بسم الله الرحمن الرحیم

پژوهشکده برنج و مرکبات

دانشگاه مازندران

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم زراعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc)
رشته مهندسی کشاورزی
گرایش اصلاح نباتات

موضوع:

بررسی برخی از خصوصیات فیزیولوژیک و آنالیز بیان پروتئین‌های پاسخگو به تنش شوری در گیاه *Aeluropus littoralis*

استاد راهنما:

دکتر قربانعلی نعمت زاده
دکتر حسین عسکری

نام دانشجو:

نجمه نصیری

تیر ۱۳۸۹

سپاسگزاری:

اکنون در آغاز یک پایان، خداوند منان را سپاسگزارم که نعمت تحصیل علم و دانش را به من عطا فرمود و مرا یاری نمود تا مرحله دیگر از زندگی را پشت سر نهاده و با امید به الطاف بی‌کرا نش، خود را برای مراحل دیگر زندگی آماده کنم، که بی لطف او هیچ امری محقق نخواهد بود. اکنون بر خود واجب می‌دانم از همه عزیزانی که در انجام این پایان نامه به هر طریق مرا یاری نمودند، سپاسگزاری کرده و برای آنها آرزوی توفیق روز افزون داشته باشم:

از **پدر فداکار و مادر مهربانم** بخاطر تمام صبوری‌ها و خوبی‌هایشان بینهایت سپاسگزارم و نعمت سلامتی و سعادت دنیا و آخرت و طول عمر با عزت را برایشان آرزومندم.

اما انجام این پژوهش بدون مساعدت استاد گرانقدر جناب آقای **دکتر قربانعلی نعمت زاده** که نقش ایشان به واقع فراتر از حد راهنمایی پایان‌نامه و برای اینجانب استاد علم، ادب و اخلاق هستند میسر نبوده است که بدین وسیله از لطف و توجه ایشان قدردانی و حق شناسی می‌کنم.

از جناب آقای **دکتر حسین عسکری** که در طی مراحل انجام پژوهش از راهنمایی‌های ارزنده شان استفاده نموده و همواره پاسخگوئی صبور برای چراهایم بودند و از مکتب این استاد بزرگوار درس‌های زندگی آموختم و بدون شک سالیان متمادی سرمایه گرانقدر برای اینجانب خواهد بود، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از اساتید ارجمند جناب آقای **دکتر نجفی، دکتر کاظمی تبار** و **دکتر پیردشتی** که زحمت مطالعه و داوری این پایان‌نامه را بر عهده داشتند و ایرادات و نواقص آن را گوشزد کردند، تشکر می‌کنم.

از اساتید ارجمند جناب آقای **دکتر نصرت صفائیان** و سرکار خانم **دکتر مریم شکری** به خاطر راهنمایی های ارزنده شان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید ارجمند جناب آقای **دکتر محمدمجتبی کامل‌منش** و سرکار خانم **دکتر آنیتا نماینده** و خانواده محترمشان که در لحظه لحظه زندگی همراه من بوده و در غم و شادی با من شریک بودند و مرا همیشه مورد لطف خود قرار دادند سپاسگزاری نموده و آرزوی توفیق روز افزون برای آنها و پسر عزیزشان **آرتین** را دارم.

از جناب آقای مهندس **احسان شکری**، بخاطر تمام تلاش‌ها و همیاری و همکاری صمیمانه در این پروژه و همچنین رفع اشکالات نگارشی پایان‌نامه کمال سپاس و قدردانی را دارم.

همچنین از مسئولین محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات، آزمایشگاه ژنومیکس، آقایان مهندس **هاشمی و علوی** و آزمایشگاه پروتئومیکس، **سرکار خانم دکتر مرادیان** کمال سپاس و قدردانی را دارم.

و در پایان از تمامی دوستان عزیزم به پاس خلوص لحظات با هم بودن کمال تشکر و قدردانی را دارم.

زیبایی علم در این است که پیوسته به این نتیجه می‌رسی که هنوز چیزی هست که نمی‌دانی...

نجمه نصیری

۲۳/ تیرماه/۱۳۸۹

تقدیم به:

یگانه منجی عالم بشریت حضرت مهدی(عج)

روح پاک برادر و مادر بزرگ عزیزم

و

پدر، مادر و برادر عزیزم

به پاس بیکران محبتشان

چکیده:

عوامل نامساعد محیطی تأثیر نامطلوبی بر تولید گیاهان زراعی دارند. شوری خاک یکی از مهمترین عوامل محدود کننده گیاهان زراعی است. شوری با بر هم زدن تعادل یونی باعث ایجاد تنش اسمزی و یونی در سلول‌های گیاهی می‌شود. با فعال کردن ژن‌های پاسخ دهنده به تنش، گیاهان به این تنش غیر زنده پاسخ می‌دهند. محصول برخی از این ژن‌ها می‌تواند میزان مقاومت گیاه را به تنش بالا ببرد. با توجه به این که تحمل گیاهان وحشی نسبت به تنش شوری از گیاهان خویشاوند زراعی بیشتر است، لذا شناسایی انواع متحمل به شوری از اهمیت خاصی برخوردار است. پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها در هنگام رویارویی گیاه با تنش شوری است. در این تحقیق اثر تنش شوری بر برخی از خصوصیات فیزیولوژی و الگوی پروتئوم برگی گیاه *Aeluropus littoralis* مورد بررسی قرار گرفت. گیاه *Aeluropus littoralis* از منطقه آق‌قلا گرگان جمع‌آوری گردید. سپس بوته‌های جمع-آوری شده در داخل گلخانه در خاک کشت گردید. بعد از ۲ ماه از رشد فیزیولوژی برای تکثیر گیاه ابتدا گره‌ها جدا شده و پس از ریشه‌دار شدن به گلدان منتقل شد. پس از رشد گیاه سطوح مختلف تنش شوری (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) به صورت پاساژدهی اعمال گردید. آزمایش فوق با سه تکرار و در هر تکرار ۵ گلدان مورد بررسی قرار گرفت. ۷۵ روز پس از اعمال تنش شوری، اندام هوایی گلدان کف بر گردید و وزن تر و وزن خشک تک برگ و تک میانگره، محتوای نسبی آب تک برگ، دینامیک رشد برگ، درصد رطوبت نسبی برگ، سطح تک برگ، طول تک میانگره، وزن تر و خشک تک میانگره، میزان دفع نمک از سطح تک برگ، میزان دفع نمک از تک میانگره، محتوای سدیم و پتاسیم تک برگ مورد بررسی قرار گرفت. استخراج پروتئین بر اساس روش دامروال با اندکی تغییرات انجام گرفت. پروتئین‌های استخراج شده از برگ بوسیله ژل الکتروفورز دو بعدی با استفاده از نوارهای *IPG* با pH ، ۴ تا ۷ در بعد اول مورد بررسی قرار گرفتند. در بعد دوم از ژل پلی اکریل آمید با غلظت ۱۲/۵ درصد استفاده شد. برای بررسی کمّی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار *Melanie 6.2* استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز ژل-ها با نرم افزار نشان داد که بین ۵۵۰ لکه که به طور تکرار پذیری در شاهد مشاهده شدند تنها تعداد معدودی از لکه‌ها (۱۷۰ لکه) به طور افتراقی بیان شان تغییر یافته بود که نمودارهای مربوط به این لکه‌ها رسم شد و از بین این لکه‌ها تعداد ۹۵ لکه انتخاب شد، که تعداد ۸۷ لکه تغییر دو برابری در بیان داشتند. همچنین تعداد ۶۲ لکه تغییر سه برابری در بیان و تعداد ۵۳ لکه تغییر چهار برابری در بیان داشتند. نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها نشان داد که الگوی بیان ۳۷ پروتئین در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار تغییر معنی‌داری در بیان نشان داده است. از بین این ۳۷ پروتئین، ۱۹ پروتئین در پاسخ به تنش شوری افزایش بیان و ۱۸ پروتئین کاهش بیان از خود نشان دادند. در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار الگوی بیان ۸۰ پروتئین تغییر معنی‌داری در بیان نشان داد که از این تعداد ۶۶ پروتئین افزایش بیان و ۱۴ پروتئین کاهش بیان از خود نشان دادند. در تیمار ۳۰۰ میلی‌مولار الگوی بیان ۴۴ پروتئین تغییر معنی‌داری در بیان نشان داد که از این تعداد ۱۹ پروتئین افزایش بیان و ۲۵ پروتئین کاهش بیان از خود نشان دادند. به منظور تعیین رابطه هم بیانی پروتئین‌های پاسخگو یک مجموعه داده با ۹۵ عضو تعیین شد. مطابق روش *Eisen* با استفاده از نرم افزار *Cluster version 2.11* با الگوریتم *Average Leankage* و ضریب همبستگی پیرسون داده‌های پروتئینی که تغییرات معنی‌داری را نشان داده بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس اطلاعات به دست آمده از آنالیز شجره‌ای ۳ گروه بزرگ هم بیان شناسایی شد که ۲ گروه واجد قرابت بزرگتری بودند. به منظور تعیین صحیح‌ترین تعداد خوشه، ۴ برش که به ترتیب تعداد ۲۴، ۱۶، ۱۰ و ۶ گروه هم بیان را شکل داد بر روی الگوی به دست آمده اجرا شد و جهت مقایسه آماری مطابق روش *Tomida* مفهوم انحراف استاندارد میانگین محاسبه شد. به منظور ارزیابی تأثیر آنالیز کلاستر بر سطح انحراف استاندارد میانگین تمام تغییرات با مقدار پایه ASD در شرایط بدون گروه‌بندی مقایسه شد. در نهایت تعداد ۱۰ کلاستر تعیین شد و بر این اساس الگوی بیان هر گروه نیز ترسیم شد. پروتئین‌های کاندیدی که روی ژل کوماسی مشاهده شدند جداسازی و برای شناسایی با استفاده از طیف سنج جرمی ارسال شدند.

