Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Proteomic analysis of rice roots under time-course drought stress condition

Parisa Asadzade
Master of Science, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: asadzadeh@yahoo.com

Mahmoud Toorchi
*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Sahel Safavi
Master of Science Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: sahel.safavi79@gmail.com

Setsuko Komatsu
Professor, Institute of Crop Science, NARO (NICS), Tsukuba, Japan. E-mail: skomatsu@affrc.go.jp

Abstract

Objective

Recent advancements in molecular biology and proteomics have generated significant hope for identifying candidate proteins associated with drought stress tolerance, which could facilitate essential steps in enhancing rice yield. The primary objective of this study was to comprehensively investigate the effects of drought stress on the morphological traits and the root proteome expression patterns of rice.

Materials and methods

The experiment was designed and executed as a completely randomized design (CRD) with three replicates under strictly controlled laboratory conditions within a growth chamber. Drought stress treatments consisted of four distinct conditions: normal irrigation (flooding) as a control, and drought stress imposed for durations of 24, 36, and 48 hours. To analyze protein expression patterns, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by Coomassie Brilliant Blue staining was employed. Statistically significant protein spots were identified using mass spectrometry and bioinformatic tools based on isoelectric point (pI), molecular weight (MW), and specialized protein databases. The measured morphological traits included proline content, root dry weight, root diameter, root volume, root number, root length, and the shoot-to-root length ratio.

Results

The findings demonstrated that drought stress induced significant changes in proline content, root dry weight, root diameter, and root volume; however, its effects on root number, root length, and the shoot-to-root length ratio were not statistically significant. Increasing the stress duration to 48 hours led to a substantial increase in root dry weight, whereas 24-hour stress resulted in a noticeable increase in root volume and diameter. Additionally, proline levels in the roots showed a significant increase after 36 hours of stress. Proteomic analysis revealed that among 135

identified protein spots, 14 exhibited significant changes in expression under drought conditions. The upregulation of ferredoxin-oxidoreductase played a crucial role in mitigating stress impacts, whereas ribosomal proteins, glyceraldehyde-3-phosphate, and ATP synthase were downregulated. Other proteins, including fructose-1,6-bisphosphate aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glycine dehydrogenase, and chitinase, initially showed decreased expression but exhibited an increasing trend as the stress duration reached 48 hours.

Conclusion

This study demonstrated that drought stress triggers significant structural changes in the roots and modulates the expression of specific proteins in rice, which are vital for plant adaptation mechanisms. The upregulation of ferredoxin-oxidoreductase and the dynamic expression of other proteins elucidate the molecular mechanisms of plant stress resistance. These findings can serve as a valuable foundation for the genetic improvement of rice varieties to enhance drought tolerance.

Keywords: proteomics, proteomics, root morphological traits, two-dimensional electrophoresis

Paper Type: Research Paper

Citation: Asadzade, P., Toorchi, M., Safavi, S., & Komatsu, S. (2026). Proteomic analysis of rice roots under time-course drought stress condition. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(4), 65-86.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 65-86. DOI: 10.22103/jab.2026.25245.1707

Received: May 13, 2026. Received in revised form: July 20, 2026.

Accepted: July 21, 2026. Published online: August 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is a staple food crop for more than half of the world's population, and its productivity is increasingly threatened by abiotic stresses, particularly drought. As climate change intensifies, water scarcity has emerged as a critical challenge to sustainable agriculture and food security. Drought stress affects rice at multiple developmental stages, leading to morphological, physiological, and molecular alterations that compromise yield and quality. Understanding the mechanisms underlying drought tolerance is essential for breeding resilient cultivars. Recent advances in molecular biology and proteomics have enabled researchers to investigate stress-responsive proteins that mediate adaptation to environmental challenges. Proteomic profiling, especially using two-dimensional electrophoresis (2-DE), allows for the identification of differentially expressed proteins under stress conditions, offering insights into the biochemical pathways involved in drought response. This study focuses on the proteomic and morphological changes in rice roots subjected to time-course drought stress, aiming to identify key proteins and traits associated with tolerance mechanisms.

Materials and Methods

The experiment was conducted using the Hashemi rice cultivar, known for its agronomic importance in northern Iran. Seeds were sterilized and germinated under controlled laboratory

conditions. Plants were grown in one-liter pots filled with a 1:1 mixture of agricultural soil and organic manure. Environmental parameters were tightly regulated: temperature at 24°C, relative humidity at 95%, and a photoperiod of 12 hours light. Drought stress was imposed by withholding irrigation for 24, 36, and 48 hours, while control plants were maintained under regular flooding conditions. The experiment was carried out in completely randomized design with three replications. Morphological traits including root dry weight (mg), root diameter (mm), root volume (mm^3), root length (cm), number of roots, shoot-to-root length ratio were measured along with proline content. Protein extraction from root tissues involved homogenization in phosphate buffer, centrifugation, precipitation with trichloroacetic acid (TCA), and washing with cold ethanol. The resulting protein pellets were solubilized in lysis buffer and subjected to 2 -DE. First-dimension isoelectric focusing (IEF) was performed using ampholytes of pH ranges 5–7 and 3.5–10, followed by second-dimension SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and scanned using a densitometer. Quantitative analysis of protein spots was conducted using PDQuest software. Statistically significant spots were identified *via* ANOVA and Duncan's multiple range test. Selected proteins were characterized using MALDI-TOF mass spectrometry and bioinformatics tools, including theoretical *pI* and molecular weight comparisons against protein databases.

Results

Drought stress significantly influenced several root traits. Root dry weight increased markedly after 48 hours of stress, indicating enhanced biomass allocation to roots under prolonged water deficit. Root volume and diameter showed significant increases after 24 hours, suggesting early adaptive responses to limited water availability. However, root length, number of roots, and shoot-to-root length ratio remained statistically unchanged across treatments. Proline accumulation was positively correlated with stress duration. A significant rise in proline content was observed after 36 hours, peaking at 48 hours. This accumulation likely contributes to osmotic adjustment and protection against oxidative damage. A total of 135 reproducible protein spots were detected across treatments. Fourteen spots exhibited significant changes in expression under drought stress. These proteins were categorized based on their functional roles. Stress mitigation and redox regulation; *Ferredoxin-NADP+ oxidoreductase* showed increased expression, suggesting its role in maintaining redox balance and mitigating oxidative stress. *GSH-dependent DHA reductase* was downregulated initially but stabilized over time, indicating dynamic antioxidant responses. Energy Metabolism and Photosynthesis; *ATP synthase α-chain* and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* were downregulated, reflecting reduced energy production under stress. *Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase* and *glucose-6-phosphate dehydrogenase* displayed biphasic expression patterns, with initial suppression followed by recovery at 48 hours. Nitrogen and amino acid metabolism; *Glycine dehydrogenase* showed fluctuating expression, possibly linked to nitrogen remobilization and osmolyte synthesis. Defense and structural proteins; *Chitinase* expression decreased initially but increased at 48 hours, suggesting its involvement in cell wall remodeling and defense. *Hypothetical proteins* and *ribosomal protein L11* exhibited variable expression, indicating potential roles in stress signaling and protein synthesis regulation. These findings highlight the temporal dynamics of protein expression in rice roots under drought stress. The upregulation of specific proteins at different time points suggests a coordinated response involving early signaling, metabolic adjustment, and structural reinforcement.

Conclusion

This study provides a comprehensive analysis of rice root responses to drought stress at both morphological and proteomic levels. The Hashemi cultivar demonstrated significant adaptive changes, including increased root biomass and proline accumulation, which are critical for water uptake and stress tolerance. Proteomic profiling revealed key proteins involved in redox regulation, energy metabolism, and structural defense. The increased expression of ferredoxin-NADP+ oxidoreductase and other stress-responsive proteins underscores their importance in mitigating oxidative damage and maintaining cellular homeostasis. The dynamic expression patterns observed across different stress durations suggest that rice roots employ a phased strategy to cope with drought, starting with osmotic adjustment and progressing to metabolic and structural adaptations. These insights contribute to the understanding of drought tolerance mechanisms and offer potential targets for genetic improvement. Future research should focus on validating the functional roles of identified proteins through gene expression studies and exploring their interactions within signaling networks. Integrating proteomic data with transcriptomic and metabolomic analyses will enhance our ability to breed rice varieties with superior drought resilience.

Author contributions

Conceptualization, Parisa Asadzade and Mahmoud Toorchi; methodology, Mahmoud toorchi; investigation, Parisa Asadzade; data curation, Parisa Asadzade; formal analysis, Setsuko Komatsu; writing-original draft, Sahel Safavi; writing-review & editing, Mahmoud Toorchi; supervision, Mahmoud Toorchi; project administration, Mahmoud Toorchi; funding acquisition, Mahmoud Toorchi. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability statement

Proteomic data generated in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors thank the University of Tabriz laboratory staff for technical support.

Ethical considerations

No human or animal subjects were involved; all procedures complied with institutional biosafety guidelines.

