جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال اول، شماره اول و دوم، پاییز و زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۲۴-۱۳
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۹/۲۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۱/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۲/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۰۳/۱۰

بررسی تغییرات پروتئینی در برگ گیاه *Lycopersicon esculentum* cv. Isfahani تحت تنش شوری با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی

فریبا امینی[1*]، علی‌اکبر احسانپور[2]
[1*] دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
[2] دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

شوری آب یا خاک، یکی از تنش‌های اصلی است و به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک می‌تواند اثری منفی بر تولید محصول بگذارد. به نظر می‌رسد که گیاهان با مکانیسم‌های پیچیده‌ای در سطح کل گیاه، سطح سلولی و یا مولکولی به تنش پاسخ می‌دهند. از جمله این پاسخ‌ها تغییر در پروتئین‌های درگیر در مسیرهای سیگنالی تنش، پروتئین‌های مخصوص سم‌زدایی تنش اکسیداتیو و پروتئین‌های با اعمال غیر مستقیم با تنش هستند. نتایج SDS-PAGE تحقیق حاضر برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها تحت تنش شوری در گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی همراه با کاهش بیان پروتئین‌های ۴۰، ۹۱ و ۱۱۰ کیلو دالتونی برگ و افزایش بیان پروتئین‌های ۲۶، ۲۰ و ۵۰ کیلو دالتون ساقه و ۳۰ و ۷۵ کیلو دالتون ریشه بود. الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های برگ‌های تحت تنش شوری نیز نشان‌دهنده اختلافاتی در شدت نقاط پروتئینی برگ نسبت به گیاهان کنترل بود. در این گیاه ۱۸ لکه پروتئینی به وسیله تنش تغییر نمودند. این لکه‌های پروتئینی دردو گروه کلی جای گرفتند: ۱- لکه‌های پروتئینی که بیان آنها در گیاهان تحت تنش شوری افزایش یا کاهش یافته بود و ۲- لکه‌های پروتئینی که در گیاهان تحت تنش شوری پدیدار گشته و یا ناپدید شده بودند. از نتایج این مقاله می‌توان دریافت که شوری بر رشد و متابولیسم گیاهان تأثیر گذاشته، همچنین سبب تغییرات مهمی‌در بیان ژن‌های گیاهان می‌گردد و در نهایت به تجمع یاکاهش متابولیت‌های مهمی منجر می‌گردد که در اثر عدم توازن در پروتئین‌های سلولی به وجود می‌آیند. این تغییرات در جهت برقراری مجدد هومئوستازی گیاه و مقاومت در برابر تنش شوری است.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز دوبعدی، تنش شوری، گیاه گوجه‌فرنگی

مقدمه

سازگاری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی به وسیله شبکه‌های مولکولی آبشاری کنترل می‌شود. این مکانیسم‌های پاسخ‌دهنده نسبت به تنش، برای برقراری مجدد هومئوستازی و حفاظت و ترمیم پروتئین‌ها و غشاهای آسیب دیده فعال می‌شوند (Wang *et al.*, 2003). در

نویسنده مسؤول مکاتبات
* f-amini@araku.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقایسه با مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی که اغلب عوامل تک ژنی هستند، پاسخ‌های پیچیده ژنتیکی نسبت به تنش‌های غیر زیستی چند ژنی هستند، بنابراین، برای کنترل و مهندسی مشکل‌تر هستند. راهکارهای مهندسی گیاهان برای مقاومت نسبت به تنش‌های غیر زیستی بر بیان ژن‌هایی که در مسیرهای سیگنالی و تنظیمی درگیرند، یا ژن‌هایی که پروتئین‌های مقاومت نسبت به تنش را کد می‌کنند، یا آنزیم‌های موجود در مسیرهایی که به سنتز متابولیت‌های ساختاری و عملکردی منجر می‌شوند، تکیه دارند (Vinocur and Altman, 2005).

در طی شناسایی پروتئین‌های مرتبط با تنش شوری در گیاه توتون ، یک پروتئین ۲۶ کیلو دالتونی به نام اسموتین شناسایی گردیده است (Singh *et al.*, 1987). در گیاه جو، دو پلی پپتید ۲۶ کیلو دالتونی به نام جرمین شناسایی شده است که این دو پروتئین در پاسخ نسبت به تنش شوری افزایش یافتند.

Lopez و همکاران در سال ۱۹۹۴ نیز یک پروتئین ۲۲ کیلو دالتونی را در پاسخ نسبت به تنش شوری در گیاه تربچه پیدا نمودند. در گیاه *Eleusine coracona*، Uma و همکاران در سال ۱۹۹۵ پروتئین‌های ۲۳، ۲۴ و ۵۴ کیلو دالتونی را در تنش شوری و خشکی مشاهده نمودند. همچنین Yamada و همکاران در سال ۲۰۰۲ طی تحقیقاتی در مورد بررسی مکانیسم‌های مقاومت نسبت به تنش شوری در یک گیاه مانگرو به نام *Bruguiera sexangula*، پروتئین مخصوصی به نام آلن اکسید سیکلاز (AOS) را پیدا کردند که در ارتباط با افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش شوری بود. آنها این پروتئین را مانگرین نامیدند. به طور مشابه، بیان پروتئین مانگرین در لاین‌های سلولی ساکارومیسس سرویزیه و گیاه توتون نیز مقاومت نسبت به تنش شوری در این گونه‌ها را افزایش می‌دهد.

