

بررسی الگوی پروتئوم و فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدانت جو تحت تنش شوری

عبدالرحمن رسول نیا^{۱*}، محمدرضا بی همتا^۲، سیدعلی پیغمبری^۳، هوشنگ علیزاده^۴، سهیلا تکلوه^۵ و
مجاهد کمالی زاده

۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار، استادیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد،

دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۱۹)

چکیده

شوری و خشکی از عوامل نامساعد محیطی هستند که رشد و عملکرد گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار می دهند. تنش ها باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش ها در گیاهان، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد می شوند. در شرایط تنش افزایش میزان گونه های فعال اکسیژن موجب خسارت به اساسی ترین ماکرومولکول های سلولی نظیر پروتئین ها، چربی ها، اسیدهای نوکلئیک و رنگدانه ها می گردد. برخی سیستم های آنزیمی نقش مهمی در پاکسازی سلول از این گونه های فعال اکسیژن بر عهده دارند. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر الگوی پروتئوم برگ و تغییرات آنتی اکسیدانتی گیاهچه های دو ژنوتیپ جو (افضل و لاین ۵۲۷)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در شرایط کنترل شده و تنش شوری (۲۰۰ میلی مولار و ۳۰۰ میلی مولار) اجرا شد. تنش شوری در مرحله ۴ تا ۵ برگی به مدت ۲۴ ساعت اعمال شد. تنش شوری باعث کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانت هایی نظیر پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ریداکتاز شد، اگر چه واکنش ژنوتیپ ها متفاوت بود. تجزیه ژل های الکتروفورز دو بعدی نشان داد که در مقایسه با شاهد، ژنوتیپ متحمل ۹۷ لکه پروتئینی (۰.۷۸٪ افزایش و ۰.۲۲٪ کاهش بیان) و در ژنوتیپ حساس ۹۴ لکه پروتئینی (۰.۳۷٪ افزایش و ۰.۶۳٪ کاهش بیان) تغییرات معنی داری از خود نشان دادند. نتایج طیف سنجی جرمی منجر به شناسایی پروتئین های درگیر در مکانیسم های آنتی اکسیدانتی و تولید انرژی و سایر مکانیسم ها شد.

واژه های کلیدی: تنش شوری، جو، فعالیت آنتی اکسیدانتی، پروتئومیکس

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare*) یکی از گیاهان مهم مورد استفاده برای خوراک دام، مالت و غذای انسان می باشد. اهمیت جو ناشی از رشد آن در نواحی حاشیه ای با حاصلخیزی کم می باشد که معمولا به وسیله خشکی، دمای پایین و شوری محدود شده است (Baum et al., 2004). تنش های غیر زنده نظیر تنش شوری تولید و تجمع گونه های فعال اکسیژن را القاء می کنند که در غلظت های بالا برای سلول زیان آور هستند. تولید این ترکیبات نظیر رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^\cdot) باعث پراکسیداسیون چربی ها، غیر فعال شدن آنزیم ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلول می شود (Bailly, 2004).

آنزیم های آنتی اکسیدانت نظیر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون ریداکتاز (GR) باعث حذف و غیر فعال شدن گونه های فعال اکسیژن می شوند (McDonald, 1999; Bailly, 2004). آنزیم های CAT، POD و APX باعث حذف و کاهش خسارت پراکسید هیدروژن می شوند و علاوه بر آن مانع تشکیل رادیکال خطرناک هیدروکسیل از پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید در طی واکنش هابر- وایس می شوند (McDonald, 1999). آنزیم GR نیز یکی از آنزیم های مسیر گلوکاتایون - آسکوربات است که با مصرف NADPH به عنوان دهنده الکترون باعث احیاء گلوکاتایون می شود (Noctor & Foyer, 1998).

چرخه گلوکاتایون آسکوربات دارای یک نقش مهم در ایجاد سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو می باشد و افزایش فعالیت آنزیم های آن در شرایط تنش سبب حداقل شدن اثرات تنش اکسیداتیو می شود (Khanna & Chopra & Selote, 2007). GR نقش کلیدی در احیاء پراکسید هیدروژن به آب از طریق مسیر هالیول - آسادا ایفاء می کنند (Noctor & Foyer, 1998). هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت CAT، POD، APX، GR و تغییر الگوی پروتئوم برگی ژنوتیپ های جو و ارتباط آنها با هم تحت تنش شوری می باشد.

مواد و روش ها

کاشت بذور و اعمال تیمارها

بذرهای جو افضل (متحمل به شوری) و لاین ۵۲۷ (حساس به شوری) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. بذرهای در گلدان های سفالی به قطر ۳۰ سانتی متر و در مخلوطی از پرلیت و کوکوپیت و ورمی کولیت به نسبت ۳:۲:۱ کاشته شد. گلدان ها در یک گلخانه که با پلاستیک جهت کنترل آفت و بیماری ایزوله شده بودند قرار گرفته و جهت کنترل دما از کولر استفاده شد.

