[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

بررسی بیان پروتئین‌های القاء شده برگ دو رقم گندم تحت تنش کادمیوم و جیوه با استفاده تکنیک الکتروفورز دو بعدی

سیده یلدا رئیسی‌ساداتی[۱]، سدابه جهانبخش گده‌کهریز[۲*] و علی عبادی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۴)

چکیده

گندم یکی از منابع مهم غذایی بشر می‌باشد. کادمیوم و جیوه به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌ها متصل شده و باعث مهار فعالیت، کاهش تولید پروتئین و تداخل با تنظیم آنزیمی - احیائی می‌شوند. به‌منظور بررسی نحوهٔ بیان پروتئین‌ها تحت تأثیر کادمیوم و جیوه آزمایشی به‌صورت فاکتوریل که فاکتورها شامل ارقام گندم در دو سطح (گنبد و تجن)، فلزات سنگین در هفت سطح (شاهد، کلرید جیوه در چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار و کلرید کادمیوم در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار) و زمان نمونه‌برداری در دو سطح (۸ و ۱۶ ساعت) بودند در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی به اجرا در آمد. بدین‌منظور از روش برادفورد برای تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها و برای بیان آنها از SDS-PAGE ۱۲٪ و تکنیک الکتروفورز دو بعدی (two-dimensional) استفاده گردید. نتایج نشان داد که تحت تنش کادمیوم و جیوه مقدار کمی پروتئین کل نسبت به حالت کنترل افزایش می‌یابد. الکتروفورز دو بعدی پروتئین تحت تنش کادمیوم نشان‌دهنده اختلافاتی در شدت بیان لکه‌های پروتئینی برگ نسبت به گیاه کنترل بود. به‌طورکلی پروتئین‌هایی که در مقابله با کادمیوم تغییر بیان دادند در دو گروه تقسیم‌بندی شدند: لکه‌های ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴ و ۱۶ متعلق به پروتئین‌هایی بودند که نسبت به شاهد کاهش بیان داشتند، اما لکه‌های ۱، ۲، ۸، ۱۹ و ۲۰ نسبت به شاهد بیان بیشتری نشان دادند که پروتئین‌های مربوط به این لکه‌ها در ارتباط مستقیم با سیستم دفاعی در مقابل تنش می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، پروتئین، فلزات سنگین، گندم

۱ ، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی و دانشیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jahanbakhsh@uma.ac.ir

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

مقدمه

امروزه یکی از مشکلات خاک‌های زراعی وجود فلزات سنگین می‌باشد. کادمیوم و جیوه از جمله فلزاتی هستند که نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند و در گروه فلزات سنگین بسیار سمی طبقه‌بندی می‌شوند (۱). بارزترین نشانه‌های آسیب ناشی از فلزات سنگین عبارتند از: افزایش رشد یا عدم توازن در فرآیندهای متابولیکی، تغییر در جذب عناصر غذایی و تجزیه ساختارهای بزرگ در سلول می‌باشد (۱۱). یکی از رویکردهای اساسی در شناخت مکانیسم تحمل و مقاومت گیاهان در واکنش به تنش‌ها، بررسی و شناسایی تغییرات در سطوح پروتئین‌های درگیر در این فرآیند می‌باشد (۲). چند نوع سیستم انتقال برای کمک به مقاومت در برابر فلزات سنگین از جمله ATPases نوع P و ناقل‌های ABC یا ناقل‌های تحریک شده ثانویه فلز سنگین وجود دارند. این ناقل‌ها در غشای پلاسمایی یا در غشای واکوئلی قرار دارند و فلزات سنگین را به‌ترتیب به داخل آپوپلاست یا واکوئل منتقل می‌کنند (۱۹). یک روش سم‌زدائی فلزات سنگین، تولید ترکیبات کلاته‌کننده می‌باشد که میل ترکیبی شدیدی برای اتصال به برخی از فلزات سنگین در محیط سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی دارند. از جمله مهم‌ترین این ترکیبات آمینو اسیدها و دو دسته از پپتیدها مانند فیتوکلاتین‌ها (Phytochelatins) و پروتئین‌های کوچک متالوتیونین‌ها (Metallothioneins) یا پپتیدهایی شبیه گلوتاتیون می‌باشند که توسط تیمارهای فلزات سنگین به سرعت القاء می‌شوند (۸). کادمیوم با تولید فرم‌های مختلفی از انواع اکسیژن فعال ROS (Reactive Oxygene Species) واکنش سمی ایجاد کرده و موجب آسیب به پروتئین‌ها، DNA و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (۳۱). تعدادی از مکانیسم‌های سم‌زدائی شامل کلاته کردن کادمیوم به‌وسیله پپتیدهای متصل شونده، جداسازی کادمیوم و انتقال به درون واکوئل‌ها یا حرکت آن به‌وسیله موسیلاژ می‌باشد. هم‌چنین گلوتاتیون و فیتوکلاتین شدیداً با کادمیوم واکنش داده و کادمیوم آزاد را در داخل سیتوزول برگ کاهش می‌دهند و در نتیجه سمیت کادمیوم را محدود می‌کنند (۲۷). تحقیقات مقایسه‌ای پروتئومیکس در گیاهان قبل و بعد از تنش‌های خاص امکان به‌دست آوردن اطلاعات در مورد مکانیسم‌های دفاعی گیاهان را به‌دست می‌دهد (۲۲). الکتروفورز دو بعدی پروتئین‌ها را براساس پارامترهای فیزیکی جدا می‌کند و یک ابزار قوی جهت جداسازی کمپلکس پروتئین‌های مخلوط می‌باشد (۲۹). افزایش استفاده روزافزون از کودهای شیمیایی و پساب‌های صنعتی آلوده به فلزات سنگین باعث مطالعات گسترده در مورد اثرات این عناصر بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاهان مهم و استرتژیک مانند گندم شده است. در این راستا هدف از این بررسی، مطالعه میزان پروتئین و بررسی کمی و کیفی آن، سنجش تغییرات در بیان پروتئین‌ها، تعیین موقعیت و شناسایی عملکرد سلولی در سطح پروتئین‌ها به‌کمک تکنیک الکتروفورز تک بعدی و دو بعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. در این آزمایش دو رقم گندم شامل گنبد (مقاوم نسبت به فوزاریوم) و تجن (حساس به فوزاریوم) در گلدان‌ها کشت و پس از سه برگچه‌ای شدن گیاهان توسط کلرید جیوه در چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار و کلرید کادمیوم در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار به‌همراه شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر) محلول‌پاشی شدند.