همچنین در ارتباط با نقش آنتی اکسیدان‌های مختلف در مقاومت نسبت به شوری گیاه گوجه‌فرنگی، Mittova و همکاران در سال ۲۰۰۲ دریافتند که گوجه‌فرنگی‌های با مقاومت بیشتر نسبت به شوری مثل *L. pennellii* در مقایسه با گونه زراعی گوجه‌فرنگی افزایش بیشتری در آنزیم‌هایی مثل SOD (سوپر اکسید دیسموتاز) و APX (آسکوربات پراکسیداز) داشتند. مکانیسم مقاومت نسبت به شوری در گیاه وقتی که پاسخ گیاه، نسبت به تغییر غلظت نمک محیط کشت و شرایط محیطی که گیاه در آن رشد کرده است تغییر کند، پیچیده‌تر می‌گردد.

پروتئومیکس شامل مطالعه تغییرات ساختمانی و فراوانی پروتئین‌ها در پاسخ نسبت به حالات نموی و تنش‌های محیطی است. بنابراین، می‌توان در مورد پروتئومیکس تنش شوری یا تنش خشکی با انتظار فهم این موضوع که چگونه سلول‌ها و موجودات زنده نسبت به این تنش‌ها در سطح پروتئین پاسخ می‌دهند، صحبت نمود. با استفاده از این روش می‌توان هزاران پروتئین متفاوت را جداسازی و اطلاعاتی مثل نقطه ایزوالکتریک پروتئین، وزن مولکولی و مقدار هر پروتئین را تعیین نمود. این تکنیک تنها روش توانمندی است که قادر به شناسایی و تعیین تغییرات پس از ترجمه ژنوم است همچنین ابزار مناسبی برای مطالعه بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده نسبت به تنش‌ها است (Zivy and de Vienne, 2000).

بررسی‌های پروتئومیکس در ریشه گیاه برنج نشان داد که تنش شوری موجب تغییراتی کیفی در پروتئین‌ها می‌گردد. از جمله این تغییرات، تغییر در یک پروتئین ۲۲

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کیلو دالتونی بود که تحت تنش شوری افزایش بیان پیدا نمود. این پروتئین از پروتئین‌های پاسخ‌دهنده نسبت به تنش است، یا در طی رسیدن میوه سنتز می‌شوند. پروتئین دیگری که با آسکوربات پراکسیداز همولوژی دارد نیز تحت تنش در ریشه برنج افزایش بیان پیدا نمود. این پروتئین، تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن را راه‌اندازی می‌کند و موجب حفاظت سلول‌ها در مقابل گونه اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) می‌گردد. احتمالاً گونه‌های مقاوم نسبت به تنش شوری، با توانایی تجمع بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت عمل می‌نمایند. در تخمک‌های کتان کشت‌شده در شرایط کشت در شیشه، مقاومت نسبت به تنش شوری با میزان بالاتر سطح آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز همراه است و ظرفیت افزایش سوپر اکسید دیسموتاز بیشتر می‌شود. بیان بیش از حد ژن آسکوربات پراکسیداز پراکسیزومی گیاه آرابیدوپسیس در گیاه تنباکو حفاظت علیه تنش اکسیداتیو را در این گیاه افزایش می‌دهد (Rajguru *et al.*, 1999).

آنزیم دیگری که در اثر تنش شوری در ریشه گیاه برنج تغییر می‌نماید Caffeoyl-Coa O Methyltransferase است که نقشی اساسی در سنتز واحدهای لیگنین guaiacyl مثل حمایت از گوهر مایه‌ها برای سنتز واحدهای syringyl لیگنین دارد که در تنش شوری در ریشه رقم مقاوم نسبت به تنش شوری برنج افزایش بیان یافته است. احتمالاً تغییرات در چوبی شدن، در حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی مهم است (Ye *et al.*, 2001).