کلمات کلیدی: تنش شوری، *Aeluropus littoralis*، الکتروفورز دو بعدی، پروتئومیکس

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
فصل دوم: کلیات و بررسی منابع	
۲- شوری	۴
۲-۱- سازوکارهای مقاومت به شوری در گیاهان	۴
۲-۱-۱- هم ایستایی یونی و اسمزی	۶
۲-۱-۲- پاسخ و جبران آسیب حاصل از شوری و ترمیم آن	۷
۲-۱-۲- ۱- سمیت‌زدایی و سیستم‌های آنتی‌اکسیداتیو	۷
۲-۱-۳- غده‌ها و کیسه‌های نمکی	۷
۲-۱-۴- گوشتی شدن به منظور تنظیم فشار اسمزی در برگ‌ها	۸
۲-۲- مسیرهای ترارسانی علامت در تنش شوری	۸
۲-۲-۱- فعالیت کلسیم سیتوسلی	۸
۲-۲-۲- فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین	۸
۲-۲-۳- مسیر علامت دهی SOS	۹
۲-۲-۴- عوامل رونویسی	۹
۲-۲-۵- پاسخ‌های علامت‌دهی ویژه سلولی	۱۰
۲-۳- اثرات شوری بر فعالیت ATPase ها	۱۰
۲-۴- اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شوری بر گیاهان	۱۱
۲-۴-۱- رشد گیاه	۱۱
۲-۴-۲- کربوهیدرات‌ها	۱۱
۲-۴-۳- اسمولیت‌های سازگار	۱۲
۲-۴-۳-۱- پرولین	۱۲
۲-۴-۳-۲- پروتئین‌ها	۱۲
۲-۵- پاداکساینده‌ها (Antioxidants)	۱۳
۲-۵- ۱- پاداکساینده‌های غیر آنزیمی	۱۳
۲-۵-۲- پاداکساینده‌های آنزیمی	۱۴
۲-۵-۲-۱- آنزیم پراکسیداز(PPX)	۱۴
۲-۵-۲-۲- آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز(PPO)	۱۵
۲-۵-۲-۳- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD)	۱۵
۲-۵-۲-۴- آنزیم کاتالاز (CAT)	۱۶
۲-۶- شوری و ترکیبات فنلی محلول	۱۶
۲-۷- شوری و فتوسنتز	۱۷
۲-۸- شوری و رنگیزه‌ها	۱۷
۲-۹- شوری و عناصر معدنی	۱۷
۲-۱۰- تأثیر تنش شوری بر بیان ژن‌ها و دستورزی گیاهان برای افزایش تحمل شوری	۱۸
۲-۱۱- اصلاح برای مقاومت به شوری	۱۹
۲-۱۱-۱- اصلاح گیاهان با استفاده از منابع ژنی موجود	۱۹
۲-۱۱-۲- تکنیک‌های کشت بافت	۲۰

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۲-۱۱-۳- مهندسی ژنتیک و روش‌های مولکولی ۲۱
۲-۱۱-۴- انتقال تک ژن جهت بهبود مقاومت گیاه به تنش ۲۱
۲-۱۱-۵- مسیرهای سیگنال‌دهی ۲۲
۲-۱۱-۶- دست‌ورزی ژنتیکی تنظیم کننده‌های نسخه برداری ۲۲
۲-۱۲- مقاومت به شوری در سطح مولکولی ۲۳
۲-۱۲-۱- پروتئین‌ها و ژن‌های پاسخ دهنده به تنش ۲۳
۲-۱۲-۲- پروموتورهای القاء شونده توسط تنش ۲۴
۲-۱۲-۳- فاکتورهای رونویسی مربوط به تنش ۲۵
۲-۱۲-۴- اجزاء انتقال سیگنال‌های مربوط به تنش ۲۵
۲-۱۳- ژنومیکس کاربردی ۲۶
۲-۱۳-۱- بررسی بیان ژن در سطح رونوشت (ترانسکریپتومیکس) ۲۶
۲-۱۳-۲- بررسی بیان ژن در سطح متابولیت‌ها (متابولومیکس) ۲۷
۲-۱۳-۳- بررسی بیان ژن در سطح فنوتیپ (فنومیکس) ۲۷
۲-۱۳-۴- بررسی بیان ژن در سطح پروتئین (پروتئومیکس) ۲۷
۲-۱۳-۴-۱- پروتئومیکس بیان (Profiling Proteomics) ۳۰
۲-۱۳-۴-۲- پروتئومیکس عملکردی (Functional Proteomics) ۳۱
۲-۱۳-۴-۳- پروتئومیکس ساختاری (Stractural Proteomics) ۳۱
۲-۱۳-۴-۴- گلیکوپروتئومیکس (Glyco Proteomics) ۳۱
۲-۱۳-۴-۵- شیمو پروتئومیکس (Chemo Proteomics) ۳۱
۲-۱۳-۴-۶- پروتئومیکس نقشه سلولی (Cell-Map Proteomics) ۳۲
۲-۱۴- محدودیت‌های پروتئومیکس ۳۲
۲-۱۵- مزایای پروتئومیکس ۳۳
۲-۱۶- شرایط انجام تکنیک پروتئومیکس ۳۳
۲-۱۶-۱- نمونه برداری ۳۳
۲-۱۶-۲- استخراج پروتئین ۳۳
۲-۱۶-۳- الکتروفورز دوبعدی ۳۴
۲-۱۶-۴- آشکارسازی پروتئین‌ها ۳۵
۲-۱۶-۵- آنالیز کمّی پروتئین‌ها با نرم افزار ۳۶
۲-۱۶-۶- شناسایی پروتئین‌ها ۳۸
۲-۱۶-۶-۱ روش توالی یابی انتهایی پروتئین‌ها (توالی‌یابی به روش تجزیه انتهایی اِدمن) ۳۸
۲-۱۶-۶-۲- استفاده از طیف سنجی جرمی برای شناسایی پروتئین‌ها ۳۸
۲-۱۶-۶-۳- طیف سنج جرمی متوالی (MS\MS) ۴۱
۲-۱۷- بیوانفورماتیک ۴۲
۲-۱۷-۱- بانک‌های اطلاعات تصاویر ۴۴
۲-۱۸- تکنولوژی DIGE ۴۴
۲-۱۹- کاربردهای پروتئومیکس ۴۶
۲-۱۹-۱- ICAT (Isotope-Coded-Affinity Tag) ۴۶

