

اثر اسید سالیسیلیک بر الگوی بیان برخی پروتئین‌های درگیر در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده در گندم نان (*Triticum aestivum*)

شیوا حمیدزاده مقدم^۱، سدابه جهانبخش گده کهریز^{۲*} و علی عبادی^۲

^۱گروه بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۳/۰۵)

چکیده:

یکی از راه‌های کنترل واکنش گیاه به انواع تنش‌ها از جمله تنش‌های زیستی از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی صورت می‌گیرد که این سیستم مشهور به واکنش فوق حساسیت می‌باشد. سیستم مقاومتی گیاه در مقابل تنش‌ها از طریق مواد شیمیایی متفاوت از جمله اسید سالیسیلیک تحریک می‌شود. بنابراین آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با جهت شناسایی پروتئین‌های بیان شده تحت تیمار با اسید سالیسیلیک در رقم فلات و چمران گندم انجام گرفت. بدین منظور ابتدا در دو رقم گندم فلات و چمران میزان غلظت پرولین، لیزین و متیونین ارزیابی شد، سپس روش الکتروفورز تک بعدی و دو بعدی برای مشخص کردن پروتئین‌های درگیر در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که تحت تیمار اسید سالیسیلیک، از غلظت اسیدهای آمینه‌ی لیزین و متیونین کاسته و غلظت اسید آمینه‌ی پرولین که در مکانیسم‌های دفاعی گیاه نقش اساسی دارند افزایش می‌یابد و همچنین بررسی‌های حاصل از پروتئومیکس نشان داد که به طور کلی پروتئین‌هایی که در مواجهه با اسید سالیسیلیک تغییر بیان دارند، در ارتباط مستقیم با سیستم دفاعی در مقابل تنش و همچنین سیستم بیان پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین، تولید انرژی و انتقال علامت می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گندم، اسید سالیسیلیک، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، اسیدهای آمینه، پروتئومیکس.

مقدمه:

زا و شروع واکنش‌های دفاعی استفاده می‌کنند. مقاومت ایجاد شده توسط پروتئین‌های مقاومتی در داخل سلول گیاهی با تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی همراه می‌باشد که این عملکرد در اصطلاح واکنش فوق حساسیت نامیده می‌شود. در طول واکنش به عوامل تنش‌زا توسط پروتئین‌های مقاومتی، تولید گونه‌های فعال اکسیژنی، فعال‌سازی علامت‌دهی از طریق پروتئین‌های کیناز (MAPK) القا ژن‌های دفاعی و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی انجام می‌گیرد

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش مهمی را در تنظیم ژنتیکی مکانیسم‌های دفاعی، واکنش‌های فیزیولوژیکی و نمو گیاهان ایفا می‌کند (Bozhkov and Lam, 2011). به طوری که گیاهان در مواجهه با انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی مجبور به فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شوند (Overmyer et al., 2003, Mahalingam et al., 2006). گیاهان از پروتئین‌های مقاومتی به منظور شناسایی عوامل تنش

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: jahanbakhsh@uma.ac.ir

(Dangl and Jones, 2001). تغییر در ساختار سوم پروتئین های مقاومتی متصل به آدنوزین تری فسفات (ATP)، نقش مهمی را در فعال سازی علامت دهی و راه اندازی مرگ برنامه ریزی شده سلولی ایفا می کند (Lukasik and Takken, 2009). همچنین تغییر در میزان اسیدهای آمینه نیز می تواند منجر به ناپایداری ساختار سوم این پروتئین ها شود (Van Ooijen et al., 2008). اسیدهای آمینه در واکنش به تنش به ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم های درگیر در سم زدایی گونه های فعال اکسیژنی می شوند (Alcazar et al., 2006).

هورمون های گیاهی یکی از عوامل تنظیم کننده مرگ برنامه ریزی شده سلولی می باشند. اسید سالیسیلیک به عنوان یکی از هورمون های گیاهی، به صورت گسترده در گیاهان یافت می شود که نقش مستقیمی در تنظیم مرگ سلولی در طول واکنش فوق حساسیت دارد (Alvarez, 2000). این هورمون یک ترکیب فنیل پروپانوئیدی است که مولکول علامت دهی کلیدی در واکنش دفاعی مقابل عوامل تنش زا می باشد (Spoel and Dong, 2008). سطوح اسید سالیسیلیک در واکنش به عوامل تنش زا افزایش می یابد و همچنین کاربرد آن به صورت خارج سلولی یا تولید آن به صورت داخل سلولی از طریق بیان آنزیم های سنتز کننده اسید سالیسیلیک، باعث القای مقاومت به انواع تنش ها می شود (Heck et al., 2003). اسید سالیسیلیک در مواجهه با تنش از طریق اتصال به پروتئین های مقاومتی باعث تغییر در ساختار سوم این پروتئین ها می شود، همچنین پروتئین های مقاومتی به عنوان یک پل ارتباطی بین مولکول علامت دهنده اسید سالیسیلیک و فعال سازی ژن های دفاعی عمل می کنند (Wu et al., 2012).

پروتئومیکس علم مطالعه ی گسترده پروتئوم شامل مطالعه ی بیان، تغییرات پس از ترجمه و بر هم کنش پروتئین ها با سایر مولکول ها می باشد. از طریق علم پروتئومیکس تغییرات ساختمانی و فراوانی پروتئین ها در پاسخ نسبت به حالات نموی و تنش های محیطی قابل بررسی است. این تکنیک تنها روش توانمندی است که قادر به شناسایی و تعیین تغییرات پس از ژنوم و همچنین ابزاری مناسب برای مطالعه ی بیان ژن های پاسخ دهنده نسبت به تنش می باشد

(Zivy and Vienne, 2000). یکی از واضح ترین علایم و نشانه های مرگ برنامه ریزی شده سلولی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک تغییر در میزان بیان پروتئین ها می باشد. الکتروفورز دو بعدی در مرحله اول شامل جداسازی پروتئین ها با استفاده از تمرکز ایزوالکتریک (IEF) بوده و در مرحله دوم شامل جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی با استفاده از SDS-PAGE است (Yang et al., 2011). در این تحقیق اثر اسید سالیسیلیک در میزان غلظت اسید آمینه های پرولین، لیزین و متیونین در دو رقم گندم فلات و چمران ارزیابی شد و همچنین الگوی بیانی برخی پروتئین های درگیر در مرگ برنامه ریزی شده در رقم فلات نسبت به شاهد بررسی شد.

