) تحت تنش به وسیله نرم‌افزار آنالیز شدن. بر پایه الگوریتم این نرم‌افزار می‌توان حجم نسبی هر نقطه را نسبت به حجم کل نقاط قابل تشخیص توسط نرم‌افزار ارائه کرد که بر این اساس عبارت درصد حجمی<sup>۴</sup> به عنوان معیار کمیت پروتئین بر روی ژل در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق نقاط تکرار پذیر در سه تکرار به عنوان نقاط مورد نظر برای آنالیز آماری انتخاب شدند. برای تعیین کمیت مولکولی پروتئین‌ها از مارکرهای پروتئینی استاندارد استفاده می‌شود.

آنالیز آماری نقاط با استفاده از نرم افزار Jump4  
استفاده شد و نقاط معنی دار در سطح ( $P \leq 0.05$ ) در  
صورتی که مقدار بیان آن ها حداقل یک و نیم برابر  
نسبت به شاهد تغییر داشت از روی ژل های  
رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو جدا و به کشور سوئد  
دانشگاه Upsala فرستاده شد.

نتایج و بحث

مقایسه وزن خشک ارقام

وزن خشک در هر دو رقم ۱۰ روز پس از اعمال تنفس  $100\text{mM}$  NaCl به ترتیب ۳۷ و ۲۴ درصد کاهش یافت که این نتایج بیانگر تفاوت شدت اثر تنفس بر دو رقم است (شکل ۱) که بر نقش توانمندی بیشتر و ژنتیکی رقم IR651 نسبت به رقم IR29 در محیط شاهد و اهمیت آن در حفظ عملکرد ماده خشک در محیط تنفس، تأکید ممکن است (شکل ۲).

د. اث تنش، ۱۰۰mM NaCl، جذب سدیم

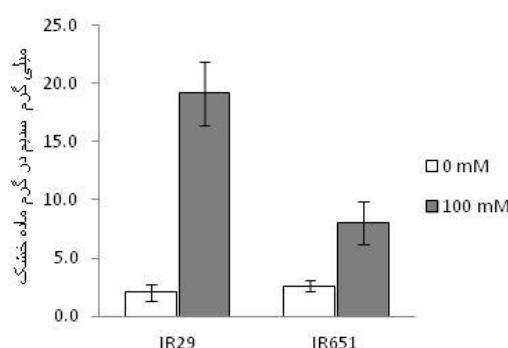
#### 4 Percent volume

مخصوص بازجذب<sup>۱</sup> ژل‌های نواری به مدت ۲۰ ساعت با این محلول تیمار و برای IEF<sup>۲</sup> به دستگاه Multiphor II منتقل شده و الکتروفوروز با برنامه ۳۰۰V (به مدت ۱ ساعت، ۵۰۰V) به مدت ۱ ساعت، ۳۵۰V (به مدت ۱ ساعت و ۳۵۰V) به مدت ۱۴ ساعت) در دمای ۲۰°C با برنامه‌ی (۳۰۰V) به مدت یک ساعت، ۵۰۰V به مدت یک ساعت، ۱۰۰۰V به مدت یک ساعت و ۳۵۰V (به مدت ۱۴ ساعت) انجام شد. پس از انجام IEF ژل‌های نواری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول متعادل‌کننده SDS (6 DTT, equilibration buffer) Murea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 1%w/v DTT, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8) قرار گرفته، پس از حذف بافر متعادل‌کننده مجدداً ۱۵ دقیقه دیگر در محلول متعادل‌کننده حاوی ایدواستاماید w/v 2.5% شناور شدند. پس از شستشو با بافر تانک در روی ژل‌های SDS-PAGE %۱۲ قرار داده شدند و از محلول آگارز w/v ۰/۰۰۵٪ جهت اتصال دو ژل استفاده گردید. سپس با استفاده از تانک الکتروفوروز عمودی PROTEIN II, Bio-Rad, با جریان ۲۰۰v بعد دوم انجام شد. با پایان یافتن بعد دوم ژل‌ها از روی شیشه جدا شده و حداقل به مدت یک ساعت در سینی‌های مخصوص رنگ‌آمیزی حاوی محلول ثابت‌کننده<sup>۳</sup> قرار داده شدند. ژل‌های آنالیتیک با استفاده از روش نیترات نقره و ژل‌های آماده‌سازی با استفاده از روش کوماسی‌بلو (Blum *et al.* 1987; Smith *et al.* 1995) رنگ‌آمیزی شدند.

