

مطالعه پاسخ پروتئینی ریشه آفتابگردان به تنش خشکی با رهیافت پروتئومیکس

مهدی غفاری^{۱*}، سعادت شریفی^۲، غلامرضا بخشی خانیکی^۳

۱. استادیار، موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

۳. استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۱)

The study of protein response of sunflower root to drought stress using proteomics approach

Mehdi Ghaffari^{1*}, Saadat Sharifi², Gholamreza Bakhshi Khaniki³

1. Assistant Professor Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. Former M.Sc. of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

3. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Dec. 29, 2017 - Accepted: Sep. 23, 2018)

Abstract

In order to understand of the molecular mechanisms of drought tolerance in sunflower, proteomic pattern of roots in two drought sensitive and drought-tolerant lines were evaluated under limited and favorable water conditions. After 2DE and comparison of relative abundance of protein spots using t test, 12 of 417 protein spots in sensitive and 17 of 467 in tolerant line were affected by drought stress significantly. Following nano-LC MS/MS the protein spots were identified using Mascot search engine in NCBI protein database considering more than 10 % sequence coverage and score of above 80. Cytoplasmic and nuclear proteins were the most proteins which were affected by water deficiency. Three protein spots i.e. Enolase, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and Chalcone synthase were expressed differentially in these lines. Reduction of Enolase as a sign of metabolic impairment could be resulted in downstream process under drought stress. Increased expression of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and Chalcone synthase could have a role in detoxification/removal of oxidative destruction and antioxidant capability of the tolerant line. Increased level of heat shock protein, dihydroflavonol reductase, Seed linoleate 9S-lipoxygenase, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase and G protein indicated crucial role of defensive, protective and transductive process in reduction of drought injuries.

Keywords: Two Dimensional Electrophoresis. Enolase, Heat Shock Protein, Mass Spectrophotometry.

چکیده

برای درک مکانیسم مولکولی تحمل به خشکی در ارتباط با ریشه آفتابگردان، الگوی پروتئوم ریشه دو لاین حساس و متحمل به خشکی در شرایط آبیاری محدود و مطلوب بررسی شد. با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و مقایسه شدت نسبی لکه‌ها با آزمون t تعداد ۱۲ لکه از ۴۱۷ لکه پروتئینی در لاین حساس و ۱۷ لکه از ۴۶۷ لکه پروتئینی در لاین متحمل به طور معنی‌داری از تنش خشکی متأثر شد. لکه‌های پروتئینی با استفاده از طیف‌سنجی جرمی nano-LC MS/MS توسط جستجوگر مسکات با در نظر گرفتن حداقل ۱۰٪ همپوشانی و امتیاز بالاتر از ۸۰ در پایگاه NCBI شناسایی شدند. پروتئین‌های سیتوپلاسمی و هسته‌ای به ترتیب بیش از سایر پروتئین‌ها از محدودیت آب متأثر شدند. سه لکه پروتئینی انولاز، گلیسرآلدئید تری فسفات دهیدروژناز و چالکون سینتاز با بیان متمایز در هر دو لاین حساس و متحمل شناسایی شد. کاهش شدت نسبی انولاز در لاین متحمل دلالت بر آسیب متابولیکی بود که می‌تواند منجر به کاهش فرایندهای پایین دست در اثر محدودیت ناشی از خشکی باشد. در مقابل افزایش شدت نسبی گلیسرآلدئید تری فسفات دهیدروژناز و چالکون سینتاز در لاین متحمل نشان‌دهنده توانایی این لاین در سمیت‌زدایی/ترمیم آسیب‌های ناشی از تخریب اکسیداتیو و دفاع ضد اکسیداتیو در شرایط تنش بود. افزایش شدت نسبی پروتئین شوک-دمایی، دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز، لیپواکسیژناز لینولئات‌دانه، یوبیکوئیتین کربوکسیل‌ترمینال هیدرولاز و جی پروتئین در لاین متحمل نشان‌دهنده اهمیت فرایندهای دفاعی، حفاظتی و ترانسدکشنی برای کاهش آسیب‌های ناشی از خشکی است.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز دو بعدی، انولاز، پروتئین شوک دمایی، طیف‌سنجی جرمی.

مقدمه

خشکی اصلی‌ترین تنش غیرزیستی در یک سوم اراضی دنیا و یک چهارم اراضی قابل آبیاری است (Singh, 2015). با پدیده گرم شدن کره زمین اثرات خشکی در آینده بیشتر نیز خواهد شد. پیش بینی شده است تا سال ۲۰۵۰ خشکی به همراه شوری در بیش از ۵۰٪ اراضی زراعی دنیا عامل اصلی محدودکننده تولیدات کشاورزی خواهد شد (Ashraf and Wu, 1994). در سال‌های اخیر از پروتئومیکس برای بررسی بیان متمایز پروتئین‌ها در شرایط تنش خشکی استفاده شده است. تغییرات پروتئوم ذرت در شرایط تنش خشکی در جهت القای آنزیم‌های مرتبط با مسیرهای متابولیکی پایه نظیر گلیکولیز و چرخه کربس گزارش شده است (Riccardi et al., 1998). در یک بررسی توسط Bhushan و همکاران (۲۰۰۷) از پروتئومیکس برای شناسایی پروتئین‌های متأثر از خشکی در نخود استفاده شده و اعلام شد که تغییر دیواره سلولی، ترانسسانی علامتی، متابولیسم، دفاع و نجات سلول در تحمل خشکی نخود دخالت دارند. بر اساس نتایج Hajheidari و همکاران (۲۰۰۷) تنش خشکی باعث افزایش تشکیل گلیادین‌ها در ژنوتیپ متحمل گندم می‌شود. با بررسی تغییرات پروتئوم گندم مشخص شد که در شرایط تنش خشکی بیشتر پروتئین‌های شناسایی شده مرتبط با گلیکولیز و گلوکونوژنسیز هستند (Caruso et al., 2009). همچنین مشخص شده است که بسته‌شدن روزنه و کاهش فعالیت فتوسنتزی نقش تنظیمی در به حداقل رساندن تلفات آبی و جلوگیری از آسیب سلولی دارد (Kottapalli et al., 2009).