Funding

This research was funded by the Vice Chancellor for Research, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تجزیه پروتئوم ریشه برنج تحت دوره های زمانی تنش کمبود آب

پریسا اسدزاده

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: asadzadeh@yahoo.com

محمود تورچی

* نویسنده مسئول: استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

ساحل صفوی

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: sahel.safavi79@gmail.com

ستسوکو کوماتسو

استاد انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی، سوکوبا، ژاپن. رایانامه: skomatsu@affrc.go.jp

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۹

چکیده

هدف: پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی مولکولی و پروتئومیکس، امیدهای تازه‌ای برای شناسایی پروتئین‌های کاندیدای تحمل به تنش کمبود آب ایجاد کرده است تا بتوان گام‌های اساسی در بهبود عملکرد برنج برداشت. هدف اصلی این پژوهش، بررسی دقیق اثر تنش کمبود آب بر صفات مورفولوژیکی و الگوی بیان پروتئوم ریشه برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها: آزمایشی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کاملاً کنترل‌شده اتاقک رشد طراحی و اجرا گردید. تیمار کمبود آب شامل چهار شرایط مختلف شامل آبیاری عادی (غرقاب) و تنش کمبود آب به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بود. برای بررسی دقیق الگوی بیان پروتئین‌ها، از روش الکتروفورز دوبعدی (۲-DE) و رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو استفاده شد. جهت شناسایی لکه‌های پروتئینی که از نظر آماری معنی‌دار بودند، از روش طیف‌سنجی جرمی و ابزارهای بیوانفورماتیک بر اساس نقطه ایزوالکتریک *(pI)*، وزن مولکولی *(MW)* و بانک‌های اطلاعاتی تخصصی استفاده گردید. صفات اندازه‌گیری‌شده شامل میزان پرولین، وزن خشک، قطر، حجم، تعداد و طول ریشه و همچنین نسبت طول اندام هوایی به ریشه بودند.

نتایج: نتایج نشان داد که تنش کمبود آب باعث تغییرات معنی‌دار در صفات پرولین، وزن خشک، قطر و حجم ریشه شد، اما اثرات آن بر تعداد ریشه، طول ریشه و نسبت طول اندام هوایی به ریشه معنی‌دار نبود. افزایش مدت زمان تنش به ۴۸ ساعت منجر به افزایش چشمگیر وزن خشک ریشه گردید، در حالی که تنش ۲۴ ساعته باعث افزایش قابل‌توجه حجم و قطر ریشه شد. همچنین،

میزان پرولین ریشه پس از ۳۶ ساعت تنش افزایش نشان داد. بررسی پروتئوم ریشه نشان داد که از میان ۱۳۵ لکه پروتئینی، ۱۴ لکه تحت تنش کمبود آب تغییرات معنی‌دار در بیان داشتند. افزایش بیان پروتئین فردوکسین اکسیدوردوکتاز نقش مهمی در کاهش اثرات تنش داشت، اما پروتئین‌های ریبوزومی، گلیسرآلدئید ۳-فسفات و ATP سنتاز کاهش بیان داشتند. پروتئین‌های فروکتوز ۱،۶-بیس‌فسفات آلدولاز، گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز، گلایسین دهیدروژناز و کتیناز ابتدا کاهش بیان داشتند، ولی با افزایش مدت تنش به ۴۸ ساعت مجدداً روند افزایشی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تنش کمبود آب باعث تغییرات ساختاری در ریشه و تنظیم مجدد بیان پروتئین‌های خاص در برنج می‌شود که نقش مهمی در سازگاری گیاه دارند. افزایش بیان فردوکسین اکسیدوردوکتاز و تغییرات سایر پروتئین‌ها، مکانیسم‌های مقاومت گیاه به تنش را روشن ساخت. این یافته‌ها می‌توانند مبنای ارزشمندی برای بهبود ژنتیکی برنج جهت تحمل بهتر به تنش کمبود آب باشند.

کلیدواژه‌ها: الکتروفورز دو بعدی، پروتئومیک، پرولین، صفات مورفولوژی ریشه

نوع مقاله: پژوهشی

استناد: اسدزاده پریسا، تورچی محمود، صفوی ساحل، کوماتسو ستسوکو (۱۴۰۵) تجزیه پروتئوم ریشه برنج تحت دوره های زمانی تنش کمبود آب. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۴)، ۶۵-۸۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

برنج تنها غله پر مصرف است که برای مصرف مردم تولید می‌شود. تولید برنج به دلیل افزایش جمعیت جهان باید افزایش یابد. پیشرفت‌های اخیر در روش‌های بیولوژی مولکولی این امید را به وجود آورده است که با شناسایی پروتئین‌های کاندیدای مقاومت به تنش کمبود آب بتوان در افزایش عملکرد برنج گام‌های اساسی برداشت (Heydari, 2008). از عمده ترین محدودیت‌های تولید محصول برنج کمبود آب است. کمبود آب یکی از بحران‌های تهدید کننده امنیت غذایی در جهان است. خسارت کمبود آب وابسته به فاکتورهای زیادی نظیر میزان و توزیع بارندگی تبخیر و تعرق و ظرفیت ذخیره رطوبت در خاک است. سه مکانیسم کاهش سطح کانوپی و در نهایت کم شدن فتوسنتز کم شدن میزان جذب نور و کاهش شاخص برداشت باعث کاهش عملکرد در شرایط کمبود آب می شود (Earl & Davis, 2003). اثرات مختلفی که کمبود آب در گیاه دارد در برگیرنده تغییرات مورفولوژیکی تا مولکولی می‌باشد(Harris et al., 2002). بر اساس مطالعات که در گیاهان مختلف به عمل آمده است در شرایط کمبود آب پتانسیل جوانه زنی، اندازه هیپوکوتیل، وزن تر و خشک ریشه و ساقه کاهش می یابد در حالی که طول ریشه اضافه می‌شود. در برنج تنش کمبود آب در مرحله رویشی باعث کاهش رشد و توسعه گیاه می‌شود (Tripathy et al., 2000; Manikavelu et al., 2006). یکی از اثرات تنش پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشا به دلیل بالا رفتن انواع فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد (Hernandez et al., 2000; Sairam et al., 2002). آبشارهای پیام‌رسانی علامت در محلی که پیام‌های تنش کمبود آب دریافت می‌شود، موجب بیان بسیاری از ژن‌ها و فعال شدن مولکول‌های پیام رسانی می‌شوند. بسته شدن

روزنه ها از فرآیندهایی است که در پاسخ سلول‌های گیاهی به تنش کمبود آب مطرح است (Giraudat et al., 1994). فرآیند فسفوریلاسیون نقش مهمی در آبشارهای پیام‌رسانی علامت در گیاهان مختلف، مخمرها و حیوانات دارند. انواع مختلفی از پروتئین کینازها در گیاهان گزارش شده اند که در فرآیند فسفوریلاسیون مسیرهای مختلف پیام‌رسانی علامت از قبیل تنش کمبود آب و پاسخ به ABA نقش دارند (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996). تنش خشکی یکی از تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که باعث تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاه شده و اثرات منفی بر رشد گیاهان داشته و درنتیجه باعث کاهش عملکرد محصول می‌گردد. بروز تنش خشکی طی مراحل مختلف رشد، مخصوصا مرحله زایشی باعث کاهش طول دوره فتوسنتزی و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود (Mathivanan, 2021). راه انداز ژن‌های تنظیم شونده با ABA دارای یک توالی ۶ نوکلئوتیدی معروف به توالی پاسخ به ABA (ABRE) است که احتمالا به عوامل رونویسی دخیل در فعالسازی ژن‌های تنظیم‌شونده با ABA متصل می‌شود. راه انداز این ژن‌ها که توسط تنش اسمزی به یک شیوه وابسته به ABA تنظیم می شوند دارای توالی تنظیمی ۹ نوکلئوتیدی جایگزین به نام توالی پاسخ به پسابیدگی (DRE) است که توسط یکدسته جایگزین از پروتئین‌های تنظیم کننده رونویسی شناسایی می‌گردد. بنابراین ژن‌هایی که توسط تنش اسمزی تنظیم می‌شوند ظاهراً توسط مسیرهایی پیام‌رسانی علامت وابسته به ABA (ژن های وابسته به ABA) یا توسط یک مسیر مستقل از ABA مسیر پیام‌رسانی علامت حساس به تنش اسمزی تنظیم می شوند (Ebrahimzadeh et al., 2008). تنش‌های کمبود آب، سرما و شوری بالا بسیاری از ژنهای پاسخ به ABA را القا می‌کنند. زیرا راه انداز این ژن‌ها حاوی موتیف‌های پاسخ به ABA یا ABRE هستند (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). دومین مسیر وابسته به ABA از طریق تجزیه وتحلیل ژن *rd22* و دیگر ژن‌های پاسخ به تنش کمبود آب مشخص شده است (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1993). حداقل دو مسیر علامت دهی در تنظیم بیان ژن به شیوه مستقل از ABA دخالت می‌کند. عامل‌های رونویسی عمل کننده ترانس که DREB1 و DREB2 نامیده می‌شود و در راه انداز ژن‌های حساس به تنش، به توالی DRE متصل می‌شوند، ظاهراً توسط یک آبشار علامت دهی مستقل از ABA فعال می‌گردند. سایر ژن‌های مستقل از ABA و حساس به تنش اسمزی به طور مستقیم توسط آبشار علامت دهی MAP کیناز نظارت می‌شوند. به نظر می‌رسد که سایر تغییرات در بیان ژن از طریق سازوکارهای دیگری بدون مداخله DREB ها میانجی‌گری می‌شوند (Ebrahimzadeh et al., 2008). تشخیص مسیرهای وابسته ومستقل از ABA ممکن است در پائین دست اولین تنش مشخص شده و رخدادهای علامت دهی اتفاق افتد، و یا ممکن است ژن، دارای هر دوی توالی DRE و ABRE در ناحیه راه انداز خود باشد. برای مثال، درآرابیدوپسیس تنظیم ژن *rd29A* (که حاوی DRE و ABRE می‌باشد) در اولین ساعات پسابیدگی، مستقل از ABA ولی در مراحل بعدی بیان خود وابسته به ABA است (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). به طور مشابه ژن *dreb1* دارای یک موتیف حفاظت شده است که در توالی پاسخ به اتیلن ژن‌های خانواده پاسخ به اتیلن یافت می‌شود (Stockinger et al., 1997; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). دربررسی ژنوم برنج ۱۰ و ۴ هومولوگ برای ژن‌های *cbf/dreb1* و *dreb2* مشخص شده است. کنش این ژن‌ها (*cbf/dreb1* و *dreb2*) در القا از تنش در برنج نشان داده شده است. بیش‌بیان ژن *Osdreb1* در آرابیدپسیس نشان از کنش مشابه ژن‌های برنج در پاسخ به تنش دارد (Dubouzet et al., 2003). همچنین بیش‌بیان ژن *Osdreb1* و *dreb1* آرابیدوپسیس موجب افزایش مقاومت به کمبود آب و سرما در برنج شده است (Ito et al., 2006). جایگزینی ناگهانی ABA در ریشه‌ها از طریق آوند آبکش و افزایش غلظت آن در بافتها منجر به تغییرات فیزیولوژیکی عظیمی در