طرز تهیه محلول‌های کلرید جیوه و کلرید کادمیوم: جرم مولکولی کلرید جیوه ۲۷۱/۵ گرم و جرم مولکولی کلرید کادمیوم ۲۰۱/۳۲ گرم می‌باشد. برای تهیه غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه و هم‌چنین ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم محاسباتی به‌صورت زیر انجام شد:

$$x = \frac{\text{برحسب غلظت } \mu M \times ۲۷۱/۵}{۱۰۰۰۰۰۰} \quad (۱)$$

به‌دلیل توزین سخت هزارم گرم با ترازوی آزمایشگاه محلول

استوک ۱۰۰x تهیه شد. از استوک ۱۰ mL برداشته و با آب مقطر به حجم یک لیتر رساندیم.

$$x = \frac{\text{برحسب غلظت } mM \times ۲۰۱/۳۲}{۱۰۰۰} \quad (۲)$$

نمونه‌برداری از تمام گلدان‌ها ۸ و ۱۶ ساعت پس از محلول‌پاشی صورت گرفت. به‌منظور بررسی مقدار کمی پروتئین ابتدا استخراج پروتئین کل از برگ با استفاده از روش گای و همکاران (۷) انجام شد و سپس از روش برادفورد (۳) جهت تعیین غلظت پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر استفاده گردید. بعد از استخراج پروتئین‌ها و تعیین مقدار کمی آن‌ها به مقدار 1 mg از هر نمونه پروتئینی برداشته و با بافر نمونه مخلوط شده و سپس در SDS-PAGE ۱۲٪ مورد بررسی قرار گرفتند. پروتئین‌های استخراجی در بعد اول الکتروفورز با استفاده از دستگاه Bio Rad IEF CELL براساس بار الکتریکی با استریپ cm ۱۷ و pH = ۴ - ۷ به‌روش دمروال و همکاران (۵) و در مرحله دوم با استفاده از دستگاه SDS-PAGE ۱۲٪ به‌روش لاملی و همکاران (۱۶) با یک‌سری تغییرات صورت گرفت. به این صورت که محلول جدا کننده به داخل فضای بین دو شیشه ریخته شد، بعد از انعقاد ژل تا ارتفاع نیم سانتی‌متری از بالا ژل متراکم‌کننده اضافه شد. دستگاه الکتروفورز ابتدا روی ۳۰ میلی‌آمپر قرار داده شد تا پروتئین‌ها به‌طور کامل به داخل ژل بالایی نفوذ کند، پس از وارد شدن پروتئین‌ها به داخل ژل پایینی از ۴۰ میلی‌آمپر استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی لکه‌های پروتئینی از Coomassie Brilliant Blue (G-250)استفاده شد. محلول‌ها به‌ترتیب شامل تثبیت‌کننده (متانول ۴۰٪، اسید اسیتیک ۱۰٪ و آب دیونایز ۵۰٪)، محلول رنگ‌آمیزی (۲۵ گرم آمونیوم سولفات، ml ۲۵ اتانول، ۰/۳ گرم کوماسی‌بریلیانت بلو G-250، ml ۲۵ اسید فسفریک ۸۵٪ (v/v)) و محلول رنگ‌بری (آب مقطر ml ۲۵۰) بودند.

استخراج پروتئین با استفاده از روش دمروال و همکاران (۵) با یک‌سری تغییرات انجام شد که شامل مراحل زیر بود: ۱- مرحله استخراج با محلول تری‌کلرو استیک اسید و استون و ساتریفیوژ عصاره پروتئین به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴C و rpm ۱۳۰۰۰ ۲- مرحله شستشو با محلول استون و مرکاپتواتانول که به‌منظور برطرف کردن آلودگی‌های غیر پروتئینی موجود در نمونه سه‌بار انجام گرفت ۳- در مرحله نهایی برای استخراج پروتئین، به‌ازای هر mg ۱ نمونه پودری به‌دست آمده، µl ۵۰ محلول لیزکننده اضافه شد. سپس به‌مدت min ۱۵ در دمای ۱۵°C با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جدا شده در حقیقت عصاره پروتئینی است که پس از تعیین غلظت به‌روش برادفورد به‌منظور سنجش کیفی به‌روش الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید. بعد اول الکتروفورز شامل سه مرحله rehydration، focusing با برنامه دستگاه ۹ مرحله‌ای و متعادل‌سازی صورت گرفت و بعد دوم از روش SDS-PAGE ۱۲٪ استفاده شد. بعد از انجام بعد دوم از روش رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو که در روش SDS-PAGE به‌کار برده شده بود استفاده گردید. بعد از این مرحله از ژل‌ها اسکن گرفته شد و تصاویر ژل دو بعدی توسط نرم‌افزارهای TotalLab، Top Spot و Progensis Samespots software vers.2.0 بر پایهٔ بار الکتریکی (نقطه ایزوالکتریک یا pI) و اندازه (جرم مولکولی نسبی یا M_r) ارزیابی شدند. مقایسه لکه‌های پروتئینی از طریق آنالیز آماری T انجام گرفت که ۲۱ لکهٔ حاصل، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. لکه‌های پروتئینی حاصل با طیف‌سنجی جرمی MS/MS تجزیه شدند.

