

بررسی پروتئوم پیام رسانی خشکی در ریشه برنج

ندا سلطانی¹، قاسم حسینی سالکده^{2*}

¹ دانشجوی کارشناسی ارشد، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

² عضو هیات علمی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: 1391/4/18، تاریخ پذیرش: 1391/8/20

چکیده

خشکی یکی از بزرگترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان در سطح جهان می‌باشد. بررسی تغییرات الگوی پروتئین‌های ریشه برنج در سیستم خشکی نسبی با استفاده از تکنیک پروتئومیکس مورد مطالعه قرار گرفت. تیمارها در سه تکرار مستقل از هم اعمال شد و چهار بافت ریشه‌ای مورد مقایسه قرار گرفت: ریشه‌هایی که تحت آبیاری کامل قرار داشتند (WW)، ریشه‌هایی که تحت خشکی کامل بوده (WD)، ریشه‌هایی که در تقسیم ریشه آب کافی دریافت کرده (SpWW) و ریشه‌هایی که در تقسیم ریشه در معرض خشکی کامل بودند (spWD) بررسی پروتئوم بافت‌های ریشه حاصل از تیمارهای ذکر شده توسط الکتروفورز دوبعدی منجر به شناسایی 32 نقطه پروتئین شد که از این تعداد 13 نقطه پروتئینی در هر دو تیمار WD و spWD افزایش بیان داشته، تعداد 9 نقطه پروتئینی در هر سه تیمار WD، spWD و spWW نسبت به گیاهان نرمال WW افزایش نشان داده، تعداد 8 نقطه پروتئینی در گیاهان نرمال بیان نشده و 2 نقطه پروتئینی فقط در تیمار WD افزایش بیان داشت. تنش خشکی باعث تغییراتی در بیان پروتئین‌ها گردید که اکثر تغییرات در ریشه‌های در معرض تنش خشکی رخ داد، از جمله افزایش بیان PR پروتئین‌ها در پاسخ به خشکی افزایش و عدم بیان Heat shock پروتئین‌ها و تیرودوکسین در ریشه‌های در معرض آب.

کلمات کلیدی: خشکی، تقسیم ریشه، برنج، پروتئومیکس.

که نقش کلیدی در مقاومت گیاه به خشکی دارد تحت کنترل هر دو نوع پیام مذکور قرار دارد (Comstock et al., 2002). ABA به عنوان اولین پیام شیمیایی انتقالی به ساقه هنگام تنش خشکی پذیرفته شده است. (Blackman et al., 1985) در دهه گذشته مشخص شد که ورود ABA به برگ-ها بخشی از پاسخ به خشکی می باشد (Nilson et al., 2010). بنابراین ABA در ریشه تولید و در سلولهای اپیدرم برگ تجمع می یابد. رشد ریشه-های ذرت در خاک خشک تغییر می کند که احتمالاً این تغییر برای رسیدن به آب کافی می-باشد (Sharp, 1985) متعاقباً رشد ریشه نشان دهنده حضور ABA می باشد (Saab, 1990) گیاهان پس از درک تنش خشکی، در سطح مولکولی و سلولی به مانند سطح فیزیولوژیکی به تنش پاسخ می دهند (Yamaguchi et al., 2002). لذا، ثابت شده است که بیان و تظاهر بسیاری از ژن ها در پاسخ به تنش خشکی تحت تاثیر قرار می گیرند و کاهش یا افزایش بیان می یابند. مشخص شده که بعضی از این ژن ها در تحمل به خشکی نقش دارند (Kavar, 2007). محصول این ژن ها نه تنها در تحمل به خشکی، بلکه در تنظیم الگوی بیان ژن ها و مسیرهای انتقال پیام در پاسخ به تنش خشکی نقش ایفا می کنند (2000 Shinozaki, همچنین یک گروه بزرگ از فاکتورهای رونویسی در حضور ABA و تنش کم آبی افزایش بیان پیدا می کنند (2010 Yoshida, در نتیجه پروتیین هایی که به صورت معمول در بافت های تحت تنش ایفای نقش می-

برنج یکی از قدیمی ترین غلات بوده و بیش از ده هزار سال است که تعداد زیادی از مردم دنیا به عنوان غذا از آن استفاده می کنند همچنین در میان غلات یک گیاه مدل مطلوب برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی می باشد. (Ashraf, 1994). تنش کم آبی عمده ترین محدودیت در تولید محصولات زراعی است (Boyer, 1982). اثر اولیه تنش خشکی بر روی برگ ها، قطع شدن فشار هیدرولیکی آب است که یکسری اثرهای ثانویه مانند تغییر عملکرد روزنه-ها توسط کاهش تعرق را در پی خواهد داشت (Hsiao, 1974). این پارامترهای فیزیولوژیک نیاز به تنظیم توسط پیام های هورمونی دارند (Blackman, 1985)، پیام رسانی هورمونی به صورت موضعی یا در فواصل زیاد در اندام های گیاه اتفاق می افتد. پیام رسانی از ریشه به ساقه نیازمند ترکیبات شیمیایی و یا پیام های فیزیکی است که با احساس تنش توسط ریشه تولید شده و قادر به انتقال در گیاه باشند (Chaves et al., 2004). که ترکیبات شیمیایی تولید شده در ریشه به جریان آوندی اضافه شده و در سرتاسر گیاه حرکت می کنند و بعضی مواقع نیز سلول ها به تغییرات فشار هیدرولیکی و پتانسیل اسمزی ناشی از تنش خشکی بافت آوندی پاسخ داده و پیام به صورت فیزیکی عمل می کند (Chaves et al., 2004). اهمیت نسبی پیام های شیمیایی و پیام های فیزیکی از موارد مورد بحث در تنش خشکی می-باشد، به عنوان مثال تنظیم ساختار روزنه در برگ