بررسی‌های چندی در ارتباط با تغییر پروتئین‌های آفتابگردان در اثر تنش‌های مختلف صورت گرفته است. با اعمال تنش اسمزی کاهش پروتئین‌های محلول و فعالیت نترات ردوکتاز در برگ آفتابگردان گزارش شده است (Tankha et al., 1992). کاهش سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به دنبال تنش خشکی در آفتابگردان گزارش شده است (Quartacci and Navari-Izzo, 2002).

افزایش سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز^۱ و دهیدروآسکوربات ردوکتاز^۲ و کاهش مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز^۳ در پاسخ به تنش خشکی در آفتابگردان گزارش شده است (Zhang and Kirkham, 1996a). در بررسی دیگر افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز کلروپلاستی و دهیدروآسکوربات ردوکتاز و کاتالاز سیتوسولی و کاهش پراکسیداز سیتوسولی برگ آفتابگردان در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Zhang and Kirkham, 1996b). در زمینه پاسخ پروتئوم آفتابگردان به تنش خشکی بررسی‌های محدودی صورت گرفته است. در یک بررسی توسط Castillejo و همکاران (۲۰۰۸) پروتئوم برگ دو لاین حساس و متحمل به خشکی آفتابگردان در مرحله گیاهچه‌ای بررسی و ۲۸ پروتئین با بیان متمایز در لاین حساس و ۸ پروتئین در لاین متحمل شناسایی شد. پروتئین‌های شناسایی شده به فرایندهای فتوسنتز، چرخه‌های گلیکولیز-گلوکونوژنسیز^۴ و گلی‌اکسیلات^۵ و آنزیم‌های مربوط به واکنش‌های اکسیداسیون- احیا ارتباط داده شد. در بررسی مکانیسم سازگاری به خشکی در رقم پردویک آفتابگردان توسط Fulda و همکاران (۲۰۱۱) القای دو برابر برخی پروتئین‌ها از جمله کافتوئیل-کو آ^۳-او-متیل ترانسفراز، فروکتوکیناز و Cu/Zn سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان تنش دیده گزارش شده است.

بررسی تغییرات پروتئوم ریشه با اهداف متفاوت در گیاهان مختلف صورت گرفته است. با بررسی تغییرات پروتئومیکس ریشه سویا در شرایط غرقابی نقش منفی گلیکوزیلاسیون پروتئین در تجزیه پروتئین گزارش شده است (Mostafa and Komatsu, 2014). تغییرات پروتئومیکس ریشه به منظور بررسی مکانیسم عمل

1. Glutathione reductase
2. Dehydroascorbate reductase
3. Monodehydroascorbate reductase
4. Gluconeogenesis
5. Glyoxylate

نقش احتمالی آنها در تحمل خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذر دو لاین جدید متحمل (RGK46) و حساس (BGK221) آفتابگردان در دو شرایط آبیاری محدود و مطلوب هر کدام در سه تکرار در لوله‌های PVC کشت شد. تنش خشکی از طریق قطع آبیاری از مرحله ستاره‌ای تا پایان گلدهی در مراحل R1-R6 (Schniter and Miller, 1981) اعمال شد. در پایان دوره اعمال تنش خشکی نمونه‌های ریشه از دو لاین متحمل و حساس در دو شرایط آبیاری محدود و مطلوب جمع‌آوری و پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش رسوب با TCA-استن (Ghaffari *et al.*, 2013) استخراج شد. بعد از استخراج پروتئین‌های ریشه، مقدار پروتئین به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. به منظور تفکیک پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک در بعد اول از ژل‌های IPG به طول ۱۱ سانتی متر و pH ۵-۸ استفاده شد. سپس در بعد دوم پروتئین‌ها بر اساس جرم مولکولی از طریق SDS-PAGE تفکیک شدند. رنگ‌آمیزی ژل با محلول رنگی کوماسی بریلینت بلو حاوی ۳۵٪ متانول و ۱۰٪ اسید استیک در مدت یک ساعت صورت گرفت. تصاویر ژل خشک شده 2-DE توسط دانسیومتر کالیبره شده (GS-800 (Bio-Rad) تهیه شد. برای بررسی تغییرات کمی و کیفی لکه‌ها از نرم‌افزار PDQuest (Bio-Rad) (نسخه ۸) استفاده شد. در این راستا، برای مقایسه تغییرات بیان پروتئین در شرایط آبیاری مطلوب و محدود بعد از نرمال کردن حجم لکه‌های پروتئینی با استفاده از رگرسیون موضعی کمیت هر لکه تعیین شد. از آزمون t استیودنت برای مقایسه تغییر حجم لکه‌ها در دو شرایط آبیاری مطلوب و محدود استفاده شد و

علفکش‌های انتخابی در گیاه مدل آراییدوپسیس مورد استفاده قرار گرفته و چندین مسیر جدید که به عنوان هدف برای علفکش ایمازتاپیر یافت شده است (Qian *et al.*, 2015). تغییرات پروتئومیکس ریشه تربچه و ارتباط آن با پاسخ به تنش شوری توسط Xiaochuan و همکاران (۲۰۱۷) مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی در زمینه پروتئومیکس ریشه آفتابگردان محدود بوده است. در بررسی Ghaffari و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی الگوی پروتئوم ریشه لاین‌های حساس (RGK21) و متحمل (BGK329) به خشکی آفتابگردان پروتئین‌های مرتبط با انرژی و بیماری/دفاع در لاین حساس کاهش ولی در لاین متحمل افزایش یافت. نتایج آنها نشان داد که تغییر در مصرف انرژی، انتقال آب و مقابله با اشکال فعال اکسیژن نقش مهمی در تحمل خشکی آفتابگردان دارد. با بررسی تغییرات پروتئوم برگ این دو لاین در شرایط تنش خشکی ضمن مشاهده تغییرات اختصاصی لاین‌ها مشخص شد تغییرات پروتئین‌های درگیر در حفظ یکپارچگی سلول به دلیل حفظ ذخیره رطوبتی، متابولیسم انرژی و دفاع ضد اکسیدان از مهمترین عوامل ایجاد سازگاری و تحمل به خشکی آفتابگردان هستند (Ghaffari *et al.*, 2017).

