الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالـي و البحـث العلمـي

جــامعـة الإخوة منتوري قسنطينـة

كليـــة علـــوم الطبيعة و الحيـــاة
قسم البيولوجيا و علم البيئة النباتية

رقم الترتيب: ....
رقم التسلسل: ....

أطروحة دكتوراه في العلوم

تخصص: بيولوجيا و فسيولوجيا النبات

تحت عنوان:

دور الهرمونات النباتية ومضادات الأكسدة في تحمل القمح الصلب للملوحة

المترشح: فرشة عزالدين

تاريخ المناقشة : 16/مارس/2015

أمام لجنة المناقشة :

الرئيس: د. **باقـــة مبـارك** أستاذ التعليم العالي جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة

المشرف: د. **غروشة حسيـن** أستاذ التعليم العالي جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة

الممتحنين:

د. **بـدور لـيــلى** أستاذة التعليم العالي جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة

د. **حـــرزالله داود** أستاذ التعليم العـالي جامعة ف عباس سطيف1- سطيف

د. **يـحي ع الوهاب** أستاذ التعليم العـالي م الجامعي ع ح بوالصوف - ميلـــة

د. **حزمون الطاهر** أستاذ محاضـــــر جامعة 20 أوت 1955- سكيكـــدة

الموسم الجامعي 2015/2014

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالــي و البحـث العلمــي

جـــامعـة الإخوة منتوري قسنطينـة

كليـــة علـــوم الطبيعة و الحيـــاة قسم البيولوجيا و علم البيئة النباتية

رقم الترتيب: ....
رقم التسلسل: ....

أطروحة دكتوراه في العلوم

تخصص: بيولوجيا و فسيولوجيا النبات

تحت عنوان:

دور الهرمونات النباتية ومضادات الأكسدة في تحمل القمح الصلب للملوحة

المترشح: فرشة عزالدين

تاريخ المناقشة : 16/مارس/2015

أمام لجنة المناقشة :

الرئيس: د. **باقـــة مبـارك** أستاذ التعليم العالي جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة

المشرف: د. **غروشة حسيـن** أستاذ التعليم العالي جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة

الممتحنين:

د. **بـدور لـيـــلى**	أستاذة التعليم العالي	جامعة الإخوة منتوري- قسنطينـــة
د. **حـــرزالله داود**	أستاذ التعليم العـالي	جامعة ف عباس سطيف1- سطيف
د. **يـحي ع الوهاب**	أستاذ التعليم العـالي	م الجامعي ع ح بوالصوف - ميلـــة
د. **حزمون الطاهر**	أستاذ محاضـــــر	جامعة 20 أوت 1955- سكيكـــدة

الموسم الجامعي 2015/2014

التشكرات

الحمد لله على منه و فضله و على توفيقه و إحسانه... فله الحمد و له الشكر
و مصداقا لقول الرسول ﷺ (لا يشكر الله من لا يشكر الناس)
وكما قال أيضا (من صنع إليه معروف فقال لفاعله، جزاك الله خيرا فقد أبلغ في الثناء).

فلكل من أسدى إلي معروفا و لو من باب التشجيع شكري و عرفاني بالجميل و الله أسأل أن يجازيكم عني خير الجزاء... آمين

و أخص بالذكر

الدكتور حسين غروشة –أستاذ بجامعة قسنطينة 1 – على قبوله الإشراف على هذا العمل، على تواجده المستمر، على ثقته و دعمه ....

الدكتور Aldo Lagana و الدكتور Giuseppe Caruso، على التوالي أستاذ و أستاذ محاضر بجامعة لاسبينزا دي روما 1 –إيطاليا– اللذان أتاحا لي الفرصة لتعلم الكثير عن تقنيات البروتيوميك، فلهما مني كل التقدير و الاحترام على جميل صنيعهما و نبل أخلاقهما.

الدكتور محمد أشرف، أستاذ و عميد كلية العلوم الزراعية بجامعة إسلام أباد –باكستان– على كل التوجيهات و كلمات التشجيع التي ما فتئ يتحفني بها....

كما أتقدم بالشكر لكل من

الدكتور مبارك باقة –أستاذ بجامعة قسنطينة 1– لقبوله ترأس لجنة المناقشة
الدكتورة ليلى بدور –أستاذة بجامعة قسنطينة 1– على قبولها المشاركة في تقييم هذا العمل
الدكتور داود حرزالله –أستاذ بجامعة سطيف – و الدكتور عبد الوهاب يحي –أستاذ بجامعة ميلة –
و الدكتور الطاهر حزمون – أستاذ م بجامعة سكيكدة – على قبولهم مناقشة هذه الأطروحة و تكبد عناء السفر من أجل ذلك.

شكر خاص

إلى صديقي عياش العباسي على تقديم يد العون و تشجيعي

إلى كل من لم يرد ذكر اسمه .... شكرا

عزالدين

الإهداء

أهدي هذا العمـل

إلى

أمي الغالية رحمها الله

أبي العزيز حفظه الله

زوجتي قرة عيني

أبنائي الأعزاء سلسبيل

محمد ولي الدين و وسيم

شكرا على حبكم و إخلاصكم

عزالدين

((... البحث العلمي هو أن تطلع على كل ما يعرفه غيرك

و أن تفكر فيما لم يفكر فيه أحد غيرك...))

زنت جورجي

مكتشف الفيتامين ج (حمض الأسكوربيك)

حائز على جائزة نوبل في الفسيولوجيا و الطب سنة 1937.

مقالات أو مداخلات ذات صلة بالأطروحة

1. **Fercha, A.**, Gherroucha, H., & Baka, M. (**2011**). Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, 7(1), 27-37.
2. **Fercha, A.** (**2011**). Some Physiological and Biochemical Effects of NaCl Salinity on Durum Wheat (Triticum durum Desf.). **Advances in Biological Research**,5(6), 315-322.
3. **Fercha, A.,** Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Gherroucha, H., Samperi, R., ... & Lagana, A. (**2013**). Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. **Journal of proteomics**, 91, 486-499. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.010. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439191300451X (IF= 3.93)

4. **Fercha, A.**, Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., & Laganà, A. (**2014**). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. **Journal of proteomics**. 108, 238–257 doi:10.1016/j.jprot.2014.04.040. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914002656 (IF= 3.93)

5. **Fercha, A.,** & Gherroucha, H. (**2014**). The role of osmoprotectants and antioxidant enzymes in the differential response of durum wheat genotypes to salinity. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 87. 74-79. doi: 10.5073/JABFQ.2014.011 http://pub.jki.bund.de/index.php/JABFQ/article/view/2481 (IF= 0.8)

6. **Fercha A et al., (2014).** Shotgun proteomic analysis of ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salinity conditions (Abstract). **J Biotechnol Biomater**, 3 (5) 272-311; http://dx.doi.org/10.4172/2155-952X.S1.029

قائمة المختصرات

ABA	Abscissic Acid
AGP	Ascorbate + gibberellin primed seeds
AOX	Antioxidants
AP	Ascorbate primed seeds
APX	Ascorbate peroxidase
AsA	Ascorbic acid
BSA	Bovine serum albumin
CAR	Carotenoids
CAT	Catalase
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
CL	Coleoptile length
DW	Dry weight
FGP	Final germination percentage
FW	Fresh weight
GA_3	Gibberellic acid
GAs	Gibberellins
GP	Gibberellin primed seeds
GR	Glutathione reductase
H2O2	Hydrogen peroxide
HP	Hydro or water primed seeds
LPO	Lipid peroxidation
LSD	Last significant deference
MDA	Malondialdehyde
MGT	Mean germination time
OA	Osmotic adjustment
POX	Peroxidase
PRO	Proline
RL	Radicle length
ROS	Reactive oxygen species
RWC	Relative water content
SOD	Superoxide dismutase
SPROT	Soluble proteins
STI	Salt tolerance index
TBA	Thiobarbituric acid
TW	Turgid weight
UP	Unprimed seeds
VI	Vigor index

قائمة الأشكال

التعيين	الصفحة
الفصل الأول	
الشكل 1. توزيع الأراضي المتضررة بالملوحة عبر العالم	02
الشكل 2. تراكم الأملاح بعد عملية الري الزراعي، خصوصا في المناطق القاحلة و مرتفعة الحرارة	03
الشكل 3. نسبة الأراضي المتضررة من المالوحة إلى النسبة الكلية للأراضي المسقية	03
الشكل 4. نموذج المرحلتين لتأثير الملوحة على نمو النباتات السكرية	04
الشكل 5. صور مجهريه لقمم جذور القمح الصلب النامية في غياب أو وجود NaCl	05
الشكل 6. فليات الثلاثة لمقاومة النباتات للملوحة	06
الشكل 7. رسم بياني يوضح عمل المواد المذابة المتوافقة	07
الشكل 8. بنية بعض الأسموليتات	08
الشكل 9. مسار الغلوتامات و المسارات البديلة لتخليق البرولين في النباتات	08
الشكل 10. موجز لطرق نقل البوتاسيوم و الصوديوم و مسارات نقل الإشارة المشاركة في تنظيم ذلك	11
الشكل 11. نظام نقل الإشارة SOS و تدخله في تنظيم امتصاص، توزيع و استبعادها أيونات Na^+ من الخلايا	13
الشكل 12. العلاقات التطورية بين جينومات أنواع مختلفة من القمح المزروع والبري	21
الشكل 13. تدجين الحبوب.	21
الشكل 14. إنتاج القمح وتوزيع زراعته عبر العالم (2015/2014)	22
الشكل 15. مختلف أقسام بذرة القمح	23
الشكل 16. الموضع، الدور و الفوائد الصحية لمختلف مكونات بذور القمح (صمم هذا الشكل بالاعتماد على نتائج دراسات أجريت على أكثر من 150 نمط وراثي)	24
شكل 17. عدد المقالات التي نشرت في الخمس سنوات الماضية و التي اهتمت باستجابة نبات القمح للملوحة	25
الشكل 18: بنية بذرة القمح و إنباتها.	28
الشكل 19. تعاقب أحداث إنبات البذور و نمو البادرات.	30
الشكل 20. العوامل الداخلية المتحكمة في بزوغ الجذير	31
الشكل 21. تعبئة مدخرات البذرة أثناء الإنبات	32
الشكل 22. نموذج مقترح لتفسير التداخلات المحتملة بين H_2O_2، NO، ABA و GA في تنظيم سكون و إنبات البذور في الظروف العادية أو المجهدة ملحيا قبل أو بعد المعاملة بواسطة حمض الأسكوربيك.	35
الشكل 23. نموذج عام لشبكات نقل الإشارة في النبات المجهد	38
الشكل 24. رسم توضيحي لمراحل الإنبات و تحفيز البذور	42
الشكل 25. مراحل الإنبات و علاقتها بامتصاص الماء لوصف التغيرات الحاصلة أثناء تحفيز البذور.	42
الشكل 26. توازن الأكسدة الخلوية	43
الشكل 27. الآثار السلبية لإجهاد الأكسدة على الوظائف الخلوية	44

الفصل الثاني

الشكل 1. فصل الجنين عن باقي البذرة. 54

الشكل 2. التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- حركية الإنبات، (ب)- نسبة الإنبات النهائية (%)، (ج)- متوسط زمن الإنبات (أيام) لبذور القمح القاسي. 58

الشكل 3. التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- الوزن الغض (مغ)، (ب)- الوزن الجاف (مغ)، (ج)- طول الكوليوبتيل (سم)، (د)- طول الجدير (سم)، (ه)- النسبة ج/ك، (و)- معامل قوة البذور عند القمح القاسي. 60

الشكل 4. التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- المحتوى النسبي للماء (%)، (ب)- تعبئة المدخرات (مغ)، (ج)- البروتينات الذائبة (مغ/غ وزن غض)، (د)- السكريات الذائبة (مغ/غ وزن غض) عند القمح القاسي. 62

الفصل الثالث

الشكل 1. عينة من أوراق شتلات القمح الصلب لمختلف المعاملات 68

الشكل 2. التأثير المتداخل لتحفيز البذور والملوحة على (أ)- الوزن الغض (مغ)، (ب)- الوزن الجاف (مغ)، (ج)- المساحة (سم2)، (د)- المحتوى النسبي للماء (%) لأوراق القمح الصلب. 70

الشكل 3: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- الكلوروفيل أ (مغ/غ وزن غض)، (ب)- 71 الكلوروفيل ب (مغ/غ وزن غض)، (ج)- أشباه الكاروتين (مغ/غ وزن غض)، (د)- النسبة كلا أ+ب/كاروتين، عند القمح الصلب. 71

الشكل 4: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على محتوى أوراق القمح الصلب من (أ)- البرولين (مغ/غ وزن غض)، (ب)- السكريات الذائبة في الماء (مغ/غ وزن غض)، (ج)- الماء الأكسوجيني (مغ/غ وزن غض)، أكسدة اللبيدات (مغ/غ وزن غض) 73

الفصل الرابع

81 Fig. 1– Seed germination and seedling growth of durum wheat.

82 Fig. 2– Venn diagrams and functional classification of wheat proteome in both primed seeds compared to control un-primed seeds.

88 Fig. 3– Functional distribution of the 121 proteins identified in hydro-primed and ascorbate-primed wheat seeds.

89 Fig. 4– Venn diagrams and functional classification of wheat proteome in hydro-primed seeds compared to ascorbate-primed seeds.

89 Fig. 5– Scheme showing the possible changes in methionine metabolism induced by ascorbate-priming.

الفصل الخامس

100 Fig. 1– Metabolic proteome signature in Embryo of germinating primed and unprimed wheat seeds under salt stress as compared to control (UP-H_2O).

106 Fig. 2– Metabolic proteome signature in embryo-ST of germinating primed and unprimed wheat seeds under salt stress as compared to control (UP-H_2O).

109 Fig. 3– Effect of NaCl on wheat seed germination

110 Fig. 4– Hierarchical clustering of accumulation patterns of differentially regulated proteins in Wheat Embryo.

111 Fig. 5– Hierarchical clustering of accumulation patterns of differentially regulated proteins Wheat embryo-surrounding tissues.

قائمة الجداول

التعيين	الصفحة
الفصل الأول	
جدول 1. أهم مضادات الأكسدة الطبيعية و مواقعها.	16
جدول 2. مضادات الأكسدة كمؤشرات عن مقاومة الملوحة في مختلف المحاصيل الزراعية.	17
جدول 3. بعض المحاصيل المعدلة وراثيا لرفع قدرة أنظمتها المضادة للأكسدة و منه قدرتها على تحمل الملوحة.	18
جدول 4. المساحة، المردود و إنتاج القمح الصلب في العالم بين سنتي 2004 و 2005.	20
جدول 5. تأثير الملوحة على مختلف مظاهر/أعضاء النمو في القمح	26
جدول 6. بعض الجينات المتدخلة في مقاومة القمح للملوحة	27
جدول 7. ملخص للدراسات التي تناولت تأثير الملوحة على إنبات و نمو بادرات القمح	36
جدول 8. مختلف طرق تحفيز البذور المعتمدة لتطوير تحمل مختلف النباتات للملوحة	41
جدول 9. تحسين مقاومة النباتات الزراعية لإجهادات الوسط عبر معاملتها بحمض الأسكوربيك	44
جدول 10. تحسين مقاومة النباتات لإجهادات الوسط عبر معاملتها بحمض الجبريليك.	46
جدول 11. تحسين مقاومة القمح للملوحة باستعمال مختلف الطرق البيوتكنولوجية	46
جدول 12. لمحة عن أحدث طرق التحليل البروتيومي-المعتمد و الخالي من الجال كأدوات بيوتكنولوجية يمكن أن توفر المعلومات اللازمة لإنجاح برامج تحسين المحاصيل الزراعية	49
جدول 13. ملخص لأهم الدراسات البروتيومية التي أنجزت خلال السنة الجارية (2015/2014)	50
جدول 14. استخدام البروتيوم لدراسة عمليات إنبات البذور و / أو تحفيز البذور	51
الفصل الثاني	
جدول 1. جدول يلخص المعاملات المنجزة خلال هذه التجربة	54
جدول 2. التحليل الإحصائي لمعايير النمو و الأيض العام	59
الفصل الثالث	
جدول 1. التحليل الإحصائي للمعايير المدروسة	74
الفصل الرابع	
Table 1– Metabolic proteins identified according to two protocols, one comprising a standard in-solution trypsin digestion, and the other one in which an enrichment step by NIPAm/CB core VSA shell particles (HG) was added.	84
Table 2– Wheat metabolic proteins whose abundance varied in hydro-primed seeds.	87
Table 3– Wheat metabolic proteins whose abundance varies specifically in ascorbate-primed seeds.	92
الفصل الخامس	
Table 1– Embryo proteome of unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions.	104
Table 2– Embryo-surrounding tissues proteome of unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions.	110

جدول المواد

المقدمة أ

الفصل الأول

1. **الملوحة و تأثيرها على نمو النبات** 01
1-1. ملوحة التربة 01
1-2. تأثير الملوحة على نمو النباتات 03
1-3. آليات مقاومة النباتات للملوحة 05
1-3-1. التوازن الداخلي 06
1-3-2. مضادات الأكسدة وبروتينات نزع السمية 14
1-3-3. مراقبة النمو (انقسام و استطالة الخلايا) 15
2. **القمح الصلب و استجابته للملوحة** 19
2-1. القمح الصلب 19
2-2. استجابة القمح للملوحة 25
3. **إنبات البذور و الملوحة** 28
3-1. إنبات البذور 29
3-2. التغيرات التي تطرأ علي البذرة في أثناء إنباتها 29
3-3. إنبات البذور و التوازن الهرموني 32
3-4. حمض الأسكوربيك و إنبات البذور 33
3-5. آثار الإجهاد الملحي على الإنبات و إنشاء الشتلات 35
4. **قوة البذور و تحفيزها:** 37
4-1. قوة البذور 37
4-2. تحفيز البذور 37
4-3. التغيرات البيوكيميائية الناجمة عن تحفيز البذور 40
4-4. حمض الأسكوربيك و تحفيز البذور 43
4-5. حمض الجبريليك و تحفيز البذور 44
5. **دور البروتيوميات في دراسة استجابة النباتات لإجهادات الوسط (الإجهاد الملحي كمثال)** 47

الفصل الثاني

1. **المقدمة** 53
2. **المواد و طرائق العمل** 54
2-1. المواد النباتية و طريقة المعاملة: 54
2-2. زراعة البذور و الأطباق: 54
2-3. القياسات 55
2-3-1. اختبار الإنبات 55
2-3-2. معايير النمو 55
2-3-3. المعايير الفسيولوجية و البيوكيميائية 55
- *المحتوى النسبي للماء (RWC)* 55
- *تعبئة المدخرات الغذائية (SRM)* 56

- تقدير السكريات الذائبة في الماء (WSC) 56
- تقدير البروتينات الذائبة (SPROT) 56

2-4. التحليل الإحصائي 56

3. **النتائج** 57

3-1. خصائص الإنبات 57

3-2. بزوغ البادرات و نموها 57

3-3. المعايير الفسيولوجية و البيوكيميائية 61

- المحتوى النسبي للماء (RWC) 61
- تعبئة المدخرات الغذائية (SRM) 61
- تقدير السكريات الذائبة في الماء (WSC) 61
- تقدير البروتينات الذائبة (SPROT) 61

4. **المناقشة** 63

5. **الخلاصة** 64

الفصل الثالث

الملخص 65

1. **المقدمة** 66

2. **المواد و طرائق العمل** 67

2-1. المواد البيولوجية و طريقة الزراعة 67

2-2. القياسات 67

2-2. القياسات 67

أ. نمو الأوراق (الورقة الثالثة) 67

ب. المحتوى النسبي للماء (RWC) 67

ج. تقدير أصباغ الكلوروفيل (Chl-a & b) و أشباه الكاروتين (CAR) 68

د. تقدير السكريات الذائبة في الماء (WSC) 68

هـ. تقدير البرولين (PRO) 68

و. تقدير الماء الأكسجيني (H_2O_2) 68

ز. تقدير أكسدة اللبيدات (LPO) 69

2-3. التحليل الإحصائي و عرض النتائج 69

3. **النتائج** 69

3-1. معايير نمو الأوراق 69

3-2. المعايير الفسيولوجية و البيوكيميائية 72

أ. المحتوى النسبي للماء (RWC) 72

ب. صبغات التمثيل الضوئي 72

ج. محتوى البرولين (PRO) 72

د. محتوى السكريات القابلة الذوبان (WSC) 74

هـ. بيروكسيد الهيدروجين (H2O2) 74

و. أكسدة الدهون (LPO or MDA) 74

4. **المناقشة** 76

5. الخلاصة 78

الفصل الرابع

الملخص 79
الأهمية البيولوجية لهذه الدراسة 79
1. المقدمة 80
2. المقال 01 83
2-1. المقدمة 84
2-2. الوسائل و طرائق العمل 86
2-2-1. معاملة البذور، الإنبات و نمو البادرات 86
2-2-2. استخلاص و تقدير البروتينات الأيضية 86
2-2-3. هضم البروتينات بالتربسين و تنقيتها 86
2-2-4. تخصيب البروتينات بواسطة جسيمات النانو هيدروجال 86
2-2-5. التحليل بواسطة NanoHPLC–MS 86
2-2-6. البحث في قواعد البيانات و تحديد البروتينات 90
2-2-7. التحليل بواسطة برنامج Scaffold 90
2-2-8. التصنيف الوظيفي للبروتينات 90
2-3. النتائج 90
2-3-1. تصميم التجربة و مقاربة البروتيوميك المستعملة 90
2-3-2. بروتيوميك بروتينات الأيض لبذور القمح الصلب 91
2-3-3. التصنيف الوظيفي ببلبروتينات 91
2-3-4. التحليل المقارن للبروتينات المحددة 91
2-4. المناقشة 91
2-4-1. بروتيوميك البذور المعاملة بالماء 91
2-4-2. بروتيوميك البذور المعاملة بحمص الأسكوربيك 93
2-5. الخلاصة 94
2-6. المراجع 95

الفصل الخامس

الملخص 97
الأهمية البيولوجية لهذه الدراسة 97
1. المقدمة 98
2. المقال 02 100
2-1. المقدمة 101
2-2. الوسائل و طرائق العمل 101

2-2-1. معاملة البذور و الإنبات 101
2-2-2. إستخلاص بروتينات الأيض و تقديرها 101
2-2-3. هضم البروتينات بالتربسين و تنقيتها 102
2-2-4. التحليل بواسطة NanoHPLC–MS 102
2-2-5. البحث في قواعد البيانات و تحديد البروتينات 102
2-2-6. التحليل بواسطة برنامج Scaffold 102
2-2-8. التصنيف الوظيفي للبروتينات 103
2-3. النتائج 103
2-3-1. البروتيوم الأيضي لجنين القمح 103
2-3-2. البروتيوم الأيضي للأنسجة المحيطة بجنين القمح 108
2-3-3. التحليل العنقودي لبروتينات الاستجابة للملوحة و حمض الأسكوربيك 108
2-4. المناقشة 109
2-4-1. البروتيوم الأيضي للجنين تحت تأثير الملوحة و المعاملة بحمض الأسكوربيك 112
2-4-2. البروتيوم الأيضي لأنسجة المحيطة بالجنين تحت تأثير الملوحة و المعاملة بحمض الأسكوربيك 116
2-5. الخلاصة 116
2-6. المراجع 116
الخلاصة العامة و التوصيات 120
قائمة المراجع 126
الملاحق 153

المقدمة

لعل من أعظم التحديات التي ستواجهها الزراعة الحديثة، رفع سقف الإنتاج الغذائي لأكثر من 70 % من أجل تلبية حاجيات 2.3 مليار نسمة التي ستضاف للتعداد السكاني بحلول سنة 2050 (FAO, 2009 ; Tester & Langridge, 2010).

تعد الملوحة من أبرز عوامل الإجهاد غير الحيوي التي تقف حجر عثرة أمام تحقيق هذا الهدف المنشود. تستشعر النباتات بيئتها و تضبط نموها وتطورها وفقا لذلك، من خلال مجموعة واسعة من الاستجابات الفسيولوجية، البيو كيميائية و الجزيئية التي تمكنها من الاستمرار و التكاثر. فهم كيفية قيام النباتات باستشعار بيئتها و التكيف مع ظروفها المجهدة أمر ضروري لضمان إنتاج زراعي كافي و مستدام في ظل الظروف الناجمة عن تغير المناخ العالمي – خصوصا ارتفاع درجات الحرارة ازدياد وتيرة الجفاف (Osakabe et al., 2014).

على الرغم من كون القمح الصلب (*Triticum durum Desf.*) من أبرز المحاصيل المزروعة على نطاق واسع، وخاصة في حوض البحر الأبيض المتوسط أين يتم توفير حوالي 75 % من إجمالي الإنتاج العالمي من القمح (Habash et al., 2009)، يبقى إنتاجه في كثير من الأحيان محدودا، ذلك ربما بسبب ضعف إنبات البذور و نمو الشتلات الناجمان عن تأثير الجفاف و ملوحة التربة (Sayar et al., 2010). و يتضح مما سبق ذكره ضرورة تطوير التراكيب الوراثية للقمح بغرض تحسين تحمله للملوحة. و هذا أمر بالغ الأهمية في حالة القمح رباعي الصيغة الصبغية (القمح الصلب)، الذي يخلوى من الجينوم D، مما يجعله أقل تحملا للإجهاد الملحي (Munns et al., 2012). و عليه، فإن فهم الأساس الجزيئي لاستجابة نبات القمح للظروف المجهدة أمر ضروري للتحسين الوراثي لميزة تحمل الإجهاد الملحي في محصول القمح (Sayar et al., 2010; Munns et al., 2012). و لعل من أهم المفاتيح لتحقيق ذلك هو توضيح الآليات الجزيئية التي تتحكم في قوة إنبات البذور/نمو الشتلات، سواء منها التكوينية (Constitutives) أو المحدثة (Inductives) بفعل تحفيز البذور و خاصة تحت ظروف الإجهاد (Gallardo et al., 2001, Yacoubi et al., 2011).

اعتمدت في السنوات القليلة الماضية جملة من الاستراتيجيات لتحسين أداء النباتات تحت ظروف الإجهاد الملحي، و لعل من أبرزها تطوير أصناف جديدة متحملة للملوحة. مع ذلك، تجدر الإشارة إلى أن هذا الاختيار يحتاج للكثير من الوقت و التكاليف و يشترط أصلا وجود اختلاف وراثي بين أصناف النوع الواحد. و هو ما أدى بالعديد من الباحثين إلى اقتراح سبل أخرى كفيلة بمساعدة النباتات على تحمل الملوحة، و ذلك من خلال محاولة عكس أو تقليل التأثيرات الناجمة عن تعرض النبات للإجهاد، و من أبرز هذه التطبيقات استعمال المواد الكيميائية المنظمة للنمو (كالهرمونات النباتية، مضادات الأكسدة، الواقيات الأسموزية،.. إلخ).

استقطبت الهرمونات النباتية و مضادات الأكسدة في السنوات القليلة الماضية اهتمام الكثير من العلماء و الدارسين لإجهادات الوسط، باعتبارها من أهم العناصر الفاعلة في سلاسل نقل الإشارة المتدخلة في تحفيز استجابة النباتات الزراعية لإجهادات الوسط المختلفة على غرار إجهاد الملوحة (Munns, 2002; Kzang et al., 2014; Pedranzani et al., 2003; Alla et al., 2014; Miller et al., 2010) (أنظر لاحقا).

في السنوات القليلة الماضية، برزت تقنية تحفيز البذور (seed-priming) باعتبارها إستراتيجية واعدة لإدارة الإجهاد و ذلك لأنها تحمي النباتات ضد مختلف الإجهادات غير الحيوية دون أن تؤثر على سلامة البذور. إذ تعزز

هذه التقنية الآمنة و غير المكلفة من آليات الدفاع الطبيعي لدى النبات قبل تعرضه للإجهاد مما يساعده على تجاوز محنة الإجهاد بأقل الأضرار الممكنة، و ذلك من خلال تشكل استجابة مكتسبة – ذاكرة التحفيز priming memory – تشبه في كثير من سماتها الاستجابة المناعية المكتسبة لدى الحيوانات، و لعل هذا من الأسباب التي جعلت الكثير من العلماء المعاصرين يتحدثون عن وجود نظام مناعي نباتي الطبعة (Jones & Dangl , 2006).

استعملت العديد من المواد الكيميائية المتدخلة في تنظيم نمو النباتات (كالهرمونات) و كذا في تنظيم أيض الأكسدة (كالفيتامينات) لتحفيز و تعزيز تحمل النباتات الاقتصادية للملوحة (Tuna et al., 2008 ; Hamayun et al., 2010 ; Arfan et al., 2007). و على كثرة هذه الدراسات و أهمية النتائج المسجلة كان عرض الآثار الايجابية لهذه المعاملات دون التطرق إلى الآليات المتحكمة في ذلك السمة البارزة لهذه الدراسات، على الرغم من أن تفسير هذه التأثيرات يعتبر من الأهمية بمكان لفهم و كشف الآليات الدقيقة المتدخلة في تحمل النباتات للملوحة (Kim & Park, 2008).

يعد حمض الجبريليك من أهم الهرمونات النباتية التي استعملت بغرض تحسين تحمل النباتات للملوحة (فرشة، 2001 ; Banyal and Rai,1983 ; Siddiqui et al., 2008; Hisamatsu et al., 2000). حيث تبين أن المعاملة بـ GA_3 تزيد من معدل إنبات البذور و نمو البادرات/الشتلات، كما تبين أنها تثبط الأكسدة الفوقية للبيدات (Lipid Peroxidation, LPO) المستحثة بالجذور الحرة أو المواد الأكسوجينية التفاعلية (Reactive Oxygen Species, ROS) التي تتراكم خلال الإجهاد (Choudhuri, 1988). هذه الدراسات و أخرى دلت بشكل لا يدع مجال للشك أن استعمال GA_3 سواء بالنقع أو الرش يساعد المحاصيل الزراعية على تحمل الملوحة و رفع إنتاجها (فرشة، 2001 ; Kaya et al., 2009 ; Gherroucha et al., 2011).

على الرغم من أن نمو النبات يخضع لمراقبة هرمونية، دلت العديد من المعطيات التي تراكمت خلال العشرين سنة الماضية على مساهمة حمض الأسكوربيك (Ascorbic Acid, AsA) في تنظيم نمو النباتات و تطورها. فعلى سبيل المثال، تصبح النباتات قزمة عند خفض محتواها من AsA باستعمال مادة اللكورين (Lycorine) التي تثبط تخليق AsA (Arrigoni et al., 1975). و بغض النظر عن قدرة AsA في تنظيم الإنقسام و الاستطالة الخلوية، ثبت أن لـ AsA القدرة على تنظيم نمو النباتات من خلال التأثير على التوازن الهرموني، إذ يعتبر AsA مادة مساعدة لعمل إنزيم Fe(II)AsA oxidase المتدخل في أيض و تخليق العديد من الهرمونات مثل الإثيلين(Ethylene) و الجبرلينات خصوصا بواسطة 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid (ACC) oxidase و-gibberellin 3-β dioxygenase على الترتيب (De Gara, 2004). أتضح من جهة أخرى، أن أوراق نبات الأرابيدوبسيس الطافر (vtc1 mutant) تكون غنية بمثبط النمو "حمض الأبسيسيك" (ABA) مقارنة بالنباتات البرية (WT) (Kaya et al., 2009; Brossa et al., 2011). حديثا، أشارت بعض الأبحاث إلى احتمال تدخل حمض الأسكوربيك في تنظيم إنبات البذور تحت ظروف الإجهاد باعتباره وسيط في تنظيم عمل الهرمونات النباتية خصوصا منها الجبر لينات (Ye et al., 2011; Ye & Zhang, 2012 ; Zheng et al., 2009).

انطلاقا مما سبق و بعد إجراء سلسلة من التجارب الأولية (الملاحق)، قمنا باختبار تأثير GA_3 و AsA على مقاومة القمح الصلب للملوحة في المراحل الأولى من نموه. بعد التأكد من قدرة كل من التحفيز بالجبرلينات (GA-priming) و التحفيز بحمض الأسكوربيك (AsA-priming) على تحمل نبات القمح للملوحة (نتائج هذه الدراسات مدرجة في الفصلين الثاني و الثالث)، قمنا في مرحلة لاحقة بالتركيز على مادة AsA – التي أعطت أفضل

تأثير– في محاولة –هي الأولى من نوعها– لتفسير آليات تحريض البذور بواسطة تقنية تحفيز البذور و ذلك بالاستعانة بواحدة من أحدث تقنيات البيولوجية الجزيئية آلا و هي التحليل البروتيومي الخالي من الجال "Gel-free proteomic analysis or shotgun proteomic analysis". حيث تم في المرحلة الأولى إجراء تحليل للبروتيوم الأيضي (جملة بروتينات الأيض) لبذور قمح سبق معاملتها بالماء (Hydro-priming) أو بحمض الأسكوربيك (Ascorbate-priming) و مقارنته ببروتيوم بذور قمح لم تتم معالجتها (أو طبيعية، Un-priming) (نتائج هذه الدراسة مدرجة في الفصل الرابع و المقال رقم 01). في مرحلة لاحقة، و لتأكيد استنتاجاتنا من الدراسة الأولى، قمنا بإنجاز تجربة تم على إثرها مقارنة التغيرات الحاصلة في بروتيوميات بذور قمح طبيعية أو محفزة بـ AsA و ذلك بعد إنباتها في وسط ملحي أو خالي من الأملاح (نتائج هذه الدراسة مدرجة في الفصل الخامس و المقال رقم 02). مما سبق يمكن تلخيص أهداف هذه الأطروحة في النقاط التالية:

- *تقييم آثار الإجهاد الملحي على إنبات و إنشاء الشتلات (القمح الصلب)*
- *تقييم إمكانية تحسين الإنبات و نمو بادرات/شتلات القمح في ظروف الإجهاد الملحي الشديد عن طريق تحفيز البذور بواسطة الهرمونات النباتية و مضادات الأكسدة.*
- *تقييم أهمية إجهاد الأكسدة و نظام الدفاع المضاد للأكسدة في تأثير الملوحة على إنبات و نمو بادرات القمح*
- *تعميق فهمنا للآليات الجزيئية للتحمل الملحي المستحث بواسطة تحفيز البذور.*

الفصل الأول

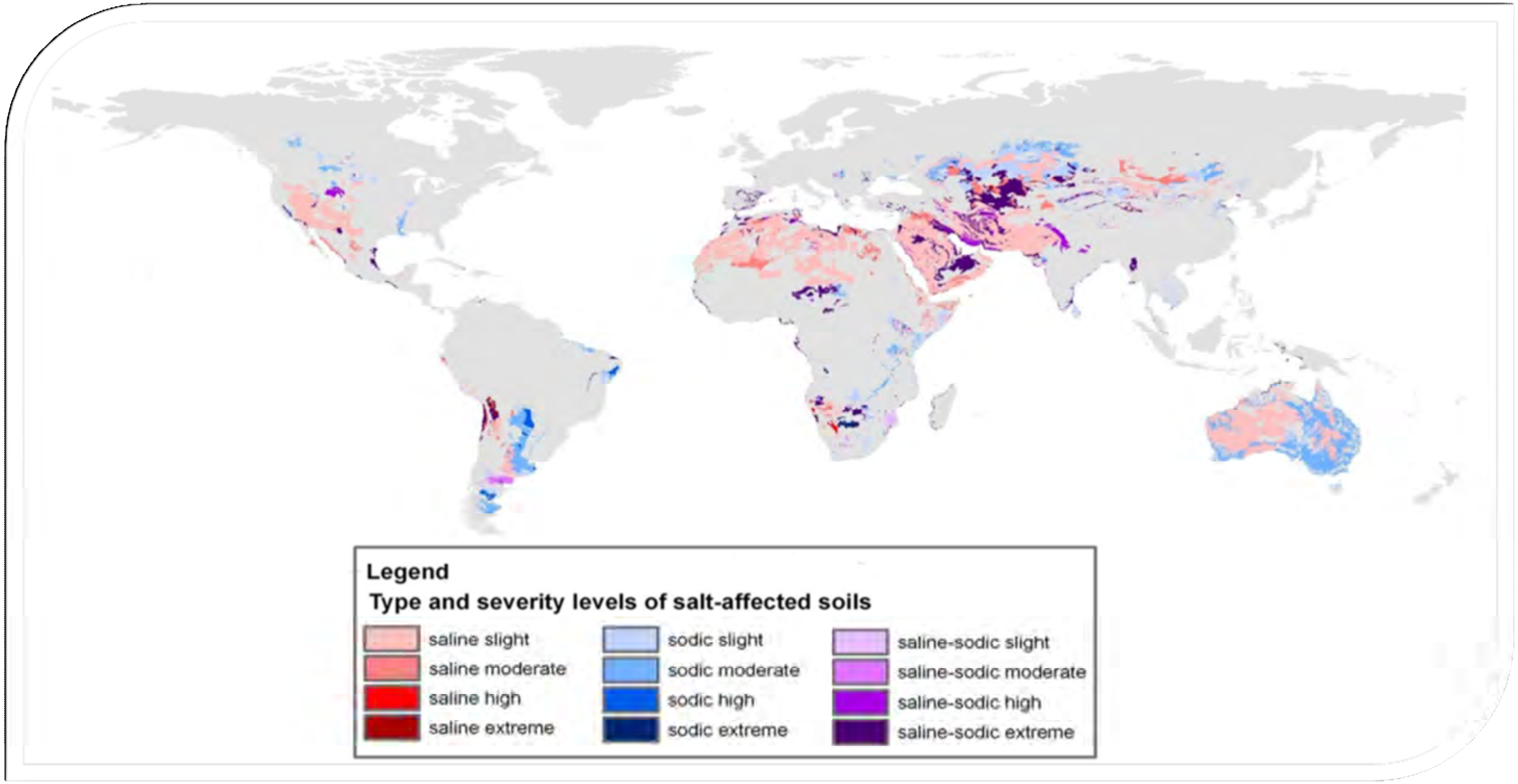
1. الملوحة و تأثيرها على نمو النبات

يعد الإجهاد الملحي من أبرز عوامل الإجهاد غير الحيوي التي تقلل بشكل كبير من الإنتاجية النباتية في البيئات الطبيعية. غالبا ما يتزامن الإجهاد الملحي مع الضغوط الأخرى مثل الجفاف، الإجهاد الضوئي و الإجهاد الحراري. تتعامل النباتات مع الإجهادين الأيوني و الاسموزي الناجمين عن الملوحة العالية من خلال مجموعة متنوعة من الآليات على مختلف المستويات، و تنطوي على عمليات فسيولوجية، بيوكيميائية و جزيئية. في حين تتطور بنجاح النباتات الملحية "Halophytes" في البيئات المالحة، تبدي نباتات المحاصيل "Glycophytes" مستويات متفاوتة من التحمل الملحي (Bartels & Dinakar, 2013; Gupta & Huang, 2014).

1-1. ملوحة التربة

ملوحة الأراضي ظاهرة طبيعية عرفها الإنسان منذ العصور القديمة، إذ ورد ذكر ها في أحد المصنفات الذي عثر عليه في بلاد الرافدين و الذي يعتقد أنه يعود لأكثر من 2400 سنة قبل الميلاد (Russel et al., 1965 in Singh & Chatrath, 2001). توجد الأراضي المالحة في كل القارات، تمتد عبر المناطق ذات المناخ الرطب و المعتدل إلى المناطق القطبية. كما يمكن أن تتواجد هذه الأراضي على مختلف الارتفاعات من المناطق المتدنية (المناطق المتاخمة للبحر الميت) إلى المناطق الشاهقة الارتفاع - أكثر من 5000 متر-. كهضاب التبت (Tibetan Plateau) و جبال الروكي-أمريكا (Rocky Mountains). و عليه فالأراضي المالحة ليست حكرا على المناطق الجافة أو القاحلة (Singh & Chatrath, 2001) (الشكل 1).

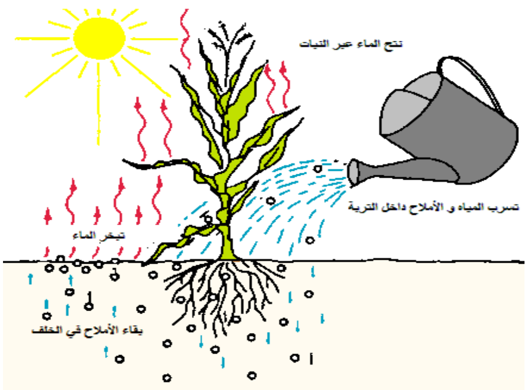
تحتوي التربة و المياه، على اختلاف مصادرها و حتى العذبة منها، على كميات متفاوتة من الأملاح. فالأملاح مكون مشترك و أساسي للتربة، و العديد من هذه الأملاح (مثل، أملاح النترات و البوتاس) ضرورية لنمو النباتات. تنشأ أملاح التربة من التجوية المعدنية، إضافة المخصبات غير العضوية و أسمدة التربة المختلفة (مثل، الجبس، السماد العضوي و روث الحيوانات e.g. gypsum, composts and manures)، و كذا من مياه الري (Kotuby-Amacher et al., 2000). يعتبر الري الزراعي بشكل خاص أحد أهم مصادر تسريع عملية تمليح الترب، إذ تنقل مياه الري كميات كبيرة من الأملاح إلى التربة (Munns et al., 2004) (الشكل 2). حاليا، تقدر نسبة الأراضي المتضررة من ملوحة التربة بحوالي 2 % من الأراضي الزراعية غير المروية و 20 % من الأراضي المسقية (45 مليون هكتار) (Lauchli et al., 2008) (الشكل 3).



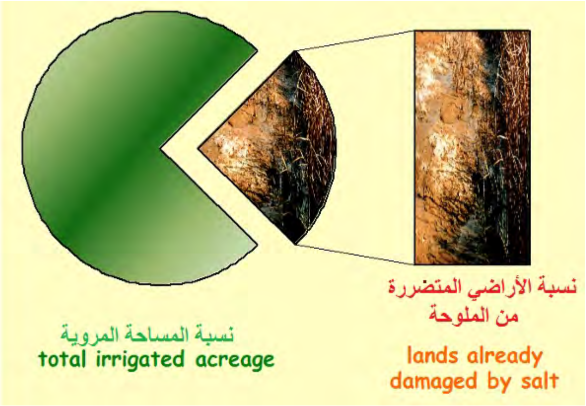
الشكل 1. توزيع الأراضي المتضررة بالملوحة عبر العالم (http://www.clubgreen.nl/vraag/Biosaline-agroforestry-and-forestry.html)

كما نلاحظ الجزائر من بين الدول التي تعاني من مشكلة الملوحة بحوالي 3.2 مليون هكتار (Benmahioul et al., 2008)

تربة مالحة : Sline soil ؛ تربة صودية soil : sodic soil



الشكل 2. تراكم الأملاح بعد عملية الري الزراعي، خصوصا في المناطق القاحلة و مرتفعة الحرارة (Ramade, 2008)



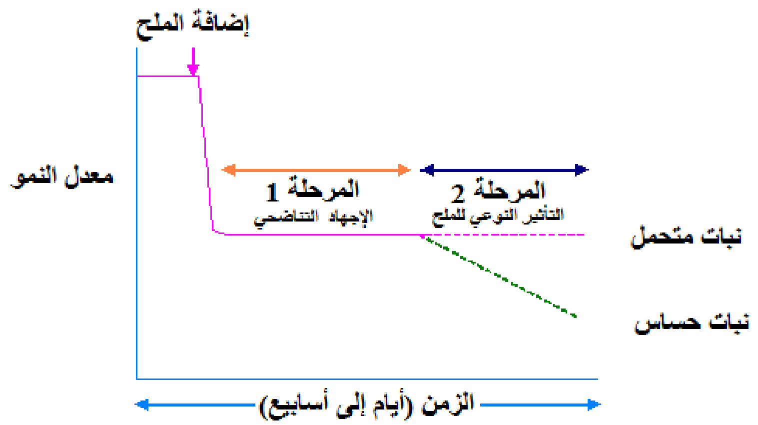
الشكل 3. نسبة الأراضي المتضررة من المالوحة إلى النسبة الكلية للأراضي المسقية (Carillo et al., 2011)

2-1. تأثير الملوحة على نمو النباتات

ملوحة التربة هي العامل الرئيسي الذي يحد من غلة المحاصيل الزراعية، مما يهدد قدرة الزراعة على مسايرة الزيادة السكانية المتنامية (Flowers, 2004; Munns & Tester, 2008). عند تركيزات الملح المنخفضة، لا يتأثر مردود المحاصيل الزراعية إلا بصورة طفيفة و قد لا يتأثر البتة (Maggio et al., 2001)، في حين تبدأ الغلة بالتناقص إلى أن تصل إلى الصفر مع تزايد تركيزات الملح، ومرد ذلك كون النباتات "السكرية" "Glycophytes"، بما في ذلك معظم نباتات المحاصيل، لا تنمو في تركيزات الملح العالية، إذ تتعرض لتثبيط شديد و قد تموت عند تركيزات تتراوح بين 100 -200 ملي مول/ل من كلوريد الصوديوم (NaCl). و يعتقد أن هذه النباتات قد تطورت في ظل ظروف تتميز بانخفاض ملوحة التربة فلم تكن بحاجة إلى تطوير آليات تحمل الملوحة (Munns & Termaat, 1986).

تؤثر الملوحة المرتفعة على النباتات بطريقتين رئيسيتين: تخفض التركيزات العالية للأملاح في التربة من مقدرة الجذور على امتصاص المياه، كما أن التركيزات العالية للأملاح داخل النبات نفسه يمكن أن تكون سامة، مما يؤدى إلى تثبيط العديد من العمليات الفسيولوجية و البيوكيميائية مثل امتصاص المغذيات و تمثيلها (Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002). يعمل هذان التأثيران على خفض نمو النبات، تطوره و بقائه على قيد الحياة. و على هذا الأساس اقترح نموذج من مرحلتين لتوصيف آثار الإجهاد الأسموزي (التناضحي) والأيوني على نمو النباتات (Munns, 1995) (الشكل 4).

و حسب هذا النموذج، تختلف السرعة التي يصل بها الملح إلى مستويات سامة في أوراق النباتات الحساسة و المتحملة للملوحة. و يكون الجدول الزمني بالأيام أو الأسابيع أو الأشهر، تبعا للأنواع ومستوى الملوحة. خلال **المرحلة Œ**، يسجل انخفاض نمو كل الأنواع النباتية بسبب التأثير الأسموزي للمحلول الملحي خارج الجذور. في حين، خلال **المرحلة •** ، تموت الأوراق المسنة في النباتات الحساسة بفعل تراكم الأملاح السامة فتقل بذلك حصيلة التمثيل الضوئي لدى هذه النباتات الشيء الذي يمارس تأثيرا إضافيا على النمو فيزداد بذلك انخفاض نمو النباتات الحساسة على عكس النباتات المتحملة (الشكل 4).

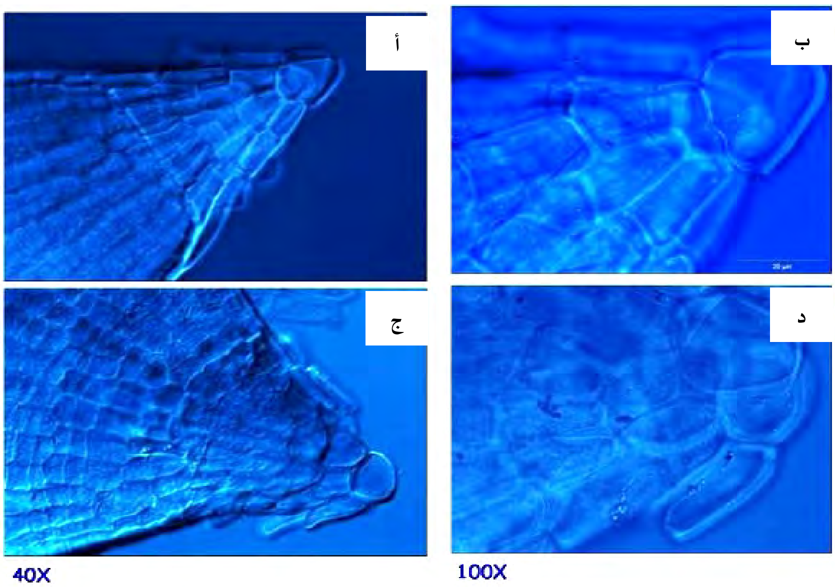


الشكل 4. نموذج المرحلتين لتأثير الملوحة على نمو النباتات السكرية (Munns, 1995)

- المرحلة Œ أو مرحلة الإجهاد الأسموزي:

تبدأ مباشرة بعد تراكم الأملاح حول الجذور إلى مستوى عتبي (Threshold level) يجعل من الصعب على الجذور استخراج الماء من التربة، و يبدأ تراجع معدل نمو القسم الخضري بشكل ملحوظ. كاستجابة فورية لهذا التأثير، و الذي يخفف أيضا من تدفق الأيونات نحو القسم الخضري، تقوم النباتات بإغلاق الثغور. على الرغم من ذلك، و بسبب فرق الجهد المائي بين خلايا الأوراق و الهواء المحيط من جهة، و الحاجة إلى تثبيت الكربون من جهة أخرى، تصبح هذه الإستراتيجية غير مجدية لتحمل الملوحة على المدى الطويل (Hasegawa et al., 2000). عموما، يكون نمو القسم الخضري أكثر حساسية من نمو الجذور للعجز المائي الناجم عن الملوحة العالية، ربما بسبب ارتفاع إنتاج حمض الأبسيسيك (ABA)، الذي يثبط نمو القسم الخضري بما في ذلك الأوراق بينما يحفز نمو الجذور، الشيء الذي من شأنه خفض استهلاك المياه من قبل النبات، مما يتيح الحفاظ على رطوبة التربة ومنع تراكم الأملاح في التربة (Hasegawa, 2013 ; Munns & Tester, 2008). يتم التعبير عن انخفاض نمو القسم الخضري بسبب الملوحة عادة بالمساحة الورقة المخفضة و النمو الخضري النحيل (Läuchli & Epstein, 1990). تثبيط نمو الأوراق الحساسة للإجهاد الملحي يحدث أيضا كنتيجة لتثبيط نقل أيونات Ca^{2+} عبر جدر الأوعية الخشبية من الجذور (Läuchli & Grattan, 2007). يعتمد الحجم النهائي للورقة على كل من انقسام و استطالة الخلايا. اتضح أن بزوغ الأوراق، الذي يخضع لانقسام الخلايا، لا يتأثر بالإجهاد الملحي في بنجر السكر (sugar beet)، في حين يبدى تمدد الأوراق حساسية للملوحة (Papp et al., 1983)، اعتمادا على معدل Ca^{2+}. و علاوة على ذلك تثبيط الإجهاد الملحي لامتصاص المغذيات المعدنية الهامة، مثل K^{+} و Ca^{2+}، يخفض نمو الخلايا الجذرية (Larcher, 1980) (الشكل 5).

تبدي المنطقة القمية للجذور النامية في ظل الملوحة تشكل فجوات واسعة وعدم وجود انتظام نموذجي في الأنسجة القمية (الشكل 5). انحلال طفيف للهيولى بسبب نقص الاستمرارية والالتحام بين الخلايا مع ميل إلى وقف النمو و التمايز. خلاف ذلك، تتميز القمم الجذرية للنباتات الشاهدة بأنسجة مزدحمة مع مسافات صغيرة بين الخلايا (Carillo et al., 2011).



الشكل 5. صور مجهريه لقمح جذور القمح الصلب النامية في غياب (أ،ب) أو وجود (ج،د) NaCl (Carillo et al., 2011).

- المرحلة • أو مرحلة الإجهاد الايوني:

تتميز بتراكم الأيونات ولاسيما Na^+ في أنصال الأوراق بفعل تدفق النتح و ليس في الجذور (Munns, 2002). يصبح تراكم Na^+ ساما خاصة في الأوراق المسنة، التي لم تعد قادرة على الاستطالة و منه لم تعد قادرة على إماهة أو تخفيف الملح الواصل إليها كما تفعل الأوراق الفتية. إذا كان معدل موت الأوراق يفوق معدل إنتاج الأوراق الجديدة، فإن قدرة التمثيل الضوئي للنبات لن تكون قادرة على تلبية متطلبات الأوراق الفتية، مما ينعكس سلبا على معدل نموها (Munns & Tester, 2008). في أنسجة التمثيل الضوئي، يؤثر تراكم Na^+ على مكونات جهاز التمثيل الضوئي مثل الإنزيمات، الكلوروفيل و الكاروتينات (Davenport et al., 2005). يمكن للانخفاض في معدل التمثيل الضوئي في النباتات الحساسة للملوحة أن يزيد من إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). عادة ما يتم إزالة جزيئات ROS بسرعة عن طريق آليات مضادة للأكسدة، و لكن يمكن للإجهاد الملحي أن يضعف هذه الآليات (Foyer & Noctor, 2005). تبين حديثا أن نقل الإشارات بواسطة ROS هو جزء لا يتجزأ من استجابة التأقلم مع الملوحة. في الواقع، تلعب جزيئات ROS دور مزدوج في استجابة النباتات لإجهادات الوسط غير الحيوية، و ذلك من خلال عملها كمنتجات ثانوية لأيض الإجهاد، و كذلك كجزيئات نقل إشارة تتكامل مع الكالسيوم، الهرمونات و فسفرة البروتينات في تشكيل مسارات الاستجابة للإجهاد (Miller et al., 2009).

3-1. آليات مقاومة النباتات للملوحة

لا تزال الآليات الوراثية لمقاومة الملوحة عند النباتات غير مفهومة تماما بسبب تعقيد هذه الظاهرة. في الواقع، هناك عدة جينات تتحكم في تحمل الملوحة عند الأنواع النباتية المختلفة، و بالتالي لا يمكن أن يظهر الاختلاف الجيني إلا بشكل غير مباشر، من خلال قياس استجابة الأنماط الجينية المختلفة. ربما الاستجابة الأكثر ملائمة للقياس هي النمو و المردود، وخصوصا عند الملوحة المعتدلة (Flowers & Yeo, 1995). في الواقع، يمكن تقييم تحمل النباتات

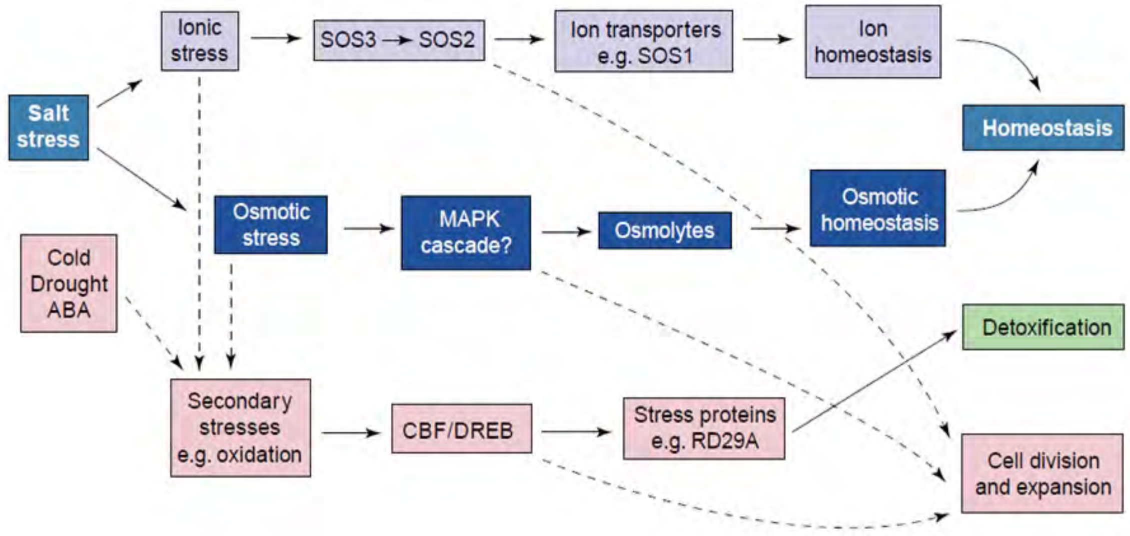
للملوحة من خلال قياس إنتاج الكتلة الحيوية في الظروف المالحة في مقابل الظروف المراقبة على مدى فترة طويلة من الزمن (و هذا يرتبط عادة مع المردود) أو من خلال بقاء النباتات على قيد الحياة (Munns, 2002).

حساسية نوع نباتي معين للملوحة قد تتغير بتغير أطوار نموه. قد يزيد أو ينقص التحمل الملحي تبعا للأنواع النباتية و/ أو العوامل البيئية. تبدي بعض الأنواع حساسية أكبر للملوحة عند مرحلة الإنبات، في حين تزيد حساسية أنواع أخرى خلال مرحلة التكاثر (Munns, 2002). طورت النباتات آليات عديدة للتأقلم مع الملوحة. و مع ذلك، من الممكن أن نميز ثلاثة آليات أساسية: Œ تحمل الإجهاد الأسموزي و الأيوني (استرجاع التوازن الداخلي) • حماية و إصلاح الجزيئات المحطمة (نزع السمية)، Ž مراقبة النمو خلال و بعد الإجهاد (Zhu, 2001 & 2002).

1-3-1. التوازن الداخلي Homeostasis

يحفز الإجهاد ردود فعل تم تصميمها للحفاظ على التوازن الداخلي للعضوية. تم توصيف هذه التفاعلات من قبل الفسيولوجي الأمريكي Bradforde في عام 1915 بكلمة "Homeostasis" و التي هي عبارة عن دمج بين كلمتين يونانيتين، 'stasis' و تعني حالة أو موقف، و 'homios' و تعني المساواة أو التشابه (Roeder, 2006).

تحت ظروف الإجهاد الملحي يختل التوازن الداخلي للنباتات. نظرا لكون الإجهاد الملحي يفرض على النبات نوعين من القيود (الأسموزي و الأيوني)، يحدث خلل في التغذية المائية و المعدنية. لإعادة التوازن طورت النبات استراتيجيات كفيلة بتصحيح هذا الاختلال و استرجاع حالة التوازني الأسموزي و الأيوني (الشكل 7). يبدو أن الجينات الحاملة لصفات التحمل الأسموزي تمتلك قدر أكبر من التأثير على تحمل المحاصيل الزراعية مقارنة بالجينات الضالعة في إقصاء الأيونات (Munns et al., 2012). و عليه يعتبر تحديد جينات التحمل الأسموزي أولوية لتحسين تحمل المحاصيل الزراعة للملوحة خصوصا في الترب المنخفضة أو المعتدلة الملوحة (Roy et al., 2014).



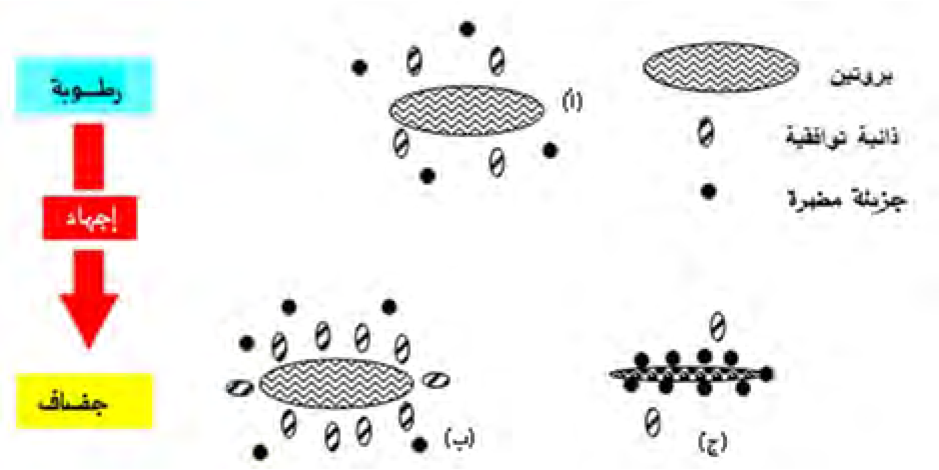
الشكل 6. الآليات الثلاثة لمقاومة النباتات للملوحة (Zhu, 2001)

SOS : salt overly sensitive ; MAPK: mitogenactivated-protein kinase; CBF/ DREB (cold-binding factor/dehydration responsive element binding) transcription factor ABA-independent; ABA: abscisic acid.

1-1-3-1. التوازن الأسموزي Osmotic homeostasie

n التعديل الأسموزي Osmotic adjustment (OA)

من بين استراتيجيات التكيف مع الإجهاد الأسموزي قيام النباتات بمراكمة الواقيات الأسموزية "osmoprotectants" (مركبات أمينية و سكريات) في السيتوبلازم و العضيات. عادة ما تكون المواد الأسموزية "osmolytes"، عبارة عن جزيئات صغيرة ذات طبيعة محبة للماء، غير مشحونة، قطبية و تتميز بذوبانيتها العالية في الماء (Sairam & Tyagi, 2004)، مما يوحي إلى مقدرتها على الالتصاق بسطح البروتينات والأغشية لحمايتها من الجفاف (Yancey et al., 1982) (الشكل 7). لذا فالدور الأساسي لـ OA هو زيادة قدرة الخلايا على الاحتفاظ بالماء دون التأثير على الأيض. تبين مؤخرا أن بعض هذه المواد فعالة أيضا في الحد من جهد الأكسدة الذي تحدثه الملوحة (الشكل 8). تشمل الأسموليتات التي تتراكم استجابة للإجهاد الملحي السكريات البسيطة (الجلوكوز و الفركتوز) والسكريات الكحولية أو عديدات الكحول (الجلسرين وإينوسيتول الميثيل)، والسكريات المعقدة (التريهالوز و الرافينوز)، مشتقات الأحماض الأمينية الرباعية (البرولين، جلايسن بتايين، البتايين ألانين، البرولين بتايين)، ... الخ.



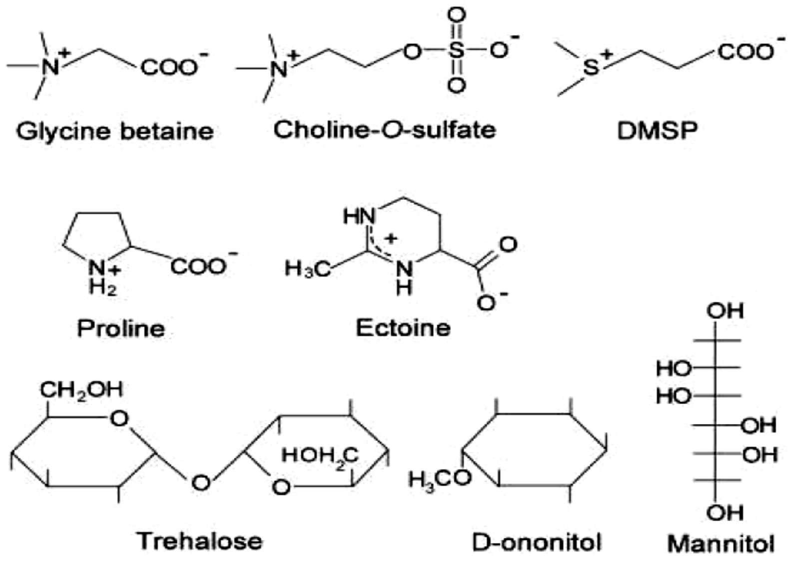
الشكل 7. رسم بياني يوضح عمل المواد المذابة المتوافقة.

(أ)- في الوسط المائي، وجود الماء يقلل من تفاعل البروتينات مع الجزيئات المضرة التي تزعزع استقرارها. (ب)- في الخلايا "المتحملة"، تخليق المواد المذابة المتوافقة يسمح بإقصاء الجزيئات المضرة وحماية الجزيئات البيولوجية (مثل البروتينات). (ج)- في الخلايا "الحساسة"، نقص المواد المذابة المتوافقة (أو موجودة و لكن بتركيزات منخفضة) يؤدي إلى توضع الجزيئات المضرة على سطح الجزيئات البيولوجية، ما يؤدي إلى زعزعة استقرارها (Mundree et al., 2002).

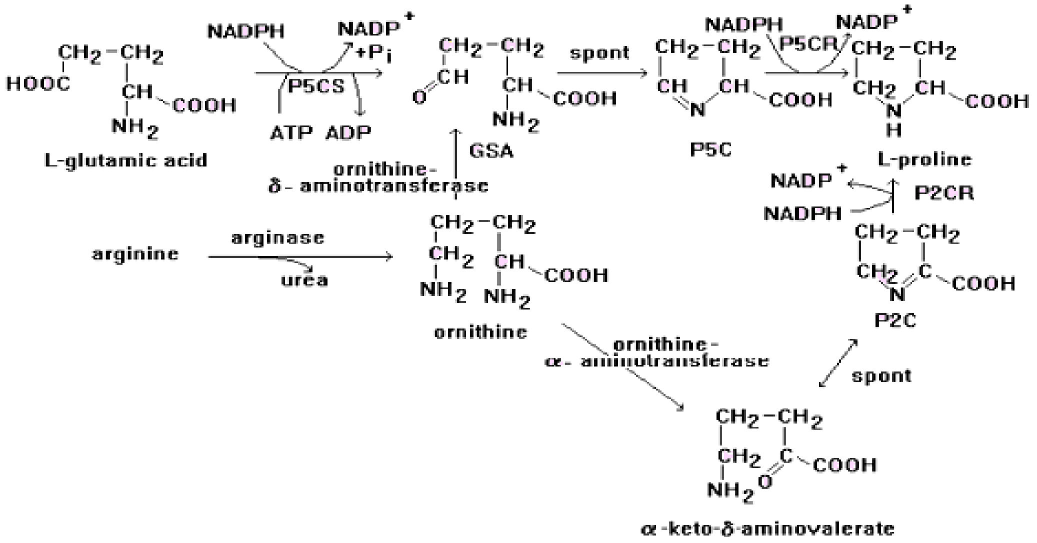
ü البرولين

تتزايد مستويات البرولين بسرعة في العديد من النباتات أحادية أو ثنائية الفلقة عند تعرضها للإجهاد الملحي (Fercha et al., 2011; Silva-Ortega et al. 2007). هذه الزيادة في التركيز الهيولي من البرولين ناتجة عن تحفيز التخليق الحيوي، نظرا لارتفاع كميات ARNm الخاصة بالإنزيم الذي يحول الغلوتامات نصف-ألدهيد إلى برولين (الشكل 9). هناك مساران لتخليق البرولين في النباتات، إما من الغلوتامات أو من الأورنيثين. يبدو أن المسار الأول يكون هو الغالب في ظروف الإجهاد (Silva-Ortega et al., 2007). كما يبدو أن تحفيز تخليق البرولين هو مواز لتفعيل مسار أيضي عام بدءا من الغلوتامات نصف-ألدهيد ويؤدي بالإضافة إلى البرولين، إلى تخليق عديد الأمينات

(polyamins)، عبر Orn أو Arg (Bartels et Sunkar, 2005). يعمل البرولين كمركب قابل للذوبان متوافق للتعديل الأسموزي، يمكن أن يصل إلى تركيزات عالية دون ممارسة أي تأثير سام كما هو الحال في الأيونات (Silva-Ortega et al., 2008). بالإضافة إلى دوره الاسموزي، يشارك البرولين في إزالة سمية ROS (Ben Rejeb et al., 2014) واستقرار البروتين (Ashraf & Foolad, 2007)، وحماية سلامة الغشاء السيتوبلازمي (Mansour, 1998) ويكون مصدر للكربون والنيتروجين بعد زوال الإجهاد (Sairam & Tyagi, 2004) (الشكل 9).



شكل 8. بنية بعض الأسموليتات (Rontein et al., 2002)



الشكل 9. مسار الغلوتامات و المسارات البديلة لتخليق البرولين في النباتات

بشكل عام، تصنع النباتات البرولين عبر مسار حمض الجلوتاميك (Kishor et al., 1995). من خلال مرحلتين وسطيتين الجلوتامات-γ-نصف ألدهيد-glutamate-γ-semialdhyde (GSA) و دالتا1-بيرولين-5-كربوكسيلات Δ1-pyrroline-5-carboxylate (P5C). أهم إنزيمين مشاركين في هذا المسار، P5C synthetase (P5CS) التي تحفز التفاعل الأول و P5C réductase (P5CR) التي تحفز التفاعل الأخير (Zhang et al., 1999).

يحافظ البرولين على النسبة NADPH+/NADP متوافقة مع أيض الخلية (Hare & Cress, 1997) و يؤثر على جهد الأكسدة/الإرجاع (Redox) للخلية بالإضافة إلى آليات نقل الإشارة المرتبطة بالإجهاد الملحي، ولاسيما تحريض تشفير الجينات التي تحتوي في سلسلة تحفيز عناصر الاستجابة للبرولين ACTCAT (Chinnusamy et al., 2005). كما يقترن استقلاب البرولين في الخنيدرات مباشرة بنقل الإلكترونات وتركيب ATP على مستوى السلسلة التنفسية (Sairam & Tyagi, 2004). يرتبط تراكم البرولين في أنواع مختلفة من النباتات مع قدرتها على التحمل و يكون تركيزه عموما أعلى في النباتات المتحملة منه في النباتات الحساسة (Ashraf & Foolad, 2007). و مع ذلك، في بعض الحالات، لا يبدو أن هذه العلاقة صحيحة.

تجلت أهمية البرولين في تحمل الملوحة من خلال دراسة سلوك النبات المحورة جينيا، كنباتات الأرابيدوبسيس (Arabidopsis) الطافرة بحيث تفقد مقدرتها على تخلق إنزيم البرولين دهيدروجيناز proline deshydrogenas (Nanjo et al., 2003). و نباتات التبغ (Hong et al. 2000) والأرز (Zhu et al. 1998) و الأرابيدوبسيس (Roosens et al., 2002) التي تشفر بإفراط تخليق البرولين، مما يجعلها تبدى قدرة أكبر على تحمل الإجهاد الأسموزي. كما أن الإضافة الخارجية للبرولين تسمح في بعض الحالات بتحسين تحمل النبات للملوحة (Ashraf & Foolad, 2007).

ü السكريات الذائبة

أظهرت العديد من الدراسات أن تراكم السكريات الذائبة و مشتقاتها عديدات الكحول يحفزه الإجهاد الملحي في العديـد من الأنـواع النبـاتية (Ashraf & Harris, 2004; Bartels & Sunkar, 2005; ElSayed et al., 2014). كما تبين وجود ارتباط قوي بين تراكم السكريات و تحمل الملوحة (Ashraf & Harris, 2004; Bartels & Sunkar, 2005).

زيادة تركيز عديدات الكحول يزيد من الجهد الأسموزي السيتوبلازمي، مما يسمح بعزل أكبر قدر ممكن من الصوديوم في الفجوات. و علاوة على ذلك، تلعب عديدات الكحول دور الواقيات الأسموزية للأغشية والبروتينات، و يتم ذلك أيضا من خلال القضاء على الجذور الحرة للأكسجين ROS (Puniran-Hartley et al., 2014). كما يمكنها أن تكون بمثابة مصدر لهياكل الكربون عندما تقل مواد التمثيل الضوئي خلال فترة الإجهاد (Vernon et al., 1993). و على الرغم من ذلك يبدوا أن إضافة هذه المركبات إلى وسط النمو لا تغير من سلوك النباتات تجاه الإجهاد الملحي (Hanana et al., 2011).

ومع ذلك فقد تجلت أهمية المواد السكرية و مشتقاتها الكحولية في مقاومة الملوحة من خلال دراسة تأثير تغير أيضها على استجابة النباتات للملوحة. فعلى سبيل المثال، سمح الإفراط في التعبير "overexpression" الجينات الضالعة في التحكم في التخليق الحيوي للمانيتول Mannitol في نباتات في الحصول على نمط ظاهري متحمل للملوحة في العديد من النباتات كالأرابيدوبسيس (Thomas et al., 1995). كما أن الإضافة الخارجية للمانيتول (Seckin et al., 2009) أو الترهالوز Trehalose (Ding et al., 2004) تزيد من مقاومة القمح للملوحة. وهكذا، فإن العمل على الواقيات الأسموزية قد مهد الطريق لتحسين تحمل النبات للإجهاد الملحي من خلال الهندسة الوراثية (Munns, 2005).

2-1-3-1. التوازن الأيوني

- **الامتصاص الانتقائي للأيونات**

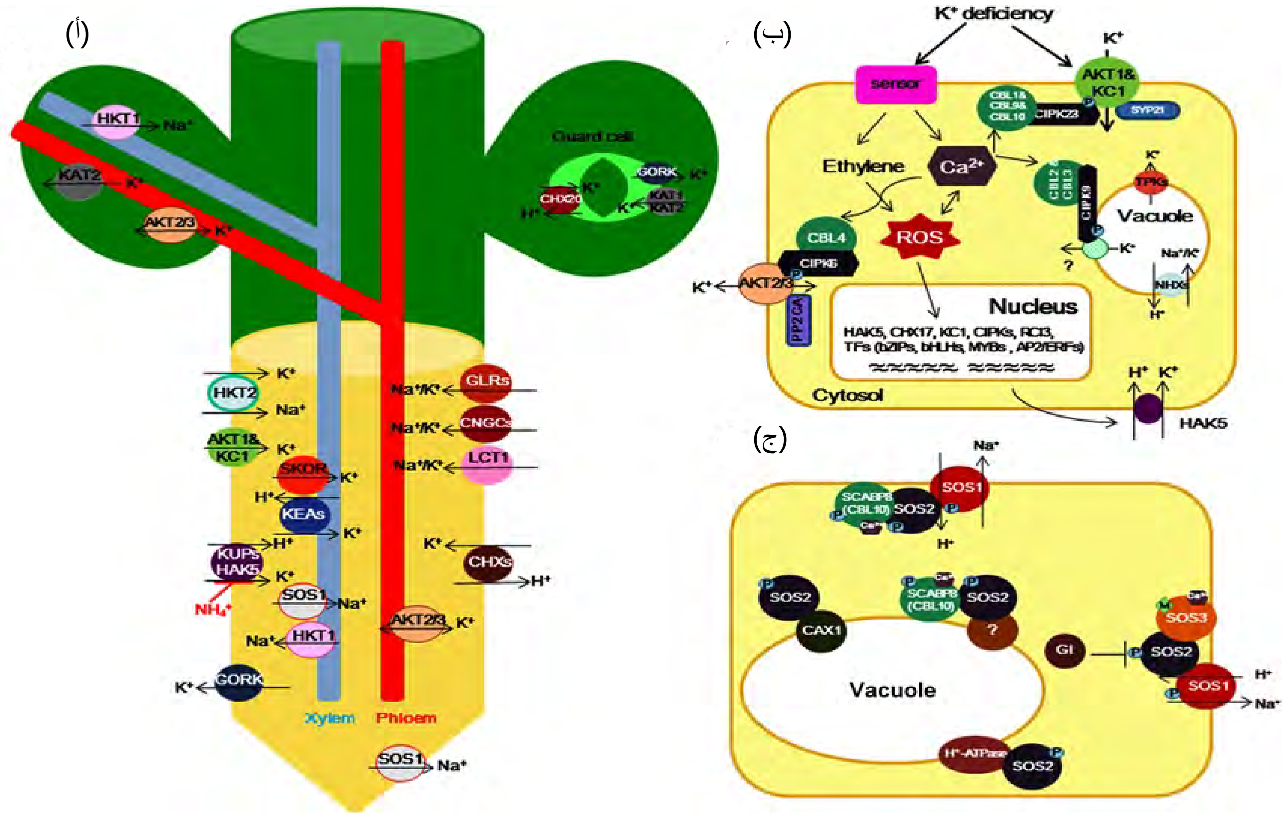
تمتص جذور النباتات عدة عناصر معدنية ذائبة في محلول التربة. بعض هذه العناصر (كالبوتاسيوم) ضروري و بعضها (كالصوديوم) سام و غير مفيد لنمو النبات و تطوره (Luan et al., 2009 ; Zhu et al., 1998). أحد أهم الآثار السلبية للملوحة إحداث تسرب أيونات K^+ من الجذور، مما يحدث اختلال في التوازن الأيوني للسيتوبلازم، وبالتالي اختلال القدرة على النمو والبقاء على قيد الحياة. بناءا على عدة مؤشرات فسيولوجية وزراعية، أمكن البرهنة على وجود علاقة قوية بين تسرب K^+ الذي يسببه كلوريد الصوديوم وتحمل الملوحة في الشعير و القمح (Munns & Tester, 2008).

يتسبب تراكم الصوديوم في تسمم خلايا النباتات السكرية. ينفذ الصوديوم إلى داخل الخلايا عبر قنوات نقل البوتاسيوم (مثل HKT و غيرها، أنظر الشكل 10). نظرا لكون المحافظة على نسبة عالية من K^+ في مقابل Na^+، على مستوى الهيولى يعتبر أمر حاسم في تحمل الملوحة، و ليتم ذلك وجب استبعاد أيونات الصوديوم من الخلايا أو عزلها في الفجوات.

- **التوزيع (الحجز) الفجوي Vacuolar compartimentation**

يتمثل التوزيع أو العزل الفجوي في إزالة أيونات Na^+ الزائدة من الهيولي و حجزها في الفجوة لتجنب سميتها (Flowers et al., 1977). تتم هذه الآلية بفضل وجود ناقل فجوي « Na^+/H^+-antiporter» يستمد طاقته من مضخات البروتونات الفجوية V-H^+-ATPases و V-H^+-PPases (Adams & Shin, 2014). وهكذا، من خلال العزل الفجوي، يمكن للخلية الحفاظ على تركيز منخفض للصوديوم في السيتوبلازم، وبالتالي التقليل من آثاره المدمرة.