## اکتساب تصاویر، آنالیز ژل‌ها و شناسایی نقاط MS با

---

1. Reswelling Trays
2. Isoelectric focusing
3. Fixator Solution



شکل ۴- میزان سدیم در برگ دو رقم حساس (IR29) و مقاوم (IR651)، در محیط کنترل و تنش شوری

علت متفاوت بودن میزان جذب سدیم در برگ این دو رقم در زمان اعمال تنش شوری می‌تواند ناشی از هموستازی بهتر یون سدیم در ریشه همچنین حذف سدیم در قسمت‌های پایین ساقه و عدم انتقال آن به اندام‌های هوایی در رقم متحمل است. با توجه به حساس‌بودن گیاه برنج به شوری تنوع زیادی در تحمل به این تنش در بین ارقام مختلف این گیاه مشاهده شده است که به احتمال زیاد به خاطر تفاوت نسبت K/Na بوده است. نسبت مولی پتانسیم به سدیم در برگ‌های IR651 ۲/۶۱ برابر این میزان در رقم IR29 است که قسمت اعظم این تفاوت ناشی از وجود مقادیر بیشتر سدیم در برگ‌های IR29 نسبت به IR651 می‌باشد. عدم انتقال سدیم از ریشه به اندام‌های هوایی نقش مهم‌تری در افزایش نسبت K/Na در برگ‌های IR651 نسبت به IR29 دارد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که رقم IR29 از پتانسیل پایین‌تری نسبت به رقم IR651 جهت مدیریت مقادیر سدیم ورودی برخوردار است.

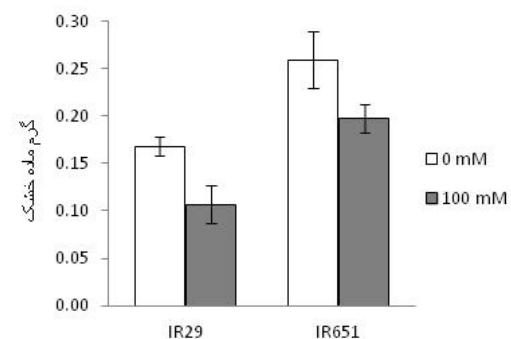
#### بررسی تغییرات الگوی پروتئوم ریشه و برگ تحت تنش

از تعداد ۴۶۸ نقطه آنالیز شده در ریشه که تکرار پذیر تشخیص داده شد، ۱۰۷ نقطه پروتئینی از نظر آماری در سطح ۵ درصد تغییر معنی‌داری در بیان خود (حداقل در یکی از ارقام) داشتند. ۵۰ نقطه در رقم IR29، ۳۸ نقطه در رقم IR651 و ۱۹ نقطه نیز

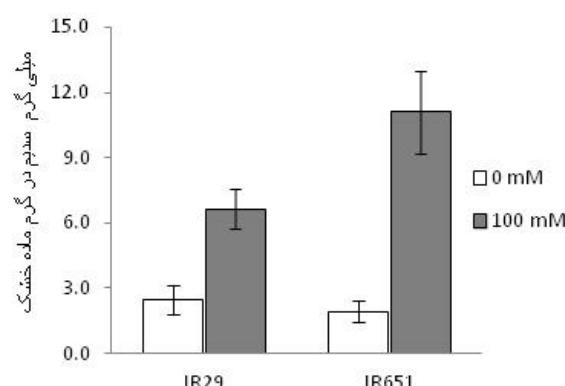
در ریشه رقم مقاوم ۵/۷۳ برابر و در رقم حساس ۲/۶۱ برابر، طی تیمار با ۱۰۰ mM NaCl با افزایش می‌باید (شکل ۳)، اما این روند افزایشی در برگ رقم IR29 پیشی می‌گیرد (شکل ۴)، بهطوری که میزان جذب سدیم در برگ سوم رقم حساس ۹/۲۱ برابر و در رقم مقاوم ۳/۰۹ برابر می‌شود.