پاسخ گیاهان به تنش کمبود آب می‌شود (Zeevaart & Creelman, 1998). براساس مطالعات صورت گرفته مشاهده شده که تحت تنش‌های غیرزیستی میزان پرولین افزایش می‌یابد (Delauney & Verma, 1993). ژن‌های تنظیم کننده آنزیم دلتا پرولین-۵-کربوکسیلات در گیاهان متعددی از جمله برنج (Igarashi et al., 1997)، آرابیدوپسیس، یونجه وگوجه‌فرنگی (Fujita et al., 1998) همسانه‌سازی شده وآزمایشات نشان داده است که تظاهر آنزیم فوق در شرایط تنش‌های اسمزی و کمبود آب افزایش بیان داشته و این افزایش بیان بواسطه پیام‌رسانی پیام‌های وابسته به ABA و مستقل از آن اتفاق می‌افتد. تحقیقات نشان داده‌اند که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل APO، GR، CAT و SOD نقش کلیدی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب دارند (Sairam et al., 1998). ژنوتیپ‌هایی با پراکسیداسیون لیپیدی پایین و محتوای بالای کلروفیل II و کاروتنوئید مقاومت بیشتری به خشکی دارند. همچنین، تجمع اسمولیت‌ها در شرایط کمبود آب بدون تخریب عملکرد سلول مشاهده شده است (Ishitani et al., 1997). پروتئین‌های کانال آبی غشا نقش مهمی را در تنظیم اسمزی و اجتناب از کمبود آب ایفا می‌کنند (Fray et al., 1994). برخی پروتئین‌های حفاظت‌گر مکانیکی سلول تحت تنش اسمزی کاهش بیان داشته‌اند. پروتئین‌های حفاظتی شامل کلاس‌های مختلفی از پروتئین‌های جنین‌زایی تأخیری (LEA) نظیر دهیدرین‌ها هستند (Lisse et al., 1996). چاپرون‌ها برای ممعانت از ارتباط پروتئین‌های نامرتبط و پروتئینازها که پروتئین‌های غیرفعال را از بین می‌برد فعالیت می‌کنند (Williams et al., 1994). بسیاری از ژن‌های گزارش شده در پاسخ به تنش کمبود آب در گونه‌های مختلف وکنش بسیاری از پروتئین‌های رمز شده توسط آنها از طریق توالی‌یابی شناخته شده است. این ژن‌ها نه تنها از طریق کنش بلکه از طریق متابولیک پروتئین‌ها ژن‌های دخیل در پیام‌رسانی پیام در پاسخ به تنش کمبود آب را تنظیم می‌کنند. تولیدات این ژن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند. گروه اول پروتئین‌هایی که در مقاومت به کمبود آب نقش عملکردی دارند مانند: پروتئین‌های کانال آب که در حرکت آب از عرض غشا نقش دارند، پروتئین‌هایی که در حفاظت ماکرو مولکول‌ها نقش دارند مثل پروتئینLEA، اسموتین‌ها پروتئین‌های ممانعت کننده از یخ زدگی، چاپرون‌ها و پروتئین‌های متصل شونده به mRNA ها. گروه دوم پروتئینهایی هستند که در تنظیم پیام‌رسانی علامت و بیان ژن‌های پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. مانند: پروتئین کینازها، فاکتورهای رونویسی و فسفولیپازC. امروزه مشخص شده پروتئین‌های تنظیمی اهمیت بالایی در درک هرچه بیشتر پاسخ گیاهان به تنش کمبود آب دارند (Ingram & Bartles, 1996). پروتئوم به کل پروتئین‌های کد شده توسط ژن اطلاق می‌شود، و پروتئومیک مطالعه‌ای جامع از پروتئین‌ها شامل تغییرات ساختاری و فراوانی در پاسخ به عوامل محیطی است (Wilkins et al., 1996). تکنیک اصلی پروتئومیک، استفاده از ژل الکتروفورز دوبعدی است که برای بررسی تنش‌ها در ژن‌ها مفید است (Zivy & Devienne, 2000). پیشرفت‌های تکنیکی اخیر امکان استخراج بهتر پروتئین‌ها و بررسی و تحلیل آسان‌تر ژل‌ها را فراهم کرده است (Herbert, 1999; Molloy, 2000). پس از تکمیل توالی ژنوم، تلاش‌ها بر تشخیص عملکرد ژن‌ها و شناسایی پروتئین‌های مرتبط متمرکز شده است (Abbott, 1999). پروتئومیک همچنین برای مقایسه کیفی ژنوتیپ‌ها و بررسی کمی رفتار بافت‌ها کاربرد دارد (Leone et al., 1994). مطالعه‌ای روی پاسخ گیاهچه‌های برنج به تنش شوری و کمبود آب نشان داد که هر دو تنش موجب تغییرات پروتئینی مرتبط با تنش اسمزی می‌شوند (Komatsu et al., 2006). تحت تنش شوری، ۱۲ لکه پروتئینی و تحت تنش کمبود آب، ۵ لکه پروتئینی تغییر معنی‌داری داشتند. از این میان، ۳ پروتئین به طور خاص به تنش اسمزی پاسخ دادند. نتایج نشان داد که همه پروتئین‌های فعال در پاسخ به تنش اسمزی در سایر تنش‌ها فعال نیستند. علاوه بر این، بیان پروتئین بازدارنده پروتئاز در تنش اسمزی، کمبود آب و شوری افزایش یافت اما در تنش سرما تغییری نداشت (Toorchi et al., 2009). در آزمایشی روی

دو رقم برنج، گیاهان تحت تنش کمبود آب قرار گرفتند که موجب تغییرات معنی‌داری در ۴۲ لکه پروتئینی شـد و ۲۷ لکه پروتئینی الگوهای متفاوتی در دو رقم نشان دادند. پس از آبیاری مجدد، فراوانی نسبی بیشتر پروتئین‌ها به شرایط اولیه بازگشت (Salekdeh et al., 2002). در مطالعه ای دیگر دو رقم برنج با نام‌های IR 62266-42-6-2 و CT9993-5-10-M1 بررسـی شـدند (Kamoshiti et al., 2000). گیاهان تحت تنش کمبود آب قرار گرفتند و پس از کاهش ۴ کیلوگرم آب، آبیاری شـدند. بررسـی پروتئوم برگ‌ها ۲۰۰۰ لکه پروتئینی شناسایی کرد که از این میان، ۱۰۰۰ لکه قابل اعتماد بودند و ۴۲ تغییر کمی و کیفی در شرایط تنش و آبیاری مجدد مشاهده شد. این تغییرات توسط روش‌های آزمایشگاهی دقیق ثبت شدند. اهمیت این پژوهش در ارتقای درک سازوکارهای مولکولی پاسخ ریشـه برنج به تنش کمبود آب و فراهم‌سازی زمینه‌ای برای بهبود تحمل این گیاه به خشکی از طریق شناسایی پروتئین‌های کلیدی است.

مواد و روش‌ها

رقم مورد اسـتفاده در این آزمایش برنج رقم هاشـمی بود. این بذور از شـمال کشـور تهیه شـد و در شـرایط آزمایشـگاهی تحت شرایط کنترل شده در اتاقک رشد پرورش یافتند. برای کاشت گلدان‌های یک لیتری با ارتفاع ۷ سانتی متر و قطر دهانه ۱۰ سانتیمتر تهیه و با خاک زراعی و کودحیوانی گاوی به نسبت ۱:۱ پر شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده از نظر دما، رطوبت و روشنایی قرار گرفتند. به این ترتیب که دما ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و طول دوره روشـنایی ۱۲ ساعت تعیین گردید. بذور ۴۵ دقیقه بعد از ضـد عفونی با محلول هیپوکلریت سـدیم ۳ درصـد و آب به نسـبت ۱:۱ به مدت ۲ روز در لای پارچه خیس نگهداری و سـپس به گلدان‌ها منتقل شـدند بطوری که ۱۵ گیاه در هر گلدان و ۶ گلدان یک واحد آزمایشـی را تشـکیل می داد. ۲۱ روز بعد از انتقال و رشـد گیاهان، تنش در دوره های زمانی ۲۴، ۳۶ و ۴۸ سـاعت با قطع آبیاری به مدت یک هفته اعمال گردید. ضـمن اینکه گیاهان شاهد همچنان بصورت غرقاب (هر ۸ ساعت یکبار) آبیاری شدند. آزمایش در ۳ تکرار بصورت طرح کاملا تصادفی انجام شد و سه سطح تنش به همراه شاهد تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند.