من جهة أخرى، يصاحب الزيادة في تركيز الصوديوم في الفجوة تولد ضغط أسموزي قوي يعزز من امتصاص الماء وبالتالي تحسين إنتباج الخلية Cell turgor (Apse & Blumwald, 2007). في النباتات المراكمة "Includer" تكون تدفقات الصوديوم في معظمها تصاعدية مما يسمح للملح بالتراكم في القسم الهوائي على مستوى الفجوات. على النقيض من ذلك، بالنسبة للأنواع الطارحة "Excluder"، معظم الصوديوم الممتص و المنقول إلى الأوراق يتم تصديره من جديد نحو الجذور عبر اللحاء (Berthomieu et al., 2003). تعتبر عملية عزل كلوريد الصوديوم في الفجوات الآلية الرئيسية لإزالة سمية الأملاح في النباتات المحبة للملوحة (Rozema & Schat, 2013)، بينما تستخدم النباتات السكرية آلية إقصاء أو طرح الصوديوم من الخلايا (في الغشاء البلازمي) من الأجزاء الهوائية باتجاه الجذور (Munns, 2002; Davenpor et al., 2005; Apse & Blumwald, 2007).



الشكل 10. رسم موجز لمسارات نقل البوتاسيوم و الصوديوم و كذا مسارات نقل الإشارة المشاركة في تنظيم ذلك.

(أ) شكل يلخص أهم القنوات و نواقل البوتاسيوم و الصوديوم في النباتات. و كما يمكن ملاحظته فإن هذه النواقل تنتشر على طول خط انتقال الماء من الجذر إلى الورقة عبر أنسجة النقل (اللحاء و الخشب) (أنظر في النص).

(ب) شكل توضيحي لنظام الإشارة المتدخل في الاستجابة لعوز البوتاسيوم (نقص البوتاسيوم يحفز نشاط العديد من بروتينات نقل البوتاسيوم خصوصا عبر الكالسيوم، الإثيلين و مواد الأكسجين التفاعلية ROS)

(ج) شكل مبسط لنظام SOS لنقل الإشارة خلال الإجهاد الملحي و هو نظام يراقب دخول و توزيع كل من أيونات الصوديوم و البوتاسيوم في الخلايا مما يجعل فقد هذا النظام يتسبب في ارتفاع شدة حساسية النباتات للملوحة.

تفاعل الفسفرة أو إضافة الجذر الفسفوري إلى البروتين P, phosphorylation

إضافة جذر الميريستول الناتج عن الحمض الدسم ميريستيك إلى البروتين M, myristoylation

حسب Adams & Shin (2014)، يمكن الإطلاع على تفصيل هذه المعلومات من خلال المقال المتوفر مجانا على موقع المجلة أو الرابط التالي: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jipb.12159/pdf

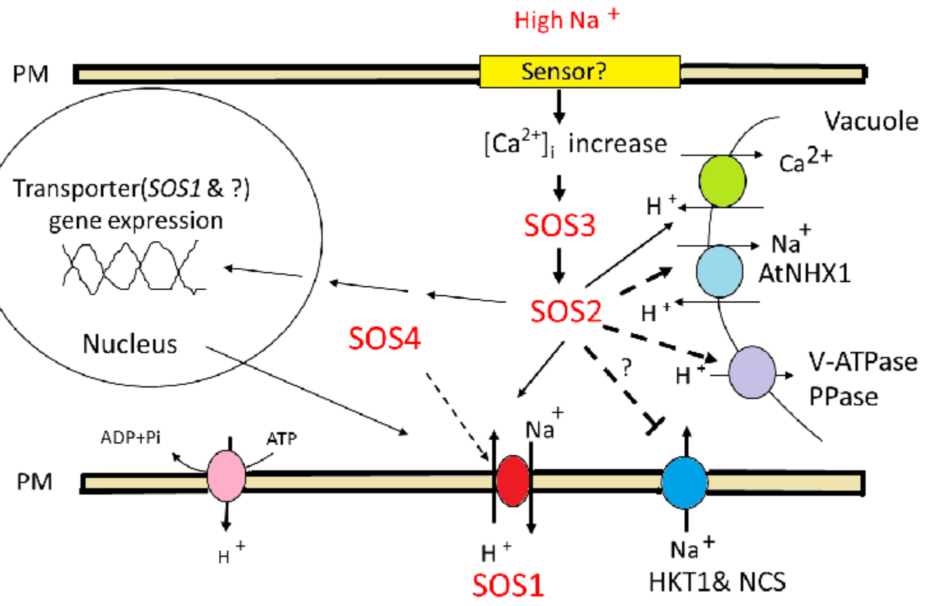
يمكن لبعض النباتات الملحية أن تستبعد الصوديوم و الكلور من خلال غدد و حويصلات سطحية (Golldack, 2004). أحد أبرز الفروق بين النباتات السكرية والنباتات الملحية، هو كون الأولى تراكم و تخزن حوالي 90 % من الصوديوم في قسمها الخضري منها ما لا يقل عن 80 % في الأوراق (Flowers et al., 1977)، بينما تعمل النباتات السكرية على تقييد حركية الأيونات إلى قسمها الهوائي من خلال السيطرة على تدفق الأيونات عبر الأوعية الخشبية (Hasegawa, 2013)، تستخدم النباتات الملحية آلية عزل الصوديوم في الفجوة لتوليد جهد أسموزي في الخلايا، يساعدها على امتصاص الماء من التربة المالحة. وهكذا، يبدو أن تراكم الصوديوم في الفجوات يلعب دور مزدوج يتمثل في حماية السيتوبلازم ضد سمية الصوديوم و مساعدة الخلية على امتصاص الماء (Bartels et Sunkar 2005).

في بعض الحالات، تعزى حساسية النباتات السكرية للملح إلى غياب أو إلى انخفاض نشاط antiporter الفجوي (NHX). فقد أكدت العديد من الدراسات على أساس التعبير عن جينات NHX1 و NHX2 (Barragán et al., 2012) و NHX7 (Zhu, 2002) على أهمية العزل الفجوي للصوديوم في تحمل الملوحة. في حين تبدي النباتات الطافرة (nhx1, nhx2) (Barragán et al., 2012) حساسية مرتفعة تجاه الملوحة، تبدى النباتات ذات التعبير الجيني المفرط مقاومة معتبرة للملوحة كما في الطماطم (Rodríguez-Rosales et al., 2008).

- **استبعاد الأيونات السامة Toxic ions exclusion**

إستراتيجية أخرى تعتمدها النباتات من أجل البقاء على قيد الحياة في ظل ظروف الإجهاد الملحي. تتمثل في استبعاد أيونات Na^+ من الهيولى إلى خارج الخلية. من أجل ذلك، تحد النباتات من دخول أيونات الأملاح و تلفضها في الجدر الخلوية (Hasegawa, 2013; Munns, 2005).

يبدأ الاستبعاد عبر الانتقائية الغشائية للخلايا الجذرية، عن طريق الحد من النفاذية السلبية، وجود نواقل انتقائية و نقل خارج خلوي للأيونات الممتصة (Apse & Blumwald, 2007). تتسبب هذه التغييرات في اختلال في التمثيل الغذائي الذي يؤدي إلى ازدياد في استهلاك الطاقة. كما قد يكون العامل المحدد لوفرة الكربون، أو الطاقة أو سرعة نقل الأيونات. ويتم استبعاد الصوديوم بالتعاون بين مجموعة من بروتينات SOS (الحساسية المفرطة للملح Salt Overly Sensitive) (Zhu, 2003). SOS1 هو عبارة عن Na^+/H^+-antiporter يتخذ موضعه على مستوى الغشاء البلازمي، و يلعب دورا رئيسيا في آلية استبعاد الصوديوم إلى الوسط الخارجي (Zhu, 2003). تعمل بروتينات SOS2 و SOS3 على تنظيم عمل النواقل SOS1 ولكن أيضا نشاط NHX1 antiporter الفجوي (Liu et al., 2000; Zhu, 2002; Qiu et al., 2003). علاوة على ذلك، وللحد من تراكم الصوديوم في القسم الهوائي للنبات، يتفاعل المعقد البروتيني SOS مع الناقل HKT1 (Rus et al., 2001) الذي يقع هو الآخر على مستوى الغشاء البلازمي و هو مسؤول عن إعادة تدوير الصوديوم من الأوراق إلى الجذور عبر اللحاء (Byrt et al., 2014 ; Berthomieu et al., 2003; Hauser & Horie, 2009) (الشكل 11).



الشكل 11. نظام نقل الإشارة SOS و تدخله في تنظيم امتصاص، توزيع و استبعاد أيونات Na^+ من الخلايا

التفاصيل في النص، شكل مقتبس من الموقع https://ag.purdue.edu/hla/zhulab/Pages/default.aspx

هناك علاقة إيجابية واضحة بين الإقصاء و التحمل الملحي كما ثبت في العديد من الأنواع (Storey & Walker, 1998; Lee et al., 2003; Munns & James, 2003; Zhu et al., 2004; Munns et al. 2006). فعلى سبيل المثال، تبدى نباتات الأرابيدوبسيس المعدلة وراثيا بحيث تصبح ذات تشفير مرتفع لـ SOS1 ، تحمل أفضل للإجهاد الملحي مقارنة بالنوع البري (Shi et al., 2002).

التعديل الأيوني Ionic adjustment

ارتفاع تركيزات الفجوة من الصوديوم تستلزم رفع الجهد الأسموزي لباقي التجويفات للمحافظة على حجمها الانتباجي (Amtmann & Leigh, 2010). على الرغم من الدور الفعال الذي تلعبه الواقيات الأسموزية في التعديل الأسموزي للخلايا، يمكن للخلايا أن تعدل من ضغطها الأسموزي عبر القيام بالتعديل الأيوني (Shabala & Cuin, 2008). و يمكن للبوتاسيوم أن يلعب دورا حاسم بهذا الصدد (Munns & Tester, 2008). بالإضافة إلى ذلك، يلعب البوتاسيوم دورا أيضا في السيطرة على انتباج الخلايا (Sairam & Tyagi, 2004). للحفاظ على التفاعلات الأيضية و للحفاظ على نسبة K^+ إلى Na^+ معتبرة، وجب على الخلايا النباتية أن تضبط محتواها من البوتاسيوم ما بين 100 و 200 ملي مول/ل (Maathuis, 2006).

تعتمد K^+/Na^+ على تضافر جهود عدة أنظمة نقل مختلفة تقع على مستوى الغشاء البلازمي و غشاء الفجوة و تنطوي على مسارات كثيرة أو قليلة الانتقائية للأيونات K^+ و Na^+ (Maathuis, 2006; Shabala et Cuin 2008; Amtmann et Leigh 2010). وتشارك فئتين من النواقل في امتصاص أيونات K^+ و Na^+:

• النواقل ذات الجاذبية العالية للبوتاسيوم (عائلة KUP-HAK، « K^+ uptake transporter – high affinity K+ uptake transporter »).

• النواقل ذات الجاذبية الضعيفة اتجاه الكاتيونات (HKT1 "high affinity K^+ transporter" و LCT1 "low affinity cation transporter").

موازاة مع ذلك، هناك ثلاثة أنواع من القنوات المسؤولة عن نقل الكاتيونات أحادية التكافؤ (وبالتالي يحتمل أن تكون قادرة على نقل K^+ و Na^+): KIRCs (« K^+ inward rectifying channels » قناوة تضبط التدفق نحو الداخل للبوتاسيوم)، KORCs (« K^+ outward rectifying channels » قناوة تضبط التدفق نحو الخارج للبوتاسيوم)، VICs (« voltage independent channels » قناوة مستقلة عن الجهد) التي تتميز بانتقائيتها الأيونية وسلوكها الوظيفي (حالة الفتح أو الإغلاق) (Maathuis, 2006). من جهة أخرى، ينقل البوتاسيوم إلى الأجزاء الهوائية للنبات بواسطة قناوة SKOR وNORK لمزيد من التفاصيل ننصح المقالات التالية (Adams & Shin, 2014; Gierth & Mäser, 2007 ; Shabala & Cuin, 2008).

ثبت أن الإفراط في التعبير عن HKT1 في الجذور تحسن من تحمل الملوحة في نبات الأرابيدوبسيس عبر استرجاع أيونات الصوديوم من تيار النتح (الصاعد) وبالتالي يحد من صعوده إلى الأجزاء الهوائية للنبات (Farquharson, 2009). وفقا لـ Zhu (2002)، إضافة البوتاسيوم يقلل من فرط الحساسية لنباتات الأرابيدوبسيس الطافرة SOS، وربما يرجع ذلك إلى محتوى السيتوبلازم المرتفع من البوتاسيوم. كما يمكن رفع النسبة K^+/Na^+ من خلال إضافة أيونات Ca^{2+} القادرة على الحد من نشاط قناوة KORKs (Murata et al., 1998) وكذلك ناقلات الصوديوم VICs (Roberts et Tester, 1997). ويبدو أيضا، أن بعض الواقيات الأسموزية (مثل glycine betaïn و البرولين) قادرة على تحسين نسبة K^+/Na^+ تحت الإجهاد الملحي و ذلك من خلال تأثيرها على ROS.

2-3-1. مضادات الأكسدة وبروتينات نزع السمية

تنتج أشكال الأكسجين التفاعلية (ROS) مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) جذور السوبر أكسيد (O_2^-) و الهيدروكسيل (OH)، أثناء عمليات الإستقلاب الهوائية لكن تزداد وتيرة إنتاجها تحت تأثير إجهادات الوسط، لاسيما الملوحة (Smirnoff, 1998). عند التركيزات الضعيفة يمكن لهذه المواد أن تكون بمثابة إشارات (signal) لحث التعبير عن جينات الاستجابة والدفاع الخلوية (Parent et al., 2008). في نبات الأرابيدوبسيس تم تحديد أكثر من 150 جين تشارك كلها في شبكة معقدة من نظام إزالة السمية (Mittler et al., 2004). الإفراط في إنتاج هذه المواد يسبب ما اصطلح على تسميته بإجهاد الأكسدة، فتتسمم بسببها الخلية (Mahajan et al., 2008). على سبيل المثال، يمكن لجذور الهيدروكسيل،أن تتلف هياكل الكلوروفيل والبروتين والأحماض النووية والدهون، و بالتالي تعيق استقلاب الخلية، وظائفها الفسيولوجية و في نهاية المطاف نمو النبات (Dat et al., 2000; Deinlein et al., 2014). لإبقاء هذه المواد تحت المراقبة، يجب على النبات تفعيل آليات دفاعه المضادة للأكسدة دون انقطاع. لتحقيق ذلك تستعمل النباتات مضادات الأكسدة – غير الإنزيمية – ذات الكتل الجزيئية المنخفضة، مثل المركبات الفينولية، الفلافونويد، الأنثوسيانين، وحمض الأسكوربيك (Ashraf, 2009)،كما أنها توظف مجموعة متنوعة من الإنزيمات مثل ديسموتاز

الفائق (SOD)، الكاتالاز (CAT)، الأسكوربات بيروكسيداز (APX)، الجلوتاثيون S-ترانسفيراز (GST) و الجلوتاثيون بيروكسيديز (GPX) (Noctor et Foyer, 1998; Sairam et Tyagi 2004; Türkan et Demiral 2009;). يمكن لـ SOD القضاء على O_2^- عن طريق حفز تحويلها إلى H_2O_2 الذي هو أقل سمية. كما أن تركيز هذا الأخير يمكن أن ينظم من قبل مجموعة متنوعة من الإنزيمات، مثل APX، CAT و GPX (Parent et al., 2008). فعلى سبيل المثال الإفراط في تشفير SOD يجعل نباتات الأرز و الأربيدوبسيس أكثر مقاومة للملوحة (Tanaka et al., 1999; Wang et al. 2004).

رفع كفاءة أنظمة الدفاع المضاد للأكسدة يحسن من مقاومة النباتات لمختلف إجهادات الوسط (أنظر الجداول الموالية). فعلى سبيل المثال، يؤدي الإفراط في التعبير عن أحد إنزيمات البيروكسيداز في نباتات التبغ إلى تحسين قدرتها على الإنبات تحت الإجهاد الأسموزي (Amaya et al., 1999). وبالمثل، الإفراط في التعبير عن GST و GPX في نباتات التبغ المعدلة وراثيا يحسن من الإنبات والنمو تحت الإجهاد الملحي (Roxas et al., 1997, 2000).

1-3-3. مراقبة النمو (انقسام و استطالة الخلايا)

تتسبب الملوحة على غرار باقي إجهادات الوسط في تراجع نمو النباتات. يعد انخفاض النمو مظهر من مظاهر التكيف مع الإجهاد، إذ يسمح للنبات بتوجيه جزء من طاقته لمجابهة الآثار السلبية للإجهاد (Zhu, 2001). لا تبدي الأنشطة الخلوية نفس الحساسية اتجاه الإجهاد الملحي. تعد قدرة النباتات على استعادة أنشطتها الفسيولوجية، و الحفاظ عليها و تشجيعها أمر حاسم في تحملها للملوحة.

مثل الخلايا الحيوانية، تتوقف الخلايا النباتية مؤقتا عن النمو عندما تتعرض للإجهاد بصورة مفاجئة "حالة الصدمة". أشارت العديد من الدراسات أن هذا "القبض على انقسام الخلايا" المحدث هو نتيجة للتثبيط الممارس من قبل ABA على انقسام الخلايا أو تضاعف الحمض النووي. في الآونة الأخيرة، نشرت العديد من الدراسات التي تدعم بشكل واضح هذا التوجه. في هذا الصدد، فعلى سبيل المثال، تبين أن ABA يستثير التعبير الجيني عن بروتين (ICK1) الذي يلعب دور مثبط لبروتينات CDK "Cyclin-Dependent Kinases" التي تنظم الانقسام الخلوي من خلال تنظيم التعبير الجيني للجينات المتحكمة في عمليات التخليق الحيوي و منه الانتقال من المرحلة G1 إلى المرحلة S في الدورة الخلوية (Tang et al., 2013; Wang et al., 1998).

جدول 1. أهم مضادات الأكسدة الطبيعية و مواقع عملها على المستوى تحت الخلوي.

Antioxidant	Localization of antioxidant	Respective ROS	References
I. Enzymatic			
Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)	Chl, Mit, Per, Cyt, Apo	Superoxide (O_2–)	Bowler et al. (1992), Mittler (2002)
Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)	Per, Gly	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Willekens et al. (1997), Mittler (2002)
Ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11)	Chl, Mit, Per, Gly, Cyt, Apo	H_2O_2	Asada (1999), Bunkelmann and Trelease (1995)
Peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7)	Vac, Cyt, CW	H_2O_2	Asada and Takahashi (1987), Mittler (2002)
Glutathione reductase (GR) (EC 1.6.4.2)	Chl, Cyt, Mit	Reduction of glutathione	Edwards et al. (1990), Creissen et al. (1994)
Glutathione peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.12)	Cyt	H2O2, lipid peroxyl radicals (ROO), organic hydroperoxide (ROOH)	Dixon et al. (1998), Mittler (2002), Hoque et al. (2008)
Glutathione S-transferase GST (EC 2.5.1.18)	Cyt, Mit, ER	Organic hydroperoxide (ROOH)	Roxas et al. (1997), Galle et al. (2005)
Dehydroascorbate reductase (DHAR) (EC 1.8.5.1)	Chl, Mit, Per	Regeneration of ascorbate from dehydroascorbate (DHA)	Asada (1994), Minkov et al. (1999)
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) (EC 1.6.5.4)	Chl, Mit, Per, Cyt	Reduction of monodehydroascorbate (MDA) to give rise ascorbate	Asada (1994), Jimenez et al. (1997), Minkov et al. (1999), Baek and Skinner (2003)
II. Non-enzymatic			
Glutathione (GSH)	Chl, Mit, Per, Cyt, Apo	H_2O_2, hydroxyl radical (OH), singlet oxygen ($1O_2$), dehydroascorbate reductase (DHAR)	Asada (1999), Noctor and Foyer (1998), Jimenez et al. (1998), Mittler (2002)
Ascorbic acid (AsA)	Chl, Mit, Per, Cyt, Apo	H_2O_2, O_2–, OH, $1O_2$	Asada (1999), Noctor and Foyer (1998),
α-Tocopherol	Membranes	$1O_2$, OH, lipid peroxyl radicals (ROO), Organic peroxide (ROOH)	Smirnoff (2000), Mittler (2002), Asada and Takahashi (1987), Mittler (2002), Munne-Bosch (2005), Holländer-Czytko et al. (2005)
Carotenoids	Chloroplast	$1O_2$,	Asada and Takahashi (1987), Mittler (2002)
Flavonoids	Vac	$1O_2$, O_2, OH, peroxyl radicals (ROO), and peroxynitrite (ONOO–).	Buhler and Cristobal, 2000, Vierstra et al. (1982)

Abbreviations: Chl, chloroplast; Mit, mitochondrion; Per; peroxisome; Gly, glyoxisome; Cyt, cytosol; Apo, apoplast; CW, cell wall. (adopted from Mittler, 2002).

جدول 2. مضادات الأكسدة كمؤشرات عن مقاومة الملوحة في مختلف المحاصيل الزراعية.

Antioxidant	Plant/Crop species	Association of antioxidant with salinity tolerance	References
SOD, APX, GR	Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Positive	Sairam et al. (2005)
CAT, POX, APX, GR	Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Uniform increase of these antioxidants in salt tolerant and salt sensitive cultivars	Mandhania et al. (2006)
AsA, CAT	Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Positive	Athar et al. (2008)
APX, CAT	Wheat (*Triticum durum* Desf.)	Positive	Fercha & Gherroucha (2014)
SOD, APX, GPX, GR	Maize (*Zea mays* L.)	Positive	Neto et al. (2006)
SOD	Potato (*Solanum tuberosum*)	Positive only at low salt level, but no at high salt levels difference	Rahnama and Ebrahimzadeh (2005)
SOD, POX	Rice (*Oryza sativa* L.)	Variable response of cultivars differing in salt tolerance	Dionisiosese and Tobita (1998)
SOD, CAT, POX, GR	Rice (*Oryza sativa* L.)	Positive	Khan and Panda (2008)
CAT, POX, GR, α-tocopherol	Cotton (*Gossypium* sp.)	Positive	Gosset et al. (1994, 1996)
POX	*Brassica* spp.	No relationship	Siegal et al. (1982)
SOD, CAT, POX	Canola (*Brassica napus* L.)	Positive	Ashraf and Ali (2008)
GR	Cotton (*Gossypium herbaceum* L.)	Positive	Garratt et al. (2002)
SOD, POX	Sunflower (*Helianthus annuus* L.)	Positive	Davenport et al. (2003)
CAT, GR	Tomato (*Lycopersicon pennellii* L.)	Negative	Shalata et al. (2001)
SOD, APOX, DHAR	Tomato (*Lycopersicon pennellii* L.)	Positive	Shalata et al. (2001)
CAT, APOX, GR	Strawberry (*Fragaria ananassa* L.)	Positive, but the expression of these enzymes different in salt tolerant cultivars was	Turhan et al. (2008)

Abbreviations: SOD, superoxide dismutase: CAT, catalase; POX, peroxidase; APOX, ascorbate peroxidase; GR, glutathione reductase (adopted from, Ashraf, 2009).

جدول 3. بعض المحاصيل المعدلة وراثيا لرفع قدرة أنظمتها المضادة للأكسدة و منه قدرتها على تحمل الملوحة.

	Antioxidant gene transformed	Antioxidants over-expressed in transgenic line	Remarks	References
Arabidopsis thaliana	Mn-SOD	Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, CAT, POX	Two-fold increase in expression of Mn-SOD	Wang et al. (2004)
Arabidopsis thaliana	DHAR1	Dehydroascorbate reductase (DHAR), ascorbate	Substantial improvement in salt tolerance	Ushimaru et al. (2006)
Rice (*Oryza sativa* L.)	Mn-SOD	SOD, APOX	1.7 fold increase in SOD and1.5 fold in APOX	Tanaka et al. (1999)
Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)	Gly I and Gly II	High reduced glutathione (GSH) and reduced to oxidized glutathione (GSH:GSSG) in transgenic line	Reduced accumulation of methylglyoxal (MG)	Yadav et al. (2005)
Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)	Chl-APX5	APOX	3.8-fold enhanced activity of APX; enhanced tolerance to salt and water stress	Badawi et al. (2004)
Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)	TPX2	Cell wall associated POX	transgenic seeds were able to retain more water available for germination	Amaya et al. (1999)
Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)	katE	CAT	transgene increased the resistance of the chloroplast's translational machinery to salt stress	Al-Taweel et al. (2007)
Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)	GST and GPX	Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase	Transgenics had higher levels of glutathione and ascorbate than wild-type plants	Roxas et al. (2000)

Abbreviations: SOD, superoxide dismutase: CAT, catalase; POX, peroxidase; APX, ascorbate peroxidase; GR, glutathione reductase (adopted from Ashraf, 2009).

2. القمح الصلب و استجابته للملوحة

2-1.القمح الصلب

القمح الصلب أو القاسي *Triticum turgidum (L.) subsp. turgidum (L.) convar. Durum (Desf.)* (Ficco et al., 2014) هو نبات أحادي الفلقة من عائلة النجيليات *Poaceae*، و قبيلة *Triticeae* وينتمي إلى جنس الحنطة *Triticum*. القمح الصلب، ثاني أهم أنواع الحنطة بعد القمح اللين أو قمح الخبز (*T. aestivum* L)، عبارة عن عشب حولي متوسط الطول مع أوراق غمدية مسطحة و ازهار قمي (سنبلة) يتكون من أزهار مثالية (Bozzini, 1998). كما هو الحال مع القمح اللين، هناك أصناف من القمح الصلب ذات قوام شبه قزم (-semi dwarf). يتكون النظام + الجذري الدائم. تكون الساق أسطوانية، قائمة، جوفاء، وتنقسم إلى سلاميات. تمتلك بعض أصناف القمح الصلب سوق صلبة (Clarke et al., 2002).

يتكيف القمح الصلب بصورة جيدة في المناطق ذات المناخ الجاف نسبيا، مع أيام دافئة وليالي باردة خلال موسم النمو، وهو بالضبط مناخ البحر الأبيض المتوسط. يحدث إنبات البذور عند درجات الحرارة المنخفضة و التي قد تصل إلى 2 درجة مئوية، ولكن درجة الحرارة المثلى هي 15°C (Bozzini, 1998).

على المستوى العالمي، يبلغ متوسط المساحة المزروعة من القمح القاسي سنويا ما يقرب من 13.5 مليون هكتار، مع متوسط إنتاج يصل إلى حوالي 30 مليون طن سنويا (Royo et al., 2009). يعتبر الاتحاد الأوروبي (وخصوصا ايطاليا واسبانيا واليونان) أكبر منتج للقمح القاسي، بمتوسط ثمانية ملايين طن سنويا. كندا هي ثاني أكبر منتج بـ 4.6 مليون طن سنويا تليها تركيا (4 ملايين طن) والولايات المتحدة (3.5 مليون طن) (Royo et al., 2009) (الجدول 4).

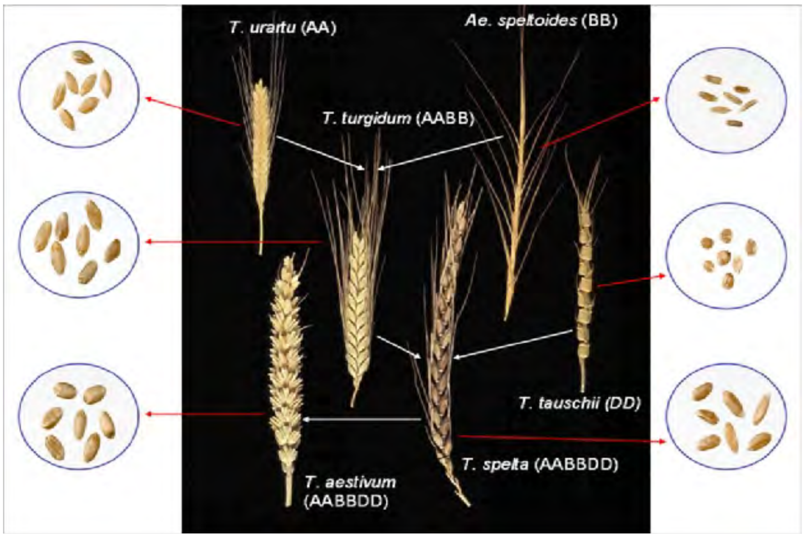
الجدول 4. مردود القمح الصلب ("ن/هكتار) في الجزائر و بعد دول العالم

	Area (000 ha)			Yield (t/ha)			Production (000 t)		
Country	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Algeria	1.673	1.945	1.900	1.5276	1.7639	1.6842	2.554	3.432	3.200
Australia	13.400	13.500	12.500	2.0455	2.2151	1.8284	27.410	29.905	22.855
Canada	8.543	9.497	10.441	2.9567	2.8645	3.5942	25.261	27.205	37.529
Egypt	1.284	1.336	1.418	6.5427	6.5822	6.6681	8.407	8.795	9.460
France	5.825	5.303	5.323	6.1427	7.5991	7.2541	35.994	40.300	38.613
Italy	1.732	1.879	1.888	3.8334	4.1324	3.7114	6.641	7.767	7.009
Mexico	0.662	0.578	0.634	5.4777	5.6567	5.2934	3.627	3.274	3.357
Morocco	3.088	3.142	3.204	1.9487	1.2342	2.1640	6.017	3.878	6.933
Tunisia	0.772	0.754	0.500	2.0791	2.0202	1.9520	1.605	1.523	0.976
USA	18.496	19.797	18.274	2.9418	3.1153	3.1720	54.413	61.677	57.966

حسب FAO http://wheatatlas.org/visualizations

في منطقة حوض المتوسط يزرع القمح الصلب تحت ظروف الزراعة البعلية (غير المروية)، و تتميز هذه المنطقة بقلة الأمطار و تذبذبها كما تتميز بوجود نسبة كبيرة من إجهادات الوسط غير الحيوية و الحيوية. الجفاف و الملوحة خلال الإنبات و نشوء الشتلات، الجفاف و الحرارة المرتفعة خلال فترة امتلاء الحبوب، نقص المواد الغذائية، ومشاكل التربة والأمراض والآفات كلها معوقات رئيسية للإنتاج الحي للقمح. حوض البحر الأبيض المتوسط هو أيضا أكبر مستهلك لمنتجات القمح القاسي كالسباغيتي، المعكرونة، الكسكس، الفريك، بالإضافة إلى العديد من المنتجات التقليدية المعروفة في الجزائر، كالمطلوع، الرخسيس، الحرشة، التريدة، الرشتة، البراج، ... الخ (Kezih et al., 2014).

يعتبر القمح الصلب من أقدم المحاصيل الزراعية التي استأنسها الإنسان منذ 10000 سنة، و هو الطراز الرباعي الصيغة الصبغية الوحيد الذي لا زالت زراعته منتشرة إلى يومنا هذا (Shewry, 2009 ; Charmet, 2011). ظهر هذا النوع من التزاوج بين الأشكال البرية للقمح *Triticum monococcum* و *Aegilops speltoides* L.، التي لا يزال من الممكن العثور عليها حتى اليوم في بلدان الشرق الأوسط (Croston et Williams, 1981 in Feldman et Levy, 2009). تشكلت أنواع القمح على اثر سلسلة من تغيرات الصيغة الصبغية (Ploidy changes)، حيث أظهر التحليل الجيني أن التغييرات الجوهرية قد حدثت خلال تشكيل التغاير في التعداد الصبغي allopolyploidy و من خلال التضاعف الوراثي والخلوي لعبت هذه التغيرات دورا رئيسيا في تطوير الصيغة الوراثية للقمح القاسي AABB الجينوم (N = 4X = 282) 4 (Feldman et Levy, 2009 ; Charmet, 2011) كما هو مبين في الشكل 12.



الشكل 12. العلاقات التطورية بين جينومات أنواع مختلفة من القمح المزروع والبري (Shewry, 2009)

الشكل 13. إستئناس الحبوب.

المنطقة المظللة بالأخضر الداكن على الخريطة تبين منطقة الشرق الأدنى (فلسطين، الأردن، تركيا، سوريا، إيران، العراق) المعروفة باسم "الهلال الخصيب" حيث تم انتشال أقدم البقايا الأثرية من الشعير، قمح einkorn (*T. monococcum*)، قمح emmer (*T. Dloccum*). التنوع الطبيعي للأقارب البرية في المنطقة و المؤشرات الجزيئية ومعلومات تسلسل الحمض النووي تدعم كون منطقة الهلال الخصيب وأطرافها الشمالية هي الموقع الأصلي لاستئناس الحبوب "*Triticeae*"، ومهد الزراعة منذ حوالي 10.000 سنة (Feuillet et al., 2008).

يعد تحديد الأصل الجغرافي للقمح واحدة من قضايا البحث التي أثارت الكثير من الجدل في القرن الماضي، وقد طرحت بهذا الصدد العديد من الفرضيات (Valdeyron, 1961). بالاعتماد على الكثير من المعطيات الأثرية و النشوئية/التطورية "phyllogenetics" تبين أن هناك ثلاثة مراكز محتملة لنشوء القمح، ألا وهي: الشرق الأوسط، الشرق الأدنى وشمال أفريقيا (MacKay, 2005) (الشكل 13).

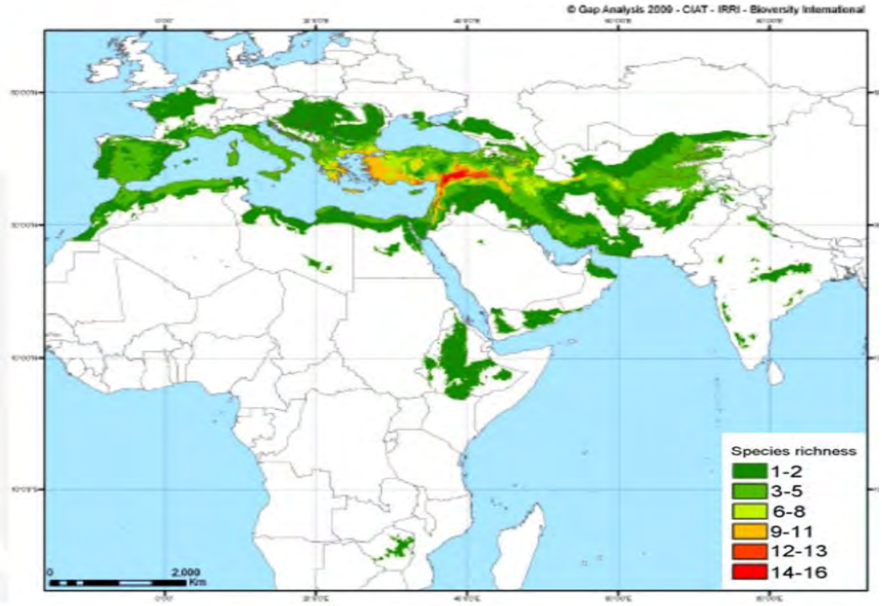
في الوقت الراهن تغطى زراعة القمح الصلب رقعة شاسعة من المناطق الجافة و الساخنة من الشرق الأوسط، وشمال أفريقيا و أوروبا و البحر الأبيض المتوسط (الجدول 4 و الشكل 14).

في الجزائر، تتم زراعة القمح أساسا في الشمال و المناطق التي يتجاوز فيها التساقط 300 مم (الشكل 14). هذا المجال ملائم نسبيا لتطور هذا النوع من الزراعة على الرغم من أنه يتميز بانتشار العديد من إجهادات الوسط مثل الجفاف و درجات الحرارة المرتفعة المميزة لمناخ البحر الأبيض المتوسط (Smadhi & Zella, 2012).

منذ فجر التاريخ كان و لازال القمح بمختلف أنواعه الغذاء الرئيسي للإنسان (Ruel, 2006). إذ يعتبر المصدر الرئيس للبروتين (20 %) (Gillies et al., 2012)، و هو من أهم المحاصيل التي توفر أو تغطي 95 % من الاحتياجات الغذائية للبشر ، بالإضافة إلى كون القمح مصدر ممتاز لتغذية الحيوانات و الاستعمالات الصناعية المتعددة.

القمح هو ثالث أهم محصول (بعد الذرة و الأرز)، إذ يبلغ الإنتاج العالمي للقمح (بأنواعه المختلفة) حوالي 663 مليون طن سنويا (http://www.igc.int/;/http://faostat.fao.org). تتم زراعته على مساحة تزيد عن 200 مليون

هكتار (International Grains Council, 2002). يحتل القمح الصلب حوالي 8 % من هذه المساحة، و تقع حوالي 70 % منها تحت ظروف البحر الأبيض المتوسط (Habash et al., 2009).



الشكل 14. إنتشار زراعة القمح عبر حوض البحر الأبيض المتوسط، شمال إفريقيا، أوروبا و الشرق الأوسط
(Charmet, 2011)

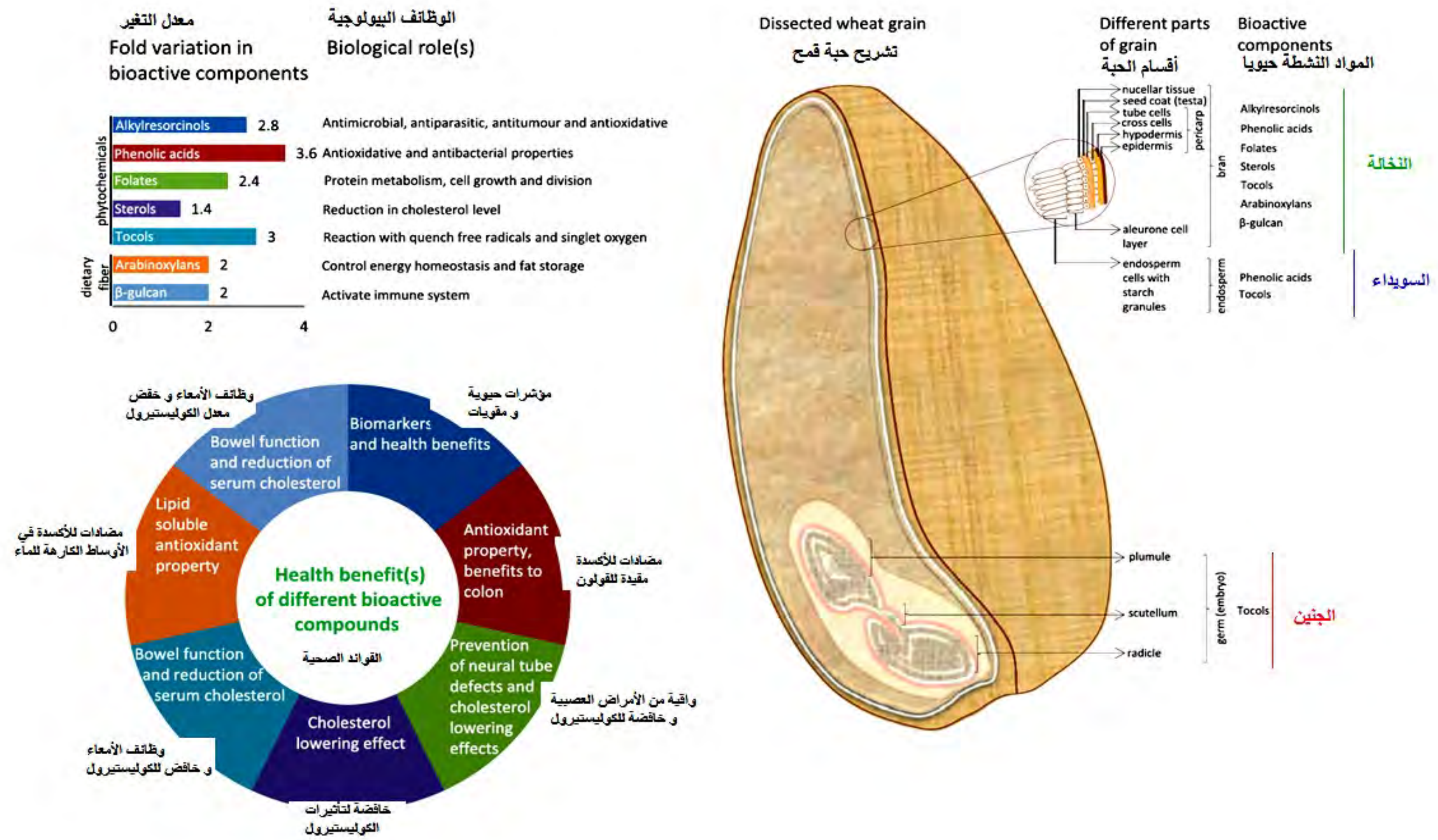
بذرة القمح بيضاوية الشكل، قليلة أو كثيرة التحدب، يزينها أخدود عميق و يبدو في نهايتها العلوية القليل من الشعر، بينما تكون الجهة السفلية أكثر تفلطحا أين يستقر الجنين. تختلف حبوب القمح في أحجامها و أشكالها و ألوانها باختلاف الأصناف. يتراوح طول البذرة ما بين 3 و 8 ملم، عرضها ما بين 2 و 4 مم، سمكها ما بين 2.5 و 3.5 مم، أما وزنها فيتراوح ما بين 20 و 50 ملغ (Feillet, 2000).

تتكون حبات القمح (الشكل 15) من ثلاثة أقسام، حيث تمثل النخالة (bran) من 13–17 % ، الجنين (germ) 2–3 %، و السويداء (endosperm) من 81–84 %. المكونات الرئيسية للسويداء هي النشا (60–75 %)، البروتينات (6–20 %)، الماء (~10 %)، والدهون (1.5–2 %).

ترجع خصائص القمح غير العادية إلى وجود **الغلوتينات** التي تشكل بروتينات التخزين الخاصة بالسويداء و التي تتألف من قسمين اثنين ، البروتينات القابلة للذوبان في الكحول أو "gliadins" غير القابلة للذوبان في الكحول أو"glutenins" (Osborn, 1907; Barak et al., 2015) يحتوي كل جزء من حبة القمح على مواد ذات فاعلية بيولوجية، و لها تأثيرات بالغة الأهمية على صحة الإنسان خصوصا ما تعلق بأمراض القولون و الكوليستيرول (الشكل 16) (Balyan et al., 2013).

الشكل 15. مختلف أقسام بذرة القمح

(http://www.fooducate.com/blog/wp-content/media/wheat-kernel.jpg)



الشكل 16. الموضع، الدور و الفوائد الصحية لمختلف مكونات بذور القمح (صمم هذا الشكل بالاعتماد على دراسات أجريت على أكثر من 150 نمط وراثي) (Balyan et al., 2013)

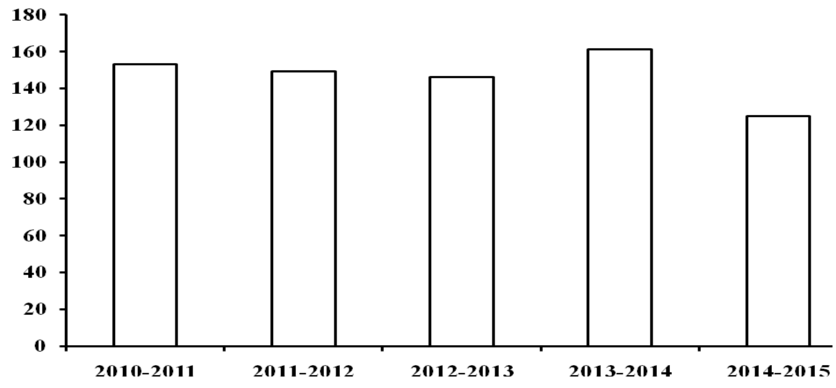
2-2.استجابة القمح للملوحة

يعد القمح من النباتات الزراعية الحساسة إلى متوسطة المقاومة للملوحة (Maas & Poss, 1989)، و يختلف ذلك باختلاف ضروبه (أنماطه) و أصنافه و مراحل نموه (الجدول 5)، بالإضافة إلى درجة و مدة تعرضه للإجهاد الملحي (Chauhan et al., 2008). و يعتبر القمح الصلب أكثر تحسسا للملوحة من القمح اللين، و ذلك لغياب الجينوم D الذي يبدوا أنه يحتوى على الكثير من الجينات المتدخلة في مقاومة الملوحة (الجدول 6).

يستجيب القمح للملوحة الوسط وفق مراحل نموه المختلفة بدرجات متفاوتة (Iqbal et al., 1999) و بخاصة في مرحلة الإنبات، حيث تكون المراحل الأولى للنمو حساسة أكثر للملوحة من المراحل الأخيرة (Williams et al., 1998). كما يؤدي ارتفاع مستوى الأملاح في وسط النمو في المراحل الأولى، إلى ضياع جزء كبير من الإنتاج في المراحل الأخيرة (Iqbal et al., 1999).

يعمل الإجهاد الملحي أيضا، على خفض الجهد المائي للأوراق، الانتفاخ الخلوي (Mahdid et al., 2011, Borrelli et al., 2011) و معدل إنبات البذور بشكل يتناسب طردياً مع درجة ملوحة الوسط (Almanssouri et al., 2001 ; Fercha & Gherroucha, 2014 ; Waall & Jeschlike,1999)، كذلك تؤثر الملوحة سلبا على نمو الفارع من خلال خفض الانقسام و الاستطالة الخلوية للمرستيمات القمية (Munns & Rawson, 1999). كما أن عدد العقد و طول النبات و عدد الخلف الناتجة عند النضج تنخفض مع تزايد معدل الملوحة (Alam & Azmi,1990) و بالتزايد المفرط للملوحة ينخفض مردود القش و الحبوب (Iqbal et al.,1999).

يستجيب القمح للملوحة كغيره من المحاصيل الزراعية المتحملة (Termaat et al.,1986) مع اختلافات طفيفة، حيث يقوم بالتعديل الأسموزي من خلال مراكمة الأملاح و بعض المواد العضوية خاصة البرولين والسكريات (Fercha & Gherroucha, 2014 ; Fercha et al., 2011 ; Fercha, 2011) .



شكل 17. عدد المقالات التي نشرت في الخمس سنوات الماضية و التي اهتمت باستجابة نبات القمح للملوحة

أنجز بالإعتماد على قاعدة (Google scholar) أجري البحث يوم 2014/11/01.

جدول 5. التأثير السلبي للملوحة على مختلف مظاهر و أعضاء النمو في القمح

Growth stage	Organ/Tissue/process	References
Germination/ seedling growth	Embryo, radicle, coleoptile, seed reserves, etc.	El Malki et al. (2007); Fercha & Gherroucha (2014); Gholamin & Khayatnezhad (2013); Sharifi et al. (2014); Sourour et al. (2014); Zhou et al. (2010); Qiao et al. (2013); Akbarimoghaddam et al. (2011); Sun et al. (2004); Fábián et al. (2011); Kahrizi & Sedghi (2013); Kashem et al. (2000); Soltani et al. (2006)
Adult growth	Shoot (meristem, nodes, internodes, ramification, elongation, etc.)	Ahmad et al. (2014); Aldesuquy et al. (2013); El Malki et al.(2007); Fercha & Gherroucha (2014); Kahrizi et al. (2013); Mojid et al.(2014) ; Rao et al. (2013); Sharifi et al. (2014); Sourour et al. (2014); Qiao et al. (2013); Akbarimoghaddam et al. (2011)
	Leaf (number, surface, elongation, etc.)	Aldesuquy et al. (2014); Arif & Tomos (1993); Caruso et al. (2008); Harvey & Thorpe (1986); Hu & Schmidhalter (2007); Hu et al.(2005); Iqbal (2003a); Iqbal (2003b); Iqbal (2005); James et al. (2002); Mguis et al. (2013); Semenova et al. (2014)
	Root (meristem, ramification, elongation, etc.)	Cuin et al. (2011); Kara & Kara (2010); Pahlavan-Rad et al. (2010); Shafi et al. (2010); Tahira et al. (2006)
Reproduction	Grain yield, spike, flour quality, etc.)	El Malki et al. (2007); Kahrizi et al. (2013); Grieve et al. (1992); Sipos et al. (2014); Toyosaki & Sakane (2013); Houshmand et al. (2014); Katerji et al. (2005)

ملخص عن الابحاث التي اهتمت بدراسة تأثير الملوحة على مختلف مظاهر و أعضاء النمو في القمح (التفاصيل في النص).
أنجز بالإعتماد على قاعدة (Google scholar) أجري البحث يوم 2014/11/01.

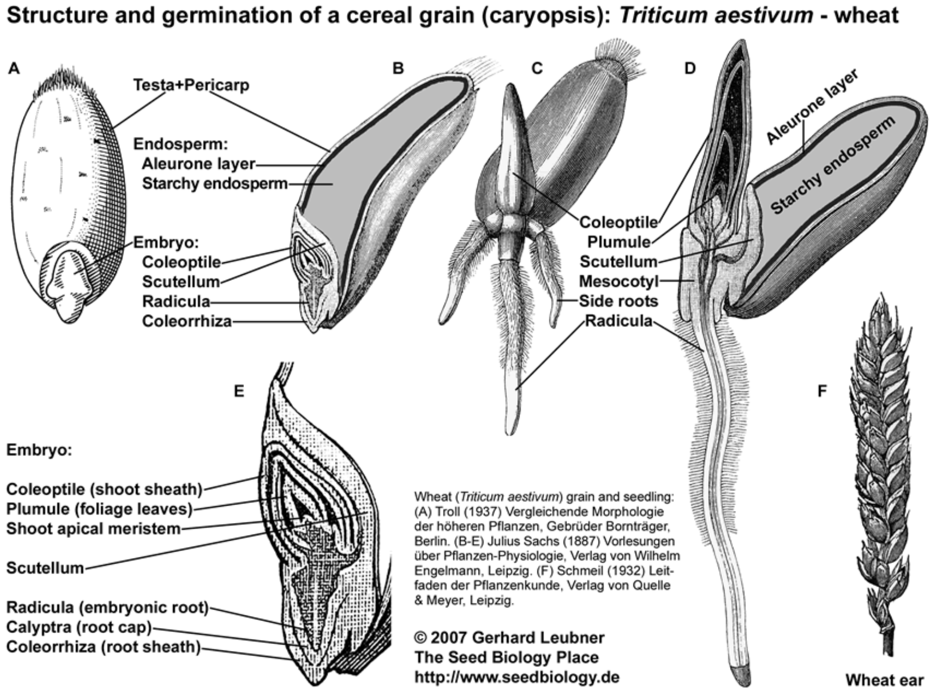
جدول 6. بعض الجينات المتدخلة في مقاومة القمح للملوحة

Gene	Mean function	Response/effect	Reference
2 GPX	Chloroplastic anti-oxidative system	improve salt and H_2O_2 tolerances in Arabidopsis	Zhai et al. (2013)
LEA	Stress proteins/defense	induced by salinity	Bhagi et al. (2013)
PI4K	Signal transduction	confers tolerance to drought and salt in Arabidopsis	Liu et al. (2013)
TaACO1	Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, involved in ethylene synthesis using ascorbate	negatively regulates salinity stress in Arabidopsis thaliana	Chen et al. (2014)
TaCIPK29	Signal transduction	confers salt stress tolerance in transgenic tobacco	Deng et al. (2013)
TaERF3	Ethylene response factor	promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat	Rong et al. (2014)
TaHPS	α-amylase inhibitor	improves the salt and drought tolerance of transgenic Arabidopsis	Xiao et al. (2013)
TaMYB19	R2R3 type of MYB transcription factor	enhanced abiotic stresses in Arabidopsis	Zhang et al. (2014)
TaNHX3	Vacuolar Na+/H+-antiporter	enhances salt stress tolerance in tobacco	Lu et al. (2014)
TaRUB1	Ubiquitination	improves the salt and drought tolerance of transgenic Arabidopsis	Zhang et al. (2013)
TaSIP	Transcription factor	enhance drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice	Du et al. (2013)
TaSK5	Signal transduction	confers salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis	Christov et al. (2014)
TaSOS1	Ion transporter	increased in salt tolerant cultivars	Ramezani et al. (2013)
TaSOS4	Ion transporter	increased in salt tolerant cultivars	Ramezani et al. (2013)
TaSRHP	Transcription factor	contributes to enhanced resistance to salt stress in Arabidopsis thaliana	Hou et al. (2013)
TaSRK2C1	Signal transduction	increases tolerance to dehydration, salt, and low temperature in transgenic tobacco	Du et al. (2013)
TaSTG	Salt tolerance gene	induced by salinity	Wang et al. (2013)
Ta-UnP	Unknown function	enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice	Liang et al. (2014)
TdERF1	Ethylene response factor	potentially involved in salt-stress responses.	Makhloufi et al. (2014)
TdSOS1	Na+/H+- antiporter	confers high salt tolerance to transgenic Arabidopsis	Feki et al. (2014)
V-ATPase	Vacuolar H+-pump	induces salt tolerance in Arabidopsis thaliana	He et al. (2014)
VP	Vacuolar H+-pyrophosphatase	improves the salt and drought tolerance of transgenic tobacco	Li et al. (2014)

ملخص لأحدث الدراسات (2014/2013) بالاعتماد على قاعدة بيانات Google scholar.

3. إنبات البذور و الملوحة

البذرة (حبة أو نواة) في علم النبات، هي وسيلة تكاثر النباتات البذرية وانتشارها، بالإضافة لكونها مخزنًا للطاقة و الغذاء، و هي عبارة عن بويضة مخصبة تكونت من مبيض الزهرة. تعرف البذرة على أنها نبات جنيني (Embryon) صغير في حالة سكون أو سبات مؤقت. تتكون البذرة من جنين يحاط بغلاف يسمى قصرة (أنظر الشكل 18)، و من كمية من المدخرات الغذائية التي تكون مختزنة في بعض أجزاء الجنين، أو منفصلة عنه في نسيج خاص يسمى سويداء البذرة (الإندوسبيرم Endosperm)، توصف البذرة في الحالة الأولى بأنها لا إندوسبيرمية، وفي الثانية بأنها إندوسبيرمية. يتم اختزان المواد الغذائية في البذرة اللاإندوسبيرمية غالباً في الفلقتين (http://ar.wikipedia.org/wiki/بذرة).



الشكل 18: بنية بذرة القمح و إنباتها

(http://www.seedbiology.de/structure.asp).

تعتبر البذور من أهم مصادر الغذاء للإنسان و الماشية، إذ تغطي حوالي 40 % من السعرات الحرارية و 20 % من البروتينات التي يحتاجها الإنسان يوميا (Balyan et al., 2013). كما تشكل الحبوب الجزء الأكبر من المادة الجافة المستهلكة (90 % من غذاء الإنسان). يشكل كل من القمح، الذرة، الأرز و الشعير حوالي 70 % من المواد الغذائية والأعلاف التي يستهلكها البشر والحيوانات على الترتيب. انتشار الحبوب في النظام الغذائي البشري حديث المنشأ نسبيا. ظهرت الزراعة إلى الوجود في الهلال الخصيب (الشكل 13)، وهي منطقة تشمل ما يعرف حاليا بتركيا والعراق وفلسطين والأردن، قبل ما لا يقل عن 10 000 عاما وهي فترة زمنية قصيرة نسبيا في سياق الوجود الإنساني (Jones et al., 2013).

3-1. إنبات البذور

بعد فترة السكون التي يقضيها الجنين داخل البذرة الجافة، و حتى تنبت البذرة و تتحول بالتدريج إلى بادرة ثم إلى نبات كامل فإنها تحتاج إلى توفر عدد من الشروط الداخلية و الخارجية، ومن الشروط الداخلية نذكر على سبيل المثال لا الحصر: حيوية الجنين، نضج البذرة وسلامتها من التسوس و العفن، ومن سمات نضج البذرة تخلصها من المواد الكابحة للنمو و المثبطة له من مثل حمض الأبسيسيك (Abscissic Acid) الذي يتخلق في بعض البذور ليساعد الجنين على البقاء في حالة السكون داخل البذرة، و يضمن سباته حتى تتوفر له الظروف المناسبة لإنباته. و كثير من البذور يعتمد إنباتها على إزالة تلك المواد المثبطة للنمو، ويتم ذلك بواسطة الضوء و الحرارة، أو بإفراز مواد مضادة للمواد المثبطة – مثل الجبريلينات- بواسطة الجنين ذاته في داخل البذرة، كما ثبت حديثا أن حمض الأسكوربيك (AsA) و الماء فوق الأكسوجيني (H_2O_2) يلعبان دورا حاسما في هذه العملية (Hartmann et al., 2011).

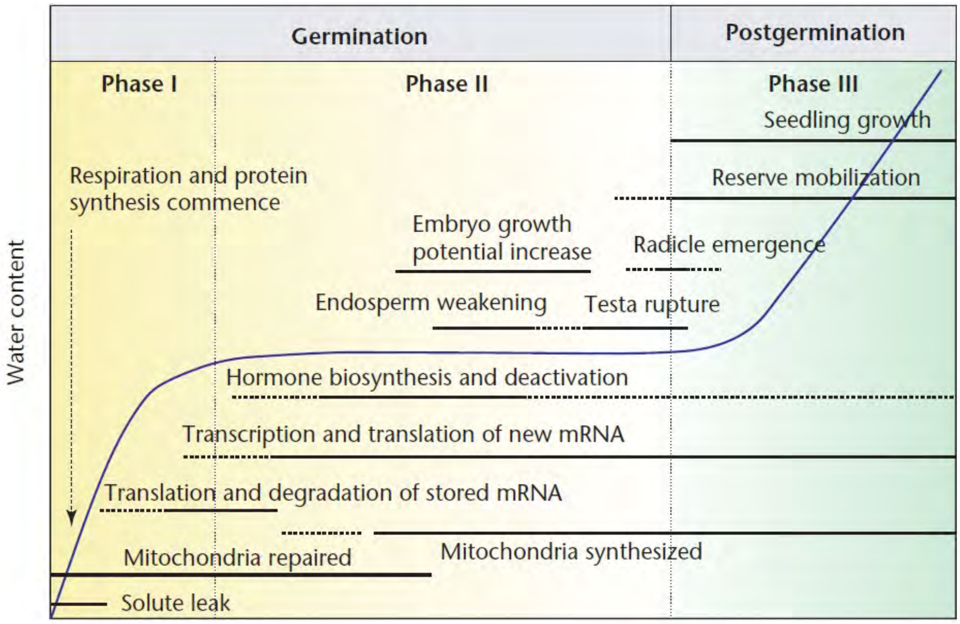
ومن الشروط الداخلية أيضا، إمتصاص البذور للماء والأكسجين عن طريق فتحات دقيقة في أجسامها مثل السرة و النقير، خاصة و أن بعض أنواع البذور مغطاة بطبقة خارجية صلبة قد تحول دون وصول القدر الكافي من الماء والأكسجين إلي الجنين إلا بعد أن تمر تلك الطبقة الخارجية للبذرة بسلسلة من النشاطات الطبيعية أو الكيميائية أو الميكروبية التي تعين علي تمزيقها. و مثل هذه البذور قد يصعب استنباتها إلا بعد خدش غطائها الخارجي، أو غسلها و نقعها في الماء لفترة محددة، أو تعريضها للضوء أو لدرجات الحرارة المنخفضة حوالي 5°م لمدة تتراوح بين 4 و 6 أسابيع (Hartmann et al., 2011).

أما عن الشروط الخارجية فأولها توفر الماء بالمواصفات المناسبة (منخفض الملوحة) لأنه أهم شروط الإنبات، وبالقدر الكافي لأن غمر البذور بالماء قد يؤدي إلي إفسادها لمنعه الأكسجين من الوصول إلي الجنين في داخل البذرة (اختناق الجنين)، وكذلك توفر القدر الكافي من الأكسجين، درجات الحرارة والإضاءة المناسبتين، وذلك لأن بعض البذور تنشط عملية إنباتها في الضوء بينما البعض الآخر يفضل الظلام (Hartmann et al., 2011)، كما هو الحال مع بذور القمح.

3-2. التغيرات التي تطرأ علي البذرة في أثناء إنباتها:

يبدأ إنبات البذور بتشرب هذه الأخيرة للماء، و يتميز بزيادة ثلاثية الأطوار (ثلاث مراحل) في الوزن الطازج للبذور تنتج عن الاختلاف في امتصاص الماء من طور لأخر (الشكل 19)؛ و توصف المراحل الثلاث على النحو التالي:

- تتميز المرحلة الأولى بامتصاص أولي سريع للماء.
- يليها مرحلة هدوء (استرخاء) تتميز بضعف امتصاص الماء و تنشيط عمليات الأيض
- تتميز هذه المرحلة بزيادة امتصاص الماء الذي يصاحبه الزيادة في الوزن نتيجة نمو الجذير.



الشكل 19. تعاقب أحداث إنبات البذور و نمو البادرات.

يختلف الوقت اللازم لكل حدث من عدة ساعات إلى عدة أسابيع، اعتمادا على العوامل الوراثية الكامنة والظروف السائدة أثناء الإنبات، وخاصة درجة الحرارة وتوفر المياه. حسب (Bewley, 1997; Nonogaki et al., 2007).

و تعتمد هذه العمليات على الجهد المائي لخلايا البذرة و الجنين (لمزيد من المعلومات أنظر المراجعات التالية: Bewley & Black, 1993 ; Bewley, 1997; Rajjou et al., 2012).

■ المرحلة الأولى - امتصاص الماء بالتشرب Water Uptake by Imbibition:

تكون بذور معظم النباتات جافة (معدل الرطوبة أقل من 10%) عند نضجها. ينتج عن ذلك جهد مائي جد منخفض قد يصل إلى - 100 و حتى- 350 ميغاباسكال (MPa). التشرب هو آلية فيزيائية بحتة مرتبطة بالقوى البنيوية (matric forces) يحدث في البذور الجافة عبر أغشيتها النفوذة للماء سواء أكانت هذه الأخيرة حية أم ميتة، في حالة سكون أم نشاط. يتم التشرب في خطوتين أثنتين (الشكل 19). في البداية، من 10 إلى 30 دقيقة الأولى يكون امتصاص الماء سريعا. تلي هذه الخطوة عملية تبلل بطيء لأنسجة البذرة و تتميز بكونها عملية خطية وتدوم حوالي ساعة بالنسبة للبذور الصغيرة و عدة ساعات (5 حتى 10 ساعات) بالنسبة للبذور كبيرة الحجم (Hartmann et al., 2011)، كما في حالة القمح.

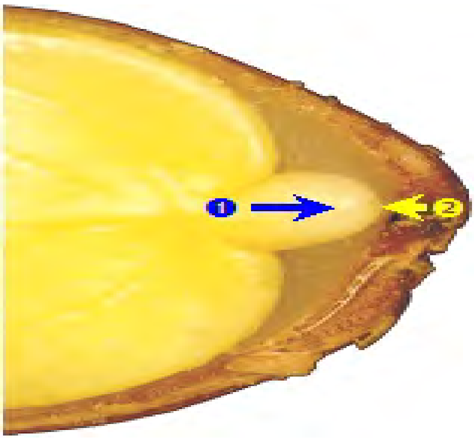
■ **المرحلة الثانية- مرحلة كمون الإنبات** Lag Phase of Germination:

على الرغم من كون مرحلة الكمون فترة تتميز بتراجع حاد في أخذ البذور للماء إلا أنها تتميز بنشاط فسيولوجي عالي (Hartmann et al., 2011). فهي مرحلة تتميز بنشاط أيضي مرتفع إذ تستعد فيها البذرة للإنبات. و من الأنشطة الخلوية الحاسمة في إنبات البذور في الظروف الطبيعية الملائمة:

- نضج الخنيدرات (Mitochondria Maturation)
- تخليق البروتين: بمجرد تشكل الجسيمات الريبوزومية تشرع البذرة في تخليق البروتين. تتشكل بروتينات جديدة في غضون الساعات القليلة التي تلي بداية التشرب للبذور. كما أن بعض البروتينات الجديدة التي تتخلق أثناء مرحلة الكمون تعتبر ضرورية لإنبات البذور.
- أيض (تعبئة) المدخرات الغذائية للبذرة. تنشط في هذه المرحلة إنزيمات هدم جزيئات المدخرات الغذائية إلى مكوناتها البسيطة التي تستعمل كوقود لإنتاج الطاقة و لبنات لبناء البروتين كالأحماض الأمينية. أيض المدخرات يساعد أيضا على إنتاج المواد النشطة أسموزيا (مثل السكروز) و التي تسمح بتغير الجهد المائي للجنين استعدادا لبزوغ الجذير.
- تخليق إنزيمات خاصة، خصوصا منها المتعلقة بإرخاء الجدر الخلوية القاسية داخل أنسجة الجنين (embryo) أو في الأنسجة المحيطة بالجنين (embryo-surrounding tissues).

■ **المرحلة الثالثة- بزوغ الجذير** Radicle Protrusion:

يعتبر بزوغ الجذير أول قرينة ظاهرية على إنبات البذور، و يرجع الفضل في ذلك إلى استطالة الخلايا بدل انقسامها (Barrôco et al., 2005; Haber et al., 1960)، على الرغم من أن بزوغ الجذير يسبقه نشاط إنقسام خلوي ملحوظ في قمة الجذير (Hartmann et al., 2011). يخضع بزوغ الجذير لمراقبة مزدوجة من قوى متعاكسة في الاتجاه، ألا وهي قدرة النمو في الجنين و المقاومة الفيزيائية التي تبديها الأنسجة المحيطة به (الشكل 20).

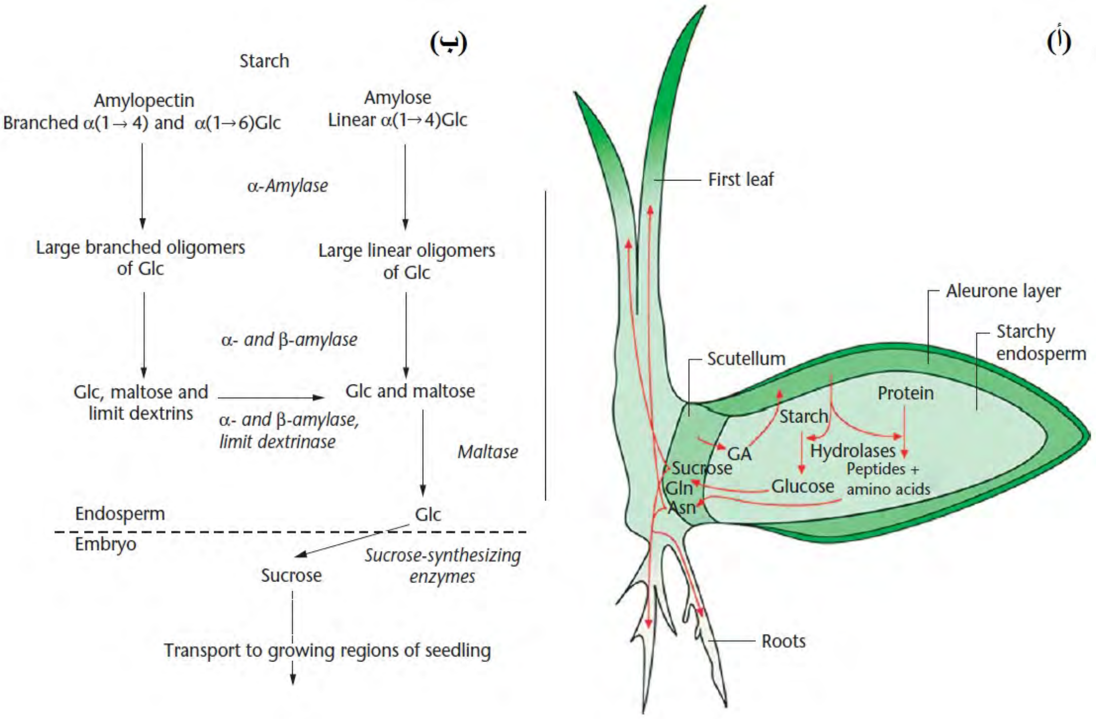


الشكل 20. العوامل الداخلية المتحكمة في بزوغ الجذير(Hartmann et al., 2011)

3-3. إنبات البذور و التوازن الهرموني:

تحت الظروف البيئية غير الملائمة للإنبات تبقى البذور في حالة سكون للمحافظة على قدرتها على الإنبات، بينما تنبت عندما تصبح الظروف أكثر ملائمة للإنبات (Miransari & Smith, 2014). من بين العوامل الكثيرة التي تراقب نمو البذور، تلعب الهرمونات النباتية دورا بارزا في ذلك (Graeber et al., 2012). على الرغم من كون جل الهرمونات النباتية تلعب دورا في تنظيم إنبات البذور و نمو البادرات سيتم التركيز في هذه المراجعة على نوعين أساسين فقط، ألا و هما: حمض الأبسيسيك، الجبرلينات (أنظر لاحقا).

خلال الإنبات، تحدث عملية تعبئة (شحن) المدخرات التي تراكمت داخل أنسجة التخزين في البذرة (السويداء عند القمح) خلال نضجها. هضم هذه المدخرات يزود الجنين و من ثم البادرة بالطاقة و اللبنات الضرورية للنمو إلى أن تصبح البادرة ذاتية التغذية (photo-autotrophic). يساهم في هذه العملية العديد من إنزيمات الهضم مثل: الغلوكوسيداز، البروتياز، و كذا الليباز ...الخ (الشكل 21). اتضح في الآونة الأخيرة أن إنبات البذور يترافق بتنفيذ برنامجين مختلفين. يعمل الأول على تنظيم الإنبات و يقع تحت سيطرة حمض الأبسيسيك، بينما يعمل البرنامج الثاني على تنظيم تعبئة المدخرات و هو مستقل عن ABA و ربما يخضع لسيطرة الجبرلينات (Holdsworth et al., 2008).



الشكل 21. تعبئة مدخرات البذرة أثناء عملية الإنبات (Nonogaki, 2008).

(أ)- أهم الحوادث التي تلي تشرب البذرة للماء و تعبئة مدخراتها الغذائية

(ب)- مراحل تحليل النشاء و الإنزيمات المساهمة في ذلك.

4-3. حمض الأسكوربيك و إنبات البذور:

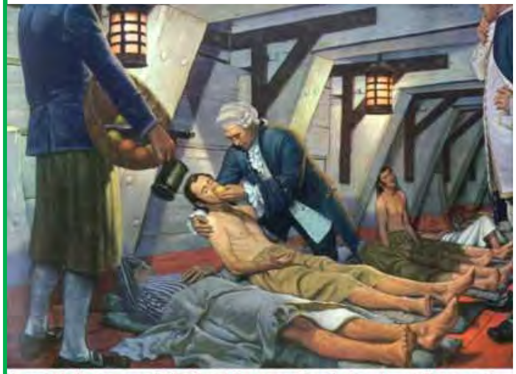
منذ اكتشافه في أواخر العشرينات من القرن الماضي (1928م، أنظر المربع 1)، ربما لم تحظ مادة كيميائية أخرى بما حظي به حمض الأسكوربيك من الاهتمام (Davies et al., 1991).باستثناء خصائصه المضادة للأكسدة، لا زال السؤال عن وظائف حمض الأسكوربيك مطروح إلى يومنا هذا (Arrigoni & De Tullio, 2002; Herschbach et al., 2010). يعد AsA مضاد الأكسدة المحب للماء الأكثر شيوعا و انتشارا في المملكة النباتية (Chinoy, 1984; Gallie, 2013 ; Zhang, 2013). يلعب أدوارا بالغة الأهمية، فهو معامل مرافق للعديد من الإنزيمات، يتدخل في عمليتي التمثيل الضوئي و التنفس الخلوي (Chinoy, 1984; Gallie, 2013 ; Zhang, 2013)، كما يتدخل في تخليق العديد من الهرمونات النباتية (Prescott & John, 1996; Pastori et al., 2003) بما في ذلك الجبرلينات و حمض الأبسيسيك (De Tullio & Arrigoni, 2003)، كما يساعد على استرجاع العديد من مضادات الأكسدة الخلوية المهمة كعديد الببتيد جلوتاثيون و الألفا توكوفيرول الذي يحمي الأغشية الخلوية (Smirnoff, 2011).

تجلت أهمية حمض الأسكوربيك في تنظيم نمو النباتات و إنتاجيتها منذ بدايات القرن العشرين (Reid, 1937). و قدر العديد من الباحثين أن هذا الحمض يلعب دورا هاما كمنظم لنمو النبات (Garg & Kapoor, 1972)، إذ أنه يشارك في تشكل العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين (Garg & Kapoor, 1972)، يحفز تخليق ARNm (Bharti & Garg, 1970)، ينظم الإزهار (Pbice, 1966)، و يشجع ظهور البراعم الجانبية. في الآونة الأخيرة تبين أيضا، أن AsA يلعب دورا هاما في تنظيم عملية التمثيل الضوئي، الإزهار و الشيخوخة (Davey et al., 2000; Barth et al., 2006)، مكافحة الآثار السلبية للإجهاد الملحي على مختلف النباتات كالطماطم (Shalata & Neumann, 2001)،القمح اللين (Al-Hakimi & Hamada, 2001; Athara et al., 2008)، القمح الصلب (Fercha et al., 2011) و الشعير (Agami, 2014)، دوار الشمس (Khan et al., 2013) و الفول (Azooz et al., 2013) ...الخ.

في حين تحتوى على كمية قليلة نسبيا من الديهيدرو أسكوربات (فيتامين ج- الشكل المؤكسد)، تكون البذور "المحافظة" (Orthodox). قبل الإنبات، خالية تقريبا من AsA و الذي تشرع في تخليقه بمجرد شروعها في الإنبات (De Gara et al., 1997). في بداية الإنبات، يتوافق غياب AsA مع غياب إنزيمات اختزاله مثل الأسكوربات بيروكسيداز (Ascorbate peroxidase or APX)، التي تكون على ثلاثة أشكال، و يبدأ تخليقها بشكل متزامن مع تخليق AsA (De Tullio & Arrigoni, 2003).

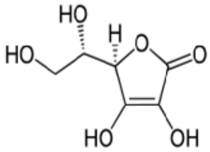
بمجرد شروعها في الإنبات، تسترجع بذور القمح جميع أنشطتها الأيضية بما في ذلك أيض الأوكسجين الذي ينتج عنه تخليق الجذور الحرة و جزيئات ROS . التراكم السريع لهذه المواد السامة يتسبب في حدوث ما يصطلح عليه "بإجهاد الأكسدة" (الشكل 21). تسبب الجذور الحرة و ROS العديد من الأضرار على مستوى الأغشية، البروتينات، الأحماض النووية، و قد تؤدى الشتلة إلى حد الموت إذا لم تنقذها أنظمتها الدفاعية المضادة للأكسدة (Ishikawa et al., 2012).

المربع 1 **حمض الأسكوربيك ... "بين الماضي و الحاضر"**



James Lind, a surgeon in the Royal Navy, conducted clinical tests that proved that citrus fruits and their juices would cure and prevent scurvy, the disease which killed a million seamen between 1600 and 1800. In this painting he is shown aboard HMS *Salisbury* in 1747.

عرف حمض الأسكوربيك منذ عام 1734م باعتباره العامل الفعال في عصير الفواكه و الخضار الذي يحمي من الإصابة بمرض الأسكربوط (Scurvy) و ذلك بفضل أعمال الطبيب و الفيزيائي الأسكتلندي James Lind (1716-1794م)، لكن بقية هويته لغزا عجز أمامه العلماء لأكثر من قرنين من الزمان (Chick, 1953).



قصة الاكتشاف؟

كان عالم الكيمياء الحيوية المجري ألبرت فون زنت جيورجي Albert von Szent Györgyi صاحب فكاهة. حيث قام في النسخة الأولى من المقال الذي هم بنشره ليميط اللثام عن اكتشافه الجديد، و المتعلق بسكر سداسي الكربون مجهول الوظيفة، أطلق عليه إسم **"السكر المجهول"** "ignose". و عندما أقترح أحد المراجعين (الممتحنين) للمقال تغيير هذا الاسم الغريب، سماه **"سكر الله أعلم"** "godnose". ليعاود إليه المقال من جديد و يطلب منه أن يكون "علميا أكثر" في تسميته لهذه المادة، فقرر تسميتها **"حمض الهيكسورونيك"** « Since the exact constitution of the reducing substance is unknown, I propose to refer to it as a hexuronic acid. » (Szent-Gyorgyi, 1928). لم تمر إلى 4 سنوات ليتبين أن المادة التي تشفي مرض الأسكربوط (Scurvy) و التي اتفق على تسميتها فيما بعد بالفيتامين ج "Vit. C" ما هي في الحقيقة إلا حمض الهيكسورونيك، لتتم تسميتها في نهاية المطاف بحمض الأسكوربيك (Ascorbic acid, AsA ou ASC) بالتعاون بين زنت-جيورجي و نورمن هاورث (Svirbely and Szent Györgyi, 1932) و يحصل كل منهما على جائزة نوبل سنة 1937م.