مواد و روش ها:

مواد ژنتیکی مورد استفاده، شرایط کاشت و نمونه برداری: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه ی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. در این آزمایش دو رقم گندم فلات (حساس به فوزاریوم) و چمران (مقاوم به فوزاریوم) بعد از سه برگچه ای شدن، با اسید سالیسیلیک تیمار شدند. برای این منظور محلول پاشی توسط اسید سالیسیلیک در غلظت های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار و نمونه برداری از برگ ها ۸ و ۱۲ ساعت بعد از محلول پاشی انجام شد. در هر مرحله نمونه برداری، گیاهچه های شاهد و تیمار به طور جداگانه نمونه برداری شدند و بلافاصله به داخل یخچال ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

سنجش مقدار پرولین، لیزین و متیونین برگ: استخراج پرولین از جوان ترین برگ ها با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استخراج لیزین و متیونین با استفاده از روش Ferre و همکاران (۱۹۶۹) صورت گرفت. برای استخراج میزان پرولین، ۰/۱ گرم بافت برگی در ۵ میلی لیتر سولفو اسید سالیسیلیک ۳ درصد سائیده و سانتریفیوژ گردید. به ۱ میلی لیتر از عصاره ی حاصل، ۱ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۱ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال خالص افزوده شد. به مخلوط واکنش ۲ میلی لیتر تولوئن اضافه شد و میزان جذب در دستگاه

بعد اول الکتروفورز طی دو مرحله‌ی Focusing و Rehydration صورت گرفت. برای این منظور از دستگاه Biorad (Bio-Rad-Protean-IEF-Cell-System) و نوارهای IPG با طول ۱۷ سانتی‌متر با pH= ۷/۵ استفاده شد. جهت انجام Rehydration، از ۸۵۰ میلی‌گرم پروتئین در ۳۰۰ میکرولیتر بافر Rehydration استفاده شد. در مرحله Focusing نوارها در دستگاه Bio Rad IEF CELL طبق برنامه‌ی تعریف شده قرار گرفتند. بعد از تمام شدن بعد اول، استریپ‌ها داخل محلول متعادل‌سازی به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته شدند. سپس برای انجام الکتروفورز پروتئین در بعد دوم از روش SDS-PAGE با ژل جدا کننده ۱۲٪ و روش Laemmli و همکاران (۱۹۷۰) استفاده شد. به این صورت که محلول جدا کننده به داخل فضای بین دو شیشه ریخته شد، بعد از انعقاد ژل تا ارتفاع نیم‌ساعتی‌تری از بالا ژل متراکم کننده اضافه شد. دستگاه الکتروفورز ابتدا روی ۳۰ میلی‌آمپر قرار داده شد تا پروتئین‌ها به طور کامل به داخل ژل بالایی نفوذ کند، پس از وارد شدن پروتئین‌ها به داخل ژل پایینی از ۴۰ میلی‌آمپر استفاده شد. برای رنگ آمیزی لکه‌های پروتئینی از Coomassie Brilliant Blue (G-250) (۲۵ گرم آمونیم سولفات، ۲۵ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۳ گرم کوماسی بریلیانت بلو G-250، ۲۵ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد) استفاده شد.

تجزیه‌های آماری: مطالعه صفات اندازه‌گیری شده از طریق آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار: رقم گندم در ۲ سطح، تیمار اسید سالیسیلیک در ۴ سطح و زمان نمونه‌برداری در ۲ سطح و با ۳ تکرار انجام گرفت و برای تجزیه‌های آماری داده‌ها از دو نرم افزار SAS و SPSS استفاده شد.

تجزیه تصاویر: تصاویر ژل تک بعدی توسط نرم افزار UVIDocMW و تصاویر ژل دو بعدی توسط نرم افزارهای Progenesis Samespots software vers.2.0 و بر پایه بار الکتریکی (نقطه ایزوالکتریک یا pI) و اندازه (جرم مولکولی نسبی یا M_r) ارزیابی شدند لکه‌های پروتئینی حاصل با طیف سنجی جرمی MS/MS تجزیه شدند.

اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. برای استخراج لیزین و متیونین ۰/۵ گرم نمونه‌ی برگ‌ی به همراه ۵۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۱ درصد خوب سائیده و سانتریفیوژ شد. جهت سنجش میزان لیزین ۱ میلی‌لیتر از محلول بالا با ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۶) و ۱ میلی‌لیتر نین‌هیدرین مخلوط و میزان جذب آن در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و برای سنجش میزان متیونین ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده با ۴ میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید، ۲ میلی‌لیتر از محلول گلیسین آبدار و ۲ میلی‌لیتر از محلول سدیم نیترو فری‌سیانید آبدار خوب مخلوط گردید. در نهایت پس از اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید جذب آن در ۵۱۰ نانومتر خوانده شد.

استخراج و تعیین مقدار کمی پروتئین کل محلول برگ گندم: استخراج پروتئین کل محلول از جوان‌ترین برگ‌ها به روش Guy و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت. برای سنجش مقدار کمی پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد، به این منظور ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد با ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی و ۲۹۰ میکرولیتر بافر استخراج مخلوط شدند. مقدار کمی پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

مطالعه‌ی تغییرات بیان پروتئین در برگ گندم با روش الکتروفورز دو بعدی: استخراج پروتئین با استفاده از روش Damerval و همکاران (۱۹۸۶) انجام شد. بدین منظور ابتدا ۱ گرم از بافت گیاهی با ۱ میلی‌لیتر محلول استخراج تری کلرواستیک اسید (TCA) خوب سائیده شد. عصاره‌ی پروتئین به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول شست‌وشو (۱۰۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر استون) اضافه شد. برای استخراج پروتئین، محلول لیزکننده (۴/۸ گرم اوره، ۱/۵۲ گرم تیواوره، ۴۰۰ میلی‌گرم CHAPS، ۱۰۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول، ۰/۴۲ گرم تریس قلیایی و ۱۰۰ میکرولیتر آمفولیت) اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

نتایج و بحث:

پروکلین: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل رقم، غلظت اسید سالیسیلیک و زمان در مورد پروکلین در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از برش عوامل غلظت، زمان و تیمار نشان داد که در رقم چمران و زمان ۸ ساعت در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری وجود داشت، در حالی که در غلظت ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری مشاهده شد. همچنین در رقم فلات، در غلظت ۵ میلی‌مولار و در زمان ۸ ساعت کاهش معنی‌دار و در غلظت ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲ و ۳).

پروکلین به عنوان یکی از اسمولیت‌های مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول‌های تحت تنش نقش اساسی را ایفا می‌کند. افزایش این ماده در شرایط تنش اسمزی، علاوه بر گیاهان در طیف وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتری‌ها، مخمرها، بی‌مهرگان دریایی و جلبک‌ها مشاهده شده است. در واقع پروکلین به عنوان یک چاپرون شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌کند. همچنین تولید زیاد پروکلین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات شوری در فرآیند طبیعی سلولی ممانعت به عمل می‌آورد (Paul and Hasegava, 1996). هر چه گیاه متحمل‌تر باشد، پروکلین بیشتری را ذخیره می‌کند (Desnigh and Kanagaraj, 2997). بر طبق مطالعات انجام شده، تجمع پروکلین از طریق تیمار اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد (Tasgin, 2003). به طوری که تجمع پروکلین در غلظت‌های پایین اسید سالیسیلیک کاهش پیدا می‌کند، اما بلافاصله با کاربرد بالاتر غلظت اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد (Saeidnejad et al., 2012).

لیزین: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل رقم، غلظت اسید سالیسیلیک و زمان در سطح ۱ درصد در مورد لیزین معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از برش عوامل غلظت، زمان و رقم نشان داد که غلظت ۲/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در زمان ۸ ساعت سبب افزایش معنی‌دار اسید آمینه لیزین شد، همچنین در این رقم طی

زمان ۱۲ ساعت، در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار افزایش معنی‌دار و در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری وجود داشت. در رقم فلات نیز در زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت و در تمامی غلظت‌ها، کاهش معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲ و ۳). کاتابولیسم لیزین ممکن است برای تنظیم سطح لیزین در برخی از بافت‌ها به کار برده شود. لیزین به‌طور کارآمد در پاسخ به تنش و در برخی از برنامه‌های تکاملی ابتدا به گلوتامات و سپس به سایر متابولیت‌های مرتبط با تنش تبدیل می‌شود (Galili et al., 2001). لیزین، پیش ماده‌ی اصلی سه متابولیت مهم مرتبط با تنش است که این سه متابولیت عبارتند از پروکلین که یک اسمولیت نیرومند است (Hare and Cress, 1997)، آمینو بوتیریک اسید که یک مولکول علامت‌دهی مرتبط با تنش است و آرژنین که بالقوه پیش ماده مربوط به ترکیبات پلی‌آمین‌ها و اکسیدنتریک می‌باشد (Baum et al., 1996). واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی باعث رمز شدن آنزیم‌های بیوسنتز کننده‌ی لیزین می‌شود (Song et al., 2004).

متیونین: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل رقم، غلظت اسید سالیسیلیک و زمان در مورد متیونین در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از برش عوامل غلظت، زمان و رقم نشان داد که در رقم چمران و زمان ۸ ساعت با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک از ۲/۵ میلی‌مولار به ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری وجود داشت. همچنین در رقم چمران و زمان ۱۲ ساعت، در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری مشاهده شد. در رقم فلات و در زمان ۸ ساعت کاهش معنی‌داری در تمامی غلظت‌ها وجود داشت، همچنین در رقم فلات و زمان ۱۲ ساعت، در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲ و ۳).

از آنجا که متیونین متابولیت اساسی در سلول‌های گیاهی است و صرف نظر از نقش آن به عنوان جزء اصلی پروتئین و نقش محوری آن در شروع ترجمه mRNA، به طور غیر مستقیم انواع فرایندهای سلولی را از طریق پیش‌ماده‌ی S-Adenosyl Methionine که دهنده‌ی اولین گروه متیل بیولوژیکی است، تنظیم می‌کند. میزان اسید آمینه‌ی متیونین با کاربرد اسید سالیسیلیک کاهش می‌یابد که این نتایج، با نتایج

جدول ۱- میانگین مربعات تجزیه واریانس لیزین، متیونین، پرولین تحت تیمار اسید سالیسیلیک

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
پرولین	متیونین	لیزین		
۱/۰۶۴**	۰/۰۳۶**	۰/۸۵۳**	۱	رقم گندم
۰/۰۹۶**	۰/۰۰۲**	۰/۷۷۷**	۳	اسید سالیسیلیک
۰/۰۰۱۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۱۹ ^{ns}	۱	زمان
۰/۰۵۵**	۰/۰۰۰۹**	۰/۷۷۳**	۳	رقم گندم*اسید سالیسیلیک
۰/۰۶۳**	۰/۰۰۲**	۰/۲۴۲**	۱	رقم گندم*زمان
۰/۰۱۵**	۰/۰۰۵**	۰/۰۷۱**	۳	اسید سالیسیلیک*زمان
۰/۰۶۸**	۰/۰۰۱**	۰/۳۶۸**	۳	رقم گندم*اسید سالیسیلیک*زمان
۰/۰۰۳**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۱۸**	۳۲	خطا
۱۱/۳	۹/۱	۱۴/۲۳		ضریب تغییرات

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۵، ** اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱، ^{ns} بدون اختلاف معنی‌دار

جدول ۲- برش اثرات سه جانبه رقم*زمان*غلظت توسط عامل رقم*زمان برای محتوای لیزین، متیونین و پرولین

میانگین مربعات			درجه آزادی	رقم*زمان (ساعت)
پرولین	متیونین	لیزین		
۰/۱**	۰/۰۰۸**	۰/۱۳**	۳	چمران* ۸
۰/۰۲**	۰/۰۱**	۰/۴**	۳	چمران* ۱۲
۰/۱**	۰/۰۰۶**	۰/۹**	۳	فلات* ۸
۰/۰۱**	۰/۰۰۷**	۰/۵۴**	۳	فلات* ۱۲

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱

انجام گرفت. وزن مولکولی پلی‌پپتیدها، بین ۲۱ تا ۷۰ کیلو-دالتون رده بندی شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، پلی‌پپتیدهای ۵۵، ۵۰، ۴۵، ۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۲۱ کیلودالتونی در رقم فلات به ترتیب با نسبت‌های ۱/۴، ۴/۸، ۲/۲، ۲/۸، ۹/۴، ۸/۴ و ۱/۵ نسبت به شاهد افزایش یافتند. اما در رقم چمران در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و زمان ۱۲ ساعت بالاترین تراکم پلی‌پپتیدهای ۴۵، ۴۰، ۳۵ و ۳۰ کیلودالتونی مشاهده شد که نسبت به شاهد به ترتیب افزایش ۱/۴۷، ۱/۸۳، ۲/۹۷ و ۱/۹۷ را نشان دادند. همچنین پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۷۰ کیلودالتون در رقم چمران مشاهده گردید که در رقم فلات وجود نداشت (شکل ۱). این نتایج با مطالعات انجام شده توسط Tasgin و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت داشت.

حاصل از Hussein و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت. متیونین به‌عنوان سوبسترا برای سنتز ایزولوسین بکار می‌رود، همچنین سنتز و کاتابولیسم آن تحت شرایط متفاوت زیستی و نموی می‌تواند قابلیت دسترسی به ایزولوسین را تحت تأثیر قرار دهد. بررسی‌ها نشان داد که متیونین گاما-لیاز تعادل ایزولوسین را تحت شرایط مختلف در گیاهان حفظ می‌کند (Joshi et al., 2010).

الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین کل محلول تحت تأثیر اسید سالیسیلیک: نمونه‌ها در حالت تیمار و شاهد برای تعیین وزن مولکولی پلی‌پپتیدها مورد بررسی قرار گرفتند که تعیین وزن مولکولی از روی میزان Rf (Release factor) و همچنین نشانگر مورد استفاده توسط نرم‌افزار UVIDocMW

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات سه جانبه رقم*زمان*غلظت برای محتوای لیزین، متیونین و پرولین

میانگین صفات				
رقم* زمان (ساعت)	غلظت (میلی مولار)	لیزین	متیونین	پرولین
چمران* ۸	۰	۱/۰۲ ^b	۰/۱۱ ^{bc}	۰/۷۱ ^b
	۲/۵	۱/۴۸ ^a	۰/۱۳ ^b	۰/۵ ^c
	۵	۱/۱۵ ^b	۰/۰۹ ^c	۰/۵۲ ^c
	۱۰	۱/۰۴ ^b	۰/۱۶ ^a	۰/۸۹ ^a
فلات* ۸	۰	۱/۴۵ ^a	۰/۲۰ ^{۷a}	۰/۲۹ ^c
	۲/۵	۰/۸۶ ^b	۰/۱۵ ^{۶b}	۰/۲۹ ^c
	۵	۰/۷۳ ^c	۰/۱۵ ^{۹b}	۰/۶۷ ^a
	۱۰	۰/۶۳ ^d	۰/۱۵ ^{۵b}	۰/۴۸ ^b
چمران* ۱۲	۰	۱/۰۲	۰/۱۳ ^{۲b}	۰/۶ ^b
	۲/۵	۱/۴۹ ^a	۰/۱۱ ^{۱b}	۰/۷۲ ^a
	۵	۰/۶۷ ^c	۰/۱۶ ^{۷a}	۰/۷۶ ^a
	۱۰	۰/۷۸ ^c	۰/۸۶ ^c	۰/۸ ^a
فلات* ۱۲	۰	۱/۴۵ ^a	۰/۲۱ ^{۵a}	۰/۲۹ ^b
	۲/۵	۰/۹۳ ^b	۰/۲۰ ^{۷a}	۰/۳۶ ^{ab}
	۵	۰/۵۴ ^c	۰/۱۷ ^{۵c}	۰/۳۱ ^b
	۱۰	۰/۵۵ ^c	۰/۱۵ ^{۵c}	۰/۴۳ ^c
Lsd		۰/۲۲۵	۰/۰۲۲	۰/۱۰۲

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند.

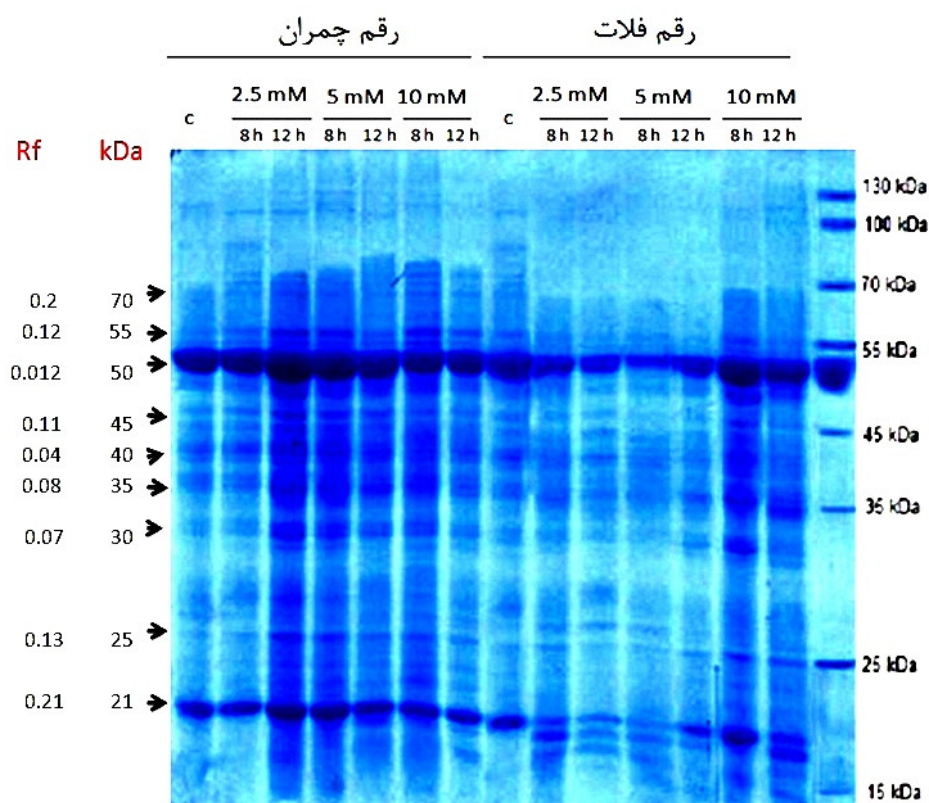
الکتروفورز ۲ بعدی پروتئین‌های رقم فلات تحت تیمار

با اسید سالیسیلیک: به منظور بررسی نحوه بیان پروتئین‌ها در اثر تیمار با ۱۰ میلی مولار اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید، سپس لکه‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزارهای TotalLab و Progenesis بر پایه بارالکتریکی (نقطه ایزوالکتریک یا pI) و اندازه (جرم مولکولی نسبی یا M_r) ارزیابی شدند.

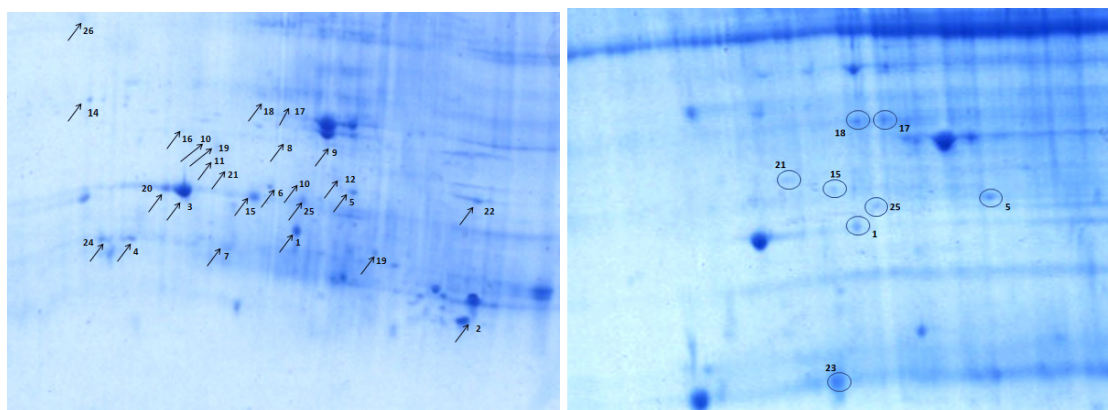
مقایسه لکه‌های گیاهان تیمار شده با گیاهان شاهد نشان داد که، لکه‌های ۱، ۵، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۱ و ۲۵ به ترتیب با وزن مولکولی ۲۵/۹۳، ۳۹/۹۷، ۴۰/۰۴، ۵۳/۹۸، ۵۵/۳۲، ۲۱/۷۱ و ۳۲ متعلق به پروتئین‌هایی هستند که در گیاهان تیمار شده و شاهد به صورت مشترک وجود دارند ولی در حالت تیمار شده نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند. بر عکس، لکه ۲۳ با وزن