آبیاری با آب خالص و محلول هوگلند انجام شد. ۲۰ روز پس از جوانه زنی بذور، در مرحله چهار برگی گیاهچه ها، آبیاری با آب شور (۲ مرتبه در روز) به غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش نمونه گیری از برگهای تحت تنش و شاهد انجام شد. برگها درون ورقه های آلومینیومی پیچیده و در نیتروژن مایع به سرعت فریز شدند و تا زمان استخراج پروتئین و اندازه گیری های صفات مورد نظر در فریزر، با دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

اندازه گیری محتوی یونی

اندازه گیری غلظت یون های سدیم و پتاسیم به روش فلیم فوتومتري انجام شد. نمونه های برگگی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد خشک و سپس آسیاب شدند. یک گرم از پودر آسیاب شده داخل کروزه های چینی در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت تبدیل به خاکستر سفید رنگ شد. خاکستر حاصله در ۲۰ میلی لیتر اسید کلریدریک دو نرمال حل شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. عصاره حاصله صاف و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر افزایش یافت.

استخراج و تعیین غلظت پروتئین ها

برای انجام الکتروفورز دو بعدی، استخراج پروتئین از بافت برگگی به روش دامروال و همکاران (Damerval et al., 1986) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای اندازه گیری میزان غلظت پروتئین ها از روش برادفورد استفاده

استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Nakano & Asada (1981) اندازه گیری شد. ابتدا ۰/۵ گرم برگ پرچم توسط ۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7.0) حاوی ۱ میلی مولار EDTA، ۱ درصد PVP (w/w)، ۰/۱ درصد Triton x-100 و ۵ میلی مولار آسکوربات در هاون چینی هموژنیزه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. از محلول روشنور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7.0)، ۵ میلی مولار آسکوربات، ۱ میلی مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ مایکرو لیتر از عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره بلافاصله میزان کاهش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه قرائت شد.

میزان آسکوربات اکسید شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه شد. فعالیت آنزیم گلوکاتایون ریداکتاز به روش Smith et al. (1988) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7.5)، ۵ میلی مولار گلوکاتایون اکسید شده (GSSG)، ۱۵ میلی مولار NADPH و ۵۰ مایکرو لیتر عصاره استخراج شده بود. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. میزان NADPH مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه شد.

نتایج و بحث

محتوی یونی

جدول مقایسه میانگین نشان می دهد، که غلظت سدیم و پتاسیم برگی بین شاهد و تیمار تنش تفاوت معنی داری با هم دارند (جدول ۱). گیاهان در شرایط معمولی نسبت بالایی از K^+/Na^+ را در سیتوپلاسم حفظ می کنند کاهش نسبت K^+/Na^+ متأثر از تنش شوری در تقابل با فرایندهای بیوشیمیایی است. علاوه بر این K^+ فراهم کننده پتانسیل اسمزی لازم برای جذب آب توسط سلول های گیاهی است (Schatchman & liu, 1999).

شد (Bradford, 1976). ۵ میکرو لیتر از نمونه پروتئین محلول در بافر لیزیز به ۵۵ میکرو لیتر آب دیونیزه و ۳ میلی لیتر محلول سنجش برادفورد اضافه شد و میزان جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید.

الکتروفورز و شناسایی پروتئین ها

به منظور انجام الکتروفورز، از ژل نواری (IPG Strip 17cm) با pH=۴-۷ برای بعد اول استفاده شد و برای انجام بعد دوم از دستگاه Cell ProteinII Xi (Bio-Rad) استفاده شد. رنگ آمیزی ژل ها طبق پروتکل بلوم انجام شد (Blum et al., 1987). پس از رنگ آمیزی، ژل ها با استفاده از دنسیتومتر Gs800 (Bio-rad) و بوسیله نرم افزار PDQuest اسکن شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار Melanie7.3 (GeneBio, Geneva, Switzerland) استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم ها

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (1984) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم برگ پرچم توسط ۵ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم (pH=7.0) حاوی ۲ میلی مولار EDTA در هاون چینی کاملاً هموژنیزه شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول روشنور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.0)، ۵۰ مایکرو لیتر از عصاره استخراج شده و ۱۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن در هنگام اندازه گیری تغییرات جذب بود. کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه قرائت شد. میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز همانند آنزیم کاتالاز بود و به روش Chance & Maehly (1955) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.0)، ۱۰ میلی مولار گویاکول، ۱۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ مایکرو لیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن ترکیبات به عصاره، افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. میزان تراگوپاکول تشکیل شده با

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف شوری روی غلظت سدیم و پتاسیم در برگ جو

ارقام	کنتزل	تیمار شوری ۲۰۰ میلی مولار	تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار
افضل	Na ⁺	۰/۴ ± ۰/۱۰۲ ^c	۰/۷ ± ۰/۱۰۲ ^b
	K ⁺	۶/۵ ± ۰/۰۶۷ ^c	۷/۸ ± ۰/۰۶۷ ^a
لایین ۵۲۷	Na ⁺	۰/۶ ± ۰/۱۰۲ ^c	۱/۱ ± ۰/۱۰۲ ^a
	K ⁺	۶/۵ ± ۰/۰۶۷ ^c	۵/۳ ± ۰/۰۶۷ ^b