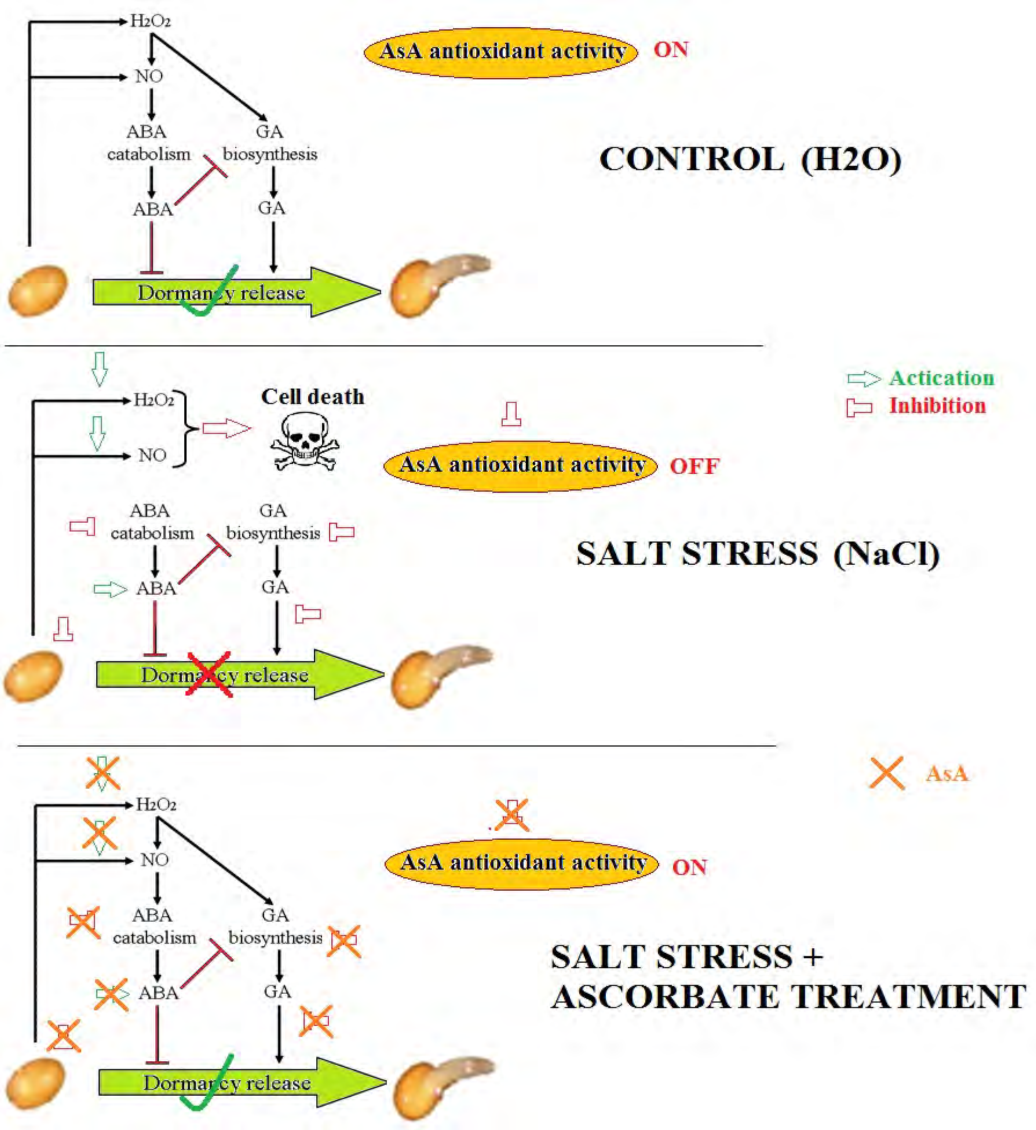
حتى عند توفر كل الظروف الملائمة للإنبات، يؤدي تسارع التنفس إلى تراكم المواد المؤكسدة و يتسبب في الإضرار بالشتلة، و من هنا تبرز أهمية التخليق السريع لـ AsA باعتباره مادة مضادة للأكسدة خصوصا في الساعات الأولى من الإنبات (De Tullio & Arrigoni, 2003). تزيد الشدة التنفسية (تنفس الصيانة) في البذور المنتشة أو الشتلات عند تعرضها إلى أي نوع من إجهادات الوسط اللاحيوي (كالملوحة، الجفاف، البرودة الخ). و نتيجة لذلك تتسارع لديها وتيرة تخليق ROS و تضعف أنظمتها الدفاعية ضد ROS بالإضافة إلي التأثيرات النوعية المتعلقة بكل نوع من إجهادات الوسط.

أشارت دراسات حديثة إلى مساهمة حمض الأسكوربيك على غرار جزيئات ROS في التنظيم الهرموني لإنبات البذور (Lee et al., 2010; Ye et al., 2012) (الشكل 21). حيث أشار Ye et al.(2012) إلى أن AsA يتدخل في تنظيم التأثير المتعلق لـ ABA و GAs على إنبات البذور. كما أشار Chen et al. (2014) إلى أن إنزيم ascorbate peroxidase 6 (APX6) يحمي بذور الأربيدوبسيس من إجهاد الأكسدة و يتوسط التفاعل بين جزيئات ROS، ABA و الأوكسين في تنظيم الإنبات.

3-5. آثار الإجهاد الملحي على الإنبات وإنشاء الشتلات:

يمكن للملوحة أن تؤثر سلبا على جل مظاهر النمو في القمح (الجداول 5 و 7)، إذ يمكنها أن تؤخر أو تمنع إنبات البذور (Al-Karaki, 2001)، أو تحد من نمو الشتلات (Hameed et al., 2008)، و بالتالي تحد من إنتاجية القمح (فرشة، 2001 ; Paulsen, 1987). إنبات البذور هي مرحلة حاسمة لإنشاء الشتلات، نموها و قوتها. تعد مرحلة الإنبات من أكثر المراحل تحسسا لإجهادات البيئية، وذلك بسبب تعرض البذور، التي تكون بالقرب من

السطح، إلى بيئة ديناميكية أو كثيرة التغير (Hamdy, 1999). يمكن للإجهاد الملحي أن يسبب إجهادا أيونيا من خلال تراكم الأيونات السامة في أنسجة الجنين. و منه فإن معدلات الإنبات تنخفض مع زيادة تركيز كلوريد الصوديوم (Almansouri et al., 2001 ; Fercha et al., 2014).



الشكل 22. نموذج مقترح لتفسير التداخلات المحتملة بين H_2O_2، NO، ABA و GA في تنظيم سكون و إنبات البذور في الظروف العادية أو المجهدة ملحيا قبل أو بعد المعاملة بواسطة حمض الأسكوربيك. (مقتبس عن Liu et al., 2010).

في الظروف غير المجهدة، يؤدي ترطيب البذور إلى ارتفاع محتواها من H_2O_2 و NO. يزيد H_2O_2 من هدم ABA عبر تنشيط تخليق NO كما يعمل أيضا على تنشيط تخليق GA. يعمل التركيز المرتفع لـ ABA على تثبيط تخليق GA. لذا فإن التوازن بينهما يراقب سكون و إنبات البذور في الظروف المجهدة ملحيا، تزداد معدلات H_2O_2 و NO نتيجة ازدياد تخليقها و كذا تراجع النشاط المضاد للأكسدة المعتمد على AsA مما يتسبب في موت الخلايا. بالإضافة إلى ارتفاع محتوى البذور من ABA نتيجة ضعف امتصاص البذور للماء مما يمنع إنبات البذور. عند المعاملة بحمض الأسكوربيك، يقلل هذا الأخير أو يعكس التأثيرات الناتجة عن الملوحة مما يعيد الأمور إلى نصابها مما يساعد البذور على الإنبات.

يمكن للملوحة أن تؤثر على الإنبات و النمو إما عن طريق خلق جهد أسموزي (Osmotic stress)، يمنع الجنين من امتصاص المياه أو عن طريق الآثار السامة للأيونات (خصوصا Na^{+}) التي تتراكم في أنسجة الجنين (Atak et al., 2006). باعتبارها كنموذج جيد لدراسة تحمل الملوحة. يعد الكشف عن البذور التي تبدي مقاومة مرتفعة من الأمور التي ستساعد على تطوير أصناف جديدة ذات مقاومة عالية للملوحة (Eskandari & Kazemi, 2011).

عند البذر، تتعرض المحاصيل الشتوية مثل القمح للإجهاد الملحي أكثر من غيرها، نظرا لكون التربة قد تحتوي على نسب عالية من الأملاح في هذه الفترة و ذلك نتيجة ارتفاع معدل التبخر خلال فصل الصيف فتهاجر بذلك الأملاح إلى سطح الأرض (Maghsoudi-Moudi & Maghsoudi, 2008، الشكل 1). للحصول على إنتاج مرضي في الظروف الملحية، يجب أن تنبت البذور و يجب على الشتلات أن تمر بقوة و سرعة من خلال طبقة الملح في التربة و البقاء على قيد الحياة (Huang et al., 2003). في ظل هذه الظروف، فإن النمو القوي للشتلات هو الصفة الأهم لضمان الإنشاء الجيد للمحاصيل.

في محاولة لفهم أي آليتي الإجهاد الملحي الأكثر تأثيرا على إنبات بذور القمح، خلص Almansouri et al. (2001) إلى أن الملوحة المعتدلة تعمل فقط على تأخير إنبات بذور القمح. و لا يمكن أن يعزى تثبيط إنبات البذور (السكون المحدث salt-iduced dormancy) إلى تثبيط تعبئة المدخرات الغذائية. كما أن الآثار الضارة لملح كلوريد الصوديوم قد تكون ذات صلة بالتراكم التدريجي للأيونات السامة، خصوصا أيونات الصوديوم (Almansouri et al., 2001). لكن اتضح لاحقا أن الملوحة تتسبب في تراكم المواد المؤكسدة مما قد يتسبب في تسمم الخلايا و موتها (Zheng et al., 2009) (الشكل 22). اتضح أيضا أن الملوحة تثبط إنبات البذور من خلال خفض نظام الدفاع المضاد للأكسدة خصوصا المعتمد على حمض الأسكوربيك (Hameed et al., 2014 ; Hu et al., 2012 ; Garg et al., 2012).

الجدول7. ملخص للدراسات التي تناولت تأثير الملوحة على إنبات و نمو بادرات القمح

Stage	Species	References
Seed germination	Bread wheat (*T. aestivum* L.)	Xu et al. (2011) ; Francois et al. (1986) ; Zheng et al. (2009) ; Sarin & Narayanan (1968) ; Xu et al. (2006) ; Lei et al. (2005); Kaya et al. (2009)
	Durum wheat (*T. durum* Desf.)	Fethi et al. (2013) ; Sayar et al. (2010) ; El Malki et al. (2007) ; Sourour et al. (2014); Mammadov (1999); Berrebbah & Réda, M. (2013) ; Fercha & Gherroucha (2014)
Seedling growth	Bread wheat (*T. aestivum* L.)	Sarin & Narayanan (1968) ; Lei et al. (2005) ; Kaya et al. (2009)
	Durum wheat (*T. durum* Desf.)	Francois et al. (1986); Sayar et al. (2010) ; El Malki et al. (2007); Sourour et al. (2014) ; Berrebbah & Réda, M. (2013); Fercha & Gherroucha (2014)

4. قوة البذور و تحفيزها:

خلال الإنبات، تكون البذور قادرة على التكيف مع بيئات جد مختلفة. على الرغم من أن هذه القدرة على التكيف تسمح بإنشاء جيد للبادرات و لو في بيئة معادية، نادرا ما تتمكن البذور من التعبير عن قدرتها الكامنة(قوتها) بشكل متجانس (Irfan, 2005). و يمكن أن يعزى هذا العجز إلى الاختلافات الوراثية (درجة النضج)، الفيزيائية (حجم البذور)، أو الفسيولوجية (درجة السكون،... الخ). لكن هذا القصور في الأداء المتجانس للإنبات و نمو البادرات هي صفة غير مرغوب فيها في الزراعة الحديثة، وخاصة في البيئات التي تتميز بملوحة التربة (Irfan, 2005). و لذلك فمن الضروري تحسين أداء الإنبات و نمو البادرات (قوة) تحت ظروف الإجهاد لتحقيق عوائد مقبولة و تلبية الاحتياجات الغذائية لعدد متزايد من السكان. و يعتقد أن التكنولوجيات الحيوية، مثل تحفيز البذور "seed priming"، تسمح بتحقيق هذا الهدف (McDonald, 2000).

1-4. قوة البذور:

يمكن تعريف قوة البذور على أنها: "*تلك الخصائص التي تحدد القدرة على البزوغ السريع و المتجانس و إنتاج شتلات طبيعية تحت مختلف ظروف الوسط*" (AOSA, 1983). تكون مجموعة البذور قوية (حيوية) عندما تتمكن من الإنتاش بصورة جيدة حتى في الظروف غير المثالية للنوع النباتي الذي تنتمي إليه (FAO, 2011). تعتبر نسبة الإنبات مؤشرا جيدا على قدرة البذور على الإنبات و إعطاء نبات سليم تحت الظروف العادية. في حين، تقاس قوة البذور (تقاس بـ vigor index) بقدرتها على النهوض/البزوغ والبقاء على قيد الحياة في ظل الظروف القاسية. فقدان القدرة على الإنبات هي الخطوة الأخيرة (و ليست الأولى) لعملية طويلة من تدهور البذور (الفقدان التدريجي للحيوية). الانخفاض في قوة البذور و التغيرات الفسيولوجية الأخرى تحدث قبل فقدان القدرة على الإنبات. لذلك قد تبدي البذور إنباتا مقبولا لكن قوتها تكون ضعيفة (FAO, 2011).

لا يمكن للبذور أن تمارس وظائفها البيولوجية إلا إذا كانت حية. و لذلك، فإن انتقاء البذور على أساس التجانس الفيزيائي (مثل الحجم، اللون، الشكل، ...الخ) لصنف ما حتى و إن كان مقاوم سيكون من دون طائل إذا كان الإنبات وقوة البذور منخفضان أو إذا لم تنجح هذه البذور في الإنبات عند زراعتها. الفرق بين بذرة (graine) من وجهة نظر بيولوجية و بذرة (semence) من وجهة نظر زراعية، هو أن الأولى قد تنبت و قد لا تنبت، أما الثانية فيجب أن تنبت. لهذا السبب فإن ارتفاع معدل إنبات البذور هو من المواصفات الفنية الهامة للغاية (FAO, 2011 ; McDonald, 2000).

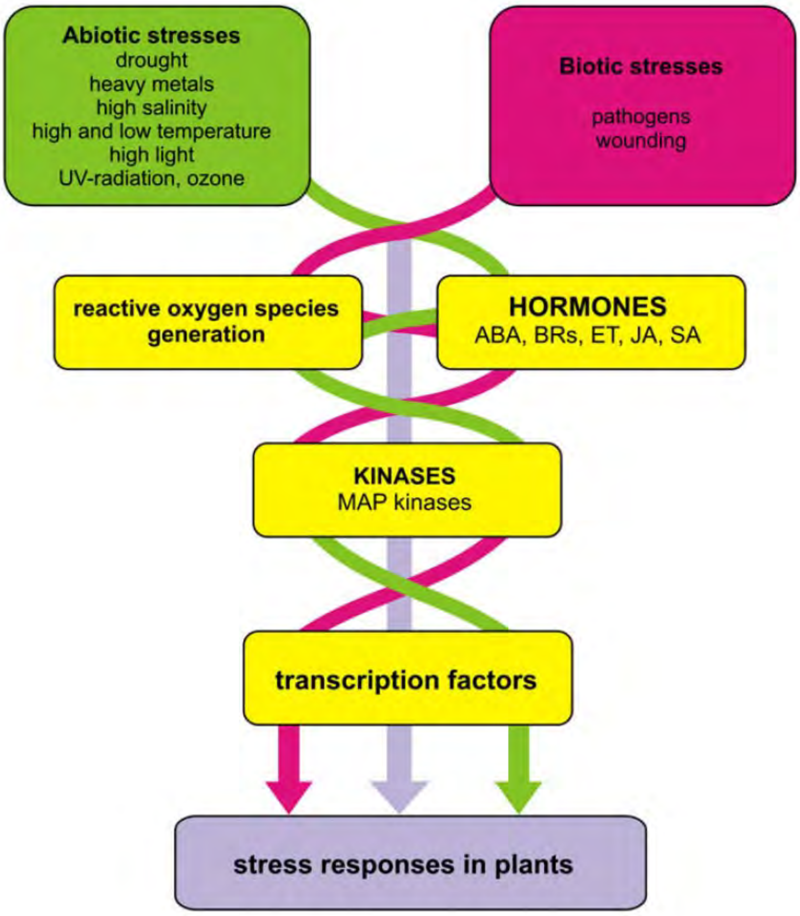
2-4. تحفيز البذور:

على مدار السنوات القليلة الماضية، برزت تقنية تحفيز البذور (تقوية البذور seed invigoration، توضيب البذور seed conditioning) باعتبارها إستراتيجية واعدة في إدارة إجهادات الوسط لأنها تحمي النباتات من

مختلف الإجهادات الحيوية و غير الحيوية دون التأثير على البيئة و الإنسان (المربع 2). و علاوة على ذلك، توفر تقنية تحفيز البذور خيار ذكي وفعال وواقعي لحماية النباتات بصورة فعالة (Goellner & Conrath, 2008).

غالبا ما تكون إجهادات الوسط كالجفاف والملوحة ودرجات الحرارة القصوى و إجهاد الأكسدة مترابطة فيما بينها، و تتسبب في أضرارا مشتركة. ونتيجة لذلك، فإن هذه الإجهادات المتنوعة في كثير من الأحيان تُفَعِّل مسارات لنقل الإشارات و استجابات خلوية متماثلة كما يلخصه الشكل 23 (Bajguz & Hayat, 2009).

يمكن لتحفيز البذور تنشيط مسارات نقل الإشارة في المراحل المبكرة من النمو كما يعمل على تحريض أنظمة الدفاع لدى النبات. ومع ذلك، تبقى الآليات الجزيئية الدقيقة وراء هذا التأثير غير معروف بشكل تام، و يعتقد بأن هذا التأثير مرتبط بتراكم بروتينات إشارات تبقى خاملة إلى أن تتعرض الخلايا لتحفيز جديد كتعرضها للإجهاد الشيء الذي يؤدي إلى تحفيز شديد لهذه البروتينات فيحدث تضخيم الإشارة، مما يؤدي إلى مزيد من فعالية، سرعة و كثافة الاستجابات الدفاعية (Conrath et al., 2007).



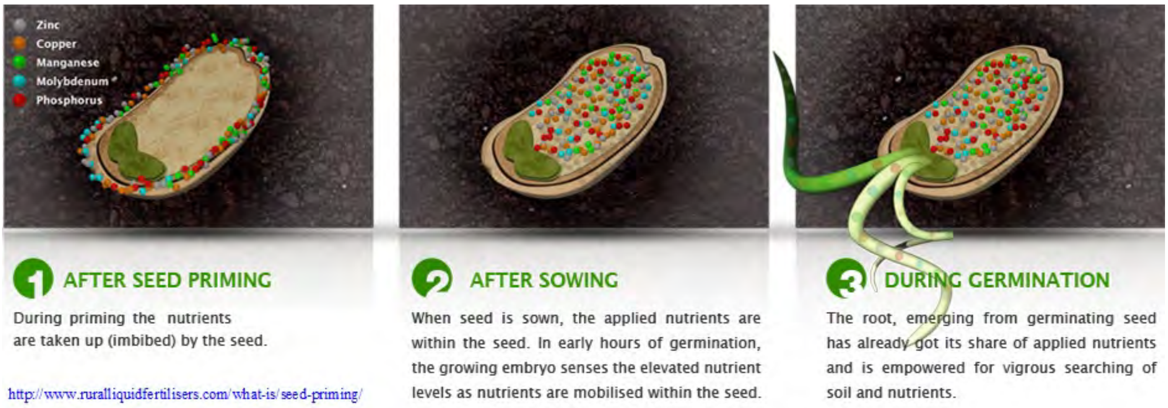
الشكل 23. نموذج عام لشبكات نقل الإشارة في النبات المجهد (Bajguz & Hayat, 2009)

BRs, brassinosteroids; ET, ethylene; JA, jasmonic acid; SA, salicylic acid. ABA, abscisic acid;

المربع 2

تحفيز البذور .... لمحة تاريخية

تحفيز البذور تقنية قديمة تعود بداياتها إلى القرن الرابع قبل الميلاد، عندما لاحظ الفيلسوف اليوناني ثيوفراست[1] Theophrastus أن بذور الخيار المنقوعة في الماء تنبت بسرعة أكبر من نظيراتها غير المنقوعة. و في عام 1600، وصف عالم الزراعة الفرنسي Olivier de Serres أهمية نقع بذور القمح أو الشعير لمدة يومين في الماء ثم التجفيف في الظل قبل بذرها و سماها بـ"الخيار الذكي"، كما أشار إلى أن البذور المنقوعة تظهر بسرعة أكبر، فتتجنب بذلك "خطر التعرض للأكل من قبل هوام الأرض" (Taylor et al., 1998). و في سنة 1855، لمّح تشارلز داروين[2] إلى احتمالية حدوث تحريض أسموزي للبذور (Allan, 1977)، على اثر تجربة أجراها لإظهار إمكانية انتقال البذور عبر مياه البحر كوسيلة لتفسير التوزيع الجغرافي للأنواع النباتية، حيث لاحظ دارون أن البذور المنقوعة في مياه البحر لم تتحمل البقاء في المياه المالحة و الباردة لفترة طويلة فحسب بل أبدى بعضها، كبذور الجرجير و الخس، سرعة عالية في الإنبات. و في عام 1963، لاحظ Ells تحسن في إنبات بذور الطماطم المنقوعة في محلول مغذي في نفس الوقت، لوحظ أن تجفيف البذور بعد نقعها يسرع من إنباتها (May et al., 1962). وهذا ما أصطلح على تسميته "بالتجفيف التشربي" (Hanson, 1973). و في سنة 1973 قام Heydecker et al. باستعمال مادة البولي إثيلين غليكول PEG لتحفيز البذور، و منذ ذلك الحين بدأ الاهتمام بتقنية "seed priming" في مجال صناعة البذور (Heydecker et al., 1975).



- ثيوفراست، فيلسوف يوناني (372–287 ق.م) تلميذ أرسطو، تناول الكثير من مظاهر نمو النباتات بالدراسة و التحليل في كتابيه (Historia de Plantis و De Causis Plantarum). فهو بذلك يعتبر مؤسس علم النبات و علم البذور.
- تطرق تشارلز داروين (1809-1882م) لظاهرة تحفيز البذور عن غير قصد في عدد من مقالاته، منها:
  - Darwin CR. 1855. Vitality of seeds. Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette 46, 758.
  - Darwin CR. 1855. Effect of salt-water on the germination of seeds. Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette 47, 773.
  - Darwin CR. 1855. Does sea-water kill seeds? Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette 15 and 21, 242 and 356–357.

لتفسير تأثير التحفيز على قوة البذور و سرعة إنباتها اقترحت العديد من الفرضيات:

- يشجع تحفيز البذور على تعبئة المدخرات الغذائية، تفعيل و إعادة تخليق بعض الإنزيمات و ربما أيضا تخليق الأحماض النووية DNA و RNA (Nascimento & West, 1998).
- تحفيز البذور يساعد على إصلاح بعض الأضرار الناجمة عن إهتراء البذور وهذا يؤدي إلى تعزيز قوة البذور المحفزة (Arif et al., 2008).
- تقلل عملية تحفيز البذور من فترة الاسترخاء (lag phase) خلال إنبات البذور الشيء الذي يعجل عمليات استنساخ DNA و منه الإنبات (Bray et al., 1989).

مما سبق تتضح أهمية تصميم طرق تحفيز البذور بشكل يتناسب مع كل نوع نباتي و ذلك لمساعدتها على مجابهة مختلف تحديات الوسط البيئي (الجدول 8).

يسمح تحفيز البذور بحدوث العمليات الأولى من الإنبات دون السماح للجذير بالظهور (الأشكال 24 و 25). يتم منع ظهور الجذير من خلال التحكم في الوقت أو الجهد المائي للوسط. عند اكتمال عملية التحفيز، تجفف البذور حتى يصل محتواه من الرطوبة إلى حالته الأولى. و تستخدم تقنيات مختلفة للسيطرة على تشرب البذور للماء. كل هذه المعاملات توفر الظروف المناسبة للتحفيز، بمعنى (أ) جهد المائي عادة ما يكون ما بين – 1.0 و – 2.0 ميجا باسكال (– 10 إلى – 20 بار)، (ب) درجة حرارة بين 15 و 25 درجة مئوية، و (ج) الحصول على بذور يمكن تخزينها بأمان لفترات طويلة (تصل إلى 20 يوما، ولكن عادة أقل من 2 أسبوعين) (Bruggink, 2005).

هناك عدة تقنيات تستعمل حاليا لتحفيز البذور نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر (الجدول 8):

1. التحفيز الأسموزي Osmopriming: نقع البذور في محاليل أسموزية (PEG).

3. التحفيز المائي Hydropriming: ترطيب البذور بالماء في حوض.

4. التحفيز الهرموني Hormone-priming: يتم باستعمال الهرمونات النباتية الطبيعية أو الاصطناعية

5. التحفيز الملحي Halopriming: باستخدام الأملاح مثل ملح كلوريد الصوديوم بتركيزات مدروسة.

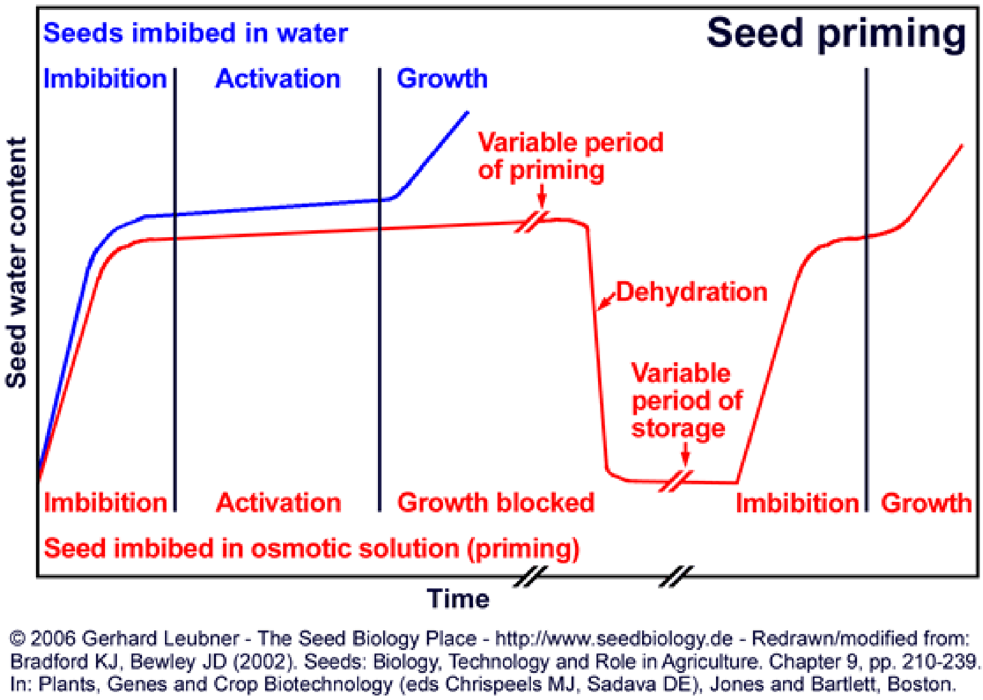
3-4. التغيرات البيوكيميائية الناجمة عن تحفيز البذور:

تصاحب عملية تحفيز البذور العديد من التغيرات البيوكيميائية و الجزيئية. فعلى سبيل المثال وجد أنه يحدث ارتفاع طفيف في تخليق DNA (Bray et al., 1995). كما يحدث تنشيط للآليات البيوكيميائية للصيانة الخلوية، تسريع العمليات الأيضية من خلال تخليق الأحماض النووية و البروتينات (Bewley & Black, 1994) و ربما أيضا من خلال تحسين نظام الدفاع المضاد للأكسدة (Arora, 2011; Bailly & Chiu et al., 2006; Chen et al., 2000 ; Amooaghaie, 2013).

بالنسبة لتخليق البروتينات، و باعتبارها شرط أساسي للإنبات، تشرع البذور في تخليق البروتينات في غضون بضع دقائق بعد تشربها للماء (Cheung et al., 1979). عند هذه المرحلة، يعمل التحفيز الأسموزي على وقف عملية تخليق البروتين في الجنين و الأنسجة المحيطة به مقارنة بالبذور المنقوعة في الماء لنفس الوقت، لترتفع بعد ذلك وتيرة التخليق البروتيني في المراحل اللاحقة لإنبات البذور المحفزة مقارنة بالشاهدة. يدعم ذلك أبحاث سابقة أشارت إلى أن كمية البروتينات المخلقة بعد يومين من إنبات بذور الفلفل المحفزة تكون تقريبا نفس الكمية التي تخلقها البذور غير المحفزة بعد 4 أيام (Bray, 1995). كما لوحظ ارتفاع تركيز بروتينات الدهيدرين في السبانخ (*Spinacia oleracea* L) بعد التحفيز الأسموزي (Chen et al., 2011). هذه الزيادة لوحظت أيضا عند تعريض البذور للإجهاد الوسط كالبرودة أو التجفيف، مما يوحي بأن التحفيز يمكن أن يلعب دورا إيجابيا في تحمل النباتات للإجهاد.

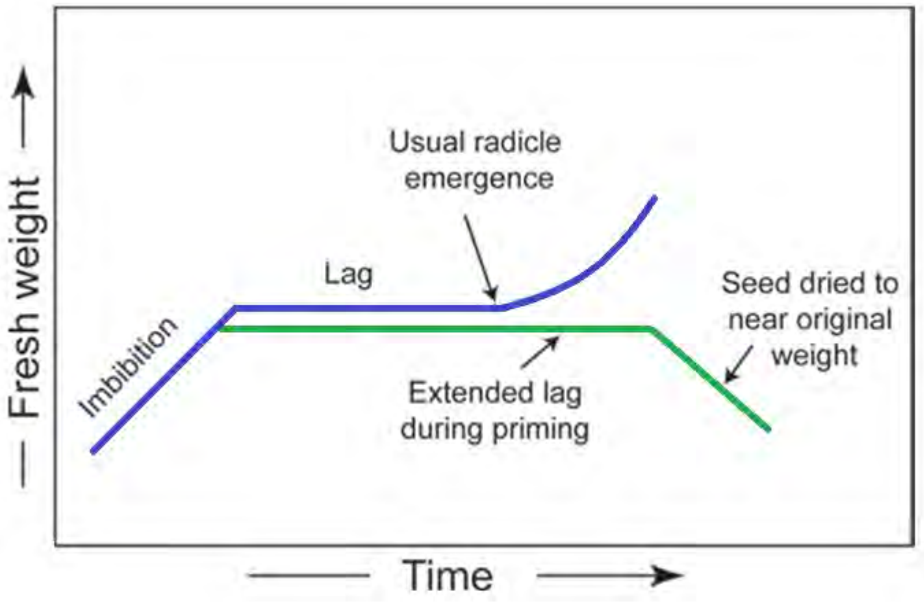
الجدول 8. مختلف طرق تحفيز البذور المعتمدة لتطوير تحمل مختلف النباتات للملوحة

Plant species	Priming method	References
Ajowan (*Carum copticum*)	Priming with chitosan	Mahdavi & Rahimi, (2013).
Alfaalfa (*Medicago sativa* L.)	Osmopriming (mannitol), hydropriming, Hormone-priming (brassinolide)	Amooaghaie, (2011); Zhang et al. (2007)
Barely (*Hordeum vulgar* L.)	Halo-priming; On-farm priming	Anwar et al. (2013); Rashid et al., (2006).
Basil (*Ocimum basilicum* L)	Hydro-priming, halo-priming	Farahani & Maroufi, (2011); Ghanbari et al., (2013).
Broad bean (*Vicia faba* L.).	Vitamine-priming (ascorbic acid and nicotinamide)	Azooz et al. (2013).
Bromus (*Bromus tectorum* L)	Osmopriming (PEG)	Tavili et al. (2011).
Canola (*Brassica napus* L.)	Halo-priming and priming with KNO_3	Abdollahi & Jafari, (2012).
Chickpea (*Cicer arietinum* L.)	priming with zinc sulfate	Seyedi et al. (2012).
Coriander (*Coriandrum sativum* L.)	Halo-priming	Aymen & Cherif, (2013).
Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)	Hydro-priming and priming with KNO3	Nazir, (2014); Ahmadvand et al. (2012).
Cumin (*Nigella sativa* L.)	Hormone-priming (SA) and priming with KNO3	Ahmadpour & Balouchi, (2013).
Faba bean (*Vicia faba minor*)	Hormone-priming (salicylic acid)	Azooz, (2009).
Fennel (*Foeniculum vulgare*)	Hormone-priming (SA)	Farahbakhsh, (2012).
Lentil (*Lens culinaris* L.)	Hydro-priming and priming with KNO_3	Eskandari & Alizadeh-Amraie, (2014).
Lettuce (*Lactuca sativa* L.)	Hydro-priming+ priming with KNO3 and Hormone-priming (GA3)	Mahmoudi, et al. (2012)
Maize (*Zea mays* L.)	Halo-priming; priming with KNO3; Hormone-priming (24-epibrassinolide or SA); Seed priming, chemical priming (CuSO4 ZnSO4), on-farm seed priming	Yohannes & Abraha, (2013); Saed-Moocheshi et al. (2014); Zhang, (2012); Du et al. (2012); Ashraf & Rauf, (2001); Murungu et al. (2003); Finch-Savage et al. (2004); Foti et al. (2008); Janmohammadi et al. (2008)
Melon (*Cucumis melo* L)	Halo-priming	Sivritepe et al. (2003, 2005).
Millet (*Panicum miliaceum* L)	Hydro-priming and KNO3	Eskandari & Alizadeh-Amraie, (2014).
Mung bean (*Vigna radiata* L.)	Hormone-priming (SA) and priming with KNO3; Halo-priming	Entesariet al. (2012); Rashid et al. (2004); Saha et al. (2010).
Mustard (*Brassica juncea* L.)	Hydropriming, Halo-priming, Hormone-priming (ABA)	Srivastava et al. (2010).
Pepper (*Capsicum annuum* L)	Hydro-priming and Haloprimine; Hormone-priming (ABA)	Smith & Cobb, (1991); Yadav et al. (2011).
Pumpkin (*Cucurbita pepovar.* styriaca)	Vitamine-priming (AsA)	Fazlali et al. (2013).
Safflower (*Carthamus tinctorius*)	Halo-priming	Elouaer & Hannachi, (2012).
Salicornia utahensis	Hormone--priming	Gul & Khan, (2003).
Smooth vetch (*Vicia dasycarpa* L.)	Hormone-priming (SA)	Namdari & Baghbani, (2013).
Sorghum bicolor (L.)	Osmopriming (PEG), Halo-priming (NaCl) and Hormone-priming (SA)	Haghighat et al. (2012).
Sugarcane (*Saccharum arundinaceum*)	Halo-priming (NaCl)	Patade et al. (2009).
Sunflower (*Helianthus annuus*,L)	Hormone-priming (IAA, GA3,cytokinin(6-BA)); Arginine-Priming; Sodium Nitroprusside ; Hydro-, osmopriming (KNO3)	Yan et al. (2012); Nejadalimorad et al. (2014); Kaya et al. (2006).
Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.)	Halo-priming (NaCl), KNO3	Heydecker et al. (1973) ; Ozbingol et al. (1998), Nawaz et al. (2011).
Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Halo-priming, Hormone-priming (GA3, KIN, BAP) and Hydro-priming.	Mohammadi & Mozafari, (2012); Murtaza & Ghafoor, (2012); Iqbal & Ashraf, (2006).
Wheat (*Triticum durum* Desf.)	Vitamine-priming	Fercha et al. (2013; 2014).



الشكل 24. رسم توضيحي لمراحل الإنبات و تحفيز البذور

(.http://www.seedbiology.de/structure.asp)



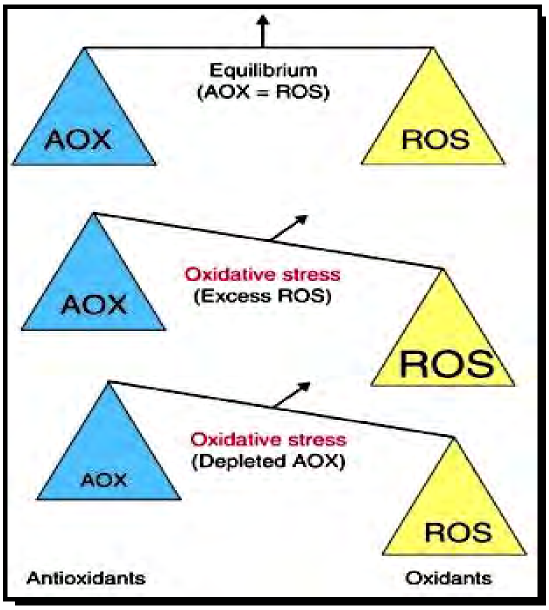
الشكل 25. مراحل الإنبات و علاقتها بامتصاص الماء لوصف التغيرات الحاصلة أثناء تحفيز البذور (Hartmann et al., 2011).

تحفيز البذور يطيل مدة الاسترخاء (الانتظار). يتم تجفيف البذور المحفزة إلى أن يقترب وزنها من الوزن الابتدائي و ذلك قبل أن تتمكن البذور من إخراج الجذير .

4-4. حمض الأسكوربيك و تحفيز البذور:

لمجابهة الظروف القاسية التي تفرضها البيئة، تلجأ النباتات إلى الاستعانة بعدة أنظمة دفاع فعالة لكنها تبقى غير مفهومة لحد الأن. فعندما يتعرض النبات لإجهادات الوسط المختلفة (إجهادات أولية) يعاني النبات من إجهاد في الأكسدة (إجهاد ثانوي) ينجم عن تراكم جزيئات ROS، نتيجة اختلال في التوازن القائم بين مسببات الأكسدة و مضادات الأكسدة (الأشكال 26 و 27، Zhu, 2001). للتغلب على هذا الإجهاد تقوم النباتات بتعزيز أنظمة الدفاع المضاد للأكسدة، و هو ما يمكن تحقيقه أيضا من خلال تحفيز البذور. بالفعل، وثَّقَت العديد من الدراسات فعالية المعاملة المسبقة للبذور أو النباتات بواسطة مضادات الأكسدة كحمض الأسكوربيك على معاكسة الآثار السلبية الناجمة عن مختلف إجهادات الوسط (الجدول 9).

من جهة أخرى، تجدر الإشارة إلى أن تأثير الفيتامين C على تحمل النباتات لإجهادات الوسط غير الحيوية تعتمد على عدة عوامل منها تركيز الحمض، النوع النباتي، مرحلة النمو، نوع الإجهاد، شدته و مدته... الخ. فعلى سبيل المثال، أظهرت دراسات سابقة أن استعمال تركيزات مرتفعة من حمض الأسكوربيك تثبط إنبات و نمو البادرات شأنها في ذلك شأن الهرمونات النباتية (Ishibashi & Iwaya-Inoue, 2006 ; Ye et al., 2012).

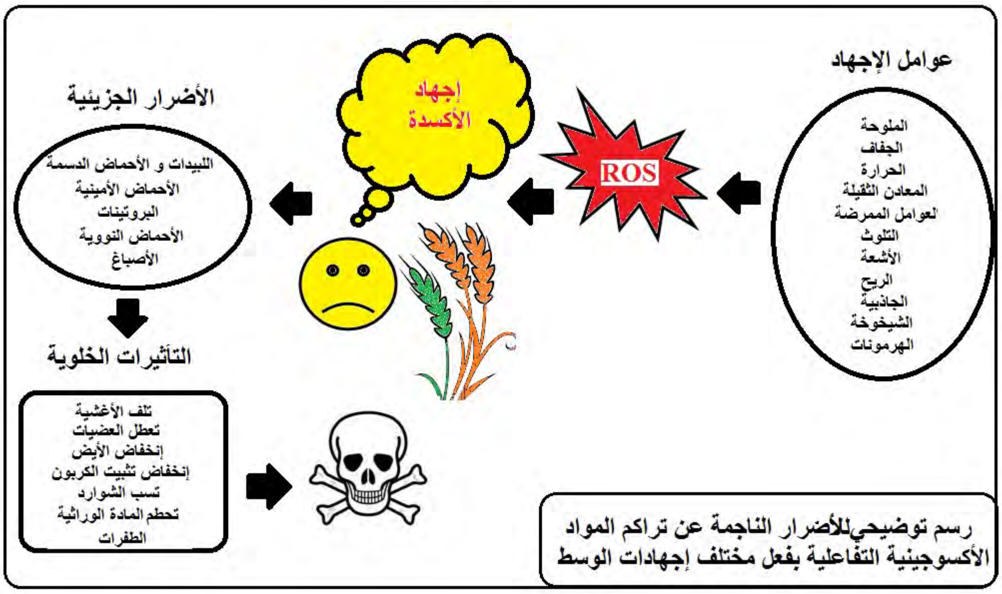


الشكل 26. توازن الأكسدة الخلوية

إجهاد الأكسدة الناجم عن عدم التوازن بين مستويات المواد المضادة للأكسدة (AOX) و أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). عادة تكون الخلايا قادرة على تحقيق التوازن في إنتاج مواد الأكسدة ومضادات الأكسدة. يحدث إجهاد الأكسدة عندما يتم قلب هذا التوازن من خلال المستويات الزائدة من ROS، أو استنزاف الدفاعات المضادة للأكسدة (Scandalios, 2005).

جدول 9. تحسين مقاومة النباتات الزراعية لإجهادات الوسط عبر معاملتها بحمض الأسكوربيك

Stress	Species	Reference
Salinity	Faba bean (*Vicia faba* L.)	Mohsen et al. (2014), Azooz et al. (2013)
	Rice (*Oryza sativa* L)	Wang,(2014) ; Hua et al. (2003)
	Tomato (*L. escumantum* L)	Shalata & Neumann, (2001)
	Canola (*Brassica napus* L.)	Dolatabadian et al,(2008)
	Chick pea (*Cicer arietinum* L.)	Mohamed, (2008)
	Wheat (*Triticum durum* Desf.)	Fercha et al. (2011) ; Fercha et al. (2014)
	Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Athar et al. (2008) ; Athar et al. (2009) ; Farouk, (2011)
	Sugarcane	Munir & Aftab, (2013).
Drought	*Matricaria aurea* L	Behjou et al. (2014)
	Chickpea (*Cicer arietinum* L.)	Farjam, (2014)
	Rapeseed (*Brassica napus* L.)	Razaji et al. (2014)
	Wheat (*Triticum aestivum* L.)	Hamada, (2000) ; Farooq et al. (2013); Malik & Ashraf, (2012)
Heat	Mungbean (P. *aureus* Roxb.)	Kumar et al. (2011)
	Festuca arundinacea	Zhao et al. (2008)
	Wheat (*Triticum aestivum*)	Kumar et al. (2013)



الشكل 27. الآثار السلبية لإجهاد الأكسدة على الوظائف الخلوية (Scandalios, 2005)

4-5. حمض الجبريليك و تحفيز البذور:

تعد الهرمونات النباتية أو منظمات النمو النباتية من المركبات العضوية التي يتم إنتاجها بكميات صغيرة جدا في النباتات وتلعب دورا هاما في تحديد نمو و تطور و إنتاجية المحاصيل، مما جعلها تصبح أدوات أساسية في الممارسات الزراعية الحديثة. الجبرلينات (GAs) من الهرمونات النباتية التي تنظم النمو و التطور، بما في ذلك

إنبات البذور (Peng & Harberd, 2002)، واستطالة السيقان و بزوغ الأوراق و كذا ظهور الأزهار (Magome et al., 2004). تُنَظِم النباتات التخليق الحيوي للجبرلينات استجابة لمحفزات داخلية مرتبطة بالتطور و أخرى خارجية متعلقة بالبيئة (Hedden & Phillips, 2000; Kaya et al., 2009 ; Kohli et al., 2013).

من بين جميع GAs، يعد حمض الجبريليك (GA_3) منظم النمو الأكثر نشاطا، حيث يقوم بتعزز إنبات البذور، تطاول السلاميات و نمو و انقسام الخلايا في مناطق النمو كالنسيج الكامبيومي و الهيبوكوتيل، كما يزيد من حجم الأوراق و يحفز إزالة سكون البذور (Miransari & Smith, 2014).

تخليق الجبرلينات ضروري لإنبات البذور، و قد ثبت ذلك في العديد من الدراسات(Miransari & Smith, 2014). حيث لوحظ أن بذور الطماطم الطافرة بحيث تفقد القدرة على تخليق الجبرلينات تعجز عن الإنبات إلا أن يضاف لها خارجيا حمض الجبريليك (Hilborst & Karssen, 1992). تحفز الجبرلينات إنبات البذور من خلال تنشيط العديد من الإنزيمات منها التي تساعد على هضم الأنسجة المحيطة بالجنين (السويداء و الأغلفة) خصوصا بالقرب من الجذير، كما تعمل على إذابة المدخرات الغذائية و تسهيل توصيلها لمناطق النمو في الجنين، ثم تحفز استطالة الخلايا و نمو الجنين (الشكل 21؛ Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

تتأثر كل من عملتي تخليق و استقبال الجبرلينات بالظروف البيئية التي تؤثر أيضا على نزع سكون البذور. من أبرز هذه العوامل نذكر الإضاءة، الحرارة (بما في ذلك عملية التطبق stratification)، و معدلات النترات (Siddiqui et al., 2008). الاستعمال الخارجي للجبرلينات (التي تباع على شكل أحماض خصوصا GA_3، GA_{4+7}) يساعد على إزالة بعض أنواع سكون البذور (Miransari & Smith, 2014).

أظهرت العديد من الدراسات السابقة مقدرة الجبرلينات على تحسين إنبات و نمو النباتات تحت الإجهادات المختلفة (أنظر الجدول 10). فعلى سبيل المثال، أورد Turkyilmaz (2012)، أن معاملة بذور القمح بحمض الجبريليك (10-20 ppm) يساعد على خفض الآثار السلبية للملوحة على إنباتها. في سياق متصل، أظهر Bahrani & Pourreza (2012) أن البذور المحفزة بحمض الجبريليك تبدي نسب إنبات مرتفعة مقارنة بالبذور غير المحفزة عند تعريضها لإجهاد ملحي.

على الرغم من كون الجبريلينات تخفض من أطوال الجذور و تزيد من أطوال الكوليوبتيل، تحسن إضافة GA من نمو الجذير و الكوليوبتيل في البادرات المعرضة للإجهاد الملحي. كما يخفض استعمال GA من تأثير الملوحة على الأوزان الجافة لكل من الجذير و الكوليوبتيل (Bahrani & Pourreza, 2012). تم الحصول على نتائج مماثلة في دراساتنا السابقة (فرشة، 2001؛ Gherroucha et al., 2011).

جدول 10. تحسين مقاومة النباتات لإجهادات الوسط عبر معاملتها بحمض الجبريليك.

Stress	Species	Reference
Salinity	*Brassica juncea* L.	Siddiqui et al. (2008)
	Beta vulgaris L.	Jamil & Rha (2007)
	Brassica napus L.	Jamil et al. (2009)
	Lycopersicum esculontum L.	Xue & Wu (2011)
	Lens culinaris L.	Khavarinegad et al. (2014)
	Phaseolus vulgaris L.	Saeidi-Sar et al. (2013)
	Stevia rebaudiana	Liopa-Tsakalidi et al. (2012)
	Salicornia europaea L.	Ping et al. (2011)
	Satureja hortensis L.	Nikee et al. (2014)
	Triticum aestivum L.	Shaddad et al. (2013; Ashraf et al. (2002)
	Triticum durum Desf.	Fercha (2002; Gherroucha et al. (2006, 2011)
Drought	*Vicia sativa* L.	Abdel & Al-Rawi (2011)
	Boehmeria nivea L.	Liu et al. (2013)
	Cicer arietinum L.	Kaur et al. (2000)
Chilling	*Prunus* ssp.	Wang et al. (2012)
Heat shock	*Hordum vulgar* L.	Grindstaff et al. (1996)
Cadmium stress	*Vigna unguiculata* L	Al-Rumaih et al. (2003)

جدول 11. تحسين مقاومة القمح للملوحة باستعمال مختلف الطرق البيوتكنولوجية

Dev. Stage	Method	Designation	References
Germination	Antioxidants	Ascorbic Acid (AsA)	Fercha et al. (2013); Fercha et al. (2014)
	Hormones	Indole-3-Acetic Acid (IAA) ; Kinetin; Salicylic Acid (SA) ; Spermine	Abdoli et al. (2013); Aldesuquy et al. (2014); Yousof & El-Saidy (2014); Aldesuquy et al. (2014).
Growth	Antioxidants	Ascorbic Acid (AsA)	Chang et al. (2013); Fercha et al. (2013) ; Fercha et al.(2014).
	Prooxidants	Nitric Oxide (NO), H_2O_2	Kausar & Shahbaz (2013); Gondim et al. (2013)
	Hormones	24-Epibrassinolide; Brassinolide Gibberellic acid (GA_3); Indole-3-Acetic Acid (IAA); Jasmonic acid (JA); Salicylic acid (SA)	Talaat & Shawky (2013); El-Feky & Abo-Hamad (2014); Iqbal & Ashraf (2013); Shaddad et al. (2013); El-Samad (2013); El-Samad (2013); Iqbal & Ashraf (2013); Abdoli et al. (2013); Qiu et al. (2014) ; Li et al. (2013); Howladar & Dennett (2014); Mutlu & Atici (2013)
	Osmoprotectants	Proline, glycinebetaine, trehalose	Talat et al. (2013); Chen & Heuer (2013); Mostofa et al.(2014)
	Chemical elements	Silicon ; calcium ; N; K; zinc	Ali et al. (2014); Morgan et al. (2013); Khan et al. (2013); Xu et al. (2014)
	Liquid Extract	Seaweed; leaves extract	Latique et al. (2014); El Baky et al. (2014)
	Inoculation	Halotolerant bacteria; Plant growth-promoting rhizobacteria; arbuscular mycorrhizal fungi	Ramadoss et al., (2013); Upadhyay & Singh (2014); Talaat & Shawky (2014)
	Transgenesis	Expressing AtNHX1 gene Overexpression of GmDREB1 Rice stress-responsive NAC	Sharaf et al. (2014); Jiang et al. (2014); Saad et al. (2013)
Reproductive	Hormones	24-Epibrassinolide; Gibberellic acid (GA_3); Salicylic Acid (SA)	Iqbal & Ashraf (2013); Howladar & Dennett(2014); Yousof & El-Saidy (2014); Talaat & Shawky (2013)
	Chemical elements	N and K	Khan et al. (2013)
	Inoculation	Plant growth-promoting rhizobacteria	Upadhyay & Singh (2014)
	Transgenesis	Expressing the Arabidopsis AtNHX1 gene	Sharaf et al. (2014)

تم إنجاز هذا الجدول بالاعتماد على أحدث النتائج (منذ جانفي 2013)

5. دور البروتيوميات في دراسة استجابة النباتات لإجهادات الوسط (الإجهاد الملحي كمثال)

للتعامل مع الإجهاد الملحي طورت النباتات أنظمة فعالة للدفاع و التكيف و لكن تبقى في معظمها غير مفهومة بشكل جيد (Nouri et al., 2011). من التأثيرات التي يسببها الإجهاد الملحي إحداث تعبير تفاضلي لبروتيوم النبات و تخليق بروتينات الاستجابة-للملوحة و ذلك من أجل الحماية من و التأقلم مع الظروف المجهدة. شهد العقد الماضي إجراء عدد كبير من التحليلات البروتيومية لدراسة استجابات النبات للإجهاد الملحي باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية على الجال ثنائية البعد (2-DE). مع التقدم في تقنيات التحليل البروتيومي، وخاصة مع ظهور تقنية "shotgun"، أجريت العديد من الدراسات لتحليل التغيرات الطارئة على بروتيوم العديد من النباتات الزراعية تحت ظروف الإجهاد غير الحيوية (الجدول 12). و نتيجة لذلك، تم تحديد أكثر من 560 بروتين استجابة-للملوحة (Zhang et al., 2012). و مما لا شك فيه، سيمكننا تحديد وظائف هذه البروتينات ودورها في شبكات نقل الإشارة من توفير سبل جديدة لتحسين مقاومة النباتات للإجهاد الملحي (Sobhanian et al., 2011; Singh & Jwa, 2013; Kosovà et al., 2011 ; 2013; Zhang et al., 2012; Hakeem et al., 2012). في هذه اللمحة القصيرة، سنقوم باستعراض أهم النتائج.

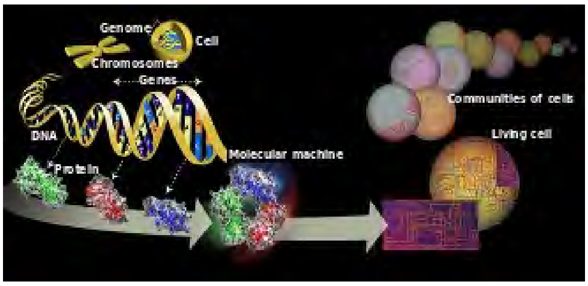
أجريت أولى الدراسات حول تأثير إجهادات الوسط في بروتيوميات (المربع 3) النباتات في الثمانينات من القرن الماضي على إثر تطوير تقنية الهجرة الكهربائية سنة 1975م من قبل O'Farrell و Klose كل من جانبه (Vincent & Zivy, 2007). وعلى الرغم من أن معظم البروتينات حينها لم تكن معروفة إلا أن هذه الدراسات سمحت بمعرفة مدى تأثير الإجهاد اللاحيوي على تخليق بروتينات جديدة (Hurkman & Tanaka, 1987)، التغيرات الطارئة على مستوى الأغشية المختلفة (Hurkman et al., 1988) و كذا إثبات وجود اختلاف وراثي في استجابة النباتات للإجهاد على المستوى البروتيومي (Zivy, 1987). باستعمال طريقة التسلسل الجزيئي لإدمان (Edman microsequencing) تمكن الباحثين من وضع قائمة من البروتينات التي يتأثر تخليقها بفعل الإجهاد اللاحيوي (Costa et al. 1998; Riccardi et al. 1998). و مع ظهور تقنية مطيافية الكتلة (Mass spectrometry) تسارعت معها دراسة بروتينات الاستجابة للإجهاد على غرار الإجهاد الملحي. تعتبر دراسة Chang et al. (2000)، من أول الدراسات التي استعملت فيها هذه التقنية لدراسة استجابة النباتات لإجهادات الوسط، حيث قاموا بدراسة التغيرات الطارئة على بروتينات الذُرة عند تعرضها لإجهاد ناجم عن نقص الأوكسجين (anoxia). كما مكنهم استعمال تقنية MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight) من استكشاف الآليات التي تفسر تأقلم النباتات مع الإجهاد. مع تطور تقنيات الفصل و التقصي زاد اهتمام العلماء باستعمال التحليل البروتيومي لتقصي تحمل النباتات لإجهادات الوسط (أنظر الجدول 12).

اهتمت العديد من الأبحاث بدراسة استجابة النباتات للملوحة عبر مختلف طرق التحليل البروتيومي (أنظر الجدول 12)، و قد ساعدت هذه الدراسات في تحديد العديد من البروتينات المتدخلة في مقاومة الملوحة. فعلى سبيل المثال، قام Salekdeh et al. (2002)، بتحديد ثلاث بروتينات يزيد تركيزها في جذور أصناف الأرز المقاومة عند تعريضها للإجهاد الملحي المتزايد (50 ثم 100 ملي مول/ل)، تبين لاحقا أنها تشارك في الدفاع المضاد للأكسدة، فاستنتجوا من ذلك أن الأصناف المقاومة تكون تكوينيا محمية بصورة أفضل ضد إجهاد الأكسدة.

المربـــع 3

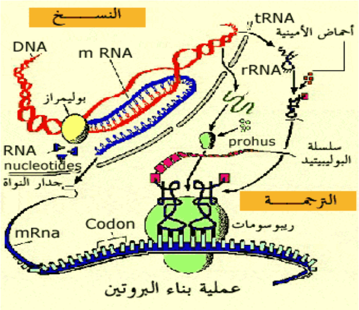
"البروتيوم".. عالم ما بعد "الجينوم!"[1]

مع بزوغ فجر الألفية الثالثة خطا علم التقنية الحيوية خطوات كبيرة للأمام بعد الإعلان عن رسم الأطلس الوراثي للإنسان، وهو المشروع الذي عُرف بمشروع الجينوم البشري (Human Genome Project HGP)[2]. و كانت الآمال كبيرة في أن إنجاز هذا المشروع الكبير يعني بداية الخلاص من أخطر الأمراض، بما في ذلك السرطان. إنجاز مشروع الجينوم البشري صاحبته مفاجآت كثيرة، من أبرزها أن عدد المورثات في الإنسان 25 ألفا فقط، وليس مائة ألف كما اعتقد العلماء لمدة طويلة، ولهذا برز سؤال مهم هو: كيف أمكن تكويننا بمثل هذا الإعجاز والتعقيد من خلال 20-25 ألف مورثة فقط[2]. علما بأن ذبابة الفاكهة تملك 13 ألفا منها، نبات "الأرابيدوبسيس"[3] يملك 25 ألف و الأرز 50 ألفا! فسارع العلماء بالبدء في مشروع البروتيوم للإجابة على هذا السؤال الصعب، الذي لخصه العالم الأمريكي "Brian Schmidt" فيما يلي: "إن ما نريد اكتشافه هو أن في أعماق كل فرد مائة تريليون خلية.. فما هو نوع كل بروتين تنتجه هذه الخلايا؟". لذلك كان لا بد من ترتيب وجرد وتحليل البروتينات والجزيئات المرتبطة بها ذات الأدوار الجوهرية بالنسبة للكائنات الحية، بعد أن تأكد العلماء أنه لا يكفي معرفة المورثة المسئولة عن حفز الخلايا الحية لإنتاج أنواع بعينها من البروتينات، بل ينبغي معرفة حالة الخلايا أثناء الصحة و المرض.



ما هو البروتيوم؟

البروتيوم" مصطلح " ظهر عام 1995م على يد طالب الدكتوراه الأسترالي "Marc Wilkins"[4]. وجاءت هذه التسمية لتشير إلى الحصيلة الكلية للبروتينات المتواجدة في كل نوع من أنواع الخلايا الحية؛ فكل خلايا الكائن الحي تحتوي على نفس الجينوم، لكن كلها (أو معظمها) تحتوي بروتيومات خاصة.... وإذا كان "الجينوم "Genome يعني جميع الجينات الكامنة في خلايا الجسم، فإن "البروتيوم Proteome" هو مجموع البروتينات التي تفرزها خلايا الجسم خلال المراحل المختلفة من حياتها. وإذا كان الجينوم من التعقيد بحيث ينطوي على ملايين العمليات الكيميائية، فإن "البروتيوم" يحتوي على معلومات تزيد ألف مرة عن ما يحمله الجينوم! و للتعرف علي معنى "البروتيوم" علينا أن نعود إلى مصطلح "بروتين" الذي يعني "الأول" protos". كما يزعم البعض أن كلمة بروتين مشتقة من اسم أحد آلهة اليونان Protee[5]، الذي كان قادرًا على اتخاذ آلاف الأشكال وأكثر الأشكال غرابة حتى يستطيع الهروب من مطارديه. و كما تمثله هذه الأسطورة اليونانية فبالرغم من كونها تتكون من عشرين نوعا من الأحماض الأمينية تبدي البروتينات تنوعا مهولا في الأشكال و التي تعود في الأساس إلى خواصها الفيزيائية و الكيميائية التي تم الكشف عنها في القرن العشرين.



"الأوميك Omic-"[7]

تضاف كلمة أوميك إلى تسمية كل دراسة شاملة للمظاهر الوظيفية للعضوية،كالجينوميك (دراسة جملة الجينات)، البروتيوميك (دراسة جملة البروتينات) الترانسكريتوميك (دراسة جملة العناصر المستنسخة)، الليبيدوميك (دراسة مجموع الليبيدات) و الغليكوميك (دراسة لكل السكريات) ... الخ

---

(1)-طارق قابيل، مقال منشور على الموقع http://www.onislam.net/arabic/newsanalysis/

(2)- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature, 431(7011), 931-945.

(3)- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature, 408(6814), 796.

(4)- Wilkins,M.R., Sanchez,J.C., Gooley, A. A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser,D.F.,et al .(1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by agenome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13, 19–50.

(5)- Vickery HB. The origin of the word Protein. Yale J Biol Med 1950;22:387–93

(6)- Calvete, J. J., Bini, L., Hochstrasser, D., Sanchez, J. C., & Turck, N. (2014). The magic of words. Journal of proteomics, 107, 1-4.

(7)- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy. Plant Biology, 59(1), 387.

جدول 12. لمحة عن أحدث طرق التحليل البروتيومي-المعتمد و الخالي من الجال كأدوات بيوتكنولوجية يمكن أن توفر المعلومات اللازمة لإنجاح برامج تحسين المحاصيل الزراعية

Major crops	Technique used	Trait studied	Plant part	Reference
Wheat	2-DE	Desiccation	Embryo	Irar et al. (2010)
	iTRAQ & 2D-DIGE	Drought	Leaves	Ford et al. (2011)
	2D-DIGE	Salinity	Leaves	Gao et al. (2011)
	2-DE	Senescence and oxidative stress	Stem	Bazargani et al. (2011)
	2-DE	Flooding stress	Root	Kong et al. (2010)
	2-DE	Metabolism post anthesis	Endosperm amyloplast	Dupont (2008)
	2-DE	Fusarium head blight	Kernels	Foroud et al. (2008)
	Shotgun proteomics	Salinity	Leaves	Capriotti et al. (2014)
	Shotgun proteomics	Salinity	Kernels	Fercha et al. (2014)
Maize	2-DE	Desiccation	Embryo	Huang et al. (2012)
	Shotgun proteomics	Photosynthesis	Chloroplast thylakoid membrane	Liu et al. (2011)
	Shotgun proteomics	Desiccation	Embryo	Amara et al. (2012)
	2-DE	Drought	Xylem sap in root and stem	Alvarez et al. (2008)
	LC-MS	Greening of etiolated leaves	Leaves	Shen et al. (2009)
Soybean	2-DE	Tolerance to Phytophthora	Hypocotyls	Zhang et al. (2011)
	2-DE & blue native PAGE	Flooding stress	Roots and hypocotyl	Komatsu et al. (2011)
	2-DE	Oxidative stress	Leaves	Galant et al. (2012)
	2-DE	Heat stress	Leaves	Wang et al. (2012)
	2-DE	Flooding stress	Roots, Hypocotyl, and leaves	Khatoon et al. (2012)
	2-DE	Osmotic stress	Roots	Toorchi et al. (2009)
	2-DE	Salinity	Seeds	Ma et al. (2014)
	iTRAQ	Enhancing water and nutrient uptake after inoculation with Bradyrhizobium	Roots	Nguyen et al. (2012)
Rice	2-DE	Response to selenium	Leaves	Gong et al. (2012)
	2-DE	Embryogenesis	Embryo	Zi et al. (2012)
	Shotgun proteomics	Grains development	Grains	Lee & Koh (2011)
	2-DE	Heat stress	Spikelet	Jagadish et al. (2010)
	2-DE	Drought stress	Rice peduncles	Muthurajan et al. (2011)
	iTRAQ	Cold stress	Leaves	Neilson et al. (2011)
	2-DE	Salinity	Stem and Leaves	Ghaffari et al. (2014)
	2-DE	Salinity	Leaves and root	Liu et al. (2014)

حسب Eldakak et al. (2013) مع بعض الإضافات.

في دراسة مماثلة، قام Parker et al. (2006) بتقصي التغيرات الحاصلة على بروتيوم أوراق (الورقة الرابعة) شتلات الأرز عند تعريضها لإجهاد ملحي منخفض (50 ملي مول/ل) و لكن لفترات متفاوتة (يوم أو 7 أيام). بعد يوم من الإجهاد تغير تركيز 9 بروتينات فقط، و لكن بعد 7 أيما من الإجهاد تغير تركيز 31 بروتين. كان من بين البروتينات التي زاد تركيزها على المدى القصير و الطويل، إنزيم SOD المتدخل في الدفاع المضاد للأكسدة.

مكنت دراسة التحليل البروتيومي من الكشف عن العديد من البروتينات التي أصطلح على تسميتها ببروتينات الاستجابة للإجهاد، كبروتينات LEA (Late-Embryogenesis Abundant)، بروتينات الصدمة الحرارية HSP (Heat Shock Proteins) و غيرها.

تعد بروتينات LEA، بروتينات الحماية من آثار الإجهاد الأسموزي، تتراكم بإفراط في ظروف الإجهاد المائي، حيث تقوم بحماية البروتينات و تحافظ على توازن الأغشية و الضغط الأسموزي (Goyal et al., 2005). أشارت العديد من التقارير البروتيومية إلى تراكم بروتينات LEA و مثيلاتها كالدهيدرين DHN ، بروتينات النضج Seed Maturation Proteins (SMP), في أعضاء القمح عن تعرضها للإجهاد الأسموزي (Ford et al., 2011 ; Zhang et al., 2014). في دراسات حديثة على القمح الصلب، وجدت Capriotti et al. (2014) أن الملوحة (100 أو 200 ملي مولاً/ل)، مثل الجفاف (Ford et al., 2011)، تتسبب في تراكم بروتين WCDR410 الذي ينتمي لمجموعة الدهيدرين و يلعب بذلك دورا هاما في حماية أوراق القمح من الإجهاد الأسموزي المحدث بفعل الإجهاد الملحي.

الجدول 13. ملخص لأهم الدراسات البروتيومية التي أنجزت خلال السنة الجارية (2015/2014)

Organ	Class/Species	Reference
Flowers	Dico/Arabidopsis thaliana	Kong et al. (2014)
Leaves	Dico/Arabidopsis thaliana	Mano et al. (2014)
	Dico/ Kandelia candel	Wang et al. (2014)
	Dico/Sesuvium portulacastrum	Yi et al. (2014)
	Dico/Sunflower (Helianthus annuus)	Messaitfa et al. (2014)
	Mono/Brachypodium distachyon	Lv et al. (2014)
	Mono/Rice (Oryza sativa)	Liu et al. (2014) ; Zhang, (2014)
	Mono/Sugarcane (Saccharum officinarum)	Murad et al. (2014)
	Mono/Wheat (Triticum durum)	Capriotti et al. (2014)
	Dico/Arabidopsis thaliana	Kong et al. (2014)
	Dico/ Cowpea (Vigna unguiculata)	De Abreu et al. (2014)
Roots	Dico/Arabidopsis thaliana	Guo et al. (2014)
	Dico/ Amaranth (Amaranthus cruentus)	Huerta-Ocampo et al. (2014)
	Dico/Soybeans (Glaycine max)	Ma et al. (2014)
	Mono/Barley (Hordum vulgar)	Mostek et al. (2014)
	Mono/Rice (Oryza sativa)	Liu et al. (2014); Zhang, (2014)
Seeds	Dico/Soybeans (Glycine max)	Yin et al. (2014)
	Mono/Wheat (Triticum durum)	Fercha et al. (2014)
Shoots	Dico/Citrus (Citrus reticulata)	Tanou et al. (2014)
	Dico/Halogeton glomeratus	Wang et al. (2014)
	Mono/Rice (Oryza sativa)	Ghaffari et al. (2014)

الجدول 14. استخدام البروتيوم لدراسة عمليات إنبات البذور و / أو تحفيز البذور

Process/organ	Taxon or Specie	Conditions	Reference
Cotyledons	Soybean	flooding stress	Kamal et al. (2015)
Dormancy	Arabidopsis thaliana	-	Chibani et al. (2006)
	Wheat	-	Gao et al. (2013)
	Maize	fungal infection	Campo et al. (2004)
Germination	Alfalfa	priming, vigor	Yacoubi et al. (2011)
	Arabidopsis thaliana	α-amanitin (inhibition of transcription)/ hydro- or osmopriming/ GAs treatment ; SA and salt stress	Rajjou et al. (2004)/Gallardo et al. (2001) ; Gallardo et al. (2002) ; Rajjou et al. (2006) ; Galland et al. (2014)
	Barley	germination and radicle elongation	Bønsager et al. (2007)
	Cress	Hormone	Müller et al. (2010)
	Pea	H_2O_2 pretreatment ; osmotic stress	Barba-Espın et al. (2011) ; Brosowska-Arendt et al. (2014)
	Maize	heterosis/development	Fu et al. (2011) ; Guo et al. (2013)
	Magnolia sieboldii	seed germination	Zhang et al. (2014)
	Rice	high temperature and ABA treatment/development	Liu et al. (2014) ; Kim et al. (2009) ; Han et al. (2014)
	Soybean	development/ NaCl-stressed	Han et al. (2013) ; Yin et al. (2014)
	Wheat	priming, salinity	Fercha et al. (2013) ; Fercha et al. (2014)
Leaves	Wheat	salinity	Capriotti et al. (2014), Caruso et al., 2008
Seedling vigor, pathogen resistance	Maize	maturation drying	Wang et al. (2013)
Seeds	Barley	grain filling and seed maturation	Finnie et al. (2002)
Seed vigor	Sugarbeet	-	Catusse et al. (2008)
Several tissues	Arabidopsis thaliana	-	Fu et al. (2005)
Somatic embryo	Brassica	-	Hossain et al. (2014)

الفصل الثاني

التأثير المتداخل للملوحة و تحفيز البذور بحمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك على إنبات و نمو بادرات القمح الصلب.

Interactive effects of salinity and seed-priming with GA_3 and AsA on durum wheat seed germination and seedling growth.

الملخص

أجريت هذه التجربة بهدف دراسة التأثير المتداخل لكل من الملوحة (250 ملي مول/ل، كلوريد الصوديوم) و تحفيز البذور (seed priming) باستخدام حمض الأسكوربيك (AsA، 0.5 ملي مول/ل) وحمض الجبريليك (GA_3، 0.5 ملي مول/ل) على إنبات بذور و نمو بادرات القمح الصلب (*Triticum durum*, var. Waha). تمت أيضا دراسة تعبئة مدخرات البذور و تراكم البروتينات والسكريات الذائبة في جنين القمح أو الشتلات. تشير النتائج إلى أن جميع المعايير المدروسة قد تأثرت سلبا بفعل الملوحة. في المقابل، أبدت بذور القمح المحفزة خصوصا بالمزيج (+ AsA GA_3) تحسنا واضحا في خصائص الإنبات و قوة نمو البادرات. وعلاوة على ذلك، أبدت البذور المحفزة تحسنا في تعبئة المدخرات الغذائية وتراكم البروتينات والسكريات الذائبة مقارنة بالبذور غير المحفزة و المجهدة. إجمالا، تشير هذه النتائج إلى أن تحفيز البذور تقنية فعالة لتحسين تحمل الملوحة لدى القمح الصلب.

Abstract

In this study, we have examined the interactive effects of salinity (250 mmol/L, NaCl) and pre-sowing seed treatment (or seed priming) using Ascorbic acid (AsA, 05.mmol/L) and Gibberellic acid (GA_3, 0.5mmol/L) on durum wheat (*Triticum durum* var. Waha) seeds germination and seedlings growth. Seed reserves mobilization, soluble proteins and sugars accumulation in wheat embryo/seedling were also analyzed. Results indicate that all the studied parameters were adversely affected by salinity. However, the primed wheat seeds particularly, with the mixture (AsA+GA_3) exhibited improved germination characteristics and seedling vigor. Also, the results show that post-priming germinating seeds under salt stress exhibited an improved seed reserves mobilization and accumulation of soluble proteins and sugars compared to untreated stressed seeds. Altogether, these results indicate that seed-priming was effective in improving wheat salt tolerance.

1. المقدمـــــة

يعتمد إنتاج الحبوب على الظروف البيئية التي تعيـــق ظهـــور البادرات (باقة و مساعدوه، 2006؛ Ajouri et al., 2004 ; Hazmoune, 2006). تعد الملوحة العائق الرئيسي لإنتاج الحبوب في المناطق الجافة وشبه الجافة من حوض البحر الأبيض المتوسط (Sayar et al., 2010). تؤثر الملوحة سلبا على جميع العمليات الفسيولوجية للنبات. و ينتج عن تأثيرها فشل في إنشاء البادرات (stand establishment) نتيجة نقص وفرة المياه، مما يؤدي إلى انخفاض معدلات الإنبات أو ارتفاع معدل الوفيات بصورة غير طبيعية بين الشتلات الناشئة (Läuchli & Epstein, 1990). ومع ذلك، فإن حساسية النباتات اتجاه الإجهاد الملحي تختلف من مرحلة نمو إلى أخرى (Bernstein & Hayward, 1958).

على الرغم من كون غالبية النباتات تتحمل الملوحة نسبيا عند مراحل الإنبات/بزوغ البادرات، فهي تعتبر من المراحل الحرجة لتحديد غلة النباتات تحت ظروف الإجهاد (Läuchli & Epstein, 1990). في الواقع، يمكن للملوحة أن تؤخر الإنبات و/أو ظهور البادرات، كما تعيق أيضا إنشاء الشتلات (Maas & Grattan, 1999) كما هو الحال عند سقي القمح بالمياه المالحة (Chauhan et al., 2008). تحمل المحاصيل الزراعية للملوحة خلال هذه المرحلة، الحساسة نسبيا، يختلف كثيرا من نوع نباتي إلى آخر، و كما هو الحال بالنسبة للإنبات، فهذا التصنيف لا يتطابق بالضرورة مع التصنيف المبني على أساس المردود الحي (Läuchli & Epstein, 1990). و لذلك، فمن الضروري تحسين أداء الإنبات و نمو البادرات (قوة) تحت ظروف الإجهاد لتحقيق عوائد مقبولة و تلبية الاحتياجات الغذائية المتزايدة للسكان. و يعتقد أن التكنولوجيات الحيوية، مثل تحفيز البذور "seed priming"، تسمح بتحقيق هذا الهدف (McDonald, 2000).

تحفيز البذور هي واحدة من التقنيات الحيوية التي استخدمت حديثا لتخفيف آثار إجهادات الوسط اللاحيوي على الإنتاج الزراعي (Ashraf & Foolad, 2005). استخدم لهذا الغرض العديد من المواد الكيميائية مثل الهرمونات و الواقيات الأسموزية. شرع في السنوات القليلة الماضية استخدام مضادات الأكسدة (كالفيتامينات) للتخفيف من الآثار السلبية للملوحة على نمو المحاصيل وتحسين إنتاجيتها تحت الظروف البيئية غير الملائمة (Ashraf et al., 2008 ; Fercha et al., 2011 ; Khan et al., 2013).

مما سبق ذِكرُه تهدف هذه التجربة إلى تقييم إمكانية تحسين قدرة الإنبات و النمو (قوة) عند القمح الصلب النامي تحت ظروف الإجهاد الملحي، و ذلك باستخدام تقنية تحفيز البذور بواسطة مضاد للأكسدة (حمض الأسكوربيك) أو هرمون نباتي (حمض الجبريليك) أو مزيج من كليهما.

2. المواد و طرائق العمل

2-1.المواد النباتية و طريقة المعاملة:

تم تعقيم بذور القمح (صنف واحة، أنظر الملحق (02) التي تم الحصول عليها من المعهد التقني للمحاصيل الكبرى ITGC (سطيف) لمدة 10 دقائق في محلول يحتوي على 5 % (ح/ح) من هيبوكلوريت الصوديوم (ماء جافيل NaOCL). وأعقبت هذه الخطوة بالشطف 03 مرات بالماء المقطر لإزالة ماء جافيل (Davenport et al., 1997). تمت بعد ذلك معالجة البذور المعقمة بأحد المحاليل التالية (أنظر الجدول 1).

توضع بذور القمح في أوعية مفتوحة (لضمان التهوية) تحتوي على محاليل مائية لكل من حمض الأسكوربيك (0.5 ملي مول/ل)، حمض الجبريليك (0.5 ملي مول/ل) أو مزيج من كليهما (1:1)، و تترك لمدة 12 ساعة في مكان مظلم، مهوى و معتدل الحرارة (حوالي 25 °م).

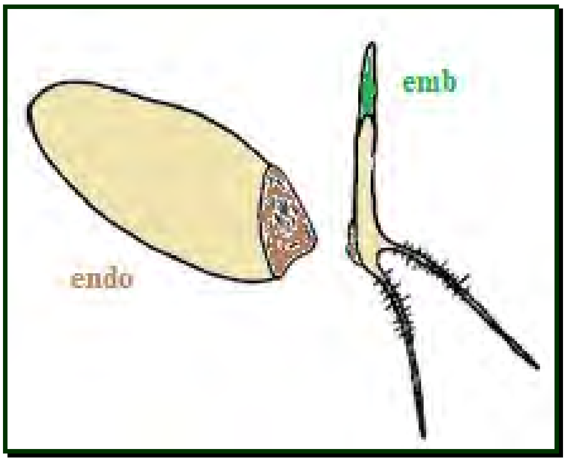
2-2.زراعة البذور في الأطباق:

تمت زراعة البذور المعاملة و غير المعاملة لمدة أسبوع، على طبقتين من ورق الترشيح تم تبليله مسبقا بالماء أو المحلول الملحي (250 ملي مول/ل) و وضعت داخل الأطباق البيترية (9 سم) بمعدل 30 بذرة في كل علبة.

جدول 1. جدول يلخص المعاملات المنجزة خلال هذه التجربة

المرحلة	الهدف	المعاملة	التشفير
الأولى	دراسة الإنبات	بدون معاملة+ بدون إجهاد	UPC
		بدون معاملة+ إجهاد	UPS
		AsA (0.5 mM)+ إجهاد	APS
الثانية	دراسة نمو الجنين بعد الإنبات	GA3 (0.5 mM)+ إجهاد	GPS
		AsA + GA3 (0.5 mM)+ إجهاد	AGPS

C, control; S, stress; UP, un-primed; APS, AsA-primed & stressed; GPS: GA3-primed & stressed; AGPS: AsA+GA3-primed & stressed; AsA: ascorbic acid; GA_3: gibberellic acid.



الشكل 1. فصل الجنين عن باقي البذرة.

2-3.القياسات:

2-3-1. اختبار الإنبات

- تم عد البذور النابتة كل يوم إلى غاية اليوم السابع (نهاية التجربة). تم حساب النسبة النهائية للإنبات (Final Germination Percentage) أو FGP باستعمال المعادلة التالية:

$$FGP = \frac{n}{N} \times 100$$

حيث يمثل n عدد البذور الناتشة و N عدد البذور المزروعة.

- كما تم حساب متوسط زمن الإنبات (Mean Germination Time) أو MGT من المعادلة التالية:

$$MGT = \frac{\sum_{i=1}^{i=7} ni \times ti}{N}$$

حيث n_i عدد البذور الناتشة عند الزمن t_i (i يمتد من 1 إلى 7) و N عدد البذور الناتشة عند نهاية التجربة.

2-3-2. معايير النمو

تم تقدير الأوزان الغضة (Fresh Weight, FW) و الجافة (Dry Weight, DW) للأجنة (الشكل 1) بواسطة ميزان تحليلي قبل و بعد تمرير الأجنة لمدة 48 ساعة في فرن تجفيف ضبطت درجة حرارته على 80 °م. تم قياس أطوال الجذير و الكوليوبتيل باستعمال ممساك رقمي (Digital caliper < 0-150 mm>).