شکل ۱- رقم حساس IR29 (سمت راست) و رقم متحمل IR651 (سمت چپ) تحت شرایط تنش شوری



شکل ۲- اثر تنش شوری بر میانگین عملکرد ماده‌ی خشک ارقام در دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl



شکل ۳- میزان سدیم ریشه در دو رقم حساس (IR29) و مقاوم (IR651) در دو سطح صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl

چهار نقطه روند مخالف و شش نقطه روند یکسانی در هر دو رقم در پاسخ به تنش داشتند. در برگ از بین پنج پروتئین ارسالی با استفاده از توالی یابی جزیی سه پروتئین به نام‌های فریتین (نقطه ۱۱۰)، روپیسکو اکتیواز (نقطه ۶۷) و آسکوربات پراکسیداز (نقطه ۷۳) شناسایی شدند (جدول ۱).

جایگاه پروتئین‌های شناسایی شده در روی ژل دوبعدی در شکل ۶ نشان داده شده است.

### پراکسیداز

نقطه ۲۴۵ در ریشه تحت عنوان پراکسیداز شناسایی شد که بیان آن در بین دو رقم تفاوت معنی‌داری نشان نداد، اما اثر تیمار در هر دو رقم در سطح یک درصد معنی‌دار شد (شکل ۵). پراکسیدازها آنزیمهای حاوی یون آهن هستند که پراکسیدهیدروژن را به عنوان پذیرندهی الکترون جهت تسريع تعدادی از واکنش‌های اکسیداتیو بکار می‌گيرند. همچنین در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن، در بیوستتر دیواره سلولی گیاهان با تسريع آخرین مرحله از سنتر لیگنین و سوبرین، نقش ایفا می‌کنند (Quiroga *et al.* 2000). شوری با تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب القاء فعالیت پراکسیداز می‌شود (Higa *et al.* 2001).