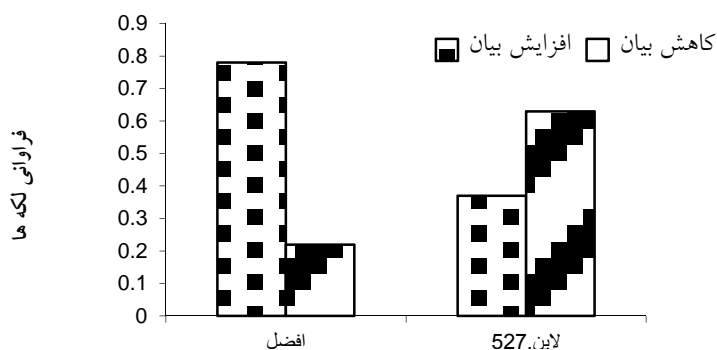
ژنوتیپ متحمل ۸۴٪ لکه‌ها افزایش بیان و ۱۶٪ کاهش بیان نشان دادند در حالی که در ژنوتیپ حساس ۸۶٪ نقاط کاهش بیان و ۱۴٪ نیز افزایش بیان داشتند (Dadashi et al., 2006).

آنزیم‌های فعال در سمیت زدایی گونه‌های فعال اکسیژن

در گیاهان منابع بالقوه زیادی برای تولید گونه‌های فعال اکسیژن وجود دارد و برخی از اینها در متابولیسم نرمال گیاه همچون فتوسنتز و تنفس دخیل هستند. رادیکال سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن به وسیله فتوسیستم II تولید می‌شوند. علاوه بر این وقتی که گیاهان در تنش‌های محیطی مثل خشکی، شوری و سرما قرار می‌گیرند تولید گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست افزایش پیدا می‌کند (Peskan-Berghfer et al., 2005).

شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری

نتایج حاصل از تجزیه ژل‌های دو بعدی نشان می‌دهد که در تیمارهای ژنوتیپ متحمل و حساس، تعداد ۲۴۷۸ و ۲۸۳۳ لکه پروتئینی شناسایی شد. بررسی دقیق مقایسات تیمارها با شاهد نشان می‌دهد که در مجموع در تیمارهای ژنوتیپ متحمل و حساس ۳۸۹ و ۳۸۷ لکه پروتئینی تغییرات معنی‌داری داشتند. نکته قابل توجه این که در مجموع، در ژنوتیپ متحمل ۳۱۴ لکه (۷/۸۰٪) افزایش و ۸۵ لکه (۳/۱۹٪) نیز کاهش بیان داشتند در حالی که در ژنوتیپ حساس ۱۴۵ لکه (۴/۳۷٪) افزایش و ۲۳۲ لکه (۶/۶۶٪) لکه کاهش بیان نشان دادند. (شکل-۱). در بررسی اثر شوری بر روی دو ژنوتیپ برنج متحمل (IR651) و حساس (IR129) به شوری، نتایج مشابه به دست آمد در مجموع ۸۷ لکه پروتئینی دارای تغییرات معنی‌دار، در



شکل ۱ - نمودار تغییرات فراوانی لکه‌ها در ژنوتیپ‌های جو متحمل و حساس به شوری

به عنوان پیامبرهای فعال در مسیر انتقال سیگنال وابسته به تنش تلقی شود. بنابراین سلول به دو سازوکار

افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند هم به عنوان تهدیدی برای سلول محسوب شود و هم می‌تواند

همراه با افزایش بیان دایمی اسکوربات پر اکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپر اکسید دیسموتاز بوده است (Rajguru et al., 1999). در تنباکو تشدید بیان اسکوربات پراکسیداز پراکسی زوم باعث افزایش مقاومت در مقابل تنش اکسیداتیو شد (Wang et al., 1999). همچنین مقدار اسکوربات پراکسیداز در ریشه برنج متحمل به شوری (Pokkali) در شرایط نرمال در حدود ۴/۴ برابر بیشتر از ژنوتیپ حساس (IR29) بوده است (Salekdeh et al., 2002).

بنابراین به نظر می رسد که تحمل به شوری ژنوتیپ متحمل به واسطه ظرفیت بالای آنتی اکسیدانتهی آن باشد. در یک بررسی در ژنوتیپ متحمل به شوری برنج (IR651) مقدار سوپر اکسید دیسموتاز و تیورودوکسین تغییر معنی داری در تیمار تنش شوری ۷۵ میلی مولار نمک در مقایسه با شاهد در پانیکول های جوان نشان داد (Dadashi et al., 2006). هم چنین در یک مطالعه تنش خشکی گلوتاتیون اس-ترانسفراز، تیورودوکسین و ۱-سیس پراکسی رداکسین در ژنوتیپ متحمل به خشکی افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان دادند (Hajheydari et al., 2007).

لکه شماره ۱۱۹ به عنوان آنزیم ۲-سیس پراکسی رداکسین شناسایی شد (جدول ۲) و از جمله پروتئین های آنتی اکسیدانتهی یوبیکوتینی است که در تمام موجودات زنده یافت می شود و دارای چندین نقش مهم است. این پروتئین با پروتئین هایی نظیر گلوتارودوکسین و تیورودوکسین اثر متقابل دارد در حفاظت DNA و دفاع در برابر پاتوژن نیز نقش دارد (Dietz et al., 2006). انواعی از این آنزیم ها که در کلروپلاست واقع شده اند در دفع پراکسید هیدروژن نقش اساسی دارند (Kitajima et al., 2008).