با توجه به مشاهده پاسخ اختصاصی ژنوتیپ‌ها در بررسی‌های قبل بررسی تغییرات پروتئوم ریشه و برگ گروهی از لاین‌های متحمل در مقابل گروهی از لاین‌های حساس می‌تواند در کنار پاسخ اختصاصی، جنبه‌های عمومی از مکانیسم تحمل به خشکی آفتابگردان را مشخص کند. با توجه به نقش کلیدی پروتئین‌ها به عنوان فراورده نهایی تظاهر ژنوتیپی در شرایط مختلف، به منظور فراهم آوردن اطلاعاتی در مورد پاسخ عمومی پروتئین‌های ریشه در تحمل به خشکی آفتابگردان در این بررسی الگوی پروتئوم ریشه دو لاین جدید حساس و متحمل به خشکی در دو شرایط مطلوب و تنش خشکی مورد مقایسه قرار گرفته و ضمن شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به خشکی

WOLFPSORT (<http://wolfsort.org>) استفاده شد. برای گروه‌بندی پروتئین‌های شناسایی شده از نظر عملکرد از روش طبقه‌بندی Bevan و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از الکتروفورز دو بعدی ۴۶۷ لکه در لاین متحمل و ۴۱۷ لکه در لاین حساس به طور تکرار پذیر ظاهر شدند. از بین این پروتئین‌ها در لاین متحمل ۱۷ لکه (۱۴ لکه افزایش و ۳ لکه کاهش) و در لاین حساس ۱۲ لکه (۸ لکه افزایش و ۴ لکه کاهش) به‌طور معنی‌داری از تنش خشکی متأثر شدند (شکل ۱). در هر دو لاین حساس و متحمل برآیند اصلی تغییرات در جهت افزایش بیان پروتئین می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳). به‌طوری‌که در لاین متحمل ۸۳٪ و در لاین حساس ۶۳٪ لکه‌ها افزایش شدت نسبی نشان داد. لکه‌های شماره ۹۰۴ و ۸۱۱ بیشترین میزان افزایش شدت نسبی را به ترتیب در دو لاین متحمل و حساس داشتند. لکه‌های تغییر یافته در اثر تنش خشکی با استفاده از طیف سنج جرمی پیاپی شناسایی و مشخصات آنها در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج حاصل، برخی پروتئین‌ها مانند انولاز، گلیسرآلدئید تری فسفات دهیدروژناز، چالکون سینتاز و جی پروتئین در بیش از یک لکه شناسایی شدند (جدول‌های ۱ و ۲). موارد مشابهی توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Caruso et al., 2009; Wang et al., 2008; Gao et al., 2011). این امر می‌تواند ناشی از ویژگی‌های مهم پروتئین‌ها از جمله وجود ایزوفرم‌های پروتئین یا تغییرات پس از ترجمه‌ای از قبیل گلیکوزیلاسیون و فسفوریلاسیون ناشی شده باشد که در اثر آن وزن مولکولی یا نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها تغییر می‌یابد (Caruso et al., 2009).

بر اساس نتایج حاصل سه لکه پروتئینی در هر دو لاین حساس و متحمل شناسایی شدند با این حال

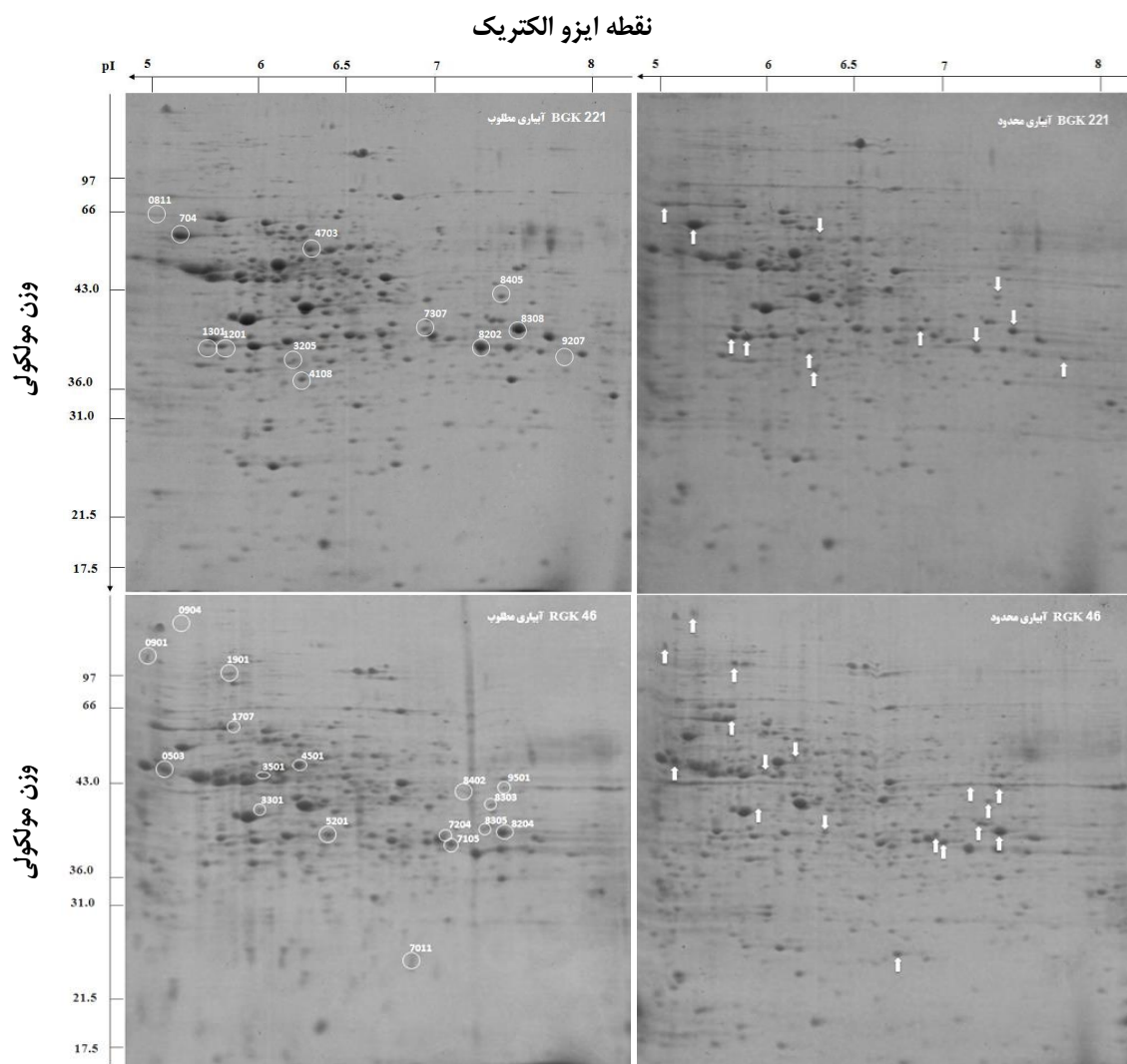
لکه‌هایی که در سطح ۵٪ تغییر بیان معنی‌دار داشتند برای انگشت‌نگاری جرمی انتخاب شدند.