### فریتین

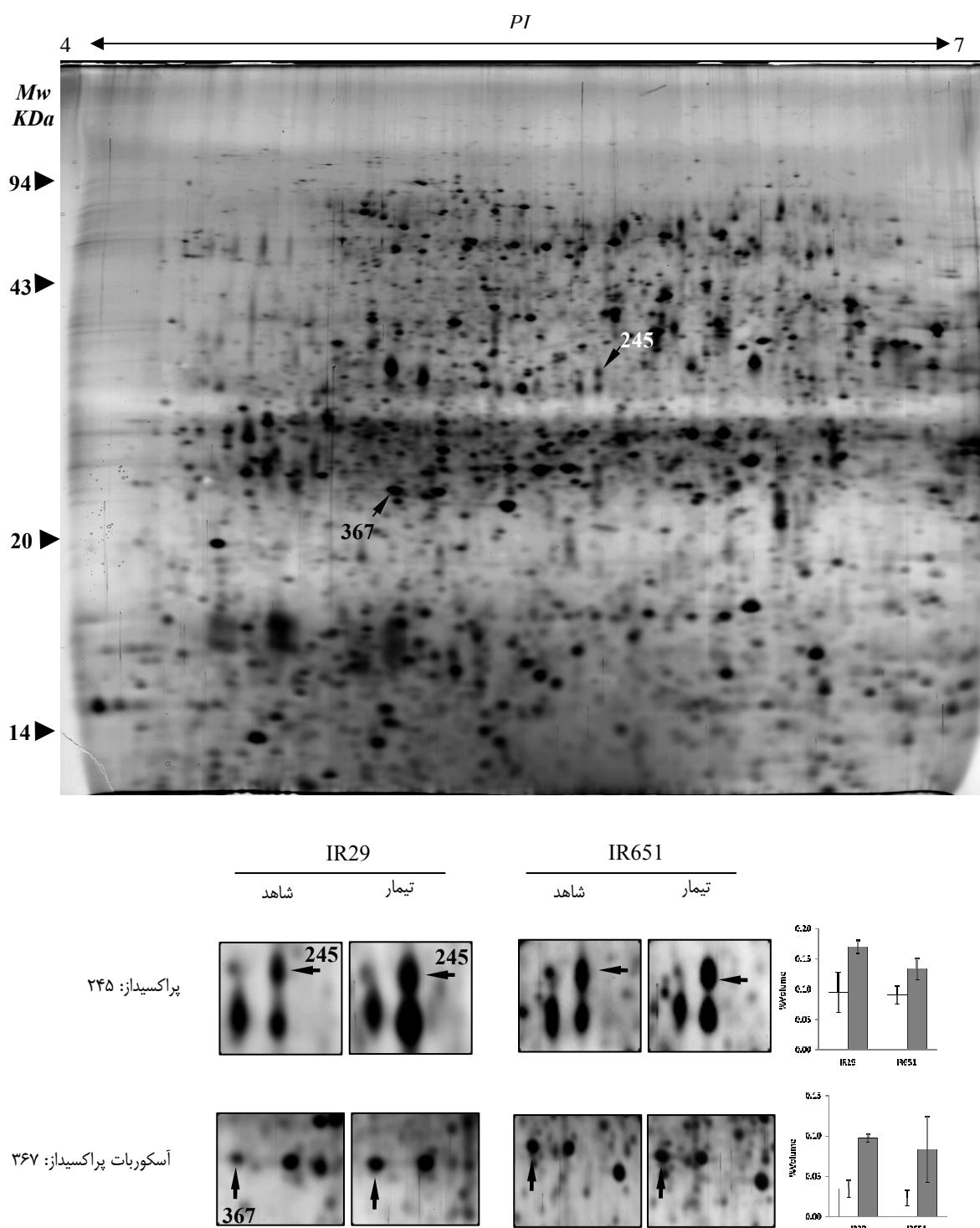
نقطه ۱۱۰ به عنوان پروتئین فریتین در برگ

به طور مشترک در هر دو رقم نسبت به تیمار اعمال شده پاسخ معنی‌دار نشان دادند. در بین پروتئین‌هایی که بیان آن‌ها طی تیمار با NaCl تغییر یافته بود به ترتیب ۲۹ و ۲۱ لکه در IR29 و ۸ و ۳۰ نقطه نیز در IR651 افزایش و کاهش معنی‌داری در شدت بیان خود نشان دادند. از بین نقاط پاسخ‌دهنده به تنش دو نقطه (نقطه ۲۴۵ و نقطه ۳۶۷) که بیشترین تغییر بیان را حداقل در یکی از دو رقم نشان می‌دادند از روی ژل‌های ریشه جدا و با استفاده از روش ESI-Q-TOF MS/MS این ۲ پروتئین با نام‌های پراکسیداز (نقطه‌ی شماره ۳۶۷) و آسکوربات پراکسیداز (نقطه شماره‌ی ۳۶۷) شناسایی شدند (شکل ۵).

در ژل‌های حاصل از برگ (شکل ۶) و با کمک نرم‌افزار ۳۴۵ نقطه تکرارپذیر مشخص شد. پس از آنالیز آماری نقاط ۸۶ نقطه تغییر معنی‌داری در بیان خود حداقل در یکی از ارقام نشان دادند که از این میان ۵۵ نقطه در رقم IR29، ۲۱ نقطه در رقم IR651 و ۱۰ نقطه نیز به طور مشترک در هر دو رقم IR29 و IR651 نسبت به تیمار اعمال شده پاسخ دادند. در رقم IR29 ۸۶٪ نقاط کاهش بیان و ۱۳٪ افزایش بیان نشان دادند. در حالی که در رقم IR651 ۸۴٪ نقاط افزایش بیان و ۱۶٪ نقاط کاهش بیان داشتند. در بین نقاطی که در هر دو ژنوتیپ پاسخ معنی‌دار نشان داده بودند،

جدول ۱- نتایج توالی یابی جزیی پروتئین‌های ریشه و برگ

Spot ID	Exp. Pi/Mw	Theo. Pi/Mw	Accession No. (Swiss prot)	Protein name	Partial sequence	Identity	Tissue
245	5.65/35	5.51/32	gi:50939971	Peroxidase	VALGGPSWTVLLLGR	14/14	Root
301	6.07/30	5.42/27	gi:50920595	Putative ascorbate peroxidase	TPAELSHAANAGLDIAVRAL	19/20	Root
67	4.38/30	5.85/47	gi:1778414	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	LVDSFPGQSIDFFGALR	17/17	Leaf
73	4.73/30	5.21/27	gi:75308965	L-ascorbate peroxidase	EGLLQLPSDK	10/10	Leaf
110	5.33/29	5.28/28	gi:75306633	Ferritin	EVLSGVVFQPFEELKPLT	17/19	Leaf