تجزیه‌های آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، SPSS ارزیابی شدند و به‌منظور بررسی نحوهٔ بیان پروتئین از نرم‌افزارهای Uvi doc، Total Lab و Top spot بر پایهٔ بار الکتریکی (نقطه ایزوالکتریک یا pI) و اندازه (جرم مولکولی نسبی یا M_r)، استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. به‌دلیل معنی‌داری اثرات سه جانبه و برای تفسیر قابل درک برای خواننده یکی از عامل‌ها را ثابت در نظر گرفته و اثرات دو جانبه رقم × زمان بررسی گردید به‌همین دلیل از روش slice

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

برش‌یافته در نرم‌افزار SAS استفاده کردیم.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر سه جانبهٔ فلز سنگین × رقم × زمان نمونه‌برداری بر روی میزان پروتئین کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). بنابراین از روش برش داده در بررسی اثرات متقابل دوگانه استفاده گردید (جدول ۲). با توجه به اینکه اثرات سه جانبه معنی‌دار بود، در رسم جدول از آنالیزهای حاصل از روش slice با استفاده از نرم‌افزار SAS استفاده کردیم تا اطلاعات داده شده در جدول برای خواننده گویا و قابل درک باشد. مقایسه میانگین صفت میزان پروتئین کل در رقم گنبد در هر دو بازهٔ زمانی افزایش معنی‌داری را در سطوح فلز سنگین نسبت به شاهد نشان داد. در رقم تجن پس از ۸ ساعت از محلول‌پاشی با افزایش غلظت فلزات سنگین اختلاف معنی‌داری در میزان پروتئین کل نسبت به حالت کنترل مشاهده شد، اما پس از ۱۶ ساعت از اعمال تنش با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه و کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین کل نسبت به شاهد ملاحظه گردید. بیشترین میزان پروتئین کل (۰/۳۴۹ mg/g) مربوط به رقم تجن و ۸ ساعت پس از محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه و کمترین میزان مربوط به شاهد (۰/۰۲۱ mg/g) می‌باشد.

گیاه در جهت مقابله با تنش فلزات سنگین شروع به سنتز پروتئین‌های دفاعی کرده و متابولیت‌ها و آنزیم‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها را درگیر می‌سازد. کادمیوم شباهت زیادی با لیگاندهای نیتروژن و پروتئین‌های گوگردی دارد و به‌همین دلیل با تشکیل پیوند و اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها موجب مهار و اختلال در ساختار آنها و کنترل احیایی سلول می‌گردد، هم‌چنین موجب تخریب کانال‌های یونی و نشت یونی می‌شود (۲۰). کاهش میزان پروتئین کل در رقم تجن با مدت زمان طولانی‌تر (۱۶ ساعت) تحت تنش کادمیوم و جیوه ممکن است به‌علت تجمع بیش از حد

جدول ۱. تجزیه واریانس پروتئین کل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم و جیوه و زمان نمونه‌برداری در دو رقم گندم

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		پروتئین کل
رقم	۱	۰/۰۶۷**
فلز سنگین	۶	۰/۰۵۹**
زمان	۱	۰/۱۱۶**
رقم × فلز سنگین	۶	۰/۰۳۲**
رقم × زمان	۱	۰/۰۰۳ns
فلز سنگین × زمان	۶	۰/۰۱۷**
رقم × فلز سنگین × زمان	۶	۰/۰۲۶**
خطا	۵۶	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (CV)		۱۴/۴

ns، **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪

این فلزات و اتصال آنها با گروه‌های سولفیدریل پروتئین بوده که موجب تخریب ساختارهای پروتئینی و در نهایت منجر به آزادسازی رادیکال‌های آزاد شده باشد. رادوتیک و همکاران (۲۳) در تحقیقات خود نشان دادند که وجود فلزات سنگین و به‌ویژه کادمیوم منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش تولید پراکسید هیدروژن در ذرت می‌گردد که به مولکول‌های زیستی صدمه می‌زنند. نتایج تحقیق آنان نشان داد که حضور کادمیوم موجب کاهش میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای شد که علت آن از بین رفتن ساختارهای پروتئینی به‌دلیل حضور رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در هر دو رقم گنبد و تجن افزایش غلظت پروتئین کل تحت تأثیر کادمیوم و جیوه در هر دو بازهٔ زمانی ممکن است به‌دلیل افزایش سنتز برخی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، هم‌چنین سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای درگیر در سیستم دفاعی سلول در برابر یون‌ها (متالوتیونین‌ها و فیتوکلاتین‌ها) باشد. مطالعات انجام گرفته توسط کریمی و نوجوان (۱۵) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم پروتئین‌های محلول برگ در عدس افزایش می‌یابد، که

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

جدول ۲. مقایسه میانگین اثرات سه‌جانبه رقم×فلز سنگین ×زمان برای میزان پروتئین کل (mg/g)

رقم × زمان (ساعت)	غلظت فلزات سنگین	میانگین صفت پروتئین کل
گنبد × ۸	$HgCl_2$ (µM)	۰/۰۲۱^{l}
		۰/۰۵۲^{kl}
		۰/۲۷۱^{b}
	$CdCl_2$ (mM)	۰/۱۴۶^{efgh}
		۰/۲۰۶^{cd}
		۰/۱۲۴^{fghi}
		۰/۱۵۴^{efg}
گنبد × ۱۶	$HgCl_2$ (µM)	۰/۰۲۱^{l}
		۰/۰۳۰^{l}
		۰/۱۱۸^{fghi}
	$CdCl_2$ (mM)	۰/۰۲۶^{l}
		۰/۲۳۰^{bc}
		۰/۱۰۵^{hij}
		۰/۰۴۹^{kl}
تجن × ۸	$HgCl_2$ (µM)	۰/۱۲۶^{fghi}
		۰/۱۱۰^{ghi}
		۰/۱۱۸^{fghi}
	$CdCl_2$ (mM)	۰/۱۲۳^{fghi}
		۰/۳۴۹^{a}
		۰/۱۶۵^{def}
		۰/۱۸۰^{de}
تجن × ۱۶	$HgCl_2$ (µM)	۰/۱۲۶^{fghi}
		۰/۱۶۳^{def}
		۰/۱۰۳^{hij}
	$CdCl_2$ (mM)	۰/۰۸۵^{ijk}
		۰/۰۵۸^{jkl}
		۰/۱۸۵^{cde}
		۰/۱۰۴^{hij}

میانگین‌هایی با حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪، براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند.