لکه‌های پروتئینی با تغییر معنی‌دار بعد از برش، با آنزیم تریپسین هضم و سپس نمک‌زدایی شده و برای تجزیه با طیف سنج nano LC-MS/MS مورد استفاده قرار گرفت. به منظور شناسایی پروتئین‌ها از تجهیزات نانواسپری Orbitrap MS (LTQ XL Thermo Fisher Science, San Jose, CA, USA) مجهز به نرم‌افزار XCalibur با روش هدف‌یابی وابسته به داده استفاده شد. پپتیدها در اسیدفرمیک ۱٪ با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع به ستون‌های C18 PepMap به طول ۵ میلی‌متر و قطر داخلی ۳۰۰ میکرومتر به عنوان ستون‌های تله انداز پروتئین بار شدند و بعد از شستشو در اسید فرمیک ۱٪ در استونیتریل با سرعت جریان ۲۰۰ نانولیت در دقیقه در یک ستون کاپیلاری نانو به قطر داخلی ۷۵ میکرومتر و طول ۱۲ سانتی‌متر با ولتاژ ۱/۸ کیلو ولت اسپری شدند. طیف جرمی کامل با درجه تبیین ۱۵۰۰۰ در Orbitrap با دامنه m/z ۱۵۰-۲۰۰۰ حاصل شد. فراوان‌ترین سه یون غالب با حداقل آستانه بار/جرم ۱۰۰۰ برای تفکیک القایی با تصادم و مد خطی تله یونی با انرژی تصادم ۳۵٪ انتخاب شد. طیف MS/MS حاصل با استفاده از نرم‌افزار BioWorks نسخه ۳/۳/۱ (Thermo Fisher Science) به فایل‌های dta و سپس mgf تبدیل شد. لکه‌های پروتئینی با استفاده از طیف‌سنجی جرمی nano-LC MS/MS توسط جستجوگر مسکات^۵ با در نظر گرفتن حداقل ۱۰٪ همپوشانی و امتیاز بالاتر از ۸۰ در پایگاه NCBI شناسایی شدند. برای طبقه‌بندی پروتئین‌ها از نظر مکان سلولی از موتور جستجوگر

1. Nanospray
2. Data-dependent acquisition mode
3. Collision-induced fragmentation
4. Linear ion trap
5. Mascot

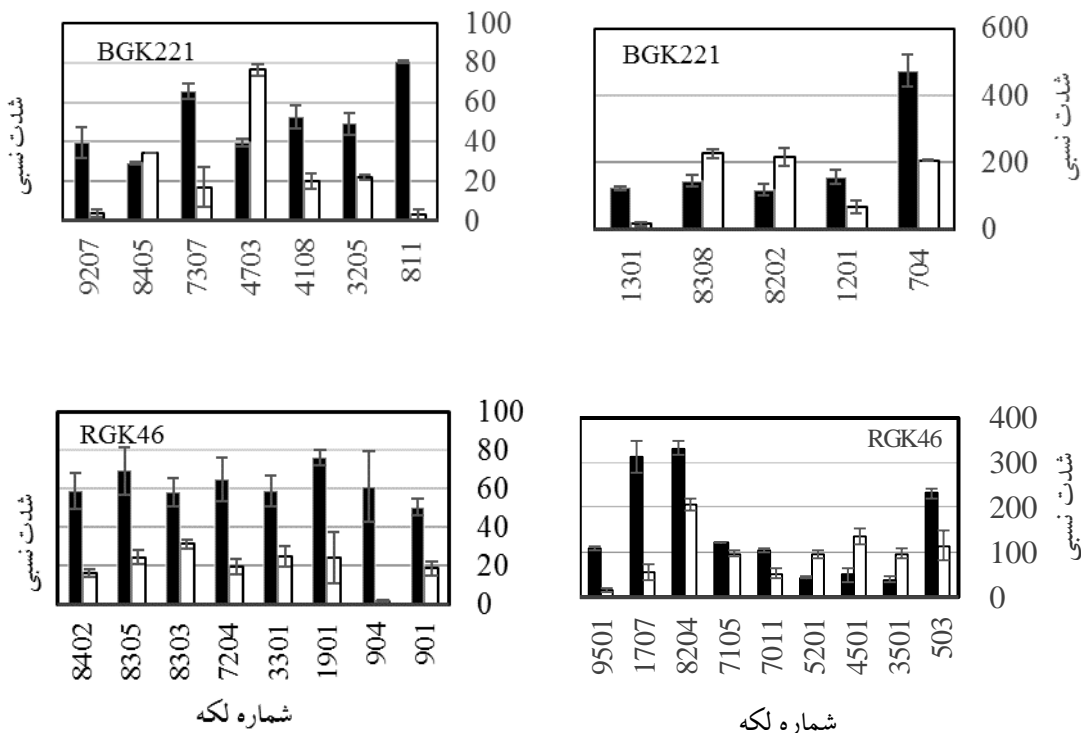
ذرت نیز گزارش شده است (Riccardi *et al.*, 1998). شدت نسبی بالای این آنزیم در لاین برخوردار از درصد روغن بالای آفتابگردان توسط Hajdуч و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش شده است. کاهش شدت نسبی انولاز در لاین متحمل نشانه‌ای از آسیب متابولیکی در این لاین بوده و می‌تواند منجر به کاهش فرایندهای پایین دست و در نتیجه صرفه‌جویی در مصرف انرژی منجر شود. این تفاوت ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های مختلف در سطح پروتئوم می‌تواند از تفاوت ژنتیکی آنها در نحوه سازگاری به شرایط تنش خشکی باشد.