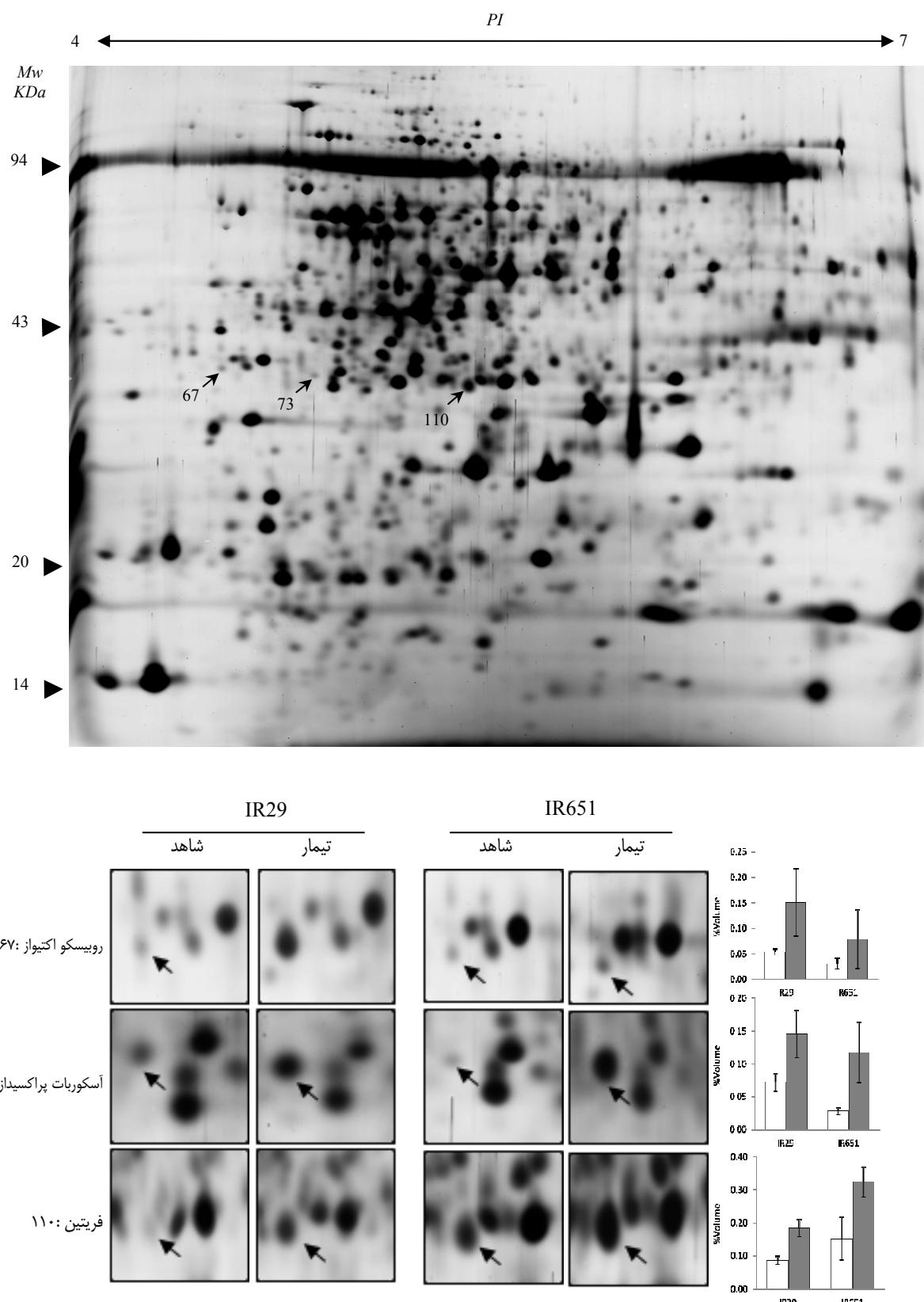


شکل ۵- تصویر ژل دوبعدی ریشه برنج و بزرگنمایی نقاط شناسایی شده. در بعد اول ۱۲۵ میکروگرم پروتئین از هر نمونه روی ژلهای نواری لود شد و برای بعد دوم از ژلهای ۱۲ درصد SDS-PAGE استفاده شد. رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره برای ظاهرسازی نقاط به کار رفت. نقاط اشاره‌شده مجموعه پروتئین‌های ریشه برنج را نشان می‌دهد که بیان آن‌ها در پاسخ به تنش شوری تغییر یافته است. نمودارهای مجاور هر پروتئین میزان بیان آن را در سطوح صفر میلی‌مولار (رنگ سفید) و ۱۰۰ میلی‌مولار (رنگ تیره) نشان می‌دهد.