صـفات مورد اندازه گیری: بعد از جدا کردن ریشـه‌ها بعد از اتمام زمان تنش و شسـت وشوی کامل، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد در آون قرار گرفتند ودر نهایت وزن خشـک آنها توسط ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ (Sartorius, Germany) اندازه گیری شـد. تعداد ۶۰ گیاه از هر تیمار به صـورت تصـادفی انتخاب و طول ریشـه، قطر ریشـه و تعداد ریشـه به ترتیب توسـط خط کش، کولیس و شـمارش تعیین گردید، در نهایت از حاصـل تقسـیم اعداد بر تعداد بوته‌ها میانگین این سـه صـفت برای هر گیاهچه بدست آمد. برای محاسبه حجم ریشه ۶۰ گیاه پس از شستشو داخل لوله فالکون مدرج که تا یکی از خطوط مدرج از آب پر شده بود ریخته شد و میزان تغییر حجم آب که نشانگر حجم ریشه بود بر حسب سانتیمتر مکعب یادداشت گردید. همچنین، صفت نسبت طول اندام هوایی به ریشه از طریق تقسیم طول بخش هوایی بر طول ریشه هر گیاهچه محاسبه گردید.

میزان پرولین آزاد: غلظت پرولین در گیاهچه‌های نگهداری‌شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد از طریق همگن‌سازی۰/۲ گرم نمونه در اسـید سـولفوسـالیسـیلیک ۳ درصـد و سـانتریفیوژ با سـرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت هفت دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد استخراج شد. فاز مایع حاصل، با حجم اسید نین هیدرین (۱/۲۵ گرم نین هیدرین+۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال +۲۰ میلی لیتر اسـید فسـفوریک) و یک میلی لیتر اسـید اسـتیک گلاسـیال ترکیب و به‌مدت یک سـاعت در حمام آب ۱۰۰ درجه

سانتی‌گراد گرم و سپس خنک شد. پس از افزودن تولوئن و تشکیل لایه قرمز در بالای نمونه، حدود ۸۰۰ میکرولیتر از آن جدا و میزان جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، غلظت پرولین با استفاده از معادله رگرسیون محاسبه گردید (Bates et al., 1973).

استخراج پروتئین: برای استخراج پروتئین، یک گرم ریشه روی یخ در هاون چینی با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و شن کوارتز همگن شد. عصاره حاصل به تیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و با سرعت ۱۵۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس فاز بالایی به ریز لوله دیگری منتقل، مجدداً سانتریفوژ و با ۴۰۰ میکرولیتر TCA 50% ترکیب گردید. پس از نگهداری در یخ و انجام چندین میکروفیوژ، رسوب پروتئینی با اتانول سرد شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز حل شد. در پایان، محلول پروتئینی آماده بارگذاری برای مراحل بعدی شد (Mohayeji, et al., 2014).

الکتروفورز دوبعدی و رنگ‌آمیزی: برای آماده‌سازی ژل‌های الکتروفورز، ابتدا ۱/۲ گرم اوره با آب دیونیزه، NP-40، محلول پلی‌اکریلامید و آمفولین‌های pH 5-7 و ۳/۵–۱۰ ترکیب و با APS 10% و TEMED تکمیل شد. این محلول در لوله‌های شیشه‌ای تزریق و با افزودن آب دیونیزه پلیمریزاسیون آن طی ۱ تا ۴ ساعت انجام شد. سپس لوله‌ها در الکتروفورز بعد اول استفاده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر محلول پروتئینی با بافر لیز و NaOH بارگذاری گردید. گرادیان pH توسط NaOH و اسید فسفریک ایجاد و الکتروفورز در سه مرحله ولتاژ به پایان رسید. برای ژل‌های بعد دوم، مواد ژل جداکننده شامل آکریل‌آمید، بافر pH 8.8 و آب دو بار تقطیر دیونیزه، APS 10%، TEMED ترکیب و پس از پلیمریزاسیون آماده شد. ژل نگهدارنده نیز با ترکیباتی مشابه اما با pH 8.6 تهیه و با آگارز ۱٪ ژل‌های IEF روی آن تثبیت گردید. فرایند الکتروفورز بعد دوم با جریان ثابت و رنگ‌آمیزی ژل جداکننده با محلول آبی کوماسی ادامه یافت. در نهایت ژل‌ها با محلول رنگ‌زدا پردازش شدند و آماده تصویربرداری شدند (Toorchi et al., 2009).

تصویر برداری از ژل‌ها: تصویربرداری از ژل‌ها پس از رنگ آمیزی، با دستگاه چگالی سنج (GS-800, Bio-Rad) انجام شد. علاوه بر ذخیره تصاویر در رایانه امکان تبدیل تصویر لکه‌های پروتئینی به داده‌های کمی توسط نرم افزار PDQuest فراهم شد.

کمی کردن نقاط پروتئینی و تجزیه و تحلیل ژل‌ها: برای اینکار، درصد حجمی نقاط توسط نرم افزار محاسبه و به عنوان میزان پروتئین بیان‌شده در نظر گرفته شد. داده‌های کمی توسط نرم افزار EXCEL مرتب گردیده و تجزیه واریانس برای هر لکه پروتئینی در سه تکرار با نرم افزار SAS انجام شد. نقاطی که دارای تغییرات بیان معنی‌داری از نظر آماری بودند مشخص و شناسایی آنها به روش انگشت‌نگاری جرم پپتیدی MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) در انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی ژاپن صورت گرفت. روند افزایشی و یا کاهشی بیان لکه‌های پروتئینی براثر تیمارهای تنش کمبود آب به صورت نمودار با نرم افزار اکسل مشخص گردید. تجزیه آماری صفات مورفولوژی ریشه و فیزیولوژیکی بر اساس طرح کاملا تصادفی توسط نرم افزار SAS انجام و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات: آزمون‌های نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف ویکنواختی واریانس‌ها برای صفات مورد اندازه‌گیری نشان دادند که داده‌ها نرمال و واریانس‌ها یکنواخت هستند. تجزیه واریانس نشان داد که تنش کمبود آب بر صفات قطر و حجم ریشه، میزان پرولین و وزن خشک ریشه به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ تأثیر دارد، اما صفاتی چون تعداد ریشه، طول ریشه و نسبت طول اندام هوایی به ریشه تحت تأثیر قرار نگرفتند (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین مربعات صفات مورد مطالعه در برنج رقم هاشمی تحت تیمارهای مختلف تنش کمبود آب

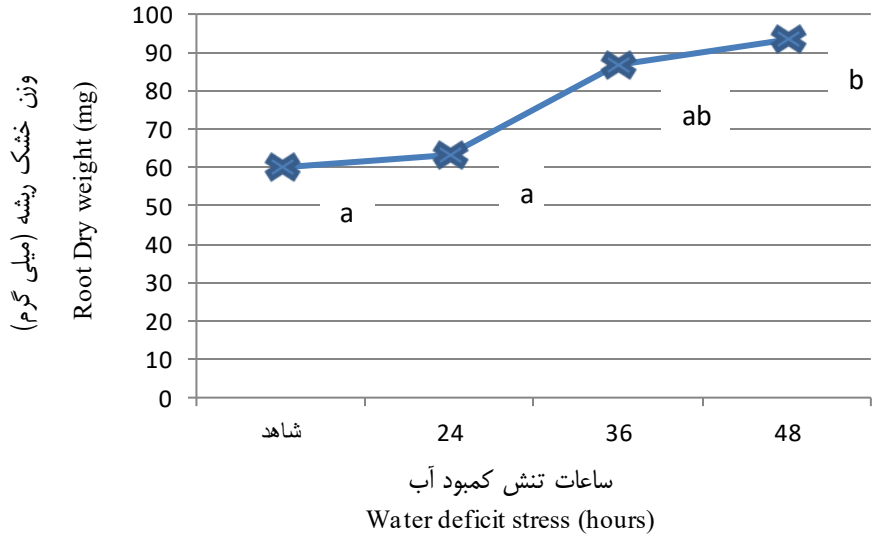
Table 1. Mean squares of traits studied in Hashemi rice cultivar under different water stress treatments

منابع تغییر Source of Change	درجه آزادی Degree of Freedom	میزان پرولین Proline Content	وزن خشک ریشه Dry weight of Root	تعداد ریشه Number of Roots	طول ریشه Root Length	قطر ریشه Root Diameter	حجم ریشه Root Volume	نسبت طول اندام هوایی به ریشه Shoot-to-root length ratio
تیمار Treatment	3	1388.8**	830.5**	31.77 ns	255.8 ns	2675**	0.47**	42.06 ns
خطا Error	8	50.0	100.0	46.17	116.5	50	0.04	77.8
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of Variation		12.12	13.18	19.05	14.39	6.57	11.66	25.90