فعالیت آنزیمی

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثرات تنش شوری نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز ژنوتیپ ها به طور معنی داری با افزایش شوری کاهش یافت (شکل ۳، جدول ۲).

سیستم آنتی اکسیدانتهی گیاه با حذف گونه های فعال اکسیژن موجب کاهش خسارت های ناشی از آنها می شود. آنزیم کاتالاز به طور مستقیم باعث تجزیه

نیاز دارد که هم رادیکال های آزاد اکسیژن مازاد را سم زدایی کند و هم چنین مقدار بهینه آن را برای پیامرسانی تنظیم کند. در اثر تنش شوری یکی از رخدادهای زودهنگام بسته شدن روزنه ها است. این عمل باعث می شود با وجود اینکه واکنش های وابسته به نور فتوسنتز انجام می شود ولی تثبیت کربن انجام نمی شود در چرخه انتقال الکترون در کلروپلاست NADPH تولید می شود که می بایستی در چرخه کلون مصرف شود تا کمبود ناقل $NADP^+$ رخ ندهد. در غیر این حالت، اکسیژن به جای $NADP^+$ به عنوان گیرنده الکترون عمل کرده و باعث تولید آنیون سوپراکسید می شود. پس در واقع گیاه با به کار انداختن چرخه گلی اکسالات مسیری برای مصرف NADPH به وجود می آورد تا از تولید سوپر اکسید جلوگیری شود (Kim et al., 2005).

سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی سوپراکسید را تبدیل به پراکسید هیدروژن می کند. این آنزیم در چرخه گلی اکسالات فعال است (Douce et al., 2001). سم زدایی پراکسید هیدروژن به وسیله اسکوربات پراکسیداز، تیورودوکسین پر اکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و ۲-سیس پراکسی ردووکسین تکمیل می شود (Melhorn et al., 1996).

تیورودوکسین در فرایندهای بیوشیمیایی بسیار فعال است که شامل موبایلزاسیون پروتئین و نشاسته در جوانه زنی غلات، خود ناسازگاری و حفاظت سلولی در برابر تنش اکسیداتیو است. گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زدودن رادیکال های آزاد اکسیژن نقش دارد. این آنزیم خسارت های ناشی از تنش اکسیداتیو را به وسیله حذف رادیکال های تشکیل شده در تنش کاهش می دهد (Hajheydari et al., 2007).

لکه های شماره ۳۸۲، ۲۸۳، و ۲۲۰۱۳۶ به ترتیب به عنوان آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، تیورودوکسین پراکسیداز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و اسکوربات پراکسیداز شناسایی شدند. (شکل ۲ و جدول ۲) نتایج نشان داد که این آنزیم ها در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس افزایش بیشتری داشته است. مطالعات نشان می دهد که در تخمک های کشت شده پنبه در محیط *in vitro*، تحمل به تنش شوری

پراکسید هیدروژن می‌شود (Jiang & Huang, 2001). کاهش مشاهده شده در فعالیت این آنزیم منطبق با نتایج سایر تحقیقات است که غیر فعال سازی شدید آنزیم کاتالاز را توسط شوری نشان می‌دهد (Fidalgo et al., 2004; Lee et al., 2001). کاهش فعالیت این آنزیم توسط سایر تنش‌های محیطی نظیر تنش سرما (Kubo et al., 1999)، شوک حرارتی (Dat et al., 1998) و خشکی (Moran et al., 1994) نیز مشخص شده است. اگرچه نتایج مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شوری وجود دارد (Demiral & Turkan, 2005; Bor et al., 2003).