شدت نسبی آنها در دو لاین متمایز بود. در شرایط تنش فرم سیتوپلاسمی انولاز در لاین حساس (لکه شماره ۷۰۴) افزایش و در لاین متحمل (لکه‌های شماره ۳۵۰۱ و ۴۵۰۱) کاهش یافت. پروتئین‌هایی مانند انولاز نقش عمده‌ای در کنترل مسیرهای کلیدی متابولیسم انرژی مانند گلیکولیز دارند. انولاز آنزیم کلیدی گلیکولیتیک است که تبدیل ۲-فسفوگلیسرات را به فسفوانول پیرووات کاتالیز می‌کند و از تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری، خشکی و سرما متأثر می‌شود (Riccardi *et al.*, 1998). افزایش انولاز در اثر تنش خشکی در دو لاین اینبرد حساس و متحمل



شکل ۱. الگوی پروتئوم لاین حساس (BGK221) و متحمل (RGK46) آفتابگردان در شرایط آبیاری مطلوب و محدود. دایره‌های توخالی موقعیت هر لکه در شرایط آبیاری مطلوب و فلش‌ها جهت تغییرات آنها در شرایط آبیاری محدود را نشان

می‌دهند. وزن مولکولی و PI (نقطه ایزوالکتریک) بر اساس پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) نشان داده شده است.



شکل ۲. تغییر شدت نسبی پروتئین‌ها در لاین حساس (BGK221) و لاین متحمل (RGK46) آفتابگردان در اثر تنش خشکی. ستون‌های سفید و سیاه به ترتیب شدت پروتئین‌های مربوطه در شرایط آبیاری مطلوب و محدود را نشان می‌دهد. از میانگین حجم لکه در سه تکرار استفاده شده و خطای معیار ± 1 برای مقایسه میزان تغییرات نشان داده شده است.

جدول ۱. مشخصات پروتئین‌های تغییر یافته در لاین حساس (BGK221) آفتابگردان در اثر آبیاری محدود

SSP	پروتئین همولوگ	شماره ثبت در NCBI	امتیاز	% همپوشانی	وزن /PI مولکولی تئوری	وزن /PI مولکولی آزمایش	درصد تغییر	احتمال	نقش	مکان
704	Enolase	NP_001105896.1	149	17	48.26/5.20	58-5.4	2.3	0.005	انرژی	سیتوپلاسم
811	Phosphoglycerate mutase,2,3-bisphosphoglycerate-independent	NP_187471.1	122	14	60.99/5.53	66-5	25.5	0.000	انرژی	سیتوپلاسم
1201	Auxin-induced protein	AAB84222.1v	107	18	37.67/6.03	39-5.7	2.3	0.039	ناشناخته	هسته
1301	Auxin-induced protein	AAB84222.1v	107	18	37.67/6.03	39-5.6	7.6	0.000	ناشناخته	هسته
3205	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	O48905.1	179	15	35.87/6.39	38/6.2	2.2	0.009	متابولیسم	سیتوپلاسم
4108	Auxin-induced protein	AAB84222.1v	107	18	37.67/6.03	37/6.3	2.6	0.01	ناشناخته	هسته
4703	Adenosylhomocysteinase 1	NP_193130.1	135	24	53.99/5.58	55/6.3	0.5	0.000	متابولیسم	هسته
7307	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	40/7.0	3.8	0.012	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم
8202	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AES72079.1	240	30	37.1/6.97	39-7.3	0.5	0.035	انرژی	سیتوپلاسم
8308	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	40-7.6	0.6	0.018	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم
8405	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	43-7.4	0.8	0.001	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم

SSP	پروتئین همولوگ	شماره ثبت در NCBI	% همپوشانی امتیاز	وزن / PI مولکولی	وزن / PI مولکولی آزمایش	درصد تغییر	احتمال	نقش	مکان	
9207	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AES72079.1	240	30	37.1/6.97	38-7.8	10.1	0.01	انرژی	سیتوپلاسم
جدول ۲. مشخصات پروتئین‌های تغییر یافته در لاین متحمل (RGK46) آفتابگردان در اثر آبیاری محدود										
503	Similar to dihydroflavonol reductase	AAK68820.1	103	11	44.18/5.58	46/5.1	2.03	0.031	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم
901	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	P24095.1	123	19	96.87/5	100/5	2.7	0.005	متابولیسم	سیتوپلاسم
904	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	XP_002524120.1	112	15	131.76/5.44	100/5.3	36.7	0.031	متابولیسم	سیتوپلاسم
1707	Chloroplast heat shock protein 70-1	ABZ04080.1	167	24	74.48/5.14	58/5.8	5.6	0.003	دفاع / بیماری	پلاستید
1901	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	P24095.1	123	19	96.87/5	97/58	3.2	0.02	متابولیسم	سیتوپلاسم
3301	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA-like	XP_003538161.1	101	14	43.68/5	40/6	2.3	0.025	دفاع / بیماری	سیتوپلاسم
3501	Enolase	AAQ77240.1	116	23	48.31/6.17	43/6	0.4	0.01	انرژی	سیتوپلاسم
4501	Enolase	AAQ77240.1	116	23	48.31/6.17	47/6.3	0.4	0.021	انرژی	سیتوپلاسم
5201	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AES72079.1	240	30	37.1/6.97	39/6.5	0.5	0.007	انرژی	سیتوپلاسم
7011	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AEP71393.1	252	36	21.04/7	24/6.9	2.0	0.017	انرژی	سیتوپلاسم
7105	G protein beta-subunit-like protein	CAA96528.1	115	21	36.5/7.42	38/7.1	1.3	0.015	هدایت سیگنال	هسته
7204	G protein beta-subunit-like protein	CAA96528.1	115	21	36.5/7.42	39/7	3.3	0.019	هدایت سیگنال	هسته
8204	Peroxisomal hydroxypyruvate reductase	BAG09374.1	85	19	42.39/7.01	39/7.5	1.6	0.004	متابولیسم	کلروپلاست
8303	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	40/7.4	1.9	0.025	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم
8305	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AES72079.1	240	30	37.1/6.97	40/7.4	2.8	0.025	انرژی	سیتوپلاسم
8402	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	42/7.3	3.6	0.011	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم
9501	Chalcone synthase	Q9ZU06	278	19	42.48/6.99	43/7.5	7.5	0.000	متابولیسم ثانویه	سیتوپلاسم