**: معنی دار در سطح احتمال ۱٪ ns: غیر معنی دار

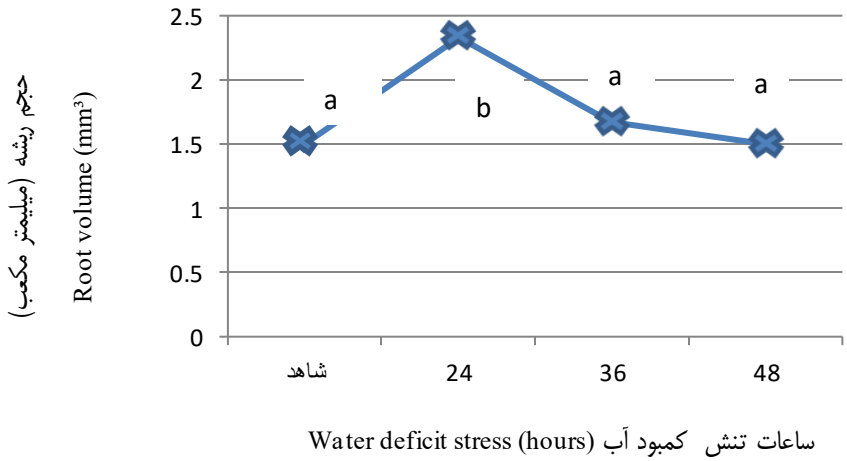
اثر تنش کمبود آب بر صفات ریشه: تحلیل داده‌ها نشان داد که کمبود آب تأثیر معنی‌داری بر صفات مورفولوژی ریشه از جمله وزن خشک ریشه (جدول ۱ و شکل ۱) و حجم ریشه (جدول ۱ و شکل ۲) دارد. پس از ۲۴ ساعت تنش، افزایش معنی‌داری در وزن خشک ریشه مشاهده نشد، اما پس از ۴۸ ساعت تنش، افزایش معنی‌دار رخ داد. در مورد حجم ریشه، ۲۴ ساعت تنش باعث افزایش معنی‌دار شد، ولی در بازه ۳۶ تا ۴۸ ساعت کاهش حجم مشاهده گردید. قطر ریشه نیز تحت تأثیر تنش کمبود آب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، ابتدا در سطح ۲۴ ساعت و سپس در ۴۸ ساعت (جدول ۱ و شکل ۳). بررسی‌های پیشین نیز همبستگی مثبت بین طول ریشه و مقاومت به تنش کمبود آب در برخی گیاهان را نشان داده‌اند. ریشه به‌عنوان بخش اصلی سازگاری به کمبود آب، نقش مهمی در رشد و تغذیه گیاهان زراعی ایفا می‌کند. در پژوهشی Toorchi et al. (2002) با بررسی اثر تنش کمبود آب روی برنج نشان دادند که تنش کمبود آب باعث افزایش حجم و وزن خشک ریشه‌ها می‌گردد. یک روش سازگاری به کمبود آب این است که گیاه با افزایش سرعت رشد طولی ریشه و نفوذ به اعماق خاک آب بیشتری جذب نماید (Midaouri et al., 2003). همچنین Matsuura et al. (1996) گزارش کردند که تحت تنش کمبود آب طول ریشه در ذرت کاهش، ولی در گیاهان سورگوم و ارزن افزایش می‌یابد. آنان دریافتند که همبستگی مثبتی بین طول ریشه و مقاومت به تنش

کمبود آب در گیاهان سورگوم و ارزن وجود دارد. مدائوری و همکاران (Midaouri et al., 2003) با بررسی اثر تنش کمبود آب روی آفتابگردان به این نتیجه رسیدند که تنش کمبود آب موجب افزایش وزن خشک ریشه ، طول ریشه و حجم ریشه می‌شود.



شکل ۱. میانگین وزن خشک ریشه برنج رقم هاشمی تحت سطوح مختلف تنش کمبود آب

Figure 1. Mean dry root weight of Hashemi rice cultivar under different levels of water stress



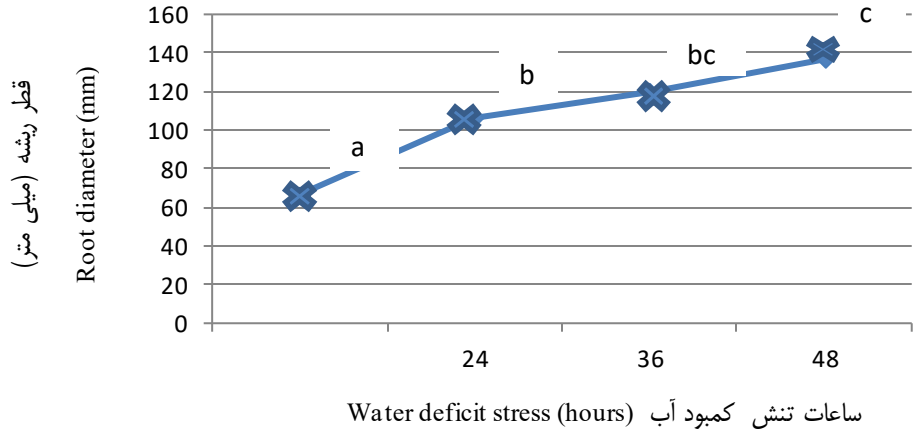
شکل ۲. میانگین حجم ریشه برنج رقم هاشمی تحت سطوح مختلف تنش کمبود آب

Figure 2. Mean root volume of Hashemi rice cultivar under different levels of water stress

میانگین‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

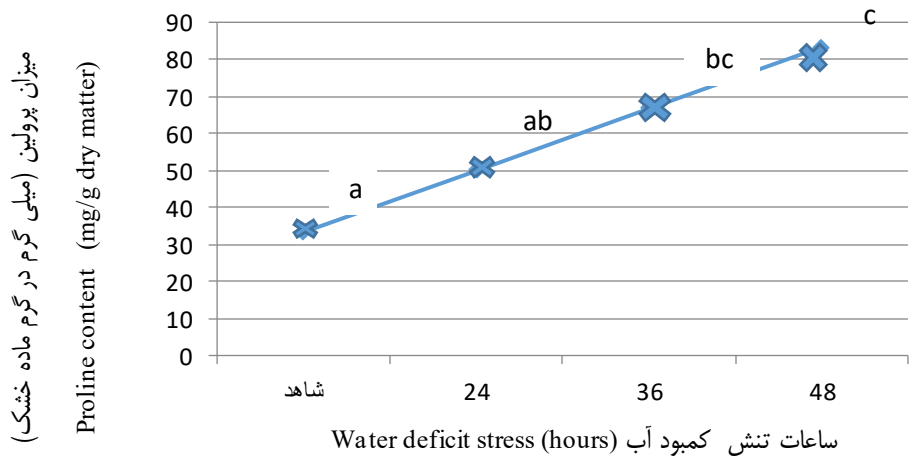
اثر تنش کمبود آب بر میزان پرولین: نتایج نشان داد که غلظت پرولین بین سطوح مختلف تنش کمبود آب در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری دارد (جدول ۱). افزایش شدت تنش باعث افزایش پرولین از سطح شاهد تا ۴۸ ساعت شد، اما این افزایش معنی‌دار از ۳۶ ساعت قابل مشاهده بود (شکل ۴). تجمع پرولین در ریشه به کاهش اثرات منفی تنش از طریق تنظیم اسمزی کمک می‌کند. این اسمولیت از مسیر گلوتامیک سنتز می‌شود (Yoshiba et al., 1997). در گیاهان گندم، تجمع بیشتر

پرولین در برابر شوری به تنظیم پتانسیل اسمزی و افزایش فشار تورمی سلول کمک می‌کند (Ali et al., 2008). تجمع پرولین در برگ‌های کلزا به تحمل کمبود آب مرتبط نیست و نشان‌دهنده آسیب ناشی از تنش است (Deepak & Wattal, 1995).



شکل ۳. میانگین قطر ریشه برنج رقم هاشمی تحت سطوح مختلف تنش کمبود آب

Figure 3. Mean root diameter of Hashemi rice cultivar under different levels of water stress

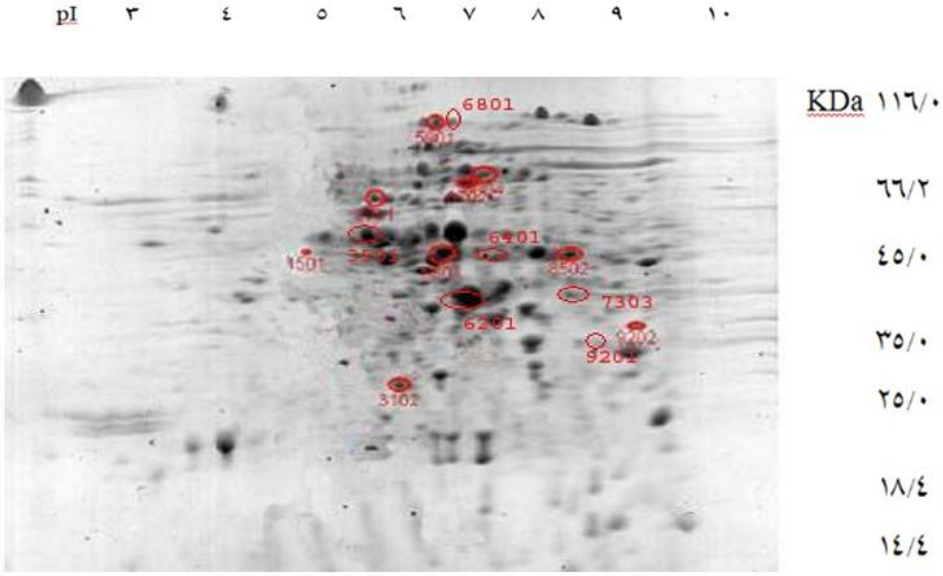


شکل ٤. میانگین میزان پرولین ریشه برنج رقم هاشمی تحت سطوح مختلف کمبود آب

Figure 4. Mean proline content in the roots of Hashemi rice cultivar under different levels of water stress