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۲-۱۹-۲- پروتئین آری ۴۸
۲-۱۹-۳- تحقیقات دارویی و درمانی ۴۸
۲-۱۹-۴- تحقیقات پایه‌ای ۴۹
۲-۲۰- مطالعات گیاهی ۴۹
۲-۲۰-۱- پروتئوم اندامک‌ها ۴۹
۲-۲۰-۲- پروتئوم کلروپلاست ۵۰
۲-۲۰-۳- پروتئوم میتوکندری ۵۱
۲-۲۰-۴- پروتئوم هسته ۵۱
۲-۲۰-۵- پروتئوم غشاها ۵۲
۲-۲۰-۶- پروتئوم بافت‌ها و اندام‌ها ۵۳
۲-۲۱- کاربردهای پروتئومیکس در ژنتیک و اصلاح نبات ۵۷
۲-۲۲- پروتئومیکس و پروتئین‌های شناسایی شده دخیل در تنش‌های محیطی ۵۷
۲-۲۲-۱- سوپر اکسید دیسموتاز ۵۷
۲-۲۲-۲- اسکوربات پراکسیداز ۵۸
۲-۲۲-۳- گلوتاتیون ردوکتاز ۵۸
۲-۲۲-۴- کاتالاز ۵۸
۲-۲۲-۵- پروتئین‌های چرخه SOS ۵۹
۲-۲۲-۶- پیام رسانی توسط متیل جاسمونات و پروتئین‌های دخیل در آن ۵۹
۲-۲۲-۷- پروتئین‌های شوک حرارتی و چاپرون‌ها ۵۹
۲-۲۳- مشخصات جنس *Aeluropus* ۶۰
۲-۲۴- کلید شناسایی گونه‌های *Aeluropus* در ایران ۶۰
۲-۲۵- مشخصات گیاه‌شناسی گونه *Aeluropus littoralis* ۶۰
۲-۲۶- پراکندگی جغرافیایی *Aeluropus littoralis* در جهان و ایران ۶۱
۲-۲۷- اهمیت گونه *Aeluropus littoralis* ۶۱
۲-۲۸- مروری برتحقیقات پیشین ۶۲

فصل سوم: مواد و روش ها

۳- ارزیابی تحمل به تنش شوری در بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه در مرحله جوانه زنی ۶۵
۳-۱- جمع آوری مواد گیاهی و نحوه اعمال تیمارها ۶۵
۳-۱-۱- پارامترهای جوانه زنی مورد بررسی ۶۵
۳-۱-۲- آماده سازی نمونه و شناسایی ترکیب‌های عصاره با استفاده از دستگاه GC-MS ۶۵
۳-۱-۲-۱- استخراج عصاره ۶۵
۳-۱-۲-۲- تزریق به دستگاه GC-MS ۶۶
۳-۱-۳- تجزیه و تحلیل آماری ۶۶
۳-۲- شوری و شاخص‌های فیزیولوژیکی ۶۷
۳-۲-۱- اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه ۶۷
۳-۲-۲- اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ ۶۷
۳-۲-۳- اندازه‌گیری عناصر ۶۸

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۳-۲-۳-۱- آماده سازی نمونه‌ها جهت بررسی عناصر ۶۸
۳-۲-۳-۲- هضم ماده گیاهی بمنظور اندازه‌گیری عناصر ۶۸
۳-۲-۳-۳- سنجش غلظت یون سدیم در بافت‌های مختلف گیاهی ۶۹
۳-۲-۳-۴- سنجش غلظت یون پتاسیم در بافت‌های مختلف گیاهی ۶۹
۳-۳- شوری و بیان پروتئین‌های پاسخگو به تنش ۶۹
۳-۳-۱- تهیه مواد گیاهی و نحوه اعمال تیمارها برای پروتئومیکس ۶۹
۳-۳-۱-۱- اهمیت اندازه‌گیری pH در کشت هیدروپونیک ۶۹
۳-۳-۱-۲- اهمیت اندازه‌گیری دما در کشت هیدروپونیک ۷۰
۳-۳-۱-۳- اهمیت اندازه‌گیری هدایت الکتریکی در کشت هیدروپونیک ۷۰
۳-۳-۲- استخراج پروتئین ۷۱
۳-۳-۳- تعیین غلظت پروتئین‌ها ۷۱
۳-۳-۴- الکتروفورز دو بعدی ۷۳
۳-۳-۴-۱- بعد اول ۷۳
۳-۳-۴-۲- بعد دوم ۷۵
۳-۳-۵- اکتساب تصاویر ۷۷
۳-۳-۶- آنالیز ژل ها با نرم افزار ۷۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- تأثیر تنش شوری بر جوانه زنی بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه ۸۰
۴-۱-۱- اثر شوری بر درصد جوانه زنی نهایی بذرها ۸۰
۴-۱-۲- اثر شوری بر درصد جوانه‌زنی نهایی بذرها در روز ۸۱
۴-۱-۳- اثر شوری بر سرعت جوانه‌زنی نهایی بذرها ۸۲
۴-۱-۴- آنالیز GC-MS ۸۲
۴-۲- تأثیر تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی ۸۴
۴-۲-۱- تأثیر تنش شوری بر دینامیک رشد برگ ۸۴
۴-۲-۲- تأثیر تنش شوری بر درصد رطوبت نسبی برگ (LRWC) ۸۵
۴-۲-۳- تأثیر تنش شوری بر میانگین آب نسبی تک برگ (LWC) ۸۷
۴-۲-۴- تأثیر تنش شوری بر میانگین وزن خشک تک برگ ۸۸
۴-۲-۵- تأثیر تنش شوری بر میانگین سطح تک برگ‌ها ۸۹
۴-۲-۶- تأثیر تنش شوری بر میانگین سطح ویژه تک برگ (SLW) ۹۰
۴-۲-۷- تأثیر تنش شوری بر طول میانگره ۹۱
۴-۲-۸- تأثیر تنش شوری بر میانگین وزن تر و خشک میانگره ۹۲
۴-۲-۹- تأثیر تنش شوری بر نسبت وزن خشک به طول میانگره ۹۴
۴-۲-۱۰- تأثیر تنش شوری بر میزان دفع نمک از سطح تک برگ ۹۴
۴-۲-۱۱- تأثیر تنش شوری بر میزان دفع نمک از میانگره ۹۸
۴-۲-۱۲- تأثیر تنش شوری بر محتوای سدیم و پتاسیم تک برگ ۱۰۰
۴-۳- تحلیل کلی رفتار هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس بر اساس داده‌های فیزیولوژی ۱۰۳
۴-۴- آنالیز پروتئین‌های پاسخگو به تنش شوری ۱۰۶