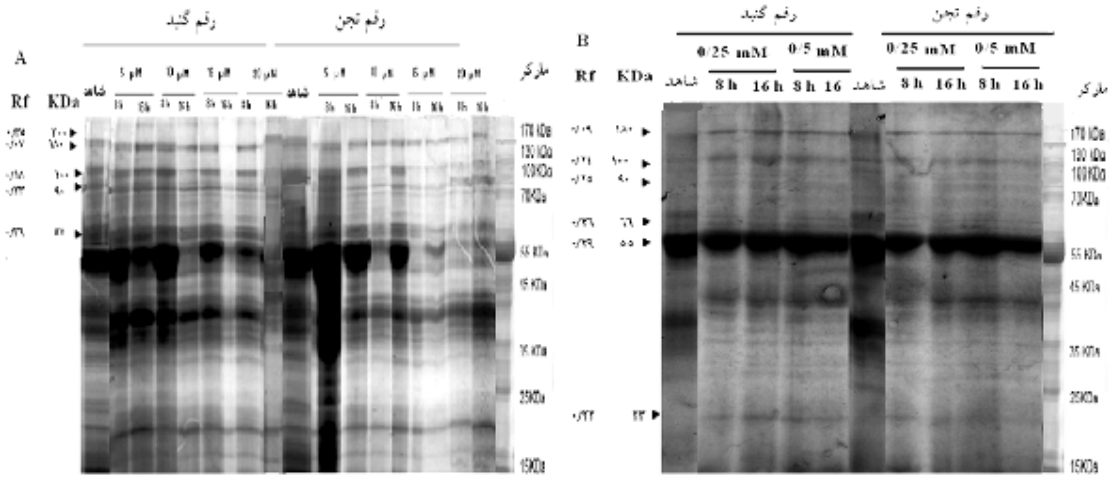
این افزایش می‌تواند بیانگر افزایش آنزیم‌های درگیر در مکانیسم دفاعی گیاه و پلی‌پپتیدهای آنتی‌اکسیدان باشد.

ارزیابی الگوهای الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های کل محلول برگی

پروتئین‌های محلول برگی گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد هریک از ارقام، جهت تعیین وزن مولکولی پلی‌پپتیدها به درون چاهک تزریق شدند. تعیین وزن مولکولی از روی میزان Rf (Release factor) و هم‌چنین نشانگر مورد استفاده توسط نرم‌افزار Uvi DocMW انجام گرفت. نتایج نشان داد برگ گیاهچه‌های گندم ارقام گنبد و تجن پلی‌پپتیدی با وزن ملکولی ۲۰۰ kDa (با غلظت کم) تولید کرد که در شاهد مشاهده نگردید (شکل ۱). در رقم گنبد تحت تیمار کلرید جیوه ۵ µM در طی ۸ و ۱۶ ساعت، ۱۰، ۱۵و ۲۰ µM در طی ۱۶ ساعت پلی‌پپتیدهایی با وزن ملکولی ۵۷، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۸۰ kDa (کیلو دالتون) دارای بیان بیشتری نسبت به حالت کنترل بودند، اما در رقم تجن به‌جز غلظت ۵ µM (۸ و ۱۶ ساعت) و ۱۰ µM (۱۶ ساعت) ۴ نوع پلی‌پپتید با وزن ملکولی ۵۷ kDa، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۸۰ بیان کمتری نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل 1A). برگ گیاهچه‌های گندم ارقام گنبد و تجن تحت تیمار کلرید کادمیوم پلی‌پپتیدهایی با وزن ملکولی ۲۳، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۸۰ kDa (با غلظت کم) تولید کرده که در شاهد مشاهده نشد. هم‌چنین تحت تأثیر کلرید کادمیوم ۰/۲۵ و ۰/۵ mM، (۸ و ۱۶ ساعت) پلی‌پپتیدهایی با وزن ملکولی ۵۵، ۶۶، ۱۰۰ و ۱۸۰ kDa (کیلو دالتون) بیان بیشتری داشتند، اما در رقم تجن جز غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ mM، (۸ ساعت) ۲ نوع پلی‌پپتید با وزن ملکولی ۶۶ و ۹۰ kDa بیان کمتری داشت (شکل 1B).

پروتئین ۲۳-۵۷ کیلو دالتون احتمالاً مربوط به خانواده پروتئینی Heat Shock Protein70 می‌باشند. پروتئین شوک گرمایی ۲۳ کیلو دالتون در کلروپلاست تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی شناسایی شده است و ژن‌هایی را فعال می‌کند که این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کُد می‌کنند که قبل از رونویسی به

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]



شکل ۱. تفکیک پروتئین‌های کل محلول در برگ‌های گندم رقم گنبد و تجن تحت تیمار کلرید جیوه (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ µM) و شاهد (A) و هم‌چنین تحت تیمار کلرید کادمیوم (۰/۲۵ و ۰/۵ mM) و شاهد در زمان‌های ۸ و ۱۶ ساعت بعد از تیمار (B)