زنده و غیرزنده و کشف مکانیزم‌های دفاعی گیاهان به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاحی رشد چشمگیری یافته است. این تکنیک در مورد گیاهانی از جمله ذرت (Vincent, 2005) برنج (Salekdeh et al., 2002; Ali, G.M et al., 2006; Mirzaei et al., 2011) چغندر قند (Hajheidari et al., 2005)، موز (Carpenter, 2007)، یونجه (Aranjuelo) و گندم، (Bazargani et al., 2011) به طور جداگانه تحت شرایط خشکی مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روشها

بدور مورد استفاده در این مطالعه، ژنوتیپ IR64 و از موسسه بین المللی تحقیقات برنج و جهت جوانه زنی به ژرمیناتور منتقل شدند، سه روز پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به محیط کشت پوشیدا و پس از 10 روز به گلدانهایی به ابعاد 15×20×26 که یک دیوار میانی گلدان را به دو قسمت مساوی تقسیم کرده جهت کشت (split-root) منتقل گردید. گلدانها با مخلوطی از شن، ماسه و خاک گلدان با نسبت (1:2:1) پر شدند، گیاهچه بر روی دیوار میانی قرار گرفت و ریشه‌ها به طور مساوی به دو طرف گلدانها هدایت شدند. جهت استقرار، گیاهان به مدت دو هفته در شرایط کاملا یکسان و میزان آب یکسان قرار داشتند پس از اتمام این دو هفته، تنش خشکی در سه تیمار و سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی به این صورت که: آبیاری گلدانها

کند مانند پروتیین‌های LEA افزایش بیان می‌یابند. بررسی و تحقیق در مورد اتفاقاتی که در سطح بیان ژن رخ می‌دهد، رویکردی جهت تشخیص هیدرولیک یا شیمیایی بودن پیام‌هایی که از ریشه‌های در حال خشک شدن می‌آیند. این استراتژی به بهترین نحو در سیستم کشت تقسیم ریشه (split-root) از ترکیب سیگنال‌های مثبت هیدرولیکی حاصل از ریشه‌هایی که در شرایط آبیاری کامل قرار دارند با سیگنال‌های شیمیایی منفی برای کمک به جداسازی سهم هر کدام در احساس خشکی، اجرایی می‌گردد. این روش به طور اختصاصی به شناسایی چگونگی تغییر پروتئوم ریشه‌هایی که در معرض آبیاری کامل هستند توسط پیام‌های هورمونی ناشی از ریشه‌های تحت خشکی کامل و متقابلا اثرهای هیدرولیکی ناشی از ریشه‌های دارای آب کافی بر ریشه‌های در معرض خشکی می‌پردازد و نه تنها حاوی اطلاعات پیام‌های خشکی به ساقه می‌باشد بلکه امکان مطالعه سیگنال‌های با فواصل زیاد و نحوه بیان ژن در تقابل نواحی از سیستم ریشه با میزان آب متفاوت را فراهم می‌کند. همچنین سرخ‌هایی بر پایه و اساس محدودیت آبیاری که در آن ریشه‌های خشک پیام‌های صرفه جویی آب را القا می‌کنند و به طور همزمان گیاه آب کافی را از ناحیه‌ای که آبیاری کامل انجام می‌شود دریافت می‌کند را نیز به ما می‌دهد. پروتئومیکس ابزاری قدرتمند در شناسایی و بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش بوده که در سال‌های اخیر استفاده از آن جهت شناخت ماهیت تنش‌های

(1982) با کمی تغییرات بدین شرح انجام شد. 0/5 گرم از نمونه های منجمد شده در هاون چینی پودر ، و به فالکون های 50 میلی لیتری منتقل شدند. سپس 40 میلی لیتر محلول متانول 80 درصد حاوی و سدیم اسکوربات به آن افزوده شد و به مدت 16 ساعت در تاریکی در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد تا عمل انحلال هورمون ها در محلول به خوبی انجام شود. سپس نمونه ها توسط کاغذ صافی و اتمن 40 صاف شدند. متانول اضافی با استفاده از دستگاه لیوفلایزر از محلول صاف شده حذف شد. به محلول باقی مانده به مقدار مساوی محلول با فر فسفات (8g NaCl , 0.2g KH₂PO₄, 9.6g)⁻¹ (NaHPO₄12H₂O) اضافه شد و pH آن «با هیدرواکسید پتاسیم 0/2 نرمال 2-3 تنظیم شده و دوبار دیگر با اتیل استات شستشو شد با این تفاوت که این بار اتیل استات در فالکون های جداگانه نگهداری شد. سپس اتیل استات توسط دستگاه لیوفلایزر کاملاً تبخیر شد. پس از تبخیر کامل اتیل استات، بالفاصله رسوب باقی مانده رادر 1 میلی لیتر متانول با درجه خلوص HPLC⁶ حل کرده و از فیلتر پلی تترافلوئورو اتیلن 0/45 عبور داده تا نمونه ها آماده تزریق به دستگاه HPLC (Knuer Germany) شوند. سپس با استفاده از ستون C₁₈ و فاز مایع اسید استیک 0/1 نرمال (آب اسید) و متانول 80 درصد مخصوص HPLC به نسبت 50:50 و شدت جریان 0/8 میلی لیتر در دقیقه ، تفکیک ABA صورت گرفته، و شناسایی