## روبیسکو اکتیواز

نقاطه ۶۷ پس از انجام توالی‌یابی به عنوان روبیسکو اکتیواز شناسایی شد (شکل ۶)، در گیاهان آنزیم روبیسکو یا ریبولوزیس فسفات کربوکسیلاز نقش کلیدی در ثبیت کربن و فتوستتر دارد. تحقیقات نشان داده که آنزیم روبیسکو اکتیواز دارای نقش چپرونی است و در پروسه‌ی فتوستتر نقش مهمی دارد. وظیفه اصلی روبیسکو اکتیواز فعال کردن و تنظیم روبیسکو است. این مسئله برای روبیسکو ضروری است زیرا تنها این فرم روبیسکو (روبیسکو اکتیواز) در فتوستتر نقش فعال دارد. اگر سلول‌های گیاه از روبیسکوی غیرفعال بیش از فرم فعال آن برخوردار باشند، سرعت فتوستتر کاهش می‌باید. تبدیل فرم غیرفعال روبیسکو به فرم فعال آن که برای هر دو واکنش کربامیلاسیون و اکسیژن‌ناسیون لازم است، نیازمند کربامیلاسیون واحد لیزین خاصی بر روی این آنزیم می‌باشد. وظیفه روبیسکو اکتیواز جدانمودن قند بیس فسفات از سایت غیرکربامیدی روبیسکو و فراهم‌کردن زمینه برای کربامیلاسیون آنزیم و کربوکسیلاسیون بیس فسفات می‌باشد (Craft-Brandner and Salvucci. 2000). این آنزیم در مقایسه با روبیسکو به دمای بالا و افزایش  $\text{CO}_2$  حساس‌تر بوده و سریع‌تر غیرفعال غلظت آبزیانه‌های مقاوم این می‌شود. تحقیقات برای یافتن آبزیانه‌های مقاوم این آنزیم در منابع گوناگون برای افزایش پتانسیل فتوستتر گیاه و افزایش تحمل آن به تنفس گرما ادامه دارد. در مطالعات دیگر نیز دو فرم از آنزیم روبیسکو اکتیواز در دو رقم برجسته که تحت تنفس شوری افزایش بیان بیشتری داشته‌اند گزارش شده است (Salekdeh et al. 2002). در این تحقیق بیان این پروتئین در هر دو رقم به هنگام تنفس افزایش نشان داد. اما این میزان تنفس در رقم حساس معنی‌دار بود (شکل ۶) که خود می‌تواند ناشی از تاثیر بیشتر استرس بر رقم حساس و نیاز بیشتر این رقم در جبران فرم فعال آنزیم از دست‌رفته باشد.

شناسایی شد (شکل ۶). فریتین پروتئین ذخیره‌ای آهن است که در تمام یوکاریوت‌ها وجود دارد و از ۲۴ زیر واحد تشکیل شده است (Sickmann *et al.* 2003). در گیاهان این پروتئین توسط هسته کد شده و به پلاستیدها منتقل می‌شود. اهمیت بیولوژیکی این عنصر در ثابت نگهداشت غلظت مورد نیاز آهن (تقریباً  $M^{-7}$ ) در سلول است. آهن یکی از عناصر اصلی انتقال الکترون در سیستم‌های بیولوژیکی است و برای حیات ضروری می‌باشد. حالیت کم این عنصر و رسوب آن در pH فیزیولوژیک موجب شده این عنصر به راحتی قابل دسترس سلول نباشد. علاوه بر این آهن آزاد به دلیل داشتن دو سطح پتانسیل ردکس مختلف با شرکت در واکنش فتوتون موجب احیاء اکسیژن و تولید گونه‌های فعال آن می‌شود. بنابراین هموستازی آهن در سلول بایستی به دقت کنترل شود. فریتین با توانایی ذخیره ۴۵۰۰ اتم آهن در هر مولکول خود نقش ارزشمندی در هموستازی این عنصر در سلول دارد (Harrison and Arosio. 1996) مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند در تنظیم بیان ژن فریتین نقش فعال داشته باشند (Lobreaux *et al.* 1995). مطالعات مختلفی که به منظور بررسی اثرات بیان بیشتر فریتین در سیتوپلاسم و یا پلاستیدها در گیاهان تاریخت صورت گرفته است بیانگر افزایش توان گیاه به هنگام مواجه با تنفس‌ها است. توتون تاریخت با ژن فریتین که سطح بیشتری از فریتین را در خود بیان می‌نمود، نسبت به تنفس سرما مقاومت بیشتری نشان داد (Hegeduse. 2002). با توجه به نقش غیرمستقیم این پروتئین در کاهش میزان رادیکال‌های اکسیژن از طریق حذف سوبسترای واکنش فتوتون و نقش مستقیم آن در هموستازی آهن، افزایش بیان این پروتئین را می‌توان یکی از علل مقاومت به تنفس در رقم متتحمل در این مطالعه به حساب آورد.