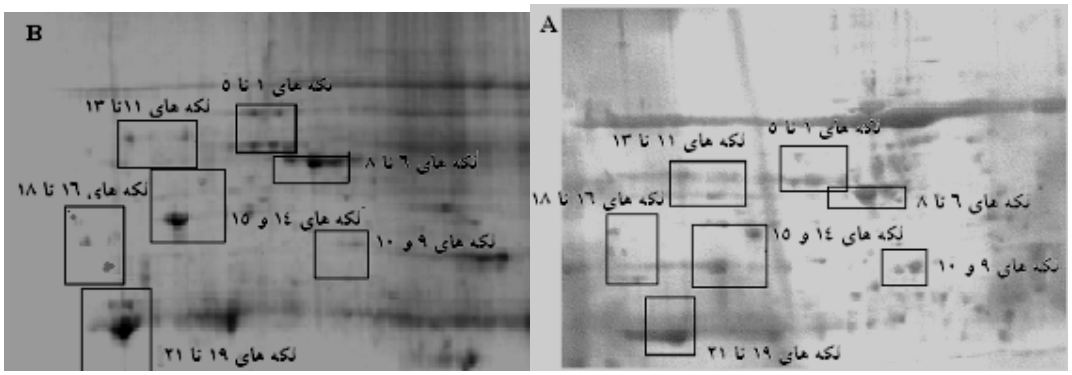
کلروپلاست‌ها منتقل می‌شوند و در طول واکنش به استرس افزایش می‌یابد. HSP70 یک پروتئین سنتزی متداول در تمام گونه‌ها بوده و در انتقال پروتئین‌ها، ممانعت از اجتماع پروتئینی و کمک به فولد شدن پروتئین و نیز تنظیم رونویسی مشارکت دارد. HSP70 استرومایی، نقش مهمی را در ورود پروتئین به درون کلروپلاست برعهده دارد و یکی از ویژگی‌های مشترک در مکانیسم‌های انتقال از عرض غشای شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری، مشارکت پروتئین شوک حرارتی می‌باشد (۲۵). پروتئین ۶۶ کیلو دالتون احتمالاً مربوط به خانواده ATP synthase α subunit می‌باشد. زیر واحد α متعلق به ATP سنتاز هم در کلروپلاست‌های مزوفیل و هم غلاف آوندی پایه به‌وسیله شدت نور تغییر می‌یابد، ولی این تغییر در گونه‌های مختلف متفاوت است (۲۶). پروتئین ۹۰-۱۸۰ کیلو دالتون مربوط به خانواده Aspartate Aminotransferase می‌باشد بیشتر فعالیت کامل آسپارتات آمینوترانسفراز از برگ‌های گندم، ناشی از فعالیت در کلروپلاست و سیتوپلاسم می‌باشد. آسپارتات آمینوترانسفراز گیاهی، واکنش برگشت‌پذیر ترانس آمیناسیون بین L- آسپارتات و ۲- اگزوگلوتارات را کاتالیز کرده و اگزالواستات و L- گلوتامات را ایجاد می‌کند. محدوده وسیعی از عملکردهای متابولیکی به آسپارتات آمینوترانسفراز نسبت داده می‌شود. ایزوآنزیم‌های این پروتئین در سیتوپلاسم، میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم سلول‌های برگ اسفناج شناسایی شدند (۲۸).

پروتئین ۲۰۰ کیلو دالتون مربوط به خانواده LEA می‌باشند که با تنش Dehydration القاء می‌شوند و از نظر اندازه از ۹ کیلو دالتون برای Wsi724 برنج تا ۲۰۰ کیلو دالتون برای WCS200 گندم متغیرند. در ثبات غشاءها و حفظ ماکرومولکول‌ها نقش دارند (فعالیتی شبیه به چاپرون‌ها دارند). این پروتئین‌ها اولین بار با تجمع در طی فرآیند بلوغ بذر در پنبه شناسایی شدند (۹). در کل پروتئین‌های شناسایی شده، معمولاً در اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی بیان می‌گردند.

تغییرات پروتئین‌ها در الکتروفورز دو بعدی

به‌منظور بررسی نحوه بیان پروتئین‌ها در اثر تیمار با ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم در مقایسه با شاهد از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید، به این جهت ابتدا نقشه بیان پروتئین‌ها در شرایط تیمار و کنترل تهیه گردید (شکل ۲) و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای Top spot و TotalLab یک‌سری از پروتئین‌هایی که بیانی بیش از ۳ برابر را نسبت به کنترل نشان داده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳ و جدول ۳).

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]



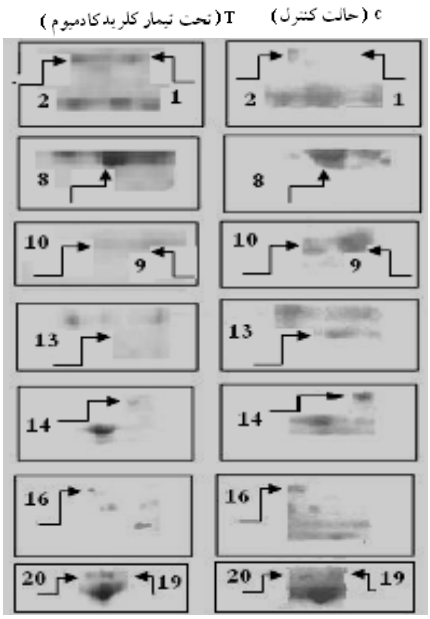
شکل ۲. نقشه پروتئوم بافت برگ گندم رقم گنبد. تحت تیمار کلرید کادمیوم با غلظت ۰/۵ mM و زمان نمونه‌برداری بعد از ۱۶ ساعت (B) و نقشه پروتئوم بافت برگ گندم شاهد (A)

نکته حائز اهمیت این بود که این پروتئین‌ها جزء پروتئین‌های پایدار در اثر کادمیوم بوده و بیان بالایی را نشان می‌دهند.

مقایسه لکه‌های گیاهان تیمار شده با گیاهان شاهد (شکل ۳) نشان داد که، لکه‌های ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴ و ۱۶ متعلق به پروتئین‌هایی هستند که در گیاهان تیمار شده و شاهد به‌صورت مشترک وجود دارند ولی در حالت تیمار شده نسبت به شاهد کاهش بیان و لکه‌های ۱، ۲، ۸، ۱۹ و ۲۰ نسبت به شاهد بیان بیشتری نشان دادند. پروتئین‌هایی که تحت تیمار کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار افزایش بیان نشان دادند. پروتئین‌های تحت تیمار کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار شامل: ۰ Heat Shock Protein7، Glutathione- s transferase، ATP synthase CF1 beta subunit، ToxA binding protein 1، ATP-synthase، Rubisco و phosphoglycerate kinase بودند.