مولکولی ۲۶/۴۴ کاهش بیان نسبت به شاهد را نشان داد. لکه های ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۶ به ترتیب با وزن مولکولی ۲۵/۰۹، ۲۷/۹۶، ۲۸/۳۶، ۳۵/۰۶، ۳۱/۹۶، ۵۲/۸۶، ۴۷/۶۸، ۳۷/۸۵، ۳۹/۸۴، ۰۴/۵۸، ۳۹/۴، ۵۶/۳۲، ۵۳/۸۸، ۳۲/۴۲، ۲۹/۳۸، ۲۹/۲، ۱۶/۶۷، ۷۱/۵۸ جزو پروتئین‌هایی می‌باشند که در گیاهان شاهد دیده نشدند و احتمالاً مربوط به تیمار هورمون اسید سالیسیلیک هستند (شکل ۲ و ۳). پروتئین‌های مشخص شده به شرح زیر بودند (جدول ۴):

پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی مقابل عوامل تنش-زا: در مطالعه‌ی حاضر، گلوتاتیون ترانسفراز (لکه‌های ۱ و ۲)، آسکوربات پراکسیداز (لکه ۳) و 2-cys-Prx (لکه ۴) به صورت معنی‌داری توسط تیمار با اسید سالیسیلیک تنظیم می‌شوند.



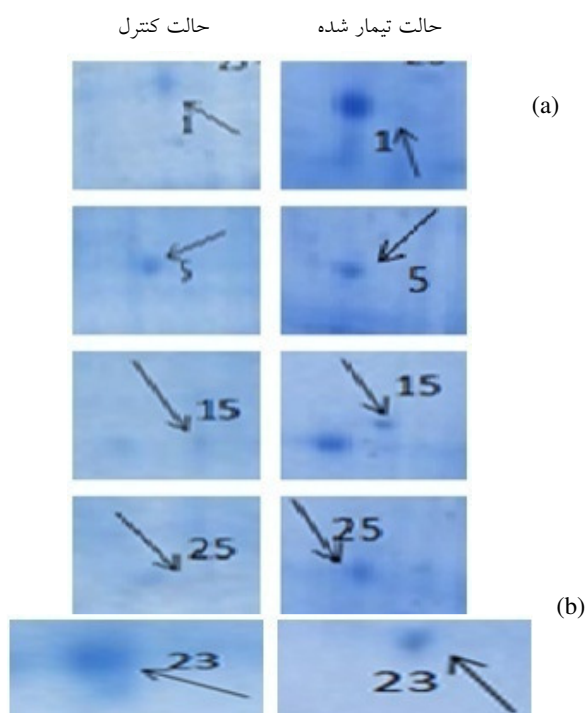
شکل ۱- تغییرات الگوی پروتئین کل محلول در برگ‌های گندم رقم فلات و چمران تحت تیمارهای اسید سالیسیلیک با غلظت‌های (۵، ۲/۵، ۱۰ mM) و شاهد (c) در زمان‌های ۸ ساعت (h) و ۱۲ ساعت بعد از تیمار



شکل ۲- نقشه پروتئوم بافت برگ گندم رقم فلات حساس به فوزاریوم مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و نمونه برداری بعد از ۱۲ ساعت (سمت چپ)، نقشه پروتئوم بافت برگ گندم شاهد (سمت راست).

اکسیداتیو، اتصال فلاونوئیدها و تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی دخالت دارند (Kilili *et al.*, 2004). این آنزیم‌ها توانایی اتصال به هورمون‌های متفاوت مانند اکسین و سیٹوکینین را دارند (Gonneau *et al.*, 1998) و قادر به تحریک توسط انواع

گلوکوتایون s ترانسفرازها گروهی از آنزیم‌های دایمری چند عملکردی می‌باشند که در سم‌زدایی آنزیمی ترکیبات زنبوبیوتیک و آندوبیوتیک دخالت دارند (Moons, 2005). آنزیم گلوکوتایون s ترانسفراز در متابولیسم‌های داخلی شامل تنش



شکل ۳- موقعیت برخی از لکه‌های پروتئینی در تیمار ۱۰ میلی مولار اسید سالیسیلیک در گندم رقم فلات نسبت به شاهد (a) دارای بیان بالا (b) دارای بیان کمتر.

هیدروژن پراکسید و القا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود (Kim *et al.*, 2000).

Probenazole – induced protein (PBZ) (لکه ۲۴) به عنوان پروتئین دخیل در مقابله با تنش معرفی شده است. ژن PBZ پروتئین مربوط به پاتوزن را رمز می‌کند و از طریق تیمار با پروبنازول فعال می‌شود که یک القا کننده‌ی موثر در مقاومت میزبان در مقابل تنش و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌باشد (Midoh and Iwata, 1996).

سوپراکسیددیسموتاز (SOD) (لکه ۲۵) جز پروتئین‌هایی می‌باشد که باعث کاهش گونه‌های اکسیژن فعال شده و توسط تنش‌های زیستی و غیر زیستی فعال می‌شود (Edwards *et al.*, 2000) به دلیل حفظ هموستازی در شرایط تنش، گیاهان نیاز دارند تا سازوکارهای مقاومت از قبیل حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال و سیستم دفاع سلولی را تقویت کنند. گونه‌های اکسیژن فعال می‌توانند اجزای سلولی را تخریب کرده و به‌عنوان مولکول‌های پیام‌دهنده عمل کنند (Apel *et al.*, 2004). همچنین ثابت شده

هورمون‌های گیاهی شامل اتیلن، اکسین و متیل جاسمونات، آبسزیک اسید و اسید سالیسیلیک می‌باشند (Smith *et al.*, 2003).