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۴-۴-۱- نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها	۱۰۷
۴-۴-۲- آنالیز هم‌بیانی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش شوری	۱۱۰
فصل پنجم : پیشنهادات	۱۱۵
فصل ششم: منابع مورد استفاده	۱۱۶
پیوست	۱۲۴

فهرست شکلها

عنوان | صفحه

شکل۱-۱: مراحل مختلف یک پروسه پروتئومیکس ۲
شکل۲-۱: روند کلی پروتئومیکس ۲۹
شکل۲-۲: مجموعه‌ای از ژل‌های دو بعدی ۳۱
شکل۲-۳: طرح شماتیک الکتروفورز دو بعدی ۳۵
شکل۲-۴: تجزیه ژل‌های دو بعدی با استفاده از نرم افزار ۳۶
شکل۲-۵: انواع تفاوت تغییر مکان و حضور و عدم حضور لکه پروتئینی بر روی ژل دو بعدی ۳۷
شکل۲-۶: اجزاء یک دستگاه طیف سنج ۳۸
شکل۲-۷: دستگاه طیف سنجی جرمی و نتایج بدست آمده از آنالیز یک ژل ۳۹
شکل۲-۸: نحوه تشکیل یون در فرایند ESI ۳۹
شکل۲-۹: مکانیزم یونیزاسیون به روش MALDI ۴۰
شکل۲-۱۰: شناسایی پروتئین‌ها بوسیله انگشت نگاری جرم پپتیدی (PMF) ۴۳
شکل۲-۱۱: جستجوی Peptide Mass Tag در بانک اطلاعاتی ۴۴
شکل۲-۱۲: تکنیک DIGE ۴۵
شکل۲-۱۳: دیاگرام تکنیک Blue Native PAGE ۴۶
شکل۲-۱۴: روش ICAT برای اندازه‌گیری کمّی بیان پروتئین‌ها ۴۷
شکل۲-۱۵: گل آذین (الف) و گیاه کامل *Aeluropus littoralis* (ب)، ۶۰
شکل۲-۱۶: غدد نمکی بر روی برگ گیاه *Aeluropus littoralis* ۶۱
شکل۲-۱۷: *Aeluropus* littoralis در رویشگاه طبیعی (آق قلا گرگان) ۶۱
شکل۳-۱: بذر بدون پوشینه (الف)، بذر با پوشینه (ب) گیاه *Aeluropus littoralis* ۶۵
شکل۳-۲: پوشینه و بذرهای پودر شده (الف) و عصاره حاصل از پوشینه و بذر گیاه *Aeluropus littoralis* ۶۶
شکل۳-۳: دستگاه GC/MS Agillent مدل ۶۸۹۰ N ۶۶
شکل۳-۴: مراحل تکثیر گیاه *Aeluropus littoralis* ۶۷
شکل۳-۵: پودر کردن بافت گیاهی در هاون با استفاده از ازت مایع و پیلت پروتئینی ۷۱
شکل۳-۶: منحنی استاندارد بدست آمده جهت تعیین غلظت پروتئین‌ها ۷۳
شکل۳-۷: سینی ریهایدریشن (۱)، نحوه قرار دادن پروتئین (۲) و ژل (۳) درون شیار سینی ریهایدریشن ۷۴
شکل۳-۸: دستگاه Protean ساخت شرکت بیورد برای انجام بعد اول (IEF) ۷۴
شکل۳-۹: حرکت رنگ آبی به تدریج به سمت قطب مثبت پس از شروع الکتروفورز و شفاف شدن ژل ۷۵
شکل۳-۱۰: دستگاه بعد دوم ساخت شرکت Bio-Rad و طرز قرار دادن شیشه‌های ژل در داخل آن ۷۶
شکل۳-۱۱: دستگاه دنسیتومتر Gs800 ساخت شرکت بیورد برای اسکن ژل‌های پروتئوم ۷۷
شکل۳-۱۲: بررسی کمّی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از نرم افزار Melanie 6.2 ۷۹
شکل۴-۱: نمودار مقایسه درصد جوانه‌زنی نهایی بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه در سطوح مختلف شوری ۸۰
شکل۴-۲: نمودار میانگین درصد جوانه‌زنی نهایی بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه در سطوح مختلف شوری ۸۱
شکل۴-۳: نمودار مقایسه سرعت جوانه‌زنی بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه ۸۲
شکل۴-۴: طیف‌های بدست آمده از ترکیبات پوشینه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی ۸۳
شکل۴-۵: نمودار دینامیک رشد برگ در تیمارهای مختلف شوری ۸۴
شکل۴-۶: نمودار مقایسه‌ای درصد رطوبت نسبی برگ در سطوح مختلف شوری ۸۵
شکل۴-۷: تأثیر تنش شوری بر درصد رطوبت نسبی برگ بالا، میانی و پائینی ۸۶
شکل۴-۸: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میانگین آب نسبی تک برگ ۸۷

فهرست شکلها

عنوان صفحه

شکل۴-۹: پروفایل مقایسه آب نسبی برگ در تیمارهای مختلف تنش شوری نسبت به شاهد ۸۸
شکل۴-۱۰: اثر تنش شوری بر میانگین وزن خشک تک برگ ۸۸
شکل۴-۱۱: پروفایل مقایسه وزن خشک تک برگ در تیمارهای مختلف تنش شوری نسبت به شاهد ۸۹
شکل۴-۱۲: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میانگین سطح تک برگ ۸۹
شکل۴-۱۳: پروفایل مقایسه سطح تک برگ در تیمارهای مختلف تنش شوری نسبت به شاهد ۹۰
شکل۴-۱۴: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میانگین سطح ویژه تک برگ ۹۱
شکل۴-۱۵: پروفایل مقایسه سطح ویژه تک برگ در تیمارهای مختلف تنش شوری نسبت به شاهد ۹۱
شکل۴-۱۶: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر طول میانگره ۹۲
شکل۴-۱۷: پروفایل مقایسه طول میانگره در تیمارهای مختلف تنش شوری نسبت به شاهد ۹۲
شکل۴-۱۸: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میانگین وزن تر میانگره ۹۳
شکل۴-۱۹: نمودار مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میانگین وزن خشک میانگره ۹۳
شکل۴-۲۰: نمودار مقایسه اثر تنش شوری بر نسبت وزن خشک به طول میانگره ۹۴
شکل۴-۲۱: نمودار مقایسه اثر تنش شوری بر میزان دفع نمک از سطح تک برگ ۹۵
شکل۴-۲۲: نمودار مقایسه اثر تنش شوری بر میزان دفع نمک از سطح تک میانگره ۹۹
شکل۴-۲۳: نمودار مقایسه اثر تنش شوری بر محتوای سدیم و پتاسیم تک برگ ۱۰۱
شکل۴-۲۴: ژل اجرا شده از پروتئین گیاهان رشد کرده در شرایط بدون شوری ۱۰۶
شکل۴-۲۵: نمونه‌ای از ژل‌های مورد ارزیابی در ۴ سطح شاهد و تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار ۱۰۷
شکل۴-۲۶: درصد لکه‌هایی که در بین تیمارهای مختلف افزایش و یا کاهش بیان داشته‌اند. ۱۰۸
شکل۴-۲۷: الگوی بیان تعدادی از لکه‌ها با بزرگنمایی بیشتر ۱۰۹
شکل۴-۲۸: الگوی هم‌بیانی پروتئین‌هایی که تغییرات معنی‌داری به تنش شوری نشان دادند ۱۱۰
شکل۴-۲۹: ارزیابی تأثیر آنالیز کلاستر بر سطح انحراف استاندارد میانگین (ASD) با مقدار پایه ASD در شرایط بدون گروه‌بندی ۱۱۱