در این تحقیق، تغییرات الگوی الکتروفورزی برگ گیاه گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی به منظور بررسی تغییرات پروتئینی برگ این گیاه تحت تنش شوری با استفاده از روش SDS PAGE والکتروفورز دوبعدی 2DE بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها

استخراج پروتئین‌های محلول برای انجام الکتروفورز

برای استخراج پروتئین‌های محلول، قطعات برگ گیاهان گوجه‌فرنگی که به مدت ۲۹ روز در محیط کشت‌های بدون نمک NaCl و محیط کشت‌های دارای ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی‌مولار نمک NaCl رشد کرده بودند به طور جداگانه با کمک ازت مایع کاملاً به صورت پودر در آمدند. سپس بافت نرم شده به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و به نسبت ۱ گرم بافت به ۳ سی‌سی بافر استخراج (Tris- HCl, 50 mM; PMSF, 1mM; EDTA, 2mM; Mercaptoethanol, 1mM; pH 7.2) به لوله‌ها افزوده گردید. سپس لوله‌های حاوی محلول به مدت ۴-۳ ساعت در دمای $4\ ^{\circ}C$ روی شیکر با دور rpm ۵۰ قرار داده شد و پس از آن به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ و $4\ ^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. پس از آن روشناور مربوطه جمع‌آوری و به وسیله استون سرد (۱حجم نمونه به ۳ حجم استون) رسوب داده شد دو در دمای $-20\ ^{\circ}C$ فریزر به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد و پس از آن مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰rpm در $4\ ^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. در این مرحله روشناور به آرامی خالی گردید و رسوب حاصله در دمای اتاق کاملاً خشک شد و پس از آن به این رسوب مقدار کمی از بافر استخراج (حدوداً ۳۰۰ میکرولیتر) افزوده شده، با دقت رسوب موجود حل گردید و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰rpm در $4\ ^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. از این روشناور برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE استفاده شد (Kim *et al.*, 2001).

تهیه ژل، آماده‌سازی عصاره‌های پروتئینی و انجام الکتروفورز

در این تحقیق از ژل جدا کننده ۱۲ درصد و ژل توده کننده ۵ درصد استفاده گردید. برای آماده‌سازی عصاره‌های پروتئینی، به ۱۲ میکرو لیتر از هر یک از عصاره‌های پروتئینی ۳ میکرولیتر از بافر نمونه (Tris-HCl, 1M; Glycerol, 25%, SDS 10%; Bromophenol blue, 1%; 2 mercaptoethanol, 0.5 ml; pH 6.8) افزوده گردید و عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با درجه حرارت $100^{\circ C}$ حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها در چاهک‌ها تزریق گردید. در مدت زمان انجام الکتروفورز ولتاژ دستگاه در ساعت اول روی ۵۰ ولت و در ساعت دوم به بعد روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید (Hames and Rickwood, 1990).

تثبیت پروتئین‌ها، رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری از ژل

ابتدا ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تثبیت کننده (۳۰ درصد متانول، ۷ درصد اسید استیک) قرار داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول رنگ (۴۰ درصد متانول، ۱۰ درصد اسید استیک گلاسیال و۰/۰۴ گرم کوماسی بریلیانت بلو) قرار داده شد تا زمینه ژل به طور کامل رنگ گرفت. برای رنگبری از ژل از محلول رنگ بر (۱۵ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک گلاسیال) به مدت یک ساعت بر روی شیکر استفاده گردید (Reed *et al*, 1998). سپس برای حفظ نتایج با کمک جعبه روشن و دوربین دیجیتال از ژل‌ها عکس گرفته شد.

الکتروفورز پروتئین‌ها به روش الکتروفورز دو بعدی

برای بررسی تغییر نوع پروتئین‌ها یا افزایش و کاهش بیان آنها از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید. این آنالیز بر روی برگ گیاهان گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی رشد کرده در ۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌مولار نمک NaCl استفاده گردید. این آزمایش در ۵-۳ تکرار در هر غلظت نمک انجام گرفت.

استخراج پروتئین برای الکتروفورز دو بعدی

استخراج پروتئین برای انجام الکتروفورز دو بعدی با روش Tsugita and Kamo (1999) انجام گرفت؛ به این صورت که ابتدا برگ‌های جوان گیاهانی که یک ماه از تاریخ کشت بذر آنها می‌گذشت (۳-۱ از رأس) با کمک ازت مایع کاملا به صورت پودر در آمدند، سپس در محلول استون سرد دارای (w/v)۱۰٪ تری کلرواستیک اسید (TCA) و (w/v) ۰/۰۷ بتا مرکاپتواتانول در $^{\circ C}$ ۸۰- به مدت ۶ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با اولترا سانتریفیوژ با دور rpm ۳۰۰۰۰ در $^{\circ C}$ ۴ سانتریفیوژ گردید و پس از دور ریختن روشناور، رسوب حاصله در محلول ۰/۰۷ درصد بتا مرکاپتو اتانول در استون دارای ۱ mM PMSF و ۲ mM EDTA حل شد و به مدت یک ساعت در فریزر $^{\circ C}$ ۲۰- انکوبه گردید و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه با rpm ۳۰۰۰۰ و در دمای $^{\circ C}$ ۴ سانتریفیوژ گردید. این عمل حدود ۵-۴ بار؛ یعنی تا زمانی که روشناور کاملا شفاف و بی‌رنگ گردید، تکرار شد و پس از آن پس از خالی کردن کامل روشناور رسوب حاصله در دمای اتاق لیوفیلیز گردید. سپس ۵ میلی‌گرم از پودر لیوفیلیزه شده در ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ۹/۹ مولار اوره، ۲ مولار Thurea، CHAPS (Zwitterionic detergent) ۴٪، ۱۰۰mM DTT (Dithiothreitol)، دو درصد آمفولین با محدوده pH ۴ تا ۷ به صورت سوسپانسیون درآمد و در دمای اتاق به مدت یک ساعت انکوبه گردید و پس از آن با rpm ۳۰۰۰۰ در $^{\circ C}$ ۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور حاصله برای سنجش کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد Bradford (1978) و

سنجش کیفی به روش الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید.