جدول ۲- برخی از پروتئین‌های شناسایی شده جو با MS/MOLDI TOF

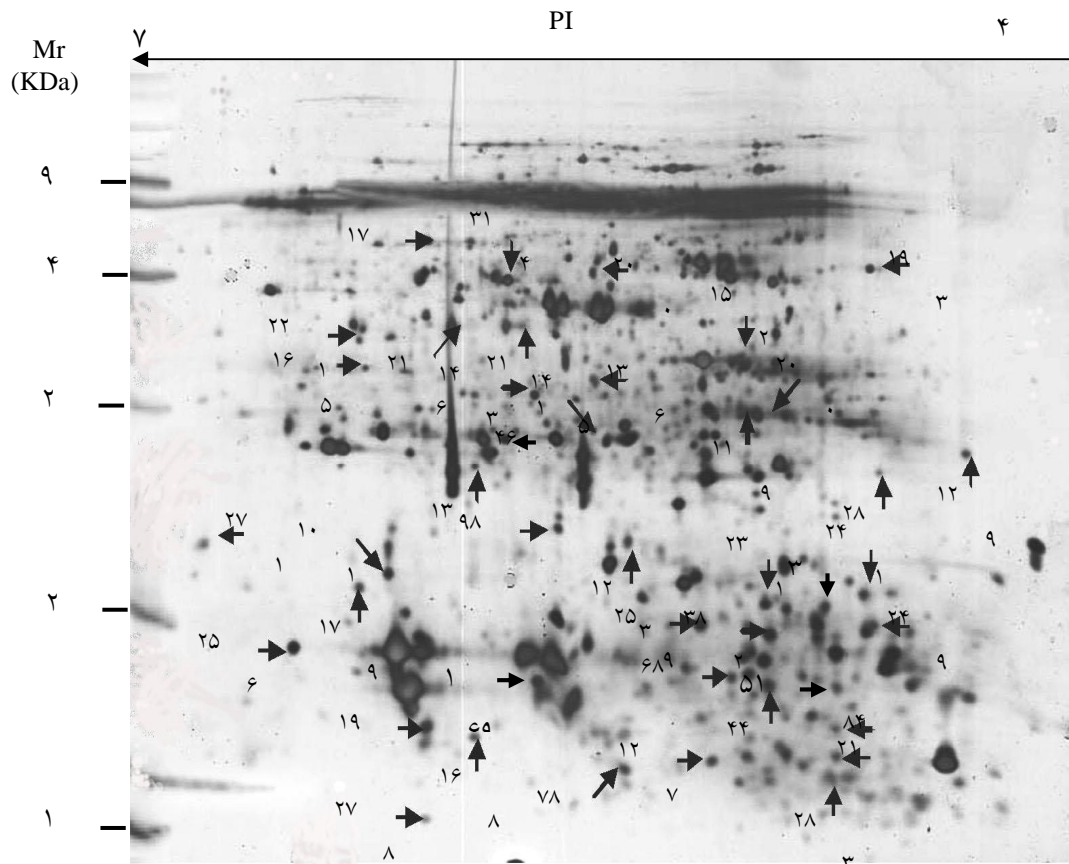
شماره لکه	Annotation	NCBI nr	Mascot score	Mascote Coverage%	PI تجربی/تئوری	Mr تجربی/تئوری (KDa)
۴۴	Plastocyanin, chloroplastic	gi/130269	۱۹۷	۲۰	۵/۵،۵/۴	۱۵/۷۵، ۱۶/۵
۱۱۹	2-cyc peroxiredoxin	gi/2499477	۷۱۰	۴۳	۵/۵،۴/۱	۲۳/۳۹، ۲۲
۱۳۶	Glatathion s-transfrase	gi/18479038	۱۴۲	۲۶	۵/۸، ۵/۷	۲۵/۳۰، ۲۴/۵
۱۵۲	Triosephosphate isomerase	gi/2507469	۴۹۹	۲۲	۵/۳، ۵/۲	۲۶/۴۹، ۲۷/۵
۱۶۵	Oxygen- evolving enhancer protein	gi/131394	۶۸۹	۵۵	۶/۸، ۶/۶	۲۷/۴۲، ۲۸/۵
۲۰۰	Mythochndrial cystein syntase	gi/213958273	۳۸۲	۳۶	۵/۲، ۵/۴	۲۲/۵۵، ۲۳/۲
۲۱۱	FBP Aldolase protein	gi/223018643	۴۹۵	۲۵	۵/۹، ۵/۹	۴۲/۲۱، ۴۳
۲۱۶	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	gi/1456119030	۹۶	۱۴	۶/۶، ۶/۲	۴۲/۳، ۴۳
۲۲۰	Putative ascorbate peroxidase	gi/148763638	۴۷۲	۳۵	۵/۳، ۵/۶	۲۹، ۲۷/۲
۲۷۸	photosystem I subunit VII	gi/11460848	۸۱	۱۸	۷/۲، ۶/۷	۹/۴۶، ۱۰
۲۸۳	Putative thiroedoxin peroxidase	gi/561822370	۱۷۲	۳۹	۴/۷، ۴/۸	۱۰/۸۳، ۱۱/۵
۳۱۴	Phosphribulo kinase, chloroplastic	gi/125580	۵۴۸	۲۳	۵/۷، ۵/۹	۴۵/۵، ۴۴/۵
۳۸۲	Super oxide dismutase	gi/1572627	۳۵۹	۴۳	۵/۳، ۵/۱	۲۰/۳۵، ۱۹/۵

مقایسات میانگین می‌توان نتیجه گرفت که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ پرچم ارقام با افزایش سطوح شوری به طور معنی داری افزایش یافت. آنزیم پراکسیداز با استفاده از مواد فنولیک به عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Asada, 1994).

کاهش فعالیت کاتالاز در این تحقیق ممکن است ناشی از جلوگیری از سنتز آنزیم جدید باشد (Streb and Feierabend., 1996; Fidalgo et al., 2004). دلایلی نیز مبنی بر کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش به دلیل حساسیت این آنزیم نسبت به نور می‌باشد که در مقابل نور سریعاً غیر فعال می‌شود و بنابراین فعالیت آنزیم در شرایط تنش کاهش می‌یابد. توجه به نتایج

*Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



شکل ۲- موقعیت لکه های پروتئینی که برای شناسایی انتخاب شدند، این لکه ها در مقایسه با شاهد جو دارای بیان افتراقی بودند

برای تجزیه پراکسید هیدروژن تولیدی ناشی از سوپراکسید دیسموتاز می باشند و هم چنین نتایج تجزیه MS نشان داد که یکی از پروتئین های شناسایی شده از خانواده پراکسیداز می باشد که در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان نشان داده است.