⁶ High performance liquid chromatography

همانند دو هفته استقرار ادامه یافت (WW¹). تیمار دوم آبیاری گلدانها کاملاً قطع شد (WD)² و تیمار سوم؛ یک طرف گلدان آبیاری کامل و بخش دیگر همان گلدان قطع آبیاری (spWW³) و بخش دیگر همان گلدان قطع آبیاری (spWD)⁴ اعمال شد و دو هفته پس از تنش نمونه برداری انجام شد، ریشه ها با آب مقطر شستشو و به فریزر 80- انتقال داده شد.

محتوای آب نسبی

محتوای آبی نسبی طبق روش Barrs (1962) اندازه گیری شد. دیسکهایی به قطر یک سانتیمتر از آخرین برگ گسترش یافته تهیه کرده بلافاصله توزین شده و وزن تر⁵ آنها یادداشت گردید. سپس نمونه های گیاهی در 15 میلی لیتر آب مقطر (25 درجه سانتیگراد) غوطه ور شدند. پس از گذشت 16 ساعت از آب مقطر خارج شده و مجدداً وزن آنها تعیین گردید. نمونه های وزن شده به مدت 48 ساعت درون پاکت های کاغذی در آون (70 درجه سانتیگراد) قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. در نهایت وزن نمونه های خشک شده یادداشت گردید و درصد محتوای آب نسبی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

$$RWC(\%) = [(fresh\ weight - dry\ weight) / (turgid\ weight - dry\ weight)] * 100$$

تجزیه و تحلیل کمی ABA

استخراج ABA براساس روش Durley

¹ Well water

² Water Deficit

³ Split root-Well water

⁴ Split root-Water Deficit

⁵ Fresh weight

برای IEF (Isoelectric focusing) به دستگاه Multiphor II منتقل شدند و الکتروفورز در دمای 20°C با برنامه (300V به مدت 1 ساعت، 500V به مدت 1 ساعت، 1000V به مدت 1 ساعت و 3500V به مدت 14 ساعت) انجام شد. پس از انجام IEF ژل‌های نواری به مدت 15 دقیقه در محلول متعادل‌کننده (SDS 6M urea, DTT equilibration buffer (30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 1% w/v DTT, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8) شیک شدند، پس از حذف بافر متعادل‌کننده مجدداً 15 دقیقه دیگر در محلول متعادل‌کننده حاوی 2.5 w/v درصد ایدواستاماید شناور شدند. پس از شستشو با بافر تانک در روی ژل‌های 12 درصد SDS-PAGE قرار داده شدند و از محلول 0/005 w/v درصد آگارز جهت اتصال دو ژل استفاده شد. سپس با استفاده از تانک الکتروفورز عمودی (PROTEIN II, Bio-Rad)، با جریان 200v بعد دوم انجام شد. با پایان یافتن بعد دوم ژل‌ها از روی شیشه جدا و حداقل به مدت یک ساعت در محلول ثابت‌کننده (Fixator Solution) نگهداری شدند. ژل‌های آنالیتیک با استفاده از روش نیترا ت نقره و ژل‌های آماده‌سازی با روش کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شدند (Blum, 1987; Smith, 1995).

اکتساب تصاویر، آنالیز ژل‌ها و شناسایی نقاط با MS

ژل‌ها پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از دنسیتومتر (GS-700 Bio-Rad)، با وضوح

هورمون‌ها با استفاده از دتکتور UV/VIS در طول موج 257 نانومتر انجام شد. باید توجه داشت به دلیل ناپایداری زیاد هورمون‌ها در نور بهتر است در حد امکان مراحل استخراج در تاریکی انجام شود.

استخراج پروتیین

بافت گیاهی نگهداری شده در C° -80 را به طور کامل پودر کرده و استخراج پروتیین از بافت گیاهی توسط تریزول انجام شد. غلظت‌سنجی نمونه‌ها با استفاده از آزمون بردفورد انجام شد. برای انجام این آزمون از پودر پروتیینی BSA و محلول بردفورد (Bio-) Rad, Hercules, CA, USA محلول‌های استاندارد پروتیینی با غلظت مشخص تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary300 در طول موج 595nm تعیین غلظت شدند.