انجام الکتروفورزدوبعدی

مرحله اول الکتروفورز Iso Electro Focusing (IEF)

۳۰۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه با مقدار لازم از Rehydration buffer مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور با دمای $^{\circ}C$ ۲۵ قرار داده شد تا موجب حلالیت بهتر پروتئین‌ها گردد. سپس نوارهای مخصوص IEF (IPG) را در جای مخصوص قرار داده شد و مواد آماده شده در سراسر نوار پخش گردید. سپس روی هر نوار با ۳ میلی‌لیتر Mineral oil پوشانده شد و نوارها به ترتیب در دستگاه مخصوص Run کردن ژل‌ها IPGphor instrument (Amersham Pharmacia Biotech, UK) چیده شدند و پس ازآن به دستگاه به صورت زیر برنامه داده شد:

1- Rehydration	7 h
2- Step-n-hold	30V/5h
3- Step-n-hold	200V/30 min
4- Gradiant	500V/1 min
5- Gradiant	8000V/45 min
6- Step-n-hold	8000V/9h
7- Step-n-hold	8000V/8h

پس از اتمام Run شدن ژل‌ها، بعد دوم الکتروفورز، انجام گردید.

بعد دوم الکتروفورز SDS- PAGE

برای انجام بعد دوم الکتروفورز پروتئین‌ها از ژل اکریلامید ۳۰٪ استفاده گردید و طبق برنامه زیر عمل Running انجام گرفت:

Running program

Step 1	5 W/1 plate/ 1 h
Step 2	10 W/1 plate/ 2 h
Step 3	120 W/ ∞

تا زمان Run شدن کامل ژل‌ها دما در $^{\circ}C$ ۲۰ تنظیم گردید (Laemmli, 1970). رنگ‌آمیزی ژل‌ها نیز به روش نیترات نقره انجام گرفت (Lee *et al.*, 2007).

نتایج

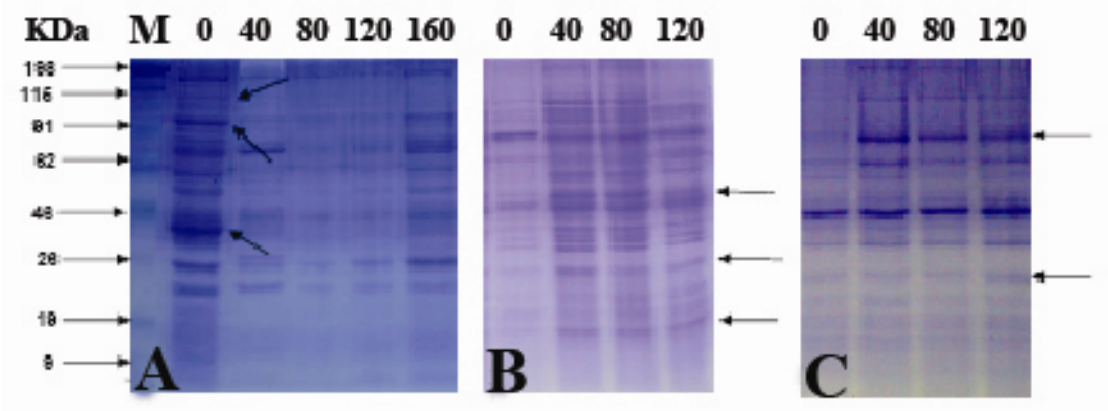
الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین‌ها

برای بررسی تغییرات الگوی پروتئین‌های محلول از غلظت‌های ۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار نمک NaCl استفاده گردید و پروتئین‌های گیاهان کنترل و تحت تنش شوری همزمان در ۳ جداکشت برگ، ساقه و ریشه گیاهان به طور همزمان بررسی گردید. در هر ۳ جداکشت، الگوی پروتئین‌های گیاهان تحت تنش با گیاهان کنترل تفاوت داشت. برای مثال، در جداکشت برگ با افزایش غلظت نمک در محیط کشت بیان پروتئین‌های حدود ۴۰، ۹۱ و ۱۱۰ کیلو دالتون کاهش یافت، در حالی که در جداکشت ساقه بیان پروتئین‌های حدود ۲۰، ۲۶ و ۵۰ کیلو دالتون افزایش پیدا نمود. در ریشه نیز بیان دو پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۰ و ۷۵ کیلو دالتون افزایش یافت (شکل ۱).