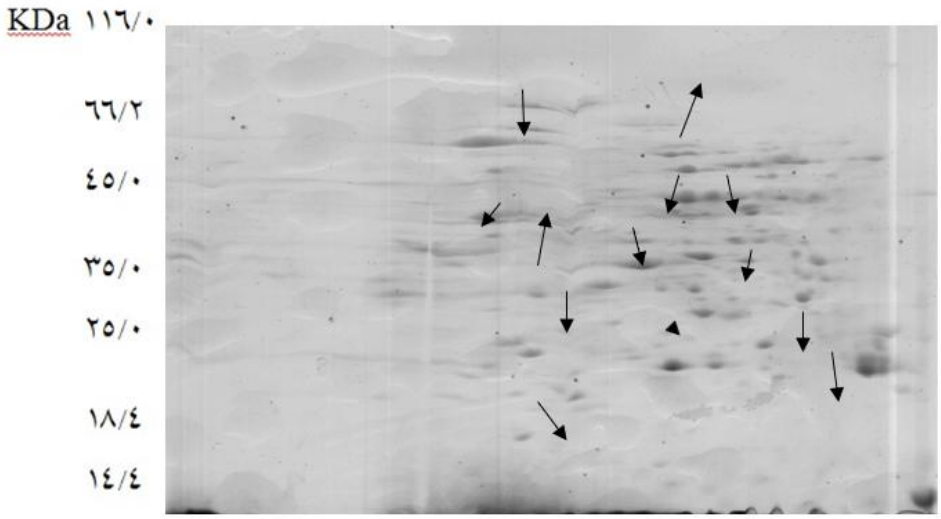
تجزیه وتحلیل پروتئوم ریشه: در این مطالعه، تغییرات پروتئوم بافت ریشه برنج رقم هاشمی تحت تنش کمبود آب بررسی شد. با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و رنگ‌آمیزی آبی کوماسی، تعداد ۱۳۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر شناسایی گردید (شکل‌های ۵ تا ۸). از بین آن‌ها، ۱۴ لکه پروتئینی تغییرات بیان معنی‌داری نشان دادند(جدول ۲). لکه‌های شماره ۱۵۰۱، ۳۱۰۲، ۳۵۰۱، ۶۸۰۱، ۶۸۰۴، ۷۳۰۳، ۹۲۰۲ در سطح احتمال ۱٪ و لکه‌های شماره ۳۷۰۱، ۵۵۰۱، ۵۸۰۱، ۶۲۰۱، ۶۴۰۱، ۸۵۰۲، ۹۲۰۱ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شدند. پروتئین‌های شماره ۵۸۰۱، ۶۴۰۱، ۷۳۰۳، ۸۵۰۲، ۹۲۰۱ روند افزایش بیان بعد از ۴۸ ساعت تنش نشان دادند، در حالی که پروتئین‌های شماره ۳۱۰۲، ۳۵۰۱، ۳۷۰۱، ۶۸۰۱، ۶۸۰۴ کاهش بیان در ۲۴ ساعت و سپس افزایش در ۳۶ ساعت و کاهش مجدد

در ۴۸ ساعت داشتند. لکه‌های ۶۲۰۱ و ۱۵۰۱ ابتدا افزایش بیان در ۲۴ ساعت و سپس کاهش در ۳۶ ساعت و افزایش مجدد در ۴۸ ساعت داشتند. پروتئین شماره ۵۵۰۱ روند کاهش بیان در تمامی تیمارها نشان داد و پروتئین شماره ۹۲۰۲ تنها در ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری در بیان داشت، در حالی که بیان آن در سطح شاهد، ۳۶ و ۴۸ ساعت مشابه بود.



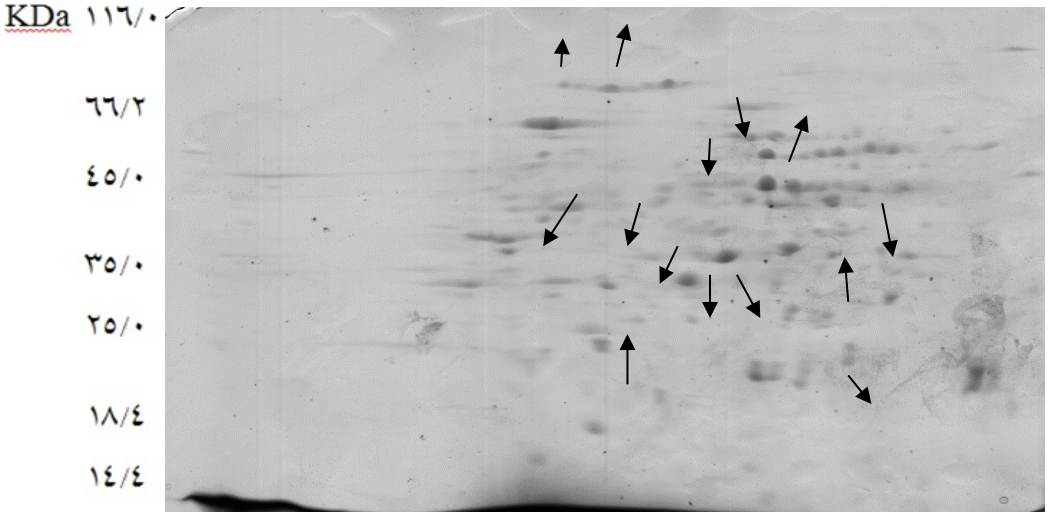
شکل ۵. موقعیت نسبی و برچسب لکه‌های پروتئینی الکتروفورز دوبعدی برنج رقم هاشمی (ژل مستر)

Figure 5. pI ۳ ٤ ٥ ٦ ٧ ٨ ٩ ١٠ Relative position and label of protein spots on the two-dimensional electrophoresis gel of Hashemi rice (Master Gel)



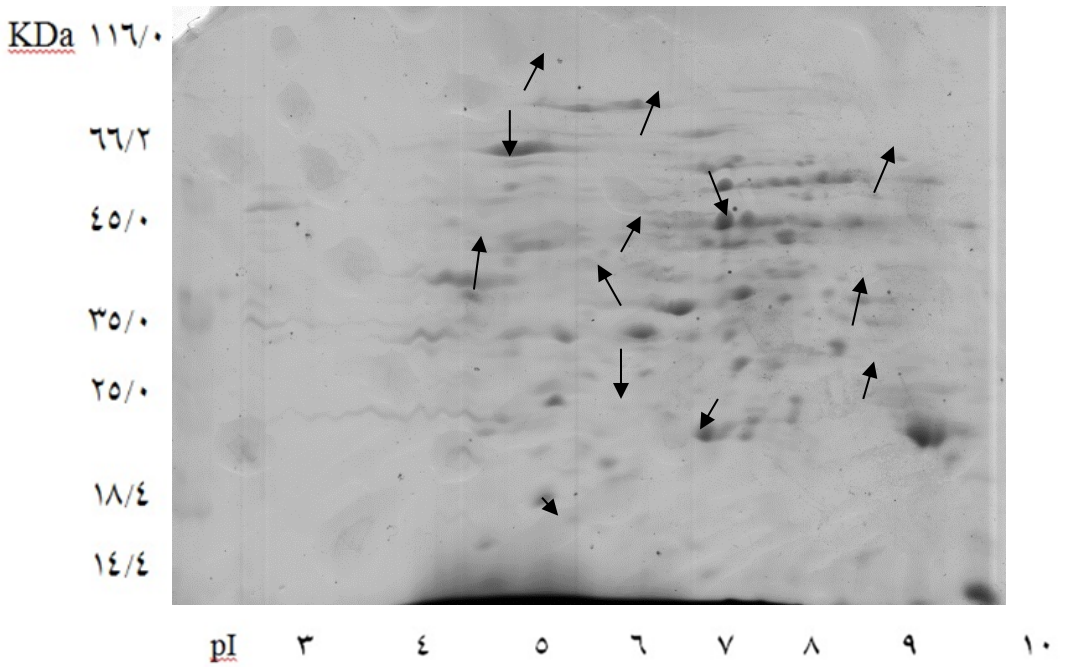
شکل ٦. ژل الکتروفورز دو بعدی ریشه برنج رقم هاشمی تحت تنش کمبود آب ۲٤ ساعت

Figure 6. Two-dimensional electrophoresis gel of Hashemi rice roots under 24-hour water deficit stress



شکل ۷. ژل الکتروفورز دو بعدی ریشه برنج رقم هاشمی تحت تنش کمبود آب ۳٦ ساعت

Figure 7. Two-dimensional electrophoresis gel of Hashemi rice roots under 36-hour water deficit stress



شکل ۸ . ژل الکتروفورز دو بعدی ریشه برنج رقم هاشمی تحت تنش کمبود آب ٤۸ ساعت

Figure 8. Two-dimensional electrophoresis gel of Hashemi rice roots under 48-hour water deficit stress

پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز: پروتئین شماره ۳۵۰۱، زیر واحد α ATP سنتاز CF-CF1، در غشای تیلاکوئید وظیفه تولید ATP از طریق فسفریلاسیون نوری را برعهده دارد. این آنزیم که ساختاری محافظت‌شده در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها دارد

(Walker et al., 1984)، شامل CF1 برای کاتالیز تولید ATP و CF0 به‌عنوان کانال پروتون است (Senior & Wise, 1983).

جدول ۲. مشخصات پروتئین‌های شناسایی شده درریشه برنج رقم هاشمی تحت تیمار تنش کمبود آب

Table 2. Characteristics of identified proteins in the roots of Hashemi rice under water deficit stress treatment

شماره پروتئین Protein Number	نام پروتئین Protein Name	pI,MW (kDa) تئوری Theory	pI,MW (kDa) تجربی Experimental	Accession Number
1501	Hypotetical Protein	5.2,60	6.17,56.4	115465323
3102	GSH-dependent DHAreductase	6.3,27	7.0,28.9	BAA90672
3501	ATP synthase cf1 alpha chain	6.11,55.30	6.95,54.43	17371040
3701	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrugenase	4.0,82.0	6.8,74.1	20455490
5501	Ribosomal PrL11	7.49,55.8	7.0,50	226533453
5801	Glycine dehydrogenase	7.4,108.5	6.3,112	356514615
6201	Ferredoxin- NADPH oxydoreductase	7.24,38.9	7.62,38.53	20302473
6401	Ribosomal PrL11	7.49,55.8	7.75,44.87	226533453
6801	Glycine dehydrogenase	7.57,108.5	6.3,112	356514615
6804	Glyceraldehyde3-Phosphate dehydrogenase	4.0 ,82	7.8,83.8	20455490
7303	Froctosel-6bisphosphatealdolase	8.3,42.08	9.0,41	256152303
8502	Glocose 6-Phosphate dehydrogenase	5.92,59	8.7,56	3023817
9201	Chitinase	4.2,34.3	9.3,34.14	561873
9202	Ferrodoxine NADPH oxidoreductase	8.2,9.39	9.3,39	20302473

پروتئین At3g46430 از آرابیدوپسیس جدا شده و ژن AtMtATP6 آن را کد می‌کند که بیانش تحت تنش‌های غیرزنده مثل شوری، کم‌آبی و سرما افزایش یافته و باعث مقاومت بیشتر گیاه می‌شود (Kraft et al., 2001; Zhang et al., 2008). در گندم، تنش شوری موجب کاهش بیان زیر واحد α شده و بر فتوسنتز و چرخه کالوین اثر منفی می‌گذارد (Caruso et al., 2008; Sobhanian et al., 2010). پروتئین شماره ۷۳۰۳ به‌عنوان فروکتوز ۶-۱ بیس فسفات آلدولاز شناخته شده و نقش مهمی در تثبیت کربن و انتقال الکترون فتوسنتزی در چرخه کالوین دارد. مطالعات نشان داده‌اند که بیان این پروتئین تحت تنش‌های غیرزنده مانند شوری به‌طور معناداری کاهش یافته و سپس افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای Liu et al. (2011) بیان cDNAهای کدکننده این آنزیم را در دو واریته گندم زمستانه بررسی کردند و تفاوت‌هایی در روند بیان تحت دمای پایین و تنش گزارش کردند؛ به‌طوری‌که در واریته Aibian1 ابتدا افزایش و سپس کاهش، و در واریته حساس Albinism line ابتدا کاهش و سپس افزایش مشاهده شد.