الکتروفورز دو بعدی

از ژل‌های نواری (Immobilin pH IPG (Gradient) تهیه شده از شرکت (Amersham Pharmacia Biotech) با مشخصات (pH=4-7 و 24 Cm) جهت الکتروفورز استفاده شد. در محلول آگیری (8 M Urea, 0.5% Chaps, 0mM DTT, 0.5% v/v (IPG buffer) و 300 میکروگرم پروتیین برای تهیه ژل‌های آنالیتیک (رنگ آمیزی شده با نیترا ت نقره) حل شد طوری که حجم کل محلول به 350 ماکرولیتتر برسد. آنگاه در داخل سینی‌های مخصوص بازجذب، ژل‌های نواری (Reswelling (Trays) به مدت 20 ساعت با این محلول تیمار و

شد که تیمارهای WD و split-root به ترتیب 39% و 23% نسبت به تیمار WW افزایش نشان داد. (شکل 2)

تغییرات الگوی پروتئوم ریشه

از 738 نقطه تکرارپذیر در ریشه، 32 نقطه پروتئینی از نظر آماری در سطح 5 درصد تغییر معنی داری در بیان خود نشان دادند. از این تعداد 13 نقطه پروتئینی در هر دو تیمار WD و spWD افزایش بیان داشته، تعداد 9 نقطه پروتئینی در هر سه تیمار WD، spWD و spWW نسبت به گیاهان نرمال (WW) افزایش نشان داد، تعداد 8 نقطه پروتئینی در گیاهان نرمال بیان نشده و 2 نقطه پروتئینی فقط در تیمار WD افزایش نشان داد. (شکل 3) عملکرد پروتئین‌ها در پاسخ به خشکی را در چند گروه از جمله پروتئین‌های پاسخ دهنده به محرک‌ها، پروتئین‌های دخیل در اکسیداسیون و احیا، متابولیسم لیپیدها و پیام رسانی میتوان خلاصه نمود. پروتئین‌هایی که درگیر پاسخ به محرک‌ها هستند نقشهای مختلفی ایفا می‌کنند که HSP ها و PR پروتئین‌ها گروهی از این دسته هستند که توسط خشکی القا می‌شوند.

PR پروتئین‌ها¹

علیرغم نامشان تنها ویژه بیماری‌ها نیستند بلکه اغلب توسط تنش‌های مختلف غیر زنده القا می‌شوند. خشکی (Dubos, 2001; Lee, 2008)

600dpi اسکن و با فرمت Tiff ذخیره شدند. شناسایی و کمیت سنجی پروتئین‌ها (نقاط) و مقایسه ژل‌های کنترل با ژل‌های تحت تنش، به وسیله نرم‌افزار Gen Bio, Geneva, Melanie6 (Switzerland) انجام شد. در این تحقیق نقاط تکرارپذیر در سه تکرار، به عنوان نقاط مورد نظر برای آنالیز آماری انتخاب شده و آنالیز آماری نقاط با استفاده از t-test انجام و نقاط معنی دار در سطح $(P \leq 0.05)$ در صورتی که مقدار بیان آن‌ها حداقل یک و نیم برابر نسبت به شاهد تغییر داشت، برای شناسایی با ESI-Q-TOF MS/MS، از روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو جدا و به کشور استرالیا جهت شناسایی فرستاده شدند.

نتایج و بحث

محتوای آب نسبی و ABA

محتوای آب نسبی برگ‌ها در هر دو تیمار WD و split-root نسبت به تیمار WW کمتر بود. (شکل 1) تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ‌ها را در تیمار split-root 16% و در تیمار WD حدود 30% نسبت به تیمار WW کاهش داده می‌تواند بازگو کننده این مطلب باشد که نیمی از ریشه‌ها که در شرایط آب کافی قرار دارند ضمن کمبود آب در نیم دیگر ریشه‌ها، توانسته‌اند تا حدی آب کافی را جذب کنند. همگام با کاهش سطح آب سطح ABA نیز در تیمارهای WD و split-root افزایش یافت اما این افزایش مقداری در تیمار WD بیشتر بود. پس از اندازه‌گیری میزان ABA در تیمارها مشخص

¹ Pathogenesis related proteins

شوری، (Hon, Srivastava, 2004) سرما، (Duke, 1996) حرارت و فلزات سنگین، همچنین طی رشد و پیری گیاه القا می- شوند و این القا وابسته به حضور مولکولهای سیگنالینگ مانند اتیلن، آبسزیکاسید و سالیسیلیکاسید می باشد (Marion et al., 2003). پروتئینها اولین بار در تنباکو مشاهده شدند (PR 1-17) (Afroz et al., 2011) و به 17 گروه (PR 1-17) تقسیم می شوند در این مطالعه چهار PR پروتئین در تیمارهای WD و spWD افزایش بیان شدیدی نشان دادند از جمله PR-10 و کیتیناز نقاط پروتئینی 7، 611 و 154 و باروین barwin نقطه پروتئینی 260 که در گیاهان نرمال WW مشاهده نشد و شبه تائوماتین نقطه پروتئینی 19 که علاوه بر افزایش در تیمارهای WD و spWD در تیمار spWW نیز افزایش نشان داده. که القا آن به علت سیگنالهایی است که از ریشه در معرض خشکی ارسال می شود (جدول 1).

شوری، (Hon, Srivastava, 2004) سرما، (Duke, 1996) حرارت و فلزات سنگین، همچنین طی رشد و پیری گیاه القا می- شوند و این القا وابسته به حضور مولکولهای سیگنالینگ مانند اتیلن، آبسزیکاسید و سالیسیلیکاسید می باشد (Marion et al., 2003). پروتئینها اولین بار در تنباکو مشاهده شدند (PR 1-17) (Afroz et al., 2011) و به 17 گروه (PR 1-17) تقسیم می شوند در این مطالعه چهار PR پروتئین در تیمارهای WD و spWD افزایش بیان شدیدی نشان دادند از جمله PR-10 و کیتیناز نقاط پروتئینی 7، 611 و 154 و باروین barwin نقطه پروتئینی 260 که در گیاهان نرمال WW مشاهده نشد و شبه تائوماتین نقطه پروتئینی 19 که علاوه بر افزایش در تیمارهای WD و spWD در تیمار spWW نیز افزایش نشان داده. که القا آن به علت سیگنالهایی است که از ریشه در معرض خشکی ارسال می شود (جدول 1).