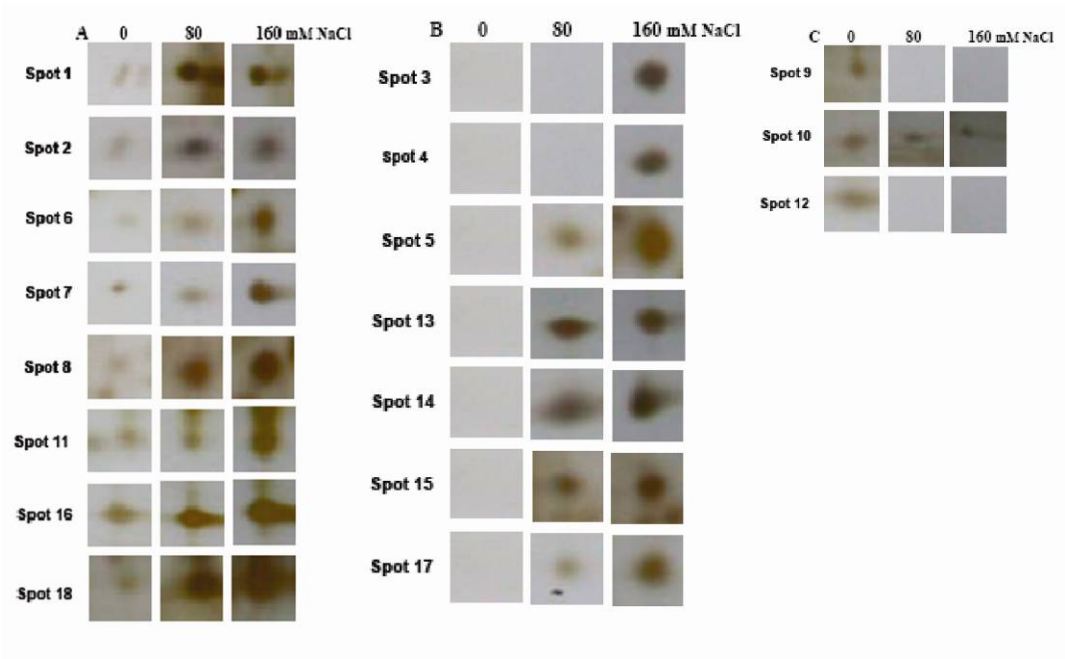
نتایج حاصل از الکتروفورز دو بعدی (2-DE) پروتئین‌ها

برای بررسی دقیق‌تر تغییرات پروتئینی برگ گیاهان تحت تنش غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌مولار نمک NaCl از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید. به منظور مجزا نمودن پاسخ گیاهان نسبت به تنش شوری از تغییرات نموی گیاهان در تجمع پروتئین‌ها و به حداقل رساندن خطای آزمایش، برگ‌های گیاهان کنترل و تیمار شده در یک زمان برداشت شده و آزمایش گردیدند. در آزمایش‌های الکتروفورز دو بعدی، اختلافاتی در شدت نقاط پروتئینی بین گیاهان کنترل و تحت تنش شوری مشاهده گردید. از

بین بیش از ۲۰۰ لکه پروتئینی بررسی شده، ۱۸ لکه به وسیله تنش تغییر نمودند. این لکه‌های تغییر یافته در اثر تنش در سه گروه جای گرفتند: ۱- لکه‌های پروتئینی که بیان آنها در گیاهان تحت تنش شوری افزایش یافته بود؛ ۲- لکه‌های پروتئینی که در گیاهان تحت تنش شوری به وجود آمده بودند و ۳- لکه‌های پروتئینی که در گیاهان تحت تنش شوری بیان آن‌ها کاهش یافته یا ناپدید شده بودند (شکل ۳).