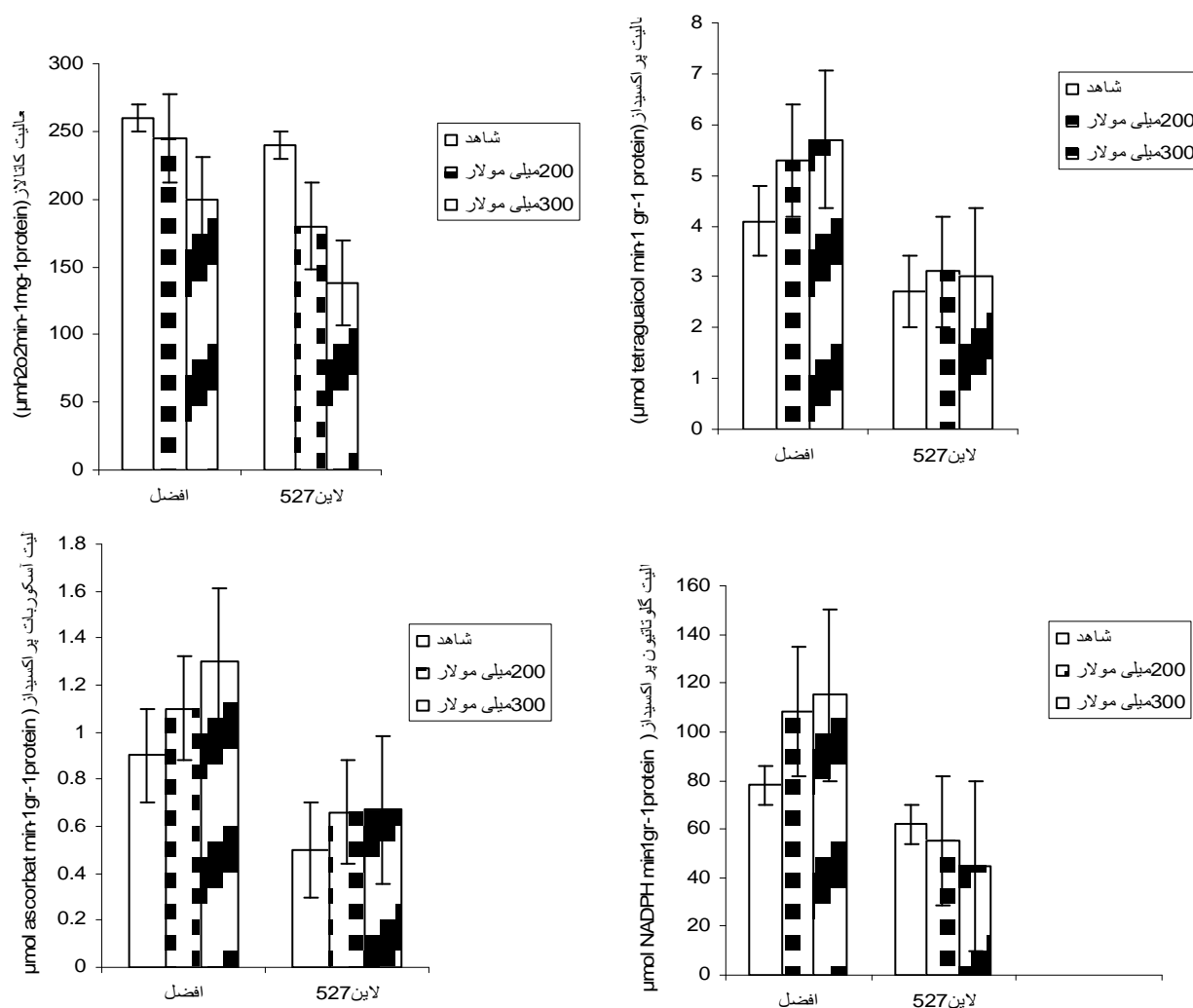
افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش شوری در مطالعات متعددی نیز گزارش شده است (Moradi et al., 2007; Demiral & Turkan, 2005). شواهد زیادی مبنی بر افزایش و کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش وجود دارد و همانند آنزیم پراکسیداز اگرچه افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز توسط تنش شوری در چغندر قند (Bor et al., 2003)، برنج (Demiral & Turkan, 2005) گزارش شده است، ولی شواهدی نیز مبنی بر کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط شوری وجود دارد (Demiral & Turkan, 2005). افزایش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ های متحمل آنها را قادر می سازد تا خودشان را

از آنجایی که تجمع پراکسید هیدروژن ناشی از واکنش سوپراکسید دیسموتاز نیاز به فعالیت ترکیبی دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به منظور حفاظت سلول های گیاهی خواهد داشت، لذا این دو آنزیم نقش مهمی را در حذف پراکسید هیدروژن ایفاء می نمایند. شواهد زیادی مبنی بر افزایش و کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش وجود دارد و اگرچه افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط تنش شوری در چغندر قند (Bor et al., 2003) و برنج (Dionisio-Sese & Tobita, 1998; Demiral & Turkan, 2005) گزارش شده است، ولی شواهدی نیز مبنی بر کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش شوری وجود دارد (Demiral & Turkan, 2005). تغییر در فعالیت آنزیم پراکسیداز در سایر تنش ها نیز مشخص گردیده است.