شکل ۶- تصویر ژل دوبعدی برگ برنج و بزرگنمایی نقاط

## نتیجه‌گیری

تاکنون روش‌های اصلاحی برای صفت تحمل به شوری به دلایل مختلف از جمله پیچیدگی و تنوع سازوکارهای پاسخ‌دهنده به تنش مفید نبوده است. پروتئومیکس با دارابودن توانایی کشف پروتئین و ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش از پتانسیل مطلوبی جهت استفاده در فرآیند اصلاح برای تنش‌ها بهویژه تنش شوری برخوردار است. بررسی و مقایسه روند پروتئین‌های رقم حساس و مقاوم در برگ نشان می‌دهد که در رقم حساس پروتئین‌های بیشتری به هنگام تنش تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در این مطالعه تنها سازوکار متفاوت بین دو رقم بیان بیشتر پروتئین فربیتین در رقم متحمل نسبت به رقم حساس است که می‌تواند یکی از چندین سازوکار ممکن تحمل به تنش شوری در رقم متحمل نسبت به رقم حساس باشد. بدون شک سازوکارهای متفاوت و متعددی (حداقل در سطح مولکولی) بین دو رقم وجود دارد که موجب مقاومت بیشتر رقم IR651 در مقایسه با رقم IR29 نسبت به تنش شوری می‌شود. توجه به این نکته ضروری است که بررسی جامع سازوکارهای مقاومت به تنش از طریق تلفیق روش‌های مختلف ژنومیکس کاربردی نظریه ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس با مطالعه فیزیولوژی گیاه و تنش‌ها و نیز بیوشیمی متابولیت‌ها امکان‌پذیر خواهد بود و بدین ترتیب است که فرآیند پیچیده نحوی مقابله گیاهان با تنش‌ها روش خواهد شد.

## سپاسگزاری

این مقاله بخشی از اطلاعات طرح پژوهشی به شماره مصوب: ۱۴۰۰۰-۰۳-۸۴۰۱-۸۴۰۱-۱۰۱۳-۱۴۰۰۰۰ است که با حمایت مالی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام گردیده است. از تمامی عزیزانی که نگارندگان مقاله را در انجام این امر یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## آسکوربات پراکسیداز

اسید آسکوربیک آنتی‌اکسیدانی قوی بوده که در تنظیم رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل ( $\text{OH}^-$ ) و اکسیژن منفرد<sup>۱</sup> بسیار مؤثر است. آسکوربات پراکسیدازها (APX) مهم‌ترین و مؤثرترین آنزیم‌های درگیر در فرایند حذف پراکسیدهیدروژن در کلروپلاست و سیتوسول سلول‌های گیاهی می‌باشند و به صورت ایزوآنزیم‌های مختلف<sup>۲</sup> یافت می‌شوند. این ایزوژایم‌ها از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون برای احیاء پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کند.

ایزوآنزیم‌های APX در اجزای مختلف سلول مانند استروم، غشای تیلاکوئیدی، کلروپلاست‌ها، غشای اندامک‌ها، سیتوسول و غشای میتوکندریایی وجود دارند و در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند (Shigeoka, 2001). در این مطالعه این پروتئین به صورت دو ایزوفرم مختلف در برگ ( نقطه ۷۳ ) و در ریشه ( نقطه ۳۰۱ ) مشاهده شدند (شکل ۵ و ۶). میزان بیان این پروتئین در هر دو بافت ریشه و برگ در هر دو رقم به هنگام تنش افزایش معنی‌داری از خود نشان داد. آیزوژایم‌های APX بهوسیله سازوکارهای تنظیمی مجزا در پاسخ به تنش‌های محیطی متفاوت با شرایط سلولی تنظیم می‌شوند تا از هر اندامکی محافظت کنند و صدمه به بافت را به حداقل برسانند. پراکسیدهیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) یکی از این تنظیم‌کننده‌ها است که به عنوان یک پیامبر ثانویه جهت تنظیم بیان ژن برای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های گیاهی عمل می‌کند. به همین دلیل معمولاً فعالیت APX به طور جالبی همراه با دیگر آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، سوپراکسیداز دسموتاز و GSH ردکتاز در پاسخ به فاکتورهای مختلف تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود (Mano, 1997).