مختلف مربوط به یک آنزیم می‌تواند به دلیل وجود ایزوفرم‌های ناشی از تغییرات پس ترجمه و نقش متمایز آنها در مسیرهای مختلف متابولیکی باشد. با این حال به نظر می‌رسد افزایش بیشتر شدت نسبی این آنزیم در لاین متحمل به علت نیاز به انرژی جهت سمیت‌زدایی و بازسازی آسیب‌های ناشی از تخریب اکسیداتیو است. سه فرم سیتوپلاسمی چالکون سینتاز (CHS) در لاین حساس (۷۳۰۷، ۸۳۰۸ و ۸۴۰۵) شناسایی شدند که شدت نسبی یک لکه افزایش و دو لکه کاهش داشت. در لاین متحمل نیز سه لکه (۸۳۰۳، ۸۴۰۲ و ۹۵۰۱) شناسایی شد و بیان هر سه در شرایط تنش افزایش داشتند. چالکون سینتاز یک آنزیم کلیدی مسیر بیوستنز فلاونوئید / ایزوفلاونوئید است و بیان آن باعث تجمع فلاونوئید و فیتوالکسین ایزوفلاونوئیدها شده و در مسیر دفاع سالیسیلیک اسید درگیر است (Dao et al.,

دو فرم سیتوپلاسمی گلیسرآلدئید تری فسفات دهیدروژناز (لکه‌های شماره ۸۲۰۲ و ۹۲۰۷) در لاین حساس شناسایی شد که در شرایط تنش شدت نسبی یک لکه افزایش و لکه دیگر کاهش بیان داشت. در لاین متحمل سه فرم سیتوپلاسمی این پروتئین (لکه‌های شماره ۵۲۰۱، ۷۰۱۱ و ۸۳۰۵) شناسایی شد که در شرایط تنش شدت نسبی دو لکه افزایش و یک لکه کاهش داشت (جدول‌های ۱ و ۲). گلیسر آلدئید تری فسفات دهیدروژناز دارای نقش اکسیدوردوکتاز بوده و در متابولیسم اولیه کربن و گلیکولیز دخالت داشته (Fang et al., 2011) و نقش ضد ROS آن گزارش شده است (Beak et al., 2008). افزایش شدت نسبی این پروتئین در شرایط تنش یک پاسخ سریع در جهت تأمین انرژی مورد نیاز از طریق گلیکولیز و نیز دفاع اکسیداتیو است. تغییرات متمایز لکه‌های پروتئینی

متحمل (به ترتیب RGK21 و BGK329) آفتابگردان در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Ghaffari *et al.*, 2013). این پروتئین در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها واقع شده و علاوه بر جنبه زینتی در دفاع از گیاه در برابر گیاه خواران، حفاظت در برابر تنش‌های مختلف محیطی داشته و همچنین خواص دارویی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی دارد (Li *et al.*, 2012). افزایش شدت نسبی این آنزیم حاکی از نقش دفاعی آن و سازگاری به تنش خشکی در لاین متحمل است. دو فرم سیتوپلاسمی لپو اکسیژناز لینولئات دانه (۹۰۱ و ۱۹۰۱) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش یافت. لپوکسیژنازها در اکسیداسیون اسید چرب لینولئیک، ترانسانی، دفاع و جابجایی لیپید دخالت دارند (Porta and Rocha, 2002) و این امر نیز نشان می‌دهد که در شرایط تنش نقش عوامل محافظت‌کننده و دفاعی در افزایش تحمل به خشکی حیاتی است. فرم سیتوپلاسمی یوبیکویتین کربوکسیل-ترمینال هیدرولاز (۹۰۴) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشت. این آنزیم فعالیت پپتیداز و هیدرولاز دارد. در شرایط تنش خشکی پروتئولیز از طریق القای پروتئازها از جمله پروتئازهای سیستمی افزایش می‌یابد (Campalans *et al.*, 2001). پروتئولیز یکی از فعالیت‌های حیاتی سلول جهت حفظ هوموستازی پروتئین است. افزایش پروتئولیز در پاسخ به تنش خشکی راهی برای رهایی از پروتئین‌های آسیب دیده یا برای جابجایی نیتروژن است. سیستم پروتئوزوم یوبیکویتین تقریباً در تنظیم تمام مراحل رشد و نمو در گیاهان نقش دارد و احتمالاً نقش محوری آن در بسیاری از مسیرهای هورمونی و پاسخ دفاعی حیاتی سلول است (Dreher and Callis, 2006). دو فرم هسته‌ای از جی پروتئین (۷۱۰۵ و ۷۲۰۴) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشتند. جی پروتئین‌ها به‌عنوان مولکول‌های علامت‌دهی که توسط اتصال GTP (گوانوزین تری فسفات) فعال می‌شوند