از فعالیت بالاتر این آنزیم در برگ های ژنوتیپ متحمل به شوری در شرایط تنش چنین استنتاج می شود که ژنوتیپ های متحمل دارای ظرفیت بالاتری

افزایش بین بیشتر این آنزیم را در ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ شاهد در شرایط شور بودیم.

در برابر تنش اکسیداتیو محافظت نمایند، در حالی که در ژنوتیپ حساس این افزایش ناچیز و تنها به صورت جزئی معنی دار بود (شکل ۳). در مطالعات پروتئومیکس نیز



شکل ۳- تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانتهی کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکوتاتیون ریداکتاز در برخی ارقام جو و سطوح مختلف شوری. (خطوط عمودی نشان دهنده خطای استاندارد می باشد)

گلوکوتاتیون، این آنزیم به احتمال زیاد یکی از آنزیم‌های مهم در گیاه است که افزایش فعالیت آن سبب افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو خواهد شد. گزارش شده است که افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ریداکتاز در برگ‌های چغندر قند مرتبط با تحمل شوری باشد (Bor et al., 2003). به هر حال در این تحقیق به نظر می رسد کاهش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های حساس به شوری به علت افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و غیرفعال شدن آنزیم‌ها بر اثر واکنش با آن‌ها

افزایش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری (Moradi et al., 2007; Shalata et al., 2001) و کاهش (Moradi et al., 2007; Shalata et al., 2001)، یا عدم تغییر (Demiral & Turkan, 2005) فعالیت آن در ژنوتیپ‌های حساس نیز گزارش گردیده است. میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ریداکتاز برگ ژنوتیپ‌ها با افزایش سطوح شوری به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۳-). با توجه به افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی و شوری و نقش آن در احیاء

متحمل گوجه فرنگی وجود دارد (Shalata & Tal, 1998).

باشد (Dat et al., 1998). نتایجی نیز مبنی بر کاهش فعالیت این آنزیم در برگ های ژنوتیپ حساس و

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس صفات کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتایون ریداکتاز، آسکوربات پراکسیداز در جو

میانگین مربعات		درجه آزادی		منابع تغییر	
اسکوربات پراکسیداز	گلوکاتایون ریداکتاز	پراکسیداز	کاتالاز		
۰/۱۴۳۰**	۱۲۳۹**	۳/۴۸**	۳۲۴۹**	۱	رقم
۰/۱۵۴۰**	۶۰۳**	۲/۸۸**	۱۳۰۴۸*	۲	شوری
۰/۰۰۷۵**	۱۸۵**	۰/۲۲**	۲۲۲*	۲	رقم×شوری
۰/۰۰۱۷	۹/۱۳	۰/۰۵۱۴	۸۹/۸	۱۲	خطا

** و * به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

از عوامل محدود کننده سنتز گلوکاتایون می باشد. افزایش بیان این آنزیم در دیگر مطالعات پروتئومیکس نیز مشاهده شده است پس می توان نتیجه گرفت که افزایش بیان این آنزیم باعث تحریک تولید بیشتر گلوکاتایون در برابر تنش می باشد. (Naghib et al., 2008).

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از فعالیت آنتی اکسیدانت می توان گفت که تنش شوری می تواند سبب کاهش جذب دی اکسیدکربن در اثر انسداد روزنه ها گردد و این امر منجر به تحریک تشکیل گونه های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروژن می شود. با بسته شدن روزنه و کاهش فتوسنتز افزایش گونه های فعال اکسیژن در اثر عدم مصرف الکترون های حاصل از واکنش نوری در فتوسیستم I نیز دیده می شود. افزایش بیان آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون- اس ترانسفراز و آسکوربات پراکسیداز و سایر آنزیم های درگیر در سمیت زدایی گونه های فعال اکسیژن بیانگر واکنش گیاه در برابر رادیکال های آزاد اکسیژن است. البته در گیاه متحمل افزایش بیشتری نسبت به گیاه حساس دیده می شود. گیاه در هنگام تنش شوری با بسته شدن روزنه ها، با کاهش دی اکسید کربن و $NADPH^+$ روبه رو می شود برای رفع این مشکل بیان آنزیم های

با این تفاسیر از آنجایی که کاهش فعالیت این آنزیم منجر به افزایش حساسیت به شوری می گردد، لذا کاهش بیشتر این آنزیم در ژنوتیپ های حساس ممکن است نتیجه حساسیت ساختاری بیشتر این ارقام در برابر تنش باشد. به طور کلی چرخه گلوکاتایون آسکوربات نقش مهمی در ایجاد سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو دارد و افزایش فعالیت آنزیم های آن باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می شود و برعکس کاهش فعالیت آنزیم های آن باعث افزایش خسارت های تنش اکسیداتیو می شود (Khanna-Chopra & Selote, 2007). کاهش فعالیت این آنزیم ها در شرایط تنش به علت افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و غیرفعال شدن آنزیم ها بر اثر واکنش با آنها است (Dat et al., 1998). نتایج حاصل از فعالیت این آنزیم ها نشان می دهد که حفاظت در برابر خسارت اکسیداتیو توسط سطوح بالایی از آنتی اکسیدانت ها و نیز وجود یک چرخه فعال آسکوربات گلوکاتایون ممکن است نقش مهمی در افزایش تحمل شوری در جو داشته باشد.