تیرودوکسین³

از سری پروتئینهایی هستند که طی تنش خشکی بیان می شوند و دارای توان احیا کننده گی بالایی بوده و بنابراین نقش مهمی در اکسیداسیون و احیا سلولی دارند. این آنزیم از آنزیمهای مهم در مسیرهای متابولیک و تنظیمی دیگر همچون چرخه کالوین، متابولیسم انرژی، فتوسنتز، پیچش پروتئینها و سنتز آمینواسیدها محسوب می گردند (Sanchez & Hochstrasser, 1999).

پروتئینهای شوک حرارتی (HSPs)¹ و چاپرونینها موجودات زنده در پاسخ به دماهای بالا سنتز گروهی از پروتئینها به نام پروتئینهای شوک حرارتی (HSPs) را که از نظر تکاملی حفظ شده اند، افزایش می دهند (Vierling, 1991). هنگامی که گیاهان در معرض دماهای بالا قرار می گیرند سنتز hspهای با وزن مولکولی زیاد (60-110kDa) و hspهای با وزن مولکولی کم

²-Stress-related chaperon

¹-Thioredoxin

¹-Heat shock protein

جدول 1- نتایج طیف سنجی جرمی پروتئین‌های ریشه گیاه برنج که به روش ESI-Q-TOF MS/MS شناسایی شده‌اند. نقاط شناسایی شده به شدت افزایش بیان نسبت به WW نشان دادند ($p < 0.05$).
NWW: این نقطه پروتئینی در WW قابل جداسازی نبودند.

Table 1. Differentially expressed proteins identified by MALDI TOF/TOF mass spectrometer Significant up-regulated proteins in spWD and/or DD and/or spWW conditions compared to WW condition ($p < 0.05$); NWW: not detected in well-watered samples.

Spot ^a	Exp. pI/MW ^b	Theo. pI/MW	Gi no. ^d	Protein name	Score/coverage ^e	PMF/MS-MS ^f	Induction Factor		
							SPWD/WW	SPW W/WW	DD/WW
2	4.7/16	5/15	2072553	salT protein	225/66		2.94	1.70	4.438
3	4.7/17	5.19/15	2072553	salT protein	245/31	4/2	NWW		
7	4.6/17	5.56/22	115462835	chitinase	231/14	3/2	3.32	1.52	2.98
10	5/16	5/15	115436436	salT protein	1060/71	7/7	8.19	2.68	5.41
16	5.25/16	4.9/13	82407383	Thioredoxin Type H	184/23	3/3	7.03	1.9	6.77
19	5.31/19	5.07/17	115489688	Thaumatococcus-like protein	182/22	3/3	5.21	1.75	5.95
26	5.21/19	4.88/16	115489014	pathogenesis-related protein 10	410/54	8/6	4.07	1.39	4.97
58	6.49/16	8.16/16	125535005	Barwin	506/34	5/4	NWW		
75	5.65/33	8.34/40	115434068	Late embryogenesis abundant protein, group 3	72/37	2/1	NWW		
136	5.32/31	5.25/38	9068149	drought-induced S-like ribonuclease	84/40	6/1	3.76	1.85	2.95
150	5.54/29	5.76/24	115482666	Secretory protein, Putative	693/58	8/6	12.05	8.94	17.08
154	5.45/30	6.28/27	3370780	chitinase	143/35	4/3	7.96	2.04	7.94
167	5/33	4.92/21	115435500	DREPP plasma membrane polypeptide family protein	437/24	5/4	4.74	1.87	3.29
170	5.1/32	5.01/27	115461070	Receptor like-protein kinase DUF26	116/22	6/3	2.71	1.71	2.76
175	4.97/35	5/15	158513205	salT protein	473/51	6/4	7.75	4.06	4.63
202	4.65/33	4.48/31	115482030	Chitinase class III	279/29	11/4	NWW		
218	5/42	4.9/34	115456523	Late embryogenesis abundant protein 2 family	300/21	8/4	2.03	2.64	2.13
224	5/53	4.94/42	115481300	EF-Hand containing protein	339/11	3/3	3.79	3.53	6.15
225	5.3/52	4.94/42	115481300	EF-Hand containing protein	356/15		4.70	2.88	7.15
235	4.88/23	4.9/16	115456239	Actin-depolymerizing factor 3	560/47		2.85	2.99	5.06
251	5.51/17	5/15	158513205	salT protein	168/45	5/2	NWW		
260	5.78/15	8.16/16	125535005	Barwin	477/46	8/3	NWW		
272	6.13/30	5.72/23	115440119	glutathione S-transferase II	293/33	7/2	6.89	4.67	7.16