استعملت المعطيات المتحصل عليها لحساب معامل قوة البذور أو النمو (Vigor Index) أو VI حسب المعادلة (VI= FGP x SL/100)، حيث SL يمثل طول النبيتة (سم) (Seedling Length) (Abdul-Baki & Anderson,1970). كما تم حساب معامل مقاومة الملوحة (Salt Tolerance Index) أو STI حسب المعادلة:

$(STI = FW_{stress} \times 100/FW_{control})$

2-3-3. المعايير الفسيولوجية و البيوكيميائية

- **المحتوى النسبي للماء** Relative water content (RWC)

بعدما تم عزل الجنين/البادرة عن باقي البذرة لمختلف العينات (الشكل 1)، أخذت مباشرة أوزانها الغضة (FW). ثم وضعت في أنابيب اختبار مملوءة بالماء المقطر و تركت في مكان مظلم لمدة 24 ساعة. تم بعد ذلك استخراج العينات، تجفيفها بورق الترشيح و تقدير أوزانها من جديد (Turgid Weight, TW). تم تقدير الأوزان الجافة (DW) بعد وضع العينات في فرن ضبطت حرارته على 80 °م لمدة 48 ساعة. تم حساب المحتوى النسبي للماء من المعادلة التالية (González & González-Vilar; 2001):

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

- **تعبئة المدخرات** Seed reserves mobilization (SRM)

تعبئة أو تمثيل مدخرات البذرة خلال الإنبات هي خطوة مهمة نظرا لكونها تسمح للبادرة بالنمو الجيد خلال المراحل الأولى للتطور النباتي. حساسية هذه العملية (الخطوة) تجاه الإجهاد الملحي تم تقديرها من خلال كمية المادة الجافة المتبقية في البذرة (الشكل 1) بعد سبعة أيام من الإنبات (Hajlaoui et al., 2007).

- **تقدير السكريات الذائبة في الماء** Water soluble carbohydrates (WSC)

تم تقدير السكريات الذائبة باستعمال طريقة الفينول (Dubois et al., 1956). حيث وضعت 50 مغ من النسيج الطازج في أنابيب اختبار نقية، أضيفت لها 3 مل من كحول الإيثانول (80 %) لاستخلاص السكريات الذائبة. تركت الأنابيب في مكان مظلم بعد إحكام غلقها لمدة 48 ساعة. بعد ذلك، تم تجفيف الكحول المتبقي في الأنابيب، و تمت إضافة 20 ملل من الماء المقطر لكل أنبوب للحصول على محلول التحليل. في أنابيب نظيفة، وضع 1 مل من كل عينة و أضيف له 1 مل من محلول الفينول (5 %). بعد الرج الجيد للأنابيب، أضيف لكل منها 5 ملل من حمض الكبريت (Sulfuric acid) بواسطة سحاحة. بعدما تركت العينات تستريح لمدة 30 دقيقة في حمام مائي (30 °م)، تمت قراءة الكثافة الضوئية عند طول موجة 485 نانو متر. حولت القيم المتحصل عليها إلى تركيزات بقسمتها على المعامل (4.15، *r* =0.98) الذي تم حسابه بواسطة منحى معياري باستخدام الغلوكوز النقي (0 – 0.1 ملي غرام/مل).

- **تقدير البروتينات الذائبة** soluble proteins (SPROT)

تم طحن 50 مغ من النسيج الطازج في حوض من الجليد بعد إضافة 5 مل من الماء المقطر. بعد الطرد المركزي (10 دقائق عند سرعة 2000 د/د)، أخذ الطافي من كل عينة و تم تقدير البروتينات الذائبة فيه بواسطة تقنية (1976) Bradford. أخذت القراءات عند طول الموجة 612 نانو متر (Hayat & Ahmad, 2003). تم حساب تركيز البروتين في كل عينة باستعمال المعادلة (بروتين = [القراءة – 0.48] /0.0005، *r* = 0.58) المتحصل عليها من المنحنى المعياري لتقدير البروتين باستعمال مصل البقر BSA (0 – 0.25 ملي غرام/مل).

4-2. التحليل الإحصائي

تمت معالجة النتائج إحصائيا بتحليل التباين باستخدام برنامج Statgraphics Centurion 16، حيث كان التصميم التجريبي تصميم عشوائي كامل مع n (3 أو 4) تكرار. لتحليل النسبة المئوية للإنبات، تم تحويل البيانات إلى ((Arsin√ (X / 100). تم إجراء مقارنات بين المعاملات باستخدام اختبار التجانس (LSD 5 %).

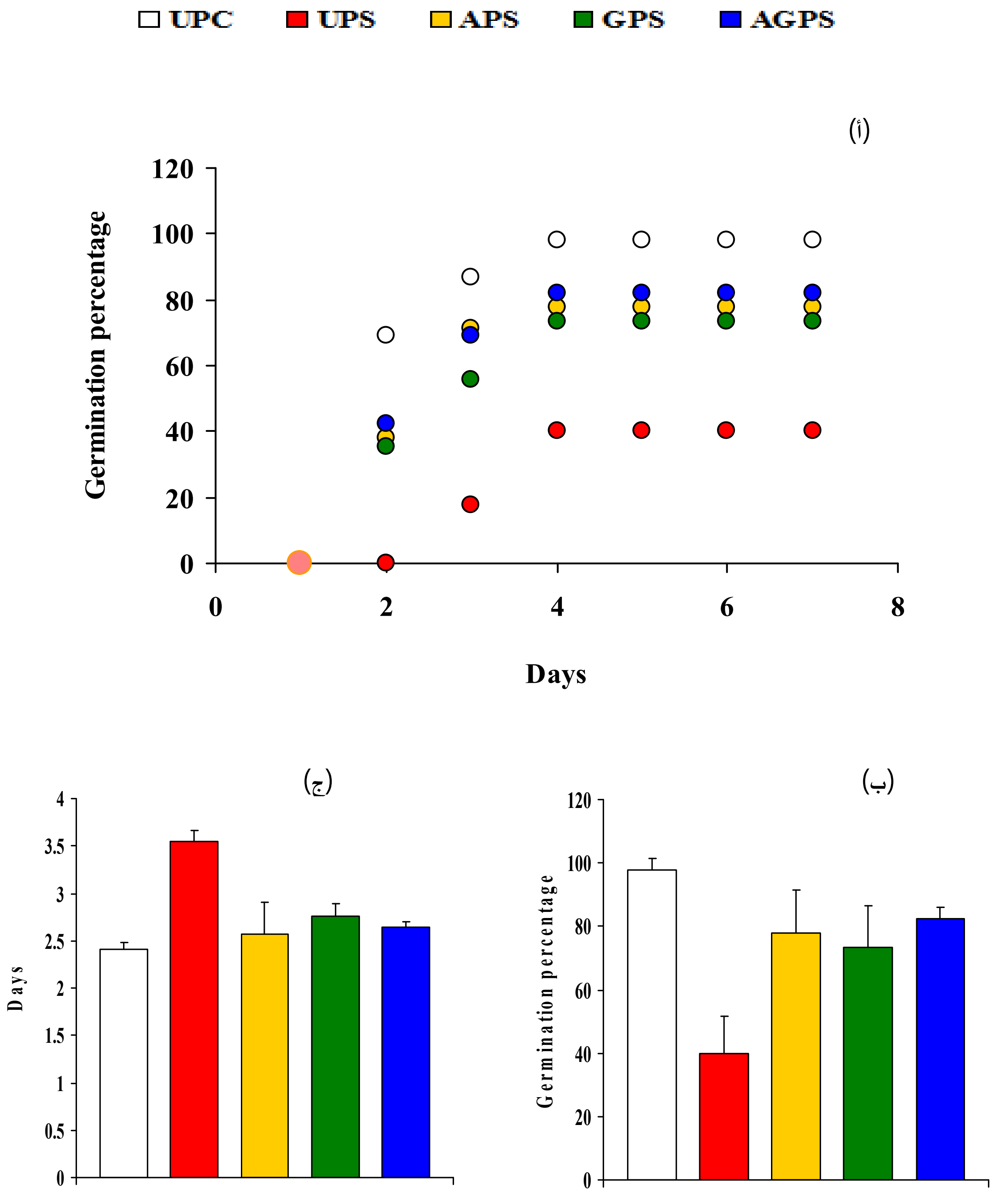
3. النتائج

1-3. خصائص الإنبات:

تشير النتائج إلى أن الملوحة (250 ملي مول/ل) قد أثرت بصورة سلبية و معنوية (الشكل 2) على جل خصائص الإنبات التي فحصت، حيث خفضت من حركية الإنبات (سجلنا تباطؤا في الإنبات) و كذا النسبة المؤوية للإنبات (~60 %)، كما أخرت الإنبات (~40 %). على النقيض من ذلك، حسنت جل المعاملات من خصائص إنبات القمح الصلب تحت ظروف الإجهاد الملحي لكن بنسب متفاوتة. في هذا الصدد تم تسجيل أفضل استرجاع لل FGP، و المقدر بـ 51.35 %، في عينات البذور المحفزة بواسطة المزيج 'حمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك' (AGPS)، كما قلل تحفيز البذور، خصوصا بواسطة GA_3 من التأثير المثبط الذي نجم عن إضافة ملح كلوريد الصوديوم إلى وسط الإنبات.

2-3. بزوغ البادرات و نمو ها

أثر كلوريد الصوديوم NaCl على بزوغ البادرات الناتجة من بذور القمح المحفزة و غير المحفزة. حيث خفض الإجهاد الملحي معنويا ($P<0.001$) من معامل القوة (VI) بدرجة كبيرة (12 مرة) مقارنة بالشاهد (UPC) (الشكل 3). كما أثرت الملوحة بشكل سلبي على مؤشر التسامح لبذور القمح الناتشة (الشكل 3). و كانت نسبة الانخفاض في هذه الحالة حوالي خمس مرات مقارنة بالشاهد (UPC). في المقابل، تحفيز البذور بمختلف المحاليل زاد من مؤشر تسامح بذور القمح للملوحة. و كانت المعاملة بـ GA_3 أفضل المعاملات حيث كان معدل التحسن 45 %، تلها في ذلك المعاملة بـ AsA (APS).



الشكل 2: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- حركية الإنبات، (ب)- نسبة الإنبات النهائية (%)، (ج)- متوسط زمن الإنبات (أيام) لبذور القمح القاسي. تم تقدير النسبة النهائية للإنبات و متوسط زمن الإنبات بعد 7 أيام من الإنبات. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري.

يتضح من النتائج المبينة في الشكل 3-أ، أن الإجهاد الملحي خفض بصورة معنوية جدا ($P < 0.001$) من الوزن الطازج للأجنة، حيث بلغت نسبة الانخفاض 90 % عند المقارنة بالعينات الشاهدة (UPC). أظهرت المعالجة المسبقة للبذور تأثيرا إيجابيا على هذا المعيار و ذلك من خلال الحد من التأثير السلبي للملوحة على نمو بادرات القمح، و شكلت المعاملة بواسطة GA_3 (GPS) أفضل المعاملات.

من الشكل 3-ب، يتضح أن الإجهاد الملحي قلل من الوزن الجاف لأجنة القمح مقارنة بالشاهد. في المقابل، أبدت المعالجة المسبقة للبذور، خصوصا بواسطة GA_3، تأثيرا إيجابيا على الوزن الجاف للأجنة و خففت بذلك من تأثير الملوحة على هذا المعيار.

يبين الشكل 3-ج أن الإجهاد الملحي عمل على الحد من نمو الكوليوبتيل (Coleoptile = Col) بنسبة 94.65 % مقارنة بالشاهد (UPC). في المقابل، تأثير كلوريد الصوديوم على نمو Col، تم تعويضه بشكل جزئي من خلال تحفيز البذور، خصوصا بواسطة حمض الجبريليك (GPS).

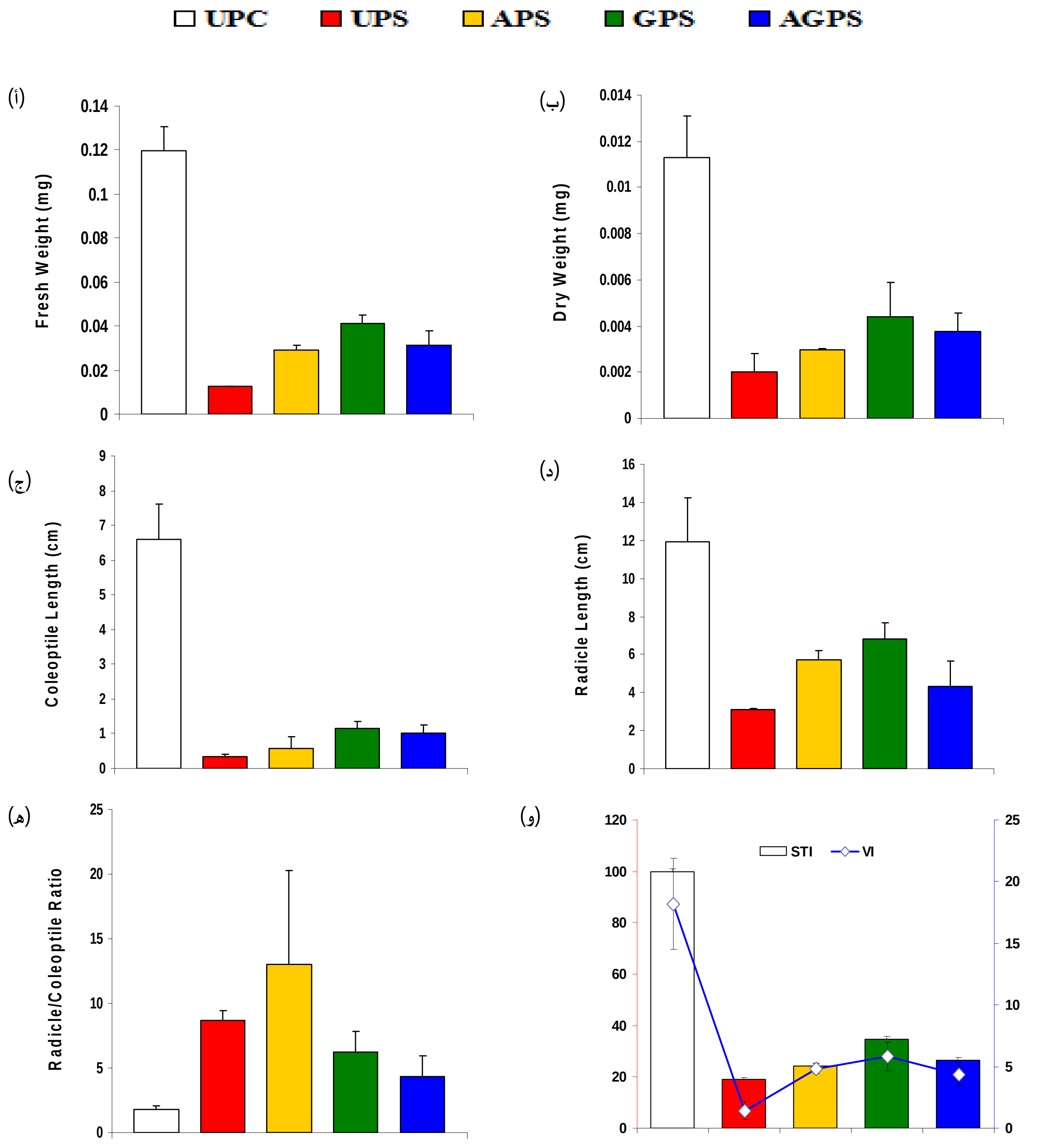
بالمثل، من الشكل 3-د يتبين أن الملوحة قد أثرت بشكل سلبي و لكن بدرجة أقل على نمو الجذير (Radicle = Rad)، حيث قدر معدل التراجع في النمو في هذه الحالة بنسبة 74.04 % مقارنة بالعينات الشاهدة (UPC). في المقابل، تحفيز البذور بمختلف المحاليل زاد من أطوال Rad، و أعطى التحفيز بـ GA_3 (GPS) أفضل تأثير حيث رفع معدل التحسن إلى 42.66 %، يليه في ذلك التحفيز بواسطة AsA (APS). في نفس السياق، و عند مقارنة نمو كل من Col و Rad كما هو مبين على الشكل 3-هـ، اتضح أن الكوليوبتيل أكثر تحسسا للملوحة من الجذير.

من جهة أخرى، أدى الإجهاد الملحي إلى الحد بصورة جد معتبرة (81.39 %، $P < 0.001$) من معامل قوة نمو البادرات (الشكل 3- و) مقارنة بالشاهد (UPC). وعلاوة على ذلك، انعكس تأثير كلوريد الصوديوم على VI بشكل جزئي اثر معالجة البذور، و أعطت المعاملة بواسطة(GA_3) أفضل تأثير.

جدول 2. التحليل الإحصائي لمعايير النمو و الأيض العام

Variation	WSC	SPROT	RWC	SRM	VI	STI	FW	DW	R/C	RL	CL
معامل فيشر F	7.21**	14.5***	4.4*	8.8**	37.5***	252***	137.9***	30.5***	ns	20.7***	83.8***
أصغر فرق مع. LSD 5%	0.49	0.04	14.3	0.02	3,541	7,537	0.012	0.0023	ns	2.53	5.47

*P< 0.05; **P< 0.01; ***P< 0.001; ns not significant



الشكل 3: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- الوزن الغض (مغ)، (ب)- الوزن الجاف (مغ)، (ج)- طول الكوليوبتيل (سم)، (د)- طول الجدير (سم)، (هـ)- النسبة ج/ك، (و)- معامل قوة البذور (VI) و مؤشر التسامح الملحي (STI) عند القمح الصلب. تم تقدير كل هذه المعايير بعد 7 أيام من الإنبات. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري.

3-3.المعايير الفسيولوجية و البيوكيميائية:

- **المحتوى النسبي للماء (RWC):**

مقارنة بالشاهد، أبدي الإجهاد الملحي تأثيرا سلبيا على محتوى أجنة/بادرات القمح من الماء (الشكل 4-أ). تعرضت الأجنة/بادرات إلى فقد ما يقرب 18.5% من محتواها النسبي للماء. في المقابل، تحفيز البذور بواسطة AGPS خففت من هذا التأثير السلبي لملح كلوريد الصوديوم.

- **تعبئة المدخرات الغذائية (SRM):**

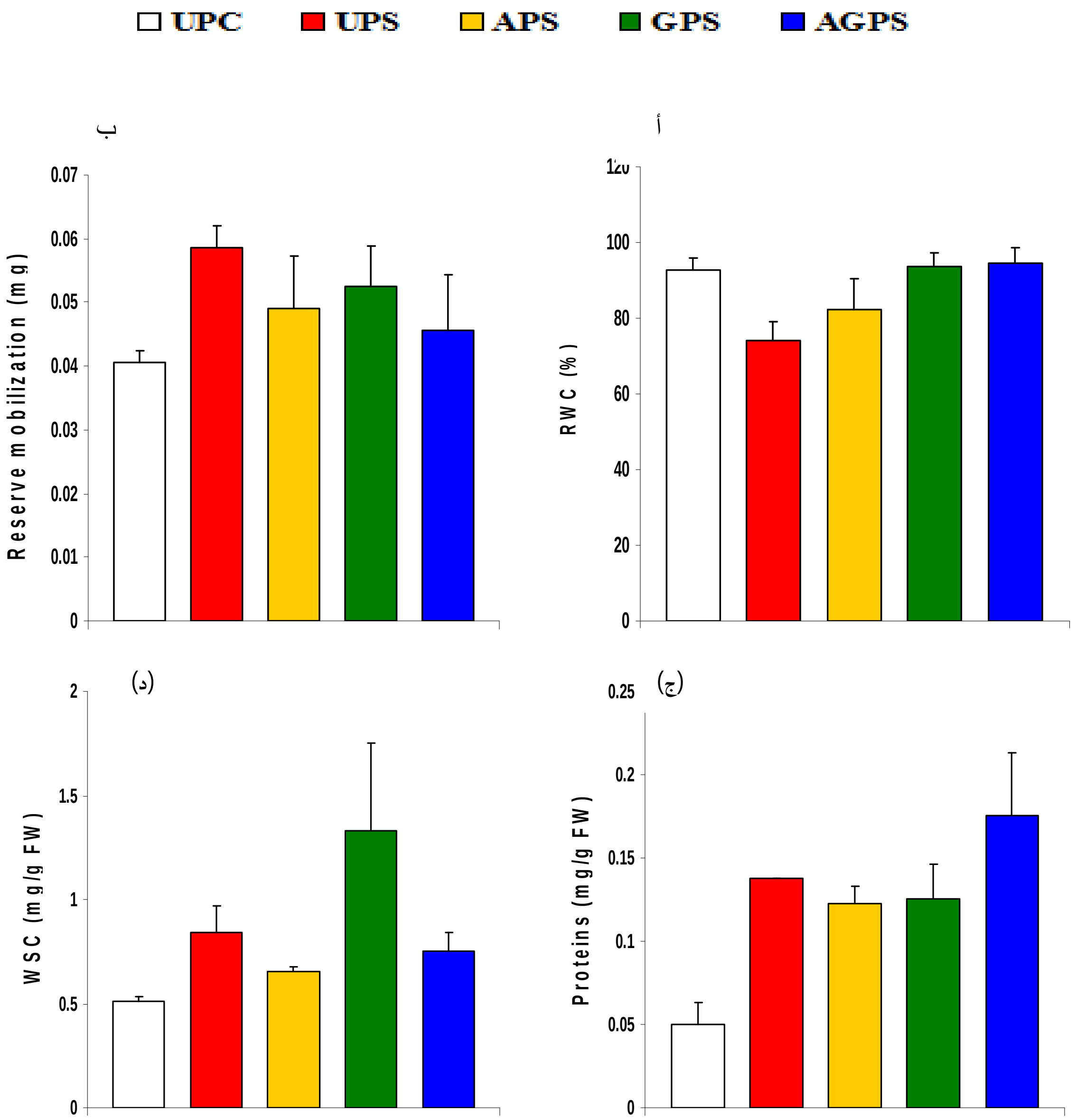
مقارنة بالشاهد، أبدت حبوب القمح المجهدة ملحيا قدرة ضعيفة على تعبئة مدخراتها الغذائية (الشكل 4-ب). حيث فقدت الأجنة بعد تعرضها للإجهاد ما يقارب 50 % من قدرتها على تعبئة مدخراتها. مع ذلك، و مع استثناء المعاملة بواسطة المزيج AGPS ، تحريض البذور لم يبدي أي تأثير واضح على هذا المعيار.

- **السكريات الذائبة في الماء (WSC):**

أدت إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الإنبات إلى تراكم السكريات الذائبة (WSC) في أجنة القمح (الشكل 4-د). في غياب الإجهاد لم يتجاوز محتوى الأجنة من السكر 0.5 مغ/غ الوزن الغض ، ليصبح بعد الإجهاد أكثر من 0.8 مغ/غ الوزن الغض، وهذا يعني زيادة قدرها حوالي 40 %. في المقابل، أدت المعاملة بحمض الأسكوربيك إلى تراجع معدل WSC .

- **البروتينات الذائبة (SPROT):**

عند الإجهاد الملحي، أبدت حبوب القمح زيادة في محتواها من البروتينات الذائبة (تقريبا ثلاث مرات مقارنة بالعينات الشاهدة). في حين، أدت إضافة حمضي الأسكوربيك و الجبريليك إلى تراجع طفيف (8.76 %) في محتوى البذور من البروتين (الشكل 4-ج). على العكس من ذلك أدت المعاملة المزدوجة إلى رفع محتوى البذور المعرضة للإجهاد من البروتين.



الشكل 4: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- المحتوى النسبي للماء (%)، (ب)- تعبئة المدخرات (مغ)، (ج)- البروتينات الذائبة (مغ/غ وزن غض)، (د)- السكريات الذائبة (مغ/غ وزن غض) عند القمح الصلب. تم تقدير كل هذه المعايير بعد 7 أيام من الإنبات. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري.

4. المنـــاقشــــة

قمنا في هذه التجربة بدراسة تأثير تركيز عالي لمح كلوريد الصوديوم NaCl (250 مليمول/ل) على حركية الإنبات، قدرة الإنبات أو النسبة النهائية للإنبات (FGP)، متوسط زمن الإنبات (MGT) و كذا نمو و أيض السكريات و البروتينات في أجنة بذور قمح صلب (صنف واحة) محفزة و غير محفزة (الأشكال: 2-أ، 2-ب، 2-ج) بواسطة تركيزات تم اختيارها بناءا على معلومات نظرية (دراسات سابقة) و كذا تجارب أولية (أنظر الملحق01).

دلت النتائج المبينة في الأشكال (2 و 3) على أن الملوحة تؤثر سلبا على جميع صفات الإنبات و النمو المدروسة. تتفق نتائجنا مع نتائج العديد من الدراسات السابقة (Almansouri et al. , 2001; Fercha & Gherroucha, 2014; Zhang et al., 2010). يمكن للملوحة أن تؤثر على إنبات البذور إما عن طريق فرض ضغط أسموزي، يمنع الأخيرة من امتصاص الماء، أو بواسطة التسميم الأيوني، مما يعرقل عملية تعبة المدخرات الغذائية (الشكل 4-ب) و تمثيلها بواسطة الخلايا ومنه عدم مقدرتها على الانقسام أو التوسع، فيتأخر الإنبات و قد يؤدي ذلك إلى موت البذور (Zhang et al., 2010).

يعد نتوء الجذير من خلال معطف البذرة الدليل المرئي الأول على حدوث الإنبات. و يحدث ذلك كنتيجة لعملتي تضخم الخلايا و انقسامها (Haber & Luippold, 1969)، و اللتان تبديان حساسية مفرطة تجاه الجفاف، مما يوحي إلى أن الملوحة تقلل من نمو الجذور الجنينية بصورة غير مباشرة من خلال حجز ها الماء عن البذرة. في الواقع، نتائجنا تدعم هذا الاستنتاج، حيث ارتبط انخفاض أداء الإنبات مع انخفاض RWC، لاسيما و أن انخفاض RWC إلى أقل من 80 % (الشكل 4-أ) يؤدي إلى تراكم هرمون حمض الأبسيسيك (ABA) الذي يمنع بدوره الإنبات و منه نتوء الجذير (González & González-Vilar, 2001).

تشير النتائج المبينة في الأشكال (2 و 3) أن تحفيز البذور بكل من حمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك قد سرعا من إنبات البذور و رفعا من النسبة النهائية للإنبات، كما حسنا من خصائص نمو البادرات. هذه النتائج تدعمها نتائج العديد من الدراسات السابقة (Afzal et al., 2006; Bahrani & Pourreza, 2012; Saeidi-Sar et al., 2012; Turkyimaz, 2012). فعلى سبيل المثال أظهر Turkyilmaz (2012) أن المعاملة المسبقة للبذور بواسطة الجبرلينات (10 – 20 جزء/مليون) خففت من الآثار السلبية للملوحة على الإنبات و نمو القمح اللين. كما أظهر Bahrani & Pourreza (2012) و Sastry & Shekhawat (2001) أن بذور القمح المحفزة بواسطة الجبرلينات تبدي نسب إنبات مرتفعة مقارنة بالبذور غير المحفزة عند تعرضها للإجهاد الملحي. بالمثل أظهر Afzal et al. (2006) أن تحفيز بذور القمح بحمض الأسكوربيك (50 جزء/مليون) لا يزيد من النسبة النهائية للإنبات فحسب بل و يقلل أيضا من متوسط زمن الإنبات تحت ظروف الإجهاد الملحي.

يتضمن الإنبات انتقال الجنين من حالة السكون إلى حالة عالية النشاط (Gallardo et al., 2001). يلعب التوازن القائم بين هرمونات ABA و GAs دورا بارزا في تنظيم كل من سكون و إنبات البذور، حيث أنه ينبغي خفض مستوى ABA للسماح للجبرلينات بتشجيع الإنبات (Liu et al., 2010). تحتوى البذور عند نضجها على كمية كبيرة من

ABA في الأنسجة المحيطة بالجنين (Williams et al., 1973) بينما تتركز الجبرلينات في الجنين (Ross, 1971). لكن عندما تجف البذور بعد حصادها، ويصبح الجنين غير نشط، تقل مستويات الجبرلينات بشكل ملحوظ (Ross & Bradbeer, 1968)، ليعود و يزيد تركيزها عندما تشرع في الإنبات (أنظر القسم النظري).

حديثا، أظهر Liu et al. (2010) أن عملية مراقبة إنبات و سكون البذور التي تخضع لسيطرة مزدوجة لكل من حمض الأبسيسيك و الجبرلينات، تستلزم تدخل جزيئات الماء الأكسوجيني، ربما لكون هذه الأخيرة تنظم هدم حمض الأبسيسيك و تخليق الجبرلينات. في نفس السياق، في دراسة أحدث، أشار Ye & Zhang (2012) إلى أن حمض الأسكوربيك يساهم هو الأخر في مراقبة هذه العملية.

أشارت بعض التقارير إلى أن النباتات التي تمتلك الاستعداد الوراثي للتسامح الملحي هي فقط التي تستجيب بشكل أفضل للتحفيز الخارجي بواسطة منظمات النمو مثل AsA (Athara et al., 2008) و GA_3 (Iqbal & Ashraf, 2013)، مما يوحي إلى أن AsA و GA_3 يعملان على التخفيف من الآثار الضارة للإجهاد الملحي من خلال تنشيط آليات الدفاع المختلفة للنبات. مع ذلك، قد يرجع التأثير الإيجابي لـ AsA و GA_3 على نمو نباتات القمح المجهدة، لقدرتهما على تشجيع انقسام الخلايا و استطالتها (Smirnoff, 2000). يبدو أن حمض الاسكوربيك، مثل الجبرلينات، يزيد من نشاط الانقسام الخلوي من خلال تحفيز الانتقال من الطور G1 إلى الطور S (Smirnoff, 1996). كما أشارت العديد من الأبحاث التي أجريت على حمض الاسكوربيك أنه يعمل على تعزيز استطالة الخلايا و تكاثرها (Arrigoni et al.,1977; Blokhina et al., 2002). ونتائجنا تؤيد هذه الاستنتاجات، خصوصا التأثير التحسيني الذي أبدته عملية تحفيز البذور على تعبئة المدخرات، تراكم البروتينات و السكريات الذائبة (الشكل 4)، و مع ذلك تبقى الآليات البيولوجية التي تفسر هذا التأثير المضاد للملوحة غير واضحة.

5. الخلاصة

كان الهدف من هذا البحث هو تقييم التأثير المتداخل للملوحة (250 ملي مول/ل) و تحفيز البذور "seed-priming" بواسطة حمض الجبريليك (0.5 ملي مول/ل) أو حمض الأسكوربيك (0.5 ملي مول/ل) أو مزيج من كلا الحمضين على إنبات و نمو بادرات القمح. و تمثلت النتائج الرئيسية فيما يلي:

- أثر الإجهاد الملحي سلبا على كل خصائص الإنبات و ظهور البادرات في القمح الصلب.
- تحفيز البذور تقنية فعالة في الحد من الأثر السلبي للملوحة على خصائص الإنبات و نمو البادرات عند القمح.
- التأثير الإيجابي المعتبر الذي أعطته المعاملة بالمزيج (GA_3+AsA) على إنبات و نمو القمح تحت ظروف الإجهاد، يشير إلى وجود تفاعل (cross-talk) إيجابي بين هذه الجزيئات.
- تحفيز البذور بحمض الأسكوربيك كان فعالا، و يعود السبب في ذلك ربما بالإضافة إلى كونه يساعد في التقليل من الآثار السلبية لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) مثل H_2O_2، التي يزيد إنتاجها في ظل الإجهاد الملحي، كونه عامل مهم في تنظيم إنبات البذور من خلال مراقبة التخليق الحيوي لـ GAs و ABA كما أقترح حديثا (Ye & Zhang, 2012).

الفصل الثالث

التأثير المتداخل للملوحة و تحفيز البذور بحمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك على بعض خصائص النمو و الأيض العام لشتلات القمح الصلب

The interactive effects of salinity and seed priming with GA_3 and AsA on durum wheat seedlings growth and metabolism

الملخص

أجريت هذه التجربة بهدف دراسة تأثير معاملة البذور قبل الزراعة أو تحفيزها بواسطة حمض الأسكوربيك (AsA، 0.5 ملي مول/ل) وحمض الجبريليك (GA_3، 0.5 ملي مول/ل) على تحمل الإجهاد الملحي في القمح الطلب (*Triticum durum* var. Waha). تم تعريض نباتات فتية (20 يوم) مزروعة في أصص (2كغ) للإجهاد الملحي وذلك بسقيها بـ 50 مل من محلول ملحي (كلوريد الصوديوم) بتركيز 150 ملي مول/ل لمدة أسبوع، ثم بتركيز 200 ملي مول/ل خلال الأسبوع الثاني. بعد أسبوعين من الإجهاد، تم حصاد التجربة و أخذت القياسات المختلفة. تمت دراسة تأثير الإجهاد الملحي في وجود وغياب التحفيز البذري على كل من نمو الأوراق، المحتوى النسبي للماء، محتوي الأوراق من الكلوروفيل (أ و ب)، أشباه الكاروتين، البرولين و السكريات الذائبة، الماء فوق الأكسوجيني و مادة MDA (مؤشر عن أكسدة اللبيدات). دلت النتائج على أن الأثار السلبية للإجهاد الملحي على مختلف المعايير المدروسة تمت معاكستها بمختلف المعاملات، لاسيما التحفيز-بالأسكوربات (Ascorbate-priming). و افترض من مناقشة النتائج وجود تأثير تآزري بين AsA وGA_3 في العمل على تقليل أضرار الإجهاد الملحي. في الختام يمكن القول أن تحفيز البذور بمضادات الأكسدة (مثل فيتامين ج) ربما يشجع التحمل الملحي في القمح الصلب، من خلال تشجيع التوازن الأسموزي، الوقاية من إجهاد الأكسدة المحدث بفعل الملوحة و الحفاظ أو استرجاع التوازن الهرموني.

Abstract

This study was carried out to examine whether seed priming or pre-sowing seed treatment with Ascorbic acid (AsA, 0.5 mmol/L) and Gibberellic acid (GA_3, 0.5 mmol/L) can improve salt-stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum*, var. Waha). Twenty-day-old plants growing in pots (2Kg) were subjected to salt stress by adding 50 ml of a saline solution (NaCl) at 150 mmol/L of concentration for one week, then at the concentration of 200 mmol/L during the second week. After two weeks of stress, plants were harvested and the different parameters were measured. Effects of salt stress in the presence and absence of the treatments on the growth of leaves, the amount of relative water content, chlorophylls, carotenoids, free proline, water soluble carbohydrates, hydrogen peroxide as well as MDA were assessed. It has been established that the effects of salt stress on the different parameters analyzed were alleviated by the pre-sowing treatments, particularly by AsA-priming. It has been presumed from the discussion of results the existence of synergistic effect between AsA and GA_3 on the alleviation of salt stress. In conclusion we can say that seed priming with antioxidants (such vitamin C) can improve salt tolerance in durum wheat, through osmotic adjustment, protective effect against salt-induced oxidative stress and, as a result, by maintaining or recovering hormonal balance.

1. المقدمــة

تعتبر الملوحة أحد أكثر المشاكل البيئية خطورة، إذ تحد من نمو و إنتاجية المحاصيل الزراعية (Munns & Tester, 2008). وفقا لمنظمة الأغذية و الزراعة (FAO) أكثر من 800 مليون هكتار من الأراضي الزراعية في العالم متأثرة بشدة من جراء الملوحة (FAO, 2008). في الجزائر، على سبيل المثال، تقدر المساحة المتأثرة بالأملاح بـ 3.2 مليون هكتار (Benmahioul et al., 2008). تمنع الملوحة نمو النبات عن طريق أربع طرق رئيسية، ألا و هي الضغط الاسموزي، السمية النوعية للأيونات، الأكسدة و اختلال التوازن الهرموني (Ashraf, 2009).

القمح هو المحصول الغذائي الأساسي للبشرية نظرا لخصائصه الكيفية الفريدة من نوعها (O'Brien & DePauw, 2004)، و مع ذلك، فإن إنتاجية القمح لا تواكب النمو السكان العالمي (< 9 مليار نسمة في عام 2050). فهناك حاجة إلى زيادة كبيرة في إنتاج القمح (< 40% في عام 2020 و < 70% سنة 2050) لتلبية الطلب المتزايد على هذا الغذاء الأساسي (Bhalla, 2006).

على الرغم من كون القمح الصلب أحد أهم المحاصيل التي تزرع على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط، حيث يغطي إنتاجه حوالي 75 % من الإنتاج العالمي من القمح (Habash et al, 2009; Yousfi et al, 2010)، غالبا ما تكون إنتاجيته محدودة نتيجة لضعف الإنبات و الإنشاء (stand establishment). و تلعب الملوحة دورا حاسما في ذلك (Sayar et al., 2010). لذلك، يبدو من الأنسب استخدام الأنماط الوراثية التي تم تحسين تحملها للأملاح. و هذا أمر مهم خاصة بالنسبة للقمح الصلب، كونه أكثر تحسسا للملوحة مقارنة بقريبه قمح الخبز (Yousfi et al, 2010; Munns et al, 2012).

تنتج الخلايا النباتية بصورة طبيعية مختلف أنواع الأكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species, ROS). في حين يتفاقم الإنتاج خلال الشيخوخة و عند تعرض النبات لإجهادات الوسط الحيوية و غير الحيوية (Zentgraf, 2007). بغض النظر عن كيف و أين يتم تخليق ROS، ينجر عن زيادة محتوى الخلايا من المواد التأكسدية تأثيرين مهمين، ألا وهما، تحطيم مكونات الخلية و تعطيل مسارات نوعية لنقل الإشارة (Foyer et al., 2009).

يتيح تحفيز البذور (Seed priming)، بمختلف العوامل الحيوية و غير الحيوية، تخفيف آثار إجهادات الوسط على الإنتاج النباتي (Ashraf & Foolad, 2005). و لهذه الغاية، استخدمت العديد من المواد مثل الهرمونات النباتية، الواقيات الأسموزية و كذا المواد المضادة للأكسدة كالفيتامين ج AsA (Ashraf et al., 2008 ; Fercha et al., 2011; Khan et al., 2011; Khan et al., 2013).

تهدف هذه التجربة إلى تقييم إمكانية تحسين قدرة شتلات القمح الصلب على تحمل الأضرار الناجمة عن الإجهاد الملحي على نموها و كذا ايضها العام، من خلال تقنية تحفيز البذور باستخدام كل من مضادات الأكسدة و هرمونات النمو.

2. المواد و طرائق العمل

2-1.المواد البيولوجية و طريقة الزراعة

أجريت هذه التجربة في غرفة زراعة شبه مراقبة مع دورة ضوئية من 16 ساعة و رطوبة نسبية تصل إلى 65 % و درجة حرارة 25 ± 3 درجة مئوية في أصص بلاستيكية (2 كلغ) مملوءة بتربة متجانسة (التربة طينية- طمية لا تعاني من مشكلة الملوحة). بعد التطهير بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم (5 %) لمدة 10 دقائق يليها الشطف بالماء المقطر 03 مرات ثم التجفيف، وزرعت حبات القمح المعاملة و غير المعاملة (أنظر التجربة 1) بمعدل 9 بذرات في كل أصيص و تم سقيها بالماء المقطر. بعد ظهور الورقة الثالثة قسمت التجربة إلى قسمين (ثلاثة تكرارات لكل قسم) كما يلي:

ق-1: تم سقي الأصص بماء الحنفية (ماء عذب) بمعدل 50 ملل كل يوم طيلة التجربة.

ق-2: تم سقي الأصص بمحلول ملحي (كلوريد الصوديوم) بتركيز 150 ملي مول/ ل لمدة 07 أيام ومن ثم يتم رفع التركيز إلى 200 ملي مول/ل لسبعة أيام أخرى.

2-2.القياسات:

بعد أسبوعين من الإجهاد الملحي، حصدت التجربة و تم تقدير مختلف القياسات و المعايير.

أ. نمو الأوراق (الورقة الثالثة)

استعملت الورقة الثالثة لقياس التأثير المتداخل لكل من الملوحة و تحفيز البذور بمختلف المحاليل على نمو الأوراق. حيث تم تقدير كل من:

- الأوزان الغضة و الجافة (Leaf Fresh Weight or LFW and Leaf Dry Weight or LDW)
- المساحة الورقية (Leaf Area or LA) بحيث، LA = Length x Width x 0.75 (Quarrie & Jones, 1979).

ب. المحتوى النسبي للماء (Relative Water Content or RWC)

تم تحديد RWC من العلاقة التي أقترحت من قبل Barrs (1968) كما عرضها Kingsbury et al. (1984). حيث تم قطع الأوراق من القاعدة و أخذت أوزانها الطازجة (LFW). وضعت بعد ذلك في أنابيب اختبار تحتوي على ماء مقطر، و احتفظ بها في درجة حرارة الغرفة في مكان مظلم. بعد 24 ساعة استخرجت الأوراق و تم تجفيف سطحها بورق الترشيح و من ثم أخذت أوزانها من جديد الوزن الإنتباجي (Leaf turgide weight or LTW). تم تحديد الأوزان الجافة (LDW)، بعدما أمضت العينات 48 ساعة في الفرن على درجة حرارة 85 °م. تم تحديد RWC باستخدام المعادلة التالية:

$$RWC = \frac{LFW - LDW}{LTW - LDW} \times 100$$

ج. **تقدير أصباغ الكلوروفيل (Chl-a & b) و أشباه الكاروتين (CAR):**

تم تحديد محتوى الأوراق من الكلوروفيل أ، ب، و من أشباه الكاروتين حسب طريقة Agarwal et al. (1986) (حسب ما ذكره Higazy et al., 1995) مع تعديل طفيف. حيث تم طحن 50 ملغ من الأوراق الغضة في 20 مل من خليط الإيثانول و الأسيتون بنسبة 3 إلى 1 على الترتيب. بعد الترشيح، تم قياس الكثافة الضوئية باستعمال جهاز المطياف (JENWAY 6300) على الأطوال الموجية التالية: 480، 649 و 665 نانو متر. تم تحديد تركيز الكلوروفيل و أشباه الكاروتين باستعمال صيغ خاصة (Touchard, 2006 ; Wintermas & Demots, 1965).

$$\frac{\mu g\ \text{chlorophyll a}}{\text{ml solution}} = [(13.7)(A\ 665\ nm)] - [(5.76)(A\ 649\ nm)]$$

$$\frac{\mu g\ \text{chlorophyll b}}{\text{ml solution}} = [(25.8)(A\ 649\ nm)] - [(7.60)(A\ 665\ nm)]$$

$$\frac{\mu g\ \text{carotenoids}}{\text{ml solution}} = [(100)(A\ 470\ nm) - (1.82)\ Ca - (85.02)\ Cb]/198$$

د. **تقدير السكريات الذائبة في الماء (WSC):**

تم تقدير السكريات الذائبة في الماء في الأوراق حسب طريقة الفينول (Dubois et al., 1956) كما سبق توصيفها في معرض المواد و الطرائق للتجربة الأولى.

ه. **تقدير البرولين (PRO):**

تم تقدير محتوى الأوراق من البرولين (PRO) وفقا لطريقة Troll & Lindslay (1955)، كما وصفها Drier & Goring (1974)، حيث تمت قراءة الكثافة الضوئية عند طول الموجة 528 نانو متر. تم بعد ذلك تحديد تركيز البرولين بقسمة قيم الكثافة الضوئية على المعامل (0.31 حيث $r = 0.98$) المستخرج من المنحنى المعياري باستعمال البرولين النقي (0 – 0.1 مغ/مل).

و. **تقدير الماء الأكسجيني (H_2O_2):**

تم تحديد محتوى الأوراق من H_2O_2 حسب طريقة Velikova et al. (2000). حيث تم طحن 0.1 غرام من الأوراق الطازجة في حمام من الجليد مع 5 مل من حمض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) عند تركيز 0.1 %. تم تعريض الناتج لطرد مركزي دام 15 دقيقة عند سرعة 12000 دورة في الدقيقة. أضيف بعد ذلك 0.5 مل من الطافي إلى 0.5 مل من المنظم (فوسفات البوتاسيوم، 10 مليمول/ل، درجة حموضته 7) و 1 مل من أيود البوتاسيوم (KI) بتركيز 1 مول/ل. أخذت قراءات الامتصاص عند طول موجة 390 نانو متر باستخدام مقياس الطيف الضوئي (JENWAY 6300). تم تحديد محتوى H_2O_2 بقسمة النتائج على المعامل (0.04 حيث $r = 0.92$) المستخرج من منحى المعايرة باستخدام تركيزات معلومة من H_2O_2.

ز. تقدير أكسدة اللبيدات Lipids peroxidation (LPO) :

تم قياس أكسدة الدهون في أنسجة الأوراق من خلال تقدير محتوى Malondialdehyde (MDA) – و هي مادة تنتج عن أكسدة اللبيدات – باستعمال حمض الثيوباربتيريك Thiobarbituric acid (TBA) (Heath & Packer, 1968). بعد مزج عينات من الأوراق 0.25 غرام مع 5 مل من حمض TCA (0.1 %). تم إخضاع الناتج لطرد مركزي عند سرعة 10000 د/د لمدة 5 دقائق. تم أخذ 1 مل من الطافي و أضيف له 4 مل من TCA (20 %) تحتوي على 0.5 % TBA. تم تسخين الخليط عند 95 °م لمدة 30 دقيقة، ثم تم تبريده بسرعة في حمام ثلجي. بعد الطرد المركزي عند 10000 د/د لمدة 10 دقائق، أخذت قراءات امتصاص الطيف عند طول موجة 532 نانو متر ثم طرحت منها قيمة الامتصاص غير النوعي عند طول الموجة 600 نانو متر. تم حساب تركيز MDA باستخدام معامل الانطفاء المولي (e) المقدر بـ $155\ mm^{-1}\ cm^{-1}$ (Heath & Packer, 1968).

2-3. التحليل الإحصائي وعرض النتائج:

التصميم التجريبي المعتمد في هذه التجربة هو التوزيع العشوائي الكامل. أخضعت النتائج لتحليل التباين (ANOVA) على عتبة 5 % كما أجريت مقارنات بين المعاملات المختلفة باستخدام اختبار التجانس (LSD 5 %). تم إجراء هذا التحليل باستخدام برنامج STATISTICA V.8 (Hill & Lewicki, 2007).

3. النتائـــــج:

3-1. معايير نمو الأوراق:

- **الوزن الرطب (FW):**

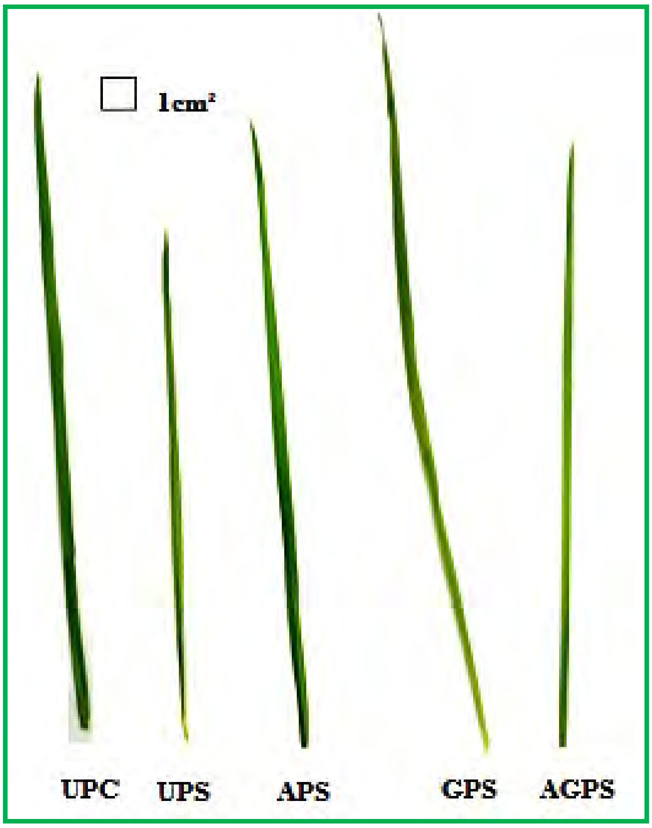
خفض الإجهاد الملحي معنويا (P <0.05) من الوزن الرطب للأوراق (الشكل 2-أ). حيث فقدت أوراق الشتلات المجهدة حوالي 20 % من وزنها الغض مقارنة بالعينات الشاهدة. و علاوة على ذلك، خففت المعاملة المسبقة للبذور من تأثير الملوحة على الوزن الطازج للأوراق. خصوصا المعاملة بحمض الأسكوربيك أين تجاوز الوزن الغض للأوراق أوزان كل المعاملات بما في ذلك العينات الشاهدة (الشكل 2).

- **الوزن الجاف (DW):**

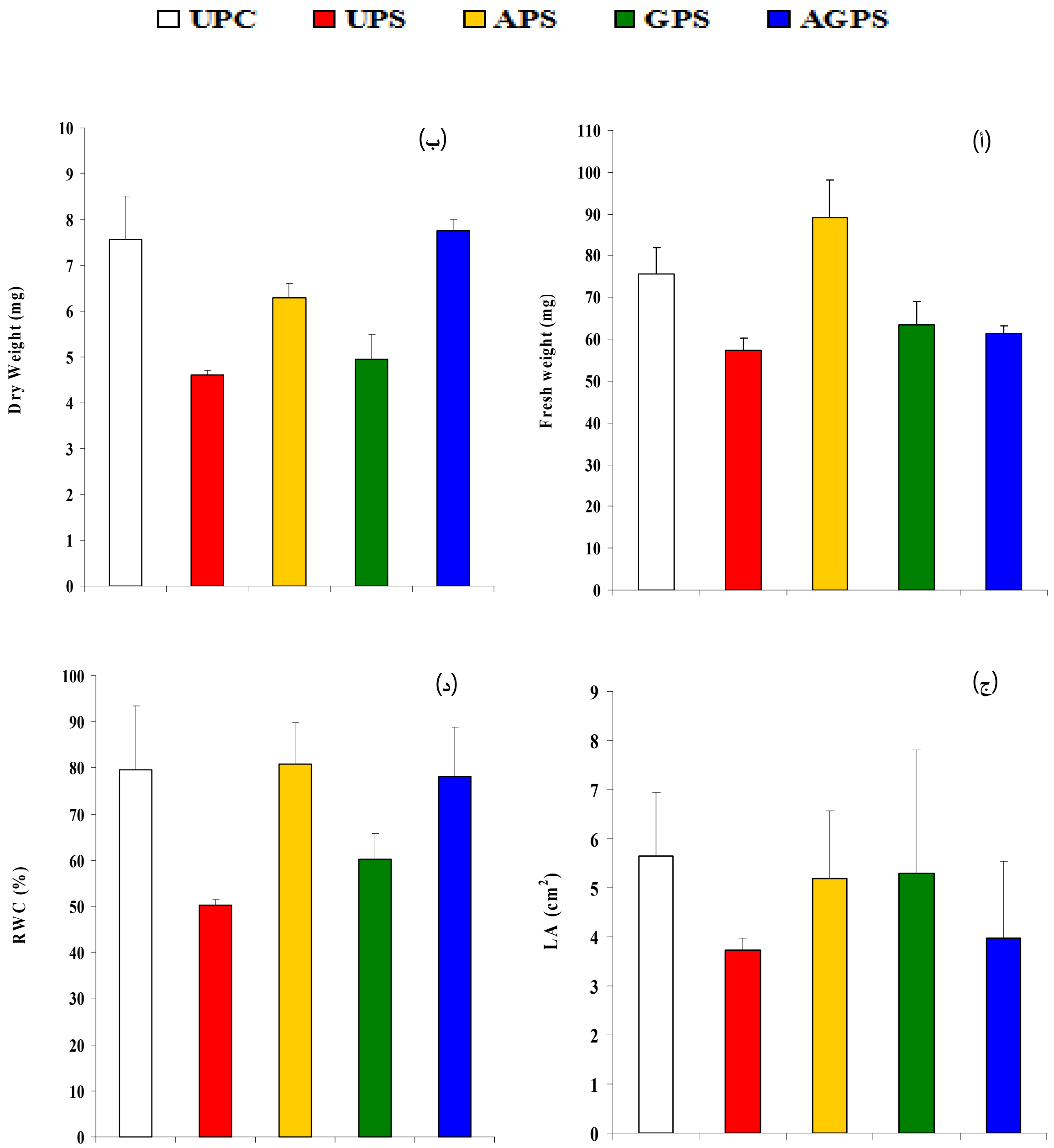
أثر الإجهاد الملحي معنويا على الوزن الجاف للأوراق، حيث خفض هذا الأخير بحوالي 40 % مما هو عند الشاهد (الشكل 2-ب). أظهرت معالجة البذور تأثيرا تحسينيا على الوزن الجاف للأوراق و لكن بدرجات متفاوتة تبعا لنوع المعاملة. و سجلت المعاملة AGPS أفضل تأثير متبوعة بالمعاملة APS (الشكل 2-ب).

■ مساحة الورقة (LA):

بينما يظهر الشكل 2-ج، انخفاض في المساحة الورقية تحت تأثير الإجهاد الملحي، كشف تحليل التباين أن هذا التأثير ليس معنويا (الجدول 1). ومع ذلك، يبدو أن البذور المحفزة بواسطة AsA و GA_3 كل على حدى قد حسنت هذا المتغير ولكن دون وجود اختلاف إحصائي معنوي (، الشكل 1، الشكل 2-ج).



شكل 1. عينة من أوراق شتلات القمح الصلب لمختلف المعاملات



الشكل 2: التأثير المتداخل لتحفيز البذور والملوحة على (أ)- الوزن الغض (مغ)، (ب)- الوزن الجاف (مغ)، (ج)- المساحة (سم^2)، (د)- المحتوى النسبي للماء (%) لأوراق القمح الصلب. تم تقدير كل هذه المعايير بعد 15 يوم من الإجهاد الملحي. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري.

المعايير الفسيولوجية والبيوكيميائية:

أ. المحتوى النسبي للماء (RWC):

أثر الإجهاد الملحي بنسبة كبيرة (P <0.01) على معدل الرطوبة النسبية للأوراق (الشكل 3). ومع ذلك، حسـ المعاملة المسبقة للبذور بصورة معنوية (P <0.05) من RWC. من خلال المقارنة المعاملة بحمض الأسكوربيك أعطت أفضل استرجاع لـ RWC.

ب. صبغات التمثيل الضوئي:

ü الكلوروفيل أ (Chl-a):

وفقا للشكل 3-أ، تسبب الإجهاد الملحي في زيادة معنوية في محتوى الأوراق من Chl-a. على العكس من ذلك، أدى تحفيز البذور خصوصا بواسطة حمض الأسكوربيك إلى منع هذا التراكم الناتج عن الإجهاد الملحي.

ü الكلوروفيل ب (Chl-b):

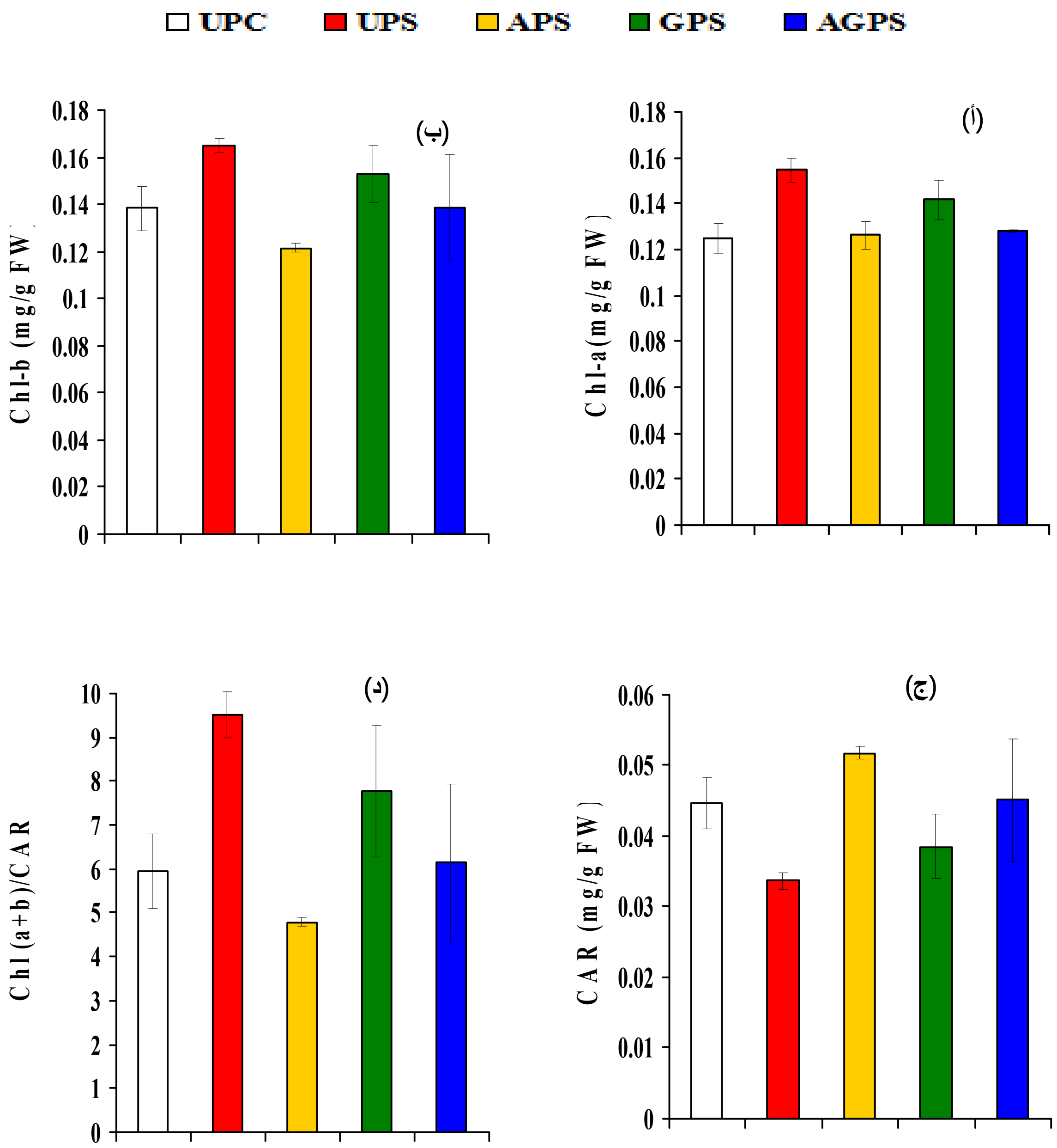
كما هو الحال مع Chl-a ،أدى الإجهاد الملحي إلى رفع محتوى أوراق القمح من Chl-b (الشكل 3-ب). علاوة على ذلك، أدت المعاملة المسبقة للبذور إلى خفض تأثير الملوحة على محتوى الأوراق من Chl-b و لكن بدرجات متفاوتة، و سجل حمض الأسكوربيك أفضل تأثير.

ü أشباه الكاروتين (CAR) :

يبدو من الشكل 3-ج، أن الإجهاد الملحي قد خفض محتوى أوراق القمح من أشباه الكاروتين (CAR). إذ تراجع تركيز هذه الأخيرة بمعدل 1.24 مرة مقارنة بالشاهد. على العكس من ذلك حسنت جل المعاملات و خصوصا المعاملة بحمض الأسكوربيك التي لم تقلل من تأثير الملوحة فحسب بل زادت من محتوى الأوراق من CAR.

ج. محتوى البرولين (PRO):

تسبب الإجهاد الملحي في تراكم معنوي (P <0.05) للبرولين في أوراق القمح الصلب، كما هو مبين في الشكل4-أ. حيث سجل محتوى البرولين زيادة معنوية و قدرها 1.56 مرة مقارنة بالعينات الشاهدة. من جهة أخرى، يبدو أن معالجة البذور قد قللت من محتوى الأوراق من PRO و خاصة عند المعاملة GPS.



الشكل 3: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على (أ)- الكلوروفيل أ (مغ/غ وزن غض)، (ب)- الكلوروفيل ب (مغ/غ وزن غض)، (ج)- أشباه الكاروتين (مغ/غ وزن غض)، (د)- النسبة كلـ أ+ب/كاروتين، عند القمح الصلب. تم تقدير كل هذه المعايير بعد 15 يوم من الإجهاد الملحي. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري

د. محتوى السكريات القابلة للذوبان (WSC):

أدى كلوريد الصوديوم المتراكم في وسط النمو إلى تراكم السكريات الذائبة في أوراق القمح الصلب (الشكل 4-ب). حيث زاد محتوى الأوراق من السكريات القابلة للذوبان بمعدل 3 مرات مقارنة بالشاهد. و مع ذلك، أظهرت معالجة البذور تأثيرا عكسيا للملوحة على محتوى السكريات الذائبة في الأوراق، و سجلت المعاملة بحمض الجبريليك أفضل تأثير.

هـ. بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2):

تسبب الإجهاد الملحي في تراكم H_2O_2 في أوراق القمح الصلب، كما هو مبين في الشكل 4-ج، حيث أصبح تركيز H_2O_2 حوالي مرتين اكبر من تركيزه في أوراق العينات الشاهدة.

في المقابل، أدت المعاملة المسبقة للبذور إلى خفض محتوى أوراق شتلات القمح المجهدة من H_2O_2، و سجلت المعاملة بواسطة حمض الأسكوربيك أفضل تأثير.

و. أكسدة الدهون (LPO or MDA):

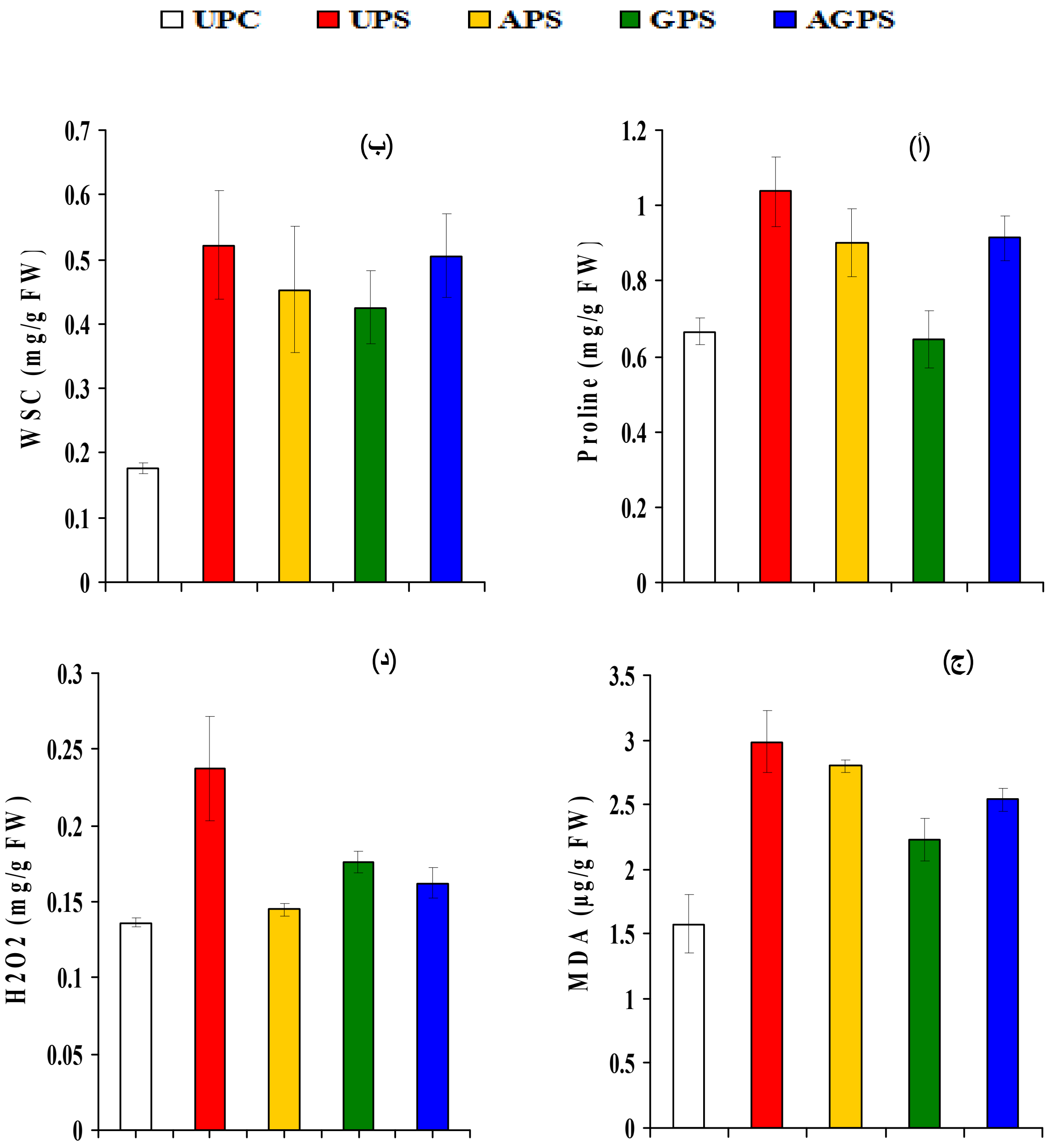
كما هو مبين في الشكل 4-د، و كما هو الحال مع H_2O_2، تسبب الإجهاد الملحي في تراكم مادة MDA و التي تعكس حدوث أكسدة للدهون في أوراق القمح الصلب، حيث تضاعف محتوى أوراق القمح المجهدة من مادة MDA مقارنة بأوراق الشتلات غير المجهدة.

على النقيض من ذلك، خففت جل المعاملات من تأثير الملوحة على معدل MAD و قد سجلت المعاملة بحمض الأسكوربيك أفضل تأثير (الشكل 4-د).

جدول 1. التحليل الإحصائي للمعايير المدروسة

LDW	LFW	LA	RWC	MDA	H_2O_2	WSC	PRO	CAR	CHL b	CHL a	Variation
*37.0****	*7.01***	*ns*	*3.34**	*22.0****	*19.3****	*9.63***	*20.3****	*11.8***	*9.7***	*12.3***	معامل فيشر F
1.45	*20*	*ns*	*20.5*	*0.45*	*0.03*	*0.15*	*0.12*	*0.35*	*0.09*	*0.06*	أصغر فرق مع. LSD 5%

*P< 0.05; **P< 0.01; ***P< 0.001; ns not significant



الشكل 4: التأثير المتداخل لكل من تحفيز البذور والملوحة على محتوى أوراق القمح الصلب من (أ)- البرولين (مغ/غ وزن غض)، (ب)- السكريات الذائبة في الماء (مغ/غ وزن غض)، (ج)- الماء الأكسوجيني (مغ/غ وزن غض)، أكسدة اللبيدات (مغ/غ وزن غض). تم تقدير كل هذه المعايير بعد 15 يوم من الإجهاد الملحي. تمثل كل قيمة المتوسط الحسابي لثلاثة تكرارات ± الخطأ المعياري

4. المناقشـــــة

قمنا في هذه التجربة بتقدير تأثير ملح كلوريد الصوديوم (200 ملي مول/ل) على خصائص النمو و الأيض العام لأوراق شتلات القمح الصلب (واحة) الناتجة من بذور محفزة (النقع لمدة 12 ساعة متبوع بالتجفيف) بواسطة حمض الجبريليك (GA_3-primed or GP)، حمض الأسكوربيك (AsA-primed or AP)، مزيج متعادل من كلا الحمضين (AsA+GA3-primed or AGP)، أو غير محفزة (un-primed or UP).

دلت النتائج على أن الإجهاد الملحي قد أثر بصورة سلبية على جل خصائص نمو الأوراق (الأشكال 1 و 2). من المعلوم أن التعرض لتركيزات عالية من كلوريد الصوديوم ينجم عنه انخفاض في نمو النباتات و إنتاجيتها (Munns, 2002; Munns & Tester, 2008). تثبيط نمو الأوراق و انخفاض معدل استطالتها يبدو أنه من أبرز آثار الإجهاد الملحي (Neves-Piestun & Bernstein., 2001). ومع ذلك، تبقى الآليات الفزيولوجية والبيوكيميائية لتثبيط نمو الأوراق الناجم عن كلوريد الصوديوم غير واضحة بشكل كافي (Munns, 2002; Lazof & Bernstein, 1998).

كأعضاء أساسية للتمثيل الضوئي و النتح، تلعب الأوراق دورا هاما في نمو و تطور النباتات الراقية، وخاصة تحت ظروف الإجهاد (Munns, 2002). و عليه، يبدو أن لمعدل استطالة الأوراق و حجمها النهائي دورا أساسيا في تحمل النبات لإجهادات الوسط غير الحيوية (Colmer et al., 2005; Lacerda et al., 2003). يرجع انخفاض نمو الأوراق تحت طائلة الإجهاد الملحي، إما إلى تثبيط نشاط ضخ البروتونات (H^+-pumping) مما يؤدي إلى انخفاض حموضة الجدر الخلوية (Apoplast) (Pitann et al., 2009)، أو إلى التغيرات الحاصلة في العلاقات المائية للنبات نتيجة لإغلاق الثغور مما يؤدي إلى انخفاض في النشاط الأنزيمي و استطالة جدر الخلايا و منه استطالة الأوراق (Dorgham, 1991; Bernstein et al., 1993). علاوة على ذلك، من المعروف أن الملوحة العالية تتسبب في إحداث إجهاد أيوني (نتيجة التراكم المفرط للأيونات السامة بما في ذلك Na^+ و Cl^-)، يتسبب بدوره في الشيخوخة المبكرة و تساقط الأوراق البالغة، وبالتالي تقليل المساحة المتاحة للامتصاص الضوئي (Munns, 2002). كما يمكن أن يرجع انخفاض المساحة الورقية إما إلى تراجع انقسام الخلايا أو استطالتها، لأن كلا منهما حساس لإجهادات الوسط (Kriedemann, 1986).

على النقيض من ذلك، و من خلال النتائج المدرجة في الشكل 2، يتضح أن المعاملة المسبقة للبذور قد حسنت بشكل واضح من خصائص نمو الأوراق و محتواها المائي تحت طائلة الإجهاد الملحي. و أعطت المعاملة بحمض الأسكوربيك أفضل النتائج. تتفق نتائجنا و نتائج Khan et al. (2011)، حيث تبين أن معاملة القمح بواسطة AsA تعطي أفضل النتائج فيما يخص معاكسة الملوحة مقارنة بمعاملته بحمض الساليسيليك (SA)، Kinetin و GA_3.

تشارك الجبرلينات في تنظيم استطالة الخلايا في النباتات المجهدة ملحيا (Munns, 2002). لكن يبقى دورها غير واضح بشكل تام لحد الآن (Iqbal et al., 2014 ; Kohli et al., 2013). تنظم الجبرلينات (GAs) المظاهر

الأساسية لنمو النباتات و تطورها. كما أنها تقلل من آثار الإجهاد الملحي (Hisamatsu et al., 2000)، و ذلك ربما من خلال تنظيم مستوى الهرمونات الأخرى. أورد Siddiqui et al. (2008) أن إضافة GA_3 مع الأزوت (N) تقلل من أضرار الإجهاد الملحي عند الكرنب (*Brassica juncea*). و يعتقد أن هذا التأثير الإيجابي لـ GAs يحدث من خلال تحسين الحالة المائية للشتلات و أيضا، و لكن بدرجة أقل، من خلال الحفاظ على مستويات البروتين والحمض النووي الريبي RNA (Banyal & Rai,1983). وهذا يتفق مع نتائجنا فيما يخص الحفاظ على محتوى مائي مرتفع نسبيا (الشكل 2).

حالة الأكسدة/الإرجاع الخلوية (cellular redox state)، عامل أخر مهم في تنظيم عمليات النمو و التطور، فضلا عن تحمل الإجهاد. استجابة لأي مؤثر خارجي، تعدل النباتات من حالة الأكسدة/الإرجاع الخلوية و يعتمد مدى التعديل المحدث على طبيعة المحفز، شدته و مدته (Miller et al., 2009). و يعتقد أنه إذا تم الحفاظ على معدل منخفض لحالة الأكسدة/الإرجاع، يمكن التقليل من أضرار الإجهاد (Mittler, 2002).

اتضح حديثا أن أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة مهمة جدا في تحديد قدرة النباتات على التسامح الملحي (Costa et al., 2005; Mittler, 2002; Sairam et al., 2005). و يعتمد نظام الدفاع المضاد للأكسدة الفعال على مضادات أكسدة إنزيمية (مثل SOD، PRX، CAT)، و أخرى غير إنزيمية (كحمض الأسكوربيك، حمض الساليسيليك، الجلوتاثيون، التوكوفيرول و أشباه الكاروتين) (Chen & Murata, 2002). الفيتامين ج (حمض الأسكوربيك، Vit-C، AsA) هو جزيء صغير مضادة للأكسدة، ينظم العديد من الوظائف الأيضية الأساسية في حياة النبات مثل حمايته من إجهاد الأكسدة (Smirnoff, 2000)، حماية جهاز التمثيل الضوئي (Chen & Murata, 2002)، تأخير الشيخوخة المبكرة للأوراق و حماية الكلوروفيل (Smirnoff, 2000)، ...الخ.

تجلت أهمية حمض الاسكوربيك في تنظيم نمو النباتات و إنتاجيتها منذ بدايات القرن العشرين (Reid, 1937). و قدر العديد من الباحثين أن هذا الحمض يلعب دورا هاما كمنظم لنمو النبات (Garg & Kapoor, 1972)، إذ أنه يشارك في العديد من العمليات الفزيولوجية و خصوصا مكافحة الآثار السلبية للإجهاد الملحي على مختلف النباتات كالطماطم (Shalata & Neumann, 2001)،القمح اللين (Al-Hakimi & Hamada, 2001; Athara et al., 2008)، القمح الصلب (Fercha et al., 2011) الشعير (Agami, 2014)، دوار الشمس (Khan et al., 2013) و الفول (Azooz et al., 2013) ...الخ.

للهرمونات النباتية آثار دراماتيكية على نمط انقسام الخلايا وتوسعها و منه على نمو النبات بأكمله. و نظرا لكون الإجهاد الملحي يؤدي إلى انخفاض في النمو العام للنبات يمكن افتراض حدوث خلل في التوازن الهرموني للنبات، و هذا ما تم فعلا تأكيده في العديد من الأبحاث (Shakirova et al., 2003 ; Iqbal & Ashraf, 2010).

ترجع أهمية حمض الأسكوربيك في الحفاظ على التوازن الهرموني إلى كونه بمثابة العامل المشترك لتخليق العديد من الهرمونات النباتية، بما في ذلك الايثيلين، حمض الجبريليك (GA_3) وحمض الأبسيسيك (ABA)، و عليه يمكننا أن نتوقع أن المستويات الداخلية لحمض الأسكوربيك لا تؤثر فقط على معدلات تخليق الهرمونات ولكن

أيضا على مسارات نقل الإشارات المتعلقة بهذه الجزيئات (Barth et al., 2006). و منه يمكننا القول بأن قدرة AsA على تنظيم النمو ترجع لقدرته على استرجاع التوازن الهرموني الذي يختل عند تعرض النبات للإجهاد الملحي.

تأثير AsA على محتوى البرولين والسكريات القابلة للذوبان يمكن أن تشير إلى أن AsA ربما يحسن نمو النباتات بالإضافة إلى عمله كمضاد للأكسدة، من خلال تكثيف قدرتها على التكيف وأنشطة النمو (انقسام الخلايا والتوسع). في الحقيقة، أظهرت العديد من الدراسات أن AsA يلعب دورا هاما في تحسين تحمل النبات للإجهادات اللاحيوية (Athar et al., 2008; Shalata & Neumann, 2001). وعلاوة على ذلك، فإن التأثير المضاد للأكسدة الناجم عن المعاملة بواسطة AsA و الذي تأكد من خلال تحديد مستوى H_2O_2، معدل MDA و CAR (الأشكال 3 و 4)، يؤكد على أهمية أنظمة الدفاع المضاد للأكسدة في تحمل نبات القمح للملوحة، كما ثبت في دراسات موازية (Agarwal & Pandey, 2004 ; Sairam et al., 2005 ; Fercha & Gherroucha, 2014).

و مع ذلك، تبقى الآليات الفزيولوجية و الجزيئية التي يمكن من خلالها تفسير التأثير الإيجابي لتحفيز البذور بواسطة منظمات النمو (حمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك) مبهمة، و هذا ما سنحاول تقصيه بالنسبة لحمض الأسكوربيك في القسم الثاني من هذه الدراسة.

5. الخلاصة

أجريت هذه التجربة بهدف تقييم أثر معاملة البذور قبل الزرع بواسطة حمض الأسكوربيك (AsA) وحمض الجبريليك (GA_3) على خصائص نمو أوراق شتلات القمح الصلب النامية في ظل ظروف الإجهاد الملحي .
و سمحت النتائج باستنتاج ما يلي :

- أثر الإجهاد الملحي (200 ملي مول/ل من كلوريد الصوديوم) سلبا على جميع خصائص النمو و الأيض العام للأوراق.
- بشكل عام، يبدو أن تحفيز (تقسية) البذور تقنية فعالة للحد من تأثير الملوحة على خصائص نمو القمح، خصوصا المعاملة بـ AsA (التحفيز-بالأسكوربات Ascorbate-priming).
- من هذه الدراسة، يبدو أن التأثير المضاد للإجهاد الملحي عن طريق تحفيز البذور يمكن تفسيره، أولا، بتشجيعه لاستعادة التوازن الاسموزي (Osmotic homeostasis) من خلال المحافظة على إمدادات الماء عالية بما فيه الكفاية، وهو ما يفسر أيضا انخفاض معدلات البرولين والسكريات القابلة للذوبان كما تم تسجيله في العينات المعاملة، و ثانيا، من خلال تعزيز الدفاع المضاد للأكسدة و هو ما يفسر انخفاض مستويات H_2O_2 و منه أكسدة الليبيدات (انخفاض مستوى MDA).
- أخيرا، نتائجنا تسمح بافتراض وجود تأثير متناغم (تحاوري cross-talk) بين AsA و GA_3 على الحث على التحمل الملحي خلال إنبات بذور و نمو شتلات القمح.

الفصل الرابع

كشف المؤشرات الحيوية المحتملة لتفسير تحمل الملوحة المحدث في القمح الصلب عن طريق تحفيز البذور (Seed priming) بالتحليل البروتيومي-الخالي من الجال.

Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat

الملخص

أثبتت تقنية تحفيز البذور بنجاح كونها وسيلة فعالة لتحسين إنتاجية المحاصيل تحت ظروف الإجهاد. كخطوة أولى نحو فهم أفضل للآليات التي يقوم عليها تحمل الإجهاد الملحي المحدث عن طريق تحفيز البذور في القمح الصلب، والتغلب على أوجه القصور في النهج القائم على التحليل البروتيومي-المعتمد على الجال، أجريت مقارنة بالاعتماد على التحليل البروتيومي-الخالي من الجال بين عينات بذور قمح صلب متفاوتة القوة على إثر تحفيزها بالماء أو حمض الأسكوربيك. تشير النتائج إلى أن التحفيز المائي (Hydro-priming) للبذور رافقته تغييرات معنوية لـ 72بروتين، معظمها تشارك في التحليل البروتيني، تخليق البروتين، الأيض العام و عمليات الدفاع ضد إجهادات الوسط. في المقابل التحفيز-بالأسكوربات (Ascorbate-priming)، رافقه تغييرات معنوية لـ 83 بروتين، تشارك جلها بشكل رئيسي في استقلاب البروتين، الدفاع المضاد للأكسدة، عمليات الإصلاح أو الترميم (للجزيئات المتضررة)، و من المثير للاهتمام، تغير بروتينات تشارك في عمليات أيض الميثيونين. تقدم هذه الدراسة معلومات جديدة لفهم كيف تتشكل "ذاكرة التحفيز" حتى تتمكن البذور من تحمل الإجهاد.

الأهمية البيولوجية لهذه الدراسة

يصف هذا البحث الدراسة الأولى من نوعها التي استخدمت فيها تقنية البروتيوميات-الخالية من الجال لتحليل بروتينات الأيض المستخلصة من بذور القمح الصلب. سمحت لنا المقاربة الإدماجية بين الفصل التجزيئي للبروتينات، تقنية الهيدروجيل أو تقنية التخصيب بالجسيمات المتناهية الصغر، و التحليل البروتيومي-الخالي من الجال بتحديد أكثر من 380 بروتين من بروتينات الأيض و بتنوع كبير في الأوزان الجزيئية (تتراوح بين 7-258 كيلو دالتون). وفقا لذلك، نقترح أن هذه المقاربة يمكن أن تكون مفيدة في الحصول على منظور أوسع وفهم أفضل لبروتيوم البذور. في هذا البحث، قمنا بتوظيف هذه الطريقة للتحقيق في المؤشرات الحيوية المحتملة للتسامح الملحي المحدث في القمح الصلب بواسطة تحفيز البذور. بهذه الطريقة، حددنا عدة بروتينات لم يسبق أن تم تحديدها في دراسات مماثلة، وخاصة تلك المتعلقة بالتحفيز بالأسكوربات (Ascorbate-priming). يمكن لهذه النتائج أن توفر سبل جديدة لتحسين إنتاجية المحاصيل، خاصة في ظل الظروف البيئية غير الملائمة.

1. المقدمة

يعتبر القمح من أكثر المحاصيل الزراعة انتشارا في العالم، نظرا لكونه يوفر يوميا حوالي 20 % من البروتين و السعرات الحرارية لأكثر من 4.5 مليار نسمة (http://www.wheatinitiative.org). بالإضافة إلى ذلك، يعتبر القمح ثاني أهم محصول غذائي في العالم، نظرا لخصائصه الفريدة، و كون كميات كبيرة من الحبوب يمكن أن يتم إنتاجها، حصادها، تخزينها ونقلها بطريقة فعالة (O'Brien & DePauw, 2004). القمح الصلب هو نوع من القمح رباعي الصيغة الصبغية، يعطي عائدات أعلى من القمح اللين في المناطق ذات التساقط المنخفض. و على الرغم من أن القمح الصلب هو من أكثر المحاصيل المزروعة على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط أين يتم تغطية 75% من المنتوج العالمي للقمح الصلب (Habash et al., 2009)، يبقى إنتاجه ضعيفا، ربما، بسبب ضعف إنبات البذور وإنشاء الشتلات، الشيء الذي يرجع أساسا إلى الجفاف و ملوحة التربة (Sayar et al., 2010).

تحفيز أو تقسية البذور هي تقنية معالجة خاصة للبذور قبل بذرها، تستخدم حاليا على نطاق واسع لتحسين أداء البذور فيما يتعلق بسرعة و انتظام الإنبات (Heydecker et al., 1973). و هذا مهم جدا في ظل ظروف الإجهاد الملحي، لأن هناك إجماع على أن إنبات البذور و نمو البادرات هي من أكثر مراحل التطور النباتي تأثرا بالإجهاد الملحي و منه تراجع الإنتاج (Läuchli A, Grattan, 2007). يبدو أن تحفيز البذور خاصة بالمركبات المضادة للأكسدة مثل حمض الاسكوربيك (AsA) وسيلة فعالة للتغلب على مشاكل إنبات البذور و تحسين نمو البادرات في هذا المجال، خصوصا تحت طائلة الإجهاد الملحي (انظر على سبيل المثال مراجعة Hasanuzzaman et al. 2013، و نتائج القسم الأول من الدراسة). تتمثل الأهمية الزراعية لتحفيز النباتات في كونها تكنولوجيا بسيطة، سريعة، غير مؤذية، منخفضة التكلفة لتعزيز قدرة النبات على التعامل مع الإجهاد، الشيء الذي حفز الباحثين للكشف عن ضليات الخلوية والجزيئية الكامنة وراء هذه الظاهرة (Tanou et al., 2012). في العقد الماضي، حاولت العديد من الدراسات الأساسية، وذلك باستخدام العديد من المقاربات الجزيئية كـ Transcriptome ، Metabolome، Proteome، تحديد الآليات الجزيئية/البيوكيميائية لعملية تحفيز البذور (Tanou et al., 2012). من الآليات الرئيسية التي أقترح على أنها تشارك في تحفيز البذور نذكر على سبيل المثال الأحداث المتعلقة بالدورة الخلوية Cell cycle (De Castro et al., 2000)، تنشيط السويداء (Bradford et al., 2000)، تعبئة البروتينات المخزنة (Job et al., 2000) تعبئة الدهون و النشا، تخليق البروتين و دورة الميثيل (Catusse et al., 2011 ; Yacoubi et al., 2011) (انظر مراجعة Rajjou et al. 2012).

الآليات المذكورة أعلاه تشير إلى أن البذور المحفزة تمتلك مبدئيا آليات جزيئية تسمح لها بتخزين (تشكل ذاكرة) لأحداث السابقة خلال عملية التحفيز، والتي يمكن استرجاعها و استعمالها في وقت لاحق عندما تتعرض البذور للإجهاد أثناء الإنبات (Chen & Arora, 2013). في الآونة الأخيرة، أُقترِحَ أن تحفيز البذور يزيد من حيوية البذور و تحمل الإجهاد من خلال، على الأقل، إستراتجيتين مختلفتين. أولا، يؤدي تحفيز البذور إلى تسريع العمليات المتعلقة بالإنبات مما يسهل انتقال الجنين من حالة السكون إلى حالة النشاط و منه تحسين قوة

الإنبات و نمو البادرات. ثانيا، يسمح تحفيز البذور من تعزيز قدرة هذه الأخيرة على رفع كفاءة استجاباتها التكيفية مما يساعدها على تحمل الإجهادات البيئية خلال إنشاء الشتلات (Rajjou et al., 2012; Chen & Arora, 2013). و عليه فإن التحليل البروتيومي المقارن في البذور المعالجة بواسطة مواد كيميائية قبل تعرضها لظروف الإجهاد غير الحيوي يكون بالغ الأهمية (Tanou et al., 2012).

يمثل التحليل البروتيومي الكمي امتدادا هاما للتقنيات البروتيومية المعروفة (أنظر القسم النظري)، حيث تتيح المقارنة بين التغيرات في مستويات البروتين في مختلف العينات (Wong & Gagney, 2010). و يتطلب ذلك إجراء تحاليل بالغة الحساسية و الدقة لتحديد البروتينات في خليط معقد منها وقياس كمية كل بروتين على حدى. الطريقة الأكثر شيوعا لدراسة بروتيوميات الأنسجة النباتية هي تقنية الهجرة الكهربائية على الجال مزدوجة المعالم (2DE-gels)، حيث يتم تحديد الفروق في الكميات المتوفرة من البروتين عن طريق مقارنة أحجام بقع الجال المحتوية على البروتين-الملون، تليها عملية تحديد البروتينات بواسطة مطياف الكتلة (Mass Spectrometry, MS) . ومع ذلك، فإن هذه الطريقة محدودة الحساسية، تتميز بمجال ديناميكي منخفض، كما أنها غير فعالة عند تحليل البروتينات قليلة الوفرة أو ذات الكتلة الجزيئية العالية أو المنخفضة جدا (Panchaud et al., 2008).

تعتبر البروتيوميات الخالية من الجال (Gel-free shotgun proteomics) طرق بديلة استعملت لتحديد و تقدير البروتينات على نطاق واسع (Domon & Aebersold, 2007; Nesvizhskii et al., 2007). على الرغم من أنه أصبح ممكنا تحديد البروتينات و بسرعة من مقتطفات خلائط خلوية خامة باستخدام البروتيوميات الخالية من الجال و MS، يمكن أن يكون من الصعب تحديد البروتينات قليلة الوفرة (low abundance proteins) في وجود فائض كبير من البروتينات الوافرة نسبيا (relatively abundnat proteins). وبالتالي، للقيام بتحليل بروتيومي فعال يصبح من الأهمية بمكان إثراء العينة و تحليلها في مقتطفات أو أجزاء (subfractions). الاستخلاص التدريجي أو التتابعي (Sequential extraction) هي طريقة مناسبة خاصة لتجزيء عينات بروتينات سويداء القمح، لأنه يستفيد من خصائص الذوبان الخاصة بكل فئة من فئات بروتينات السويداء المختلفة (الألبومين، الغلوبولين،....).

فضلا عن ذلك، تم في السنوات القليلة الماضية استحداث طريقة جديدة مناسبة للبروتيوميات المعتمدة على MS و التي تستخدم جسيمات النانو-هيدروجيل (Hydrogel nanoparticles) للتخصيب الانتقائي للبروتينات في الخلائط المعقدة (Tamburro et al., 2011). النانو-هيدروجيل، ولاسيما جزيئات [Poly(N-isopropylacrylamide/Cibacron Blue) core vinylsulfonic acid (Poly(NIPAm/CB) core VSA]، تم اختيارها على أساس دراسة سابقة (Capriotti et al., 2012)، كونها يمكن أن تساعد على فصل و تحديد البروتينات قليلة الوفرة (Fredolini et al., 2008).

في هذا المقال نعرض نتائج التحليل البروتيومي (بواسطة تقنية LC-MS/MS) لبروتينات الأيض المستخلصة من بذور القمح الصلب باستخدام تجزئة البروتين المعتمدة على الذوبانية التفاضلية (Hurkman &Tanaka, 2004)، و بالمزاوجة بين تقنية تخصيب البروتين و تقنية التحليل الكمي الخالي من الجال

بواسطة مطيافية الكتلة عالية الأداء (LTQ-XL Orbitrap). بالإضافة إلى ذلك، تهدف الدراسة الحالية إلى التحقيق في التغيرات المحتمل حدوثها في بروتينات الأيض عند تحفيز البذور. على حد علمنا، هذه هي المرة الأولى التي تستعمل فيها تقنية مماثلة للتحقيق في التغيير الحاصل في بروتينات الأيض لبذور القمح الصلب استجابة لعملية التحفيز. يمكن لهذه الدراسة أن تقدم تفسير لبعض من الآليات البيوكيميائية المشاركة في تحفيز بذور القمح، والتي يمكن أن تكون مفيدة جدا لتحسين إنتاج المحاصيل من خلال تحديد الجينات/البروتينات المحتمل تورطها في تعزيز إنبات البذور و البادرات، خاصة تحت طائلة الإجهاد الملحي.

نتائج هذه الدراسة شكلت موضوع المقال التالي:

Fercha et al. (2013). Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. Journal of proteomics, 91, 486-499. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.010

JOURNAL OF PROTEOMICS 91 (2013) 486–499

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat

Azzedine Fercha[b,c], Anna Laura Capriotti[a,*], Giuseppe Caruso[a], Chiara Cavaliere[a], Hocine Gherroucha[c], Roberto Samperi[a], Serena Stampachiacchiere[a], Aldo Lagana[a]

[a]Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy
[b]Department of Biology, University of Abbès Laghrour Khenchela, 40000 Khenchela, Algeria
[c]Department of Biology, University of Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algeria

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 23 March 2013
Accepted 12 August 2013

Keywords:
Durum wheat
Gel-free proteomics
Wheat seed metabolic proteins
Seed priming
Salt tolerance

A B S T R A C T

Seed priming has been successfully demonstrated to be an efficient method to improve crop productivity under stressful conditions. As a first step toward better understanding of the mechanisms underlying the priming-induced salt stress tolerance in durum wheat, and to overcome the limitations of the gel-based approach, a comparative gel-free proteomic analysis was conducted with durum wheat seed samples of varying vigor as generated by hydro- and ascorbate-priming treatments. Results indicate that hydro-priming was accompanied by significant changes of 72 proteins, most of which are involved in proteolysis, protein synthesis, metabolism and disease/defense response. Ascorbate-priming was, however, accompanied by significant changes of 83 proteins, which are mainly involved in protein metabolism, antioxidant protection, repair processes and, interestingly, in methionine-related metabolism. The present study provides new information for understanding how 'priming-memory' invokes seed stress tolerance.

Biological significance

The current work describes the first study in which gel-free shotgun proteomics were used to investigate the metabolic seed protein fraction in durum wheat. A combined approach of protein fractionation, hydrogel nanoparticle enrichment technique, and gel-free shotgun proteomic analysis allowed us to identify over 380 proteins exhibiting greater molecular weight diversity (ranging from 7 to 258 kDa). Accordingly, we propose that this approach could be useful to acquire a wider perspective and a better understanding of the seed proteome. In the present work, we employed this method to investigate the potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. In this way, we identified several previously unrecognized proteins which were never been reported before, particularly for the ascorbate-priming treatment. These findings could provide new avenues for improving crop productivity, particularly under unfavorable environmental conditions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, PO Box n 34 - Roma 62, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy. Tel.: +39 06 49913062; fax: +39 06 490631.
E-mail address: annalaura.capriotti@uniroma1.it (A.L. Capriotti).

1874-3919/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.010

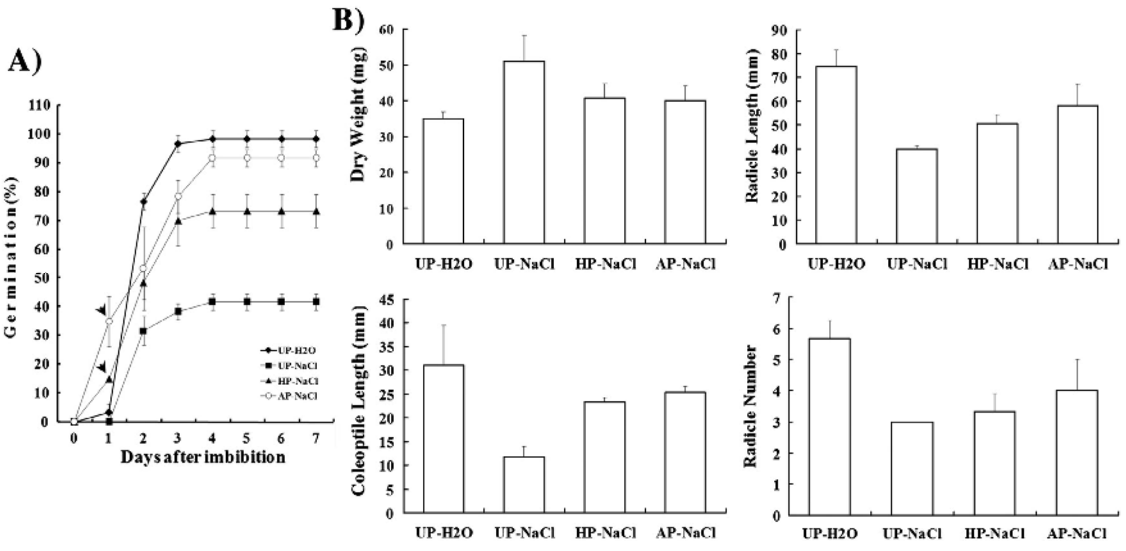


Fig. 1 – Seed germination and seedling growth of durum wheat. (A) Interactive effect of salt stress (250 mM NaCl) and priming treatments (Materials and methods) on the seed germination time-course of durum wheat. (B) Interactive effect of salt stress and priming treatments on seedling growth of durum wheat. UP, un-priming; HP, hydro-priming; AP, ascorbate-priming.

1. Introduction

Wheat is the most widely grown crop in the world, which provides about 20% of the daily protein and of the food calories for more than 4.5 billion people (http://www.wheatinitiative.org/). It is the second most important food crop in the world owing to its unique characteristics and the fact that large quantities of grain can be produced, harvested, stored, and transported in an efficient way [1]. Durum is a tetraploid species of wheat, which produces higher yield than normal wheat in areas with reduced precipitation. However, even though durum wheat is the most widely cultivated crops in the Mediterranean basin where ~75% of the world's durum grain is produced [2], its production remained low probably because of the poor seed germination and stand establishment, mainly due to drought and soil salinity [3].

Seed priming is a seed pre-sowing imbibition treatment that is widely used to improve seed performance with respect to rate and uniformity of germination [4]. This is very important under salt stress conditions, because there is general agreement that seed germination and early seedling growth are critical stages during which salt stress is especially damaging to yield [5]. Seed priming particularly with antioxidant compounds such as ascorbic acid (AsA) seems to be an efficient method to overcome seed germination problems and to improve seedling growth in the field, especially under salinity (see review in Hasanuzzaman et al. [6]). The agricultural relevance of priming in plants, as it is a simple, short-term, harmless, and low-cost technology that enhances the ability of plant to cope with stress, has motivated scientists to unravel the underlying cellular and molecular mechanisms [7]. In the past decade, several major studies, using transcriptome, metabolome and proteome approaches, have attempted to identify the molecular/biochemical mechanisms of seed priming [7–13]. The major processes potentially involved in seed priming can be described as cell cycle associated-events [9], endosperm weakening [10], mobilization of storage proteins [11] lipid and starch mobilization, protein synthesis and the methyl cycle [12,13] (see review in Rajjou et al. [8]).

The aforementioned processes suggest that primed seeds presumably possess molecular mechanisms that allow them to memorize previous priming events, which can be recruited later

Table 1 – Metabolic proteins identified according to two protocols, one comprising a standard in-solution trypsin digestion, and the other one in which an enrichment step by NIPAm/CB core VSA shell particles (HG) was added.

	Un-primed	Un-primed with HG	Combined	Overlap	Not overlap	Un-primed only	Un-primed with HG only
Proteins	292	197	323	166	157	126	31
	Hydro-primed	Hydro-primed with HG	Combined	Overlap	Not overlap	Hydro-primed only	Hydro-primed with HG only
Proteins	286	230	327	189	138	97	41
	Ascorbate-primed	Ascorbate-primed with HG	Combined	Overlap	Not overlap	Ascorbate-primed only	Ascorbate-primed with HG only
Proteins	252	225	302	175	127	77	50

when seeds are exposed to stresses during germination [14]. More recently, it has been proposed that priming increases seed vigor and stress tolerance through at least two different strategies. First, priming initiates the germination-related processes that facilitate the transition from the quiescent state into the germinating state and lead to improved germination potential. Secondly, priming allows the growth-arrested seeds to reinforce their capacity to mount adaptive defense responses useful to withstand environmental stress conditions during seedling establishment [8,14]. It is therefore interesting to apply comparative proteomic analysis in seeds treated with chemical priming agents before the imposition of abiotic stress conditions [7].

Quantitative proteomics represent an important extension to identification proteomics, enabling the comparison of changes in protein levels across different samples or treatments [15]. This requires sensitive and accurate assays for identifying proteins in complex mixtures and quantifying their abundances. The most commonly used approach for comparative proteomic analysis of plant tissues is the application of 2DE-gels, whereby differences in protein abundances were determined by comparing stained protein spot volumes followed by identification of proteins by mass spectrometry (MS). However, this method is limited in sensitivity, has a low dynamic range, and it is inefficient when analyzing proteins with very high or low molecular mass [16].

Gel-free shotgun proteomics are alternative approaches for the identification and quantification of proteins in large-scale studies [17,18]. Although it has become feasible to rapidly identify proteins from crude cell extracts using MS-based shotgun proteomics, it can be difficult to elucidate low-abundance proteins of interest in the presence of a large excess of relatively abundant proteins. Therefore, for effective proteome analysis it becomes critical to enrich the sample to be analyzed in subfractions of interest. Sequential extraction is a method particularly suited for the subfractionation of wheat endosperm proteins, because it takes advantage of the specific solubility properties of the different classes of endosperm proteins.

Moreover, a novel method suitable for high throughput MS-based proteomics that make use of hydrogel nanoparticles for selective protein enrichment in complex mixtures has been introduced recently [19]. Hydrogel nanoparticles, in particular Poly(N-isopropylacrylamide/Cibacron Blue) core vinylsulfonic acid (Poly(NIPAm/CB) core VSA) shell particles, were chosen on the basis of our previous work [20], because they can perform a further step of enrichment for less abundant proteins capable to interact with the Cibacron Blue [21].

Here we describe an LC–MS/MS platform for analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat using solubility-based protein fractionation [22] and protein enrichment combined with label-free quantitative tandem MS with a high-performance hybrid mass spectrometer, LTQ-Orbitrap XL. In addition, the present work aimed to investigate the possible changes in metabolic protein profiles during seed priming treatment. To the best of our knowledge, this is the first time that gel-free, label-free shotgun proteomic approach has been used to investigate the change in the metabolic proteins of durum wheat seeds in response to priming. This study could explain some of the biochemical processes involved in wheat seed priming, which could be very useful for improving crop production by characterizing the genes/proteins potentially involved in enhancing seed germination and seedling vigor, particularly under stress conditions.

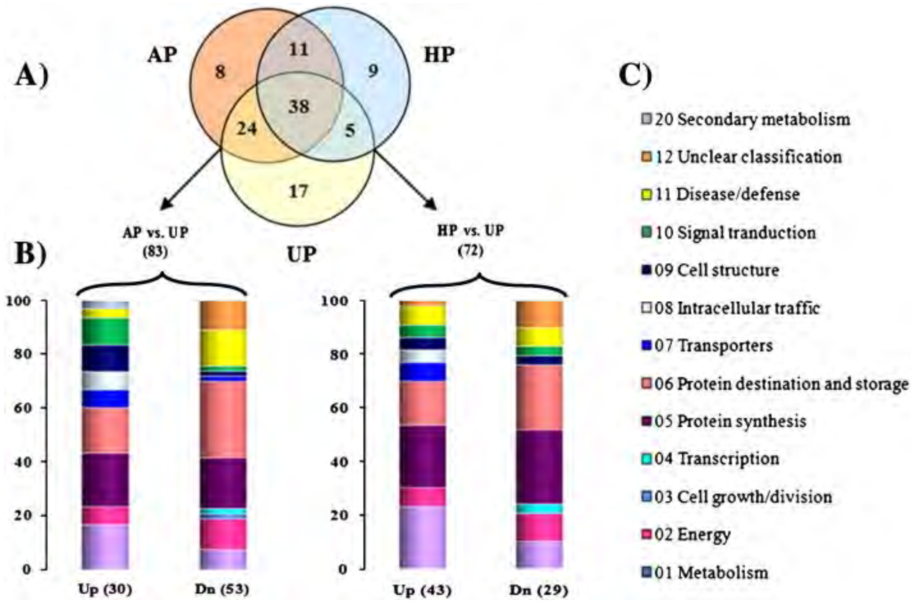


Fig. 2 – Venn diagrams and functional classification of wheat proteome in both primed seeds compared to control un-primed seeds. (A) Venn diagrams display the overlap between the proteome of primed and un-primed durum wheat seeds (see Materials and methods). (B) Functional classification of proteins shown in (A). The number of identified proteins is indicated. (C) Functional classes according to Bevan et al. [30]. Up, up-regulated; Dn, down-regulated.

2. Materials and methods

2.1. Seed treatment, germination assay and seedling growth

Seed priming treatments were performed essentially as described by Jafar et al. [23]. The ratio of seed weight to the volume of solution employed for priming was 1:5 [24]. For each seed priming treatment 50 g of wheat seeds was soaked in 250 mL aerated distilled water or ascorbate solution (0.5 mmol L^{-1}) for 12 h. During soaking period, continuous aeration was provided using a small aquarium pump. After soaking, seeds were washed three times with distilled water and then re-dried, up to almost their original weight, keeping them under shade with forced air at 27 ± 3 °C; after drying they were sealed in paper bags and stored until use. Untreated dry seeds were taken as a control.

Seeds of durum wheat (Triticum durum Desf. var. Waha), cultivar moderately resistant to salinity and widely cultivated in Algeria, both treated and untreated, were surface sterilized with sodium hypochlorite (5% w/v) for 3 min, washed several times with sterile water and dried in an oven. Thirty dried seeds were placed in each Petri-dish containing two layers of Whatman no. 1 filter paper initially moistened with 10 mL of saline solution (NaCl 250 mmol L^{-1}) or distilled water (control). Seeds were germinated in darkness in a temperature-controlled chamber held at 22 ± 0.5 °C. The number of germinated seeds was counted every day until day 7. Growth measurements were taken prior to harvest (7-day-old seedlings).

2.2. Extraction and quantification of metabolic seed proteins

Metabolic seed proteins were extracted using the method developed by Hurkman and Tanaka [22] with some modifications. Briefly, wheat seeds were ground to a fine powder in a household coffee grinder, and then 75 mg of flour was suspended in 300 μL of cold KCl buffer (Tris–HCl 50 mmol L^{-1}, KCl 100 mmol L^{-1}, EDTA 5 mmol L^{-1}, pH 7.8). The suspension was incubated on ice for 5 min with intermittent mixing and then centrifuged at 14,500 g for 15 min at 4 °C. The KCl-soluble fraction was collected and 5 volumes of cold 100 mmol L^{-1} ammonium acetate solution in methanol were added at room temperature and incubated overnight at 20 °C. The methanol-insoluble fraction was pelleted by centrifugation at 14,500 g for 15 min at 4 °C. The pellet was rinsed three times with cold acetone (500 μL) to remove the ammonium acetate, and solubilized with 200 μL of urea/ammonium bicarbonate (8 mol L^{-1}/50 mmol L^{-1}). Metabolic proteins were quantified by Bradford assay using BSA standard [25]. Three experimental replicates were performed for each seed type. For each extraction, the protein mixture was divided into two aliquots and processed according to two protocols, one comprising a standard in-solution trypsin digestion, and the other one in which an enrichment step by NIPAm/CB core VSA shell particles was added, and then in-solution trypsin digestion was performed.

2.3. In solution trypsin digestion and off-line desalting

For each sample, protein aliquots, 100 μg (1 μg $μL^{-1}$), were reduced, alkylated, and digested with trypsin as described by Capriotti et al., with some modifications [26]. Reduction of disulphide bonds was performed with 2.5 μL of DTT (200 mmol L^{-1}), under slight agitation, in incubation at 37 °C for 1 h. Carbamidomethylation of thiol groups was performed by addition of IAA (10 μL, 200 mmol L^{-1}) and incubation for 1 h in the dark at room temperature. To consume any leftover alkylating agent and to avoid trypsin alkylation, 10 μL of DTT (200 mmol L^{-1}) was added and samples were incubated at 37 °C for 1 h, under slight agitation. The samples were then diluted with ammonium bicarbonate (50 mmol L^{-1}) to obtain a 1 mol L^{-1} final urea concentration. Sequencing grade-modified tryspin was added (1:20, enzyme:protein ratio) and the samples were incubated overnight at 37 °C. Enzymatic digestion was quenched with formic acid. Digested samples were desalted using SPE C18 cartridges conditioned with acetonitrile (ACN) and rinsed with 0.1% TFA. Peptides were eluted from the SPE column with 500 μL ACN/ddH_2O (50/50, v/v) containing 0.05% TFA and were dried in a Speed-Vac SC 250 Express (Thermo S 164 avant, Holbrook, NY, USA). Each sample was re-constituted with 0.1% HCOOH aqueous solution and stored at −80 °C until LC–MS/MS analysis.

2.4. Enrichment of proteins by hydrogel nanoparticles

200 μL aliquot of NIPAm/CB core VSA shell particles (equivalent to 2 mg dry weight) was washed by centrifugation with deionized water. Briefly the hydrogel nanoparticles were centrifuged at 15,000 g for 7 min, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 200 μL of deionized water. Following centrifugation the hydrogel nanoparticle pellet was resuspended in 400 μL protein solution (750 μg) in urea/ammonium bicarbonate (8 mol L^{-1}/50 mmol L^{-1}). The mixture was incubated under slight agitation for 15 min at room temperature. The protein–hydrogel nanoparticle complexes were then separated by centrifugation at 15,000 g and washed once with 200 μL of a solution NaSCN 250 mmol L^{-1}, and twice with 200 μL of ddH_2O to remove NaSCN. Proteins bound to the hydrogel nanoparticles were eluted twice with 200 μL of ACN:ddH_2O:NH_4OH (70:27:3, v/v/v) and the eluates combined in the same vial, dried in a vacuum concentrator and solubilized with urea/ammonium bicarbonate (8 mol L^{-1}/50 mmol L^{-1}) for the subsequent digestion with trypsin as described in the previous paragraph and subsequent LC–MS/MS analysis.

2.5. NanoHPLC–MS analysis

Tryptic peptides were analyzed by a Dionex Ultimate 3000 nano-HPLC system (Sunnyvale CA, USA) connected to a hybrid LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptide mixtures were separated on in-house manufactured 20 cm fritless silica microcolumn, 75 μm i.d., packed with ReproSil-Pur C18-AQ 3 μm resin. The flow rate was 250 nL min^{-1} and the LC gradient was optimized to detect the largest set of peptides, using H_2O/HCOOH (99.9/0.1, v/v) as phase A and CH_3CN/HCOOH (99.9/0.1, v/v) as phase B. After an isocratic step at 5% B for 5 min, B was linearly increased to 30% within 75 min; afterwards, B was increased to 80% within 5 min, and to 95% within the following 10 min to rinse the column.

Table 2 – Wheat metabolic proteins whose abundance varied in hydro-primed seeds.

No	Protein name	Accession no	Organism	MW	Function category	Function description	R.
212	Glutamate decarboxylase 1	DCE1_ARATH	Arabidopsis thaliana	57	01 metabolism	01.01 amino acid	D
147	Succinate-semialdehyde dehydrogenase.	SSDH_ORYSJ	Oryza sativa	56	01 metabolism	01.01 amino acid	U
302[a]	3-isopropylmalate dehydrogenase	LEU3_BRANA	Brassica napus	43	01 metabolism	01.01 amino acid	U
309	Arginase	ARGI1_ARATH	Arabidopsis thaliana	37	01 metabolism	01.01 amino acid	U
311	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	MTNA_HORVU	Hordeum vulgare	39	01 metabolism	01.01 amino acid	U
332	Adenylate kinase A	KAD1_ORYSJ	Oryza sativa	26	01 metabolism	01.03 nucleotides	D
115	Malate dehydrogenase	MDHC1_ARATH	Arabidopsis thaliana	36	01 metabolism	01.05 sugars/polysaccharides	D
289	Probable sucrose-phosphate synthase 4	SPS4_ORYSJ	Oryza sativa	119	01 metabolism	01.05 sugars/polysaccharides	U
324[a]	Alpha-galactosidase	AGAL_ORYSJ	Oryza sativa	46	01 metabolism	01.05 sugars/polysaccharides	U
220[a]	Fructose-1,6-bisphosphatase,	F16P2_SACHY	Saccharum hybrid	37	01 metabolism	01.05 sugars/polysaccharides	U
274[a]	Acetyl-CoA carboxylase 2	ACC2_ORYSJ	Oryza sativa	258	01 metabolism	01.06 lipid and sterol	U
231[a]	Phospholipase D alpha 1	PLDA1_CYNCA	Cynara cardunculus	92	01 metabolism	01.06 lipid and sterol	U
268[a]	Pyridoxal biosynthesis protein PDX1.1	PDX11_ARATH	Arabidopsis thaliana	33	01 metabolism	01.07 cofactors	U
389	Triosephosphate isomerase	TPIC_SECCE	Secale cereale	32	02 energy	02.07 pentose phosphate	D
261[a]	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD_SOLTU	Solanum tuberosum	58	02 energy	02.07 pentose phosphate	U
195 [b]	Aconitate hydratase	ACOC_CUCMA	Cucurbita maxima	98	02 energy	02.10 TCA pathway	D
308	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5	IDH5_ARATH	Arabidopsis thaliana	41	02 energy	02.10 TCA pathway	D
123	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	CAPP1_ARATH	Arabidopsis thaliana	110	02 energy	02.30 photosynthesis	U
287[a]	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	CAPP2_ARATH	Arabidopsis thaliana	110	02 energy	02.30 photosynthesis	U
239	Glycine-rich RNA-binding protein blt801	GRP_HORVU	Hordeum vulgare	16	04 transcription	04.22 mRNA processing	D
156	60S ribosomal protein L17-2	RL172_HORVU	Hordeum vulgare	20	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
199	40S ribosomal protein S8-2	RS82_ARATH	Arabidopsis thaliana	24	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
202	40S ribosomal protein SA	RSSA_VITVI	Vitis vinifera	34	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
203	40S ribosomal protein S16	RS16_ORYSI	Oryza sativa	17	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
341[a]	60S ribosomal protein L13-3	RL133_ARATH	Arabidopsis thaliana	23	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
313[a]	60S ribosomal protein L23	RL23_ARATH (+1)	Arabidopsis thaliana	15	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
242[a]	60S ribosomal protein L24	RL24_HORVU (+1)	Hordeum vulgare	18	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
208[a]	60S ribosomal protein L7a	RL7A_ORYSJ	Oryza sativa	29	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
291[a]	60S ribosomal protein L18a	RL18A_ORYSJ	Oryza sativa	21	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
343[a]	60S ribosomal protein L30	RL30_EUPES (+7)	Euphorbia esula	12	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
257	60S ribosomal protein L22-2	RL222_ARATH	Arabidopsis thaliana	14	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
276	60S ribosomal protein L10-1	RL101_ORYSI	Oryza sativa	25	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
281	60S ribosomal protein L23a	RL23A_DAUCA	Daucus carota	18	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
331	60S ribosomal protein L6	RL6_MESCR	M. crystallinum	26	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
280	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	IF5A1_ARATH (+16)	Arabidopsis thaliana	17	05 protein synthesis	05.04 translation factors	D
272	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K_ORYSJ	Oryza sativa	26	05 protein synthesis	05.04 translation factors	U

225 [b]	Elongation factor 1-alpha	EF1A2_HORVU	Hordeum vulgare	49	05 protein synthesis	05.04 translation factors	D
262[a]	Elongation factor 1-delta 2	EF1D2_ORYSJ	Oryza sativa	25	05 protein synthesis	05.04 translation factors	U
237[a]	DNA damage-binding protein 1a	DDB1A_ARATH (+1)	Arabidopsis thaliana	121	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	U
283[a]	17.4 kDa class I heat shock protein	HSP17_ARATH	Arabidopsis thaliana	17	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	U
196	Heat shock protein 90-4	HS904_ARATH	Arabidopsis thaliana	80	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
358	Heat shock protein STI	STIP_SOYBN	Glycine max	64	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
315[a]	24.1 kDa heat shock protein, mitochondrial	HS24M_ORYSJ	Oryza sativa	24	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
288[a]	Chaperone protein ClpB3, mitochondrial	CLPB3_ORYSJ	Oryza sativa	109	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
223[a]	Proteasome subunit alpha type-4-1	PSA4A_ORYSI (+1)	Oryza sativa	27	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
246	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_ORYSJ	Oryza sativa	30	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
320	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	UFC1_ORYSI	Oryza sativa	20	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
165[a]	Proteasome subunit beta type-2	PSB2_ORYSJ	Oryza sativa	23	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	U
190	Prob. 26S proteasome non-ATPase regulatory sub 3	PSMD3_DAUCA (+1)	Daucus carota	56	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	U
204[a]	26S protease regulatory subunit 10B homolog A	PS10A_ARATH	Arabidopsis thaliana	45	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	U
305[a]	26S protease regulatory subunit 6B homolog	PRS6B_ARATH (+1)	Arabidopsis thaliana	46	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	U
318	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 1A	RPN1A_ARATH	Arabidopsis thaliana	98	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	U
314	V-type proton ATPase subunit C	VATC_HORVU	Hordeum vulgare	40	07 transporters	07.22 transport ATPases	U
265	GTP-binding protein SAR1	SAR1_TOBAC	Nicotiana tabacum	23	07 transporters	07.99 others	U
264[a]	Prob. voltage-gated potassium channel sub-beta	KCAB_ORYSJ	Oryza sativa	36	07 transporters	07.01 ions	U
235	Coatomer subunit gamma-2	COPG2_ORYSJ	Oryza sativa	99	08 intracellular traffic	08.07 vesicular	U
344	Coatomer subunit beta-1	COB21_ORYSJ	Japanese rice	103	08 intracellular traffic	08.07 vesicular	U
159	Histone H2A.1	H2A1_WHEAT (+2)	Triticum aestivum	16	09 cell structure	09.13 chromosomes	D
205[a]	Prob. UDP-arabinopyranose mutase 2	RGP2_ORYSJ	Oryza sativa	39	09 cell structure	09.01 cell wall	U
241[a]	Actin-11	ACT11_ARATH	Arabidopsis thaliana	42	09 cell structure	09.04 cytoskeleton	U
161	14–3–3-like protein GF14-6	14331_MAIZE	Zea mays	30	10 signal transduction		D
271	14–3–3-like protein GF14-D	14334_ORYSJ	Oryza sativa	29	10 signal transduction		U
167	Ser/thr-prot phosphatase 2A 65 regulatory sub A beta	2AAB_ARATH	Arabidopsis thaliana	66	10 signal transduction	10.0407 phosphatases	U
334	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor WSCI	ICIW_WHEAT	Triticum aestivum	9	11 disease/defense	11.02 defense-related	D
335	1-Cys peroxiredoxin	REHY_MEDTR	Medicago truncatula	24	11 disease/defense	11.04 stress responses	D
191[a]	Alcohol dehydrogenase class-3	ADHX_MAIZE	Zea mays	41	11 disease/defense	11.03 cell death	U
116[a]	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	RH15_ARATH	Arabidopsis thaliana	48	11 disease/defense	11.05 stress response	U
260[a]	NADP-dependent alkenal double bond reductase P1	P1_ARATH (+1)	Arabidopsis thaliana	38	11 disease/defense	11.05 stress response	U
198	Serpin-Z1B	SPZ1B_WHEAT	Triticum aestivum	43	12 unclear classification		U
92	Alpha-amylase inhibitor 0.53	IAA5_WHEAT	Triticum aestivum	13	12 unclear classification		D
245	Alpha-amylase inhibitor 0.28	IAA2_WHEAT	Triticum aestivum	17	12 unclear classification		D
267	HMG1/2-like protein	HMGL_WHEAT	Triticum aestivum	17	12 unclear classification		D

No, protein number; MW, molecular weight (kDa); R., ratio control/hydro-priming; [a]Proteins specifically affected by hydro-priming; [b]Proteins differentially affected by both treatments (up-regulated by AsA and down-regulated by water); U, up-regulated proteins; D, down-regulated proteins.

Table 3 – Wheat metabolic proteins whose abundance varies specifically in ascorbate-primed seeds.

No	Protein name	Accession no	Organism	MW	Function category	Function description	R.
163	S-adenosylmethionine synthase (AdoMet)	METK_WHEAT	Triticum aestivum	43	01 metabolism	01.01 amino acid	D
326	Adenylosuccinate synthetase (Fragment)	PURA_WHEAT	Triticum aestivum	51	01 metabolism	01.03 nucleotides	U
247	2.3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	PMGI_MAIZE	Zea mays	61	02 energy	02.01 glycolysis	D
354	Glucose-6-phosphate isomerase	G6PI_ARALP	Arabidopsis thaliana	62	02 energy	02.02 gluconeogenesis	U
259	Citrate synthase	CISY_FRAAN	Fragaria ananassa	52	02 energy	02.10 TCA pathway	U
207	Prob. succinyl-CoA ligase [ADP-forming] sub alpha.	SUCA_ORYSJ	Oryza sativa	34	02 energy	02.10 TCA pathway	D
294	Pyruvate phosphate dikinase. Chloroplastic	PPDK_FLABI (+1)	Flaveria bidentis	104	02 energy	02.30 photosynthesis	D
240	Cell division control protein 48 homolog D	CD48D_ARATH	Arabidopsis thaliana	90	03 cell growth/division	03.22 cell cycle	D
347	40S ribosomal protein S3a	RS3A_TORRU	Tortula ruralis	29	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	U
151	40S ribosomal protein S15a-1	R15A1_ARATH	Arabidopsis thaliana	15	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
150	60S ribosomal protein L3	RL3_ORYSJ	Oryza sativa	44	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
197	60S ribosomal protein L38	RL38_ARATH (+2)	Arabidopsis thaliana	8	05 protein synthesis	05.01 ribosomal proteins	D
297	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-1	ERF1X_ARATH	Arabidopsis thaliana	49	05 protein synthesis	05.04 translation factors	D
248	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PIMT_WHEAT	Triticum aestivum	25	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
253	Chaperone protein ClpB2. Chloroplastic	CLPB2_ORYSJ	Oryza sativa	109	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
252	Protein disulfide isomerase-like 2–3	PDI23_ORYSJ	Oryza sativa	47	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
263	T-complex protein 1 subunit alpha	TCPA_ARATH	Arabidopsis thaliana	59	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
273	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	HSP7S_SPIOL	Spinacia oleracea	65	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
285	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	FKB70_WHEAT	Triticum aestivum	62	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	D
304	Prob. protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_MEDSA	Medicago sativa	40	06 protein destination/storage	06.01 folding and stability	U
348	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha.	RUBA_PEA	Pisum sativum	62	06 protein destination/storage	06.10 complex assembly	D
227	Proteasome subunit alpha type-5	PSA5_ORYSJ	Oryza sativa	26	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
153	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	UBE11_WHEAT	Triticum aestivum	117	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
176	Ubiquitin-NEDD8-like protein RUB1	RUB1_ARATH (+4)	Arabidopsis thaliana	17	06 protein destination/storage	06.13 proteolysis	D
244	Alpha/beta-gliadin clone PW1215	GDA6_WHEAT	Triticum aestivum	34	06 protein destination/storage	06.20 storage proteins	D
200	ADP.ATP carrier protein 1. mitochondrial	ADT1_WHEAT (+1)	Triticum aestivum	36	07 transporters	07.16 purine/pyrimidines	D
376	Actin-7	ACT7_ARATH	Arabidopsis thaliana	42	09 cell structure	09.04 cytoskeleton	U
137	Histone H2B.10	H2B10_ORYSI (+22)	Oryza sativa	17	09 cell structure	09.13 chromosomes	U
319	Histone H3.2	H32_ARATH (+5)	Arabidopsis thaliana	15	09 cell structure	09.13 chromosomes	U
333	Signal recognition particle 19 protein	SRP19_ORYSJ	Oryza sativa	15	10 signal transduction	10.04 mediators	D
370	Ser/thr-protein phosphatase PP2A-4 catalytic subunit	PP2A4_ORYSJ	Oryza sativa	36	10 signal transduction	10.0407 phosphatases	U
169	Cysteine proteinase inhibitor 12	CYT12_ORYSJ	Oryza sativa	27	11 disease/defense	11.02 defense-related	D
340	Selenium-binding protein 1	SEBP1_ARATH	Arabidopsis thaliana	54	11 disease/defense	11.04 stress responses	U
282	Dehydrin Rab15	DHR15_WHEAT	Triticum aestivum	16	11 disease/defense	11.04 stress responses	D
269	Em protein H5	EM4_WHEAT	Triticum aestivum	10	11 disease/defense	11.04 stress responses	D
350	Prob. NADPH:quinone oxidoreductase 1	NQR1_ORYSJ	Zea mays	21	11 disease/defense	11.06 detoxification	D
209	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16	IAC16_WHEAT	Triticum aestivum	16	12 unclear classification		D
210	Carbonic anhydrase. Chloroplastic	CAHC_HORVU	Hordeum vulgare	35	12 unclear classification		D
s	Serpin-ZX	SPZX_HORVU	Hordeum vulgare	43	12 unclear classification		D
78	Lactoylglutathione lyase/glyoxalase	LGUL_ORYSJ	Oryza sativa	33	20 secondary metabolism		U

No, protein number; accession no, accession number according to the Swiss-Prot database; MW, molecular weight (kDa); R., ratio control/ascorbate-priming; U, up-regulated proteins; D, down-regulated proteins.

Finally, B was lowered to 5% over 1 min and the column re-equilibrated for 24 min (120 min total run time). MS spectra were collected over an m/z range of 400–1800 Da at 60,000 resolutions, operating in the data dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and LTQ-MS/MS acquisition. MS/MS spectra were collected for the five most abundant ions in each MS scan ("TOP5 strategy") using a dynamic exclusion limit of 2 MS/MS spectra of a given mass for 30 s with exclusion duration of 100 s. CID was performed with normalized collision energy set at 35 V. In order to assess the additional variation introduced into the measurements by the technical procedure and to increase the number of identified proteins, we performed three technical replicates (LC–MS/MS runs) for each of the three experimental replicates.

2.6. Database searching and protein identification

Raw MS/MS data files from Xcalibur software (version 2.0.7 SP1, Thermo Fisher) were submitted to Proteome Discoverer software version 1.3 (Thermo Scientific) for peptide/protein identification. The searches were performed against Swiss-Prot database (version 57.15). Thermo Finnigan LCQ/DECA RAW file data import filter was used. The search was limited to proteins from species of the Viridiplantae (green plant) taxonomy entries and performed using the built-in decoy search option of Mascot. Enzymatic digestion with trypsin was selected, with maximum 2 missed cleavages, peptide charges +2 and +3, and a precursor mass tolerance of 10 ppm and 0.8 Da fragment mass tolerance; acetylation (N-term), oxidation (M) and deamidation (N, Q) were used as dynamic modifications; carbamidomethylation (C) was used as static modification.

2.7. Scaffold analysis

Scaffold software (version 3.1.2, Proteome Software Inc.) [27] was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications and for label-free relative quantitation based on spectral counting. Spectral counting calculates the number of MS/MS scans that are attributed to the same peptide ion. The frequency of these MS/MS scans correlates with the abundance of a given peptide from a protein in the sample. The number of spectra matched to peptides from a protein is used as a surrogate measure of protein abundance. Normalization will standardize the spectral counts by multiplying some fractional amount across samples so that the total number of spectra is the same within each category and then across all categories, as from Scaffold's manual. The additional X! Tandem search engine (The GPM, Cyclone version 2010.12.01.1) was also chosen, keeping the same parameters previously used for Mascot. According to the Peptide and Protein Prophet algorithms [28,29] implemented into Scaffold, the peptide probability was set to minimum 95%, whereas the protein probability was set at 99%, with at least two identified peptides, resulting in a false discovery rate (FDR) for peptides and proteins $\leq$0.2% (where only 1 decoy hit was observed). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Fisher's exact test was used to identify statistically significant differences between unprimed seeds and primed seeds (hydro-primed or ascorbate-primed). Proteins, which had at least a two-fold difference for the mean ratio, as well as a Fisher's p-value $\leq$0.05, a relative standard deviation (RSD) of experimental replicates $\leq$40%, and appear in more than one biological replicate, were considered present in the two samples in significant different quantities.

2.8. Functional classification

Gene Ontology (GO) data about the biological processes of identified proteins were obtained by means of Scaffold's built-in option and according to Bevan et al. [30].

3. Results

3.1. Design of the experiment and proteomic approach

As a first step toward characterizing proteins that potentially associated with priming-induced salt stress tolerance in durum wheat, a comparative gel-free proteomic analysis was carried out using primed and unprimed seeds. In this work, we are also interested in examining whether the effects of seed priming can be considered as an advance in germination corresponding to the realization of germination-related processes (i.e., water uptake, cell divisions), or involve other particular mechanisms. Toward this goal, we used durum wheat seeds of varying vigor as generated by hydro- and ascorbate-priming treatments.

As expected, seed germination and seedling emergence of durum wheat are significantly ($p \leq 0.05$) improved by seed priming (Fig. 1A). The primed seeds also showed an advance in germination time as compared to untreated controls. Ascorbate-priming seems to be more effective than hydro-priming in induction of salinity tolerance in durum wheat. The results also showed that seed priming, especially with AsA, enhanced all the growth parameters of the durum wheat seedlings, particularly the coleoptile growth, which appears to be the most affected by salinity stress (Fig. 1B).

Given the importance of the sample preparation step for the analysis of MS-based proteomics, in this study, it has been decided to combine two methods. First, a fractionation method based on the specific solubility properties of different classes of wheat seed proteins, since fractionation is essential to uncovering low-abundance proteins in complex protein mixtures [31]. Second, an enrichment method for less abundant proteins using hydrogel nanoparticles, which may further increase the number of identified proteins as revealed in our previous study [20]. This approach has proved to be effective, and a large number of proteins have been identified. The combination of the two protocols, standard in-solution trypsin digestion and hydrogel nanoparticle enrichment (see Materials and methods), allows us to identify a total of 380 proteins using the average of 1830 distinct peptide sequences per sample (Supplement Table S1). Furthermore, the choice of an enrichment step, followed by an in-solution digestion, represents a fast and simple protocol allowing us to increase significantly the number of identified proteins, as shown in Table 1, providing additional information to that obtained by the standard.

To ensure the accuracy, reproducibility, and reliability of protein identification, three experimental replicates and three technical replicates were performed [32]. In order to check the correspondence among technical replicates, the unweighted spectral counts of each replicate from the same experimental sample were plotted against each other and evaluated using Scaffold's built-in option. The same assessments were applied to the experimental and control groups.

3.2. Proteomics of durum wheat seed metabolic proteins

Of a total of 380 identified proteins, 182 were significantly up- or down-regulated in response to priming (Supplementary material Table S1). However, applying the other conditions (i.e., at least a two-fold difference for the mean ratio; protein identified in more than one biological replicate) the number of identified proteins was reduced to 155. Of these, 72 proteins were differentially accumulated in hydro-primed seeds, among which 43 were up-regulated and 29 were down-regulated (Fig. 2 and Table 2). However, 83 proteins were found to be differentially accumulated in ascorbate-primed seeds, 30 of these were up-regulated and 53 were down-regulated (Fig. 2 and Table 3).

3.3. Functional protein classification

Tables 2 and 3 (summarized in Fig. 3) list 112 proteins among the 155 identified (43 are redundant proteins). These proteins were grouped into 13 functional categories according to Bevan et al. [30]. In certain cases, subcategories were devised for clarity. The graphical view highlights five biochemical processes – central metabolism (amino acids, lipids and carbohydrates), energy, protein synthesis, protein folding/assembly and storage, and stress-related proteins – that comprised ~80% of the total of proteins identified (Fig. 3). 6% of the proteins have been unclassified.

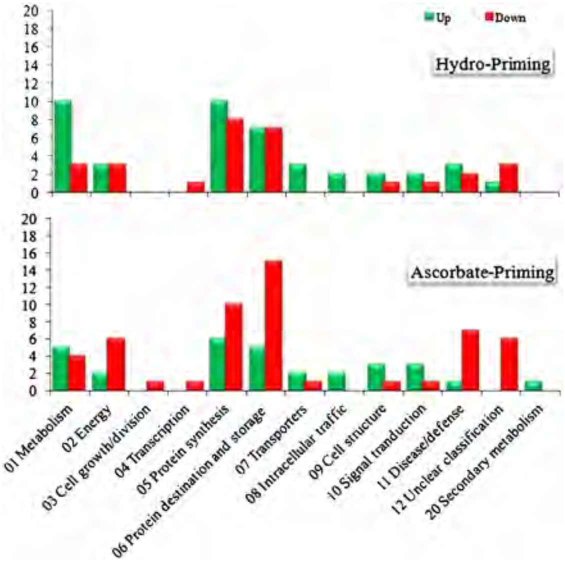


Fig. 3 – Functional distribution of the 121 proteins identified in hydro-primed and ascorbate-primed wheat seeds. Up, up-regulated proteins; Down, down-regulated proteins. Functional classes according to Bevan et al. [30].

3.4. Comparative analysis of identified proteins

Fig. 4 shows a comparative view of the 112 proteins whose abundance varied in response to seed priming. Among them, 43 were equally affected by both seed pretreatments (Table 2; Supplementary material Table S2). Of these, 41 proteins showed similar changes in their abundance, whereas two were differentially affected. Hydro-priming specifically affects the abundance of 29 proteins most of them belonging to the metabolism (particularly lipid metabolism) and protein synthesis categories (Figs. 2 and 4; Table 2 and Supplementary material Table S3). However, besides the 43 shared proteins, ascorbate-priming specifically affects the abundance of 40 proteins; most of them belonging to energy, protein destination and storage, and disease/defense protein categories (Figs. 2 and 4; Table 3 and Supplementary material Table S4).

4. Discussion

Salinity is probably the major abiotic stress that threatens crop productivity worldwide [5,6]. Poor seed germination and seedling emergence are among major consequences of salinity [33]. Seed priming, however, has been successfully used to improve germination and emergence in seeds of many crops [10–13,23,24,34]. This is of particular importance for wheat, since it seems to be more sensitive to salinity during the early seedling stage [23,33]. Consistent with this, priming durum wheat seeds resulted in an improved germination and seedling growth (Fig. 1). Since the improvement of seed vigor is both of academic and economical interest, a great deal of research has been done in the last few years trying to test, develop and eventually promote seed priming for improving the germination rate and uniformity of growth of many vegetables and field crops [10,13,22,23]. Nevertheless, the molecular mechanisms of priming as it relates to stress tolerance in germinating seeds remain largely unclarified. In the last decade, many comparative studies have been performed using gel-based proteomic approach to identify potential biomarkers of seed vigor under primed and non-primed conditions [11–13,35]. Although the results achieved to date are impressive, this goal remains elusive [7,14] mainly because of the high dynamic range in the abundance of particular proteins (i.e., storage proteins) [13] and the limited resolving power of gel-based approach, which only allows separation of proteins within certain isoelectric point (Ip) and molecular weight restrictions [36]. Gel-free proteomic approach is able to overcome most of these difficulties [32] and consequently, provide strong impetus to gain better understanding of the underlying mechanisms of seed vigor and priming-induced stress tolerance [7,10,11]. Here we report, for the first time, a comparative gel-free shotgun proteomic analysis of metabolic proteins extracted from durum wheat seeds of varying vigor as generated by hydro- and ascorbate-priming treatments.

4.1. Proteomics of wheat hydro-primed seed metabolic proteins

This study disclosed 72 proteins that were differentially accumulated in wheat seeds during hydro-priming (Table 2;

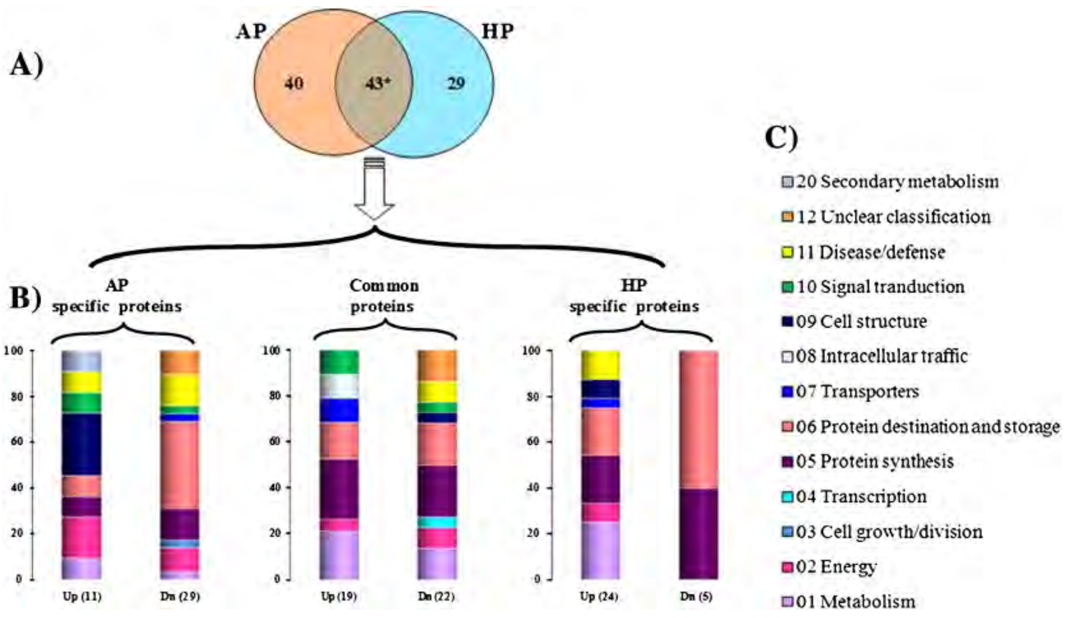


Fig. 4 – Venn diagrams and functional classification of wheat proteome in hydro-primed seeds compared to ascorbate-primed seeds. (A) Venn diagram displaying the overlap in the proteome of primed durum wheat seeds (hydro-priming vs. ascorbate-priming). (B) Functional categories of proteins shown in (A). Up, up-regulated proteins; Dn, down-regulated proteins. The number of identified proteins is indicated. (C) Functional classes according to Bevan et al. [30]. *2 proteins among them were differentially regulated by both priming treatments.

Supplementary material Table S2). Among these, proteins belonging to the functional category of "proteins destination and storage" were highly represented (Figs. 2 and 3; Table 2).

In wheat, albumins and globulins constitute about 11% of total flour protein and have mainly metabolic activity or structural functions [22]. Even though wheat seed storage

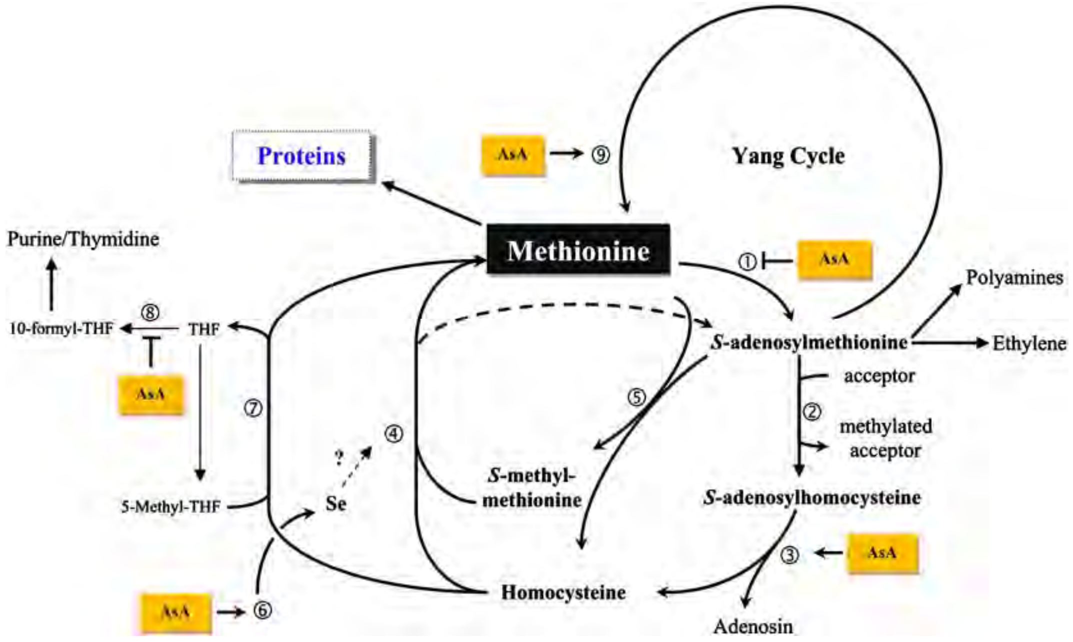


Fig. 5 – Scheme showing the possible changes in methionine metabolism induced by ascorbate-priming. Enzymes: (1) SAM synthase; (2) SAM-dependent methyltransferase; (3) S-AdoHcy hydrolase; (4) S-AdoMet:Hcy methyltransferase; (5) SMM: Hcy methyltransferase; (6) selenium binding protein 1; (7) Met synthase; (8) FTHF-ligase; (9) methylthioribose-1-phosphate isomerase. See text for details. SAM: S-adenosylmethionine; SMM: S-methyl-methionine; S-AdoHcy: S-adenosylhomocysteine; S-AdoMet: S-adenosylmethionine; Hcy: homocysteine; FTHF: formate-tetrahydrofolate.

proteins were not considered in this study, the hydro-priming treatment resulted in the up-accumulation of proteins involved in proteolysis (protein nos. 165, 190, 204, 305, 318) as well as transport, and intracellular trafficking (protein nos. 235, 264, 265, 314, 344). Interestingly, among these proteins, V-type proton ATPase (protein no. 314, identified for the first time) is described as involved in the regulation of the proteolysis of stored proteins by acidification of the protein storage vacuole [37]. This finding indicates that hydro-priming promotes the mobilization of storage proteins, as previously suggested [11–13]. This initial mobilization of the storage proteins is probably required to facilitate their further proteolytic degradation during seed germination and seedling emergence [10–13]. Furthermore, in this functional category several heat shock proteins (HSPs) and a DNA damage-binding protein were identified as changing in abundance during hydro-priming (Fig. 3; Table 2; Supplementary material Table S2). The HSPs are involved in diverse cellular processes, including regulation of protein degradation during seed germination [38] and probably during seed priming [12,13,39]. However, DNA damage-binding proteins are a component of the E3 ubiquitin–protein ligase complex, and seem to be essential for normal seed germination and post-germination growth, as recently reported in Arabidopsis [40]. In this study, the up-regulation of a small heat shock protein (17.4 kDa class I HSP) and a DNA damage-binding protein (DDB 1a, previously unidentified protein), along with a GTP-binding protein SAR1 (protein no. 265), suggests that mobilization of seed storage proteins during hydro-priming is likely to be under control.

In the "protein synthesis" category, several proteins were found to be up-regulated during hydro-priming (Table 2; Supplementary material Table S2). Previously, it has been reported that protein synthesis increases substantially during priming, and this including both the quantity and the type of the proteins being synthesized [41]. Also, it has been revealed that within a few minutes after rehydration, the number of single ribosomes declines, as they become recruited into polysomal protein-synthesizing complexes [42,43]. Even though initial protein synthesis is dependent on extant ribosomes, newly synthesized ribosomes are produced and used within a few hours after completion of the initial polysome assembly during germination [43,44]. Consistent with this, while six individual ribosomal proteins (protein nos. 276, 257, 281, 291, 331, 343) were down-regulated after hydro-priming, eight other ribosomal proteins (protein nos. 203, 199, 202, 156, 341, 313, 241 and 208) were found to be up-regulated by this process (Table 2 and Supplementary material Table S2). Furthermore, in this functional category, several elongation factors (EF) and eukaryotic translation initiation factors (eIF) have been found to changes in abundance in response to hydro-priming (Table 2 and Supplementary material Table S2), consistent with results obtained in Arabidopsis [39], sugar beet [12] and alfalfa [13] seed during priming. In this study, the abundance of eIF3K, eIF4A and many EF (protein nos. 44, 128, 225, 262) was found to be up-regulated in hydro-primed seeds (Table 2). However, it is interesting to note that eIF5A-1 was down-regulated during this treatment. This initiation factor, previously unidentified, is a highly conserved factor and thought to be necessary for selective mRNA stabilization and translation. In line with this, the stability of stored mRNAs was shown to be an important determinant of seed vigor [45]. Therefore, it will be very interesting to investigate the potential involvement of this initiation factor in seed vigor and invigoration.

In the "metabolism" category, abundance of fifteen proteins was found to be affected by hydro-priming treatment. Among them, six proteins are involved in carbohydrate metabolism (Fig. 3; Table 2; Supplementary material Table S2). In seeds, galactose-containing oligosaccharides (raffinose family, RFOs) and polysaccharides (galactomannans) are among the most prominent soluble sugars, and serve as an essential source of rapidly metabolizable carbon for early germination [46] and seed priming [13,47]. Thus, it is not surprising that the abundance of α-galactosidase and sucrose-phosphate synthase 4 (SPS4), which plays a pivotal role in the conversion of starch or fatty acids into sucrose [48], was strongly up-regulated during hydro-priming. Also, in this functional category, the abundance of five proteins involved in amino acid metabolism was found to be changed by hydro-priming (Fig. 3; Table 2; Supplementary material Table S2). Methionine (Met) is a fundamental amino acid as the building block for the biological universal methylating agent, S-adenosylmethionine (AdoMet), and as the precursor of polyamines, the plant-ripening hormone ethylene, and the vitamin biotin [8]. Previous reports suggested that the methyl cycle is activated during seed priming [12,13]. In agreement, in this study the abundance of three enzymes involved in sulfur amino acid metabolism (protein nos. 147, 212, 311) as well as a pyridoxal biosynthesis protein (PDX1.1), which is involved in biotin metabolism, was found to be up-regulated in response to hydro-priming. In addition, two enzymes involved in lipid metabolism (protein nos. 274, 231) were specifically up-regulated by hydro-priming treatment (Fig. 3; Table 2; Supplementary material Table S2). Similar results were reported in previous studies [12,13]. These findings presumably reflect an initiation of seed storage mobilization in response to hydro-priming.

In the "disease/defense" category, many proteins were found to change in abundance during hydro-priming (Table 2; Supplementary material Table S2). Previous reports revealed that priming up-regulates the abundance of several proteins associated to detoxification and stress response [12,13,39]. In the present study, three stress-related proteins (protein nos. 161, 191, 260) were found to be up-regulated during hydro-priming. Interestingly, the abundance of 1-Cys peroxiredoxin (1-CysPrx) was down-regulated. This enzyme is a peroxidase specifically and highly produced in seeds, localized in nuclei of scutellum and aleurone cells [49] and seems to be involved in the inhibition of germination particularly under salt, osmotic and oxidative stress conditions [50]. Together, these findings confirm and extend previous observations that seeds experience osmotic stress in the limiting water conditions (i.e., restricting the period of germination on water, using osmotic solution) used in priming treatments [13,39].

4.2. Proteomics of wheat ascorbate-primed seed metabolic proteins

Ascorbic acid is one of the most important metabolites involved in cell division, osmotic adjustment [51], and plays vital role during the onset of germination [52]. To date, only

few reports are available regarding the biochemical effects of ascorbate-priming or pretreatment on the germination of wheat seeds, most of them are in disagreements [53–55]. To further characterize the mechanisms involved in improving seed vigor by ascorbate-priming treatment as shown in this study (Fig. 1) and many others [23,55,56], we carried out for the first time a comparative analysis between the proteome of hydro-primed seeds with that of ascorbate-primed seeds.

As shown in Fig. 3 and Table 2, ascorbate-priming treatment displayed both similarities and differences compared with the hydro-priming treatment. Besides the 43 proteins whose abundance varied in common with hydro-priming treatment and for whose significance was discussed above, 40 proteins showed significant change (> 2-fold; $p \leq 0.05$) in their abundance during ascorbate-priming (Table 3; Supplementary material Table S4). Among these proteins, there were 29 down-regulated proteins (Fig. 4).

Dehydration and rehydration during seed development and germination are associated with high levels of oxidative stress, resulting in DNA and protein damage [8]. These detrimental conversions can lead to the recognition, tagging, and destruction of the altered proteins [57]. In the present study, the abundance of many proteins involved in the protection, repair of damaged proteins, such as protein-L-isoaspartate O-methyltransferase (PIMT), protein disulfide isomerase-like 2–3 (PDIL2–3) and HSP7S, which are able to protect the cell from oxidative damage [13], was found to be decreased during ascorbate-priming (Fig. 3, Table 3, Supplementary material Table S4). On the contrary, the lactoylglutathione lyase (LGL) or glyoxalase I, which is involved in the glutathione-based detoxification of methylglyoxal (MG) especially during oxidative stress [58], was found to be increased in abundance in response to ascorbate-priming. In similar way, nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK 1) was found to be up-regulated during ascorbate-priming (Table 3; Supplementary material Table S4). Interestingly, it has been reported that oxidative stress conditions strongly induced the NDK gene expression, the over-expression of which reduced the accumulation of ROS [59]. Altogether, these findings corroborate recent data [12,13,39], suggesting that seed priming initiates an oxidative stress, which is presumably attenuated by the ascorbate treatment.

The methionine biosynthesis pathway is essential for cell viability in that it provides building blocks for proteins and generates the precursor to S-adenosylmethionine (AdoMet), which is the main methyl group-donating compound in cells [8]. Previously, it has been reported that Met metabolism plays an important role during seed filling, seed germination and priming [13,39,60]. Consistent with this, in this study, the abundance of many proteins/enzymes involved in methyl cycle (protein nos. 117, 163, 169, 193, 248, 326, 340) was found to be affected by ascorbate-priming treatment (Tables 2 and 3; Supplementary material Table S2 and S4). However, it is interesting to note that adenosylhomocysteinase (AdoHcy hydrolase) was up-regulated whereas S-adenosylmethionine synthetase was down-regulated during ascorbate-priming (Table 3, Supplementary material Table S4). AdoHcy hydrolase catalyzes the production of AdoHcy (Fig. 5). AdoHcy is the product of all AdoMet-dependent biological transmethylation reactions and is a potent competitive inhibitor of S-adenosylmethionine-dependent methyl transferase reactions that are crucial to growth and development including seed germination [61]. This enzyme, presumed to play a key role in the control of DNA and other substrates methylation, may influence the expression of certain genes, such as genes related to seed germination and dormancy [62]. Thus, it will be interesting to investigate the possible role of AdoHcy hydrolase in seed priming, as previously performed in seed germination [63].

In similar way, ascorbate-priming appears to strongly enhance the abundance of selenium binding-protein 1 (> 5-fold), which binds cadmium and mediates lower sensitivity to stress requiring glutathione (GSH) for tolerance [64]. In animals, selenium deficiency is shown to decrease specifically the activity of betaine homocysteine methyltransferase that catalyzes the conversion of homocysteine to methionine, suggesting the involvement of selenium binding-protein in methionine biosynthesis [65]. In plants, numerous studies reported the importance of selenium in seed germination, seedling growth, and many metabolic processes notably under stress conditions [66–68], suggesting the possible involvement of selenium binding-protein 1 in methyl-methionine cycle (Fig. 5).

Furthermore, the level of methylthioribose-1-phosphate isomerase, which catalyzes the biosynthesis of methionine via salvage pathway or Yang cycle [69], appears to up-regulate during ascorbate-priming (Fig. 5). Finally, there was a decrease in abundance of the enzyme formate-tetrahydrofolate ligase (FTHF-ligase) that catalyzes the interconversion of THF with 10-FTHF, which functions as one-carbon donor and plays a critical role in thymidine and purine biosynthesis (Supplementary material Table S4). This is consistent with a decreased abundance of FTHF-ligase during seed priming [12], and suggests that THF was used for the recycling of Met.

Altogether, these findings underpin the importance of the ROS-scavenging and the antioxidant defense system in improving germination and seedling growth of durum wheat under salt stress, and suggest a possible role of methionine in seed invigoration by seed priming with ascorbate.

5. Conclusions

Our study presents a proteomic pipeline for extensive characterization of metabolic proteins from durum wheat seeds using solubility-based protein fractionation and protein enrichment combined with gel-free, label-free quantitative tandem MS (LTQ-Orbitrap). The application of an enrichment method, such as hydrogel nanoparticle fractionation, has enhanced the identification of a large part of the metabolic proteins. Accordingly, we propose that this approach could be used to acquire a wider perspective and a better understanding of the seed proteome.

Furthermore, the above approach was successfully applied to investigate the possible biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. The results give evidence that priming enhanced wheat seed vigor under salt stress conditions not only by advancing germination-related processes, but also by affecting the abundance of many proteins, most of which are involved in protein metabolism and stress response. More interestingly, besides the initiation of oxidative stress defense, ascorbate-priming appears to specifically affect the methionine-related metabolism.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.010.

REFERENCES

[1] O'Brien L, DePauw R. Wheat. In: Wrigley C, Corke H, Walker CH, editors. Encyclopedia of grain science, vol. 3. U.K.: Elsevier Ltd.; 2004. p. 330–6.
[2] Habash DZ, Kehel Z, Nachit M. Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. J Exp Bot 2009;60:2805–15.
[3] Sayar R, Bchini H, Mosbahi M, Khemira H. Response of durum wheat (Triticum durum Desf.) growth to salt and drought stresses. Czech J Genet Plant Breed 2010;46:54–63.
[4] Heydecker W, Higgins J, Gulliver RL. Accelerated germination by osmotic seed treatment. Nature 1973;246:42–4.
[5] Läuchli A, Grattan SR. Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM, editors. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Netherland: Springer; 2007. p. 285–315.
[6] Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV, editors. Ecophysiology and responses of plants under salt stress. Springer Science + Business Media, LLC; 2013. p. 25–87.
[7] Tanou G, Fotopoulos V, Molassiotis A. Priming against environmental challenges and proteomics in plants: update and agricultural perspectives. Front Plant Sci 2012;3:1–5.
[8] Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, et al. Seed germination and vigor. Annu Rev Plant Biol 2012;63: 507–33.
[9] De Castro RD, van-Lammeren AAM, Groot SPC, Bino RJ, Hilhorst HWM. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. Plant Physiol 2000;122:327–35.
[10] Bradford KJ, Chen F, Cooley MB, DahalP Downie B, Fukunaga KK, Gee OH, et al. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos J, editors. Seed biology: advances and applications. Wallingford, U.K.: CABI Int.; 2000. p. 231–51.
[11] Job D, Capron I, Job C, Dacher F, Corbineau F, Côme D. Identification of germination-specific protein markers and their use in seed priming technology. In: Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos J, editors. Seed biology: advances and applications. Wallingford, U.K.: CAB Int.; 2000. p. 449–59.
[12] Catusse J, Meinhard J, Job C, Strub JM, Fischer U, Pestsova E, et al. Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. Proteomics 2011;11:1569–80.
[13] Yacoubi R, Job C, Belghazi M, Chaibi W, Job D. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. J Proteome Res 2011;10:3891–903.
[14] Chen K, Arora R. Priming-memory invokes seed stress tolerance. Environ Exp Bot 2012. http://d x.doi.org/ 10 .1 016 / j. e n v ex pbot .
[15] Wong JW, Cagney G. An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. Methods Mol Biol 2010;604:273–83.
[16] Panchaud A, Affolter M, Moreillon P, Kussmann M. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. J Proteomics 2008;71:19–33.
[17] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. Science 2006;312:212–7.
[18] Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nat Methods 2007;4:787–97.
[19] Tamburro D, Fredolini C, Espina V, Douglas TA, Ranganathan A, Ilag L, et al. Multifunctional core–shell nanoparticles: discovery of previously invisible biomarkers. J Am Chem Soc 2011;133:19178–88.
[20] Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Laganà A. Comparison of three different enrichment strategies for serum low molecular weight protein identification using shotgun proteomics approach. Anal Chim Acta 2012;740:58–65.
[21] Fredolini C, Meani F, Reeder KA, Rucker S, Patanarut A, Botterell PJ, et al. Concentration and preservation of very low abundance biomarkers in urine, such as human growth hormone (hGH), by Cibacron Blue F3G-A loaded hydrogel particles. Nano Res 2008;1:502–18.
[22] Hurkman WJ, Tanaka CK. Improved methods for separation of wheat endosperm proteins and analysis by two-dimensional gel electrophoresis. J Cereal Sci 2004;40: 295–9.
[23] Jafar MZ, Farooq M, Cheema MA, Afzal I, Basra SMA, Wahid MA, et al. Improving the performance of wheat by seed priming under saline conditions. J Agron Crop Sci 2012;198: 38–45.
[24] Farooq M, Basra SMA, Hafeez K. Seed invigoration by osmohardening in coarse and fine rice. Seed Sci Technol 2006;34:181–7.
[25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–53.
[26] Capriotti AL, Caracciolo G, Cavaliere C, Crescenzi C, Pozzi D, Laganà A. Shotgun proteomic analytical approach for studying proteins adsorbed onto liposome surface. Anal Bioanal Chem 2011;401:1195–202.
[27] Searle BC. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. Proteomics 2010;10:1265–9.
[28] Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem 2002;74: 5383–92.
[29] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 2003;75:4646–58.
[30] Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana. Nature 1998;391:485–8.
[31] Hurkman WJ, Tanaka CK. Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. J Chromatogr B 2007;849: 344–50.
[32] Stevenson SE, Chu Y, Ozias-Akins P, Thelen JJ. Validation of gel-free, label-free quantitative proteomics approaches: applications for seed allergen profiling. J Proteomics 2009;72: 555–66.
[33] Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. Adv Agron 2008;97:45–110.
[34] Al-Hakimi AMA, Hamada AM. Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. Biol Plant 2001;44:253–61.
[35] Wang WQ, Møller IM, Song SQ. Proteomic analysis of embryonic axis of Pisum sativum seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. J Proteomics 2012;77:68–86.
[36] Skylas DJ, Van Dyk D, Wrigley CW. Proteomics of wheat grain. J Cereal Sci 2005;41:165–79.
[37] Hwang Y, Bethke PC, Gubler F, Jones RL. cPrG-HCl a potential H^+/Cl^- symporter prevents acidification of storage vacuoles in aleurone cells and inhibits

GA-dependent hydrolysis of storage protein and phytate. Plant J 2003;35:154–63.
[38] Su PH, Li HM. Arabidopsis stromal 70-kd heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. Plant Physiol 2008;146:1231–41.
[39] Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. Plant Physiol 2001;126:835–48.
[40] Mandy Hsia Mon, Callis Judy. BRIZ1 and BRIZ2 proteins form a heteromeric E3 ligase complex required for seed germination and post-germination growth in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 2010;285:37070–81.
[41] Khan AA. Preplant physiological seed conditioning. Hortic Rev 1992;13:131–81.
[42] Bewley JD. Seed germination and dormancy. Plant Cell 1997;9: 1055–66.
[43] Dommes J, Van de Walle C. Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. Physiol Plant 1990;79:289–96.
[44] Toorop PE, Groot SPC, Hilhorst HWM. Expression of a ribosomal protein gene during germination of cabbage (Brassica oleracea f. oleracea) seeds. In: Nicolas G, Bradford KJ, Come D, Pritchard HW, editors. The biology of seeds: recent research advances. Cambridge, M.A.: CAB International; 2003. p. 191–7.
[45] Sen S, Osborne DJ. Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (Secale cereale L.) embryos. Biochem J 1977;166: 33–8.
[46] Blochl A, Peterbauer T, Richter A. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. J Plant Physiol 2006;164:1093–6.
[47] Gurusinghe S, Bradford KJ. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Sci Res 2001;11: 121–33.
[48] Chávez-Bárcenas AT, Valdez-Alarcón JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, et al. Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice sps1 gene. Plant Physiol 2000;124:641–54.
[49] Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. Plant J 2009;57:132–45.
[50] Dietz Karl-Josef. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. Antioxid Redox Signal 2011;15:129–59.
[51] De Gara L, De Pinto MC, Moliterni VMC, D'Egidio MG. Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of Triticum durum. J Exp Bot 2003;54:249–58.
[52] De Tullio MC, Arrigoni O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. Seed Sci Res 2003;13:249–60.
[53] Roy NK, Srivastava AK. Effect of presoaking seed treatment on germination and amylase activity of wheat (Triticum aestivum L.) under salt stress conditions. Rachis 1999;18:46–51.
[54] Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M. Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. Plant Prod Sci 2006;9:172–5.
[55] Dolatabadian A, Modarres Sanavy SAM. Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. Not Bot Hort Agrobot Cluj 2008;36: 61–6.
[56] Farooq M, Irfan M, Aziz T, Ahmad I, Cheema SA. Seed priming with ascorbic acid improves drought resistance of wheat. J Agron Crop Sci 2013;199:12–22.
[57] Xu Q, Belcastro MP, Dolan SV, Dinkins RD, Dirk LMA, Clarke SG, et al. A second protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are targeted to the nucleus. Plant Physiol 2004;136:2652–64.
[58] Yadav SK, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. FEBS Lett 2005;579: 6265–71.
[59] Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, et al. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:358–63.
[60] Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. Proteomics of Medicago truncatula seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. Plant Physiol 2003;133: 664–82.
[61] Rocha PSCF, Sheikh M, Melchiorre R, Fagard M, Boutet S, Loach R, et al. The Arabidopsis homology-dependent gene silencing gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. Plant Cell 2005;17:404–17.
[62] Bykova NV, Hoehn B, Rampitsch C, Banks T, Stebbing JA, Fan T, et al. Redox-sensitive proteome and antioxidant strategies in wheat seed dormancy control. Proteomics 2011;11:865–82.
[63] Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, et al. Importance of methionine biosynthesis for Arabidopsis seed germination and seedling growth. Physiol Plant 2002;16:238–47.
[64] Hugouvieux V, Dutilleul C, Jourdain A, Reynaud F, Lopez V, Bourguignon J. Arabidopsis putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. J Plant Physiol 2009;151:768–81.
[65] Uthus EO, Yokoi K, Davis CD. Selenium deficiency in fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. J Nutr 2002;132:1122–8.
[66] Chen CC, Sung JM. Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. Physiol Plant 2001;111:9–16.
[67] Kong L, Wang M, Bi D. Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. Plant Growth Regul 2005;45:155–63.
[68] Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA. Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. Biol Trace Elem Res 2013;151:284–93.
[69] Yang SF, Hoffman NE. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 1984;35:155–89.