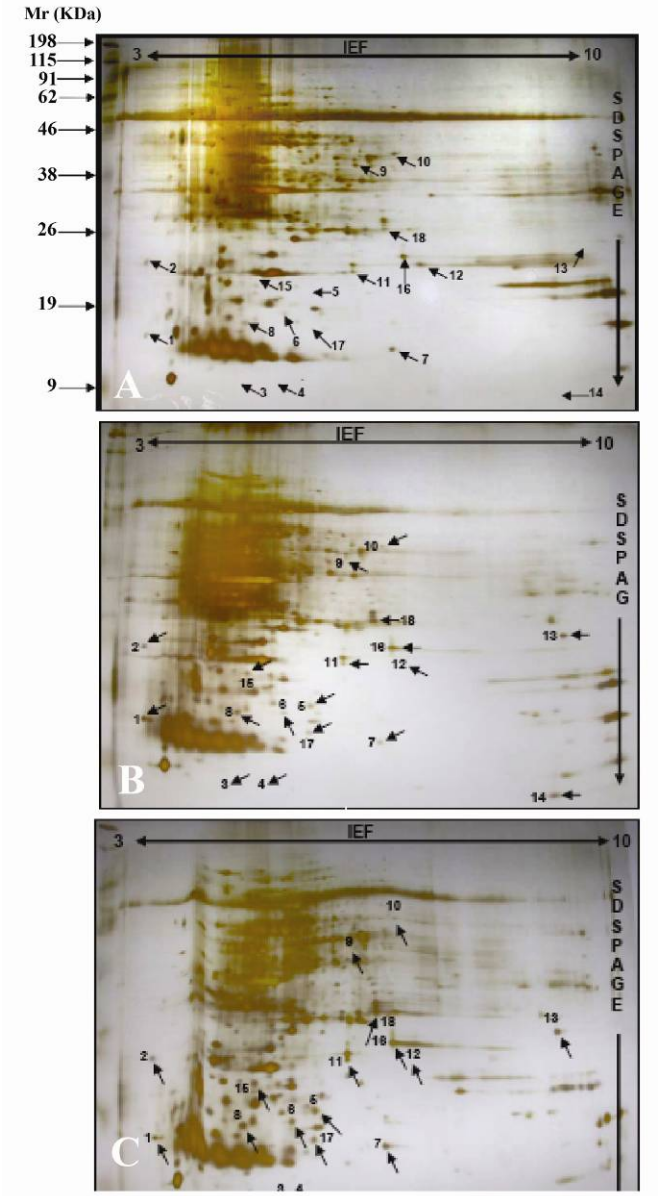


شکل ۱- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ (A)، ساقه (B) و ریشه (C) رقم اصفهانی گیاه گوجه‌فرنگی در غلظت‌های مختلف NaCl.(mM) (در ۱۶۰ میلی‌مولار نمک ریشه تولید نشد). M پروتئین مارکر



شکل ۳- جزئیات تغییرات پروتئینی برگ گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی گیاهان در غلظت‌های صفر، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌مولار نمک NaCl به دست آمده از الکتروفورز دو بعدی (2-DE): A) لکه‌های پروتئینی که بیان آنها در گیاهان تحت تنش شوری افزایش یافته است.؛ B) لکه‌های پروتئینی که در گیاهان تحت تنش شوری پدیدار شده‌اند.؛ C) لکه‌های پروتئینی که بیان آنها در گیاهان تحت تنش شوری کاهش یافته و یا ناپدید گشته‌اند.

لکه‌های پروتئینی با شماره‌های ۱، ۲، ۶، ۷، ۸، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ در گروه ۱، لکه‌های پروتئینی با شماره‌های ۳، ۴، ۵، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۷ در گروه ۲ و لکه‌های پروتئینی ۹، ۱۰ و ۱۲ در گروه ۳ جای گرفتند. نقاط ایزوالکتریک و وزن مولکولی هر لکه پروتئینی نیز تعیین گردید (شکل ۲ و جدول ۱). احتمالاً بسیاری از این پروتئین‌ها به طور اختصاصی در ارتباط با تنش شوری هستند که اثبات دقیق این موضوع نیازمند بررسی‌های بیشتر بعدی است.



شکل ۲- تغییرات الگوی پروتئین‌های محلول در الکتروفورز دو بعدی (2-DE) برگ گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی در گیاهان کنترل (A)، گیاهان رشد کرده در ۸۰ میلی‌مولار نمک NaCl (B)، و ۱۶۰ میلی‌مولار (C) به مدت ۲۹ روز. در IEF، ۱۵۰-۱۰۰ میکروگرم پروتئین روی نوارهای به طول ۲۴ سانتی متر به طور خطی و با pH= ۳-۱۰ لود گردید. SDS-PAGE نیز با استفاده از ژل‌های ۱۲/۵ درصد انجام گرفت. نقاط پروتئینی توسط رنگ‌آمیزی نیترات نقره آشکار گردید. نقاط پروتئینی متمایز در ژل‌های مختلف به وسیله فلش مشخص شده است.

جدول ۱- نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی حاصل از الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌های برگ گیاه گوجه‌فرنگی که تحت تنش شوری تغییر نموده‌اند.

شماره لکه پروتئینی	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک
۱	۱۶	۳/۴
۲	۲۴	۳/۴
۳	۹	۵/۲
۴	۹	۵/۵
۵	۲۱	۶
۶	۱۹	۵/۴
۷	۱۴	۷/۱
۸	۱۷	۴/۸
۹	۴۰	۶/۵
۱۰	۴۱	۷
۱۱	۲۲	۶/۴
۱۲	۲۴	۷/۲
۱۳	۲۶	۹/۵
۱۴	۸	۹/۴
۱۵	۲۱	۴/۹
۱۶	۲۵	۷
۱۷	۱۷	۶
۱۸	۳۰	۶/۸

بحث

وقتی گیاهان در معرض تنش شوری و خشکی قرار می‌گیرند، در سطح کل گیاه، سطح سلولی و یا مولکولی به تنش پاسخ می‌دهند. الگوی تولید بسیاری از پروتئین‌ها در پاسخ به کاهش آب گیاه تغییر می‌نماید که از جمله این پروتئین‌ها، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای سیگنالی تنش، پروتئین‌های مخصوص سم‌زدایی تنش اکسیداتیو و پروتئین‌های با اعمال غیر مستقیم با تنش هستند. به طور کلی، پاسخ‌های گیاه برای بقای هومئوستازی، سم‌زدایی مواد مضر و بازگشت رشد است (Hajheidari *et al.*, 2005). پس گیاهان برای مقابله یا کاهش آثار تنش شوری ممکن است الگوی بیان ژن‌ها و یا میزان پروتئین‌های درون بافت‌هایشان را تغییر دهند (Kanlaya *et al.*, 2005).