پروتئین‌های درگیر در تنفس نوری: در پژوهشی Demirevska et al. (2008) گزارش کردند که تنش کمبود آب در گیاهچه‌های گندم سبب افزایش سنتز هورمون آبسزیک اسید می‌شود که احتمالاً با بسته شدن روزنه‌ها همراه است و به‌منظور جلوگیری از آسیب ROSها، گیاه مسیر تنفس نوری را فعال می‌کند. پروتئین‌های شماره ۳۷۰۱ و ۶۸۰۴ به‌عنوان آنزیم گلیسر آلدئید ۳-فسفات شناسایی شدند که بیان آن‌ها تحت تأثیر تنش در بازه‌های زمانی مختلف کاهش و افزایش یافته است. تغییرات بیان این آنزیم نشان‌دهنده نقش آن در پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده است. همچنین Sobhanian et al. (2010) گزارش کردند که در شرایط تنش شوری، میزان بیان این آنزیم در برگ‌ها و هیپوکوتیل گیاهان سویا به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. پروتئین شماره ۸۵۰۲ احتمالاً از پروتئین‌های گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز است که بیان آن پس از ۲۴ ساعت تنش کمبود آب کاهش و در ۴۸ ساعت افزایش می‌یابد، نشان‌دهنده کاهش تولید NADPH در مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات (Hutchings et al., 2005) و اختلال در بالانس سلول‌های گیاهی است (Scheibe, 2004). بررسی پروتئوم دیواره ریشه گندم نشان داد که فعالیت این آنزیم تحت تنش غرقابی کاهش می‌یابد(Zhang et al., 2009). پروتئین‌های شماره ۵۸۰۱ و ۶۸۰۱ به‌عنوان گلایسین دهیدروژناز شناسایی شدند که بیان آن‌ها تحت تنش کمبود آب در زمان‌های مختلف تغییراتی نشان داده است؛ کاهش اولیه، سپس افزایش در بازه‌های مختلف تنش. پژوهشگران دیگر (Demirevska et al., 2008) گزارش کردند که تحت تنش کمبود آب، سنتز آبسزیک اسید در گیاهچه‌های گندم افزایش یافته و احتمالاً موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود.

پروتئین‌های درگیر در کاهش اثرات تنش اکسیداتیو: سرب از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند H_2O_2 و O_2^- باعث تخریب مولکولی، پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب غشا و ناپایداری سلول‌ها می‌شود (Lin & Kao, 2000). اثرات تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌تواند با مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کاهش یابد. پروتئین‌های شماره ۹۲۰۲ و ۶۲۰۱ احتمالاً از خانواده اکسیدوردوکتازها هستند که بیان آن‌ها تحت تنش کمبود آب تغییرات متناوبی نشان داده است؛ افزایش، کاهش و سپس افزایش مجدد (Higichi et al., 2011). عدم انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی باعث تنش اکسیداتیو می‌شود که با افزایش بیان فرودوکسین اکسیدوردوکتاز به کاهش آسیب غشای سلولی کمک می‌کند. فرودوکسین NADP اکسیدوردوکتاز انتقال الکترون‌ها را بین فرودوکسین و NADP انجام می‌دهد و سایر آنزیم‌های این گروه نقش مهمی در انتقال الکترون در استروما دارند. لکه پروتئینی شماره ۳۱۰۲ تحت تنش کمبود آب تا ۲۴ ساعت کاهش بیان نشان داد و در ۳۶ و ۴۸ ساعت تغییر خاصی نداشت. گلوتاتیون دهیدرو اسکوربات ردوکتاز (DHA) در کلروپلاست نقش کاتالیزوری داشته و تولید GSH مقاومت به تنش اکسیداتیو را افزایش می‌دهد؛ فعالیت این آنزیم با NADPH تنظیم شده و دمای بالا آن را افزایش می‌دهد (Urao et al., 2000). در گیاهان مختلف، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان پاسخ به تنش کمبود آب افزایش می‌یابد (Smirnoff & Pallanca, 1996; Schwanz & Polle, 2001).

پروتئین‌هایی که نقش آنها در تنش کمبود آب به‌درستی مشخص نشده است: علاوه بر پروتئین‌های اشاره شده، پروتئین‌های دیگری نیز در این تحقیق شناسایی شدند که نقش و ارتباط آن‌ها با تنش کمبود آب به درستی مشخص نگردیده است. پروتئین‌های شماره ۵۵۰۱ و ۶۴۰۱ به عنوان Ribosomal protein L11 احتمالی شناسایی شدند. بیان این پروتئین‌ها در پژوهش حاصل با اعمال تنش کمبود آب روند کاهشی نشان داد بطوریکه با افزایش ساعت تنش تا ۴۸ ساعت بیان هر دو پروتئین کاهش یافت. پروتئین شماره ۱۵۰۱ در گروه Hypothetical protein قرار گرفت. بیان این پروتئین با اعمال تنش کمبود آب تا

۳۶ ساعت تغییر معنی‌داری نشان نداد ولی با افزایش طول تنش کم آبی به ۴۸ ساعت به طور معنی‌داری افزایش بیان نشان داد. عملکرد این پروتئین به درستی شناخته نشده، ولی درایجاد مقاومت به تنش کمبود آب نقش دارد. این پروتئین‌ها کاندید مطالعات آینده برای شناسایی کارکردهای بیولوژیکی هستند (Rabello et al., 2008) پروتئین شماره ۹۲۰۱ ساختاری از کتیناز (Chitinase chain A) دارد که تحت تنش کمبود آب تا ۳۶ ساعت بیان آن کاهش یافت و سپس مجددا با افزایش مدت زمان تنش کمبود آب به ۴۸ ساعت روند افزایشی از خود نشان داد. کتینازها پروتئین‌هایی هستند که در شرایط پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی بیان می‌شوند و در علوفه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این پروتئین در چاودار در پاسخ به سرما و تنش کمبود آب بیان می شود. در گوجه فرنگی نیز کتیناز در گونه‌های مقاوم به کمبود آب نسبت به گونه‌های حساس کاهش داشته است (Rabello et al., 2008).

نتیجه گیری: کمبود آب از نظر آماری روی صفات وزن خشک ریشه، قطر ریشه، حجم ریشه و میزان پرولین اثر گذاشته و واکنش‌های متفاوتی در سطوح مختلف تنش نشان داده است. بررسی پروتئوم بافت ریشه با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو منجر به شناسایی ۱۳۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد که از این میان، تغییرات بیان ۱۴ لکه در سطوح مختلف تنش، از نظر آماری معنادار ارزیابی گردید. این پروتئین‌ها در دوره‌های زمانی مختلف تنش کمبود آب، تغییرات متفاوتی در بیان داشته‌اند که نشان‌دهنده تنظیم متفاوت بیان آن‌ها است. همچنین، افزایش بیان پروتئین‌هایی مانند فرودوکسین، گلایسین دهیدروژناز، کتیناز و Hypothetical پروتئین بیانگر تلاش گیاه برای کاهش اثرات تنش اکسیداتیو است. این یافته‌ها بر اهمیت تنظیم ژنتیکی در پاسخ به تنش‌های محیطی تاکید دارند. استفاده از رهیافت پروتئومیک برای مطالعه پروتئین‌های سایر بافت‌ها تحت تنش کمبود آب پیشنهاد می‌شود تا نتایج جامع‌تری حاصل شود. توسعه تکنیک‌های پروتئومیک ضروری به نظر می رسد، زیرا محدودیت‌های تکنیکی فعلی مانع تحلیل جامع همه پروتئین های درگیر در پاسخ به تنش خشکی هستند. تلفیق داده‌های پروتئومیک با اطلاعات سایر علوم امیکس، فیزیولوژی و بیوشیمی می‌تواند در اصلاح ژنتیکی برنج و تولید واریته‌های مقاوم به خشکی نقش مؤثری داشته باشد.

سپاسگزاری: از دانشگاه تبریز برای حمایت مالی و تامین تجهیزات آزمایشگاهی لازم جهت اجرای پژوهش حاضر قدردانی می شود.