الفصل الخامس

تحليل مقارن للتغير في البروتيوم الأيضي لبذور القمح الصلب المحفزة بواسطة حمض الأسكوربيك و غير المحفزة خلال إنباتها تحت ظروف الإجهاد الملحي.

Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress

الملخص

تحفيز البذور بواسطة حمض الأسكوربيك يحسن التحمل الملحي لدى القمح الصلب. لفهم الآليات الكامنة وراء هذا التأثير تم إجراء دراسة مقارنة بالتحليل البروتيومي-الخالي من الجال لبروتينات الأيض المستخلصة من بذور القمح المحفزة بحمض الأسكوربيك و غير المحفزة خلال إنباتها تحت الظروف الملحية و المراقبة. نظرا لكون إنبات البذور هو نتيجة للتفاعل أو "الأخذ و الرد" بين الجنين والأنسجة المحيطة به، تم دراسة الاختلاف في البروتيوم الأيضي في كل نسيج على حدى. 167 بروتين من بين 697 و69 بروتين من بين 471 من البروتينات التي تم تحديدها أظهرت زيادة أو نقصان معنوي في وفرتها استجابة للتحفيز و/أو الملوحة مقارنة بالعينات الشاهدة في الجنين والأنسجة المحيطة به، على التوالي. ترافق إنبات بذور القمح غير المحفزة و المجهدة ملحيا بتغير كمي في 129 بروتين من بروتينات الجنين، معظمها منخرطة في الأيض و إنتاج الطاقة، الدفاع ضد الإجهادات الحيوية و غير الحيوية، توجيه البروتين و تخزينه. التحفيز بالأسكوربات (Ascorbate-priming) يمنع و يصد آثار الملوحة على معظم هذه البروتينات كما يغير بصورة معنوية من وفرة 35 بروتينا مختلفة، معظمها تشارك في عملية الأيض، توجيه البروتينات و تخزينها. كشف التحليل العنقودي الهرمي (hierarchical cluster analysis) ثلاثة مجموعات رئيسية من التعبير البروتيني في الجنين، و مجموعتان فقط في الأنسجة المحيطة بالجنين. تفتح هذه الدراسة آفاقا جديدة واعدة لفهم التسامح الملحي المحدث في النباتات عن طريق.

الأهمية البيولوجية لهذه الدراسة

لتعميق فهمنا للآليات التي يعزز بها التحفيز-بالأسكوربات (Ascorbate-priming) للتحمل الملحي في القمح الصلب خلال الإنبات، أجرينا لأول مرة تحليل بروتيومي-خال من الجال للمقارنة بين بذور قمح غير محفزة و أخرى محفزة بواسطة حمض الأسكوربيك، و ذلك خلال إنباتها في وسط ملحي أو خالي من الأملاح. و نظرا للدور المهم الذي يلعبه تبادل الإشارات بين الجنين و الأنسجة المحيطة به في مراقبة إنبات البذور، قمنا بتحليل التباين في بروتيوم الأيض في كل من الجنين و الأنسجة المحيطة به. تم تحديد 1168 بروتينا ذات أوزان جزيئية مختلفة (تراوحت بين 5-258 كيلو دالتون). من بينها، 167 و 69 بروتين في الجنين و الأنسجة المحيطة به على الترتيب قد أظهرت تغيرا معنويا (ANOVA, $P<0.05$) في وفرتها في العينات المجهدة مقارنة بالعينات الشاهدة. عكست المعاملة المسبقة للبذور بحمض الأسكوربيك تأثيرات الملوحة على معظم هذه البروتينات، وخاصة تلك المساعدة في الأيض العام و الطاقة و الدفاع ضد إجهادات الوسط، و توجيه البروتين وتخزينه. قد تفتح هذه النتائج آفاقا جديدة لفهم آليات تعزيز التحمل الملحي في نباتات المحاصيل بواسطة تقنية التحفيز.

1. المقدمة

تعتبر الملوحة من أبرز إجهادات الوسط اللاحيوية التي تؤثر سلبا على نمو النباتات وإنتاجية المحاصيل. إنبات البذور ونمو البادرات من أكثر مراحل التطور التي يعتقد أنها تؤثر على إنشاء النبات و المحصول النهائي. للأسف، في العديد من محاصيل الحبوب كما هو الحال في القمح، يشكل إنبات البذور و نمو البادرات المراحل الأكثر تحسسا للإجهاد الملحي (Ashraf & Foolad, 2005 ; Tan et al., 2013). عموما، يتحدد إنتاج القمح بوفرة موارد المياه و ملوحة التربة، مما يجعلهما أهم عاملان محددان لإنتاج المحاصيل عبر العالم، إذ يخفضان متوسط المردود لمعظم نباتات المحاصيل إلى أقل من 50 % (Bray et al., 2000). لذا، فهم الآليات الجزيئية لتحمل النباتات للإجهادات غير الحيوية أمر ضروري من أجل التحسين الوراثي لصفة التحمل للإجهاد لدى محصول القمح (Zhou et al., 2012 ; Deng et al., 2013). و المفتاح لتحقيق ذلك هو توضيح الآليات الجزيئية الكامنة وراء إنبات البذور و قوتها في هذا النوع، خاصة في ظل ظروف الإجهاد.

تأثير الملوحة و الإجهاد الاسموزي على إنبات بذور القمح موثق بشكل جيد (Almansouri et al., 2001 ; Dell'Aquila & Spada, 1992 ; Lei et al., 2005). حتى الآن، سعت العديد من الدراسات باستعمال مقاربات مختلفة (الترنسكريبتوم و البروتيوم) لتحديد كل من الجينات و البروتينات المحتمل ضلوعها في تحمل إجهادات الوسط في عدد من نباتات المحاصيل و النباتات النموذجية (Bousager et al., 2007 ; Gallardo et al., 2001 ; Gao et al., 2013 ; Mak et al., 2009 ; Naydenov et al., 2010 ; Wilson et al., 2005). و قد استخدمت أجنة الحبوب في عدة دراسات كأنموذج لدراسة تحمل الإجهاد (Irar et al., 2010). يكتسي محتوى البذور من البروتين قيمة عالية في تحديد نوعية الاستخدام النهائي لحبوب القمح (Gooding et al., 2003)، و أيضا في تحديد أداء الجنين/البادرات خلال الإنبات/البزوغ و يؤثر بذلك على الإنتاجية النهائية للمحاصيل. على عكس بروتينات التخزين، إذ تتحكم بروتينات الألبومين و الجلوبيلين في التمثيل الغذائي والعمليات الخلوية. و بالتالي، فهي من دون شك بالغة الأهمية عند دراسة الإنبات تحت ظروف الإجهاد الملحي (Witzel et al., 2010).

تحفيز البذور "seed priming" قبل البذر يحسن من أداء البذور ويخفف من الآثار السلبية للضغوط البيئية على إنبات البذور و إنشاء الشتلات (Ashraf & Foolad, 2005). في محاولة للكشف عن الآليات الجزيئية لتحفيز البذور في القمح، استخدمنا في دراستنا السابقة (التجربة الأولى) التحليل البروتيومي الكمي غير المعتمد على الجال لتقصي التغييرات الطارئة على بروتيوم الأيض في بذور قمح محفزة قبل زراعتها (Fercha et al., 2013). وقد تبين أن التحفيز بواسطة حمض الأسكوربيك رافقه تغييرات معنوية لـ 83 بروتين، معظمها تشارك في استقلاب البروتين، الدفاع المضاد للأكسدة، و عمليات الإصلاح و عمليات الأيض المرتبطة بالميثيونين (Met).

في طور السكون تكون البذور المحافظة (مثل بذور القمح)، شبه خالية من الأسكوربات (AsA) و إنزيم الأسكوربات بيروكسيداز (APX)، لكن تشرع في الظهور في غضون ساعات قليلة من بعد تشرب البذور للماء

(Bousager et al., 2007 ; De Tullio & Arrigoni, 2003). هذا التغير أمر حاسم لإنبات البذور و النمو المبكر للشتلات (De gara et al., 2000). و مع ذلك، تجدر الإشارة إلى أن الجرعات العالية من AsA تقمع إنبات البذور كما هو الحال مع بذور القمح (Ishibashi & Iwaya-Inoue, 2006) وبذور الأرز (Ye & Zhang, 2012 ; Ye et al., 2012). على الرغم من دوره المهم باعتباره بادرة للتخليق الحيوي للجبرلينات (GAs)، ثبت أن التعبير عن الجينات الخاصة بالتخليق الحيوي للجبريليناتِ تُقمع (تُثبط) نتيجة المستويات المنخفضة من AsA في بذور الأرز المعاملة بحمض الأبسيسيك (ABA) (Ye & Zhang, 2012 ; Ye et al., 2012).

وصفت قدرة البذور على الإنبات باعتبارها الموازنة بين إمكانات نمو الجنين في الظروف المحفزة على ذلك و القيود التي تفرضها الأنسجة المحيطة بالجنين (Wilson et al., 2005). أجريت التحاليل البروتيومية لكل من السويداء، الآلورون و الجنين على نطاق واسع في العديد من النباتات أحادية الفلقة (Bousager et al., 2007 ; Irar et al., 2010 ; Vensel et al. 2005). و على الرغم من ذلك، المعلومات المتاحة جد محدودة خصوصا فيما يتعلق ببروتينات/ جينات الاستجابة للإجهاد الملحي خلال إنبات بذور القمح أو الإنبات بعد التحفيز، لذا دراسة التغيرات الحاصلة في وفرة البروتين و مواطنها خلال الاستجابة للملوحة قد تساعدنا في تحديد الجينات المرتبطة بهذه الاستجابة و تتيح فهم شبكة آليات التكيف مع الإجهاد في هذه المادة الغذائية الأساسية (Tan et al., 2013 ; Yin et al., 2012). من هذا المنطلق، و لتوسيع فهمنا للآليات الأساسية لقوة البذور و تحفيزها، أجرينا تحليلا مقارنا بين بروتيوم الأيض لبذور غير محفزة و أخرى محفزة بواسطة AsA و ذلك خلال الإنبات في وجود أو غياب الإجهاد الملحي.

نتائج هذه الدراسة شكلت موضوع المقال التالي:

Fercha et al., (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. Journal of Proteomics, 108, 238-57. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.040

JOURNAL OF PROTEOMICS 108 (2014) 238–257

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress

Azzedine Fercha[b,c], Anna Laura Capriotti[a,*], Giuseppe Caruso[a], Chiara Cavaliere[a], Roberto Samperi[a], Serena Stampachiacchiere[a], Aldo Laganà[a]

[a]Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy
[b]Department of Biology, University of Abbès Laghrour Khenchela, 40000 Khenchela, Algeria
[c]Department of Biology, University of Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 March 2014
Accepted 26 April 2014
Available online 21 May 2014

Keywords: Durum wheat
Proteomics
Metabolic proteome
Ascorbate-priming
Salinity

ABSTRACT

Seed priming with ascorbic acid improves salt tolerance in durum wheat. For understanding the potential mechanisms underlying this priming effect a gel-free shotgun proteomic analysis was performed comparing unprimed to ascorbate-primed wheat seed during germination under saline and non-saline conditions. Since seed germination is the result of interplay or cross-talk between embryo and embryo-surrounding tissues, we studied the variation of metabolic proteome in both tissues separately. 167 of 697 identified and 69 of 471 identified proteins increase or decrease in abundance significantly in response to priming and/or salinity compared to untreated, unstressed control in embryo and embryo-surrounding tissues, respectively. In untreated wheat embryo salt stress was accompanied by change in 129 proteins, most of which are belonging to metabolism, energy, disease/defense, protein destination and storage categories. Ascorbate pretreatment prevents and counteracts the effects of salinity upon most of these proteins and changes specifically the abundance of 35 others proteins, most of which are involved in metabolism, protein destination and storage categories. Hierarchical clustering analysis revealed three and two major clusters of protein expression in embryo and embryo-surrounding tissues, respectively. This study opens promising new avenues to understand priming-induced salt tolerance in plants.

Biological significance

To clearly understand how ascorbate-priming enhance the salt tolerance of durum wheat during germination, we performed for the first time a comparative shotgun proteomic analysis between unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions. Furthermore, since seed germination is the result of

Abbreviations: UP-H_2O, UnPrimed control; UP-NaCl, UnPrimed salt stressed; AP-H_2O, Ascorbate-Primed non stressed; AP-NaCl, Ascorbate-Primed salt stressed.

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, PoBox n° 34 – Roma 62, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy.Tel.: +39 06 49913062; fax: +39 06 490631.
E-mail address: annalaura.capriotti@uniroma1.it (A.L. Capriotti).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.040
1874-3919/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

interplay or cross-talk between embryo and embryo-surrounding tissues we analyzed the variation of metabolic proteome in both tissues separately. 1168 proteins exhibiting greater molecular weight diversity (ranging from 5 to 258 kDa) were identified. Among them, 167 and 69 proteins were increased or decreased in abundance significantly by priming and/or salinity as compared to control, in embryo and embryo-surrounding tissues respectively. Ascorbate pretreatment alleviates the effects of salinity upon most of these proteins, particularly those involved in metabolism, energy, disease/defense, protein destination and storage functions. Hierarchical clustering analysis revealed three and two major clusters of protein accumulation in embryo and embryo-surrounding tissues, respectively. These results may provide new avenues for understanding and advancing priming-induced salt tolerance in crop plants.
© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salinity is a major abiotic stress that adversely influences plant growth and crop productivity. Seed germination and early seedling growth are the stages that most likely affect plant establishment and subsequent crop yield. Unfortunately, in many cereal crops such as wheat, seed germination and early seedling growth are the stages most sensitive to salt stress [1,2]. Wheat production is obviously limited by the availability of water resources and soil salinity, which are the primary cause of crop loss worldwide, reducing the average yields for most crop plants by more than 50% [3]. Therefore, understanding the molecular basis of abiotic stress responses is necessary for genetic improvement of stress tolerance in wheat crop [4,5]. A key to achieving this is the elucidation of the molecular mechanisms underlying seed germination and vigor in this species, especially under stress conditions.

It is well-documented that the wheat germination process is highly disturbed by salt and osmotic stress [6–8]. To date, several transcriptomic and proteomic studies have sought to identify both candidate gene and gene products in a range of crop and model plants under normal and stress conditions [9–14]. Cereal embryos have been largely used as a model system to study stress tolerance [15]. Seed protein content is of high value for defining the end-use quality of wheat grain [16], and it also determine the plant's performance during germination and affect the final crop productivity. Unlike storage proteins, albumins and globulins are proteins that control metabolic and cellular processes; therefore, they are of high interest when investigating germination under salinity stress [17].

Seed priming is a pre-sowing treatment that improves seed performance and alleviates the negative effects of environmental stresses on seed germination and seedling establishment [1]. To gain insights into the gap of knowledge on the molecular features of seed invigoration in wheat, we have previously used gel-free proteomic approach to investigate the metabolic proteome changes in quiescent dry seeds triggered by seed-priming treatments [18]. It has been reported that ascorbate-priming was accompanied by significant changes of 83 proteins, most of which are involved in protein metabolism, antioxidant protection, repair processes and in methionine-related metabolism.

In orthodox seeds (such as wheat seeds), neither ascorbate (AsA) nor ascorbate peroxidase (APX) activity exist at the quiescent stage, however, they appear within a few hours after the imbibition [9,19]. The rapid recovery of both AsA biosynthesis and APX activity is crucial for seed germination and early development of seedlings [20]. It is worth noting that the high dose of AsA suppress germination as reported for wheat [21] and rice seeds [22,23]. Despite its role as a substrate in gibberellins (GAs) biosynthesis, it has been reported that expression of GAs biosynthesis genes was suppressed by the low levels of AsA in abscisic acid (ABA)-treated rice seeds [22,23].

The ability of a seed to germinate has been described as a balance between the growth potential of the embryo under promoting conditions and the restrictions imposed by the embryo-surrounding tissues [14]. To date, the proteome analyses of endosperm, aleurone and embryo has been extensively studied in many monocot plants [9,15,24]. Nevertheless, limited information is available about salt-responsive proteins/genes in wheat seed during germination or post-priming germination, and the study of protein abundance and localization changes in response to salinity may therefore help identify the associated genes and provide a detailed network of the stress adaptation mechanisms in this important staple food crop [2,25]. Thus, to extend our understanding of the underlying mechanisms of seed vigor and seed invigoration, we carried out a comparative analysis between the metabolic proteome of unprimed and AsA-primed seeds during germination under control and salt stress conditions.

2. Materials and methods

2.1. Seed treatment and germination

Seed priming with AsA solution (0.5 mmol L^{-1}) was performed essentially as previously described [18]. Thirty dried seeds of durum wheat (*Triticum durum* Desf. var. Waha), high yielding genotype moderately resistant to salinity at growth stage and widely cultivated in Algeria, both treated and untreated, were placed in each Petri-dish containing two layers of Whatman No. 1 filter paper initially moistened with 10 mL of saline solution (NaCl 250 mmol L^{-1}) or distilled water (control). Seeds were germinated in darkness in a temperature-controlled chamber held at 24 ± 0.5 °C until germination *sensu stricto* (about 42 hours).

2.2. Extraction and quantification of metabolic seed proteins

After 42 hours from the incubation, the embryo (embryonic axis and scutellum) was separated from the embryo-surrounding

tissues (embryo-ST, endosperm, aleurone layers and pericarp) and both of them were analyzed independently. Metabolic seed proteins were extracted using the method developed by Hurkman et al. [26] with some modifications. Briefly, the embryo and the embryo-ST from the wheat seeds were separately frozen in liquid N_2 and ground to a fine powder using a ceramic mortar and pestle. Seventy-five mg of the resulting powder was used to extract proteins as previously performed [18]. Metabolic proteins were quantified by Bradford assay using BSA standard [27]. Three experimental replicates were performed for each seed type.

2.3. In solution trypsin digestion and off-line desalting

For each sample, protein aliquots, were reduced, alkylated, and digested with trypsin. Reduction of disulphide bonds was performed with DTT (200 mmol L^{-1}) in incubation at 37 °C for 1 h, under slight agitation. Carbamidomethylation of thiol groups was performed by addition of IAA (200 mmol L^{-1}) and incubation for 1 h in the dark at RT. To consume any leftover alkylating agent and to avoid trypsin alkylation, DTT (200 mmol L^{-1}) was added and samples were incubated at 37 °C for 1 h, under slight agitation. The samples were then diluted with ammonium bicarbonate (50 mmol L^{-1}) to obtain a 1 mol L^{-1} final urea concentration. Sequencing grade-modified tryspin was added (1:20, w/w, enzyme to protein ratio) and the samples were incubated overnight at 37 °C. Enzymatic digestion was quenched with TFA. Digested samples were desalted using SPE C18 cartridges conditioned with ACN and rinsed with 0.1% TFA. Peptides were eluted from the SPE column with 500 μL ACN/ddH_2O (50/50, v/v) containing 0.05% TFA and were dried in a Speed-Vac SC 250 Express (Thermo S 164 avant, Holbrook, NY, USA). Each sample was re-constituted with 250 μL of 0.1% HCOOH aqueous solution and stored at -80 °C until LC-MS/MS analysis.

2.4. NanoHPLC-MS analysis

LC-MS/MS analysis was performed on Orbitrap Elite hybrid ion trap-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptide mixtures were separated by RP chromatography using the Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corporation Sunnyvale, CA, USA). The LC system was connected to an in-house manufactured 25 cm fused-silica nano-column, 75 μm i.d., packed with Acclaim-C18 2.2 μm silica microparticles, with outlet frit prepared using Kasil. Peptide mixtures were enriched on a 300 μm i.d. × 5 mm Acclaim PepMap 100 C18 (5 μm particle size, 100 Å pore size) μ-precolumn (Dionex), employing a premixed mobile phase ddH_2O/ACN 98/2 (v/v) (from loading pump) containing 0.1% (v/v) HCOOH at a flow-rate of 10 μL min^{-1}. LC gradient was optimized to detect the largest set of peptides, using ddH_2O/HCOOH (99.9/0.1, v/v) as phase A and ACN/HCOOH (99.9/0.1, v/v) as phase B. After an isocratic step at 5% B for 5 min, B was linearly increased to 15% within 2 min and then to 35% within 120 min; afterwards, phase B was maintained at 35% within 10 min, and increased to 80% within the following 10 min. Then, phase B was maintained at 80% for 10 min to rinse the column. Finally, B was lowered to 5% over 1 min and the column re-equilibrated for 19 min (177 min total run time). MS spectra were collected over an m/z range of 380–2000 Da using a resolution setting of 60000 (FWHM, m/z 400), operating in the data dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and LTQ-MS/MS acquisition. MS/MS spectra were collected for the twenty most abundant ions in each MS scan. Rejection of +1, and unassigned charge states was enabled. All MS/MS spectra were collected using a normalized collision energy of 30%, and an isolation window of 2 m/z. Ion trap and Orbitrap maximum ion injection times were set to 100 and 200 ms, respectively. Automatic gain control (AGC) was used to prevent overfilling of the ion traps and was set to 1×10^6 for full FTMS scan, and 1×10^4 ions in MS^n mode for the linear ion trap. To minimize redundant spectral acquisitions, dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and a repeat duration of 30 s with exclusion duration of 70 s. In order to increase the number of identified proteins, we performed three technical replicates (LC-MS/MS runs) for each of the three experimental replicates.

2.5. Database searching and protein identification

Raw MS/MS data files from Xcalibur software (version 2.2 SP1.48, Thermo Fisher Scientific) were submitted to Proteome Discoverer software version 1.3 (Thermo Scientific) with the Mascot search engine for peptide/protein identification. The searches were performed against Swiss-Prot database (Release 2012_05, Number of sequences: 538585). Thermo Finnigan LCQ/DECA RAW file data import filter was used. The search was limited to proteins from species of the Viridiplantae (green plants) taxonomy entries and performed using the built-in decoy search option of Mascot. Enzymatic digestion with trypsin was selected, with maximum 2 missed cleavages, peptide charges +2 and +3, a precursor mass tolerance of 10 ppm and 0.8 Da fragment mass tolerance; acetylation (N-term), oxidation (M) and deamidation (N, Q) were used as dynamic modifications; carbamidomethylation (C) was used as static modification.

2.6. Scaffold analysis

Scaffold software (version Scaffold 3.1.2, Proteome Software Inc., Portland, OR.) [28] was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications, and for label-free relative quantitation based on normalized spectral counting. The additional X! Tandem search engine (The GPM, Cyclone version 2010.12.01.1) was also used, keeping the same parameters previously used for Mascot. According to the Peptide and Protein Prophet algorithms [29,30] implemented into Scaffold, the peptide and protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95% and 99% probability, respectively, and contained at least 2 unique identified peptides, resulting in a false discovery rate (FDR) for peptides and proteins of all samples ≤ 0.6% (including ≤ 5 decoys). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. ANOVA test was used to identify statistically significant differences between different treatments and control. Proteins, which had at least a two-fold difference for the mean ratio, as well as a P-value ≤ 0.05, a relative standard deviation (RSD) of experimental replicates ≤ 40%, and appear in more than one

experimental replicate, were considered present in the two samples in significant different quantities.

2.7. Functional classification

Gene Ontology (GO) data about the biological processes of identified proteins were obtained by means of Scaffold's built in option and according to Bevan et al. [31].

3. Results

3.1. Wheat embryo metabolic proteome

Of a total of 697 identified proteins, 167 were increased or decreased in abundance significantly in response to priming and/or salinity compared to untreated, unstressed control (see Fig. 1A). Among these proteins, 129 proteins (82 specifically affected) were found to be differentially accumulated in unprimed salt stressed wheat embryo (UP-NaCl vs. UP-H_2O), 45 among them were increased, and 84 were decreased in abundance (Fig. 1C and Table 1, Supplementary material Table S1). On the other hand, 51 proteins were differentially altered in AsA-primed non-stressed wheat embryo (AP-H_2O vs. UP-H_2O), among which 12 were increased and 39 were decreased in abundance (Fig. 1C and Table 1, Supplementary material Table S1). However, 77 proteins were found to be differentially changed in AsA-primed salt stressed wheat embryo (AP-NaCl vs. UP-H_2O), 34 of these were increased and 43 were decreased in abundance (Fig. 1C and Table 1, Supplementary material Table S1). Functional classification grouped the 167 identified proteins in 13 functional categories

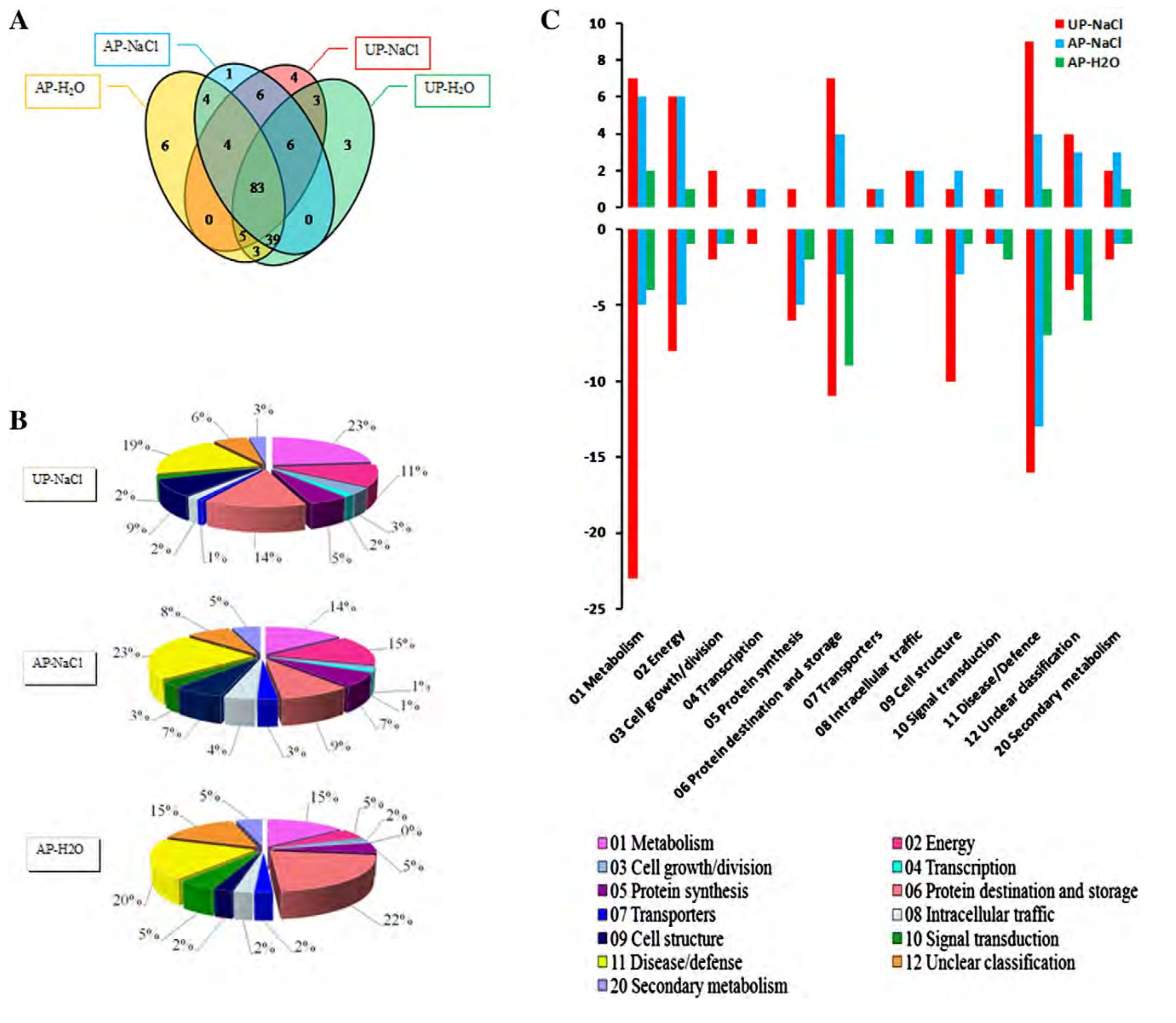


Fig. 1 – Metabolic proteome signature in Embryo of germinating primed and unprimed wheat seeds under salt stress as compared to control (UP-H_2O). A. Venn diagram based on the differentially accumulated proteins in primed and unprimed stressed seeds compared with controls; B. Functional classification of proteins according to Bevan et al. [31]; C. Functional distribution of proteins.

Table 1 – Embryo proteome of unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions.

No	Identified Proteins	Entry name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
1	Formate dehydrogenase, mitochondrial	FDH_SOLTU	42	<0.0001	20 Secondary metabolism	20 Secondary metabolism	I	N	N
2	Cationic peroxidase SPC4	PER1_SORBI	38	<0.0001	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	N	N	I
3	Actin-2	ACT2_ORYSI	42	<0.0001	09 Cell structure	09.04 Cytoskeleton	D	D	D
5	Pyruvate decarboxylase isozyme 2	PDC2_ORYSI	65	<0.0001	12 Unclear classification	12 Unclear classification	I	N	I
6	Avenin-like b1	AVLB1_WHEAT	33	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	N	D	D
7	Serine carboxypeptidase 2	CBP2_WHEAT	50	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	I	D	D
8	Peroxidase	PER1_WHEAT	32	<0.0001	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	D
9	Oxalate oxidase 2	OXO2_HORVU	23	<0.0001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	N	N
10	Basic endochitinase A	CHIA_SECCE	34	<0.0001	11 Disease/defense	11.02 Defense-related	I	N	N
11	Chaperone protein ClpB1	CLPB1_ORYSJ	101	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	I	N	I
12	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 21	RH21_ORYSJ	85	<0.0001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	I	D	N
15	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic	F16P2_ORYCO	38	<0.0001	02 Energy	02.02 Gluconeogenesis	I	N	I
17	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	XTH_WHEAT	33	<0.0001	09 Cell structure	09.01 Cell wall	D	I	I
20	S-adenosylmethionine synthase 3	METK3_HORVU	43	<0.0001	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
21	Cysteine proteinase EP-B 1	CYSP1_HORVU	40	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	N	D	D
22	Serine/threonine-protein phosphatase 5	PPP5_ARATH	60	<0.0001	10 Signal transduction	10.0407 Phosphatases	D	D	D
26	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic (Fragment)	RUBA_WHEAT	58	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.10 Complex assembly	D	N	N
27	Calreticulin	CALR_ORYSJ	48	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	N	N
28	Acetolactate synthase 1, chloroplastic	ILVB1_ORYSJ	69	<0.0001	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
29	Protein SGT1 homolog	SGT1_ORYSJ	41	<0.0001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	N	D
31	Alpha-amylase inhibitor 0.28	IAA2_WHEAT	17	<0.0001	12 Unclear classification	12 Unclear classification	N	D	N
32	Wheatwin-2	WHW2_WHEAT	16	<0.0001	11 Disease/defense	11.02 Defense-related	N	D	D
34	S-adenosylmethionine synthase 1	METK1_TRIMO	43	<0.0001	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
36	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A	GBLPA_ORYSJ	36	<0.0001	11 Disease/defense	11.02 Defense-related	D	N	N
37	Alcohol dehydrogenase 1	ADH1_PENAM	41	<0.0001	11 Disease/defense	11.03 Cell death	I	N	I
39	Dehydrin COR410	CO410_WHEAT	28	<0.0001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	N	D
40	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial	AL2B4_ARATH	59	<0.0001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	D	D
41	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	APX1_ORYSI	27	<0.0001	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	N
43	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX4_CITSI	19	<0.0001	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	N	I	N
45	Glutamate decarboxylase 2	DCE2_ARATH	56	<0.0001	01 Metabolism	01.01 Amino acid	I	N	N
46	T-complex protein 1 subunit alpha	TCPA_ARATH	59	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
47	Wheatwin-1	WHW1_WHEAT	16	<0.0001	11 Disease/defense	11.02 Defense-related	N	D	N
48	Fructan 6-exohydrolase	6FEH_WHEAT	66	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	I	N	N
49	Small ubiquitin-related modifier 1	SUMO1_ARATH	11	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.07 Modification	D	N	N
51	Dynamin-related protein 1B	DRP1B_ARATH	68	<0.0001	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	N	I	I
53	Avenin-like a2	AVLA2_WHEAT	20	0.0001	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	N	D	N
54	Mitogen-activated protein kinase 3	MPK3_ORYSJ	42	0.00011	10 Signal transduction	10.0404 Kinases	I	N	I
56	Oxalate oxidase GF-3.8	GER3_WHEAT	24	0.00012	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	D	N
60	Linoleate 9S-lipoxygenase 1	LOX1_HORVU	96	0.00013	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	I	N	N
61	Serine–tRNA ligase	SYS_ARATH	52	0.00013	05 Protein synthesis	05.10 tRNA synthases	N	D	N
62	Phenylalanine ammonia-lyase	PAL1_ORYSJ	75	0.00013	20 Secondary metabolism	20.1 Phenylpropanoids/ phenolics	D	N	N
63	Serpin-Z1A	SPZ1A_WHEAT	43	0.00013			I	N	N

Table 1 (continued)

No	Identified Proteins	Entry name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
					06 Protein destination/storage				
67	Tryptophan synthase beta chain 1 (Fragment)	TRPB1_MAIZE	43	0.00015	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
68	Probable lactoylglutathione lyase, chloroplast	LGUC_ARATH	39	0.0002	20 Secondary metabolism	20 Secondary metabolism	I	N	I
69	Alcohol dehydrogenase 1	ADH1_HORVU	41	0.00021	11 Disease/defense	11.03 Cell death	I	N	N
70	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	GLNA2_HORVU	47	0.00022	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	D
74	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]	UPTG_MAIZE	41	0.00029	09 Cell structure	09.01 Cell wall	D	N	D
78	Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	PPDK1_MAIZE	103	0.00035	02 Energy	02.30 Photosynthesis	D	N	D
79	Transketolase, chloroplastic	TKTC_SOLTU	80	0.00035	02 Energy	02.07 Pentose phosphate	I	N	N
80	Defensin-like protein 2	DEF2_WHEAT	5	0.00035	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	I	D	I
82	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic	G6PI_MAIZE	62	0.00038	02 Energy	02.01 Glycolysis	I	N	N
83	Histone H2B.4	H2B4_MAIZE	15	0.00040	09 Cell structure	09.13 Chromosomes	D	N	D
84	V-type proton ATPase subunit C	VATC_HORVU	40	0.00040	07 Transporters	07.22 Transport ATPases	I	I	I
86	Trypsin/alpha-amylase inhibitor CMX1/CMX3	IACX1_WHEAT	14	0.00041	12 Unclear classification	12 Unclear classification	N	D	N
88	Monothiol glutaredoxin-S10	GRS10_ORYSJ	18	0.00041	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	D	N
89	Catalase isozyme 2	CATA2_HORVU	57	0.00042	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	N
91	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA_ORYSJ	29	0.00045	03 Cell growth/ division	03.16 DNA synth/ replication	D	N	N
92	L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic	APX2_ORYSJ	27	0.00046	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	D
94	DnaJ protein homolog	DNJH_CUCSA	46	0.00055	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
99	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	RU1C_ARATH	22	0.00066	12 Unclear classification	12 Unclear classification	D	D	D
101	Late embryogenesis abundant protein B19.3	LE193_HORVU	15	0.00067	03 Cell growth/ division	03.30 Seed maturation	N	D	D
102	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1, mitochondrial	DHSA1_ARATH	70	0.00067	02 Energy	02.20 E-transport	D	N	I
104	Chaperone protein ClpB2, chloroplastic	CLPB2_ORYSJ	109	0.00075	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
105	Flavone O-methyltransferase 1	FOMT1_WHEAT	39	0.00076	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	N
109	Fructan 1-exohydrolase w1	1FEH1_WHEAT	67	0.00089	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	D	N	D
111	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] 2	UPTG2_SOLTU	42	0.00097	09 Cell structure	09.01 Cell wall	D	N	N
113	Phenylalanine ammonia-lyase	PAL2_ORYSI	77	0.00098	20 Secondary metabolism	20.1 Phenylpropanoids/ phenolics	D	I	I
114	Sucrose synthase 2	SUS2_ORYSJ	92	0.001	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	D	D
115	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	NNRD_SORBI	41	0.001	12 Unclear classification	12 Unclear classification	I	N	N
118	Linoleate 9S-lipoxygenase 2	LOX2_ORYSJ	97	0.0012	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	D	N	N
121	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase 2, chloroplastic	STAD2_ORYSI	45	0.0012	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	N	I	N
122	Sulfite reductase [ferredoxin], chloroplastic	SIR_MAIZE	70	0.0014	12 Unclear classification	12 Unclear classificatio n	D	D	D
127	60S ribosomal protein L13a	RL13A_PICMA	24	0.0017	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	D	N	D
128	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate–homocysteine methyltransferase	METE_CATRO	85	0.0017	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
129	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1/2	IF5A1_SOLTU	17	0.0018	05 Protein synthesis	05.04 Translation factors	D	N	N
132	Serpin-Z2A	SPZ2A_WHEAT	43	0.0019	06 Protein destination/storage		I	D	N
133	Coatomer subunit beta′-1	COB21_ORYSJ	103	0.002	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	N	N	D

(continued on next page)

Table 1 (continued)

No	Identified Proteins	Entry name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
134	Histone H3.2	H32_MEDSA	15	0.002	09 Cell structure	09.13 Chromosomes	D	N	N
135	Regulator of nonsense transcripts 1 homolog	RENT1_ARATH	137	0.002	04 Transcription	04.22 mRNA processing	I	I	I
137	Methionine S-methyltransferase	MMT1_HORVU	120	0.0022	01 Metabolism	01.01 Amino acid	I	I	I
138	Serpin-Z1C	SPZ1C_WHEAT	43	0.0022	06 Protein destination/storage		I	D	D
140	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 7	UBC7_WHEAT	19	0.0022	06 Protein destination/storage	06.07 Modification	N	I	N
141	Putative diaminopimelate epimerase, chloroplastic	DAPF_ORYSI	38	0.0022	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
142	Uridine 5′-monophosphate synthase (Fragment)	UMPS_TOBAC	50	0.0022	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	I	D	N
144	Histone H2A.1	H2A1_WHEAT	16	0.0026	09 Cell structure	09.13 Chromosomes	D	N	N
145	Chaperone protein ClpB3, mitochondrial	CLPB3_ORYSJ	109	0.0026	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	D	N
148	DNA replication licensing factor MCM3 homolog 2	MCM32_MAIZE	85	0.0028	03 Cell growth/ division	03.16 DNA synth/ replication	D	N	N
152	Bowman-Birk type proteinase inhibitor II-4 (Fragment)	IBB2_WHEAT	6	0.0032	12 Unclear classification	12 Unclear classification	I	D	I
153	Chaperonin CPN60-1, mitochondrial	CH61_CUCMA	61	0.0033	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	N	N
154	Fumarate hydratase 1, mitochondrial	FUM1_ARATH	53	0.0033	02 Energy	02.10 TCA pathway	D	I	D
157	Probable eukaryotic translation initiation factor 5-1	IF5Y_ARATH	49	0.0034	05 Protein synthesis	05.04 Translation factors	D	D	D
158	Non-specific lipid-transfer protein (Fragment)	NLTP1_WHEAT	12	0.0034	07 Transporters	07.13 Lipids	N	D	D
160	Serine carboxypeptidase 3	CBP3_HORVU	56	0.0034	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	D	D	D
164	40S ribosomal protein S3a	RS3A_ORYSJ	30	0.0038	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	D	N	N
167	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic	GSA_HORVU	49	0.0041	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
168	Gamma-gliadin (Fragment)	GDB3_WHEAT	27	0.0041	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	N	D	N
169	12-oxophytodienoate reductase 1	OPR1_ORYSJ	42	0.0041	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	D	N	N
171	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	AL7A1_BRANA	53	0.0043	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	I	N	D
172	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	PMGI_MAIZE	61	0.0044	02 Energy	02.01 Glycolysis	D	N	N
175	S-adenosylmethionine synthase 4	METK4_HORVU	43	0.0051	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
181	Protochlorophyllide reductase A, chloroplastic	PORA_WHEAT	41	0.0054	20 Secondary metabolism	20 Secondary metabolism	N	I	N
184	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, chloroplastic	STAD_HELAN	45	0.0056	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	D	I	I
187	GTP-binding protein SAR1	SAR1_TOBAC	23	0.006	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	I	I	I
188	Nucleoside diphosphate kinase IV, chloroplastic/mitochondrial	NDK4_ARATH	26	0.0061	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	D	I	I
189	Probable acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 2	THIC2_ARATH	43	0.0061	12 Unclear classification	12 Unclear classification	I	D	N
191	Probable UDP-glucose 6-dehydrogenase 2	UGDH2_ARATH	53	0.0064	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	D	I	N
192	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial	NDUS1_ARATH	82	0.0064	02 Energy	02.20 E-transport	D	N	N
196	Aconitate hydratase 2, mitochondrial	ACO2M_ARATH	108	0.0072	02 Energy	02.10 TCA pathway	I	D	D
197	17.4 kDa class I heat shock protein	HSP17_ARATH	17	0.0075	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	I	N	N
198	Probable methionine--tRNA ligase	SYM_ORYSJ	89	0.0076	05 Protein synthesis	05.10 tRNA synthases	D	N	D
199	4-alpha-glucanotransferase DPE2	DPE2_ORYSJ	108	0.0082	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	N	I	N
202	Arginase	ARGI1_ARATH	37	0.0091	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	D	D
203	Endoplasmin homolog	ENPL_ARATH	94	0.0098	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	N	N
204	Glutathione S-transferase 1	GSTF1_WHEAT	26	0.010	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	I	N	I

Table 1 (continued)

No	Identified Proteins	Entry name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
205	Aspartate carbamoyltransferase 2, chloroplastic	PYRB2_PEA	44	0.011	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	N	D	N
206	40S ribosomal protein S30	RS30_ARATH	7	0.011	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	N	D	N
209	Actin-8	ACT8_ARATH	42	0.012	09 Cell structure	09.04 Cytoskeleton	D	N	N
214	ATP-citrate synthase alpha chain protein 3	ACLA3_ORYSJ	47	0.013	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	D	I	N
215	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	NDUV1_ARATH	53	0.013	02 Energy	02.20 E-transport	D	N	I
219	Agglutinin isolectin 3 (Fragment)	AGI3_WHEAT	19	0.013	12 Unclear classification	12 Unclear classification	N	D	I
221	Histone-binding protein MSI1 homolog	MSI1_ORYSJ	48	0.014	09 Cell structure	09.13 Chromosomes	D	N	N
224	U-box domain-containing protein 72	PUB72_ORYSJ	58	0.014	06 Protein destination/storage	06.07 Modification	D	I	I
227	Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	PEAM1_ARATH	56	0.014	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	D	N	N
228	17.0 kDa class II heat shock protein	HSP23_MAIZE	17	0.015	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
230	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PIMT_WHEAT	25	0.015	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	I	N	I
232	Em protein CS41	EM2_WHEAT	10	0.016	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	I	D	D
233	Phospholipase D alpha 1	PLDA1_MAIZE	92	0.016	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	I	I	I
234	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1	THIC1_ARATH	41	0.017	20 Secondary metabolism	20.2 Terpenoids	N	D	D
235	Phosphomannomutase	PMM_WHEAT	28	0.018	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	D	N	D
238	Heat shock protein 82	HSP82_MAIZE	82	0.018	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	D	N
240	Histone H1	H1_WHEAT	24	0.018	09 Cell structure	09.13 Chromosomes	D	N	N
241	60S ribosomal protein L34-2	RL342_ARATH	14	0.018	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	I	I	D
243	Lactoylglutathione lyase	LGUL_SOLLC	21	0.019	20 Secondary metabolism	20 Secondary metabolism	N	I	I
244	Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic	GLTB_ORYSJ	175	0.020	01 Metabolism	01.01 Amino acid	N	I	I
245	Probable L-ascorbate peroxidase 6, chloroplastic	APX6_ORYSJ	34	0.020	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	D	D
246	Splicing factor U2af large subunit B	U2A2B_WHEAT	61	0.021	04 Transcription	04.22 mRNA processing	D	I	N
248	Elongation factor Tu, chloroplastic	EFTU_PEA	53	0.022	05 Protein synthesis	05.04 Translation factors	D	N	D
250	GTP-binding protein yptV4	YPTV4_VOLCA	24	0.023	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	N	D	N
251	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2	PGMC2_ARATH	63	0.023	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	I	N	N
252	Glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic	G6PIP_ARATH	67	0.023	02 Energy	02.02 Gluconeogenesis	N	I	N
253	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	HSP7M_PHAVU	73	0.024	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
254	Lon protease homolog, mitochondrial	LONM_MAIZE	106	0.024	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	D	D	N
257	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_MAIZE	36	0.024	02 Energy	02.10 TCA pathway	N	I	I
258	GDP-mannose 3,5-epimerase 2	GME2_ORYSJ	42	0.025	01 Metabolism	01.07 Cofactors	D	N	D
260	Anthranilate synthase component I-1, chloroplastic	TRPE_ARATH	66	0.026	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
262	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	PCKA_CUCSA	74	0.027	02 Energy	02.02 Gluconeogenesis	I	I	I
263	Pyrophosphate–fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	PFPA_SOLTU	67	0.027	02 Energy	02.01 Glycolysis	D	D	D
265	Thioredoxin reductase NTRA	NTRA_ORYSJ	38	0.028	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	D	N	N
271	Actin-related protein 4	ARP4_ORYSI	48	0.032	09 Cell structure	09.04 Cytoskeleton	I	N	I
272	6-phosphofructokinase 4, chloroplastic	K6PF4_ARATH	58	0.032	02 Energy	02.01 Glycolysis	I	N	D
275	Adenine phosphoribosyltransferase 1	APT1_WHEAT	20	0.033	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	D	N	D
278	Dihydrolipoyl dehydrogenase 1, mitochondrial	DLDH1_ARATH	54	0.036	11 Disease/defense	11.05 Stress responses	N	N	D

(continued on next page)

Table 1 (continued)

No	Identified Proteins	Entry name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
279	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	ODPB_PEA	39	0.037	02 Energy	02.01 Glycolysis	D	I	I
280	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	ASNS_ASPOF	66	0.038	01 Metabolism	01.01 Amino acid	N	I	N
281	Coatomer subunit gamma-1	COPG1_ORYSJ	99	0.038	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	I	N	I
283	Methylenetetrahydrofolate reductase 1	MTHR1_MAIZE	66	0.039	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	I	N
284	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3_TOBAC	56	0.040	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	I	I	I
285	COP9 signalosome complex subunit 4	CSN4_ARATH	45	0.040	10 Signal transduction	10.04 Mediators	I	N	N
286	Late embryogenesis abundant protein 1	LEA1_ORYSI	36	0.040	03 Cell growth/ division	03.30 Seed maturation	I	N	N
288	Villin-like protein ABP41 (Fragments)	ABP41_LILDA	16	0.042	12 Unclear classification	12 Unclear classification	D	N	D
292	1-Cys peroxiredoxin	REHY_MEDTR	24	0.045	11 Disease/defense	11.06 Detoxification	I	N	N
293	Probable protein phosphatase 2C 69	P2C69_ARATH	38	0.047	10 Signal transduction	10.047 Phosphatases	N	D	N
295	Protein disulfide-isomerase like 2-1	PDI21_ARATH	39	0.048	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	N	D	N
296	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloroplastic	LEU3_SOLTU	40	0.048	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	D	N
297	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2, chloroplastic	AROG_ORYSJ	59	0.049	01 Metabolism	01.01 Amino acid	D	N	N
298	Dynamin-related protein 1E	DRP1E_ARATH	70	0.049	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	N	I	I

Embryo proteins found to be differentially expressed in unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions, as described in Materials and methods section and identified by MS, with relative expression ratios. Ratio salinity/control (R1), ratio ascorbate-priming/control (R2), ratio salinity × ascorbate-priming/control (R3) are reported, where the proteins that were decreased in abundance are indicated with D, not changed proteins with N, and the proteins that were increased in abundance with I.

(Fig. 1B). The most over-represented ones are those of metabolism (14–23%), energy (5–15%), protein destination and storage (9–22%) and disease/defense (19–23%). Comparative functional distribution however revealed 5 classes that represented the most variation observed between the three treatments versus the control (Fig. 1B).

3.2. Wheat embryo-ST metabolic proteome

As expected (since endosperm is a dead tissue), of a total of 471 identified proteins only 69 proteins were significantly accumulated (Fig. 2A,Table 2, Supplementary material Table S2). Of these proteins, 53 (17 specifically affected) were found to be differentially altered in unprimed salt stressed wheat embryo-ST (UP-NaCl vs. UP-H_2O), 26 of these were increased and 27 were decreased in abundance (Fig. 2C and Table 2, Supplementary material Table S2). On the other hand, 49 proteins (13 specifically affected) were differentially accumulated in AsA-primed non stressed wheat embryo-ST (AP-H_2O vs. UP-H_2O), among which 26 were increased and 23 were decreased in abundance (Fig. 2C and Table 2, Supplementary material Table S2). However, 48 proteins were found to be differentially changed in AsA-primed salt stressed wheat embryo-ST (AP-NaCl vs. UP-H_2O), 23 of these were increased and 25 were decreased in abundance (Fig. 2C and Table 2, Supplementary material Table S2). Functional classification grouped the 69 identified proteins into 11 functional categories (Fig. 2B). The most over-represented categories are those of metabolism (15–21%), energy (9–12%), protein synthesis (15–21%), protein destination and storage (16–24%) and disease/defense (13–15%). Comparative functional distribution however revealed 2 classes that represented the most variation observed between the three treatments versus the control (Fig. 2B).

3.3. Hierarchical clustering of AsA- and salt stress-responsive proteins

In order to identify proteins with similar accumulation patterns, a two-way hierarchical clustering methodology known as Ward's method [32] was applied using PermutMatrix software (http://www.atgc-montpellier.fr/permutmatrix/; [33, 34]). In embryo, at least, three major clusters of protein accumulation were found, with the first containing proteins that were less abundant in embryo of salt stressed wheat seeds with or without AsA pretreatment (60 proteins), the second consisting of proteins that were more abundant in embryo of UP-NaCl wheat seeds but less abundant in embryo of AP-H_2O and AP-NaCl wheat seeds (50 proteins), and finely the third cluster include proteins that were less abundant in embryo of UP-NaCl seeds but more abundant in AsA pretreated seeds (57 proteins), compared to control group (Fig. 4). On the other hand, the protein accumulation patterns of UP-H_2O, AP-H_2O and AP-NaCl treatments were clustered together reflecting the close similarity between these treatments; however, the protein accumulation pattern of UP-NaCl treatment was put in a separate cluster. This result was confirmed by principal

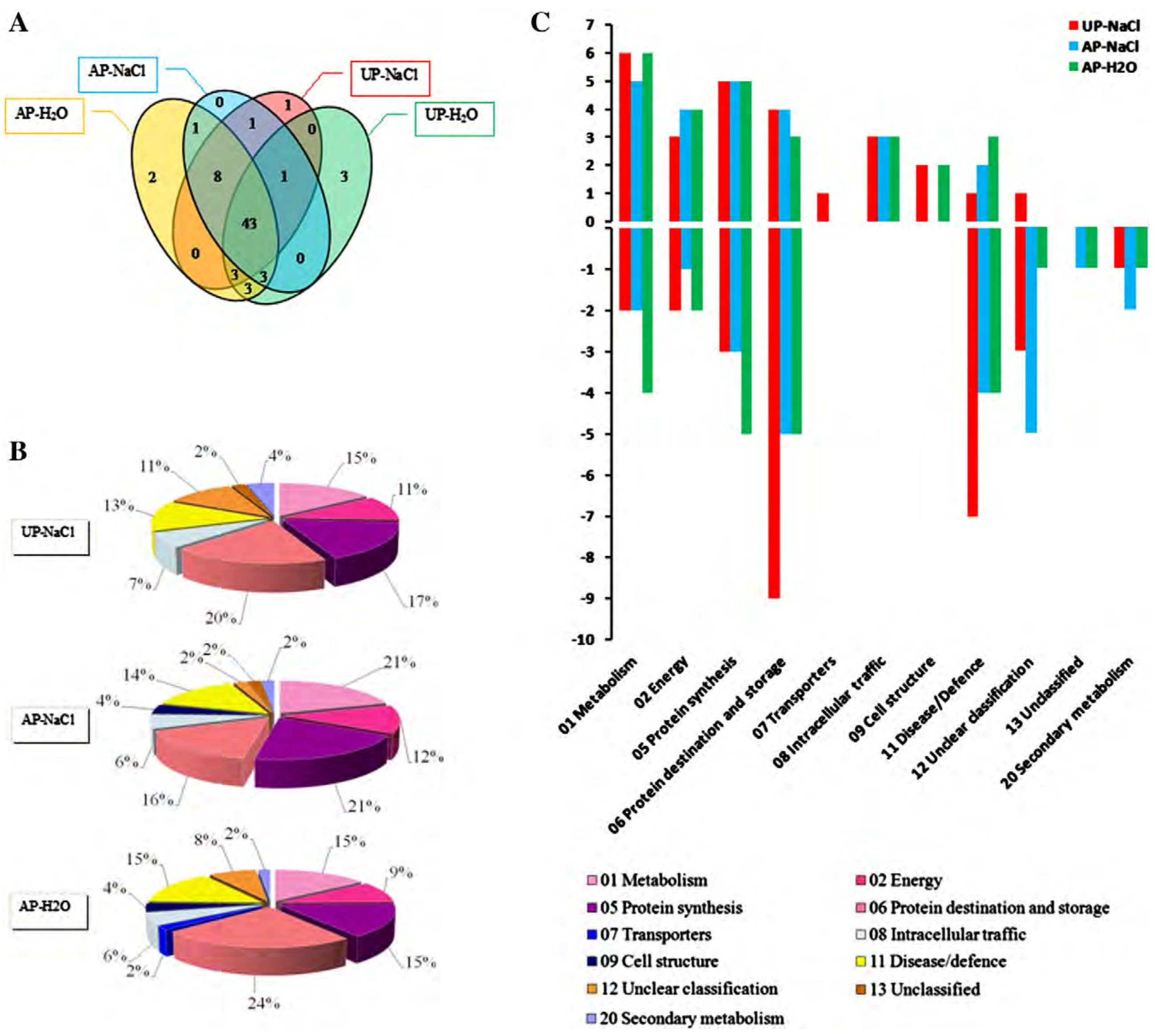


Fig. 2 – Metabolic proteome signature in embryo-ST of germinating primed and unprimed wheat seeds under salt stress as compared to control (UP-H_2O). A. Venn diagram based on the differentially accumulated proteins in primed and unprimed stressed seeds compared with controls; B. Functional classification of proteins according to Bevan et al. [31]; C. Functional distribution of proteins.

component analysis Supplementary Fig. S1), where the main factor contributing to PC1 was UP-NaCl treatment.

In embryo-ST, however, hierarchical clustering of protein accumulation profiles resulted in two major clusters, with the first consisting of proteins less abundant compared to control and the second of proteins whose abundance increased in embryo-ST of the both AsA-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress conditions as compared to untreated, unstressed control (Fig. 5).

4. Discussion

High salinity is a major abiotic stress in agriculture worldwide. Seed germination is a pivotal developmental process in the plant life cycle and the most critical under salt stress conditions [1]. Salinity may affect seed germination osmotically, by decreasing the uptake of water by seeds, and ionically, by facilitating the accumulation of ions that are toxic to embryonic activity [35]. Presumably the effect of osmotic stress on imbibition, due to salinity, is the main cause for delaying germination. Similarly, salinity also increased the ABA level and decreased the level of gibberellins in germinating seeds [36]. Recently, it has been demonstrated that AsA plays a role in germination particularly under stress conditions by mediating the antagonism between ABA and gibberellins [22,23]. Consistent with this, our results revealed that AsA may play an important role in increasing the salt tolerance or mitigating the adverse effect of salinity (Fig. 3)

Table 2 – Embryo-surrounding tissues proteome of unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions.

No	Identified Proteins	Entry Name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
1	Fructan 1-exohydrolase w1	1FEH1_WHEAT	67	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	N	I	N
2	V-type proton ATPase catalytic subunit A Fragment	VATA_MAIZE	62	<0.0001	07 Transporters	07.22 Transport ATPases	I	N	N
3	Alpha-amylase type B isozyme	AMY2_HORVU	47	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	D	N	N
4	Calmodulin	CALM_WHEAT	17	<0.0001	12 Unclear classification		D	D	D
5	HMG1/2-like protein	HMGL_WHEAT	17	<0.0001	12 Unclear classification		N	N	D
6	Defensin Tk-AMP-D4	DEF4_TRIKH	5	<0.0001	11 Disease/ Defense	11.02 Defense-related	N	D	N
7	Alpha-amylase type B isozyme	AMY6_HORVU	48	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	N	I	N
8	Beta-amylase	AMYB_WHEAT	57	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	N	N	I
9	Alpha-glucan phosphorylase, H isozyme	PHSH_WHEAT	94	<0.0001	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	I	I	I
12	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	GLGS_HORVU	56	<0.0001	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	I	N	N
17	60S ribosomal protein L38	RL38_ARATH	8	0.00015	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	I	D	I
20	Wheatwin-2	WHW2_WHEAT	16	0.00023	11 Disease/Defense	11.02 Defense-related	D	N	N
22	Clathrin heavy chain 1	CLH1_ORYSJ	193	0.00033	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	I	I	I
24	Rubber elongation factor protein	REF_HEVBR	15	0.00037	13 Unclassified		N	D	D
27	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein	MFP_ORYSJ	78	0.00041	01 Metabolism	01.06 Lipid and sterol	I	I	I
29	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	PCKA_CUCSA	74	0.00045	02 Energy	02.02 Gluconeogenesis	I	I	I
30	Elongation factor 1-alpha	EF1A2_HORVU	49	0.00048	05 Protein synthesis	05.04 Translation factors	I	I	I
34	26S protease regulatory subunit 6B homolog	PRS6B_HELAN	47	0.00067	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	N	I	I
36	60S ribosomal protein L23a	RL23A_DAUCA	18	0.00082	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	D	D	D
38	60S acidic ribosomal protein P0	RLA0_ORYSJ	34	0.00095	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	I	I	I
42	Fructokinase-2	SCRK2_ORYSI	36	0.0010	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	D	D	D
43	Tubulin beta-2 chain	TBB2_ELEIN	50	0.0011	09 Cell structure	09.04 Cytoskeleton	I	I	N
44	60S ribosomal protein L12-1	RL121_ARATH	18	0.0012	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	D	D	D
45	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52C	RH52C_ORYSJ	66	0.0012	12 Unclear classification		I	N	D
47	Serine carboxypeptidase 3	CBP3_WHEAT	55	0.0013	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	D	N	N
54	Sulfite oxidase	SUOX_ARATH	43	0.0022	11 Disease/Defense	11.06 Detoxification	D	D	D
55	Tubulin alpha-2 chain	TBA2_HORVU	50	0.0023	09 Cell structure	09.04 Cytoskeleton	I	I	N
56	40S ribosomal protein S13	RS13_MAIZE	17	0.0024	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	N	D	N
58	Uridine 5′-monophosphate synthase Fragment	UMPS_TOBAC	50	0.0034	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	I	I	I
60	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	CYPH_MAIZE	18	0.0036	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	N	D
63	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	UBE11_WHEAT	117	0.0037	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	I	I	I
64	3-isopropylmalate dehydrogenase 2, chloroplastic	LEU32_ARATH	43	0.0037	01 Metabolism	01.01 Amino acid	N	D	N
65	Cysteine proteinase EP-B 1	CYSP1_HORVU	40	0.0037	06 Protein destination/storage	06.13 Proteolysis	D	N	N
68	Sucrose synthase 1	SUS1_ORYSJ	93	0.0039	11 Disease/Defense	11.05 Stress response	I	I	I
69	Alpha-galactosidase	AGAL_ORYSJ	46	0.0040	01 Metabolism	01.05 Sugars/ Polysaccharides	I	I	I
75	Alpha/beta-gliadin clone PW1215	GDA6_WHEAT	34	0.0049	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	N	D	N
77	Formate dehydrogenase 1, mitochondrial	FDH1_ORYSJ	41	0.0059	12 Unclear classification		D	N	N

Table 2 (continued)

No	Identified Proteins	Entry Name	MW (kDa)	P-Value	Functional Category	Functional Description	R1	R2	R3
78	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A	GBLPA_ORYSJ	36	0.0061	11 Disease/Defense	11.02 Defense-related	N	I	I
80	Regulator of ribonuclease-like protein 1	RRAA1_ARATH	18	0.0062	12 Unclear classification		D	N	D
81	23.6 kDa heat shock protein, mitochondrial	HS23M_ORYSJ	24	0.0069	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	D	D
82	Malate synthase, glyoxysomal	MASY_MAIZE	62	0.0069	02 Energy	Glyoxylate pathway	N	I	I
83	16.9 kDa class I heat shock protein 2	HS16B_WHEAT	17	0.0074	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	I	N	I
86	Gamma-gliadin B	GDBB_WHEAT	33	0.0082	06 Protein destination/storage	06.20 Storage proteins	D	D	N
88	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	FKB70_WHEAT	62	0.0093	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	N	D
91	Triosephosphate isomerase, cytosolic	TPIS_MAIZE	27	0.011	02 Energy	02.01 Glycolysis	D	D	D
92	Adenosine kinase 2	ADK2_ARATH	38	0.012	01 Metabolism	01.03 Nucleotides	N	D	N
94	Lactoylglutathione lyase	LGUL_SOLLC	21	0.014	20 Secondary metabolism		N	D	D
95	40S ribosomal protein S15a-4	R15A4_ARATH	15	0.015	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	D	I	I
96	Superoxide dismutase [Mn] 3.1, mitochondrial	SODM1_MAIZE	26	0.015	11 Disease/Defense	11.06 Detoxification	D	N	N
98	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	CAPPC_FLATR	111	0.016	02 Energy	02.02 Gluconeogenesis	I	I	I
102	40S ribosomal protein Sa-1	RSSA1_ARATH	32	0.017	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	I	I	I
104	Chaperone protein ClpB2, chloroplastic	CLPB2_ORYSJ	109	0.018	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	D	D
105	Ferredoxin–NADP reductase, root isozyme 2, chloroplastic	FNRR2_ARATH	43	0.020	02 Energy	02.20 E-transport	D	D	D
108	Chaperone protein dnaJ 2	DNAJ2_ARATH	46	0.022	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	D	D
115	Importin subunit alpha-1a	IMA1A_ORYSJ	58	0.024	08 Intracellular traffic	08.01 Nuclear	I	I	I
116	Probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, chloroplastic	ARGC_ORYSJ	45	0.024	01 Metabolism	01.01 Amino acid	I	N	D
118	Putative heat shock protein 1 Fragment	HSP01_PSEMZ	2	0.025	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	D	I	D
119	Probable LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic	DAPAT_ORYSJ	50	0.026	01 Metabolism	01.01 Amino acid	I	D	N
120	40S ribosomal protein S27-1	RS271_ARATH	9	0.026	05 Protein synthesis	05.01 Ribosomal proteins	I	I	N
122	Defensin Tk-AMP-D1.1	DEF11_TRIKH	5	0.027	11 Disease/Defense	11.02 Defense-related	D	D	D
130	Cationic peroxidase SPC4	PER1_SORBI	38	0.032	11 Disease/Defense	11.06 Detoxification	N	N	D
132	60S ribosomal protein L24	RL24_HORVU	18	0.035	11 Disease/Defense	05.01 Ribosomal proteins	N	D	D
133	N-carbamoylputrescine amidase	AGUB_ORYSJ	33	0.035	20 Secondary metabolism	20.5 Amines	D	N	D
134	Calnexin homolog	CALX_HELTU	61	0.036	06 Protein destination/storage	06.01 Folding and stability	I	N	I
136	GTP-binding protein SAR1	SAR1_TOBAC	23	0.038	08 Intracellular traffic	08.07 Vesicular	I	I	I
137	Probable calcium-binding protein CML7	CML7_ORYSJ	17	0.039	12 Unclear classification		D	N	D
138	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	APX1_ORYSI	27	0.040	11 Disease/Defense	11.06 Detoxification	D	I	D
141	Isocitrate lyase	ACEA_GOSHI	65	0.045	02 Energy	Glyoxylate pathway	I	I	I
145	Peroxiredoxin-2C	PRX2C_ORYSJ	17	0.048	11 Disease/Defense	11.06 Detoxification	D	D	N

Embryo-surrounding tissues proteins found to be differentially expressed in unprimed and ascorbate-primed wheat seeds during germination under saline and non-saline conditions, as described in Materials and methods section and identified by MS, with relative expression ratios. Ratio salinity/control (R1), ratio ascorbate-priming/control (R2), ratio salinity × ascorbate-priming/control (R3) are reported, where the proteins that were decreased in abundance are indicated with D, not changed proteins with N, and the proteins that were increased in abundance with I.

Upon imbibition, embryonic cells switch from quiescence to highly active metabolism [10]. Consistent with this, comparatively to our previous study where we examined the effect of seed priming on the metabolic proteome of quiescent durum wheat seeds [18], in this study we have identified more than two-fold metabolic proteins (Table 1, Supplementary material Table S1).

4.1. Metabolic proteome of embryo as affected by salinity and AsA-priming

In this study, when compared between stressed and/or treated and control samples, the abundance of 167 proteins was significantly changed (Table 1, Supplementary material Table S1). Among these, proteins belonging to the "metabolism and energy", "protein destination/storage", "cell structure" and "disease/defense related-proteins" categories are highly represented (about 75%, Fig. 1B).

As shown by clustering analysis (Fig. 4), this discussion will focus mainly on proteins the abundance of which was differently affected by AsA-priming and salt stress (clusters II and III), in attempt to explain the improved tolerance exhibited by AsA-primed wheat seeds toward salinity. However, given the fact that the genotype selected for the present study is sensitive to NaCl at germination stage (Fig. 3), the proteins that were decreased in abundance by NaCl application will be more considered [37,38]. Therefore, the change in protein abundance will be discussed in the context of previously well-defined biochemical and metabolic aspects of salt tolerance.)

4.1.1. Metabolism

Forty five proteins belonging to "metabolism" category were differentially accumulated in response to salt stress and/or AsA-priming (Table 1; Supplementary material Table S1); of these, 32 were decreased and 13 were increased in abundance (Fig. 1). AsA-priming, however, significantly affects the abundance of 24 proteins in presence or absence of NaCl salinity. Proteins involved in amino acids metabolism are the most affected class with 18 proteins. Methionine metabolism plays a central role in seed germination (for review sees Rajjou et al., [39]). Methionine plays a multiple levels role in cellular metabolism not only as substrate for protein synthesis, or initiation of mRNA translation, but also as a regulatory molecule in the form of S-adenosylmethionine (SAM). Proteomic analysis of Arabidopsis thaliana germinating and developing seedlings has shown that methionine synthase and SAM synthetase accumulate differentially during seed germination [10], and the specific inhibitor of methionine biosynthesis, D, L-propargylglycine, strongly inhibits seed germination [40]. Previously it has been reported that overexpression of the genes involved in methionine biosynthesis or methionine supplementation enhances salt tolerance [41]. More recently, investigating how the methionine biosynthetic pathway is regulated under saline conditions at the transcriptional level in A. thaliana plants at germination and early growth stages, Ogawa and Mitsuya [42] have been found that the expression of homocysteine methyltransferase (HMT) and methionine methyltransferase (MMT) genes in S-methylmethionine (SMM) cycle had altered toward increasing Met production by the presence of NaCl. Consisting with these findings, our results revealed that at least six proteins involved in methionine metabolism (proteins no. 20, 34, 128, 137, 175, 283) were affected by salinity. Interestingly, methionine S-methyltransferase (protein no. 137) was increased but the SAM synthesis-related proteins (proteins no. 20, 34, 175) were decreased in abundance. SAM serves as a precursor for many metabolites including glycinebetaine, methylated polyols, polyamines and ethylene which

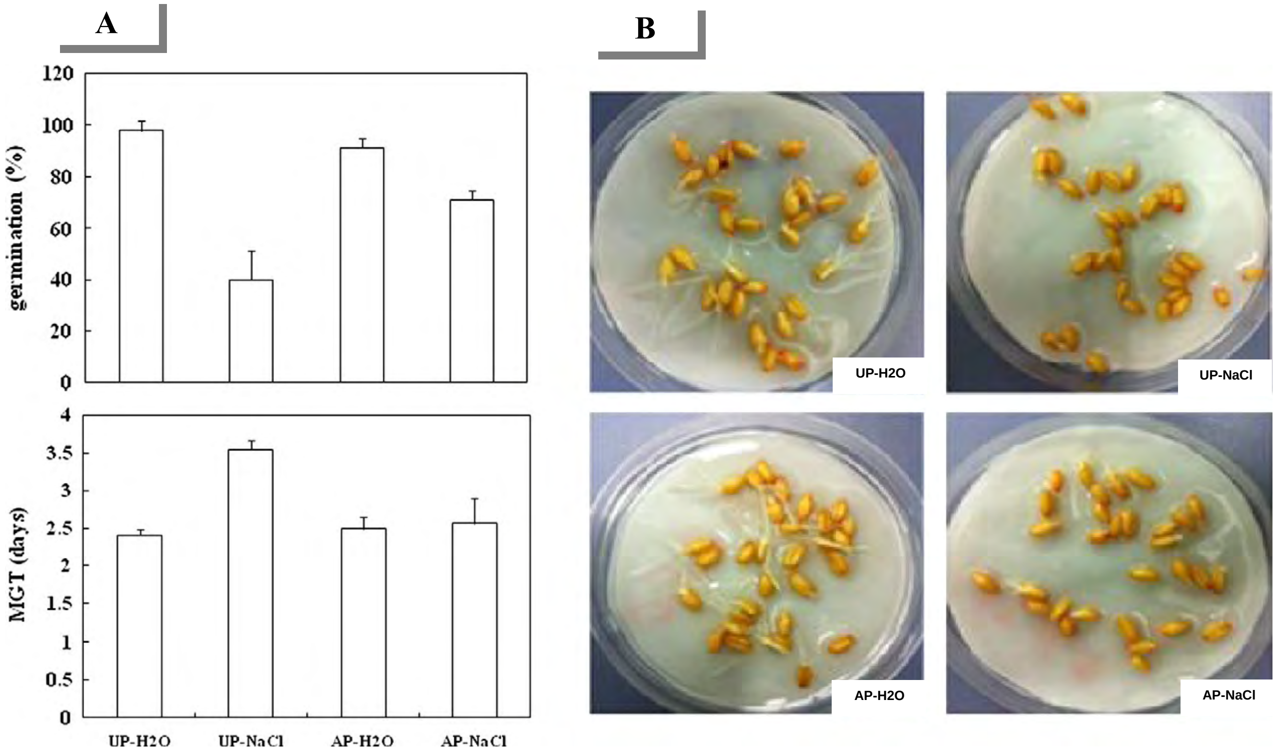


Fig. 3 – Effect of NaCl on wheat seed germination. A. final germination percentage (%) and mean germination time (day). B. Wheat seeds at 42 hours post imbibition. Results are presented as the average of three replicates ± SE.

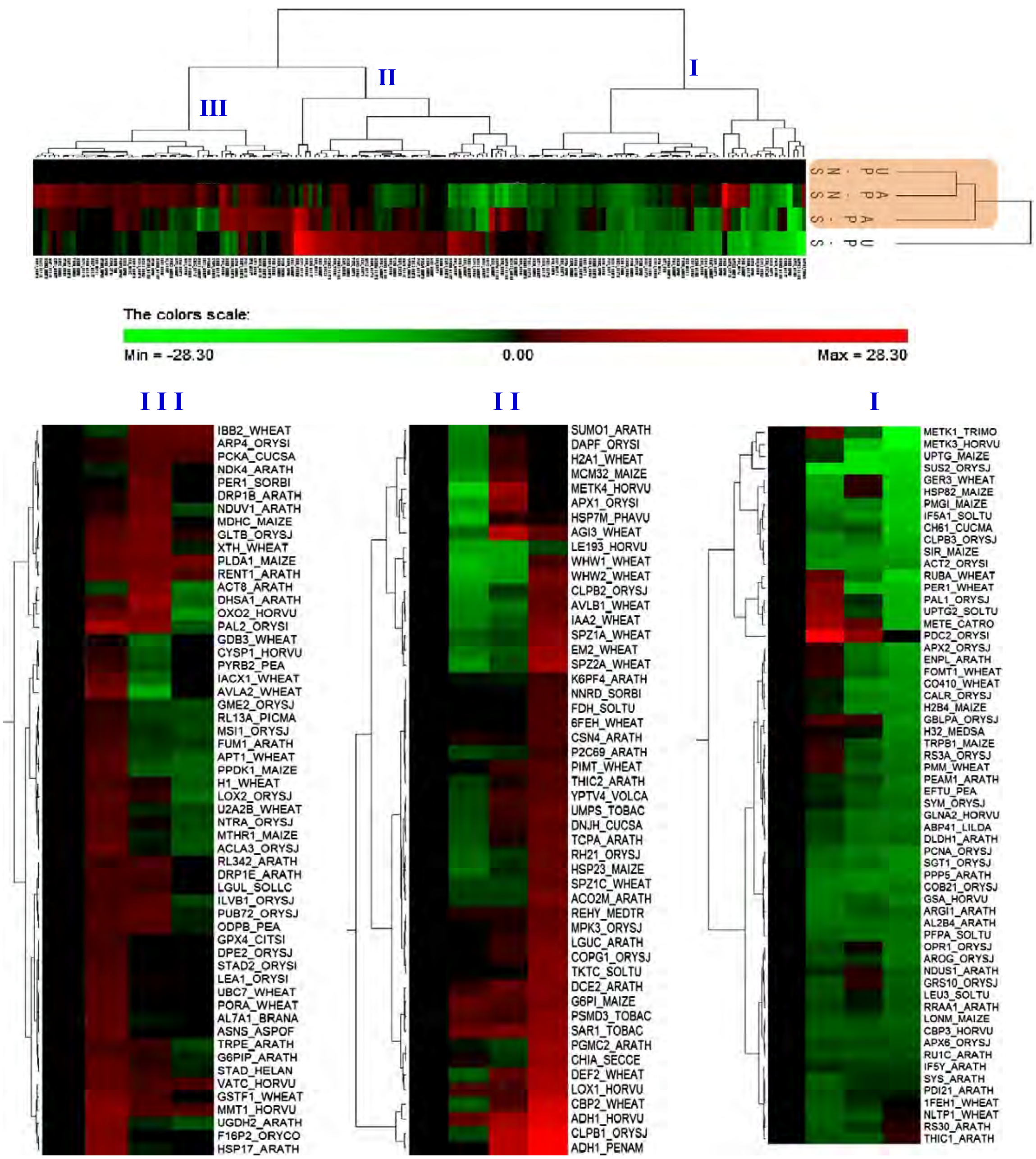


Fig. 4 – Hierarchical clustering of accumulation patterns of differentially regulated proteins in Wheat Embryo. Log2 based fold changes after exponential transformation of the quantitative values was used to create the heatmap. Differences in protein accumulation are shown in color as per the lower scale.

accumulate in response to salt stress in a wide range of plants [43]. Taking into account the salt-sensitivity of the present genotype, it is not surprising to find that salinity decreases the abundance of SAM synthesis-related proteins. Similar results were reported in tomato [44]. Also, it has been reported that salinity decrease the production of ethylene in cucumber [45] and many other species [43] during germination.