پروتئین‌هایی که تحت تیمار کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار افزایش بیان نشان دادند: ۱- پروتئین Heat Shock Protein70 مربوط به لکه شماره ۱ بود، که یک پروتئین سنتزی متداول در تمام گونه‌ها بوده و در انتقال پروتئین‌ها، ممانعت از اجتماع پروتئینی و کمک به فولد شدن پروتئین و نیز تنظیم رونویسی نقش دارد. وظیفه این پروتئین همراه با چاپرون‌های آن، پروتئین‌های دومین J و فاکتورهای مبادله‌ای نوکلئوتیدها، در یک چرخه عملکردی، اتصال و رهاسازی سوبسترا با هیدرولیز ATP همراه است (۲۵). ۲- ATP-synthase مربوط به لکه شماره ۲، یک پروتئین ۴۰۰ kDa می‌باشد که مقدار فراوانی انرژی برای فرآیندهای زیستی مهیا می‌کند (۱۷). با توجه به اینکه گیاه مقدار ATP زیاد برای رشد، نمو و مقابله با استرس نیاز دارد، بنابراین پروتئین ATP سنتاز به‌عنوان یک تولیدکننده ATP به‌حساب می‌آید (۱۲). ۳-گلوتاتیون s ترانسفرازها (Glutathione_ s transferase) مربوط به لکه شماره ۸ می‌باشد که گروهی از آنزیم‌های دایمری چند عملکردی می‌باشند و در سم‌زدایی آنزیمی، رشد و نمو سلولی (۲۱) و متابولیسم‌های داخلی شامل تنش اکسیداتیو، اتصال فلاونوئیدها و تنظیم آپوپتوزیز دخالت دارند (۱۴). ۴- احتمالاً مربوط به پروتئین ATP synthase CF1 beta subunit می‌باشد که لکه شماره ۱۹ است. زیر واحد β ایزوله شده از ATP سنتاز CF1 یک منطقه اتصالی نوکلئوتیدی دارد که با عملکرد فرضی این زیر واحد در اتصال به نوکلئوتید و کاتالیز، سازگار است. CF1 متشکل از پنج زیر واحد α_3، β_3، γ، δ، ε است و انتقال پروتون را با سنتز ATP همراه می‌کند. از آنجا که به ازای هر جفت الکترونی که از کل زنجیره عبور می‌کند ۹ پروتون از لومن خارج می‌شود، بنابراین امکان تولید ۳ مولکول ATP وجود دارد (۱۰). ۵- توکسین پروتئینی Prt ToxA مربوط به لکه شماره ۲۰ می‌باشد و منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژنی در رقم‌های گندم حساس به توکسین می‌شود. ToxA binding protein 1 در القای مرگ سلولی نقش دارد (۱۸). این پروتئین با تیمار کلرید کادمیوم

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]



شکل ۳. موقعیت برخی از لکه‌های پروتئینی در گندم رقم گنبد تحت تیمار کلرید کادمیوم ۰/۵mM (T) نسبت به شاهد (C)

افزایش بیان پیدا کرد. بنابراین احتمال دارد به‌عنوان یک تنظیم‌کننده انفجار اکسیداتیو تولید شده توسط کادمیوم تحت تأثیر شرایط تنش زیستی و غیر زیستی عمل کند.

پروتئین‌هایی که تحت تیمار کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار کاهش بیان نشان دادند: ۱-آنزیم‌های ایزوسیترات دهیدروژناز (لکه شماره ۹) ۲- مالات دهیدروژناز (لکه شماره ۱۰) ۳- تریوز فسفات ایزومراز (لکه شماره ۱۳)، ۶ فسفو گلیکونات دهیدروژناز، گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز، فروکتوز بیس فسفات و کوینون اکسی‌ردوکتاز آنزیم‌های کلیدی چرخه گلیکولیز و چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید می‌باشند. این امر نشانگر این موضوع می‌باشد که تیمار کلرید کادمیوم سطح گلوکز، فروکتوز و ساکارز و فراوانی سایر آنزیم‌های مرتبط با تنش‌های زیستی و غیر زیستی را افزایش می‌دهد (۴). ۴- Rubisco (لکه شماره ۱۴): ریبولوز ۱-۵- بیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز یا همان روبیسکو یک آنزیم درگیر در مرحله اصلی جذب کربن می‌باشد. در این فرآیند کربن دی‌اکسید اتمسفری به‌وسیله گیاه به مولکول‌های غنی از انرژی مثل گلوکز تبدیل می‌شود و از لحاظ شیمیایی کربوکسیلاسیون ریبولوز ۱ -۵- بیس فسفات را انجام می‌دهد (۶). ۵- phosphoglycerate kinase (لکه شماره ۱۶): فسفوگلیسیرات کیناز آنزیمی است که انتقال قابل برگشت گروه فسفات را از ATP به ۳- فسفوگلیسیرات کاتالیز کرده و منجر به تولید فسفوگلیسیرات می‌شود. مانند همه کینازها، این آنزیم یک ترانسفراز می‌باشد. گلیکونئوژنز و چرخه کلوین که مسیرهای آنابولیک می‌باشند، از واکنش رفت که ATP مصرف می‌کند استفاده کرده و گلیکولیز که یک مسیر کاتابولیکی می‌باشد از واکنش عکس برای تولید ATP استفاده می‌کند (۳۰). پروتئین‌هایی که نقش آنها در فرآیند حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر خسارت تنش به‌خوبی مشخص شده است عبارتند از: چاپرون‌ها و پروتئین‌های تنظیم اسمزی، کانال‌های یونی، ترنسپورترها و پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانت و سم‌زدایی بیان این پروتئین‌های عملکردی به‌شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود. مشخص شده است که بسیاری از خانواده‌های عوامل رونویسی در مسیر پیام‌رسانی ناشی از تنش در گیاهان نقش دارند. در بین آنها پروتئین‌های bZIP، ABRE، MYB، MYC، WRKY، DREB، NAC، MAPKs، GLP، RLK10، PBS1، WAK4، SRLK، ERECTA و WELP1 بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی دارند. بنابراین شناسایی ژن‌های جدید از جمله عوامل رونویسی، تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش غیرزیستی و درک بهتر از نقش کارکردی آنها در انطباق با تنش، اساس راه‌کارهای مهندسی بهتر را با هدف بهبود تحمل به تنش فراهم می‌آورد (۲۴). کیم و لی (۱۳) از روش پروتئومیکس به‌منظور شناسایی پروتئین‌های القاءشونده در معرض کادمیوم کلراید در ریشه‌های برنج استفاده کردند. در این تحقیق بیش از ۶۰۰ لکه پروتئینی از طریق الکتروفورز دو بعدی شناسایی شدند. از بین این پروتئین‌ها، ۲۷ پروتئین در واکنش به کادمیوم بیان‌شان بیش از ۱/۵ برابر تغییر