References

Abbasi, S., Safaie, N., Shams-Bakhsh, M., & Shahbazi, S. (2016). Biocontrol activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soilborne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. *Iranian Journal of Biotechnology*, *14*(4), 260–269. https://doi.org/10.15171/ijb.1224

Abbott, A. (1999). A post-genomic challenge: Learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, *402*(6763), 715–720. https://doi.org/10.1038/45350

Ali, Q., Athar, H. U. R., & Ashraf, M. (2008). Modulation of growth, photosynthetic capacity and water relations in salt-stressed wheat plants by exogenously applied 24-epibrassinolide. *Plant Growth Regulation*, *56*(2), 107–116. https://doi.org/10.1007/s10725-008-9290-7

Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*(1), 205–207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Carsuo, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P., & Lagana, A. (2008). Identification of changes in *Triticum durum* leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *391*(1), 381–390. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2008-x

Deepak, M., & Wattal, P. N. (1995). Influence of water stress on seed yield of Canadian rape at flowering and role of metabolic factors. *Plant Physiology and Biochemistry*, *22*(2), 115–118.

Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, *4*(2), 215–223. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x

Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Vaseva, I., Grigorova, B., & Feller, U. (2008). Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Genetics and Applied Plant Physiology*, *34*(1-2), 79–102.

Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, *33*(4), 751–763. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01661.x

Earl, H., & Davis, R. F. (2003). Effect of drought stress on leaf and whole canopy radiation use efficiency and yield of maize. *Agronomy Journal*, *95*(3), 688–696. https://doi.org/10.2134/agronj2003.6880

Ebrahimzadeh, H., Saboura, A., Ahmadi Moghadam, A., Habibi Rezaei, M., & Abrishamchi, P. (2008). *Plant physiology* (Translation). Biology Publications.

Fray, R. G., Wallace, A., Grierson, D., & Lycett, G. W. (1994). Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(1-2), 235–243. https://doi.org/10.1007/BF00024122

Fujita, T., Maggio, A., García-Rios, M., Bressan, R. A., & Csonka, L. N. (1998). Comparative analysis of the regulation of expression and structure of two evolutionarily divergent genes for Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology*, *118*(2), 661–674. https://doi.org/10.1104/pp.118.2.661

Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M., & Vartanian, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology*, *26*(5), 1557–1577. https://doi.org/10.1007/BF00016490

Harris, D., Tripathi, R. S., & Joshi, A. (2002). On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. In *Direct seeding: Research strategies and opportunities* (pp. 231–240). International Rice Research Institute.

Herbert, B. (1999). Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, *20*(4-5), 660–663. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<660::AID-ELPS660>3.0.CO;2-Q

Hernandez, J. A., Jimenez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment*, *23*(8), 853–862. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00602.x

Heydari, M. (2008). *Plant responses to environmental stresses*. Aras Rayaneh Publications.

Higichi-Takeuchi, M., Ichikawa, T., Kodou, Y., Matsui, K., Hasegawa, Y., Kawashima, M., Sonoike, K., Mori, M., Hirochika, H., & Matsui, M. (2011). Functional analysis of two isoforms of leaf-type ferredoxin-$NADP^+$ oxidoreductase in rice using the heterologous expression system of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *157*(1), 96–108. https://doi.org/10.1104/pp.111.181248

Hutchings, D., Rawsthorne, S., & Emes, M. J. (2005). Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*, *56*(418), 562–577. https://doi.org/10.1093/jxb/eri046

Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., & Shinozaki, K. (1997). Characterization of the gene for Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Molecular Biology*, *33*(5), 857–865. https://doi.org/10.1023/A:1005702408601

Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *47*, 377–403. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377

Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and -independent pathways. *The Plant Cell*, *9*(11), 1935–1949. https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1935

Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, *47*(1), 141–153. https://doi.org/10.1093/pcp/pci230

Kamoshita, A., Wade, L. J., & Yamauchi, A. (2000). Genotypic variation in response of rainfed lowland rice to drought and rewatering: Water extraction during drought period. *Plant Production Science*, *3*(2), 189–196. https://doi.org/10.1626/pps.3.189

Komatsu, S., Zhang, X., & Tanaka, N. (2006). Comparison of two proteomics techniques used to identify proteins regulated by gibberellins in rice. *Proteomics*, *5*(10), 270–276. https://doi.org/10.1021/pr0502929

Kruft, V., Eubel, H., Jänsch, L., Werhahn, W., & Braun, H. P. (2001). Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *127*(4), 1694–1710. https://doi.org/10.1104/pp.010474

Leone, A., Costa, A., Tucci, M., & Grillo, S. (1994). Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum*, *92*(1), 21–30. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb06650.x

Lin, C. C., & Kao, C. H. (2000). Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, *30*(2), 151–155. https://doi.org/10.1023/A:1006345126589

Lisse, T., Bartels, D., Kalbitzer, H. R., & Jaenicke, R. (1996). The recombinant dehydrin -like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biological Chemistry*, *377*(9), 555–561. https://doi.org/10.1515/bchm3.1996.377.9.555

Liu, Y., Lv, K., Hou, D., Huang, W., Hua, Q., Liu, X., Liu, Z., Xu, H., & Xu, H. (2011). The molecular characterization of wheat CpFBA genes and its expression model in cold acclimation. *The Plant Cell*, *2*(3), 371–410.

Manikavelu, A., Nadarajan, N., Ganesh, S. K., Gnanamalar, R. P., & Babu, R. C. (2006). Drought tolerance in rice: Morphological and molecular genetic consideration. *Plant Growth Regulation*, *50*(2-3), 121–138. https://doi.org/10.1007/s10725-006-9109-3

Mathivanan, S. (2021). Physiological changes and adaptive mechanisms in plants. In F. Shah, S. Saud, Y. Chen, C. Wu, & D. Wang (Eds.), *Abiotic stress in plants*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.93367

Matsuura, A., Inanaga, S., & Sugimoto, Y. (1996). Mechanism of interspecific differences among four gramineous crops in growth response to soil drying. *Japanese Journal of Crop Science*, *65*(2), 352–360. https://doi.org/10.1626/jcs.65.352

Midaouri, E. M., Serieys, H., Griveau, Y., Benbella, M., Talouizet, A., Berville, A., & Kaan, F. (2003). Effects of osmotic and water stresses on root and shoot morphology and seed yield in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes bred for Morocco or issued from introgression with *H. argophyllus* T. G. and *H. debilis* Nutt. *Helia*, *26*(38), 1–15. https://doi.org/10.2298/HEL0338001M

Mohayeji, M., Moghaddam, M., Toorchi, M., & Valizadeh, M. (2014). Combining ability analysis in sunflower hybrids under water stress conditions. *International Journal of Biosciences*, *5*(12), 364–373. https://doi.org/10.12692/ijb/5.12.364-373

Molloy, M. P. (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, *280*(1), 1–10. https://doi.org/10.1006/abio.2000.4514

Rabello, A. R., Guimarães, C. M., Rangel, P. H. N., da Silva, F. R., Seixas, D., de Souza, E., Brasileiro, A. C. M., Spehar, C. R., Ferreira, M. E., & Mehta, A. (2008). Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Genomics*, *9*, Article 485. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-485

Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Ghareyazie, B., & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, *2*(9), 1131–1145. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200209)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1

Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, *163*(5), 1037–1046. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00278-9

Sairam, R. K., Deshmukh, P. S., & Saxena, D. C. (1988). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, *41*(3), 387–394. https://doi.org/10.1023/A:1001898310321

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum*, *120*(1), 21–26. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0222.x

Schwanz, P., & Polle, A. (2001). Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO_2 concentration. *Journal of Experimental Botany*, *52*(354), 133–143. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.133

Senior, A. E., & Wise, J. G. (1983). The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. *Journal of Membrane Biology*, *73*(2), 165–177. https://doi.org/10.1007/BF01870434

Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, *115*(2), 327–334. https://doi.org/10.1104/pp.115.2.327

Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, *3*(3), 217–223. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00068-0

Smirnoff, N., & Pallanca, J. E. (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, *24*(2), 472–478. https://doi.org/10.1042/bst0240472

Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A. A., Jazii, F. R., Motamed, N., & Komatsu, S. (2010). Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*, *8*, Article 19. https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-19

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(3), 1035–1040. https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.1035

Toorchi, M., Shashidhar, H. E., Sharma, N., & Hittalmani, S. (2002). Tagging QTLs for maximum root length in rainfed lowland rice by combined selective genotyping and STMs markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *7*(2), 771–776.

Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M. Z., & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, *30*(12), 2108–2117. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.006

Tripathy, J. N., Zhang, J., Robin, S., Nguyen, T. H., & Nguyen, H. T. (2000). QTL for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Theoretical and Applied Genetics*, *100*(8), 1197–1202. https://doi.org/10.1007/s001220051424

Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Letters*, *478*(3), 227–232. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01860-3

Walker, J. E., Saraste, M., & Gay, N. J. (1984). The *unc* operon: Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *768*(2), 164–200. https://doi.org/10.1016/0304-4173(84)90003-X

Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, *13*(1), 19–50. https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923

Williams, J., Bulman, M. P., Phillips, A., & Neill, S. (1994). Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a positional thiol protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, *25*(2), 259–270. https://doi.org/10.1007/BF00023242

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics*, *238*(1-2), 17–25. https://doi.org/10.1007/BF00279525

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*, *38*(10), 1095–1102. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093

Zeevaart, J. A. D., & Creelman, R. A. (1998). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *39*(1), 439–473. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.002255

Zhang, Y., Xi, D., Wang, J., Zhu, D., & Guo, X. (2009). Functional analysis reveals effects of tobacco alternative oxidase gene (*NtAOX1a*) on regulation of defense responses against abiotic and biotic stresses. *Bioscience Reports*, *29*(6), 375–383. https://doi.org/10.1042/BSR20080133

Zhang, X., Liu, S., & Takano, T. (2008). Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*AtMtATP6*) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters*, *30*(7), 1289–1294. https://doi.org/10.1007/s10529-008-9685-6

Zivy, M., & Devienne, D. (2000). Proteomics: A link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, *44*(5), 575–580. https://doi.org/10.1023/A:1026525406953