Salinity affects also the glutamate/glutamine metabolism, by up-regulating glutamate decarboxylase (GDA, protein no. 45) and down-regulating glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (GSA, protein no. 167) and glutamine synthase (GS, protein no. 70). However, in addition to the up-regulation of asparagine synthetase (AS, protein no. 280) and ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT; protein no. 244), AsA seemed to mitigate the effects of salinity. Previously, it has been reported that exogenous L-Glu evoked ethylene release from imbibed seeds and attenuated the reduction in ethylene production induced by salinity [45]. The enzyme Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) catalyzes an essential step in the pathway of glutamate biosynthesis. The enzyme AS (EC 6.3.5.4) catalyzes the adenosine triphosphate (ATP)-dependent transfer of the amino group of glutamine to a molecule of aspartate to generate glutamate and asparagine [46]. Thus, in addition to the alleviation of the negative effects of NaCl on glutamate synthesis-related

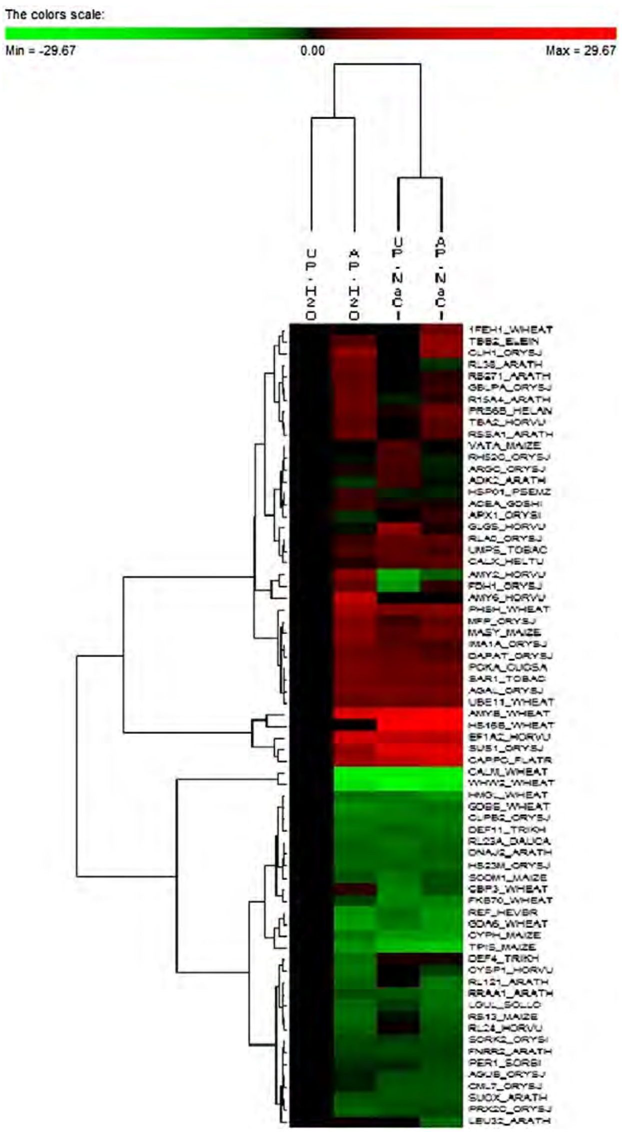


Fig. 5 – Hierarchical clustering of accumulation patterns of differentially regulated proteins Wheat embryo-surrounding tissues. Log2 based fold changes after exponential transformation of the quantitative values was used to create the heatmap. Differences in protein accumulation are shown in color as per the upper scale.

enzymes, the induction of the last two enzymes could provide the embryo with glutamate required for the proline synthesis which is a common response to salt stress [47]. This is in agreement with the increase of proline content in wheat seedlings issued from AsA-primed seeds (data not presented).

On the other hand, three proteins involved in tryptophan biosynthesis (proteins no. 67, 260, 297) were found to be decreased in abundance in UP-NaCl but not in AP-NaCl sample (Table 1; Supplementary material Table S1). Tryptophan (Trp) is an essential amino acid in plants that plays a major role in the regulation of plant development and defense responses. A tryptophan synthase β chain 1 (TSB1, protein no. 67) is responsible for the final step of Trp synthesis pathway. Previously, it has been reported that the over-expression of TSB1 in A. thaliana and tomato confers tolerance to cadmium, which is associated with low lipid peroxidation [48]. Anthranilate synthase (protein no. 260) is the key enzyme for Trp synthesis, which is the main substrate to produce auxin via a single intermediate, indole-3-pyruvic acid [49,50]. Recently, it has been postulated that auxin plays major role as an integrator of the activities of multiple phytohormones to control plant growth in response to environmental stress [51], suggesting that the up-regulation of anthranilate synthase could play a role in overcoming growth inhibition by salinity.

Nine proteins involved in nucleotides metabolism and cofactors biosynthesis were found to be significantly affected by salinity and AsA-priming treatments (Table 1; Supplementary material Table S1). It is widely recognized that embryos from dry seeds of durum wheat are completely devoid of AsA, while the de novo biosynthesis of AsA starts in the wheat embryos after 8–10 h of germination [52]. Salinity leads to the reduction in AsA content [53], thus pre-treatment with appropriate concentrations of AsA leads to improves salt tolerance in wheat plants, as showed in the present study (Fig. 3) and in other previous works [54,55]. So, it is not surprising that, in our results, at least three proteins involved in AsA biosynthesis (proteins no. 142, 191, 235, 258) were decreased in abundance by salinity, while AsA pre-treatment mitigates the adverse effect of NaCl on AsA metabolism. Among these proteins, the GDP-d-mannose 3′,5′-epimerase (GME, EC 5.1.3.18, pro. 258), which converts GDP-d-mannose to GDP-l-galactose, was generally considered to be a central enzyme of the major AsA biosynthesis pathway in higher plants [56]. Over-expression of GME genes leads to AsA accumulation and improves oxidative stress, cold, and salt tolerance of tomato plants [57].

Seven proteins involved in lipids metabolism were found to be changed in abundance (Table 1; Supplementary material Table S1). Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase acts as the first enzyme in the conversion of stearic acid to an unsaturated fatty acid. Unsaturated fatty acids are involved in membrane fluidity and normal functioning of critical integral membrane proteins [58]. Previously, it has been reported that over-expressed Acyl-ACP desaturase improved freezing tolerance significantly [59]. Because unsaturated fatty acids are the favored target of reactive oxygen species (ROS), the higher levels of unsaturated fatty acids might decrease the possibility of ROS damage to membrane lipids [60]. In agreement, while one Acyl-ACP desaturase (protein no. 184) was found to be decreased in abundance by salinity, two acyl-ACP desaturases (proteins no. 184, 121) were found to be increased in abundance by AsA-priming, a situation which may lead to an increase in unsaturated fatty acid content and enhances membrane resistance towards ROS.

4.1.2. Energy

Sixteen proteins belonging to "energy" category were found to be changed in abundance, with eight of them decreased in abundance by salinity. Interestingly, AsA supply do not only partially or completely alleviates the adverse influences of salinity upon these proteins, but also increases the abundance of many of them. An early event during germination is the resumption of energy metabolism. Mitochondrial respiration and energy production are processes which resume very

rapidly following imbibition of dormant seeds [61]. However, such processes may be affected by salinity. For instance, in durum wheat, it has been reported that succinate-dependent oxidative phosphorylation was significantly damaged by salinity, which may be related to the stress-induced alteration in inner mitochondrial membrane permeability, as indicated by changes in ΔΨ profiles [62]. In agreement, four mitochondrial/chloroplastic proteins involved in electron transport (proteins no. 78, 102, 192 and 215) were found to be decreased in abundance by salinity (Table 1, Supplementary material Table S1). In the plant mitochondria, electron transfer along the respiration chain is coupled to the formation of ATP, and the redundant electron leads to the formation of ROS if the ATP synthesis is blocked [63]. Glycolysis provides intermediates for energy supply upon seed germination. In our study, 4 enzymes involved in glycolysis/Krebs cycle pathway were decreased by salinity but increased in abundance by AsA pretreatment (Table 1, Supplementary material Table S1). In line with this, it has been reported that enzymes involved in the Krebs cycle were decreased in abundance in cucumber subjected to salt stress [64]. In such circumstance plant cells inevitably undergo fermentation to fulfill the demand for energy which increases under salinity stress conditions [43,65]. Previously, it has been revealed that stress conditions such as cold, desiccation, and salinity leads to increased alcohol dehydrogenase transcripts [66]. In agreement, our results revealed that, at least, four proteins involved in fermentation, namely alcohol dehydrogenase (proteins no. 37, 69), formate dehydrogenas (protein no. 1), pyruvate decarboxylase isozyme 2 (protein no. 5) and aldehyde dehydrogenase family 2 member B4 (protein no. 40), were increased in abundance by salinity (Table 1, Supplementary material Table S1). Thus, the enhancement of glycolysis/ATP synthesis could increase the tolerance to salinity in wheat. In agreement, the over-expression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene leads to a high germination rate of rice seeds under salt stress [57].

4.1.3. Protein synthesis/cell growth and cell structure

Protein synthesis during seed germination is generally decreased under salt stress conditions [7]. In agreement, among the nine protein synthesis-related proteins identified in our study, six of them (proteins no. 127, 129, 157, 164, 198 and 248) were found to be decreased in abundance by salinity. In contrast, the effect of NaCl was partially or completely alleviated by AsA-priming (Table 1, Supplementary material Table S1). It is recognized that during germination the translation machinery reforms rapidly following imbibition [67]. In line with this, three proteins were identified as translation initiation factors (proteins no. 129, 157 and 248). These results support the presumption that the rapid translation of stored transcripts is the main mechanism whereby the processes of early germination get underway [14,68]. In addition, by analyzing the transcriptome of wheat embryo, Wilson et al. [14] found that some of the mRNAs that accumulated in the embryo during germination, encoded carbohydrate metabolizing enzymes. Some of them are obviously involved in the synthesis of new cell walls. Consistent with this, two enzymes (proteins no. 17 and 111) involved in cell wall biogenesis were found to be decreased by salinity but increased in abundance by AsA-pre-treatment. In similar way, two enzymes (proteins no. 91 and 148) involved in cell division were also decreased by salinity and increased in abundance by AsA-priming. These findings obviously suggested that AsA attenuated salt stress-induced cell growth arrest (Fig. 3).

4.1.4. Protein destination and storage

Wheat germination was accompanied by an increase in mobilization of storage proteins [69]. Salinity, however, delay the mobilization of storage proteins [70]. In agreement, the quantitative analysis of germinating embryos under salinity showed that they are more abundant in proteins belonging to “protein destination and storage” category than embryos germinated in the absence of salt stress (Fig. 1; Table 1, Supplementary material Table S1). Likewise, salinity increases the abundance of three serpin Z proteins (proteins no. 63, 132 and 138), which are likely to use their irreversible inhibitory mechanism in the inhibition of proteinase capable of breaking down seed storage proteins [71]. Also, salinity decreases the abundance of a Bowman-Birk type proteinase inhibitor II-4 (protein no. 152) and two ubiquitination-related proteins (proteins no. 49 and 224), each of which belonging to a unique protein degradation system utilized by eukaryotes to efficiently degrade detrimental cellular proteins and control the entire pool of regulatory components [72]. By contrast, most of the effects of NaCl were mitigated by AsA-priming (Table 1, Supplementary material Table S1). On the other hand, under control conditions, AsA pretreatment induces the decrease in abundance of seventeen proteins, most of which involved in the protection, repair of damaged proteins, such as chaperons and heat shock proteins (proteins no. 104, 145, 238, 253 and 228), protein disulfide-isomerase (protein no. 295), serpin Z proteins (proteins no. 132 and 138) and proteases inhibitors (protein no. 152). Similar results were obtained in our previous study [18].

4.1.5. Stress response

ROS production by germinating seeds has often been regarded as a cause of stress that might affect the success of germination [73]. However, ROS such as H_2O_2 and NO can be beneficial or harmful for the germination, depending on the accumulation level within the embryonic cells [20]. The maintenance of the cellular ROS homeostasis requires a fine-tuned balance between ROS production and scavenging [74]. Therefore, antioxidant compounds and enzymes have been widely regarded as being of particular importance for the completion of the germination [73]. Wheat seed cells have varying protection mechanisms against oxidative stress that occurs during germination [19,20], but they seem to be disturbed by salinity [53]. Consistent with this, our results revealed that salinity decreases the abundance of several H_2O_2-scavenging enzymes, with three L-ascorbate peroxidases (proteins no. 41, 92 and 245) among them. By contrast, AsA-priming partially or completely alleviates the effects of salinity upon these enzymes. On the other hand, salinity up-regulates two enzymes involved in detoxification, namely 1-Cys peroxiredoxin (1-Cys Prx, protein no. 292) and glutathione S-transferase (protein no. 204). Seed germination and

seedling salt tolerance were improved after over-expression of GST in arabidopsis [75] and tobacco [76]. Previously, it has been suggested that the higher amount of oxidized glutathione (GSSG) in dry embryos compared to germinating seeds could contribute to prevent the germination process, since in dormant wheat embryos GSSG seemed to blocks protein synthesis [77]. 1-Cys Prx is localized in the nuclei of aleurone and scutellum cells [78]. This enzyme is a peroxidase specifically and highly produced in seeds and seems to be involved in the inhibition of germination particularly under salt, osmotic and oxidative stress conditions [79]. Interestingly, AsA-priming seems to decrease the abundance of the last two enzymes under stress conditions.

4.2. Metabolic proteome of embryo-ST as affected by salinity and AsA-priming

As expected, only 69 proteins were identified as changed in abundance in embryo-ST, thus reflecting a minor effect of salinity and AsA pre-treatments on these tissues. In agreement, Almansouri et al. [6] revealed that isolated embryos are more affected by salinity than whole seeds. Based upon the cluster analysis and the functional distribution of identified proteins only two protein categories represented the most important variation in proteins accumulation between the treatments. However, it is worth noting that the detection of a small number of storage proteins reflected the efficiency of the fractionation procedure adopted in this study, and indicating that the samples were not contaminated with one another.

In wheat, the non-gluten protein classes, albumins and globulins, represent a smaller percentage of total endosperm protein and have mainly metabolic activity or structural functions [26]. Even though wheat seed storage proteins were not considered in the present study, salinity down-regulates nine proteins involved in proteolysis and folding stability (proteins no. 81, 88, 104, 108, 60, 118, 86, 65 and 47). By contrast, AsA-priming mitigates partially or completely the effect of NaCl on six of them (Table 2, Supplementary material Table S2). As mentioned above, seed germination was accompanied by mobilization of storage proteins, which is decreased in salinity condition [70]. Also, seed imbibition was accompanied by the loss of desiccation tolerance which may explain the decrease in abundance of proteins induced by all the treatments examined.

Previously, it has been postulated that oxidative status is more pronounced in the embryos than in the endosperm [77]. In line with this, in embryo-ST, only eleven proteins belonging to the “disease/defense” category were found to be changed in abundance. Of them, seven proteins were decreased in abundance by salinity, most of which are involved in detoxification, such as superoxide dismutase [Mn] 3.1 (SOD, protein no. 96), L-ascorbate peroxidase 1 (APX, protein no. 138), sulfite oxidase (protein no. 54) and peroxiredoxin-2C (protein no. 145). In wheat, seed imbibition and germination are believed to be associated with enhanced cellular capacity to detoxify H_2O_2 [20]. For this detoxification the operation of AsA peroxidase together with the AsA-regenerating enzymes appears to be of particular importance [80]. These increases, particularly for AsA peroxidase, were much higher in the embryo than in the endosperm [80]. Consistent with this, compared to the embryo, in embryo-ST all the enzymes involved in ROS-scavenging were decreased in abundance by salinity. The negative effect of salinity on SOD activity was reported in several salt-sensitive species or varieties such as in rice [81], pea [82], and cowpea [83]. Thus, given the salt-sensitivity of the wheat genotype used in the present study, it is not surprising to find that salinity decreases the abundance of many ROS-scavenging enzymes such as SOD and APX. However, it is noteworthy that in absence of stress, AsA decreases considerably (9.5-fold) the abundance of peroxiredoxin-2C (protein no. 145). Similar results were obtained in Arabidopsis [84].

5. Conclusions

In this study, the impact of ascorbate priming upon wheat seed metabolic proteome during germination under saline and non-saline conditions was evaluated using shotgun proteomic approach. The results revealed that the decrease in germination induced by salinity was accompanied by a significant variation in metabolic protein abundance, which presumably explain the salt-induced dormancy of wheat seeds. However, given the protective effects of ascorbate on salinity damage, it is suggested that ascorbate pretreatment lead to partial reorganization of embryo-gene expression allowing germinating embryos/seedlings to survive early salt stress. Methionine, auxin (maybe other phytohormones) metabolism, ROS managing and signaling seem to play an important role in the modulation of this process.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.040.

Transparency document

Transparency Document associated with this article can be found, in the online version.

REFERENCES

[1] Ashraf M, Foolad MR. Pre-Sowing seed treatment-A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. Adv Agron 2005;88:223–71.

[2] Tan L, Chen S, Wang T, Dai S. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. Proteomics 2013;13:1850–70.

[3] Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E, Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R, Gruissem W, Buchannan B, Jones R, editors. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: MD: American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 1158–249.

[4] Zhou S, Hu W, Deng X, Ma Z, Chen L, Huang C, et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. PLoS One 2012;7:e52439.

[5] Deng X, Hu W, Wei S, Zhou S, Zhang F, Han J, et al. TaCIPK29, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic Tobacco. PLoS One 2013;8: e69881.

[6] Almansouri M, Kinet JM, Lutts S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (Triticum durum Desf.). Plant Soil 2001;23:243–54.
[7] Dell'Aquila A, Spada P. Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. Seed Sci Res 1992;2:75–80.
[8] Lei YB, Song SQ, Fu JR. Possible involvement of anti-oxidant enzymes in the cross-tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress. J Integr Plant Biol 2005;47:1211–9.
[9] Bønsager BC, Finnie C, Roepstorff P, Svensson B. Spatio-temporal changes in germination and radicle elongation of barley seeds tracked by proteome analysis of dissected embryo, aleurone layer, and endosperm tissues. Proteomics 2007;7:4528–40.
[10] Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. Plant Physiol 2001;126:835–48.
[11] Gao F, Rampitsch C, Chitnis VR, Humphreys GD, Jordan MC, Ayele BT. Integrated analysis of seed proteome and mRNA oxidation reveals distinct post-transcriptional features regulating dormancy in wheat (Triticum aestivum L.). Plant Biotechnol J 2013;11:921–32.
[12] Mak Y, Willows RD, Roberts TH, Wrigley CW, Sharp PJ, Copeland L. Germination of wheat: a functional proteomics analysis of the embryo. Cereal Chem 2009;86:281–9.
[13] Naydenov NG, Khanam S, Siniauskaya M, Nakamura C. Profiling of mitochondrial transcriptome in germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses. Genes Genet Syst 2010;85:31–42.
[14] Wilson ID, Barker GL, Lu C, Coghill JA, Beswick RW, Lenton JR, et al. Alteration of the embryo transcriptome of hexaploid winter wheat (Triticum aestivum cv. Mercia) during maturation and germination. Funct Integr Genomics 2005;5:144–54.
[15] Irar S, Brini F, Goday A, Masmoudi K, Pagès M. Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D)-a wider perspective of the proteome. J Proteomics 2010;73:1707–21.
[16] Gooding MJ, Ellis RH, Shewry PR, Schofield JD. Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. J Cereal Sci 2003;37:295–309.
[17] Witzel K, Weidner A, Surabhi GK, Varshney RK, Kunze G, Buck-Sorlin GH, et al. Comparative analysis of the grain proteome fraction in barley genotypes with contrasting salinity tolerance during germination. Plant Cell Environ 2010;33:211–22.
[18] Fercha A, Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Gherroucha H, Samperi R, et al. Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. J Proteomics 2013;91:486–99.
[19] De Tullio MC, Arrigoni O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. Seed Sci Res 2003;13:249–60.
[20] De Gara L, Paciolla C, De Tullio MC, Motto M, Arrigoni O. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. Physiol Plant 2000;109:7–13.
[21] IshibashiY Iwaya-Inoue M. Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. Plant Prod Sci 2006;9:172–5.
[22] Ye N, Zhang J. Antagonism between abscisic acid and gibberellins is partially mediated by ascorbic acid during seed germination in rice. Plant Signal Behav 2012;7:563–5.
[23] Ye N, Zhu G, Liu Y, Zhang A, Li Y, Liu R, et al. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. J Exp Bot 2012;63:1809–22.
[24] Vensel WH, Tanaka CK, Cai N, Wong JH, Buchanan BB, Hurkman WJ. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. Proteomics 2005;5:1594–611.
[25] Yin C, Teng Y, Luo Y, Christie P. Proteomic response of wheat embryos to fosthiazate stress in a protected vegetable soil. J Environ Sci 2012;24:1843–53.
[26] Hurkman WJ, Tanaka CK. Improved methods for separation of wheat endosperm proteins and analysis by two-dimensional gel electrophoresis. J Cereal Sci 2004;40:295–9.
[27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–53.
[28] Searle BC. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. Proteomics 2010;10:1265–9.
[29] Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem 2002;74:5383–92.
[30] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 2003;75:4646–58.
[31] Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana. Nature 1998;39:485–8.
[32] Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. J Am Stat Assoc 1963;58:236–44.
[33] Caraux G, Pinloche S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. Bioinformatics 2005;21:1280–1.
[34] Meunier B, Dumas E, Piec I, Béchet D, Hébraud M, Hocquette JF. Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. J Proteome Res 2007;6:358–66.
[35] Khan MSA, Hamid A, Karim MA. Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (Oryza sativa L.). 1997;179:163–9.
[36] Roy D, Basu N, Marik R, Banerjee SK. Changes in levels of endogenous gibberellins and abscisic acid in salt-sensitive germinating rice by NaCI-salinity. Plant Physiol Biochem 1995;22:200–2.
[37] Capriotti AL, Borrelli GM, Colapicchioni V, Papa R, Piovesana S, Samperi R, et al. Proteomic study of a tolerant genotype of durum wheat under salt-stress conditions. Anal Bioanal Chem 2014;406:1423–35.
[38] Dell'Aquila A, Spada P. The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos. Ann Bot 1993;72:97–101.
[39] Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, et al. Seed germination and vigor. Annu Rev Plant Biol 2012;63:507–33.
[40] Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, et al. Importance of methionine biosynthesis for Arabidopsis seed germination and seedling growth. Physiol Plant 2002;16:238–47.
[41] Gläser HU, Thomas D, Gaxiola R, Montrichard F, Surdin-Kerjan Y, Serrano R. Salt tolerance and methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae involve a putative phosphatase gene. EMBO J 1993;12:3105.
[42] Saori Ogawa, Shiro Mitsuya. S-methylmethionine is involved in the salinity tolerance of Arabidopsis thaliana plants at germination and early growth stages. Physiol Plant 2012;144:13–9.
[43] Zapata PJ, Serrano M, Pretel MT, Amorós A, Botella M. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. Plant Sci 2004;167:781–8.

[44] Ouyang B, Yang T, Li H, Zhang L, Zhang Y, Zhang J, et al. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. J Exp Bot 2007;58:507–20.
[45] Chang C, Wang B, Shi L, Li Y, Duo L, Zhang W. Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (Cucumis sativus L.) by ethylene and glutamate. J Plant Physiol 2010;167:1152–6.
[46] Lea PJ, Sodek L, Parry MA, Shewry PR, Halford NG. Asparagine in plants. Ann Appl Biol 2007;150:1–26.
[47] Berteli F, Corrales E, Guerrero C, Ariza MJ, Pliego F, Valpuesta V. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. Physiol Plant 1995;93:259–64.
[48] Hsiao PY, Su RC, Ko SS, Tong CG, Yang RY, Chan MT. Overexpression of Arabidopsis thaliana tryptophan synthase beta 1 (AtTSB1) in Arabidopsis and tomato confers tolerance to cadmium stress. Plant Cell Environ 2008;31:1074–85.
[49] Shu LB, Ding W, Wu JH, Feng FJ, Luo LJ, Mei HW. Proteomic analysis of rice leaves shows the different regulations to osmotic stress and stress signals. J Integr Plant Biol 2010;52:981–95.
[50] Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. Trends Plant Sci 2014;19:44–51.
[51] Jaillais Y, Chory J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. Nat Struct Mol Biol 2010;17:642–5.
[52] De Gara L, Pinto MD, Arrigoni O. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. Physiol Plant 1997;100:894–900.
[53] Sairam RK, Srivastava GC. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Sci 2002;162:897–904.
[54] Athar HUR, Khan A, Ashraf M. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Environ Exp Bot 2008;63:224–31.
[55] Jafar MZ, Farooq M, Cheema MA, Afzal I, Basra SMA, Wahid MA, et al. Improving the performance of wheat by seed priming under saline conditions. J Agron Crop Sci 2012;198:38–45.
[56] Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, et al. GDP-d-mannose 3, 5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. Plant J 2009;60:499–508.
[57] Zhang C, Liu J, Zhang Y, Cai X, Gong P, Zhang J, et al. Overexpression of SlGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. Plant Cell Rep 2011;30:389–98.
[58] Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Annu Rev Plant Biol 2002;53:225–45.
[59] De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, et al. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. Mol Breed 2008;21:15–26.
[60] Li XJ, Yang MF, Chen H, Qu LQ, Chen F, Shen SH. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. Biochim Biophys Acta 1804;2010:929–40.
[61] Bewley JD, Black M. Cellular events during germination and seedling growth. Seeds. US: Springer; 1985. p. 135–73.
[62] Flagella Z, Trono D, Pompa M, Di Fonzo N, Pastore D. Seawater stress applied at germination affects mitochondrial function in durum wheat (Triticum durum) early seedlings. Funct Plant Biol 2006;33:357–66.
[63] Petrussa E, Casolo V, Peresson C, Krajňáková J, Macrì F, Vianello A. Activity of a channel in Arum spadix mitochondria during thermogenesis. J Plant Physiol 2008;165:1360–9.
[64] Du CX, Fan HF, Guo SR, Tezuka T, Li J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. Phytochemistry 2010;71:1450–9.
[65] He D, Han C, Yao J, Shen S, Yang P. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. Proteomics 2011;11:2693–713.
[66] Minhas D, Grover A. Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. Plant Sci 1999;146:41–51.
[67] Dommes J, Walle C. Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. Physiol Plant 1990;79:289–96.
[68] Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. The effect of α-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiol 2004;134:1598–613.
[69] Dominguez F, Cejudo FJ. Pattern of endoproteolysis following wheat grain germination. Physiol Plant 1995;95:253–9.
[70] Soltani A, Gholipoor M, Zeinali E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. Environ Exp Bot 2006;55:195–200.
[71] Roberts TH, Marttila S, Rasmussen SK, Hejgaard J. Differential gene expression for suicide-substrate serine proteinase inhibitors (serpins) in vegetative and grain tissues of barley. J Exp Bot 2003;54:2251–63.
[72] Lee JH, Kim WT. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis. Mol Cells 2011;31:201–8.
[73] Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci Res 2004;14:93–107.
[74] Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. Plant Physiol 2009;150:494–505.
[75] Qi YC, Liu WQ, Qiu LY, Zhang SM, Ma L, Zhang H. Overexpression of glutathione S-transferase gene increases salt tolerance of Arabidopsis. Russ J Plant Physiol 2010;57:233–40.
[76] Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. Plant Cell Physiol 2000;41:1229–34.
[77] Tommasi F, Paciolla C, De Pinto MC, De Gara L. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of Pinus pinea L. seeds. J Exp Bot 2001;52:1647–54.
[78] Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. Plant J 2009;57:132–45.
[79] Haslekas C, Viken MK, Grini PE, Nygaard V, Nordgard SH, Meza TJ, et al. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. Plant Physiol 2003;133:1148–57.
[80] Cakmak I, Strbac D, Marschner H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. J Exp Bot 1993;44:127–32.
[81] Dionisio-Sese ML, Satoshi T. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Sci 1998;135:1–9.

[82] Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, Del Rio LA. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Sci 1995;105:151–67.
[83] Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F. Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from Vigna unguiculata (L.) Walp. New Phytol 1994;126:37–44.
[84] Horling F, Lamkemeyer P, König J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, et al. Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. Plant Physiol 2003;131:317–25.

الخلاصة العامة

و

التوصيات

الخلاصة العامة و التوصيات

٧ الخلاصة العامة

أجريت هذه الدراسة بهدف تعميق فهمنا لدور منظمات نمو النبات في تحسين مقدرة القمح الصلب على تحمل الملوحة، و هو أمر بالغ الأهمية بغرض تصميم و تطوير تقنيات حيوية جديدة تفيد في تحسين كفاءة المحاصيل الزراعية في تحمل الملوحة. كما تزود برامج تربية المحاصيل بمعلومات أكثر دقة و استقرار.

نظرا لكون معظم مؤشرات استجابة النباتات للملوحة تتأثر بالعديد من العوامل، بما في ذلك شدة ومدة الإجهاد، النوع النباتي أو النمط الوراثي، عمر النبات و مرحلة نموه، بالإضافة إلى التداخل بين مختلف منظمات نمو النبات، تقرر في الدراسة الحالية التركيز على دور التفاعل بين منظمات نمو النبات في السيطرة على سرعة إنبات البذور وقوة الشتلات عند القمح الصلب النامي تحت ظروف الإجهاد الملحي. هذا القرار لم يكن تعسفيا و لكن استند إلى أهمية الإنبات السريع للبذور و بزوغ البادرات المتجانس في الحصول على عوائد عالية في القمح (Hazmoune, 2006; Paulsen, 1987). بالإضافة إلى كون النمو السريع في المراحل المبكرة يساعد الشتلات في تجنب القشرة الصلبة التي تنتج عن تراكم الأملاح على مستوى سطح التربة (الشكل 2 من الفصل الأول) و يمكِّنُها من الاستفادة الجيدة من رطوبة التربة، مما يؤدي إلى إنشاءٍ أفضل للشتلات و منه الحصول على إنتاجية معتبرة.

من بين كل الهرمونات النباتية، تعتبر الجبرلينات أهمها على الإطلاق في ما يتعلق بتنظيم إنبات البذور و نمو البادرات (Miransari & Smith, 2014) و خصوصا تحت ظروف الإجهاد الملحي (Iqbal & Ashraf, 2013; Fahad et al., 2015)، و بناءا عليه فقد تم اختيار حمض الجبريليك لإجراء هذه الدراسة. من جهة أخرى و نظرا للدور البارز الذي بدأت تكتمل ملامحه في الآونة الأخيرة للمواد الأكسوجينية التفاعلية (ROS) و مضادات الأكسدة، و حمض الأسكوربيك على وجه التحديد، في تنظيم استجابة النباتات النامية تحت ظروف الإجهاد الملحي، بالإضافة إلى تنظيم الإنبات تحت ظروف الملوحة و تنظيم تخليق الجبرلينات، فقد تم اختيار حمض الأسكوربيك أيضا لإجراء هذه الدراسة.

من جهة أخرى، و نظرا لتعدد طرق استعمال أو معاملة النباتات بمواد النمو و الهرمونات (كالرش الورقي، نقع البذور، الإضافة إلى مياه الري، الإضافة إلى الوسط الجذري ...الخ)، فقد اخترنا لهذه الدراسة نهج واحد فقط و المتمثل في "تحفيز البذور *seed priming*" نظرا للنجاح الذي حققته هذه التقنية الحيوية ليس فقط في تحسين إنبات البذور و تسريع نمو البادرات، و لكن أيضا فيما يخص تشجيع النمو المتزامن و المتجانس للنباتات في الظروف البيئية المجهدة، خصوصا في المناطق الجافة و شبه الجافة (Ashraf & Foolad, 2005 ; Clark et al., 2001). كما أنها، على النقيض من باقي الطرق، تسمح بتخزين البذور المعالجة لفترات معتبرة دون أن تفقد مفعولها و بالتالي فهي الأفضل من الناحية العملية، أضف إلى ذلك، كونها من التقنيات الحيوية الآمنة، غير

المكلفة و الصديقة للبيئة، كما أنها بديل جيد، على المدى القصير، للتقنيات الوراثية و الفسيولوجية المستعملة لرفع مقدرة النباتات الزراعية على تحمل الملوحة (Gadallah, 2009; Khan et al., 2010 ; Hasanuzzaman et al., 2013).

و لتحقيق أهداف دراستنا، خصوصا ما تعلق منها Œ بتقييم آثار الإجهاد الملحي على إنبات و إنشاء الشتلات (القمح الصلب)، • تقييم إمكانية تحسين الإنبات و نمو بادرات/شتلات القمح تحت ظروف الإجهاد الملحي الشديد عن طريق تحفيز البذور بواسطة الهرمونات النباتية و مضادات الأكسدة، Ž تقييم أهمية إجهاد الأكسدة و نظام الدفاع المضاد للأكسدة في تأثير الملوحة على إنبات و نمو بادرات القمح، • و أخيرا تعميق فهمنا للآليات الجزيئية للتحمل الملحي المستحدث بواسطة تحفيز البذور. أجريت التجارب التالية.

■ التجربة الأولى

كان الهدف من هذه التجربة تقييم التأثير المتداخل لكل من الملوحة (250 ملي مول/ل NaCl) و تحفيز البذور (seed priming) بواسطة حمض الجبريليك (0.5 ملي مول/ل) أو حمض الأسكوربيك (0.5 ملي مول/ل) أو مزيج من كلا الحمضين، على إنبات و نمو بادرات القمح الصلب. أظهرت نتائجنا أن استعمال حمض الأسكوربيك و حمض الجبريليك كل على حدى أو كمزيج قد أبديا تأثيرا مضادا للإجهاد الملحي على جل معايير الإنبات و نمو البادرات التي تمت معاينتها في هذه التجربة، و هذا ما يؤكد نتائج دراساتنا الأولية و يدعم نتائج العديد من الدراسات المماثلة على مختلف الأنواع النباتية.

من خلال التحليل المقارن لنتائج تأثير تحفيز البذور على الإنبات و النمو الأولي تبين وجود تأثير تآزري (synergistic effect) بين حمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك على معظم مظاهر الإنبات و النمو تحت ظروف الدراسة. و هذا يدعم نتائج دراسات سابقة. و على الرغم من العلاقة الإيجابية التي رصدت بين التحفيز البذري و تعبئة المدخرات، نعتقد أن هذا التأثير الإيجابي بالنسبة لحمض الأسكوربيك يعود بالإضافة إلى كونه عامل مهم في تنظيم إنبات البذور من خلال مراقبة التخليق الحيوي لـ GAs و ABA (الشكل 21 الفصل الأول) كما ثبت حديثا (Ye & Zhang, 2012).كونه يساعد في التقليل من الآثار السلبية لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) مثل H_2O_2، التي يزيد إنتاجها تحت ظروف الإجهاد الملحي .

■ التجربة الثانية

أجريت التجربة الثانية بغرض فحص قدرة التحفيز البذري بواسطة AsA و GA_3 على تحسين مقاومة القمح الصلب للملوحة على المدى المتوسط، حيث قمنا في هذه التجربة بتقدير تغيرات النمو و بعض معايير الأيض العام لشتلات القمح (عمرها شهر). تمت دراسة تأثير الإجهاد الملحي في وجود وغياب التحفيز البذري على كل من نمو الأوراق، المحتوى النسبي للماء، محتوى الأوراق من الكلوروفيل (أ و ب)، أشباه الكاروتين، البرولين و السكريات الذائبة، الماء الأكسوجيني و مادة MDA (كمؤشر عن أكسدة اللبيدات). دلت النتائج على أن الآثار

السلبية للإجهاد الملحي على مختلف المعايير المدروسة تمت معاكستها بمختلف المعاملات، لاسيما التحفيز-بحمض الأسكوربيك (Ascorbate-priming). بينت مناقشة النتائج احتمال وجود تأثير تآزري بين AsA و GA_3 في العمل على تقليل أضرار الإجهاد الملحي على نمو الأوراق و الأيض العام. تتيح لنا هذه النتائج افتراض كون تحفيز البذور بمضادات الأكسدة (AsA) يرفع من تحمل القمح الصلب للملوحة ليس فقط من خلال كونه مضاد لجزيئات ROS ، و لكن أيضا من خلال الحفاظ على التغذية المائية ربما عن طريق تنظيم التوازن الأسموزي -و ربما الأيوني أيضا-، حماية الأغشية، الحفاظ أو استرجاع التوازن الهرموني الذي ثبت أنه يختل تحت ظروف الملوحة (Shakirova et al., 2003).

■ التجربة الثالثة

مما سبق ذكره، يتضح بصورة لا تدع مجالا للشك أن تقنية تحفيز البذور هي وسيلة فعالة لتحسين نمو و منه إنتاجية القمح الصلب تحت ظروف الإجهاد الملحي. و نظرا للأهمية الأكاديمية و الاقتصادية لتحسين قوة البذور، فقد شجع ذلك على أجراء الكثير من البحوث في السنوات القليلة الماضية في محاولة لاختبار و تطوير و تعزيز عمليات تحفيز البذور في سبيل تحسين إنبات البذور و إنشاء البادرات في العديد من الخضروات و المحاصيل الحقلية (Bradford et al., 2000; Yacoubi et al., 2011; Hurkman & Tanaka, 2004; Jafar et al., 2012). و لكن، عدم وضوح الآليات الجزيئية التي تحث بها عملية تحفيز البذور على رفع قدرة النباتات على تحمل الملوحة، شجع العديد من الباحثين، في العقد الماضي، على إجراء عدة دراسات مقارنة باستخدام تقنيات التحليل البروتيومي المعتمدة على الجال (Gel-electrophresis) لتحديد المؤشرات الحيوية المحتملة لهذه الظاهرة أو ما أصطلح عليه بـ "ذاكرة التحفيز" (Job et al., 2000; Catusse et al., 2011; Yacoubi et al., 2011; Wang et al., 2012). و على الرغم من كون النتائج التي تحققت لحد الآن مثيرة للإعجاب، لا يزال هذا الهدف بعيد المنال وذلك لأسباب تقنية متعلقة بكفاءة آليات فصل البروتينات (Tanou et al., 2012; Chen & Arora, 2013) و تقديرها (Skylas et al., 2005). و اعتقادا منا بمقدرة النهج البروتيومي الخالي من الجال (gel-free proteomics) على التغلب على معظم الصعوبات التي واجهتها التقنيات السابقة (Stevenson et al., 2009) وبالتالي، إعطاء دفعة قوية لتعميق فهمنا للآليات الكامنة وراء قوة البذور التكوينية أو المستحثة بواسطة التحفيز و منه فهم كيف تقاوم النباتات الإجهاد الملحي على المستوى البروتيومي الذي يزودنا بمعلومات أكثر 1000 مرة مما يزودنا به الجينوم (Tanou et al., 2012; Bradford et al., 2000; Catusse et al., 2011).

كخطوة أولى نحو فهم أفضل للآليات التي تتحكم في تحمل الملوحة المحدث في القمح الصلب، و التغلب على أوجه القصور في النهج القائم على التحليل البروتيومي-المعتمد على الجال، أجريت مقارنة بالاعتماد على التحليل البروتيومي-الخالي من الجال بين عينات بذور قمح صلب متفاوتة القوة على إثر تحفيزها بالماء أو حمض الأسكوربيك (الماء استعمل لتأكيد التأثير النوعي لحمض الأسكوربيك). أشارت النتائج إلى أن التحفيز المائي (Hydro-priming) للبذور رافقته تغييرات معنوية لـ 72 بروتين، معظمها تشارك في التحلل البروتيني، تخليق

البروتين، الأيض العام و عمليات الدفاع ضد إجهادات الوسط. في المقابل التحفيز-بالأسكوربات (Ascorbate-priming)، رافقه تغييرات معنوية لـ 83 بروتين، تشارك جلها بشكل رئيسي في استقلاب البروتين، الدفاع المضاد للأكسدة، عمليات الإصلاح أو الترميم (للجزيئات المتضررة)، و من المثير للاهتمام، حدوث تغير في محتوى بروتينات تشارك في عمليات أيض الميثيونين (أنظر المخطط المقترح لتفسير تأثير AsA على الميثيونين الفصل الرابع). من خلال تحليل نتائجنا، يمكن تأكيد كون تحفيز البذور بحمض الأسكوربيك يعيد برمجة البذور أو تشكل "ذاكرة تحفيز". بالمقارنة مع التحفيز المائي يمكن الجزم بأن هذا التأثير نوعي و ليس عرضي. يبقى فقط تأكيد علاقة هذه التغيرات بمقاومة الإجهاد الملحي و هذا ما تم تقصيه في التجربة الأخيرة.

■ التجربة الرابعة

على الرغم من أن التحاليل البروتيومية لكل من السويداء، الآلورون و الجنين أجريت على نطاق واسع في العديد من النباتات أحادية الفلقة (Bønsager et al., 2007; Irar et al., 2010; Vensel et al., 2005)، تبقى المعلومات المتاحة جد محدودة خصوصا فيما يتعلق ببروتينات/ جينات الاستجابة للإجهاد الملحي خلال إنبات بذور القمح أو الإنبات بعد التحفيز، لذا فإن دراسة التغيرات الحاصلة في وفرة البروتين و مواطنها خلال الاستجابة للملوحة ستساعدنا دون شك في تحديد الجينات المرتبطة بهذه الاستجابة و تتيح لنا فهم شبكة آليات التكيف مع الإجهاد في هذه المادة الغذائية الأساسية (Tan et al., 2013; Yin et al., 2012). من هذا المنطلق، و لتوسيع فهمنا للآليات الأساسية لقوة البذور و تحفيزها، أجرينا تحليلا مقارنا بين بروتيوم الأيض لبذور غير محفزة و أخرى محفزة بواسطة AsA و ذلك خلال الإنبات في وجود أو غياب الإجهاد الملحي.

في هذا القسم من الدراسة قمنا بإجراء تحليل بروتيومي-خالي من الجال لبروتينات الأيض المستخلصة من بذور قمح محفزة بحمض الأسكوربيك و مقارنتها بتلك المستخلصة من بذور قمح غير محفزة خلال إنباتها تحت الظروف الملحية و المراقبة. و نظرا لكون إنبات البذور يتحدد بالتفاعل "Cross talk" بين الجنين والأنسجة المحيطة به، تم دراسة الاختلاف في البروتيوم الأيضي في كل نسيج لوحده. 167 بروتين من بين 697 و 69 بروتين من بين 471 من البروتينات التي تم تحديدها أظهرت زيادة أو نقصان معنوي في وفرتها استجابة للتحفيز و/أو الملوحة مقارنة بالعينات الشاهدة في الجنين و الأنسجة المحيطة به، على التوالي. ترافق إنبات بذور القمح غير المحفزة و المجهدة ملحيا بتغير كمي في 129 بروتين من بروتينات الجنين، معظمها منخرطة في الأيض و إنتاج الطاقة، الدفاع ضد إجهادات الوسط الحيوية و غير الحيوية، توجيه البروتين و تخزينه. يبدوا أن التحفيز بالأسكوربات (Ascorbate-priming) يمنع و يعاكس آثار الملوحة على معظم هذه البروتينات كما يغير بصورة معنوية من وفرة 35 بروتينا مختلفا، معظمها تشارك في عمليات الأيض، توجيه البروتينات و تخزينها، الدفاع المضاد للأكسدة. تخليق الهرمونات (خصوصا الأكسين). كشف التحليل العنقودي الهرمي (Hierarchical cluster analysis) أن الجنين أكثر تأثرا بمختلف المعاملات على عكس السويداء، مما يؤكد حدوث إعادة برمجة للجنين خلال تحفيز البذور ليصبح بذلك أكثر استعدادا لخوض المعركة (getting ready for battle) ضد الإجهاد الملحي.

في الختام يمكننا القول بأن دراستنا تعتبر الدراسة الأولى من نوعها التي تستعمل فيها تقنية shotgun proteomics (Hu et al., 2015; Komatsu et al., 2014) للتحقيق في التغيير الحاصل في بروتيوم الأيض لبذور القمح الصلب استجابة لعملية التحفيز. يمكن لهذه الدراسة أن تقدم تفسيرا لبعض الآليات البيوكيميائية المشاركة في تحفيز بذور القمح، و التي يمكن أن تكون مفيدة جدا لتحسين إنتاج المحاصيل من خلال تحديد الجينات المحتمل تدخلها في تعزيز إنبات البذور و البادرات، خاصة تحت طائلة الإجهاد الملحي.

٧ التوصيات

1- على الرغم من كون تحفيز البذور يحسن من سرعة وانتظام ظهور البادرات و نموها خاصة تحت ظروف الإجهاد الملحي (Ashraf & Foolad, 2005)، إلا أن فعاليته تختلف باختلاف الأنواع النباتية، طبيعة ودرجة الإجهاد ...الخ (Iqbal and Ashraf, 2007). كما أننا لاحظنا خلال إجراء التجارب أن النتائج قد تختلف باختلاف درجة الحرارة المسيطرة أثناء معالجة البذور. بالإضافة إلى عامل الوقت، حيث تختلف النتائج باختلاف مدة تحفيز البذور، و نظرا لتعدد العوامل التي تشارك في التأثير على نتائج عملية تحفيز البذور فإننا نوصي بإجراء تجارب يستعمل خلالها نماذج رياضية و إحصائية كالتحليل متعدد المتغيّرات MVA (Multivariate analysis)، كما هو الحال بالنسبة لطريقة RSM (Response Surface Methodology)، التي تأخذ بعين الاعتبار معظم العوامل المتورطة في عملية التحفيز ليتم تحديد التركيز الأمثل، درجة الحرارة المثلى و المدة المثلى لتحفيز بذور نوع نباتي معين اتجاه إجهاد معين (Myers et al., 2009).

2- الآليات الخلوية لاستشعار الإجهاد و نقل الإشارة تمثل الاستجابات الأولية للنبات اتجاه الظروف غير الملائمة. يعد ظهور تقنيات التحليل عالي الدقة أو ما يعرف بتقنيات "OMICS" عهد جديد لدراسة الاستراتيجيات الجزيئية المتبعة من قبل النباتات للتكيف مع التغيرات البيئية. و مع ذلك، فإن توضيح آليات التكيف مع الإجهاد في النباتات يستلزم تطوير تقنيات فصل وتوصيف دقيق لبروتينات الاستجابة للإجهاد، كونها بالإضافة إلى التغيرات التي تطرأ عليها بعد الاستنساخ (post-translational modifications)، مهمة جدا في تحديد استجابة النبات للإجهاد، حيث توفر دراسات البروتيوم معلومات شاملة عن الضبط الدقيق للمسارات الخلوية التي تشارك في المقام الأول في التخفيف من الآثار الضارة للإجهاد (Hu et al., 2015; Komatsu et al., 2014). لذا فإننا نوصي باستغلال هذه التقنيات الحديثة لفهم الآليات الجزيئية لاستجابة النباتات للإجهاد و منه تزويد برامج تربية النبات بالمعلومات الضرورية لتحسين مقاومة النباتات لمختلف إجهادات الوسط.

3- بناءا على نتائج دراستنا خصوصا التجارب الثالثة و الرابعة، يبدوا أن تحفيز البذور بحمض الأسكوربيك (و منه بمختلف منظمات النمو) يعيد برمجة البذور بصورة تصبح فيها أكثر كفاءة في مقاومة الإجهاد الملحي، و ذلك ليس فقط من خلال تأثيره على مستويات المواد الأكسوجينية التفاعلية (ROS) فقط،

و لكن من خلال التأثير على عدد من المسارات الأيضية و نقل الإشارة و لكن بشكل خاص على الميثيونين، خصوصا و أنه بالإضافة لأهميته في تخليق عدد كبير من مواد النمو مثل هرمون الإثيلين و البولي أمين، أثبتت دراسات مماثلة أن تخليق الميثيونين أمر بالغ الأهمية لإنبات البذور و أي إخلال به يؤدي إلى تثبيط الإنبات (Gallardo et al., 2002a). من جهة أخرى تبين أن معاملة البذور بحمض الأسكوربيك، أثرت بشكل واضح على تخليق عدد من الهرمونات النباتية خصوصا الأوكسين، و هذا ما يجعلنا نوصي بإجراء دراسات أخرى في نفس السياق، خصوصا ما تعلق منها بأيض الميثيونين و الهرمونات النباتية (الأوكسين و حمض الجاسمونيك...الخ).

قائمة المراجع

1. فرشة ع. (2001). دراسة تاثير الملوحة على نمو و إنتاج القمح الصلب (Tritcum durum Desf.) وإمكانية معاكسة ذلك بواسطة الهرمونات النباتية (Kinitine, GA3, AIA). رسالة ماجستير. جامعة قسنطينة.
2. باقة م.، فرشة ع.، غروشة ح. و بدور ل. (2006). معاكسة أثر الملوحة باستخدام منظمات النمو نقعا ورشا على محتوى نبات القمح الصلب من بعض المواد العضوية أثناء المرحلة الخضرية والثمرية. *Technologie C & Sciences, (24), 5-12.*
3. Abdoli, M., Saeidi, M., Azhand, M., Jalali-Honarmand, S., Esfandiari, E., & Shekari, F. (2013). The Effects of Different Levels of Salinity and Indole-3-Acetic Acid (IAA) on Early Growth and Germination of Wheat Seedling. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(4), 329-338.*
4. Abdoli, M., Saeidi, M., Azhand, M., Jalali-Honarmand, S., Esfandiari, E., & Shekari, F. (2013). The Effects of Different Levels of Salinity and Indole-3-Acetic Acid (IAA) on Early Growth and Germination of Wheat Seedling. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(4), 329-338.*
5. Abdul-Baki, AA., & Anderson, JD. (1970). Viability and leaching of sugars from germinating barley. *Crop Science, 10(1), 31-34.*
6. Adams, E., & Shin, R. (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of Integrative Plant Biology, 56(3), 231-249.*
7. Afzal, I., Basra, S.M., & Iqbal, A. (2005). The effects of seed soaking with plant growth regulators on seedling vigor of wheat under salinity stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 1(1), 6-14.*
8. Agami, RA. (2014). Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia Plantarum, 58(2), 341-347.*
9. Ahmad, Z., Tahir, S., Abid, M., & Amanullah, M. (2014). Salt-Induced Variations in Physiological Parameters and Nutrient Concentrations of Two Wheat Cultivars. *Communications in Soil Science and Plant Analysis, 45(1), 29-41.*
10. Ajmal Khan, M., Zaheer Ahmed, M., & Hameed, A. (2006). Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes. *Journal of Arid Environments, 67(3), 535-540.*
11. Akbarimoghaddam, H., Galavi, M., Ghanbari, A., & Panjehkeh, N. (2011). Salinity effects on seed germination and seedling growth of bread wheat cultivars. *Trakia Journal of Sciences, 9(1), 43-50.*
12. Aldesuquy, HS., Baka, ZA., El-Shehaby, OA., & Ghanem, HE. (2013). Growth, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities as a Selection Criterion for the Salt Tolerance of Wheat Cultivars Irrigated by Seawater. In Phyton-Annales Rei Botanicae (Vol. 53, No. 1, pp. 151-162). Wiener Strasse 21-23, A-3580 Horn, Austria: Ferdinand Berger Soehne.
13. Aldesuquy, H., Baka, ZA., & Mickky, B. (2014). Kinetin and spermine mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Leaf area, photosynthesis and chloroplast ultrastructure of flag leaf at ear emergence. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences. 1 (2), 77-87.*
14. Al-Hakimi, AMA., Hamada, AM. (2001). Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. *Biologia Plantarum, 44,253-261.*
15. Ali, A., Basra, SM., Iqbal, J., Hussain, S., Subhani, MN., Sarwar, M., & Ahmed, M. (2014). Augmenting the salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) through exogenously applied silicon. *African Journal of Biotechnology*, 11(3), 642-649.
16. Al-Karaki, GN. (2001). Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition, 24(3), 511-522.*
17. Alla, MMN., Abogadallah, GM., Badran, EG., & Nada, RM. (2014). Differential tolerance of two wheat cultivars to NaCl is related to antioxidant potentialities. *Brazilian Journal of Botany, 37(3), 207-215.*
18. Almansouri, M., Kinet, JM., & Lutts, S. (2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil, 23, 243-54.*
19. Amooaghaie, R. (2013). The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. *African Journal of Biotechnology, 10(33), 6269-6275.*
20. Amtmann, A., & Leigh, R. (2010). Ion homeostasis. In Abiotic Stress Adaptation in Plants (pp. 245-262). Springer Netherlands.

21. Apse, MP., & Blumwald, E. (2007). Na^+ transport in plants. *FEBS letters, 581(12), 2247-2254.*

22. Arfan, M., Athar, HR., & Ashraf, M. (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *Journal of plant physiology, 164(6), 685-694.*

23. Arif, M., Jan, MT., Marwat, KB., Khan, MA. (2008). Seed priming improves emergence and yield of soybean. *Pakistan Journal of Botany, 40(3),1169-1177.*

24. Arif, H., & Tomos, AD. (1993). Control of wheat leaf growth under saline conditions. In 'Towards the rational use of high salinity tolerant plants'.(Eds H Lieth and AAl Masoom) pp. 45–52.

25. Arrigoni, O., Liso, R. A., & Calabrese, G. (1975). Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature, 256, 513-514.*

26. Ashraf, M., Athar, HR., Harris, PJC., Kwon, TR. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy, 97,45-110.*

27. Ashraf, M., & Foolad, MR. (2005). Pre-Sowing seed treatment-A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy, 88,223–271.*

28. Ashraf, M., & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany, 59(2), 206-216.*

29. Ashraf, M., & Harris, PJC. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science, 166(1), 3-16.*

30. Association of Official Seed Analysts (AOSA) (1983). Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysts. Lincoln, NE, USA.

31. Atak, M., Kaya, MD., Kaya, G., çikili, Y., & Ciftci, CY. (2006). Effects of NaCl on the germination, seedling growth and water uptake of triticale. *Turkish journal of agriculture & forestry, 30(1), 39-47.*

32. Athar, HUR., Khan, A., & Ashraf, M. (2008). Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany, 63, 224-231.*

33. Azooz, MM., Alzahrani, AM., & Youssef, MM. (2013). The potential role of seed priming with ascorbic acid and nicotinamide and their interactions to enhance salt tolerance in broad bean (Vicia faba L.). *Australian Journal of Crop Science, 7(13), 2091.*

34. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Researsh, 14(02), 93-107.*

35. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., & Côme, D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research, 10(01), 35-42.*

36. Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry, 47(1), 1-8.*

37. Balyan, HS., Gupta, PK., Kumar, S., Dhariwal, R., Jaiswal, V., Tyagi, S., ... & Kumari, S. (2013). Genetic improvement of grain protein content and other health-related constituents of wheat grain. *Plant Breeding, 132(5), 446-457.*

38. Barak, S., D. Mudgil & B. S. Khatkar (2015). Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 55:3, 357-368.*

39. Barba-espín, G., Diaz-vivancos, P., Job, D., Belghazi, M., Job, C., & Hernández, JA. (2011). Understanding the role of H_2O_2 during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant, cell & environment, 34(11), 1907-1919.*

40. Barragán, V., Leidi, EO., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, JA., ... & Pardo, JM. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *The Plant Cell Online, 24(3), 1127-1142.*

41. Barrôco, RM., Van Poucke, K., Bergervoet, JH., De Veylder, L., Groot, SP., Inzé, D., & Engler, G. (2005). The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology, 137(1), 127-140.*

42. Bartels & Dinakar (2013). Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: a comparison between *Thellungiella* & *Arabidopsis thaliana. Functional Plant Biology, 40(9), 819-831.*

43. Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences, 24(1), 23-58.*

44. Barth, C., De Tullio, M., & Conklin, PL. (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany, 57, 1657-1665.*

45. Bartoli, CG., Pastori, GM., & Foyer, CH. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology, 123(1), 335-344.*

46. Neves-Piestun, BG., & Bernstein, N. (2001). Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. *Plant Physiology, 125(3), 1419-1428.*

47. Beckers, G. J., & Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current opinion in plant biology, 10(4), 425-431.*

48. Benmahioul, B., Daguin, F., & Kaid-Harche, M. (2009). Effects of salt stress on germination and in vitro growth of pistachio (Pistacia vera L.). *Comptes rendus biologies, 332(8), 752-758.*

49. Ben Rejeb, K., Abdelly, C., & Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry, 80, 278-284.*

50. Bernstein, N., Läuchli A., & Silk, WK. (1993). Growth and development of Sorghum leaves under conditions of NaCl stress. *Planta, 191, 433-439.*

51. Berrebbah, H., & Réda, M. (2013). Effect of Zinc application under conditions of salt stress on germination and growth in vitro of durum wheat (*Triticum durum* Desf.)." *Journal of Selcuk University Natural and Applied Science, 877-884.*

52. Berteli, F., Corrales, E., Guerrero, C., Ariza, MJ., Pliego, F., & Valpuesta, V. (1995). Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiologia Plantarum, 93, 259-64.*

53. Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., ... & Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal, 22(9), 2004-2014.*

54. Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., ... & Obermaier, B. (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana. *Nature, 391(6666), 485-488.*

55. Bewley, JD., & Black, M. (1985). Cellular events during germination and seedling growth. In Seeds. (p. 135–73). Springer US.

56. Bewley, JD., & Black, M. (1994). Dormancy and the control of germination. In Seeds (pp. 199-271). Springer US.

57. Bewley, JD. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell, 9: 1055–66.*

58. Bhagi, P., Zhawar, VK., & Gupta, AK. (2013). Antioxidant response and Lea genes expression under salt stress and combined salt plus water stress in two wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology, 51(9), 746-57.*

59. Bharti, S., & Garg, O. P. (1970). Changes in the ascorbic acid content of the lateral buds of soybean in relation to flower induction. *Plant and cell physiology, 11(5), 723-727.*

60. Blochl, A., Peterbauer, T., & Richter, A. (2006). Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journal of plant physiology, 164, 1093–6.*

61. Bønsager, BC., Finnie, C., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2007). Spatio-temporal changes in germination and radical elongation of barley seeds tracked by proteome analysis of dissected embryo, aleurone layer, and endosperm tissues. *Proteomics, 7(24), 4528-4540.*

62. Borrelli, GM., Ficco, DB., Giuzio, L., Pompa, M., Cattivelli, L., & Flagella, Z. (2011). Durum wheat salt tolerance in relation to physiological, yield and quality characters. *Cereal Research Communications, 39(4), 525-534.*

63. Bozzini, A. (1988). Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. In: Durum Wheat: Chemistry and Technology, Fabriani, G. and Lintas, C. (eds). AACC, St. Paul, Minnesota, p. 229.

64. Bradford, KJ., Chen, F., Cooley, MB., DahalP Downie, B., Fukunaga, KK., Gee, OH., et al. (2000). Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos J, editors. Seed biology: advances and applications. Wallingford, U.K.: CABI Int., p. 231-51.

65. Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemistry, 72, 248-53.*

66. Bray, EA., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R, Gruissem W, Buchannan B, Jones R, editors. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: MD: American Society of Plant Physiologists, p. 1158–249.

67. Bray, CM. (1995). Biochemical processes during the osmoconditioning of seeds. In Galili, eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker. pp. 767–89

68. Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, GA., & Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter TNHX1 and H^+-pyrophosphatase TVP1 improve salt-and drought-stress tolerance in Arabidopsis thaliana plants. *Journal of Experimental Botany, 58(2), 301-308.*

69. Brosowska-Arendt, W., Gallardo, K., Sommerer, N., & Weidner, S. (2014). Changes in the proteome of pea (*Pisum sativum* L.) seeds germinating under optimal and osmotic stress conditions and subjected to post-stress recovery. *Acta Physiologiae Plantarum, 36(3), 795-807.*

70. Brossa, R., López-Carbonell, M., Jubany-Marí, T., & Alegre, L. (2011). Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient Arabidopsis plants. *Journal of Plant Growth Regulation, 30(3), 322-333.*

71. Bykova, NV., Hoehn, B., Rampitsch, C., Banks, T., Stebbing, JA., Fan, T., et al. (2011). Redox-sensitive proteome and antioxidant strategies in wheat seed dormancy control. *Proteomics, 11, 865–882.*

72. Byrt, CS., Xu, B., Krishnan, M., Lightfoot, DJ., Athman, A., Jacobs, AK., ... & Gilliham, M. (2014). The Na^+ transporter, TaHKT1; 5-D, limits shoot Na^+ accumulation in bread wheat. *The Plant Journal. 80(3), 516–526.*

73. Cakmak, I., Strbac, D., Marschner, H. (1993). Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany, 44,127-32.*

74. Camejo, D., Romero-Puertas, MDC., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, LM., Lázaro, JJ., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2013). Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of proteomics, 79, 87–99.*

75. Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abian, J., & San Segundo, B. (2004). The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics, 4(2), 383–396.*

76. Capriotti, AL., Borrelli, GM., Colapicchioni, V., Papa, R., Piovesana, S., Samperi, R., et al. (2014). Proteomic study of a tolerant genotype of durum wheat under salt-stress conditions. *Analytical and bioanalytical chemistry, 406, 1423–1435.*

77. Capriotti, AL., Caracciolo, G., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Pozzi, D., & Laganà, A. (2011). Shotgun proteomic analytical approach for studying proteins adsorbed onto liposome surface. *Analytical and bioanalytical chemistry, 401, 1195–1202.*

78. Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Laganà A. (2007). Comparison of three different enrichment strategies for serum low molecular weight protein identification using shotgun proteomics approach. *Analytica chimica acta, 740, 58–65.*

79. Caraux G, Pinloche S. (2005). PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics, 21, 1280–1281.*

80. Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P., & Laganà, A. (2008). Identification of changes in Triticum durum L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry, 391(1), 381-390.

81. Catusse, J., Meinhard, J., Job, C., Strub, J. M., Fischer, U., Pestsova, E., ... & Job, D. (2011). Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet. *Proteomics, 11(9), 1569-1580.*

82. Catusse, J., Strub, J. M., Job, C., Van Dorsselaer, A., & Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(29), 10262-10267.*

83. Chang C, Wang B, Shi L, Li Y, Duo L, Zhang W. (2010). Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate. *Journal of plant physiology, 167(14), 1152-1156.*

84. Chang, Y., Xu, K., Zhou, L., & Chen, L. (2013). Ascorbic Acid Mitigating the Inhibition of Salt Stress to Wheat Seedling Growth. *Journal of Triticeae Crops, 1, 030.*

85. Charmet, G. (2011). Wheat domestication: lessons for the future. *Comptes rendus biologies, 334(3), 212-220.*

86. Chauhan, C. P. S., Singh, R. B., & Gupta, S. K. (2008).. Supplemental irrigation of wheat with saline water. *Agricultural Water Management, 95(3), 253-258.*

87. Chávez-Bárcenas AT, Valdez-Alarcón JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, et al. (2000). Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice sps1gene. *Plant Physiology, 124, 641–654.*

88. Chen CC, Sung JM. (2001). Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. *Physiologia Plantarum, 111, 9–16.*

89. Chen, K., & Arora, R. (2013). Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany, 94, 33-45.*

90. Chen, C., Twito, S., & Miller, G. (2014). Arabidopsis ascorbate peroxidase 6 (APX6) protects seeds from oxidative stress and mediates crosstalk between ROS, ABA and auxin in germination control. *Plant Signaling & Behavior, (just-accepted), 00-00.*

91. Chen, D., Ma, X., Li, C., Zhang, W., Xia, G., & Wang, M. (2014). A wheat aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, TaACO1, negatively regulates salinity stress in Arabidopsis thaliana. *Plant cell reports, 1-13.*

92. Chen, S., & Heuer, B. (2013). Effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine on antioxidant enzyme activity in native gels of 7-day-old salt-stressed tomato (Solanum lycopersicum) seedlings. *Scientia Horticulturae, 162, 106-116.*

93. Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M., & Grappin, P. (2006). Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiology, 142(4), 1493-1510.*

94. Chinoy, J. J. (1984). The role of ascorbic acid in growth, differentiation and metabolism of plants (Vol. 5). Springer.

95. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45(2), 437-448.

96. Chourey, K., Ramani, S., Apte, S. K. (2003). Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. J.*ournal Plant Physiology, 160, 1165–1174.*

97. Christov, NK., Christova, PK., Kato, H., Liu, Y., Sasaki, K., & Imai, R. (2014). TaSK5, an abiotic stress-inducible GSK3/shaggy-like kinase from wheat, confers salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry. 84, 251–260.*

98. Colmer, T.D., Munns R. and Flowers, T.J. (2005). Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture, 45, 1425–1443.*

99. Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science, 181(5), 604–611.*

100. Cuin, T. A., Bose, J., Stefano, G., Jha, D., Tester, M., Mancuso, S., & Shabala, S. (2011). Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na^+/H^+ exchangers in salinity tolerance in wheat: in planta quantification methods. *Plant, cell & environment, 34(6), 947–961.*

101. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 57(5), 779–795.*

102. Davenport, R. J., Reid, R. J., & Smith, F. A. (1997). Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiologia Plantarum, 99(2), 323–327.*

103. Davenport, R., James, R. A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., & Munns, R. (2005). Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiology, 137(3), 807–818.*

104. Davey M.W, Van Monatgu M, Sanmatin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I.J.J, Strain J.J, Favell D, Fletcher J. (2000). Plant L-Ascorbic Acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 825–860.*

105. De Castro RD, van-Lammeren AAM, Groot SPC, Bino RJ, Hilhorst HWM. (2000). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology,,122, :327–335.*

106. De Gara L, De Pinto MC, Moliterni VMC, D'Egidio MG (2003). Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany, 54, 249–258.*

107. De Gara L, Paciolla C, De Tullio MC, Motto M, Arrigoni O. (2000). Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum, 109, 7–13.*

108. De Gara L, Pinto MD, Arrigoni O (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum, 100, 894–900.*

109. De Gara, L. (2004). Ascorbate and plant growth–from germination to cell death. Vitamin C: Functions and Biochemistry in Animals and Plants, 83-95.

110. Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science, 19(6), 371-379.*

111. De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, et al. (2008). Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molocular Breeding, 21, 15–26.*

112. De Tullio MC, Arrigoni O. (2003). The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research, 13, 249–60.*

113. Dehghan, G., Rezazadeh, L., & Habibi, G. (2011). Exogenous ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. *Acta Biologica Szegediensis, 55(2), 261-264.*

114. Dell'Aquila A, Spada P. (1992). Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. *Seed Science Research, 2, 75–80.*

115. Dell'Aquila A, Spada P. (1993). The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos. *Annual Botany, 72, 97–101.*

116. Deng, X., Hu, W., Wei, S., Zhou, S., Zhang, F., Han, J. et al. (2013). TaCIPK29, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic tobacco. *PloS one, 8(7), e69881.*

117. Dietz Karl-Josef. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling, 15, 129–159.*

118. Ding, S., Li, Y., & Wang, B. (2004). Effect of exogenous trehalose on salt tolerance of wheat seedlings. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 25(3), 513-518.*

119. Dionisio-Sese ML, Satoshi T. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci., 135:1–9.*

120. Dolatabadian A, Modarres Sanavy SAM. (2008). Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. *Not Bot Hort Agrobot Cluj., 36:61–6.*

121. Dominguez F, Cejudo FJ. (1995). Pattern of endoproteolysis following wheat grain germination. *Physiol Plant., 95:253–9.*

122. Dommes J, Van de Walle C. (1990). Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. Physiol Plant, 79:289–96.

123. Domon B, Aebersold R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. Science, 312:212–7.

124. Dorgham, E.A. (1991). Effect of water stress, irradiation and nitrogen fertilization on grain filling, yield and quality of certain wheat cultivars. Ph.D. Thesis. Ain Shams University, Cairo, Egypt.

125. Dreier W., Gôring M., (1974). Der Einfluss hoher Salzkonzentrationen auf verschiedene physiologische Parameter von Maiswurzeln. Wiss. Z. der HU. Berlin, Nath. *Naturwiss. R., 23, 641-644.*

126. Du CX, Fan HF, Guo SR, Tezuka T, Li J (2010). Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. *Phytochemistry, 71:1450–9.*

127. Du, H. Y., Shen, Y. Z., & Huang, Z. J. (2013). Function of the wheat TaSIP gene in enhancing drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. *Plant molecular biology, 81(4-5), 417-429.*

128. Du, X., Zhao, X., Li, X., Guo, C., Lu, W., Gu, J., & Xiao, K. (2013). Overexpression of TaSRK2C1, a wheat SNF1-related protein kinase 2 gene, increases tolerance to dehydration, salt, and low temperature in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter, 31(4), 810-821.*

129. El Baky, H. A., Hussein, M. M., El-Baroty, G. S., Ibrahem, E. A., & El-Faham, S. Y. (2014). Moringa Stenopetala Leaves Extract Improve Antioxidant Defense Abilities and Salt Tolerance of Wheat Plant Irrigated with Seawater. *The Journal of Agriculture and Natural Resources Sciences, 1(1), 6-17.*

130. El Malki, S., El Habbani, R., Tahaikt, M., Zeraouli, M., & Elmidaoui, A. (2007). The desalination of salt water destine to irrigation by electrodialysis and its effects on the germination, growth and seed yield of wheat (Triticum durum Desf. Var. Karim). African Journal of Agricultural Research, 2(2), 41-46.

131. Eldakak, M., Milad, S. I., Nawar, A. I., & Rohila, J. S. (2013). Proteomics: a biotechnology tool for crop improvement. Frontiers in plant science, 4. 35. doi:10.3389/fpls.2013.00035

132. El-Feky, S. S., & Abo-Hamad, S. A. (2014). Effect of Exogenous Application of Brassinolide on Growth and Metabolic Activity of Wheat Seedlings under Normal and Salt Stress Conditions. Annual Review & Research in Biology,4(24).

133. El-Samad, H. M. A. (2013). The physiological response of wheat plants to exogenous application of gibberellic acid (GA_3) or indole-3-acetic acid (IAA) with endogenous ethylene under salt stress conditions. International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 5(4), 58-64.

134. El-Sayed, A. I., Rafudeen, M. S., & Golldack, D. (2014). Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. Plant Biology, 16(1), 1-8.

135. Fábián, A., Jäger, K., Rakszegi, M., & Barnabás, B. (2011). Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. Plant cell reports, 30(4), 551-563.

136. Eskandari, H., & Kazemi, K. (2011). Germination and Seedling Properties of Different Wheat Cultivars under Salinity Conditions. Notulae Scientia Biologicae, 3(3), 130-134.

137. FAO, (2008). Land and plant nutrition management service. Available online at: http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/ Accessed 25 April. 2010

138. FAO, (2011). Les semences dans les situations d'urgence, manuel technique. Available frome the web site. http://www.fao.org/docrep/015/i1816f/i1816f00.pdf

139. FAO, (2009). High Level Expert Forum—How to Feed the World in 2050, Economic and Social Development, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.

140. Farooq, M., Basra, S. M. A., & Hafeez, K. (2006). Seed invigoration by osmohardening in coarse and fine rice. Seed Science and Technology, 34(1), 181-187.

141. Farooq, M., Irfan, M., Aziz, T., Ahmad, I., & Cheema, S. A. (2013). Seed priming with ascorbic acid improves drought resistance of wheat. Journal of Agronomy and Crop Science, 199(1), 12-22.

142. Feki, K., Quintero, F. J., Khoudi, H., Leidi, E. O., Masmoudi, K., Pardo, J. M., & Brini, F. (2014). A constitutively active form of a durum wheat Na+/H+ antiporter SOS1 confers high salt tolerance to transgenic Arabidopsis. Plant cell reports, 33(2), 277-288.

143. Fercha, A. (2011). Some Physiological and Biochemical Effects of NaCl Salinity on Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). Advances in Biological Research, 5(6), 315-322.

144. Fercha, A., Gherroucha, H., & Baka, M. (2011). Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 7(1), 27-37.

145. Fercha, A., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Gherroucha, H., Samperi, R., ... & Lagana, A. (2013). Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat. Journal of proteomics, 91, 486-499.

146. Fercha, A., & Gherroucha, H. (2014). The role of osmoprotectants and antioxidant enzymes in the differential response of durum wheat genotypes to salinity. Journal of Applied Botany and Food Quality, 87.

147. Fercha, A., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., & Laganà, A. (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. Journal of proteomics, 108, 238-257.

148. Fethi, B., Neila, R., Mourad, S., Nouari, M., & Mohamed, E. G. (2013). Genetic adaptability of durum wheat to salinity level at germination stage. African Journal of Biotechnology, 10(21), 4400-4404.

149. Feuillet, C., Langridge, P., & Waugh, R. (2008). Cereal breeding takes a walk on the wild side. Trends in Genetics, 24(1), 24-32.

150. Ficco, D. B., Mastrangelo, A. M., Trono, D., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., ... & Papa, R. (2014). The colours of durum wheat: a review. Crop and Pasture Science, 65(1), 1-15.

151. Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. Plant Physiology, 129(3), 1308-1319.

152. Flagella Z, Trono D, Pompa M, Di Fonzo N, Pastore D. (2006). Seawater stress applied at germination affects mitochondrial function in durum wheat (*Triticum durum*) early seedlings. Funct Plant Biol., 33,357–66.

153. Flowers, T. J., Troke, P. F., & Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. Annual Review of Plant Physiology, 28(1), 89-121.

154. Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?. Functional Plant Biology, 22(6), 875-884.

155. Ford, K. L., Cassin, A., & Bacic, A. (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. Frontiers in plant science, 2.

156. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. The Plant Cell Online, 17(7), 1866-1875.

157. Francois, L. E., Maas, E. V., Donovan, T. J., & Youngs, V. L. (1986). Effect of salinity on grain yield and quality, vegetative growth, and germination of semi-dwarf and durum wheat. Agronomy Journal, 78(6), 1053-1058.

158. Fredolini C, Meani F, Reeder KA, Rucker S, Patanarut A, Botterell PJ, et al. (2008). Concentration and preservation of very low abundance biomarkers in urine, such as human growth hormone (hGH), by Cibacron Blue F3G-A loaded hydrogel particles. Nano Res, 1:502–18.

159. Fu, Q., Wang, B., Jin, X., Li, H., Han, P., Wei, K. H., ... & Zhu, Y. (2005). Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating Arabidopsis seeds and young seedlings. Journal of biochemistry and molecular biology, 38(6), 650.

160. Fu, Z., Jin, X., Ding, D., Li, Y., Fu, Z., & Tang, J. (2011). Proteomic analysis of heterosis during maize seed germination. Proteomics, 11(8), 1462-1472.

161. Galland, M., Huguet, R., Arc, E., Cueff, G., Job, D., & Rajjou, L. (2014). Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during Arabidopsis seed germination. Molecular & Cellular Proteomics, 13(1), 252-268.

162. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., & Job, D. (2001). Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. Plant Physiology, 126(2), 835-848.

163. Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, et al. (2002a). Importance of methionine biosynthesis for Arabidopsis seed germination and seedling growth. Physiol Plant, 16,238–47.

164. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., & Job, D. (2002b). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. Plant Physiology, 129(2), 823-837.

165. Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. (2003). Proteomics of Medicago truncatula seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. Plant Physiol.,133, 664–82.

166. Gallie, D. R. (2013). The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. Journal of experimental botany, 64(2), 433-443.

167. Gao, F., Rampitsch, C., Chitnis, V. R., Humphreys, G. D., Jordan, M. C., & Ayele, B. T. (2013). Integrated analysis of seed proteome and mRNA oxidation reveals distinct post-transcriptional features regulating dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant biotechnology journal, 11(8), 921-932.

168. Garg O. P., Kapoor V.(1972). Retardation of leaf senescence by ascorbic acid. J. *Exp. Bot*, 23, (76): 699-703.

169. Garg, B., Jaiswal, J. P., Misra, S., Tripathi, B. N., & Prasad, M. (2012). A comprehensive study on dehydration-induced antioxidative responses during germination of Indian bread wheat (Triticum aestivum L. em Thell) cultivars collected from different agroclimatic zones. Physiology and Molecular Biology of Plants, 18(3), 217-228.

170. Gholamin, R., & Khayatnezhad, M. (2013). The Effects of water and salt stresses on germination in two bread wheat genotypes. African Journal of Biotechnology, 10(77), 17789-17792.

171. Gierth, M., & Mäser, P. (2007). Potassium transporters in plants–Involvement in K^+ acquisition, redistribution and homeostasis. FEBS letters, 581(12), 2348-2356.

172. Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, et al. (2009). GDP-d-mannose 3, 5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. Plant J., 60:499–508.

173. Gillies, S. A., Futardo A., & Henry R.J. (2012). Gene expression in the developing aleurone and starchy endosperm of wheat. Plant Biotechnol. J. 10, 668-679

174. Gläser HU, Thomas D, Gaxiola R, Montrichard F,Surdin-Kerjan Y, Serrano R. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae involve a putative phosphatase gene. EMBO J., 12:3105.

175. Goellner, K., & Conrath, U. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. European Journal of Plant Pathology, 121(3), 233-242.

176. Golldack, D. (2004). Molecular responses of halophytes to high salinity. In Progress in Botany (pp. 219-234). Springer Berlin Heidelberg.

177. Gondim, F. A., Miranda, R. D. S., Gomes-Filho, E., & Prisco, J. T. (2013). Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H2O2 leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 25(4), 251-260.

178. González L, González-Vilar M (2001). Determination of relative water content. In: Reigosa Roger MJ (ed) Handbook of plant ecophysiology techniques. Kluwer Publishers, pp 207-212

179. Gooding MJ, Ellis RH, Shewry PR, Schofield JD. (2003). Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. J Cereal Sci.,37:295–309.