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول۱-۳: ترکیبات مورد نیاز جهت تهیه استانداردها ۷۲
جدول۳-۲: مقادیر جذب استانداردها ۷۳
جدول۳-۳: میزان پروتئین مورد نیاز جهت لود نمودن در ژل‌های ۱۸ و ۲۴ سانتی‌متری ۷۳
جدول۳-۴: مراحل و مدت زمان هر مرحله از رنگ‌آمیزی به روش Blum ۷۷
جدول۴-۱: نتایج تجزیه واریانس (درصد و سرعت جوانه‌زنی) بذرهای با پوشینه و بدون پوشینه ۸۰
جدول۴-۲: میزان کاهش رشد برگ تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد ۸۴
جدول۴-۳: جدول مقایسه‌ای درصد رطوبت نسبی برگ ۸۶

اختصارات:

Abbreviation

2-DE: two-dimensional gel electrophoresis
ABA: abscisic acid
ABRE: ABA-responsive element
AFP: antifreeze protein
APX: ascorbate proxidase
BN-PAGE: blue native-polyacrylamide gel electrophoresis
BSA: bovine serum albumin
bZIP: basic-leucine zipper
CBFs: C-repeat binding factors
CCD: charge-coupled device
CDPK: calcium dependent protein kinase
CID: collision induced dissociation
COR: cold regulated genes
DIGE: difference gel electrophoresis
DNA: deoxyribonucleic acid
DRE: dehydration-responsive elements
DREB: dehydration-responsive element-binding protein
DTT: dithiothreitol
ESI: electrospray ionization
EST: expressed sequence tags
FT-MS: Fourier transform-mass spectrometry
GPX: glutathione peroxidase
GR: glutathione reductase
HSP: heat-shock proteins
ICAT: isotope-coded-affinity tag
ICE: inducer of CBF expression
IEF: Isoelectric focusing
IPG: immobilized pH gradient
IT: Ion trap
kD: kilodalton
LC-MS\MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LEA: late embryogenesis abundant
LT: low temperature
LT50: lethal temperature for 50% of the tissues
LTRE/DRE/CRT: low temperature-responsive element/droughtresponsive element/c-repeat
LTRE: low-temperature-responsive element
MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MS/MS: tandem mass spectrometry
MS: mass spectrometry
MudPIT: multi-dimensional protein identification technology
MYB: myelobalstosis
MYC: myelocytomatosis
ORF: open reading frame
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PEG: poly ethylene glycol
***p*I**: Isoelectric point
PMF: Peptide mass fingerprinting
PR: pathogenesis-related
PTM: post-translational modification
Q: Quadruple
ROS: reactive oxygen species
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SOD: superoxide dismutase
TCA: trichloroacetic acid
TOF: time of flight

فصل اول

مقدمه

۲- شوری

شوری آب و خاک مهمترین تنش در مناطق خشک و نیمه خشک جهان محسوب می‌شود که می‌تواند بطور جدی بر رشد گیاه تأثیر گذارد. تقریباً ۹۳۰ میلیون هکتار زمین در دنیا تحت تأثیر شوری قرار گرفته‌اند که این در حدود ۷٪ از کل مناطق خشک را در بر می‌گیرد (Munns, 2002). در حدود ۲۰٪ از مناطق تحت کشت، و تقریباً نصف اراضی تحت آبیاری در سراسر دنیا تحت تأثیر شوری قرار دارند (Yokoi *et al*, 2002). محاسبات نشان می‌دهد که سالیانه ۲ میلیون هکتار بر وسعت خاک‌های شور افزوده می‌شود. افزایش جمعیت و افزایش تقاضا برای استفاده از محصولات کشاورزی نیاز به کشت گیاهان در این زمین‌ها را افزایش می‌دهد. با تغییر روش‌های کشاورزی برای جلوگیری از شور شدن خاک و همچنین ارائه طرح‌هایی برای اصلاح خاک شور می‌توان بر این مشکل فائق آمد. برنامه‌های دیگری از جمله دورگه سازی سنتی و دستورزی ژنتیکی نیز به این امر کمک می‌کند (Tester & Davenport, 2003). توانایی گیاهان در پاسخ به شوری نه تنها در سطح گونه‌ها بلکه در سطح ارقام نیز وجود دارد. توانایی گیاهان در پاسخ به شوری دارای یک عملکرد دوره ای - زمانی است یعنی بسته به دوره نمو گیاه بوده و ژن‌های خاصی در پاسخ به شوری بیان می‌شوند. از طرفی عموماً پاسخ گیاهان با توجه به غلظت‌های نمک و میزان آب و دیگر شرایط محیطی تغییر می‌کند. همه نمک‌ها بر رشد اثر دارند امّا همه آنها رشد را مهار نمی‌کنند. نمک‌ها به تنهایی در خاک عمل نمی‌کنند، بلکه اثری که بر گیاه بر جا می‌گذارند حاصل برهمکنش اثرات تک تک آنها بر همدیگر است. برخی از این برهمکنش‌ها ساده اند مانند برهمکنش بین Na^+ و Ca^{2+} و برخی پیچیده‌اند مثل اثری که کربنات‌ها از طریق افزایش pH خاک به گیاهان می‌گذارند. رایج‌ترین اثر شوری خاک مهار رشد به دلیل Na^+ و Cl^- است. در برخی گیاهان به ویژه گیاهان چوبی چند ساله از قبیل سیتروس Na^+ در ریشه‌های چوبی و ساقه‌ها باقی می‌ماند و Cl^- در اندام‌های هوایی انباشته می‌شود و بیشتر آسیب وارده به گیاه حاصل همین انباشتگی Cl^- است که معمولاً از طریق مهار فتوسنتز ایجاد می‌شود (Flowers, 1998). ولی در برخی از گیاهان از جمله بعضی از گندمیان Na^+ آسیب ویژه یونی را باعث می‌شود (Tester & Davenport, 2003).