(2011). افزایش شدت نسبی چالکون سینتاز می‌تواند در دفاع ضد اکسیداتیو در شرایط تنش نقش داشته باشد. افزایش شدت نسبی هر سه لکه پروتئینی چالکون سینتاز در لاین متحمل نشان می‌دهد مکانیسم دفاعی در برابر شرایط تنش موثرتر از لاین حساس عمل کرده است. با این حال افزایش شدت نسبی یکی از سه لکه مربوطه در لاین حساس برای القا مقاومت کافی نبوده است. برخی پروتئین‌ها به صورت متمایز در دو لاین دستخوش تغییر قرار گرفتند. شدت نسبی دو پروتئین با نقش دفاع/آنتی‌اکسیدان (پروتئین‌های شوک دمایی و مقاومت پلی‌میکسین) در لاین متحمل افزایش یافت در حالیکه در لاین حساس این تغییرات مشاهده نشد. شدت نسبی پروتئین شوک دمایی (لکه ۱۷۰۷) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشت. پروتئین‌های شوک دمایی به‌عنوان چاپرون‌های مولکولی مسئول پیچش، مونتاژ، جابجایی و تجزیه پروتئین بوده و نقش حیاتی در محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف دارند (Wang *et al.*, 2004). تصور می‌شود که خانواده پروتئینی hsp70 به علت اتصال به زنجیره‌های پلی‌پپتیدی سایر پروتئین‌ها، در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و همچنین حفاظت از آنها در برابر تخریب شدن نقش دارند (Nimba *et al.*, 2005). همچنین شدت نسبی پروتئین مقاومت پلی‌میکسین (لکه ۳۳۰۱) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشت. افزایش شدت نسبی این پروتئین در لاین متحمل و کاهش آن در لاین حساس به خشکی آفتابگردان در اثر تنش خشکی توسط Ghaffari و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش شده است. افزایش شدت نسبی این دو پروتئین در لاین متحمل می‌تواند در تمایز آن از نظر میزان تحمل به خشکی نسبت به لاین حساس نقش داشته باشد. لکه پروتئینی شبه دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز (۵۰۳) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشت. افزایش بیش از دو برابر این پروتئین در دو لاین حساس و

مانند ۲-فسفوگلیسرات در سلول کم شده و نیاز به فعالیت این آنزیم افزایش یابد.

شدت نسبی مالات دهیدروژناز در لاین حساس (۳۲۰۵) در شرایط تنش افزایش داشت. این آنزیم فعالیت خود را تحت تنش خشکی در گیاهان برای تأمین نیاز بالای انرژی افزایش می‌دهد (Guicherd *et al.*, 1997). افزایش شدت نسبی این آنزیم در ژنوتیپ مقاوم و کاهش آن در لاین حساس جو در شرایط تنش خشکی به‌عنوان یکی از عوامل متمایزکننده لاین متحمل از لاین حساس ذکر شده است (Kausar *et al.*, 2013). فرم هسته‌ای آدنوزیل هموسیئوئیناز در لاین حساس (۴۷۰۳) در شرایط تنش کاهش داشت. آدنوزیل هموسیئوئیناز ممکن است نقش کلیدی در کنترل متیلاسیون از طریق تنظیم غلظت درون سلولی آدنوزیل هموسیئوئیناز بازی کند و کاهش آن می‌تواند به تبعیت از کاهش عمومی بیان پروتئین‌ها در اثر کاهش رونویسی (Kurup *et al.*, 2000) در لاین حساس در شرایط تنش خشکی باشد.

در مجموع بر اساس نتایج حاصل از این بررسی در شرایط تنش در لاین متحمل ۱۷ و در لاین حساس ۱۲ لکه پروتئینی دستخوش تغییر معنی‌دار قرار گرفتند و در لاین متحمل و حساس بترتیب حدود ۸۲ و ۶۷ درصد ۶۷ درصد این پروتئین‌ها افزایش داشتند. این امر نشان می‌دهد که افزایش شدت نسبی پروتئین‌های خاص در شرایط تنش یک راهکار عمومی در مواجهه با شرایط تنش است و در لاین متحمل شدت نسبی تعداد بیشتری از پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که در لاین متحمل احتمالاً برخی آنزیم‌های تغییر یافته مانند پروتئین مشابه دی‌هیدرو فلاونول ردوکتاز، بیفانکشنال مقاومت پلی میکسین، جی پروتئین زیر واحد بتا، چالکون سینتاز و گلیسرآلدئیدتری فسفات دهیدروژناز به‌طور غیرمستقیم در دفع ROS در شرایط تنش دخالت داشتند. نتایج این بررسی نشان داد که لاین متحمل عمدتاً از طریق تقویت پروتئین‌های درگیر در

(Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004) و در تنظیم فرآیندهای مختلف سلول از جمله واکنش‌های مربوط به تنش اکسیداتیو، پاسخ دفاعی و تسهیل انتقال آنزیم‌های سلولی ضروری نقش داشته و در تحمل به تنش خشکی ایفای نقش می‌کنند (Joo *et al.*, 2005).

لکه پروتئینی هیدروکسی پیرووات ردوکتاز پراکسیزومی (۸۲۰۴) در لاین متحمل در شرایط تنش افزایش داشت. عملکرد مولکولی این آنزیم شامل اتصال NAD و فعالیت اکسیدوردوکتازی بوده و در ارتباط با تولید مالات دهیدروژناز نقش دارد (Minarik *et al.*, 2002). شواهد نشان می‌دهد مالیک آنزیم موجود در سلول‌های محافظ ممکن است در تجزیه مالات در زمان بسته‌شدن روزنه نقش داشته باشد (Marian *et al.*, 2004). مالیک آنزیم متابولیسم مالات در سلول‌های محافظ روزنه را تغییر داده باعث تولید پیرووات می‌شود در نتیجه با کاهش مالات فشار تورمی سلول‌های روزنه کاهش یافته و بسته می‌شوند (Laporte *et al.*, 2002). لذا به نظر می‌رسد تغییر متابولیسم مالات در سلول‌های محافظ روزنه می‌تواند در حفظ رشد گیاه در طی دوره خشکی و ذخیره آب در زمان آبیاری مؤثر باشد.

به‌طور مشابه برخی پروتئین‌ها نیز در لاین حساس از تنش خشکی متأثر شدند. فرم سیتوپلاسمی فسفوگلیسرات موتاز غیر وابسته به ۳،۲-بیس فسفوگلیسرات (لکه ۸۱۱) در لاین حساس به میزان چشمگیری (۲۵/۵ برابر) در شرایط تنش افزایش داشت. افزایش شدت نسبی این پروتئین در سویای تحت تنش نیز گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2012). این آنزیم در فرآیند گلیکولیز کاتالیزور تبدیل برگشت‌پذیر ۳-فسفوگلیسرات به ۲-فسفوگلیسرات با حضور یون منیزیم است. افزایش شدت نسبی این آنزیم در لاین حساس می‌تواند از نقش تنظیم‌کنندگی ناشی شده باشد. احتمال دارد که با اختلال در روند طبیعی سوخت و ساز، متابولیت‌هایی

تنش خشکی مقابله می‌کند.