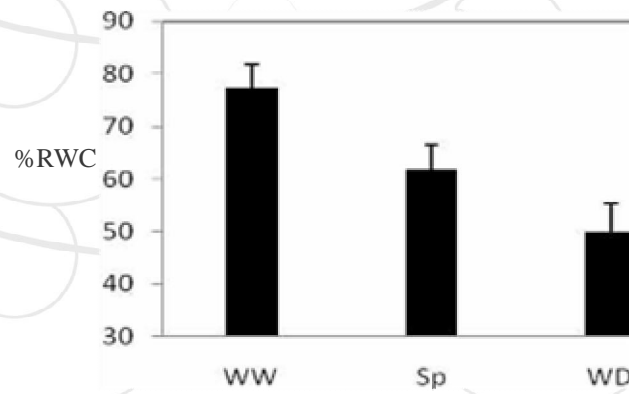
Continue table 1

Spot ^a	Exp. pI/MW ^b	Theo. pI /MW	Gi no. ^d	Protein name	Score/coverage ^e	PMF/MS-MS ^f	Induction Factor		
							SPWD /WW	SPW W/ WW	DD/ WW
302	5.64/41	5.38/34	115474653	60S acidic ribosomal protein P0	430/19	6/4	1.35	1.09	1.74
323	5.3/39	5/15	158513205	salT protein	188/45	5/4	12.07	2.30	2.95
336	5.16/42	5.02/35	125559927	Fructokinase-2	108/10	2/1	2.53	2.37	2.17
381	4.93/91	5.12/73	222631026	heat shock protein 70, chloroplast	143/6	3/3	1.52	0.96	2.00
382	4.94/93	5.12/73	222631026	heat shock protein 70, chloroplast	464/12	8/5	2.2	1.05	2.13
611	4.49/39	4.47/34	115463755	Chitinase 9	373/22	6/3	16.03	3.65	33.77
628	6.31/31	6.08/32	54291729	putative chitinase	157/20	10/2	NWW		
691	4.86/13	5.39/7	125526847	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor	87/49	4/2	NWW		
726	5.57/38	/32	115475151	glyoxalase I	337/	14/5	2.30	1.20	2.13

نتیجه گیری

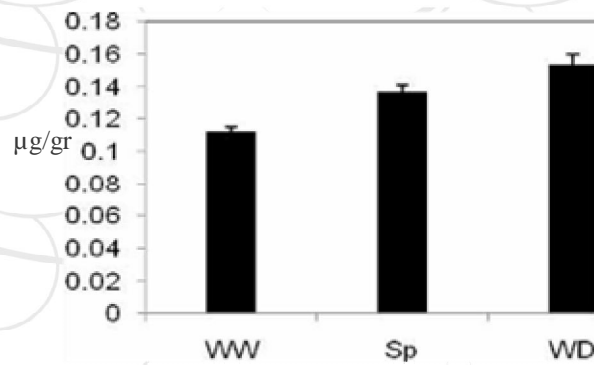
استفاده از سیستم کشت تقسیم ریشه امکان بررسی حضور پیام‌های ریشه در گیاهان برنج تحت تنش را فراهم ساخته است. این مطلب با کاهش در محتوای آب نسبی، وزن خشک و افزایش میزان ABA در گیاهانی که فقط یک قسمت از ریشه‌هایش تحت تنش قرار داشتند، نشان داده شد همچنین نتایج افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی از جمله PR پروتئین‌ها، HSPs و پروتئین‌های درگیر در اکسیداسیون واحیا را نشان می‌دهد. این مطالعه می‌تواند سرآغاز خوبی برای مطالعات بیشتر در زمینه بررسی نقش پروتئین‌های متفاوت در شروع و پیشرفت تنش خشکی و عملکرد دقیق آنها در مراحل مختلف رشد گیاه و تنش باشد.

علاوه بر این، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، تیوردوکسین‌ها باعث محافظت سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو حاصل از تنش‌ها می‌شود و از طریق حذف H_2O_2 و برخی رادیکال‌های آزاد، در فرایند سم‌زدایی این ترکیبات شرکت می‌نمایند (Zhu, J.K, 2001). تیوردوکسین‌ها در تعدادی از فرایندهای بیوشیمیایی مانند نقل و انتقال پروتئین و نشاسته در زمان جوانه‌زنی بذور غلات و تنظیم فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نیز دخالت دارند (Balmer, 2004). نقطه پروتئینی 16 مربوط به این آنزیم بوده که در تیمارهای WD و spWD افزایش بیان بالایی نسبت به WW نشان داده در صورتیکه افزایش بیان در تیمار spWW نسبت به تیمار نرمال معنا دار نبوده است (جدول 1).



شکل 1- محتوای آب نسبی.