۲-۱- سازوکارهای مقاومت به شوری در گیاهان

در مورد رشد و نمو بیشتر گیاهان بارده و مقاوم به شوری، ضروری است دریابیم که چه سازوکارهایی باعث می‌شوند یک گیاه شوری را نسبت به گیاه دیگر بیشتر تحمل کند. سازوکارهای مقاومت به شوری در گیاهان به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند:

۱- آنهایی که ورود نمک به درون گیاه را به حداقل می‌رسانند و

۲- آنهایی که غلظت نمک در سیتوپلاسم را کاهش می‌دهند

نمک دوست‌ها (هالوفیت‌ها) دارای هر دو سازوکار هستند، آنها نمک را بخوبی از خود خارج کرده، امّا به طور مؤثرتری نمک را درون واکوئل‌های خود کد بندی می‌کنند. این امر به آنها اجازه می‌دهد تا برای مدت طولانی در خاک‌های شور به بقاء و رشد خود ادامه بدهند. همچنین این گیاهان برای تنظیم غلظت‌های Na^+ و Cl^- از طریق ساختمان‌های مخصوص کرک‌ها یا غده‌های نمکی و کیسه‌های نمکی استفاده می‌کنند. برخی از شیرین دوست‌ها قادر به خارج کردن نمک هستند امّا نمی‌توانند مازاد نمک جذب شده را به خوبی هالوفیت‌ها در واکوئل‌های خود کد بندی کنند. بیشتر شیرین دوست‌ها توانایی کمی برای خارج کردن نمک از درون خود دارند، بنابراین در برگ‌های آنها غلظت نمک به یک سطح سمی می‌رسد (Munns, 2002). برخی گونه‌های گیاهی قادرند تنش شوری را بیشتر از سایر گونه‌ها تحمل کنند و حتی تحت شرایط شوری میزان محصول برخی از آنها کاهش نمی یابد. این گونه تفاوت‌ها در بین گروه‌های اصلی گیاهی، گونه‌های نزدیک به هم، رقم‌های مختلف و یا حتی افراد یک خانواده هم می‌تواند وجود داشته باشد. اختلاف بین گونه‌های نزدیک به هم می‌تواند به شناخت تعدادی از عوامل که تحمل شوری را تحت تأثیر قرار می‌دهند کمک کند. تفاوت در میزان محصول در شرایط شور اختلاف در توان و قدرت گیاه را نشان می‌دهد (Tester &

(Davenport, 2003). تولید گیاهان توانمندتر روشی برای بالا بردن محصول و بازدهی در شرایط شور است که البته باید یک استراتژی به کار رود که گیاهان قادر به حفظ این بازدهی در شرایط شور باشند. با انتخاب ژنوتیپ‌هایی از گندم که در شرایط کنترل شده بیوماس و میزان رشد آنها مشابه بود، در شرایط شور رشد برگ در آنها متفاوت بود و علّت آن به غلظت Na^+ در برگ‌ها مربوط بوده و مستقل از توان و قدرت گیاه می‌باشد زیرا نتایج نشان داد که لاین مقاوم‌تر که بازدهی فوق العاده بالایی را در شرایط شور نشان داده است دارای غلظت فوق العاده پایین Na^+ در اندام‌های هوایی خود می‌باشد (Schachman & Munns, 1992). گیاهانی توانایی بیشتری برای تحمل شوری محیط دارند که بهتر بتوانند Na^+ را از اندام هوایی و یا حداقل از پهنک برگ خارج کنند و همزمان با آن سطوح بالای K^+ را حفظ نمایند (Zhu *et al*, 2001). این وضعیت در گونه‌های زراعی گندمیان وجو دارد، هرچند که ذرت و برنج از این قاعده مستثنی هستند (Tester & Davenport, 2003). برخی هالوفیت‌ها مقادیر زیادی از Na^+ و بیش از ۵۰٪ وزن خشک را در اندام‌های هوایی خود انباشته می کنند که این بیشتر به دولپه‌های هالوفیت مربوط می‌شود که در این هالوفیت‌ها NaCl تقریباً پتانسیل اسمزی کل اندام‌های هوایی را تعیین می‌کند و NaCl به عنوان یک اسموتیکوم[1] ترجیحی عمل می‌کند. در عوض هالوفیت‌های تک لپه نسبت به دو لپه تمایل کمتری به جذب Na^+ دارند و بیشتر K^+ را در اندام‌های هوایی حفظ می‌کنند و تعادل اسمزی آنها به طور نسبی با سنتز قند انجام می‌گیرد. حتی در بین تاکسون‌های هالوفیت هم با توجه به سازوکارشان تفاوت وجود دارد. مثلاً بین گیاهان تیره اسفناج در میزان جذب Na^+ و نسبت K^+/Na^+ در اندام‌های هوایی اختلافاتی وجود دارد. مانگروها نیز بسته به این که غدد نمکی دارند یا نه، سازوکارهای مختلفی را بکار می‌برند. با اضافه شدن NaCl به محیط کشت بسیاری ازهالوفیت‌ها رشد آنها تحریک می‌شود و رشد بهینه برای گونه‌های مختلف فرق می‌کند و ممکن است با NaCl 400 mM و یا بیشتر انجام شود. با این که انباشته شدن NaCl در شوری پایین درهالوفیت‌ها اغلب بیشتر از گلیکوفیت‌هاست ولی جذب متناسب با شوری خارجی نیست و در شوری‌های بالا کاهش می‌یابد. چه درهالوفیت‌ها و چه در گلیکوفیت‌ها هنگامی که غلظت Na^+ خارجی ۲۰۰ میلی مولار باشد، باید از ورود حدود ۹۷٪ کل Na^+ که در مجاورت سطح ریشه است جلوگیری شود. تراکم Na^+ در بافت‌های در حال رشد هالوفیت‌ها کمتر از بافت‌های بالغ است. این حالت در گلیکوفیت‌ها هم وجود دارد و به علت حفاظت متابولیسمی سلول‌های فعال در برابر Na^+ می‌باشد. توانایی تنظیم جذب Na^+ در همه گیاهان حتی هالوفیت‌ها که توانایی دفع Na^+ از اندام‌های هوایی را دارند مهم می‌باشد و باید همگام انجام گیرد (Tester & Davenport, 2003).

کنترل انتقال Na^+ باید در چندین مرحله انجام گیرد. ورود Na^+ و عرضه به اندام‌های هوایی باید کنترل شوند. یون‌های Na^+ که به درون سلول‌های ریشه و اندام‌های هوایی می‌رسد باید به منظور جلوگیری از اثرات سمیت سلولی و اسمزی زیان آور کده‌بندی می‌شوند. با این که شواهدی وجو دارد که برخی هالوفیت‌ها شکل بعضی از آنزیم‌های سیتوسلی را اندکی تغییر می‌دهند، ولی با این حال غلظت‌های بالای Na^+ در اندام‌های هوایی هالوفیت‌ها مستلزم کده بندی سدیم به واکوئل است. دولپه ای‌ها ممکن است مقدار Na^+ بالا و نسبت Na^+/K^+ بالاتری را حفظ کنند زیرا آنها می‌توانند بخش عمده ای از Na^+ را در واکوئل ذخیره کنند و K^+ نسبتاً کمی را برای متابولیسم سیتوسلی نیاز دارند. در حالیکه تک‌لپه‌ای‌ها ممکن است ظرفیت ذخیره سازی Na^+ کمی داشته باشند و K^+ و اسمولیت‌های سازگار[2] بیشتری برای کده‌بندی سیتوسلی نیاز دارند. هالوفیت‌ها الزاماً با گونه‌های حساس به شوری فرقی ندارند ولی مکانیسم‌های آنها در مهار شوری کارآمدتر می‌باشد (Tester & Davenport, 2003). مکانیسم‌هایی که برای به حداقل رساندن آسیب حاصل از شوری بالا وجود دارد در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد و در دو سطح ارگانوژنز یعنی سطح سلول و کل گیاه انجام می‌گیرد. به این منظور در سطح کل گیاه باید چندین سازوکار به صورت هماهنگ در جهت Na^+ عمل نمایند. برخی از این سازوکارها عبارتند از: به حداقل رساندن ورود اولیه، به حداکثر رساندن برون شاری[3]، به حداقل