آسکوربات پراکسیداز (لکه ۳) یک نوع خاص از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌باشد که توسط یک خانواده چندژنی که شامل ایزوآنزیم‌های فراوان می‌باشند، رمز می‌شود. عملکرد آن‌ها در مقاومت‌های غیر زیستی از طریق سم‌زدایی هیدروژن پراکسید به آب و اکسیداسیون سوبستراهایی مانند آسکوربات گزارش شده است (Shigeoka *et al.*, 2002).

پروتئین پروکسی ردوکسین (Prx-2-cys) عضوی از خانواده‌ی آنزیم‌های سم‌زدای پراکسید می‌باشد و در نتیجه فعالیت اختصاصی گیاهی در محیط اکسیژنی کلروپلاست حاصل می‌شود. پروتئین‌های Prxs می‌توانند به‌عنوان یک پراکسیداز، حسگرهای ردوکس و چاپرون‌های مولکولی عمل کنند (Kim *et al.*, 2009). علاوه بر این، در انواع عملکردهای سلولی شامل مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی دخالت دارند (Zhou *et al.*, 2000). افزایش بیان Prx منجر به حذف

جدول ۴- لکه‌های پروتئینی شناسایی شده از رقم‌های شاهد و تیمار شده با اسید سالیسیلیک

Spot ^۱	Protein ID ^۲	Mw kd ^۳	pI ^۴	predict ID ^۵
۱	Glutathione_ s transferase 1	۲۵/۹۳	۵/۲۹	gi 232196
۲	Glutathione_ s transferase	۲۵/۰۹	۶/۳۵	gi 20067415
۳	Ascorbate peroxidase	۲۷/۹۶	۵/۱۰	gi 15808779
۴	2- cys peroxiredoxin BSA1	۲۸/۳۶	۵/۹۸	gi 357163385
۵	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5	۳۹/۹۷	۶/۳۳	gi 357148997
۶	Malate dehydrogenase 1	۳۵/۰۶	۸/۵۴	gi 357132456
۷	Triosephosphate isomerase	۳۱/۹۶	۶/۰۰	gi 1174745
۸	6 phosphoglucanate dehydrogenase, decarboxylating- like isoform 1	۵۲/۸۶	۵/۶۱	gi 357110692
۹	Glyceraldehydes- 3 phosphate dehydrogenase B	۴۷/۶۸	۶/۰۳	gi 357114230
۱۰	Fructose- 1,6 bisphosphate	۳۷/۸۵	۵/۳۸	gi 300681469
۱۱	Guinone oxidoreductase- like protein	۳۹/۸۴	۸/۲۹	gi 357147655
۱۲	Putative PDI- like protein	۴۰/۵۸	۶/۱۷	gi 299469378
۱۳	Glutamine synthetase isoform GS1c	۳۹/۴	۵/۴۱	gi 71361904
۱۴	Glutamine decarboxylase 1- like	۵۶/۳۲	۵/۳۰	gi 357117563
۱۵	ATP synthase subunit	۴۰/۰۴	۸/۱۸	gi 285014508
۱۶	ATP synthase cF1 beta subunit	۵۳/۸۸	۵/۰۶	gi 14017579
۱۷	ATP ₁	۵۳/۹۸	۶/۰۱	gi 166165274
۱۸	ATP synthase cF1 alpha subunit	۵۵/۳۲	۶/۱۱	gi 14017569
۱۹	Ptr ToxA- binding protein 1	۳۲/۴۲	۹/۰۱	gi 38570261
۲۰	14-3-3 protein	۲۹/۳۸	۴/۸۳	gi 40781605
۲۱	SET-domain transcriptional regulator	۲۱/۷۱	۷/۰۴	gi 4582456
۲۲	Protein agamous_ like 26	۲۹/۲	۸/۱۰	gi 334187967
۲۳	30s ribosomal protein	۲۶/۴۴	۹/۰۱	gi 357157795
۲۴	Probenazole_ induced protein (PBZ)	۱۶/۶۷	۴/۷۳	gi 7442204
۲۵	Probable superoxide dismutase	۳۲	۶/۱	gi 7433347
۲۶	70 kDa hot shock protein (PBZ)	۷۱/۵۸	۵/۱۷	gi 147853956

۱) لکه‌های پروتئینی شماره گذاری شده بر روی ژل‌های دو بعدی گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی مولار اسید سالیسیلیک (۲) نام پروتئین شناسایی شده (۳) وزن مولکولی پروتئین پیش‌بینی شده (۴) نقطه ایزوالکتریک پروتئین پیش‌بینی شده (۵) شماره پروتئین در پایگاه‌های اطلاعات.

به علت اتصال به زنجیره پلی‌پپتیدی سایر پروتئین‌ها، در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و همچنین حفاظت از آن‌ها در برابر تخریب شدن و یا انباشته شدن آن‌ها دخیل هستند. همچنین گزارش شده است که HSP 70 در انتقال پروتئین‌ها از عرض غشاهای اندامک‌های سلولی دخیل هستند (Fink, 1999).

که این پروتئین‌ها در مراحل مختلف مرگ سلولی فعالیت دارند (Kliebenstein *et al.*, 1999). پروتئین‌های شوک گرمایی (HSP 70) (لکه ۲۶) جز پروتئین‌هایی می‌باشند که احتمالاً در پایداری و تجهیزسازی تاخوردگی پروتئین‌ها نقش دارند و در طول مواجهه با تنش های متفاوت دنا توره می‌شوند. خانواده‌ی پروتئینی HSP 70

گلوتامین سنتتاز یا دکربوکسیلاز در گیاهان منجر به مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شود (McLean *et al.*, 2003). بیان ایزوفرم گلوتامین سنتتاز، GS1c و آنزیم گلوتامین دکربوکسیلاز ۱ (به ترتیب لکه‌های ۱۳ و ۱۴) تحت تیمار با اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابند.

ریبوزوم‌ها مسئول بیوسنتز پروتئین‌ها می‌باشند. پروتئین دی سولفید ایزومراز (PD1-like) نقش مهمی را در تشکیل باند-های دی سولفیدی پروتئین‌ها ایفا می‌کند. پروتئین PD1-like (لکه ۱۲) با پیش تیمار اسید سالیسیلیک سریع‌ا افزایش می‌یابد و در حالت عکس اسید سالیسیلیک از بیان پروتئین ریبوزومی (لکه ۲۳) جلوگیری می‌کند. علت افزایش این پروتئین‌ها در تیمار با اسید سالیسیلیک ممکن است مربوط به افزایش محتوای پروتئینی و نیتروژنی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک باشد (Konig *et al.*, 2003).