یکی از پروتئین های شناسایی شده در مطالعات پروتئومیکس سیستمین سینتاز می باشد (جدول ۲- که یک آنزیم کلیدی در بیو سنتز سیستمین می باشد و بطور معنی داری در پاسخ به تنش به ویژه در ژنوتیپ متحمل افزایش بیان نشان میدهد. این امر نشان دهنده افزایش میزان سیستمین سلولی می باشد. سیستمین یکی

درگیردر فتوسنتز و تولید انرژی افزایش می یابد تا تنش شوری با افزایش بیان پروتئین‌های پاسخ دهنده به تبعات ناشی از کاهش فتوسنتز را جبران نمایند. به طور کلی چنین نتیجه گیری می‌شود که گیاه در برابر تنش تنش شوری عکس العمل نشان می‌دهد.

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
2. Asada, K. (1994). *Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues*. In: Foyer C. & Mullineaux P.M. (eds), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, London, pp, 77–100.
3. Bailly C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93–107.
4. Baum, M., Grando, S. & Ceccarelli, S. (2004). Localization of *quantitative trait loci for dryland characters in barley by linkage mapping*. *Challenges and Strategies for Dryland Agriculture*, (vol. 32). (pp. 191–202). CSSA Special Publication.
5. Bor M., Özdemir F. & Türkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, 164, 77–84.
6. Bradford, M. M. (1976). *Anal Biochemistry*, 72, 248–254.
7. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidase. *Methods Enzymol*, 2, 764–775.
8. DadashiDooki A. and Mayer-posner F J, Askari H., Ziaee A. A., Salekdeh G H (2006) Proteomic response of rice young panicles to salinity. *Proteomics*, 6: 6498-6507.
9. Damerval, C., De vienne, D., Zivy, M. & Thiellement, H. (1986). Technical improvement in two-Dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7, 52-54.
10. Dat, J. F., Lopez-Delgado, H. Foyer, C. H. & Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermo tolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116, 1351–1357.
11. Demiral, T., & Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 247–257.
12. Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science (Limerick)*, 11135, 11–19.
13. Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., Mariana, S., Miranda, N. D., Barrier, M. & Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1697-1709.
14. Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. & Rebeille, F. (2001). The glycine decarboxylase system a fascinating complex. *Trends Plant Science*, 6, 167-176.
15. Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I. & Salema, R. (2004). Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annals of Applied Biology*, 145(2), 185–192.
16. Hajheydari, M., Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I. & Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research*, 6, 1451-1460.
17. Jiang, Y., & Huang, B. (2001). Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turf grasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Science*, 41, 436–442.
18. Khanna-Chopra, R., & Selote, D. S. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 276–283.
19. Kim, D. W.R., Agrawal, G. K., Jung, Y.H., Shibato, J., Jwa, N.S., Trahashi, Y., Iwahashi, H., Kim, D.H., Shim, I.S. & Vsui, K. (2005). Ahydrophobic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis*, 6, 175-182.
20. Kitajima, S. (2008). Hydrogen Peroxide-mediated Inactivation of Two Chloroplastic Peroxidases, Ascorbate Peroxidase and 2-Cys Peroxiredoxin. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 1404–1409.
21. Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. & Kondo, N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 112, 279–290.
22. Lee, D. H., Kim, Y. S. & Lee, C. B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 158, 737–745.

23. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(11), 177–237.
24. Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G. & Foyer, C. H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letter*, 378, 203–206.
25. Moradi, F., & Abdelbaghi, M. I. (2007) . responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*, 99, 1161–1173
26. Moran, J. F., Becana, M. I., Iturbe-Ormaetxe, S., Frechilla, R., Klucas, V. & Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194, 346–352.
27. Naghib, A., Dong-Gi, L., Iftekhar, A., Piljoo, K., jeungjoo, L., Young-ock, A., Sang-soo, K., Ine-Jung, L., Jeong Dong, B., Kyu Young, K., Jenny, R., Setsuku, K. . & Byung-Hyun, L. (2008) . Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, 8, 3561-3576.
28. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867–880.
29. Noctor, G. & Foyer C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279.
30. Peskan-Berghofer, T., Neuwirth, J., Kusnetsov, V. & Oelmüller, R. (2005). Suppression of heterotrimeric G-protein β -subunit affects anther shape, pollen development and inflorescence architecture in tobacco. *Planta* , 220, 737–746.
31. Rajguru, S. N., Banks, S. W., Gossett, D. R., Lucas, M. C. & Millhollon, E. P. (1999) .Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. *Journal of Cotton Science*, 3, 11–18.
32. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B. & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2, 1131–1145.
33. Schachtman, D.P. & Liu, W.H. (1999). Molecular pieces to the puzzle of interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Science*, 4,281-287.
34. Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. & Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*. 112, 487–494.
35. Shalata, A., & Tal, M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 104, 169–174.
36. Smith, I. K., Vierheller, T. V. & Thorne C. A. (1988). Assay of Glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic Acid). *Analytical Biochemistry*, 175, 408–413.
37. Streb, P. & Feierabend, J. (1996). Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta*, 109, 125–132.
38. Wang, J., Zhang, H. & Allen, R. D. (1999). Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*, 40, 725–732.