[1]-Osmoticum
[2]-Osmoprotectants
[3]-Efflux

رساندن بارگیری در گزیلم و یا به حداکثر رساندن برگشت مجدد (بازیابی) Na^+ قبل از رسیدن به اندام‌های هوایی، به حداکثر رساندن کدبندی داخل سلولی یا تقسیم شدن در بخش‌های جداگانه اندام‌های هوایی (سلول‌های مغزی یا برگ‌های پیر)، ترشح نمک به سطح برگ. در سطح سلولی اعمالی که در این باره انجام می‌گیرد شامل: کدبندی درون سلولی و سنتز محافظت کننده‌های اسمزی، تحمل Na^+ بالای سیتوپلاسمی، پاسخ به آسیب حاصل از شوری و ترمیم آن، تغییر در تنظیم بیان ژن و مسیرهای علامت دهی می‌باشد (Tester & Davenport, 2003). در برخی دیگر از منابع سه عمل درون سلولی در برابر اثرات زیان بار شوری ذکر شده است که به عنوان معیارهای قابل اطمینانی برای تحمل شوری معرفی شده اند:

۱- خروج یا توقیف Cl^- و Na^+ برای جلوگیری از سمیت آنها در سیتوپلاسم،

۲- حفظ سطح سلولی مناسب Ca^{2+} و K^+ مورد نیاز برای فعالیت‌های متابولیسمی و

۳- حفظ فشار تورژسانس بدون توجه به پتانسیل آب خارج (Zhu, 2001)

به طور کلی سازوکارهای تحمل شوری در گیاهان شامل هم ایستایی[1]، سم زدایی و حفاظت پاداکسایشی، وجود غده‌ها و کیسه‌های نمکی و همچنین گوشتی شدن به منظور تنظیم فشار اسمزی در برگ‌ها می باشد.

۲-۱-۱- هم ایستایی یونی و اسمزی

یکی از سازوکارهای مهم گیاه برای رسیدن به مقاومت بیشتر، پایداری دوباره هم ایستایی در محیط‌های پر تنش می‌باشد. هم ایستایی یونی و اسمزی هر دو باید برقرار شوند. انواع انتقال‌های یونی در تعیین هم ایستایی یونی شرکت دارند، زیرا Na^+ بازدارنده تعدادی از آنزیم‌هاست و ممانعت از تجمع در سطوح بالا در سیتوپلاسم و یا در اندامک‌هایی به غیر از واکوئل مهم است برای این هدف Na^+ باید متوقف یا کاهش یابد. مولکول‌های عمل کننده برای این امر از قبیل پادبرهای Na^+/H^+ در تنظیم غلظت‌های سیتوپلاسمی Na^+ می‌باشند که این عمل از طریق خروج Na^+ از سیتوپلاسم به درون واکوئل یا خروج از غشای پلاسمایی به سمت بیرون سلول انجام می‌شود. کدبندی Na^+ یک ترابری وابسته به انرژی است و از آنجایی که سلول‌های گیاهی برخلاف سلول‌های جانوری Na^+-ATPase و Na^+/K^+-ATPase را ندارند، H^+-ATPase و H^+ پیروفسفاتاز برای تولید نیروی محرک پروتونی که در ترابری یون‌ها و دیگر متابولیت‌ها شرکت می‌کنند نیاز دارند (Massayoshi, 2000). از پادبرهای دیگر می‌توان به خانواده AtNHX که در کدبندی واکوئلی نقش دارند اشاره کرد که این پادبرها Na^+/H^+ (AtNHX1 و $AtNHX_2$) می‌باشند. همان طور که گفته شد علاوه بر هم ایستایی یونی هم ایستایی اسمزی نیز باید برقرار باشد. پس از انباشته شدن Na^+ در واکوئل‌ها باید پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم و واکوئل در تعادل با هم باشند. این مسئله از طریق سنتز و انباشتگی مواد محلول آلی بی‌خطر در سیتوپلاسم انجام می‌گیرد. این مواد بسیار حل شدنی و خنثی می‌باشند، این ترکیبات که محافظت کننده اسمزی یا محلول‌های سازگار[2] نامیده می‌شوند شامل متابولیت‌های اولیه مانند پرولین و سوکروز، متابولیت‌های ثانویه مثل ترکیبات آمونیوم نوع چهارم (گلایسین بتائین، بتا-آلانین بتائین، پرولین بتائین ...)، ترکیبات سولفونیوم نوع سوم بتادی‌متیل‌سولفوتیوپروبیونات و کربوهیدرات‌ها (گلوکز، ترهالوز، گلیسرول) و پلی اول‌ها مانند مانیتول می‌باشند (Tester & Davenport, 2003). برخی عناصر ضروری معدنی مانند پتاسیم نیز محافظت کننده اسمزی می‌باشند که اکثریت محافظت کننده‌ها در محلول‌های آلی تشکیل می‌دهند (Yokoi *et al*, 2002). این ترکیبات می‌توانند بدون آسیب رساندن به سلول در مقادیر بالایی تجمع یابند و در ضمن نه تنها از فعالیت آنزیم‌ها جلوگیری نمی‌کنند بلکه آنزیم‌ها و ساختار غشاء را در برابر اثرات زیان بار یون‌های Na^+ و Cl^- حفظ نمایند و عمل جاروبگری[3] رادیکال‌های آزاد

[1]-Homeostasis
[2]-Ompatible Solutes
[3]-Scavengering

اکسیژن فعال (ROS) را انجام دهد. این ترکیبات به احتمال زیاد با حفظ پتانسیل اسمزی منفی در سیتوپلاسم و حفاظت مستقیم پروتئین و ساختارهای ریبوزومی در کاهش آسیب Na^+ مؤثرند (Tester & Davenport, 2003).

۲-۱-۲- پاسخ و جبران آسیب حاصل از شوری و ترمیم آن

در پاسخ به شوری سنتز پروتئین‌های زیادی افزایش می‌یابد. بسیاری از آنها مانند دهیدرین‌ها[1] و اسموتین‌ها ویژگی‌های شبیه چاپرون‌ها[2] دارند. اینها اغلب هیدروفیل‌اند و به صورت مارپیچ‌های نامنظمی ساخته شده‌اند، به نظر می‌رسد که اینها در حفظ ساختار پروتئینی در شرایط شوری بالا و سایر شرایطی که در آنها برهم کنش پروتئین – آب مورد بحث است دخالت دارند و به منظور حفظ تعادل ساختار غشاء هم عمل می‌نمایند. سنتز محافظت کننده‌های اسمزی مانند گلایسین بتائین که مانند چاپرون‌ها عمل می‌کنند نیز در این شرایط انجام می‌گیرد که به صورت بالقوه پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش می‌دهد و از واکنش‌های انتقال الکترون میتوکندریایی حفاظت می‌کند (Chen & Murata, 2002). سنتز پلی آمین‌هایی مثل پوترسین[3] و اسپرین[4] نیز در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد. فعالیت پاکسازی ROS بخشی از مکانیسم‌های فعال تحمل شوری است تا این که یک پاسخ ثانوی به آسیب ناشی از تنش. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو نیز در این مورد حائز اهمیت می‌باشد. سایر محافظت کننده‌های اسمزی از قبیل مانیتول و پرولین نیز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن دخالت دارند. در ضمن تحمل شوری ممکن است با فرآیندهای ترمیم DNA نیز ارتباط داشته باشد (Tester & Davenport, 2003).