تغییرات پروتئین‌ها در SDS-PAGE

در چند سال گذشته، تغییرات پروتئین‌ها در اثر تنش شوری به منظور شناسایی و فهم نقش پروتئین‌ها در مقاومت نسبت به تنش شوری مورد توجه بسیار واقع شده است. به هر حال، هنوز نقش اکثر پروتئین‌ها در این خصوص ناشناخته است. تحقیقات مختلف، تعدادی از پروتئین‌ها را که در اثر تنش شوری القا می‌شوند، شناسایی کرده‌اند که این امر بازتابی از پیچیدگی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاهان در برابر تنش شوری هستند. از نتیجه این بررسی‌ها، چندین پروتئین شناسایی شده‌اند که در تنظیم انتقال سدیم یا پتاسیم نقش دارند (Maathuis and Ammtmann, 1999).

در هر حال، تغییرات پروتئینی به بخشی از گیاه که مطالعه می‌شود و طبیعت گونه گیاهی وابسته است؛ مثلاً در

گیاه برنج مقایسه نقشه پروتئینی پروتئین‌های ریشه و برگ گیاهان تیمار شده با نمک NaCl در مقایسه با گیاهان کنترل نشان داد که تیمار شوری تغییرات معنی‌داری را در الگوی پروتئین‌ها ایجاد می‌کند. در تحقیق حاضر نیز تیمار شوری موجب ایجاد تغییرات متفاوت و معنی‌داری در الگوی پروتئین‌های گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی گردید. در گیاه برنج تنش شوری موجب افزایش شدت باندهای پروتئینی ۹۰ کیلو دالتون در ریشه و ۲۲ و ۳۱ کیلو دالتون در نیام برگ‌ها گردید (Kanlaya *et al*., 2005).

در تحقیق حاضر نیز تنش شوری موجب افزایش بیان پروتئین‌های ۲۰، ۲۶ و ۵۰ کیلو دالتون ساقه و ۳۰ و ۷۵ کیلو دالتون ریشه گیاهان رقم اصفهانی گردید. بنابراین، بیان این پروتئین‌ها که در گیاهان کنترل نیز وجود دارند، به طور اختصاصی افزایش یافته است و احتمالاً این پروتئین‌ها در ارتباط با سازگاری گیاهان نسبت به تنش شوری هستند. تغییرات متفاوت بعضی از باندهای پروتئینی بین دو رقم اصفهانی و شیرازی نیز نشان دهنده این است که این تغییرات وابسته به ژنوتیپ گیاه هستند (داده‌ها نشان داده نشده است). در مقابل الگوی پروتئینی پروتئین‌های برگ گیاهان تحت تیمار شوری رقم اصفهانی اختلاف معنی‌داری نسبت به گیاهان کنترل نداشت، به جز اینکه شدت بعضی از باندهای پروتئینی، مثلاً باندهای در حدود ۴۰، ۹۱ و ۱۱۰ کیلو دالتون تحت تیمار شوری کاهش یافت. این نتایج مشابه با نتایج به دست آمده از تغییرات الگوی پروتئینی پروتئین‌های پهنک برگ گیاه برنج تحت تیمار شوری است (Kanlaya *et al*., 2005).

کاهش مقدار پروتئین‌ها می‌تواند در اثر کاهش میزان سنتز پروتئین، افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده پروتئین‌ها، کاهش آمینو اسیدهای در دسترس و یا دناتوره شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز آمینو اسیدها یا پروتئین‌ها باشد.

تغییرات پروتئین‌ها در 2-DE

اگر چه مقدار پروتئین‌ها، به ویژه پروتئین‌های با مقادیر کم همیشه با میزان mRNA مرتبط است، ولی به هر حال، بسیاری از پروتئین‌ها دستخوش تغییرات پس از ترجمه، مثل حذف سیگنال پپتیدها، فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون می‌شوند که این تغییرات نهایتاً برای فعالیت پروتئین‌ها و تعیین محل درون سلولی آنها مهم است. بنابراین، مطالعه پاسخ‌های گیاهان نسبت به تنش شوری درسطح پروتئین ضروری به نظر می‌رسد (Shunping *et al*., 2005).