پروتئین‌های درگیر در تولید انرژی: تیمار با اسید سالیسیلیک فراوانی لکه‌های پروتئینی ATP synthase subunit (لکه ۱۵)، ATP synthase cF1 beta subunit (لکه ۱۶)، ATP₁ (لکه ۱۷)، ATP synthase cF1 alpha subunit (لکه ۱۶) را افزایش می‌دهد. این موضوع نشانگر این است که تولید انرژی در تیمار با اسید سالیسیلیک بیشتر از کنترل می‌باشد که باعث افزایش رشد و مقابله با انواع تنش‌های مختلف می‌شود (McLean *et al.*, 2003).

پروتئین‌های درگیر در تولید توکسین: توکسین Prt ToxA یک توکسین پروتئینی می‌باشد که توسط گندم علیه پاتوژن *Pyrenophora tritici-repentis* تولید شده و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی را القا می‌کند و منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژنی در رقم‌های گندم حساس به توکسین می‌شود. در القا مرگ سلولی ToxA binding protein1 (توکسین مرتبط با ToxA) نقش دارد (Manning *et al.*, 2007). پروتئین ToxA binding protein1 (لکه ۱۹) با پیش تیمار اسید سالیسیلیک افزایش بیان پیدا کرد. بنابراین این پروتئین ممکن است به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی انفجار اکسیداتیو تولید شده توسط اسید سالیسیلیک تحت تأثیر شرایط تنش زیستی و غیر زیستی عمل کند.

پروتئین‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات: متابولیسم کربوهیدرات سنتز و انتقال قند و همچنین تقسیم‌بندی کربن را تنظیم می‌کند که در مواجه شدن با تنش‌های متفاوت دچار اختلال می‌شود (Kim *et al.*, 2000).

آنزیم‌های ایزوسیترات دهیدروژناز (لکه ۵)، ملات دهیدروژناز (لکه ۶)، تریئوزفسفات ایزومراز (لکه ۷)، ۶ فسفو گلیکونات دهیدروژناز (لکه ۸)، گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز (لکه ۹)، فروکتوز بیس فسفات (لکه ۱۰) و کوینون اکسی ردوکتاز (لکه ۱۱) آنزیم‌های کلیدی چرخه گلیکولیز و چرخه تری کربوکسیلیک اسید می‌باشند. این امر نشانگر این موضوع می‌باشد که تیمار اسید سالیسیلیک، سطح گلوکز، فروکتوز و ساکارز و فراوانی سایر آنزیم‌های مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی را افزایش می‌دهد (Chan *et al.*, 2008).

پروتئین‌های درگیر در متابولیسم پروتئین: سیستم کنترل‌کننده‌ی مقدار پروتئین که نقش مهمی را در تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی (شامل پرولین و آمینو اسیدهای آزاد) ایفا می‌کند و همچنین متابولیسم نیتروژن که یک مکانیسم مقاومتی مهم القا شده توسط اسید سالیسیلیک می‌باشد را افزایش می‌دهد که این افزایش از طریق فعالیت نیترات ردوکتاز (NR)، محتوای پروتئینی می‌باشد (Singh *et al.*, 2003).

گلوتامین سنتتاز (لکه ۱۳) انباشتگی آمونیوم با گلوتامات را برای تولید گلوتامین کاتالیز می‌کند و سپس گروه‌های نیتروژنی را برای بیوسنتز همه‌ی ترکیبات نیتروژنی در گیاهان مهیا می‌کند. این آنزیم، تثبیت آمونیوم روی گروه آلفا کربوکسیل گلوتامات را که وابسته به آدنوزین تری فسفات است کاتالیز می‌کند تا گلوتامین را بوجود آورد. در واقع این آنزیم گروه‌های نیتروژنی را برای بیوسنتز همه اجزای نیتروژنی در گیاه فراهم می‌کند و اسید آمینه‌ی اصلی دخیل در سنتز پرولین است. پرولین یک جزء مهم پاسخ به تنش شوری در گیاهان به شمار می‌رود و در داخل سلول گیاه می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظتی اسمزی از گیاه در برابر تنش شوری حمایت کند (Ireland and Lea, 1999).

گلوتامین دکربوکسیلاز (لکه ۱۴) دکربوکسیلاسیون ۱-گلوتامین را به α -آمینو بوتیرات کاتالیز می‌کند. افزایش بیان

کاربرد خارجی اتیلن می‌باشد و با مناطق پرموتوری ژن‌های پروتئینی دمین شوک سرمایی برهم کش داده و الگوی بیانی آن‌ها را تغییر می‌دهد (Fernandez *et al.*, 2000). در این مطالعه، فراوانی پروتئین agamous 26 (لکه ۲۲) در پیش تیمار اسید سالیسیلیک بیشتر از حالت شاهد بود، بنابراین احتمالاً در تنظیم علامت‌دهی اسید سالیسیلیک نقش داشت.

نتیجه‌گیری کلی:

اسید سالیسیلیک با تنظیم میزان بیان پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین، تولید انرژی و انتقال علامت در ارتباط می‌باشد و از آنجا که اسید سالیسیلیک می‌تواند تأثیر مثبتی بر میزان کاهش انواع تنش‌های محیطی داشته باشد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش بیان پروتئین‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی حاصل از تیمار اسید سالیسیلیک با افزایش ایجاد مقاومت در مقابل تنش در ارتباط می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از مطالعات پروتئومیکسی با استفاده از الکتروفورز ۲ بعدی نشان داد که به طور کلی پروتئین‌هایی که در پاسخ با اسید سالیسیلیک تغییر بیان دارند، در ارتباط مستقیم با سیستم دفاعی در مقابل تنش مانند لکه‌های ۱، ۲، ۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶ می‌باشند که این پروتئین‌ها در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی دخالت دارند.

پروتئین‌های درگیر در انتقال علامت: دخالت پروتئین‌های مسئول انتقال علامت، اهمیت اسید سالیسیلیک را در مقاومت-های زیستی و غیر زیستی مشخص می‌کند (Chan *et al.*, 2008). لکه‌های پروتئینی 14-3-3 protein و SET-domain transcriptional regulator (به ترتیب لکه‌های ۲۰ و ۲۱) دخیل در انتقال علامت توسط تیمار اسیدسالیسیلیک افزایش می‌یابند. پروتئین ۳-۳-۱۴ ممکن است با بیش از ۲۰۰ پروتئین هدف در گیر در سازمان‌دهی سلولی مانند آنزیم‌های تجزیه کننده گوانین تری فسفات و آدنوزین تری فسفات تعامل داشته باشد و مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، علامت‌دهی، رشد سلولی و بقا را تنظیم کند (Wang *et al.*, 2008). پروتئین‌های SET-domain که در اجزای کروماتینی یافت می‌شوند نقش مهمی را در تنظیم رونویسی بیان ژن از طریق متیله کردن هیستون در حیوانات ایفا می‌کنند (Springer *et al.*, 2003)، اما عملکرد آن‌ها در گیاهان هنوز مشخص نیست. در مطالعه‌ی حاضر، SET-domain transcriptional regulator (لکه ۲۱) به صورت سریع توسط تیمار اسید سالیسیلیک افزایش بیان می‌یابد. بنابراین ممکن است به عنوان یک عامل مهم در مسیر علامت‌دهی در مقابله با تنش‌های متفاوت عمل کند. پروتئین Agamous عضو از خانواده‌ی MADS-domain می‌باشد که از عوامل تنظیم کننده محسوب می‌شود. پروتئین Agamous 15 transcriptor factor قادر به درک و پاسخ‌گویی