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

جدول ۳. لکه‌های پروتئینی شناسایی شده از رقم‌های شاهد و تیمار شده با کلرید کادمیوم

Spot[a]	Protein ID[b]	Mw kd[c]	pI[d]	predict ID[e]
۱	heat shock protein 70 [Triticum aestivum]	۳۹۷۳۷	۴/۵۶	gi۶۶۷۰۹۳۱
۲	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic [Triticum aestivum]	۲۷۴۲۴	۸/۸۴	gi۱۳۱۳۹۴
۳	Putative hydrolase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	۴۱۳۹۳	۹/۱۷	gi۱۴۰۹۱۸۶۲
۴	6 phosphoglucanate dehydrogenase, decarboxylating- like isoform 1	۵۲/۸۶	۵/۶۱	gi۳۵۷۱۱۰۶۹۲
۵	phosphoglycerate kinase [Isochrysis galbana]	۵۶۲۹۲	504	gi۵۸۶۱۲۴۷۷
۶	GSH-dependent dehydroascorbate reductase [Triticum aestivum]	۲۳۴۵۷	۵/۸۸	gi۲۸۱۹۲۴۲۱
۷	chloroplast oxygen-evolving enhancer protein 1 [Leymus chinensis]	۳۴۷۱۹	۶/۰۸	gi۱۴۷۹۴۵۶۲۲
۸	Glutathione_ s transferase 1	۲۵/۹۳	۵/۲۹	gi۲۳۲۱۹۶
۹	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5	۳۹/۹۷	۶/۳۳	gi۳۵۷۱۳۲۴۵۶
۱۰	Malate dehydrogenase 1	۳۵/۰۶	۸/۵۴	gi۱۲۵۵۹۳۶۶۰
۱۱	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar group)]	۷۳۶۷۶	۵/۱۲	gi۲۸۱۹۲۴۲۱
۱۲	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Lophopyxis maingayi]	۵۲۳۹۳	۶/۴۶	gi۵۵۷۹۲۷۹۵
۱۳	Triosephosphate isomerase	۳۱/۹۶	۶/۰۰	۱۱۷۴۷۴۵gi
۱۴	ribulose-1,5-bisphosphatev carboxylase /oxygenase (Rubisco), small subunit [Triticum aestivum]	۱۹۷۸۷	۸/۸۱	۴۰۹۰۲۹۱gi
۱۵	amino acid selective channel protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	۱۵۲۲۱	۶/۵۶	۳۷۵۸۸۲۷gi
۱۶	phosphoglycerate kinase [Isochrysis galbana]	۵۶۲۹۲	۵/۰۴	gi۵۸۶۱۳۴۷۷
۱۷	amino acid selective channel protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	۱۵۲۲۱	۶/۵۶	۳۷۵۸۸۲۷gi
۱۸	Rubisco activase alpha form precursor [Deschampsia antarctica]	۵۱۳۸۱	۵/۹۶	۳۲۴۸۱۰۶۱gi
۱۹	ATP synthase CF1 beta subunit [Triticum aestivum]	۵۳۸۸۱	۵/۰۶	۱۴۰۱۷۵۷۹gi
۲۰	Ptr ToxA- binding protein 1	۳۲/۴۲	۹/۰۱	۳۸۵۷۰۲۶۱gi
۲۱	ATP synthase cF1 alpha subunit	۵۵/۳۲	۶/۱۱	۱۴۰۱۷۵۶۹gi

a) لکه‌های پروتئینی شماره‌گذاری شده بر روی ژل‌های دو بعدی گیاهان شاهد و تیمار شده با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار، b) نام پروتئین شناسایی شده، c) وزن مولکولی پروتئین پیش‌بینی شده، d) نقطه ایزوالکتریک پروتئین پیش‌بینی شده، e) شماره پروتئین در پایگاه‌های اطلاعات

یافته بود. از بین این پروتئین‌ها گلوکوناز، ساکارز سنتاز، پروتئین‌های انتقالی متصل به ATP، فروکتوز بیس فسفات آلدولاز، زیرواحدهای پروتئوزوم، کاهش بیان نشان دادند. برعکس آدنوزیل متیونین سنتاز، دی‌متیل آلانیلین مونواکسیژناز، گلوتاتیون ترانسفراز، چاپرون، پروتئین شوک گرمایی افزایش بیان داشتند، که این تحقیقات با نتایج به‌دست آمده ما در بعضی از پروتئین‌ها مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

بررسی بیان پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ۲ بعدی نشان داد که به‌طورکلی پروتئین‌هایی که در مقابله با کادمیوم و جیوه تغییر بیان دارند، در ارتباط مستقیم با سیستم دفاعی در مقابل تنش مانند لکه‌های ۱، ۲، ۸، ۱۴، ۱۹، ۲۰ می‌باشند که این پروتئین‌ها تحت تأثیر کادمیوم افزایش بیان نشان دادند. کادمیوم و جیوه با میزان بیان پروتئین‌های دخیل در متابولیسم پروتئین،

تولید انرژی و انتقال علامت در ارتباط می‌باشد. افزایش بیان این پروتئین‌ها دراثر کادمیوم و جیوه در برگ‌های گندم احتمالاً به‌دلیل تأمین انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های دفاعی در برابر تنش می‌باشد و میزان بیان بیشتر در رقم مقاوم به‌دلیل بیشتر بودن فعالیت دفاعی انجام شده در این رقم است، این مسئله نشانگر این قضیه است که این پروتئین‌ها جزء پروتئین‌های پایدار در اثر کادمیوم و جیوه بوده و بیان بالایی را نشان می‌دهند.