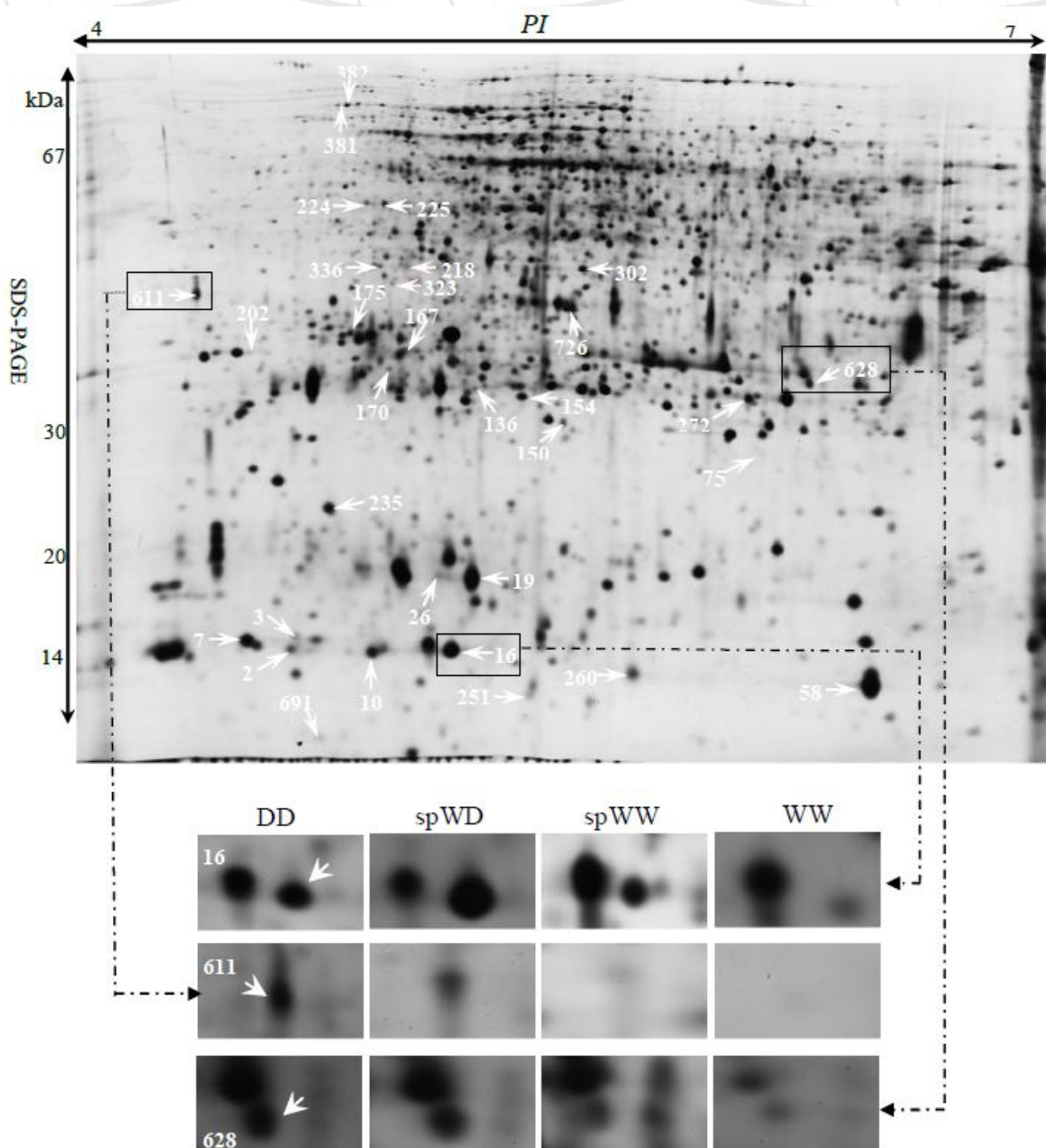
Figure 1- Relative water content.



شکل 2- میزان آبسزیک اسید میکروگرم در هر گرم بافت گیاه

Figure 2- Abscisic acid in microgram per gram of leaf tissue.

شکل 1 و 2 پارامترهای فیزیولوژیک که از برگ گیاهان با آبیاری کامل (WW)، تحت خشکی (WD) و گیاهان در شرایط تقسیم ریشه (SP) تهیه شد.



شکل 3- تصویر ژل دوبعدی ریشه برنج و بزرگنمایی نقاط شناسایی شده. در بعد اول 300 میکروگرم پروتیین از هر نمونه روی ژل‌های نواری لود شد و برای بعد دوم از ژل‌های 12 درصد SDS-PAGE استفاده شد. رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای ظاهرسازی نقاط به کار رفت. نقاط اشاره شده مجموعه پروتیین‌های ریشه برنج را نشان می‌دهد که بیان آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی تغییر یافته است.

Figure 3- 2-D gel analysis of proteins extracted from root. In the first dimension (IEF), 300 μ g of protein was loaded on a 24 cm IPG strip with a linear gradient of pH 4-7. In the second dimension, 12% SDS-PAGE gels were used, with a well for molecular weight standards. Proteins were visualized by silver staining. Arrows represent drought responsive spots identified by MS (Table 1).