۲-۱-۲-۱- سمیت زدایی و سیستم‌های آنتی اکسیداتیو

تنش شوری مانند سایر تنش‌های محیطی از قبیل خشکی و دمای بالا می‌تواند باعث القای خطرات سلول شود. غیر فعال شدن واکنش‌های انتقال الکترون که نتیجه آن تشکیل انواع فعال اکسیژن (ROS) است می‌تواند منجر به خطرات فتواکسیداسیونی شود. انواع فعال اکسیژن در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی فعال می‌شوند و می‌توانند به طور جدی از طریق آسیب‌های اکسایشی روی متابولیسم اثر گذاشته و باعث اکسید شدن رنگیزه‌های فتوسنتزی، لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها شوند (Smirnoff, 1993). گیاهان در برابر آسیب‌ها دارای پاسخ‌های سازشی از قبیل وجود سیستم‌های آنتی اکسیداتیو آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و ...) و غیر آنزیمی (کارتنوئیدها، آسکوربات، گلوتاتیون، فلاونوئیدها و آلفاتوکوفرول) می‌باشند (Loggini *et al*, 1999). هم ایستایی یونی و اسمزی و مسیر سم‌زدایی به طور فعالانه تقسیم و توسعه سلولی را برای کنترل رشد گیاه در محیط شور تنظیم می کنند.

۲-۱-۳- غده‌ها و کیسه‌های نمکی

گیاهان متحمل تر به شوری اغلب دارای روش‌های ویژه‌ای برای مدیریت نمک در برگ‌ها هستند. غده‌ها و کیسه‌های نمکی برای خروج املاح به سطوح خارجی برگ، مثال‌هایی از این سازوکارها هستند. غده‌های نمکی حداقل در ۱۱ خانواده گیاهی شناخته شده است. به نظر می‌رسد بین آناتومی غده نمکی و مقاومت به شوری همبستگی بالایی وجود دارد. گونه‌های دارای غده‌های فرورفته در اپیدرم تحمل به شوری بیشتری از غده‌های نیمه فرورفته داشته و این گیاهان نیز متحمل تر از جنس‌های دارای غده‌های سطحی می‌باشند. غده‌ها، کلرید سدیم را برخلاف شیب غلظت تجمع می‌نمایند و آب نمک خروجی دارای فشار اسمزی بیشتری از شیره سلولی بوده و مقدار Na^+/K^+ آن نیز بیش از

[1]-Dehydrin
[2]-Chaperones
[3]-Putrescine
[4]-Spermine

این نسبت در داخل سلول‌هاست. خروج املاح با افزایش شوری محیط رشد ریشه فقط تا نقطه خاصی افزایش می‌یابد. در غلظت شوری خارجی بیش از ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم خروج املاح کاهش می‌یابد. نمک در واکوئل مرکزی کیسه نمکی تجمع می‌یابد که نهایتاً پاره شده و نمک در سطح برگ رها می‌شود. نمک تجمع یافته در سطح برگ ممکن است باعث کاهش تعرق و افزایش انعکاس نور شود (رضوی، ۱۳۸۴).

۲-۱-۴- گوشتی شدن به منظور تنظیم فشار اسمزی در برگ‌ها

تمام گیاهان مقاوم به شوری قادر به دفع نمک‌ها نیستند، بسیاری ازهالوفیت‌ها و غیرهالوفیت‌های مقاوم به شوری افزایش موقتی نمک را در آپوپلاست توسط افزایش آب سلول‌های مزوفیل تحمل می‌کنند، لذا نمک‌ها را رقیق نموده و ظرفیت خود را برای جذب نمک از محلول آپوپلاست بالاتر می‌برند. هالوفیت‌های گوشتی برای انباشت نمک در واکوئل می‌توانند آب از دست بدهند. این کار زمانی اتفاق می‌افتد که میزان نمک‌های رسیده برای تأمین تنظیم اسمزی سلول‌های در حال گسترش در حداکثر میزان آب خود کافی نباشد.

۲-۲- مسیرهای ترارسانی علامت در تنش شوری

اثرات اسمزی و یونی حاصل از تنش شوری، هر دو بوسیله سلول‌های گیاهی حس و دریافت می شوند. اگرچه علائم یونی ویژه ممکن است در انتقال Na^+ مهمتر از فشار اسمزی بالا باشند، ولی تنش اسمزی نیز نقش مهمی را در این مورد بازی می‌کند. تنش اسمزی ABA (آبسزیک اسید) را فعال می‌کند که خود قادر است تنظیم رونویسی $AtNHX_1$ ژن کدکننده ترابری Na^+/K^+ واکوئلی را انجام دهد (Zhu, 2003). اگرچه سازوکارهای درک علامت هنوز به طور کامل شناخته شده نیستند، ولی ممکن است شامل کانال‌های فعال شونده به وسیله کشش و گیرنده‌های یونی ویژه باشد. در اینجا برخی از این سیستم‌ها را شرح خواهیم داد.

۲-۲-۱- فعالیت کلسیم سیتوسلی[1]

یک پاسخ سریع به افزایش ناگهانی Na^+ خارج سلولی، افزایش موقتی در Ca^{2+} سیتوسلی است. ارتباط چنین افزایش سریعی با پاسخ‌های گیاه در یک محیط نسبتاً پایدار نمکی نامشخص می‌باشد ولی به هر حال تغییرات القاء شده با شوری در فعالیت انتقال Ca^{2+} و اجزای مسیرهای ترارسانی علامت وابسته به Ca^{2+} نشان دهنده نقش فیزیولوژیکی Ca^{2+} در پاسخ گیاه به شوری است. تنظیم رونویسی یک ATPase تراجایی کننده کلسیمی در شبکه آندوپلاسمی بوسیله شوری انجام گرفته است که ممکن است نشان دهنده نقش پیشرونده Ca^{2+} در پاسخ گیاه به شوری باشد (Tester & Davenport, 2003).

۲-۲-۲- فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین

شواهد متعددی برای اهمیت اساسی فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین در پاسخ گیاه به تنش شوری وجود دارد. احتمال دارد که هیستیدین کیناز متصل به غشاء بتواند به عنوان یک دریافت کننده Na^+ عمل کند (Mikami *et al*, 2002). در آرابیدوبسیس چند نوع پروتئین کیناز به صورت بیش از حدی بیان می‌شوند که مقاومت به شوری را افزایش می‌دهند. بیان بیش از حد پروتئین کیناز GCK_1 باعث می‌شود گیاهان در شرایط غیر تنشی علائم مشابه علائم تنش شوری را نشان دهند (Piao, 2001). احتمالاً فعالیت کیناز افزایش یافته به طور مستقیم یا غیر مستقیم فعالیت پمپ Na^+/K^+ واکوئلی را افزایش می‌دهد. کینازها و فسفاتازهای فراوانی در گیاهان وجود دارد که

[1]-Cytosolic Calcium Activity