منابع مورد استفاده

1. Amani, A. 2008. Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, proline content and phosphoenol pyruvate carboxylase activity in *Triticum aestivum* seedlings. *Australian Journal of Science* 2: 57-62.
2. Aflatoni, M. M. 2010. Technique and Interpretation of the Electrophoretic Types. Publication Tehran University. Tehran.
3. 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.
4. Chan, Z., Q. Wang, X. Xu, X. Meng, G. Qin, B. Li and S. Tian. 2008. Functions of defense- related proteins and dehydrigenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics* 8: 4791-4797.
5. Damerval, C., D. Vienne, M. Zivy and H. Thiellement. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
6. Feller, U., I. Anders and T. Mae. 2008. "Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated". *Journal of Experimental Botany* 59: 16-24.
7. Guy, G. R., X. Cao, S. P. Chua and Y. H. Tan. 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.
8. Grill, E., S. Mishra, S. Srivastava and R. D. Tripathi. 2007. Role of phytochelatins in phytoremediation of heavy metals. *Environmental Technology* 141-146.
9. Hussain, S. S., M. T. Iqbal, M. A. Arif and M. Amjad. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. *Biologia Plantarum* 55: 401-413.
10. Hopkins, W. G. and N. P. A. Huner. 2008. Introduction to Plant Physiology. Fourth Edition, John Wiley & Sons Inc. New York.
11. Isarankura, P., CH. Isarankura, K. Kasikun, K. Thipkeaw and V. Prachayasittikul. 2009. Proteomic profiling of *Escherichia Coli* in response to heavy metals stress. *European Journal of Oral Sciences* 679 -688.
12. Jonckheere, A. I., A. Jan, M. Smeitink, J. Richard and T. Rodenburg. 2012. Mitochondrial ATP syntheses: architecture, function and pathology, *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35: 211-225.
13. Kim, Y. and M. Lee. 2009. Proteomic analysis of differentially expressed proteins of rice in response to cadmium. *Journal of Biological Chemistry* 52: 428-436.
14. Kilili, K. G., N. Atanassova, A. Vardanyan, N. Clatot, K. Al-Sabarna, P. N. Kanellopoulos, A. M. Makris and S. C. Kampranis. 2004. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24540-24551.
15. Karimi, G. and M. Nojavan. 2007. Effect of cadmium chloride on growth parameters, proline, soluble sugars and proteins in lentil seedlings. *Iranian Journal of Research and Sazandegi Agronomy and Horticulture* 20: 46-51. (In Farsi).
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
17. McLean, M. D., D. P. Yevtushenko, A. Deschene, O. R. V. Cauwenberghe, A. Makhmoudova, J. W. Potter, A. W. Bown and B. J. Shelp. 2003. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root- knot nematode. *Molecular Breeding* 11: 277-285.
18. Manning, V. A., L. K. Hardison and L. Ciuffetti. 2007. Ptr Tox A interacts with a chloroplast- localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 168- 177.
19. Martinoia, E., M. Maeshima and H. E. Neuhaus. 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 58: 83-102.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]

20. Mishra, S., R. D. Tripathi, S. Dwivedi and S. T. Kumar. 2009. Thiol metabolism playsignicant role during cadmium detoxication by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology* 100: 2155-2161.
21. Moons, A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones* 72: 155-202.
22. Qureshi, M. I., S. Qadir and L. Zolla. 2007. Proteomics-based dissection of stress-responsive in plants. *Plant Physiology* 602: 139-164.
23. Radotic, K., T. Ducic and D. Mutavdzic. 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 44: 105-113.
24. Rahaee, M., M. Naghavi, H. Alizadeh, M. Mlbuby, S. Abdemishani, P. Schenk and G. Ping Zhou. 2010. The pattern of expression of MYB genes in wheat under short-term salinity and cold stress using quantitative RT-PCR approach. *Iranian Journal of Crop Science*. 41 (3): 446-433. (In Farsi).
25. Shi, A. X. and M. T. Steven. 2010. A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import in to chloroplasts in the moss physcomitrella patens. *American Society of Plant Biologists* 22: 205-220.
26. Stock, D., A. G. Leslie and J. E. Walker. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Crop Science* 286: 1700-1705.
27. Schneider, T., M. Schellenberg, S. Meye, F. Keller, P. Gehrig, Y. S. Lee, L. Eber, E. Martinoia and K. Riedel. 2009. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Journal of Proteomics* 9: 2668 - 2677.
28. Wilkie, S. E., R. Lambert and M. J. Warren. 1996. Chloroplastic aspartate amino transferase from Arabidopsis thaliana: an examination of the relationship between the structure of the gene and the spatial structure of the protein. *European Journal of Biochemistry* 319: 969-976.
29. Yang, L., D. Tian, Y. Luo, R. Zhang, C. H. Ren and X. Zhou. 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.
30. Zarafshan, A. S. 1991. History of the Discovery of the Chemical Elements, Publications and Training Islamic Revolution, Tehran, Iran. (In Farsi).
31. Zhang, X., X. Fan, C. Li and Z. Nan. 2010. Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in Achnatherum inebrians plants infected with Neotyphodium endophyte. *Plant Growth Regulation* 60: 91-97.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.18.19.4]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.18.233]