1. Singlet oxygen

2. Isoenzymes

## REFERENCES

- Blum H, Beier H, Bremer E (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93-99.
- Concept paper, the international Year of rice, Food and agricultural organization of the united nation. At <http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/concept.pdf>
- Craft-Brandner SI, Salvucci ME (2000) Rubisco activase concentrations the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. *PNAS*. 97: 13430-13435.
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986) The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. 7: 52-54.
- Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochem. Biophys. Acta*. 1275: 161-203.
- Hegeduse A, Erde S, Janda T, Szalai J, Dubits D, Horrath G (2002) Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. *Acta Biol. Szeged*. 46: 97-98.
- Higa A, Hidaka T, Minai Y, Matsuka Y, Haga M (2001) Active oxygen radicals induce peroxidase activity in rice blade tissues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1852-1855.
- Lobreaux S, Thoiron S, Briat JI (1995) Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *Plant. Jour.* 8: 443-449.
- Mano S, Ymaguchi K, Hayashi M, Nishimura M (1997) Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Letters*. 413: 21-26.
- Quiroga M, Guerro C, Botell MA, Brracello A, Amoya I, Medina MI, Alonso FJ, Forchetti SL, Tigier H, Valpuesta R (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122: 1119-1127.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennet J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*. 2: 1131-1145.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2001) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoforms. *Jur. Exp. Bot.* 53: 1305-1319.
- Sickmann A, Rienders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schöfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *PNAS*. 23: 13207-13212.
- Smith DM, Tran HM, Epstein LB (1995) Two-dimensional electro-... (Balkwill, F. R., ed.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, pp 111-128.
- Takashi I, Shimamoto K (1996) Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. *Trends in Plant, Science*. 1: 95-99.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Los Báos, Filipinas.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends. Plant. Sci.* 6: 66-71.
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 247-27.

## Proteomic Analysis of Root and Leaf in Rice under Salinity Stress

**GH. HOSSEINI SALKDEH<sup>1\*</sup> AND D. NASRABADI<sup>2</sup>**

**1, Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural  
Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran**

**2, M. Sc. Student, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran**

**(Received: Nov. 17, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)**

### ABSTRACT

Rice is currently the main staple food for more than 2 billion people in Asia, Africa and Latin America. It is also an excellent model cereal for molecular biology and genetics research. Salinity is a major factor limiting rice production worldwide. The analysis of stress-responsiveness in plants is an important route to the discovery of genes conferring stress tolerance which could be then used in breeding programs. To further understand the mechanism of plant response to salinity, we employed a proteomic approach to profile the protein changes of the third leaf of rice and root under salt stress. Plants were grown in Yoshida nutrient solution and salt was stress imposed after 25 days. Plants were treated by 100 mM NaCl for 10 Days. After that, third leaves and total root were collected from the control and salt stressed plants. The Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content of the leaves/roots and several yield components changed significantly in response to short-term salt stress and their proteome patterns were analyzed using 2-DE in triplicates. The expression pattern of proteins changed in all the leaves/roots in response to stress considerably. More than 488 and 345 proteins were detected repeatedly in the 2Dgels for root and leaf, respectively. 107 proteins in the root and 86 proteins in the leaf of two genotypes showed significant response to stress. Three proteins in leaf gels and 2 proteins in root gels were selected and identified by ESI-Q-TOF. The most important ones included ferritin, rubisco activase and ascorbat peroxidase in leaf and peroxidase and ascorbat peroxidase in root. All of those were enzymes and involved in detoxification and removal of reactive oxygen species (peroxidase, ascorbat peroxidase), iron homeostasis (ferritin) or were involved in the activation of other enzymes (rubisco activase).

**Keywords:** Rice, *Oryza sativa*, Salinity, Proteomics, 2D, Oxidative stress

---

\* Corresponding author: GH. Hosseini Salekdeh

E-mail: hsalekdeh@yahoo.com