- Afroz GM, Ali A (2011). Springer Application of proteomics to investigate stress induced proteins for improvement in crop protection. *Plant cell reports* 30:745-763 .
- Ali G, Komatsu S (2006). Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Proteome Research* 5: 396-403.
- Aranjuelo I, Molero G, Erice G, Avicé J, Nogués S (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Experimental Botany* 62: 23-111.
- Ashraf (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Review plant science* 13: 17-32
- Balmer Y, Vensel C, Tanaka W, Hukman, Gelhaye E, Rouhier J, Jacquot W, Manieri P, Schurmann M (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 101: 2642-2647.
- Barrs H, Weatherley P (1962). Reexamination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413-428
- Bazargani M, Sarhadi E, Bushehri A, Matros A, Mock H.P, Naghavi M, Hajihoseini V, Mardi M, Hajirezaei M, Moradi F, Ehdaie B, Salekdeh G.H (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Proteomics* 6;74(10):1959-73.
- Blackman P.G, Davies W (1985). Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *Experimental Botany* 36: 39-48.
- Blum H, Beier H, Bremer E (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93-99.
- Boyer J.S (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-444.
- Carpentier S, Witters E, Laukens K, Van Onckelen R, Panis B (2007). Banana (*Musa spp.*) as a model to study the meristem proteome: Acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7: 92-105.
- Chaves M, Maroco J.P and Pereira J.S (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant, *Functional plant Biology* 30: 239- 264.
- Comstock p (2002). Hydraulic and chemical signaling in the control of stoma conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany* 16: 341-349.
- Dubos C, Plomion C (2001). Drought differentially affects expression of a PR-10 protein in needles of maritime pine (*Pinus pinaster Ait.*) seedlings. *Experimental Botany* 52: 1143-1144.
- Duke E. R, Doehlert D (1996). Effects of heat stress on enzyme activities and transcript levels in developing maize kernels grown in culture. *Environ. Experimental Botany* 36: 199-208.
- Durley R. C, Kannagara T, Simpson G (1982). Leaf analysis for abscisic, phaseic and 3-indolylacetic acids by high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography* 236: 181-188.
- Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Ober E, Hosseini Salekdeh G (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought. *Proteomics* 5: 950-960.
- Hon C, Griffith M, ynarz A, Yang D (1995). Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology*. 109: 879-889.
- Hsiao T. C (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519-570.
- Kavar T, Maaras M, Kidrie S, ustar – Vozlie J and Meglic V (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Springer* 21: 159-172.

- Lee B, Jung W, Lee B, Avice J, Ourry A, Kim T (2008). Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Plant Physiology* 132: 329-337.
- Marion, Fecht-Christoffer, HP Braun (2003). Effect of manganese toxicity on the proteome of cowpea plant physiology 4: 1935-1946.
- Miernyk JA (1997). The 70 KDa stress-related proteins as molecular chaperons. *Trends. Plant science* 2: 180-187.
- Mirzaei M, Pascovici D, Atwell B, Haynes P (2011). Differential regulation of aquaporins and small GTPases in rice leaves subjected to drought stress and recovery. *Proteomics* 12: 864-877.
- Nilson S, Assmann S (2010). The α -subunit of the arabidopsis heterotrimeric Gprotein, GPA1, is a regulator of transpiration efficiency. *Plant Physiology* 152: 2067-2077.
- Saab N, Sharp R, Pritchard J, Voetberg S (1990). Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology* 93: 1329-1336.
- Salekdeh G. H, Siopongco, Bennet J (2002). proteomic analysis of rice leaves during drought stress. *Proteomics* 2: 1131-1145.
- Sanchez J. C, Hochstrasser D. F (1999). High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*. 112: 227-233.
- Sharp R, Davies W (1985). Root growth and water uptake by maize plants in drying soil. *J. Experimental Botany* 36: 1441-1456.
- Shinozaki K and Yamaguchi – Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross – talk between two stress signaling pathways. *plant Biology* 3: 217-223.
- Smith DM, Tran HM, Epstein LB (1995). Two-dimensional electro- (*Balkwill, F. R., ed.*), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, pp 111-128.
- Srivastava S, Fristensky B, Kav N. N. V (2004). Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of Brassica napus under saline conditions. *Plant Cell Physiology* 45: 1320-1324.
- Vierling E (1991). The role of heat shock protein in plants. *Annual review plant physiol Plant Mol Biol* 42: 579-620.
- Vincent D, Lapierre C, Pollet B, Cornic G, Negroni L, Zivy M (2005). Water deficits affect caffeate o-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves *Plant Physiology* 137: 949-960.
- Yamaguchi- Shinozaki K, Kasugal M, Liu Q, Nakadhima K, Saluma Y, Abe H, Shinwari Z, Seki M and shinozaki K (2002). Biological mechanisms of drought stress response. *JIFCAS Working Report*. Pp, 1-8.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are mastertranscription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant journal* 61: 672-685.
- Zhu J. K (2001). Plant salt tolerance. *Plant Science*. 6: 66-71.

Proteome analyses of drought signaling in rice root

Soltani N.¹, Hosseini Salekdeh Gh*²

¹Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Karaj, Iran.

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) was grown in split-root systems in order to analyze long-distance drought signaling within root systems. This in turn underpins how root systems in heterogeneous soils adapt to drought. The approach was to compare four root tissues: Well watered (WW), water deficit (WD), split-root systems where one half was well watered (spWW) and the other half water deficit (spWD). This was specifically aimed at identifying how drought root tissues altered the proteome of adjacent wet roots by hormone signals and secondly, how wet roots reciprocally affected dry roots hydraulically. Using a 2-DE based proteomics approach, 738 protein spots were reproducibly detected, Thirty-two proteins showed reproducible and statistically significant changes in response to drought. Of them, 13 protein spots up-regulated in WD and spWD treatments. Of them 9 protein spots up-regulated in WD, spWD and spWW treatments, 8 protein spots not detected in WW and 2 protein spots just detected in WD. Specific functional groups changed consistently in drought. Pathogenesis-related proteins were generally up-regulated in response to drought and heat-shock proteins and thioredoxin were totally absent in roots of fully watered plants.

Keywords: *Drought, Split root, Rice, Proteomics.*²

*Corresponding Author: Hosseini Salekdeh Gh.

Tel: 02632703536

Email: h_salekdeh@abrii.ac.ir