به منظور تعیین ژن‌هایی که برای اصلاح گیاهان زراعی در محیط‌های با نمک زیاد و کمبود آب در دسترس گیاه اساسی‌اند، بررسی mRNA با تغییر میزان بیان، امکانات زیادی را فراهم می‌کند و بدون تحقیقات آینده، تعیین ژن‌های کاندیدای احتمالی، به خصوص شناخت این نکته که ممکن است بسیاری از mRNAها رونویسی نشوند، یا در سطح پروتئین یا فعالیت آنزیم تغییر کنند، مشکل به نظر می‌رسد، زیرا ممکن است این تغییرات بدون هیچ تغییر قابل اندازه‌گیری در فراوانی رونویسی و فقط به علت تغییرات هنگام ترجمه یا سایر سطوح کنترل باشد (Shunping *et al*., 2005).

بسیار فراوان دیده شده است که پاسخ‌های بیشماری از طرف گیاه نسبت به شوک‌های محیطی وجود دارد و بسیاری از تغییرات ژن‌ها در این ارتباط در بین چندین نوع تنش، مثل تنش سرما، شوری، گرما و تنش اسمزی مشترک هستند (Hajheidari *et al*., 2005). در تحقیق حاضر، الکتروفورز دو بعدی نشان داد که تنش شوری سبب اختلافات قابل مشاهده‌ای در گیاهان تحت تنش نسبت به

گیاهان کنترل می‌گردد. این امر می‌تواند به علت آثار بازدارندگی تنش شوری بر روی فرآیندهای رونویسی ژن‌ها باشد (Riccardi *et al.*, 1998).

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان حدس زد که تغییرات پروتئینی در برگ گیاه گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی با افزایش مقاومت نسبت به تنش شوری این گیاه به وسیله مکانیسم‌های متفاوت مرتبط است. مهم‌ترین این مکانیسم‌ها برای مقاومت نسبت به تنش شوری احتمالاً مرتبط با مسیرهای متابولیکی است که به افزایش مقاومت سلول‌ها در مقابله با حالات تنش منجر می‌شود که شناسایی دقیق‌تر این مکانیسم‌ها نیازمند آزمایش‌های تکمیلی آینده است.

منابع

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistery Quantities 72: 248-254.

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S. and Hosseini Salekdeh, Gh. (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics 5: 950-960.

Hames, B. D. and Rickwood, D. (1990. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Oxford University Press, New York.

Kanlaya, K. N., Sakda, D., Chaisiri, W., Sumontip, B., Manit, K. and Piyada, T. (2005) Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. Science Asia 31: 403-408.

Kim, S. T., Cho, K. S., Jang, Y. S., Kang, K. Y., (2001) Two-dimensional electrophoresis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. Electrophoresis 22:2103-2109.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bhak, J. D. and Lee, I. J. (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. Proteomics 7:3369–83.

Lopez, F., Vansuyt, G., Fourcroy, P. and Case- Delbart, F. (1994) Accumulation of a 22 KDa protein and its mRNA in the leaves of Raphanus sativus in response to salt stress or water stress. Plant Physiology 91: 605-614.

Maathuis, F. L. M. and Ammtmann, A. (1999) K+ nutrition and Na+ toxicity the basic of cellular K+/Na+ ratio. Annual Botany 84: 123-133.

Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M. (2002) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative Lycopersicon pennellii to salt-dependent oxidative stress: Increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. Free Radical Research 36: 195-202.

Rajguru, S. N., Banks, S. W., Gossett, D. R., Lucas, M. C. and Millhollon, E. P. (1999) Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. Journal of Cotton Science 3: 11-18.

Reed, R., Holmes, D., Weyers, J. and Jones, A. (1998) Practical skills in biomolecular sciences. Longman, Hongkong. Pp. 103-108.

Riccardi, F., Gazeau, P., de Vienne, D. and Zivy, M. (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Plant Physiology 117: 1253-1263.

Shunping, Y., Tang, Z., Su, W. and Sun, W. (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 5: 235-244.

Singh, N. K., Bracken, C. A., Hasegawa, P. M., Handa, A. K., Buckel, S., Hermodson, M. A., Pfankoch, F., Regnier, F. E. and Bressan, R. A. (1987) Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. Plant Physiology 85: 529-536.

Tsugita, A. and Kamo, M. (1999) 2-D electrophoresis of plant proteins. In: 2-D proteome analysis protocols (eds. Link, A. J.). Humana Press, Seattle 95-98.

Uma, S., Prasad, T. G. and Kumar, M. U. (1995) Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. Annual Botany 76: 43-49.

Vinocur, B. and Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. Current Opinion in Biotech 16: 123-132.

Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14.

Yamada, A., Saitoh, T., Mimura, T. and Ozeki, Y. (2002) Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in Escherichia coli, yeast and tobacco cells. Plant Cell Physiology 43: 903-910.

Ye, Z. H., Zhong, R., Morrison, W. H. and Himmelsbach, D. S. (2001) Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase and lignin biosynthesis. Phytochemistry 57: 1177-1185.

Zivy, M. and de Vienne, D. (2000) Proteomics: A link between genomics, genetics and physiology. Plant Molecular Biology 44: 575-580.