متابولیسم سلولی و انرژی و دفاع ضد اکسیداتیو) با

REFERENCES

- Ashraf M, Wu L (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:17-42.
- Baek D, Jin Y, Jeong JC, Lee H J, Moon H, Lee J, Shin D, Kang CH, Kim DH, Nam J, Lee SY, Yun DJ (2008) Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytochem.* 69: 333-338.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S A, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terry N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, Van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian KD, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, MA, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Dusterhoft A, Moores T, Jones JD G, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansoerge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes HW, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N (1998) Analysis of 1.9Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391: 485-488.
- Bhushan D, Pandey A, Choudhary MK, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N (2007) Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Mol. Cell. Proteomics*, 6: 1868-1884.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Campalans A, Pages M, Messeguer R (2001) Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiol.* 21: 633-643.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, and 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.
- Castillejo AM, Maldonado AM, Ogueta S, Jorriñ JV (2008) Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics J.* 1: 59-71.
- Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* 10(3): 397-412.
- Dreher K, and Callis J (2006) Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. Section of Molecular and Cellular Biology, Plant Biology Graduate Group Program, University of California, Davis, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA. *Ann. Bot.* 99: 787-822.
- Fang X, Ma H, Lu D, Yu H, Lai W and Ruan S (2011) Comparative proteomics analysis of rotein expressed in the I-1 and I-2 internodes of strawberry stolons. *Proteome Sci.* 9 (26), 1-15.
- Fulda S, Mikkat S, Stegmann H, Horn R (2011) Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biol.* 13: 632-642.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hua Y, Ma W and Yan Y (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress

- by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, 72(10): 1180-91.
- Ghaffari M, Toorchi M, Valizadeh M, Komatsu S (2013) Differential response of root proteome to drought stress in drought sensitive and tolerant sunflower inbred lines. *Funct. Plant Biol.* 40(6), 609-617.
- Ghaffari M, Toorchi M, Valizadeh, M, Shakiba MR (2017) Proteomic prospects for tolerance of sunflower to drought stress during the flowering stage. *Crop Pasture Sci.* 68(5) :457-465.
- Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Bliigny R, Marigo G (1997) Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L. malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees* 11(3): 155-161.
- Hajduch M, Casteel JE, Tang S, Hearne LB, Knapp S, Thelen JJ (2007) Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. *J. Proteome Res.* 6: 3232-3241.
- Hajheidari M, Eivazi A, Buchanan BB, Wong JH, Majidi I, Salekdeh GH (2007) Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *J. Proteome Res.* 6: 1451-60.
- Joo JH, Wang S, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17: 957-970.
- Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S (2013) Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44(2): 345-359.
- Kottapalli KR, Rakwal R, Shibato J, Burow G, Tissue D, Burke J, Puppala N, Burow M, Payton P (2009) Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant Cell Environ.* 32: 380-407.
- Kurup S, Jones HD, Holdsworth MJ (2000) Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *Plant J.* 21:143-155.
- Laporte MM, Shen B, Tarczynski MC (2002) Engineering for drought avoidance: Expression of maize NADPmalic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J. Exp. Bot.* 53: 699-705.
- Li X, Sun H, Pei J, Dong Y, Wang F, Chen H, Sun Y, Wang N, Li H, Li Y (2012) De novo sequencing and comparative analysis of the blueberry transcriptome to discover putative genes related to antioxidants. *Gene*, 511(1):54-61.
- Marian CO, Krebs SL, Arora R (2004) Dehydrin variability among *Rhododendron* spp: A25 kDa dehydrin is highly conserved and associated with cold acclimation across wide array of species. *New Phytol.* 161: 773-780.
- Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalík M (2002) Malate Dehydrogenases Structure and Function. Minireview. *Gen. Phys. Biophys.* 21(3), 257-265.
- Mohammadi PP, Moieni A, Hiraga S, Komatsu S (2012) Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *J. Proteomics*, 75 (6): 1906-1923.
- Mustafa G, Setsuko Komatsu. 2014. Quantitative proteomics reveals the effect of protein glycosylation in soybean root under flooding stress. *Frontiers in Plant Science* (5) Article 627.
- Ndimba BK, Chivasa S, Simon WJ, Slabas AR (2005) Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 5: 4185-4196.
- Perfus-Barbeoch L, Jones AM, Assmann

- SM (2004) Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 719-731.
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases, physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130: 15-21.
- Qian, H, Lu H, Ding H, Lavoie M, Li Y, Liu W, Fu Z (2015) Analyzing *Arabidopsis thaliana* root proteome provides insights into the molecular bases of enantioselective Imazethapyr toxicity. *Sci. Rep.* 5: 11975.
- Quartacci MF and Navari-Izzo F (1992) Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *J. P. Physiol.* 139: 621-625.
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117: 1253-1263.
- Schniter AA, Miller JF (1981) Description of sunflower growth stage. *Crop Sci.* 21: 901-903.
- Singh BD (2015) Plant breeding, Principles and methods. Kalyani Publishers, New Delhi, India.
- Tankha K, Gupta RK (1992) Effect of water deficit and sulphur dioxide on total soluble proteins, nitrate reductase activity and free proline content in sunflower leaves. *Biol. Plantarum* 34 (3-4): 305-31.
- Wang W, Tai F, Chen S (2008) Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Separation Sci.* 31: 2032-2039.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.
- Xiaochuan S, Wang Y, Xu L, Li C, Zhang W, Luo X, Jiang H, Li L (2017) Unraveling the root proteome changes and its relationship to molecular mechanism underlying salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *Front. Plant Sci.* 8:1192.
- Zhang J, Kirkham MB (1996a) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol.* 132: 361-373.
- Zhang J, Kirkham MB (1996b) Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Sci.* 113: 139-147.