منابع:

- Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO Journal* 15: 2988-2996.
- Bozhkov, P. V. and Lam, E. (2011) Green death: revealing programmed cell death in plants. *Nature* 18: 1239-1240.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B. and Tian, S. (2008) Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics* 8: 4791-4797.
- Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic
- Alcazar, R., Marco, F., Cueves, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28: 1867-1876.
- Alvarez, M. E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 429-442.
- Apel, K. and Heribert, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free prolin for water stress studies. *Plant and soil* 39: 205-208.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsenelson, H., Zik, M. and Fromm, H. (1996)

- transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39: 933-47.
- Kilili, K. G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P. N., Makris, A. M. and Kampranis, S. C. (2004) Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24540-24551.
- Kim, H., Lee, T. H., Park, E. S., Suh, J. M., Park, S. J., Chung, H. K., Kwon, O. Y., Kim, Y. K., Ro, H. K. and Shong, M. (2000) Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide induced apoptosis in thyroid cells. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18266-18270.
- Kim, S. Y., Jang, H. H., and Lee, J. R. (2009) Oligomerization and chaperone activity of a plant 2 Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. *Plant Sciences* 177: 227-232.
- Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, A. C., Last, R. L. and Dangl, J. L. (1999) LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1022-1026.
- Konig, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M. and Dietz, K. (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin: role of the C terminus and the quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24409-24420.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lukasik, E. and Takken, F. L. (2009) Standing strong, resistance proteins instigators of plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 427-436.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S. K., Faustin, E., Weng, H. and Ayoubi, P. (2006) Analysis of oxidative signaling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 29: 1357-1371.
- Manning, V. A., Hardison, L. K. and Ciuffetti, L. (2007) Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 168-177.
- McLean, M. D., Yevtushenko, D. P., Deschene, A., Cauwenbergh, O. R. V., Makhmoudova, A., Potter, J. W., Bown, A. W. and Shelp, B. J. (2003) Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root-knot nematode. *Molecular Breeding* 11: 277-285.
- Midoh, N. and Iwata, M. (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiology* 37: 9-18.
- Moons, A. (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones* 72: 155-202.
- variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Desnigh, R. and Kanagaraj, G. (2007) Influence of salinity stress on photosynthesis and antioxidant systems in two cotton varieties. *Plant Physiology* 33: 221-234.
- Edwards, R., Dixon, D. P. and Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5:193-198.
- Fernandez, D. E. F., Heck, G. R., Perry, S. E., Patterson, S. E., Bleecker, A. B. and Fang, S. C. (2000) The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12: 183-189.
- Ferre, R. E., Fellers, D. A. and Shepherd, A. D. (1969) Determination of free lysine and methionine in amino acid-fortified wheat. *Journal of Agricultural Research* 47: 614-620.
- Fink, A. L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79: 425-449.
- Galili, G., Tang, G., Zhu, X. and Gakiere, B. (2001) Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 4:261-266.
- Gonneau, J., Mornet, R. and Laloue, M. (1998) A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Plant Physiology* 103: 114-124.
- Guy, G. R., Cao, X., Chua, S. P. and Tan, Y. H. (1992) Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1. *Journal of Biological Chemistry* 267: 1846-1852.
- Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Heck, S., Grau, T. and Baucala, A. (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis. *Plant Journal* 36: 307-311.
- Hussein, M. M., Balbaa, L. K. and Gaballah, M. S. (2007) Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. *Research Journal of Agriculture and Biology Sciences* 3: 321-328.
- Ireland, R. J. and Lea, P. J. (1999) The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. In: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology* (ed. Singh, B. K.). Pp. 49-109. Marcel Dekker, New York
- Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z. and Junder, G. (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and

- (2003) Comparative analysis of SET domain proteins in maize and Arabidopsis reveals multiple duplications preceding the divergence of monocots and dicots. *Plant Physiology* 132: 907-925.
- Taşgın, E., Atıcı, O. and Nalbantoglu, B. (2003) Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* 41: 231-236.
- Van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, M. M., Albrecht, M., Cornelissen, B. J. and Takken, F. L. (2008) Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *Journal of Experimental Botany* 59:1383-1397.
- Wang, C., Ma, Q. H., Lin, Z. B., He, P. and Liu, J. Y. (2008) Cloning and characterization of a cDNA encoding 14-3-3 protein with leaf and stem-specific expression from wheat. DNA sequence. *Plant Cell* 19: 130-136.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J., Boyle, P. and Wang, Y. D. B. (2012) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* 1: 639-647.
- Yang, L., Tian, D., Luo, Y., Zhang, R., Ren, C. H. and Zhou, X. (2011) Proteomics-based identification of storage, metabolic, and allergenic protein in wheat seed from 2-DE gels. *African Journal of Agriculture Research* 6: 808-816.
- Zhou, Y., Kok, K. H., Chun, A. C., Wong, C. M., Wu, H., Lin, M. C., Fung, P. C., Kung, H. and Jin, D. Y. (2000) Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 921-927.
- Zivy, M., and Vienne, D. (2000) Proteomics: A link between genomics, genetics and physiology. *Plant Cell Reports* 1: 639-647.
- Overmyer, K., Brosche, M. and Kangasjarvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Sciences* 8: 335-342.
- Paul, M. and Hasegava, A. (1996) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Saeidnejad, A., Mardani, H., and Naghibolghora, M. (2012) Protective Effects of Salicylic Acid on Physiological Parameters and Antioxidants Response in Maize Seedlings under Salinity Stress. *Journal of Applied Environmental Biological Sciences* 2: 364-373.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305- 1319.
- Singh, B., and Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 39: 137-141.
- Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S. and Goldsbrough, P.B. (2003) Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant Journal* 36: 433-442.
- Song, J. T., Lu, H. and Greenberg, J. T. (2004) Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and AGD2-LIKE defense response protein1, encoding novel aminotransferases. *Plant Cell* 16: 353-366.
- Spoel, S. H. and Dong, X. (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Plant Cell* 3:348-351.
- Springer, N. M., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pandry, R., Cone, K. C., Chandler, V. L. and Kaepler, S. M.