180. Goyal, K., Walton, L. J., Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochem. J., 388, 151–157

181. Grieve, C. M., Lesch, S. M., Francois, L. E., & Maas, E. V. (1992). Analysis of main-spike yield components in salt-stressed wheat. Crop science, 32(3), 697-703.

182. Guo, B., Chen, Y., Zhang, G., Xing, J., Hu, Z., Feng, W., ... & Sun, Q. (2013). Comparative proteomic analysis of embryos between a maize hybrid and its parental lines during early stages of seed germination. PloS one, 8(6), e65867.

183. Gupta B & Huang B (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization," International Journal of Genomics, article ID 701596, 18 pages. http://downloads.hindawi.com/journals/ijg/2014/701596.pdf

184. Gurusinghe S, Bradford KJ. (2001). Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Sci Res;11: 121–33.

185. Habash DZ, Kehel Z, Nachit M. (2009). Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. J Exp Bot.,;60:2805–15.

186. Hajlaoui, H., Denden, M., & Bouslama, M. (2007). Etude de la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (Cicer arietinum L.) au stade germination. Tropicultura, 25(3), 168-173.

187. Hakeem, K. R., Chandna, R., Ahmad, P., Iqbal, M., & Ozturk, M. (2012). Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. Omics: a journal of integrative biology, 16(11), 621-635.

188. Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Shin, J. H., Ahmad, B., Shin, D. H., & Lee, I. J. (2010). Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. Journal of agricultural and food chemistry, 58(12), 7226-7232.

189. Hamdy A. (1999). Saline irrigation assessment for a sustainable use. Saline irrigation. Halophyte production and utilization. Project 18:152-26.

190. Hameed, A., Rasheed, A., Gul, B., & Khan, M. A. (2014). Salinity inhibits seed germination of perennial halophytes Limonium stocksii and Suaeda fruticosa by reducing water uptake and ascorbate dependent antioxidant system. Environmental and Experimental Botany. Volume 107, November 2014, Pages 32–38

191. Hazmoune, T., (2006). Le semis profond comme palliatif à la sècheresse. Rôle du coléoptile dans la levée et conséquences sur les composantes du rendement .Thèse d'état Uni. Constantine, 138p.

192. Han, C., Wang, K., & Yang, P. (2014). Gel-based comparative phosphoproteomic analysis on rice embryo during germination. Plant and Cell Physiology, pcu060.

193. Han, C., Yang, P., Sakata, K., & Komatsu, S. (2014). Quantitative proteomics reveals the role of protein phosphorylation in rice embryos during early stages of germination. Journal of proteome research, 13(3), 1766-1782.

194. Han, C., Yin, X., He, D., & Yang, P. (2013). Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. PloS one, 8(2), e56947.

195. Hanana M, Lamia H, Cagnac O, Blumwald, E (2011). Cellular mechanisms and strategies of salinity tolerance in plants. Env. Rev. 19: 121-140.

196. Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. Plant signaling & behavior, 6(10), 1503.

197. Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant growth regulation, 21(2), 79-102.

198. Hartmann, HT, DE Kester, FT Davies, Jr., & RL Geneve. 2011. Hartmann and Kester's Plant Propagation - Principles and Practices. 8th ed. (Prentice Hall). Upper Saddle River, New Jersey. 915 pp.

199. Harvey, D. M., & Thorpe, J. R. (1986). Some observations on the effects of salinity on ion distributions and cell ultrastructure in wheat leaf mesophyll cells. Journal of experimental botany, 37(1), 1-7.

200. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. InEcophysiology and responses of plants under salt stress (pp. 25-87). Springer New York.

201. Haslekas C, Viken MK, Grini PE, Nygaard V, Nordgard SH, Meza TJ, et al. (2003). Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. Plant Physiol;133:1148–57.

202. He D, Han C, Yao J, Shen S, Yang P. (2011). Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. Proteomics,11:2693–713.

203. He, X., Huang, X., Shen, Y., & Huang, Z. (2014). Wheat V-H+-ATPase Subunit Genes Significantly Affect Salt Tolerance in Arabidopsis thaliana. PloS one,9(1), e86982.

204. Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F. (1994). Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. New Phytol., 126:37–44.

205. Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, Del Rio LA. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Sci;105:151–67.

206. Heydecker W, Higgins J, Gulliver R (1973). Accelerated germination by osmotic seed treatment. Nature;246:42–4.

207. Holdsworth, M. J., Finch-Savage, W. E., Grappin, P., & Job, D. (2008). Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. Trends in plant science,13(1), 7-13

208. Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant physiology, 122(4), 1129-1136.

209. Horling F, Lamkemeyer P, König J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, et al. (2003). Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. Plant Physiol;131:317–25.

210. Hossain, M. M., Li, X., Evans, I. H., & Rahman, M. A. (2014). A Proteomic Analysis of Seed Proteins Expressed in a Brassica Somatic Hybrid and its two Parental Species. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 24(1), 11-26.

211. Hou, X., Liang, Y., He, X., Shen, Y., & Huang, Z. (2013). A novel ABA-responsive TaSRHP gene from wheat contributes to enhanced resistance to salt stress in Arabidopsis thaliana. Plant Molecular Biology Reporter, 31(4), 791-801.

212. Houshmand, S., Arzani, A., & Mirmohammadi-Maibody, S. A. M. (2014). Effects of Salinity and Drought Stress on Grain Quality of Durum Wheat.Communications in Soil Science and Plant Analysis, 45(3), 297-308.

213. Howladar, S. M., & Dennett, M. (2014) Improvement of Salt Tolerance in Saudi Arabian Wheat by Seed Priming or Foliar Spray with Salicylic Acid. International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering Vol:8 No:2, 22. 2014.

214. Hsiao PY, Su RC, Ko SS, Tong CG, Yang RY, Chan MT. (2008). Overexpression of Arabidopsis thaliana tryptophansynthase beta 1 (AtTSB1) in Arabidopsis and tomato confers tolerance to cadmium stress. Plant Cell Environ;31:1074–85.

215. Hu, Y., Fromm, J., & Schmidhalter, U. (2005). Effect of salinity on tissue architecture in expanding wheat leaves. Planta, 220(6), 838-848.

216. Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2007). Effect of salinity on the composition, number and size of epidermal cells along the mature blade of wheat leaves.Journal of Integrative Plant Biology, 49(7), 1016-1023.

217. Hu, M., Shi, Z., Zhang, Z., Zhang, Y., & Li, H. (2012). Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. Plant Growth Regulation, 68(2), 177-188.

218. Hu, J., Rampitsch, C., & Bykova, N.V. (2015). Advances in plant proteomics towards improvement of crop productivity and stress resistance. *Frontiers in Plant Science, 6, 209.*

219. Hugouvieux V, Dutilleul C, Jourdain A, Reynaud F, Lopez V, Bourguignon J. (2009). Arabidopsis putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. J *Plant Physiol;151:768–81.*

220. Hung S.H, Yu C-W, Lin CH. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10

221. Hurkman WJ, Tanaka CK. (2007). Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. J Chromatogr B;849:344–50.

222. Hurkman WJ, Tanaka CK. (2004). Improved methods for separation of wheat endosperm proteins and analysis by two- dimensional gel electrophoresis. J Cereal Sci; 40:295–9.

223. Hwang Y, Bethke PC, Gubler F, Jones RL (2003). cPrG-HCl a potential H +/Cl – symporter prevents acidification of storage vacuoles in aleurone cells and inhibits GA-dependent hydrolysis of storage protein and phytate. Plant J;35:154–63.

224. Iba K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Annu Rev Plant Biol;53:225–45.

225. Ino, Y., Ishikawa, A., Nomura, A., Kajiwara, H., Harada, K., & Hirano, H. (2014). Phosphoproteome analysis of Lotus japonicus seeds. Proteomics, 14(1), 116-120.

226. Iqbal, R. M. (2003a). Leaf area and ion contents of wheat grown under NaCl and Na2SO4 salinity. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6, 1512-1514.

227. Iqbal, RM. (2003b). Leaf extension growth of wheat grown under NaCl and Na2S04 salinity. Asian J. Plant Sci. 2 : 1092-1096

228. Iqbal, RM. (2005). Effect of Different Salinity Levels On Partitioning of Leaf Area and Dry Matter in Wheat. Asian Journal of Plant Sciences4, 3, 244-248.

229. Iqbal, M., & Ashraf, M. (2013a). Alleviation of salinity-induced perturbations in ionic and hormonal concentrations in spring wheat through seed preconditioning in synthetic auxins. Acta Physiologiae Plantarum, 35(4), 1093-1112

230. Iqbal, M., & Ashraf, M. (2013b). Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. Environmental and Experimental Botany, 86, 76-85.

231. Iqbal, N., Umar, S., Khan, NA., & Khan, MIR. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. Environmental and Experimental Botany, 100, 34-42.

232. Irar S, Brini F, Goday A, Masmoudi K, Pagès M. (2010). Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D)-a wider perspective of the proteome. J Proteomics;73:1707–21.

233. Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M. (2006). Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. Plant Prod Sci., 9:172–5.

234. Ishikawa, T., Uchimiya, H., & Kawai-Yamada, M. (2012). The Role of Plant Bax Inhibitor-1 in Suppressing H2O2-Induced Cell Death. Methods in enzymology, 527, 239-256.-

235. Jafar MZ, Farooq M, Cheema MA, Afzal I, Basra SMA, Wahid MA, et al. (2012). Improving the performance of wheat by seed priming under saline conditions. J Agron Crop Sci;198: 38–45.

236. Jaillais Y, Chory J. (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature Structural & Molecular Biology, 17, 642-645.*

237. James, R. A., Rivelli, A. R., Munns, R., & von Caemmerer, S. (2002). Factors affecting CO2 assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology, 29(12), 1393-1403.*

238. Jiang, Q., Hu, Z., Zhang, H., & Ma, Y. (2014). Overexpression of GmDREB1 improves salt tolerance in transgenic wheat and leaf protein response to high salinity. *The Crop Journal, 2(2), 120-131.*

239. Job D, Capron I, Job C, Dacher F, Corbineau F, Côme D. (2000). Identification of germination-specific protein markers and their use in seed priming technology. In: Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos J, editors. Seed biology: advances and applications. Wallingford, U.K.: CAB Int.; . p. 449–59.

240. Jones, JD., & Dangl, JL. (2006). The plant immune system. Nature,444(7117), 323-329.

241. Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., & Waaland, S. (2012). The molecular life of plants. John Wiley & Sons.

242. Kahrizi, S., & Sedghi, M. (2013). Effect of Salt Stress on Grain Reserve Composition in Ten Durum Wheat Cultivars. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(3), 113-121.

243. Kamal, AHM., Rashid, H., Sakata, K., & Komatsu, S. (2015). Gel-Free Quantitative Proteomics Approach to Identify Cotyledon Proteins in Soybean under Flooding Stress. Journal of proteomics. Journal of Proteomics. 112, 1–13.

244. Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y. H., Kim, J. H., Kim, J. G., ... & Lee, I. J. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in Cucumis sativus. Journal of Plant Interactions, 9(1), 673-682.

245. Kara, B., & Kara, N. (2010). Effect of different salinity (NaCl) concentrations on the first development stages of root and shoot organs of wheat. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 25(1), 37-43.

246. Kashem, M. A., Sultana, N., Ikeda, T., Hori, H., Loboda, T., & Mitsui, T. (2000). Alteration of starch-sucrose transition in germinating wheat seed under sodium chloride salinity. Journal of Plant Biology, 43(3), 121-127.

247. Katerji, N., Van Hoorn, J. W., Fares, C., Hamdy, A., Mastrorilli, M., & Oweis, T. (2005). Salinity effect on grain quality of two durum wheat varieties differing in salt tolerance. Agricultural water management, 75(2), 85-91.

248. Kausar, F., & Shahbaz, M. (2013). Interactive effect of foliar application of nitric oxide (NO) and salinity on wheat (Triticum aestivum L.). Pak. J. Bot, 45, 67-73.

249. Kaya, C., Tuna, A. L., & Yokaş, I. (2009). The role of plant hormones in plants under salinity stress. In Salinity and Water stress (pp. 45-50). Springer Netherlands.

250. Kaya, G., Kaya, M. D., Caliskan, M., & Arslan, Y. (2009). Comparative analysis for germination and seedling growth of wheat with some competitive weeds under salinity. J. Food Agric. Environ, 7, 534-536.

251. Kerchev, P., Mühlenbock, P., Denecker, J., Morreel, K., Hoeberichts, F. A., Van Der Kelen, K., ... & Van Breusegem, F. (2014). Activation of auxin signalling counteracts photorespiratory H2O2-dependent cell death. Plant, Cell & Environment.

252. Kezih, R., Bekhouche, F., & Merazka, A. (2014). Some traditional Algerian products from durum wheat. African Journal of Food Science, 8(1), 30-34.

253. Khan AA. (1992). Preplant physiological seed conditioning. Hortic Rev.,13:131–81.

254. Khan MB, Gurchani MA, Hussain M, Freed S, Mahmood K. (2011). Wheat seed enhancement by vitamin and hormonal priming. Pak J. Bot. 43:1495–1499

255. Khan MSA, Hamid A, Karim MA. (1997). Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Agronomy and Crop Science, 179(3), 163-169.

256. Khan, A., Shaheen Z, & Nawaz, M (2013). Amelioration of salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by foliar application of nitrogen and potassium. Sci., Tech. and Dev, 32(2), 85-98.

257. Khan, A., Lang, I., Amjid, M., Shah, A., Ahmad, I., & Nawaz, H. (2013). Inducing salt tolerance on growth and yield of sunflower by applying different levels of ascorbic acid. Journal of Plant Nutrition, 36(8), 1180-1190.

258. Kim, S. G., & Park, C. M. (2008). Gibberellic acid-mediated salt signaling in seed germination. Plant signaling & behavior, 3(10), 877-879.

259. Kim, S. T., Wang, Y., Kang, S. Y., Kim, S. G., Rakwal, R., Kim, Y. C., & Kang, K. Y. (2009). Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. Journal of proteome research, 8(7), 3598-3605.

260. Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., & Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiology, 108(4), 1387-1394.

261. Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. Humangenetik, 26(3), 231-243.

262. Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. Plant cell reports, 32(7), 945-957.

263. Kong L, Wang M, Bi D (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. Plant Growth Regul 2005;45:155–63.

264. Koorneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C. J., van Loenen-Martinet, E. P., van Rijn, L. and Zeevaart, J. A. D. (1985), A gibberellin insensitive mutant of Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum, 65: 33–39. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb02355.x

265. Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., & Prášil, I. T. (2013). Plant proteome responses to salinity stress–comparison of glycophytes and halophytes.Functional Plant Biology, 40(9), 775-786.

266. Kosová, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I.T.; Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. J. Proteomics,74, 1301-1322

267. Kotuby-Amacher, J., Koenig, K., & Kitchen, B. (2000). Salinity and plant tolerance. Available at https://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG-SO-03.pdf

268. Kriedemann, P.E. (1986). Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. Aust. J. Plant. Physiol., 87: 878-882.

269. Lacerda, C.F., J. Cambraia, M. Cano, H. Ruiz & Prisco J.T. (2003). Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. Environ. Exp. Bot., 49: 107-120.

270. Larcher W. (1980). Ecological plant physiology, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin. 303 pp.

271. Latique, S., Elouaer, M. A., Chernane, H., Hannachi, C., & Elkaoua, M. (2014). Effect of Seaweed Liquid Extract of Sargassum vulgare on Growth of Durum Wheat Seedlings (*Triticum durum* L) under salt stress. International Journal of Innovation and Applied Studies, 7 (4), 1430-1435

272. Läuchli A, Grattan SR. (2007). Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM, editors. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Netherland: Springer. p. 285–315.

273. Lazof, D. & Bernstein N. (1998). The NaCl-induced inhibition of shoot growth: the case for disturbed nutrition with special consideration of calcium nutrition. Adv. Bot. Res., 29: 113-119.

274. Lea PJ, Sodek L, Parry MA, Shewry PR, Halford NG. (2007). Asparagine in plants. Ann Appl. Biol., 150:1–26.

275. Lee JH, Kim WT (2011). Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis. Mol Cells, 31:201–8.

276. Lee, Y. P., Baek, K. H., Lee, H. S., Kwak, S. S., Bang, J. W., & Kwon, S. Y. (2010). Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. Journal of experimental botany, 61(9), 2499-2506.

277. Lei YB, Song SQ, Fu JR (2005). Possible involvement of anti-oxidantenzymes in the cross-tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress. J Integr Plant Biol., 47:1211–9.

278. Li XJ, Yang MF, Chen H, Qu LQ, Chen F, Shen SH. (2010). Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. Biochim Biophys Acta1804, 929–40.

279. Li, G., Peng, X., Wei, L., & Kang, G. (2013). Salicylic acid increases the contents of glutathione and ascorbate and temporally regulates the related gene expression in salt-stressed wheat seedlings. Gene, 529(2), 321-325.

280. Li, X., Guo, C., Gu, J., Duan, W., Zhao, M., Ma, C., ... & Xiao, K. (2014). Overexpression of VP, a vacuolar H+-pyrophosphatase gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), improves tobacco plant growth under Pi and N deprivation, high salinity, and drought. Journal of experimental botany, 65(2), 683-696.

281. Liang, W., Cui, W., Ma, X., Wang, G., & Huang, Z. (2014). Function of wheat Ta-UnP gene in enhancing salt tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. Biochemical and biophysical research communications, 450(1), 794-801.

282. Liu, P., Xu, Z. S., Pan-Pan, L., Hu, D., Chen, M., Li, L. C., & Ma, Y. Z. (2013). A wheat PI4K gene whose product possesses threonine autophosphorylation activity confers tolerance to drought and salt in Arabidopsis. Journal of experimental botany, 64(10), 2915-2927.

283. Liu, S. J., Xu, H. H., Wang, W. Q., Li, N., Wang, W. P., Møller, I. M., & Song, S. Q. (2014). A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. Physiologia plantarum. DOI: 10.1111/ppl.12292

284. Lu, W., Guo, C., Li, X., Duan, W., Ma, C., Zhao, M., ... & Xiao, K. (2014). Overexpression of TaNHX3, a vacuolar Na^+/H^+-antiporter gene in wheat, enhances salt stress tolerance in tobacco by improving related physiologicalprocesses. Plant Physiology and Biochemistry, 76, 17-28.

285. Luan, S., Lan, W., & Chul Lee, S. (2009). Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL–CIPK network. Current opinion in plant biology, 12(3), 339-346.

286. Maas, E.V., & Poss, J. A. (1989). Salt sensitivity of wheat at various growth stages. Irrigation Science, 10(1), 29-40.

287. Maathuis, F.J. (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. Journal of Experimental Botany, 57(5), 1137-1147.

288. Mahdid, M., Kameli, A., Ehlert, C., & Simonneau, T. (2011). Rapid changes in leaf elongation, ABA and water status during the recovery phase following application of water stress in two durum wheat varieties differing in drought tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 49(10), 1077-1083.

289. Mak Y, Willows RD, Roberts TH, Wrigley CW, Sharp PJ, Copeland L. (2009). Germination of wheat: a functional proteomics analysis of the embryo. Cereal Chem;86:281–9.

290. Makhloufi, E., Yousfi, F. E., Marande, W., Mila, I., Hanana, M., Bergès, H., ... & Bouzayen, M. (2014). Isolation and molecular characterization of ERF1, an ethylene response factor gene from durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum), potentially involved in salt-stress responses. Journal of experimental botany, eru352.

291. Mammadov, J. A. (1999). Evaluation of Drought-and Salt-Resistance During the Germination of Selected Durum Wheat Lines. Turkish Journal of Biology, 23(2),177-186.

292. Mandy HM, Callis J. (2010). BRIZ1 and BRIZ2 proteins form a heteromeric E3 ligase complex required for seed germination and post-germination growth in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem., 285:37070–81.

293. Mansour, MMF. (1998). Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. Plant Physiology and Biochemistry, 36(10), 767-772.

294. McDonald, M.B., (2000). Seed priming. In: Black M, Bewley JD (eds) Seed Technology and Its Biological Basis. Sheffield Academic Press, Sheffield, England., pp: 287-325.

295. Meunier B, Dumas E, Piec I, Béchet D, Hébraud M, Hocquette JF. (2007). Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. J Proteome Res., 6:358–66.

296. Mguis, K., Albouchi, A., Abassi, M., Khadhri, A., Ykoubi-Tej, M., Mahjoub, A., ... & Ouerghi, Z. (2013). Responses of leaf growth and gas exchanges to salt stress duri ng reproductive stage in wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth. and wheat (*Triticum durum* Desf.). Acta Physiologiae Plantarum, 35(5), 1453-1461.

297. Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2009). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ 33:453–467

298. Minhas D, Grover A. (1999). Transcript levels of genesencoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. Plant Sci., 146:41–51.

299. Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany, 99, 110-121.

300. Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 9:405–410

301. Mohan, A., Schillinger, W. F., & Gill, K. S. (2013). Wheat Seedling Emergence from Deep Planting Depths and Its Relationship with Coleoptile Length. PloS one, 8(9), e73314.

302. Mojid, M. A., Mia, M. S., Saha, A. K., & Tabriz, S. S. (2014). Growth stage sensitivity of wheat to irrigation water salinity. Journal of the Bangladesh Agricultural University, 11(1), 147-152.

303. Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, et al. (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA;100:358–63.

304. Morgan, S. H., Lindberg, S., & Mühling, K. H. (2013). Calcium supply effects on wheat cultivars differing in salt resistance with special reference to leaf cytosol ion homeostasis. Physiologia plantarum, 149(3), 321-328.

305. Mostofa, M. G., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2014). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. Protoplasma, 1-15.

306. Müller, K., Job, C., Belghazi, M., Job, D., & Leubner-Metzger, G. (2010). Proteomics reveal tissue-specific features of the cress (*Lepidium sativum* L.) endosperm cap proteome and its hormone-induced changes during seed germination. Proteomics, 10(3), 406-416.

307. Munns, R., & Rawson, H. M. (1999). Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. Functional Plant Biology, 26(5), 459-464.

308. Munns, R. (2002a). Salinity, growth and phytohormones. In Salinity: environment-plants-molecules (pp. 271-290). Springer Netherlands.

309. Munns, R., (2002b). Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environ., 25: 239-250.

310. Munns, R., Goyal, S., & Passioura, J. (2004). Salinity stress and its mitigation. Plant Stress Website. Blum A. (ed.). Available at http://www.plantstress.com/Articles/index.asp .

311. Munns R. and Tester M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 651-8.

312. Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., ... & Gilliham, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na^+ transporter gene. Nature biotechnology, 30(4), 360-364.

313. Murata, Y., Yoshihashi, M., Obi, I., & Kakutani, T. (1998). Ca^{2+} regulation of outward rectifying K^+ channel in the plasma membrane of tobacco cultured cells in suspension: a role of the K^+ channel in mitigation of salt-stress effects by external Ca^{2+}. Plant and cell physiology, 39(10), 1039-1044.

314. Mutlu, S., & Atici, ö. (2013). Alleviation of high salt toxicity-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment in two wheat cultivars. Toxicology and industrial health, 29(1), 89-96.

315. Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments (Vol. 705). John Wiley & Sons.

316. Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., & Shinozaki, K. (2003). Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. Plant and Cell Physiology, 44(5), 541-548.

317. Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA (2013). Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. Biol Trace Elem Res 2013;151:284–93.

318. Naydenov NG, Khanam S, Siniauskaya M, Nakamura C. (2010). Profiling of mitochondrial transcriptome in germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses. Genes Genet Syst,85:31–42.

319. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem., 75:4646–58.

320. Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. Nat Methods;4:787–97.

321. Nouri, M. Z., Toorchi, M., & Komatsu, S. (2011). Proteomics approach for identifying abiotic stress responsive proteins in soybean. Soybean-Molecular Aspects of Breeding, 187-214.

322. O'Brien L, DePauw R. (2004). Wheat. In: Wrigley C, Corke H, Walker CH, editors. Encyclopedia of grain science, vol. 3. U.K.: Elsevier Ltd.; p. 330–6.

323. Oertli, JJ. (1987). Exogenous application of vitamins as regulators for growth and development of plants—a review. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 150(6), 375-391.

324. O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of biological chemistry, 250(10), 4007-4021.

325. Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol., 150:494–505.*

326. Osborn, TB. (1907). The proteins of the wheat kernel. Carnegie Inst Washington Publ 84: pp. 1-119

327. Ouyang B, Yang T, Li H, Zhang L, Zhang Y, Zhang J, et al. (2007). Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *J Exp Bot.* 58,507–20.

328. Ozhan, N., & Hajibabaei, M. (2013). Effect of Exogenous Hormone Treatment in Germination of Spring Wheat under Salinity Stress. *International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(9), 2220-2224.*

329. Pahlavan-Rad, M. R., Movahedi-Naeini, SAR., & Pessarakli, M. (2010). Responses of wheat plants in terms of soil water content, bulk density, salinity, and root growth under different planting systems and various irrigation frequencies. *Journal of plant nutrition, 33(6), 874-888.*

330. Panchaud A, Affolter M, Moreillon P, Kussmann M. (2008). Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *Journal of Proteomics, 71;19–33.*

331. Papp, JC., Ball, MC., & Terry, N. (1983). A comparative study of the effects of NaCl salinity on respiration, photosynthesis, and leaf extension growth in *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *Plant, Cell & Environment, 6(8), 675-677.*

332. Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., ... & Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell, 15(4), 939-951.*

333. Paulsen, G.M., (1987). Wheat Stand Establishment. In: Heyne, E.G. (ed.), Wheat and wheat improvement, 384-389. ASA, CSSA and SSSA, Madison.

334. Pbice, C. E. (1966). Ascorbic acid stimulation of RNA synthesis. *Nature, 212: 1481*

335. Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., ... & Abdala, G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. Plant Growth Regulation, 41(2), 149-158.

336. Petrussa E, Casolo V, Peresson C, Krajňáková J, Macrì F, Vianello A. (2008). Activity of a channel in Arum spadixmitochondria during thermogenesis. *J Plant Physiol., 165:1360–9.*

337. Pitann, B., S. Schubert and K.H. Mühling, (2009). Decline in leaf growth under salt stress is due to an inhibition of H^+ pumping activity and increase in apoplastic pH of maize (Zea mays L.) leaves. J. Plant Nutrition and Soil Sci., 172(4): 535-543.

338. Potters, G., Horemans, N., & Jansen, M. A. (2010). The cellular redox state in plant stress biology–a charging concept. Plant Physiology and Biochemistry,48(5), 292-300.

339. Prescott, A. G., & John, P. (1996). Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. Annual review of plant biology, 47(1), 245-271.

340. Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ (2009). An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. Plant J., 57:132–45.

341. Puniran-Hartley, N., Hartley, J., Shabala, L., & Shabala, S. (2014). Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: In planta evidence for cross-tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 83, 32-39.

342. Qi YC, Liu WQ, Qiu LY, Zhang SM, Ma L, Zhang H. (2010). Overexpression of glutathione S-transferase gene increases salt tolerance of Arabidopsis. Russ J Plant Physiol;57:233–40.

343. Qiao, P., Lu, C. F., Li, H. M., Jin, D. S., Li, H. Y., Yu, M., et al. (2013). Influence of salt on seed germination and seedling physiological characteristics of mutagenic wheat. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 6, 013.

344. Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(12), 8436-8441.

345. Qiu, Z., Guo, J., Zhu, A., Zhang, L., & Zhang, M. (2014). Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. Ecotoxicology and environmental safety, 104, 202-208.

346. Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, et al. (2012). Seed germination and vigor. Annu Rev Plant Biol., 63:507–33.

347. Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., & Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant physiology, 141(3), 910-923.

348. Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., & Job, D. (2004). The effect of α-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. Plant Physiology, 134(4), 1598-1613.

349. Ramade F., (2008). Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité, Paris, Dunod, 726 p.

350. Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. SpringerPlus, 2(1), 6.

351. Ramezani, A., Niazi, A., Abolimoghadam, A. A., Babgohari, M. Z., Deihimi, T., Ebrahimi, M., ... & Ebrahimie, E. (2013). Quantitative expression analysis of TaSOS1 and TaSOS4 genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. Molecular biotechnology, 53(2), 189-197.

352. Rao, A., Ahmad, S. D., Sabir, S. M., Awan, S. I., Shah, A. H., Abbas, S. R., ... & Chaudhary, A. (2013). Potential antioxidant activities improve salt tolerance in ten varieties of wheat (Triticum aestivum L.). American Journal of Plant Sciences, 4, 69.

353. Reid, M.E. (1937). Localization of ascorbic acid in the cowpea plant at different periods of development. *Am. J. Bot.* 24: 445-57.

354. Roberts, S.K., et Tester, M. (1997). A patch clamp study of Na+ transport in maize roots. J. Exp. Bot. 48 (Special) : 431–440.

355. Roberts TH, Marttila S, Rasmussen SK, Hejgaard J (2003). Differential gene expression for suicide-substrate serine proteinase inhibitors (serpins) in vegetative and grain tissues of barley.J Exp Bot., 54:2251–63.

356. Rocha PSCF, Sheikh M, Melchiorre R, Fagard M, Boutet S, Loach R, et al. (2005). The Arabidopsis homology-dependent gene silencing gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. Plant Cell, 17:404–17.

357. Rodríguez-Rosales, M. P., Jiang, X., Gálvez, F. J., Aranda, M. N., Cubero, B., & Venema, K. (2008). Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytologist, 179(2), 366-377.

358. Romero-Rodríguez, M. C., Maldonado-Alconada, A. M., Valledor, L., & Jorrin-Novo, J. V. (2014). Back to Osborne. Sequential Protein Extraction and LC-MS Analysis for the Characterization of the Holm Oak Seed Proteome. In Plant Proteomics (pp. 379-389). Humana Press.

359. Rong, W., Qi, L., Wang, A., Ye, X., Du, L., Liang, H., ... & Zhang, Z. (2014). The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. Plant biotechnology journal, 12(4), 468-479.

360. Rontein, D., Basset, G., & Hanson, A. D. (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. Metabolic engineering, 4(1), 49-56.

361. Roosens, N. H., Al Bitar, F., Loenders, K., Angenon, G., & Jacobs, M. (2002). Overexpression of ornithine-δ-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. Molecular Breeding, 9(2), 73-80.

362. Rossel, J. B., Walter, P. B., Hendrickson, L., Chow, W. S., Poole, A., Mullineaux, P. M., & Pogson, B. J. (2006). A mutation affecting ASCORBATE PEROXIDASE 2 gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance. Plant, cell & environment, 29(2), 269-281.

363. Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. Plant Cell Physiol, 41:1229–34.

364. Roy D, Basu N, Marik R, Banerjee SK. (1995). Changes in levels of endogenous gibberellins and abscisic acid in salt-sensitive germinating rice by NaCl-salinity. Plant Physiol Biochem., 22:200–2.

365. Roy NK, Srivastava AK. (1999). Effect of presoaking seed treatment on germination and amylase activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress conditions. Rachis, 18:46–51.

366. Roy, S. K., Kamal, A. H. M., Kim, H. R., Kwon, S. J., Jang, H. Y., Ko, J. H., ... & Woo, S. H. (2014). Proteome profiling of seed from inbred and mutant line of Sorghum ('Sorghum bicolor'). Australian Journal of Crop Science. 8(4), 606-611.

367. Royo, C., Elias, E. M., & Manthey, F. A. (2009). Durum wheat breeding. In Cereals (pp. 199-226). Springer US.

368. Rozema, J., & Schat, H. (2013). Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. Environmental and Experimental Botany, 92, 83-95.

369. Saad, ASI., Li, X., Li, H.P., Huang, T., Gao, C. S., Guo, M. W., ... & Liao, Y. C. (2013). A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. Plant Science, 203, 33-40.

370. Saeidi-Sar, S., Abbaspour, H., Afshari, H., & Yaghoobi, S. R. (2013). Effects of ascorbic acid and gibberellin A3 on alleviation of salt stress in common bean (Phaseolus vulgaris L.) seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 35(3), 667-677.

371. Saeidi-Sar, S., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Ghorbanli, M., & Majd, A. (2007). Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine max seedlings under nickel stress. Russian Journal of Plant Physiology, 54(1), 74-79.

372. Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science, 162(6), 897-904.

373. Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science-Bangalore-, 86(3), 407-421.

374. Smadhi, D., & Zella, L. (2012). Variabilite de la pluviometrie etson impact sur la production cerealiere au nord de l'algerie. periode (1970-2009). Sciences & Technologie C, (35), 55-63.

375. Saori Ogawa, Shiro Mitsuya. (2012). S-methylmethionine is involved in the salinity tolerance of Arabidopsis thaliana plants at germination and early growth stages. Physiol Plant;144:13–9.

376. Sarin, M. N., & Narayanan, A. (1968). Effects of soil salinity and growth regulators on germination and seedling metabolism of wheat. Physiologia Plantarum, 21(6), 1201-1209.

377. Sastry, EVD, and KS Shekhawat (2001). Alleviatory effect on GA3 on the effects of salinity at seedling stage in wheat (*Triticum aestivum*). Indian J. Agric. Res.. 35:226–231.

378. Sayar R, Bchini H, Mosbahi M, Khemira H. (2010). Response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) growth to salt and drought stresses. Czech J Genet Plant Breed, 46:54–63.

379. Sayar, R., Bchini, H., Mosbahi, M., & Exxine, M. (2010). Effects of salt and drought stresses on germination, emergence and seedling growth of Durum wheath (*Triticum durum* Desf). J. Agric. Res, 5, 2008-2016.

380. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(7), 995-1014.

381. Searle BC. (2010). Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. Proteomics, 10:1265–9.

382. Seckin, B., Sekmen, A. H., & Türkan, i. (2009). An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress. Journal of plant growth regulation, 28(1), 12-20.

383. Semenova, G., Fomina, I., & Ivanov, A. (2014). Combined Effect of Water Deficit and Salt Stress on the Structure of Mesophyll Cells in Wheat Seedlings. Cell-Bio. V.3. – Article ID:43429, 11 pages.

384. Sen S, Osborne DJ. (1977). Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (Secale cereale L.) embryos. Biochem J., 166:33–8.

385. Shabala, S., & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. Physiologia Plantarum, 133(4), 651-669.

386. Shaddad, M. A. K., HM, A. E. S., & Mostafa, D. (2013). Role of gibberellic acid (GA3) in improving salt stress tolerance of two wheat cultivars. International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 5(4), 50-57.

387. Shafi, M., Zhang, G., Bakht, J., Khan, M., Islam, U, & Khan, M. (2010). Effect of cadmium and salinity stresses on root morphology of wheat. Pakistan J Bot, 42(4), 2747-2754.

388. Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., & Fatkhutdinova, D. R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science, 164(3), 317-322.

389. Shalata A., Neumann P.M. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin c) increases resistance to salt tolerance and reduced lipid peroxidation, J. Exp. Bot. 364: 2207–2211.

390. Sharaf, A., Soliman, M., El-Arabi, N., Momtaz, O. A., & Moghaieb, R. E. (2014). An efficient and reproducible protocol for the production of salt tolerant transgenic wheat plants expressing the Arabidopsis AtNHX1 gene.GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 5(2), 0-1.

391. Sharifi, M., Hoseini, M., Gharavi-kuchebagh, P., & Baser-Kouchebagh, S. (2014). The effect of salt stress on seed germination and seedling growth on four wheat (Triticum aestivum) varieties. International Journal of Biosciences (IJB), 4(12), 73-77.

392. Shu, LB., Ding, W., Wu, JH., Feng FJ, Luo LJ, Mei HW. (2010). Proteomic analysis of rice leaves shows the different regulations to osmotic stress and stress signals. J Integr Plant Biol;52:981–95.

393. Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiology and Biochemistry, 46(1), 82-92.

394. Simon, E. W. (1984). Early events in germination. In T. T. Kozlowski, ed. Seed physiology, Vol. 2. New York: Academic Press. pp. 77–115.

395. Singh, R., & Jwa, N.S. (2013). Understanding the responses of rice to environmental stress using proteomics. Journal of proteome research, 12(11), 4652-4669.

396. Sipos, P., Szilágyi, Z., & Móré, M. (2014). Effect of salt forms and concentrations on the valorigraphic parameters of winter wheat flour. Acta Univ. Sapientiae, 7, 88-95.

397. Skylas DJ, Van Dyk D, Wrigley CW. (2005). Proteomics of wheat grain.J Cereal Sci;41:165–79.

398. Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. Current Opinion in Biotechnology, 9(2), 214-219.

399. Smirnoff, N. (2011). Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. Adv Bot Res, 59, 107-177.

400. Soares, E.L., Shah, M., Soares, A.A., Costa, J.H., Carvalho, P., Domont, G.B., ... & Campos, F.A. (2014). Proteome analysis of the inner integument from developing Jatropha curcas L. seeds. Journal of proteome research, 13(8), 3562-3570.

401. Sobhanian, H.; Aghaei, K.; Komatsu, S. (2011). Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? J. Proteomics, , 74, 1323-1337.

402. Soltani, A., Gholipoor, M., & Zeinali, E. (2006). Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. Environmental and Experimental Botany, 55(1), 195-200.

403. Sourour, A., Neila, R., Zoubeir, C., Saddreddine, B., Feker, K., Themir, B., ... & Mongi, B. Y. (2014). Effect of salt stress (sodium chloride) on germination and seedling growth of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes.International Journal of Biodiversity and Conservation, 6(4), 320-325.

404. Staszak, A. M., & Pawłowski, T. A. (2014). Proteomic Analysis of Embryogenesis and the Acquisition of Seed Dormancy in Norway Maple (*Acer platanoides* L.). International journal of molecular sciences, 15(6), 10868-10891.

405. Stevenson SE, Chu Y, Ozias-Akins P, Thelen JJ. (2009). Validation of gel-free, label-free quantitative proteomics approaches: applications for seed allergen profiling. J Proteomics;72: 555–66.

406. Su PH, Li HM. (2008). Arabidopsis stromal 70-kd heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. Plant Physiol;146:1231–41.

407. Sun, G., Zhang, X., & Xiao, S. (2004). Effect of reactive oxygen pecies on alpha-amylase expression of germinating wheat embryo treated with ABA and water stress. Journal of Triticeae Crops, 25(4), 50-53.

408. Sun, W. H., Duan, M., Shu, D. F., Yang, S., & Meng, Q. W. (2010). Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. Plant cell reports, 29(8), 917-926.

409. Svirbely, J.L. and Szent-Gyorgyi, A. (1932) Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. Nature 129, 576.

410. Szent-Györgyi, A. (1928). Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: Description of a new carbohydrate derivative. Biochemical Journal, 22(6), 1387.

411. Tabatabaei, S. (2014) the effect halo-and hydro-priming on seed reserve utilization and seed germination of wheat seeds under salinity stress. Cercetări Agronomice în Moldova Vol. XLVII , No. 3 (159).

412. Tahira, Bhutta, W. M., Ibrahim, M., & Salam, A. (2006). Inheritance of salt tolerance as measured via root length in spring wheat (Triticum aestivum L.) under different salinity levels. Journal of Crop Improvement, 16(1-2), 131-139.

413. Talaat, N. B., & Shawky, B. T. (2013). 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 35(3), 729-740.

414. Talaat, N. B., & Shawky, B. T. (2014). Modulation of the ROS-scavenging system in salt-stressed wheat plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 177(2), 199-207.

415. Talat, A., Nawaz, K., Hussian, K., Bhatti, K. H., Siddiqi, E. H., Khalid, A., ... & Sharif, M. U. (2013). Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (Triticum aestivum L.) cultivars. World Applied Sciences Journal,22(4), 547-554.

416. Tamburro D, Fredolini C, Espina V, Douglas TA, Ranganathan A, Ilag L, et al. (2011). Multifunctional core–shell nanoparticles: discovery of previously invisible biomarkers. J Am Chem Soc;133:19178–88.

417. Tan L, Chen S, Wang T, Dai S. (2013). Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. Proteomics;13:1850–70.

418. Tanou G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012). Priming against environmental challenges and proteomics in plants: update and agricultural perspectives. Front Plant Sci;3:1–5.

419. Tester, M., & Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. Science, 327(5967), 818-822.

420. Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD. (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. Trends Plant Sci;19:44–51.

421. Thomas, J. C., Sepahi, M., Arendall, B., & Bohnert, H.J. (1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in Arabidopsis thaliana. Plant, Cell & Environment, 18(7), 801-806.

422. Toorop PE, Groot SPC, Hilhorst H. (2003). Expression of a ribosomal protein gene during Germination of cabbage (Brassica oleracea f. oleracea) seeds.. In: Nicolas G, Bradford KJ, Come D, Pritchard HW, editors. The biology of seeds: recent research advances. Cambridge, M.A.: CAB International;. p. 191–7.

423. Toyosaki, T., & Sakane, Y. (2013). Effects of Salt on Wheat Flour Dough Fermentation. Advance Journal of Food Science & Technology, 5(2). Adv. J. Food Sci. Technol., 5(2): 84-89, 2013

424. Troll, W., Lindsley, J. (1955). A photometric method for the determination of proline. J. Biol. Chem. 215, 655–660

425. Tuna, A. L., Kaya, C., Dikilitas, M., & Higgs, D. (2008). The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environmental and Experimental Botany, 62(1), 1-9.

426. Upadhyay, S. K., & Singh, D. P. (2014). Effect of salt□tolerant plant growth□promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biology. DOI: 10.1111/plb.12173

427. Ushimaru, T., Nakagawa, T., Fujioka, Y., Daicho, K., Naito, M., Yamauchi, Y., ... & Murata, N. (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. Journal of plant physiology, 163(11), 1179-1184.

428. Uthus EO, Yokoi K, Davis CD (2002). Selenium deficiency in fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. J Nutr;132:1122–8.

429. Vensel WH, Tanaka CK, Cai N, Wong JH, Buchanan BB, Hurkman WJ (2005). Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. Proteomics;5:1594–611.

430. Vernon, D. M., Tarczynski, M. C., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1993). Cyclitol production in transgenic tobacco. The Plant Journal, 4(1), 199-205.

431. Wang WQ, Møller IM, Song SQ (2012). Proteomic analysis of embryonic axis of Pisum sativum seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. J Proteomics;77:68–86.

432. Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A. J., Crosby, W. L., & Fowke, L. C. (1998). ICK1, a cyclin□dependent protein kinase inhibitor fromArabidopsis thalianainteracts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. The Plant Journal, 15(4), 501-510.

433. Wang, L., He, X., Guo, J., Shen, Y., & Huang, Z. (2013). The expression of wheat TaSTG gene can enhance salt tolerance in plants. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 147(2), 451-458.

434. Wang, W. Q., Ye, J. Q., Rogowska-Wrzesinska, A., Wojdyla, K. I., Jensen, O. N., Møller, I. M., & Song, S. Q. (2013). Proteomic Comparison between Maturation Drying and Prematurely Imposed Drying of Zea mays Seeds Reveals a Potential Role of Maturation Drying in Preparing Proteins for Seed Germination, Seedling Vigor, and Pathogen Resistance. *Journal of proteome research, 13(2), 606-626.*

435. Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., & Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130(2), 167-173.

436. Ward JH. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc;58:236–44.*

437. Wen, F. P., Zhang, Z. H., Bai, T., Xu, Q., & Pan, Y. H. (2010). Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant science, 178(2), 170-175.*

438. Wilson ID, Barker GL, Lu C, Coghill JA, Beswick RW, Lenton JR, et al. (2005). Alteration of the embryo transcriptome of hexaploid winter wheat (Triticum aestivum cv. Mercia) during maturation and germination. Funct Integr Genomics;5:144–54.

439. Witzel K, Weidner A, Surabhi GK, Varshney RK, Kunze G, Buck-Sorlin GH, et al. (2010). Comparative analysis of the grain proteome fraction in barley genotypes with contrasting salinity tolerance during germination. *Plant Cell Environ;33:211–22.*

440. Wong JW, Cagney G. (2010). An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol;604:273–83.*

441. Xiao, Y., Huang, X., Shen, Y., & Huang, Z. (2013). A novel wheat α-amylase inhibitor gene, TaHPS, significantly improves the salt and drought tolerance of transgenic Arabidopsis. *Physiologia plantarum, 148(2), 273-283.*

442. Xie, Y., Zhang, C., Lai, D., Sun, Y., Samma, M. K., Zhang, J., & Shen, W. (2014). Hydrogen sulfide delays GA-triggered programmed cell death in wheat aleurone layers by the modulation of glutathione homeostasis and heme oxygenase-1 expression. *Journal of plant physiology, 171(2), 53-62.*

443. Xu Q, Belcastro MP, Dolan SV, Dinkins RD, Dirk LMA, Clarke SG, et al. (2004). A second protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are targeted to the nucleus. *Plant Physiol;136:2652-2664.*

444. Xu, L. H., Wang, W. Y., Guo, J. J., Qin, J., Shi, D. Q., Li, Y. L., & Xu, J. (2014). Zinc improves salt tolerance by increasing reactive oxygen species scavenging and reducing Na+ accumulation in wheat seedlings. *Biologia Plantarum, 58, 4, 751-757*

445. Xu, S., Lou, T., Zhao, N., Gao, Y., Dong, L., Jiang, D., ... & Wang, R. (2011). Presoaking with hemin improves salinity tolerance during wheat seed germination. *Acta Physiologiae Plantarum, 33(4), 1173-1183.*

446. Xu, S., Sa, Z. S., Cao, Z. Y., Xuan, W., Huang, B. K., Ling, T. F., ... & Shen, W. B. (2006). Carbon monoxide alleviates wheat seed germination inhibition and counteracts lipid peroxidation mediated by salinity. *Journal of Integrative Plant Biology, 48(10), 1168-1176.*

447. Yacoubi, R., Job, C., Belghazi, M., Chaibi, W., & Job, D. (2011). Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. *Journal of proteome research, 10(9), 3891-3903.*

448. Yadav SK, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK. (2005). Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Lett., 579: 6265–71.*

449. Yamamoto, A., Bhuiyan, M. N. H., Waditee, R., Tanaka, Y., Esaka, M., Oba, K., ... & Takabe, T. (2005). Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants.*Journal of Experimental Botany, 56(417), 1785-1796.*

450. Yang SF, Hoffman NE. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol;35:155–89.*

451. Yang, M. F., Liu, Y. J., Liu, Y., Chen, H., Chen, F., & Shen, S. H. (2009). Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and post-germination development of Jatropha curcas. *Journal of proteome research, 8(3), 1441-1451.*

452. Ye N, Zhu G, Liu Y, Zhang A, Li Y, Liu R, et al. (2012). Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *J Exp Bot;63:1809–22.*

453. Ye, N., & Zhang, J. (2012). Antagonism between abscisic acid and gibberellins is partially mediated by ascorbic acid during seed germination in rice. *Plant signaling & behavior, 7(5), 563-565.*

454. Yinn C, Teng Y, Luo Y, Christie, P. (2012). Proteomic response of wheat embryos to fosthiazate stress in a protected vegetable soil. *J Environ Sci., 24, 1843–53.*

455. Yin, Y., Yang, R., & Gu, Z. (2014). Organ-specific proteomic analysis of NaCl-stressed germinating soybeans. *Journal of agricultural and food chemistry, 62(29), 7233-7244.*

456. Yousof, F. I., & El-Saidy, A. E. (2014). Application of Salicylic Acid to Improve Seed Vigor and Yield of Some Bread Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Under Salinity Stress. *Research Journal of Seed Science, 7(2), 52-62.*

457. Yuan, K., Rashotte, A. M., & Wysocka-Diller, J. W. (2011). ABA and GA signaling pathways interact and regulate seed germination and seedling development under salt stress. *Acta physiologiae plantarum, 33(2), 261-271.*

458. Zang, X., Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochemistry, 68, 426-437.

459. Zapata PJ, Serrano M, Pretel MT, Amorós A, Botella M. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci., 167, 781-8.*

460. Zhai, C. Z., Zhao, L., Yin, L. J., Chen, M., Wang, Q. Y., Li, L. C., ... & Ma, Y. Z. (2013). Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H2O2 tolerances in Arabidopsis. *PloS One, 8(10), e73989.*

461. Zhang, C., Liu, J., Zhang, Y., Cai, X., Gong, P., Zhang, J., et al. (2011). Overexpression of SlGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep., 30, 389-98.*

462. Zhang, H.; Han, B.; Wang, T.; Chen, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Dai, S (2012). Mechanisms of plant salt response: Insights from proteomics. *J. Proteome Res., 11, 49-67.*

463. Zhang, J., Nguyen, H. T., & Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany, 50(332), 291-302.*

464. Zhang, L., Liu, G., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X., & Kong, X. (2014). Characterization of a wheat R2R3-MYB transcription factor gene, TaMYB19, involved in enhanced abiotic stresses in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology, pcu109.*

465. Zhang, S., Hu, J., Zhang, Y., Xie, X. J., & Knapp, A. (2007). Seed priming with brassinolide improves lucerne (Medicago sativa L.) seed germination and seedling growth in relation to physiological changes under salinity stress. *Crop and Pasture Science, 58(8), 811-815.*

466. Zhang, X. L., Liu, G. L., Li, T. L., Qi, M. F., Mei, M., & Lu, X. J. (2014). Differential proteome analysis of mature and germinated seeds of Magnolia sieboldii K. Koch. *Trees, 28(3), 859-870.*

467. Zhang, Y. (2013). Ascorbic acid in plants: biosynthesis, regulation and enhancement. Springer.

468. Zhang, Y. F., Huang, X. W., Wang, L. L., Wei, L., Wu, Z. H., You, M. S., & Li, B. Y. (2014). Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture, 13(5), 919-925.*

469. Zhang, Y., Feng, D., Bao, Y., Ma, X., Yin, N., Xu, J., & Wang, H. (2013). A novel wheat related-to-ubiquitin gene TaRUB1 is responsive to pathogen attack as well as to both osmotic and salt stress. *Plant Molecular Biology Reporter, 31(1), 151-159.*

470. Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Q., & Cao, W. (2009). Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany, 67(1), 222-227*.

471. Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Ma, Z., Chen, L., Huang, C., et al. (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PloS One, 7:e52439*.

472. Zhou, L., Niu, M. G., & Chen, L. (2010). Effects of Salt Stress on Seed Germination of S. secales, T. durum and T. *triticale* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences, 1, 001.*

473. Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D. P. S., Fan, Y. L., & Wu, R. (1998). Overexpression of a Δ-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-and salt-stress in transgenic rice. *Plant Science, 139(1), 41-48.*

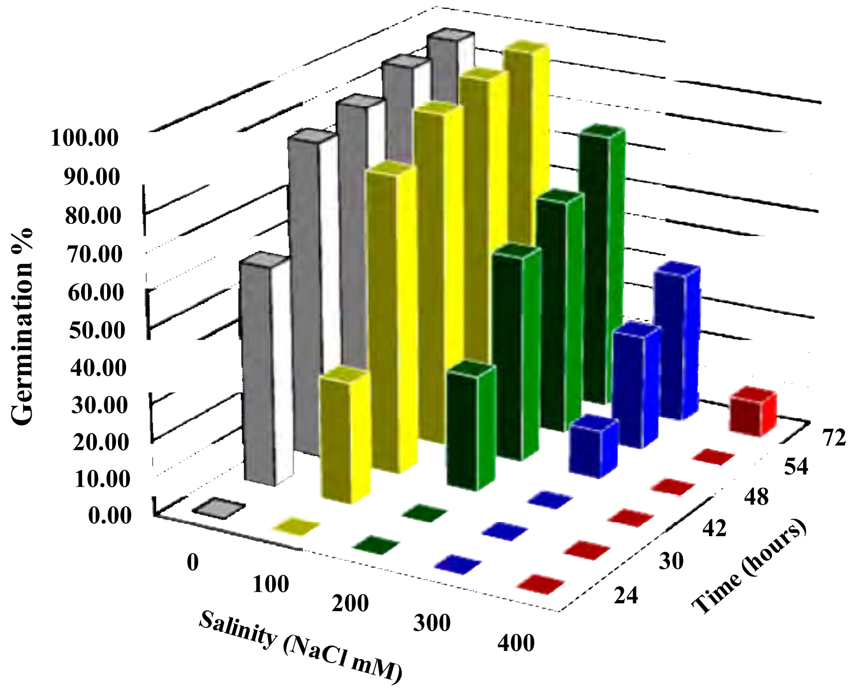
474. Zhu, J-K, Liu, JP., Xiong LM. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell 10:1181–91.*

475. Zhu, JK. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science, 6(2), 66-71.*

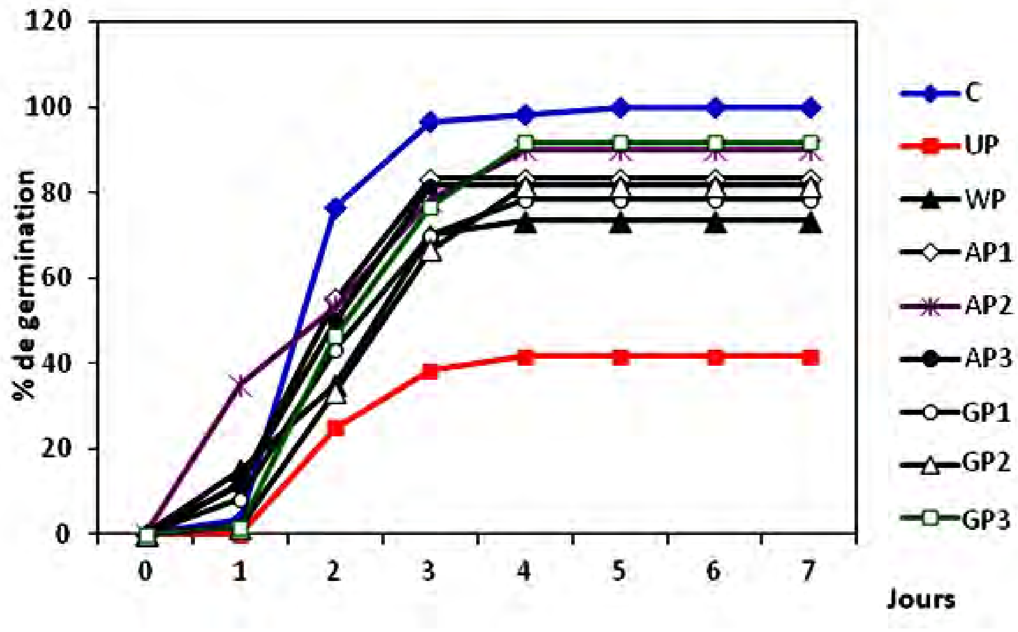
الملاحق

الملحق 1

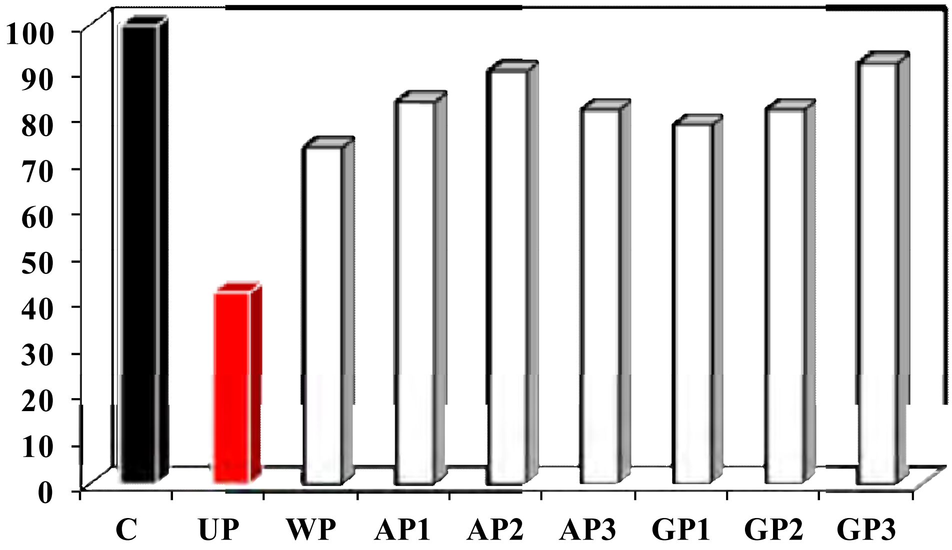
بعض نتائج دراسات أولية أجريت بتحفيز البذور بمختلف تركيزات حمض الجبريليك و حمض الأسكوربيك على حركية إنبات القمح، نسبة الإنبات، سرعة الإنبات.



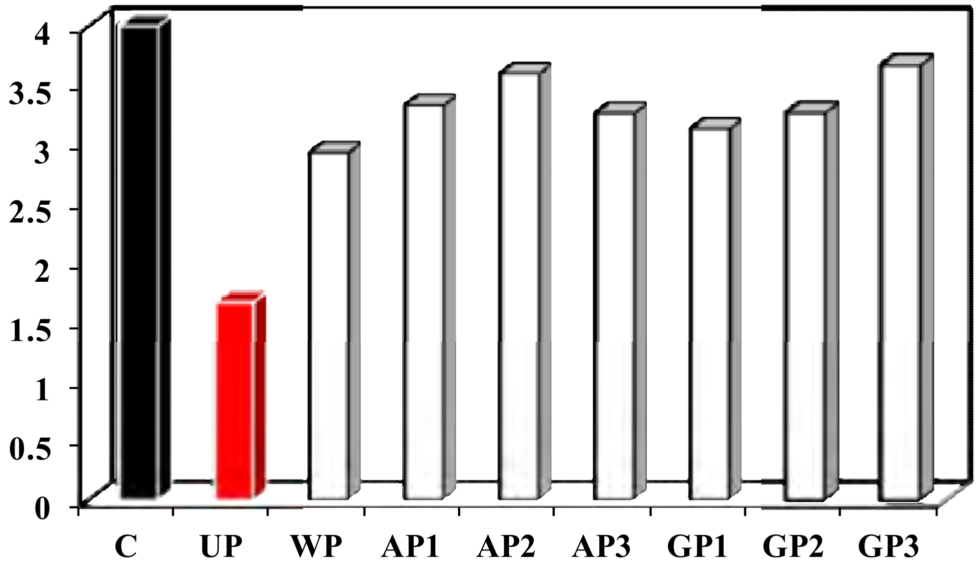
شكل 4. إنبات بذور القمح الصلب (صنف واحة) حسب درجة ملوحة الوسط



شكل 2. حركية إنبات بذور القمح (صنف واحة) تحت تأثير مختلف المعاملات.



شكل 3. التأثير المتداخل للملوحة و مختلف المعاملات (الماء، الفيتامين ج و حمض الجبريليك) على النسبة النهائية (%) لإنبات بذور القمح الصلب (واحة).



شكل 4. التأثير المتداخل للملوحة و مختلف المعاملات (الماء، الفيتامين ج و حمض الجبريليك) على سرعة الإنبات (بذرة/يوم) لبذور القمح الصلب (واحة)

C : control ; UP : unprimed ; WP : water-primed ; AP : ascorbate-primed (0.25, 0.5 and 1 mM); GP: Gibberellin-primed (0.125, 0.25, 0.5 mM).

الملحق 2

معلومات عامة عن الصنف واحة

Descriptor	CIMMYT datasets	GRIS dataset
Country (Y of release)	Algeria (1986)	DZA (1979)
Variety name	WAHA	WAHA
Synonym		CM-17904-B-3M-1Y-1Y-0SK-0AP-0DZA; CM-17904-B-3M-1Y-1Y-OSK; CHAM-1;
Wheat type	Durum Wheat	TR.DR
Growth habit	Spring	S
Semidwarf (Rht gene)	Yes	
Grain color	Unknown	
Grain hardiness	Unknown	
Pedigree	PLC"S"/RUFF"S"//GTA"S"/RTTE"S"	
Selection history	CM17904	CM-17904-B-3M-1Y-1Y-0SK-0AP-0DZA; CM-17904-B-3M-1Y-1Y-OSK; CHAM-1;
Breeding program		
Accession number		PI-519541
CID (Cross ID)	123343	
SID (Selection ID)	16	
Origin	CIMMYT segregating line or population	
CIMMYT breeding line	FRIGATE	
Genes		
Suitable megaenvironments	ME4A	
Notes		

Data obtained from the website: Wheat Atlas (http://wheatatlas.org/varieties/detail/20632). 17. Nov. 2014.

We can browse information about more than 10,000 wheat varieties provided by Wheat Atlas and GRIS (Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale) databases.

الملحق 3

Journal of Applied Botany and Food Quality 87, 74 - 79 (2014), DOI:10.5073/JABFQ.2014.087.011

[1]Department of Biology, Abbes Laghrour University, Khenchela, Algeria
[2]Department of Biology, Mentouri University, Constantine, Algeria

The role of osmoprotectants and antioxidant enzymes in the differential response of durum wheat genotypes to salinity

A. Fercha[1*], H. Gherroucha[2]

(Received August 25, 2013)

Summary

This study aims to investigate the importance of accumulation of osmoprotectants and activities of some key antioxidant enzymes in genotypic variation (GV) observed among durum wheat genotypes in response to increasing NaCl salinity (0-200 mmol/L) at seedling stage. Germination and seedling growth traits of all the genotypes were significantly decreased by salinity. Mohamed Ben Bachir, the more salt-tolerant genotype, exhibited the lowest reduction in final germination percentage (FGP, <18%) and seedling growth (<60%, based on dry biomass), the lowest increase in proline (PRO) and water soluble carbohydrates contents but the highest increase in catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities. Correlation and principal components analysis revealed that the most important variables distinguishing salt tolerant vs. salt non-tolerant genotypes were root to shoot ratio (R/S, 36.1%), CAT (30.6%), APX (12.5%) and FGP (5.74%). Although PRO and WSC could play a key role in salt tolerance by mediating osmotic adjustment, these compounds do not seem to be significantly involved in genotypic variation (GV) for salinity tolerance in durum wheat.

Introduction

Salinity which affects more than 800 Mha of world's land area (FAO, 2008), is nowadays, one of the most damaging environmental factors that limit growth and productivity of crop plants (Munns and Tester, 2008). In Algeria, for instance, more than 3.2 Mha of arable land already suffer from salinisation (Benmahioul et al., 2009). Overall, salinity adversely affects plant growth and development not only through imposition of osmotic stress, ion toxicity, but also by secondary effects such as oxidative stress and hormonal imbalance (Ashraf et al., 2012).

Even though durum wheat (Triticum durum Desf.) is regarded as one of the most widely cultivated crops, especially in the Mediterranean basin where about 75% of total durum wheat production is provided (Habash et al., 2009), its production is often limited by poor seed germination and stand establishment, mainly due to drought or soil salinity (Sayar et al., 2010). Hence, it is imperative to develop wheat genotypes with improved salt tolerance. This is of obvious importance in the case of tetraploid wheat, which lacks the D genome, making it less tolerant to salt stress (Munns et al., 2012).

Proper seed germination and seedling emergence are required traits to achieve a high grain yield in wheat (Paulsen, 1987). Therefore, it has been established that under arid conditions, the most valuable cultivars are those, which are emerging rapidly because rainfall after sowing may result in a soil crust that prevents seedling emergence (Tahir, 2010). In addition, the early emerging and the fast growing crops are able to take full advantage of the soil moisture leading to better seedling establishment and grain yield. Although the major variation in the coleoptile length is genetic, environmental conditions can significantly affect this trait (Hakizimana et al., 2000). Accordingly, identifying the physiological and biochemical attributes associated with a more vigorous and rapidly growing seedling, particularly under stress conditions will be very meaningful (Rashid et al., 1999).

Seed germination and seedling emergence are well-regulated processes characterized by high metabolic activity mediated by reactive oxygen species (ROS) in the cell (Bailly, 2004). Antioxidants act to scavenge ROS, and therefore play an important role in the regulation of growth processes that occur during germination such as radicle protrusion or coleoptile emergence (Bailly, 2004). While superoxide dismutase (SOD) is the most important antioxidant enzyme synthesized in response to oxidative stress, its effectiveness was dependant on the H_2O_2-scavenging enzymes activity notably that of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). The combined action of these two enzymes seems to play an important role in plant growth and production since seed filling was associated with a high potential of the H_2O_2-detoxification, often due to APX and CAT activities (Costa et al., 2010).

In recent years, numerous studies have been conducted to investigate whether there are differences between several durum wheat genotypes in their response to salinity (Munns et al., 2012; Rashid et al., 1999; Sayar et al., 2010). However, to the best of our knowledge no work has been done to investigate the difference in responses to salinity of wheat genotypes used in the present study, particularly with respect to their H_2O_2-scavanging capacity and osmoprotectants accumulation. Therefore, this study aimed to investigate the genotypic variation (GV) for salinity tolerance among three durum wheat landraces selected based on their good adaptation to drought-stressed Mediterranean environments.

Materials and methods

Experimental details and treatments

Germination assay and growth measurements: The present investigation was performed in a randomized complete design (RCD) with two factors and three replications. Certified seeds of durum wheat (Triticum durum Desf.) vars. Mohamed Ben Bachir (MBB), GTA-dur and Waha were surface sterilized with sodium hypochlorite (5% w/v) for 3 min, washed several times against sterile water and dried in oven. Thirty dried seeds were then placed in each Petri dish containing two layers of Whatman. No. 1 filter paper moistened with 10 mL of one of the prepared solutions (100 or 200 mmol/L NaCl) or distilled water (control). Seeds were germinated in darkness in a temperature-controlled chamber held at 22 ± 0.5 °C. The number of germinated seeds was counted every day until day 7, when there were no more germinated seeds. Final germination percentage (FGP) was calculated at the end of the germination period (7 days). Mean germination time (MGT) was calculated according to Ellis and Roberts (1981):

$$MGT = \sum Dn / \sum n$$

Where n is the number of seeds germinated on day D, the number of days counted from the beginning of germination. Final length of shoot (coleoptile) and root of seedlings seven days post-sowing were measured and used for vigor index (VI) estimation according to Abdul-Baki and Anderson (1973):

* Corresponding author

$$VI = FGP \times SL$$

where SL is seedling length (cm). The salt tolerance index (ST) was calculated according to CANO et al. (1998):

$$ST = (FW \text{ in NaCl-saline solution}) \times 100/(FW \text{ in NaCl-free solution})$$

where FW is fresh weight.

Physiological and biochemical changes

Physiological and biochemical measurements were in general based on shoot (coleoptile) samples of three 7-day-old seedlings of uniform size from each cultivar.

Relative water content: Shoot relative water content (RWC) was determined according to BARR and WEATHERLEY (1962):

$$RWC = (FW - DW) \times 100/(TW - DW)$$

where FW is fresh weight, DW is dry weight and TW is turgid weight.

Proline and water-soluble carbohydrate content: Quantitative determination of free proline (PRO) content was performed according to BATES et al. (1973). The optical density of the solution is read on a spectrophotometer at a wavelength of 528nm. The proline concentration was determined using a calibration curve of known L-proline concentration. Water-soluble carbohydrates (WSC) content was determined according to DUBOIS et al. (1956). Absorbance was measured at 485nm. The WSC concentration was determined using a calibration curve of known D-glucose concentration.

Hydrogen peroxide and lipid peroxidation assays: H_2O_2 content was determined according to VELIKOVA et al. (2000). Approximately 100 mg of fresh shoot samples were homogenized in 0.1% 5 mL of trichloro-acetic acid (TCA), and centrifuged for 15 min at 12,000 rpm. A 0.5 mL of the supernatant is then mixed with 0.5 mL of buffer (Potassium phosphate 10 mM pH 7) and 1mL of 1 M KI. The absorbance reading was taken at 390 nm. Lipid peroxidation (LPO), however, was estimated as malondialdehyde (MDA) according to HEATH and PACKER (1968). Approximately 500 mg of fresh shoot samples were homogenized in 10 mL of 0.1% TCA and the homogenate was centrifuged for 15 min at 15,000 rpm. To a 1.0 mL aliquot of the supernatant, 4.0 mL of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% TCA were added. The mixture was heated at 95 °C for 30 min, and then cooled in an ice bath. After centrifugation for 10 min at 10,000 rpm at 4 °C, the absorbance of the supernatant was recorded at 532 nm on a spectrophotometer. The MDA content was calculated according to its molar extinction coefficient of 155 mM^{-1} cm^{-1}.

H_2O_2-scavenging enzymes extraction: About 200 mg of fresh shoot tissues were collected from stressed and control seedlings and quickly frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder using a prechilled mortar and pestle. The exact weight of each powdered sample was determined before it was thoroughly homogenized in 1.2 mL of 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.8 with 0.1 mM EDTA). The samples were centrifuged for 20 min at 15,000 rpm at 4 °C. The supernatant was removed, the pellet resuspended in 0.8 mL of the same buffer, and the suspension centrifuged for another 15 min at 15,000 rpm at 4 °C. The combined supernatants were stored on ice and used to determine antioxidant enzyme activities (ELAVARTHI and MARTIN, 2010).

H_2O_2-scavenging enzymes activity assay: The activity of CAT (EC 1.11.1.6) was measured according to the method of CHANDLEE and SCANDALIOS (1984) with little modification. The assay mixture contained 2.6 mL of 50 mM potassium/phosphate buffer (pH 7.0), 0.4 mL of 15 mM H_2O_2 and 0.04 mL of enzyme extract. The decomposition of H_2O_2 was followed by the decline in absorbance at 240 nm. The enzyme activity was expressed in units mg^{-1} protein (U = 1 mM of H_2O_2 reduction min^{-1} mg^{-1} protein). The extinction coefficient of H_2O_2 (40 mM^{-1} cm^{-1} at 240 nm) was used to calculate the enzyme activity that was expressed in terms of mM of H_2O_2 per minute per gram fresh weight.

APX (EC 1.11.1.11) activity was assayed using a modified method of NAKANO and ASADA (1981). APX activity was determined by measuring decreased absorbance at 290 nm due to ascorbate oxidation. The assay mixture (1 mL) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM ascorbate, 0.5 mM H_2O_2, and 10 µl of crude extract. H_2O_2 was added last to initiate the reaction, and the decrease in absorbance was recorded for 3 min (U = 1 mM of Ascorbic acid reduction min^{-1} mg^{-1} protein). The extinction coefficient of 2.8 mM^{-1} cm^{-1} for reduced ascorbate was used in calculating the enzyme activity that gram fresh weight. The enzyme protein was estimated by the method of BRADFORD (1976).

Statistical analysis

For statistical analysis, the data of germination percentage were transformed by arcsine transformation. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) procedures, while the least significant difference (LSD) test at α = 0.05 level of significance was used to compare the differences among treatment means. Correlation analysis and principal component analysis (PCA) were carried out to examine the relationships between and among the factors and variables using the statistical software package STATISTICA 8.0 (HILL and LEWICKI, 2007).

Results

Germination assay: As shown in Fig. 1A, final germination percentage (FGP) was adversely affected by NaCl salinity. The decrease in FGP caused by moderate salinity (100 mM) was less than 9% in all the genotypes, whereas high salinity (200 mM) induced substantial reduction in FGP especially in the genotype Waha, which has lost nearly 70% of its germination capacity. Statistical analysis revealed a significant effects for both factors (salinity ‘S’ and genotype ‘G’) and their interaction ($P<0.001$) (Tab. 1), suggesting the existence of a genetic variation. Unlike the FGP, the mean germination time (MGT) was only marginally affected by moderate salinity, whereas high salinity resulted in a more pronounced increase of MGT, especially in the genotype Waha.

Growth Analysis

Shoot and Root lengths: NaCl salinity decreased more or less significantly shoot and root lengths in all genotypes in a concentration-dependent manner (Fig. 1B). With the exception of the decrease in root to shoot ratio (R/S) recorded by the genotype Waha at 200 mM NaCl (> 40%), salinity seems to increase significantly the R/S (Fig. 1C). It was noteworthy that the genotype MBB had the highest R/S.

Total dry weight and Vigor index: Among the tested wheat genotypes, the total dry weight (DW) was affected more or less to the same extent by salinity (Fig. 1C). This effect was more pronounced when the concentration of NaCl becomes higher. Whilst root growth (particularly in genotype MBB) was much less affected, which

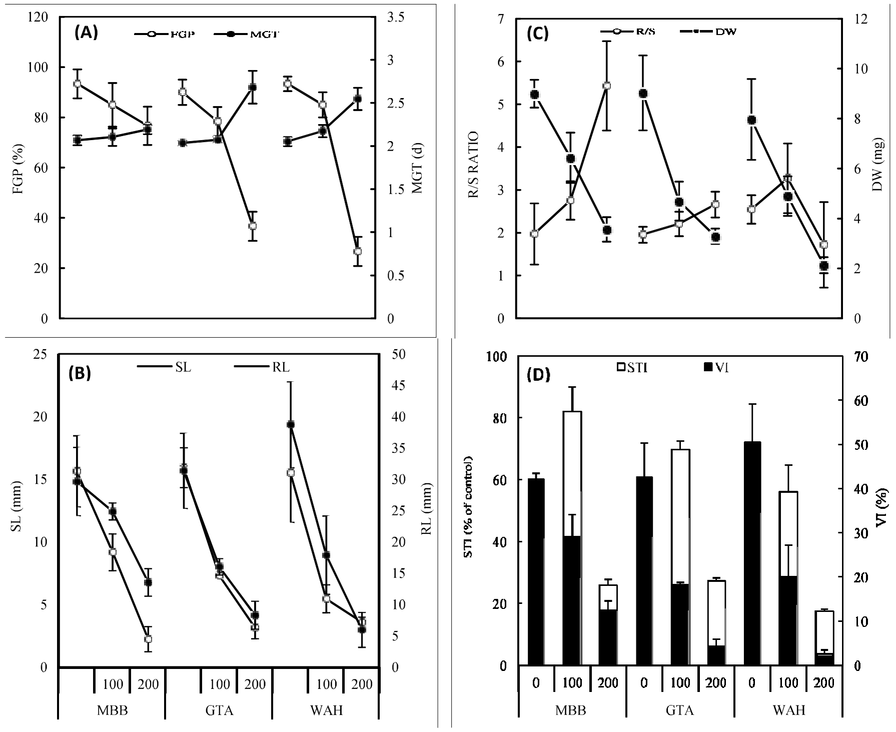


Fig. 1: Effect of salinity (mM) on (A) final germination percentage (FGP) and mean germination time (MGT); (B) shoot (SL) and root lengths (RL); (C) root:shoot ratio (R/S) and total dry weight (DW); (D) salt tolerance index (ST) and vigor index (VI) of durum wheat genotypes. Values are means of three replicates ± SE.

Tab. 1: F and LSD values of the effects of salinity (S), genotype (G) and the interaction between them (S×G) on the dependent variables.

Variation	F			LSD	
	Salt	Genotype	Interaction	Salt	Genotype
FGP	73.53***	12.03***	6.45***	0.16	0.19
MGT	55.07***	6.95**	8.40***	0.35	0.137
SL	107.8***	0.60 ns	1.35 ns	4.2	ns
RL	67.60***	2.01 ns	3.69*	10.32	ns
R/S	4.95*	5.50*	8.25***	1.11	0.87
DW	83.53***	4.57 *	0.88 ns	2.34	1.33
VI	136***	3.43 ns	3.29*	16.01	ns
ST	775.9***	18.0***	8.24***	30.75	7.83
RWC	22.63***	3.33 ns	2.49 ns	7.49	ns
PRO	1200***	8.27**	47.69***	67.6	8.76
WSC	210.3***	10.58 ns	3.41*	62.66	ns
MDA	16.33***	7.62**	0.43 ns	0.34	0.23
H_2O_2	25.92***	26.11***	1.58 ns	11.96	5.83
CAT	6.90**	5.93**	10.65***	0.99	0.93
APX	13.3***	6.55**	5.87**	8.57	6.18

*P< 0.05; **P< 0.01; ***P< 0.001; ns = not significant.

explains the high R/S, high salinity (200 mM) had reduced plant biomass by 50% to 70% compared to control groups. Increasing salinity induced a significant linear decline in seedling vigor index (VI) and salt tolerance index (ST) of all tested cultivars (Fig. 1D).

Physiological and biochemical parameters:

Relative Water Content: As shown in Fig. 2A, RWC of wheat seedlings, especially in genotype GTA (~84%) showed only slight and non-significant decrease with increasing NaCl concentration.

Proline and Water Soluble Carbohydrates contents: According to Fig. 2A, salinity induced a significant (P<0.001) increase of proline content of all genotypes. However, genotype GTA treated with 200 mM NaCl showed the highest amount of proline content (up to 3-folds compared to control) (Tab. 1). In all genotypes, NaCl induced a significant (P<0.001) accumulation of WSC in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). While WSC content does not appear to differ significantly from one genotype to another, the existence of a significant interaction genotype × salt stress (Tab. 1) gives rise to conclude that these genotypes respond differently with increasing salt level.

Hydrogen peroxide content and Lipid peroxidation: From the Fig. 3A it is apparent that the amount of H_2O_2 increased in response to increasing salinity. Fig. 3A shows also that under both salinity levels, lipid peroxidation occurs in seedling tissues of all wheat cultivars.

Ascorbate Peroxidase and Catalase activity: Unexpectedly salt stress affected the activity of APX independently of NaCl concentration and differently from one genotype to another (Fig. 3B). Nevertheless, at 200 mM salt stress increased the activity of APX in the three genotypes with respect to their respective controls. On the other hand, salinity had not only affected differently the activity of CAT, but regardless of its concentration (Fig. 3B). However, at 200 mM, unlike genotype Waha CAT activity increased in the genotypes GTA and MBB.

Multifactorial analysis: Results of multifactorial comparison generalized over the entire set of data (432 entries) using the principal components analysis (PCA), were given in Fig. 4A and 4B. It is noteworthy that every single genotype was presented by 9 points (3 levels of salinity × 3 repetitions). PCA results revealed that the factor 1 (first principal component or PC1) explained 63.69% of the total data variation and had positive correlation with the growth/germination performance under both stress and non-stress environments (Fig. 4A and Fig. 1A-D). Thus this component was able to separate the genotypes according to their growth/germination potential under the three different stress treatments. The PC 2 explained 11.04% of the total data variation. The first two PCs accounted for 74.73% of total variation. Considering the projection of the variables, it appears that the mean values of proline and water-soluble carbohydrates decreased from the negative side of PC1 to its positive side (Fig. 4B). This reflects the highly significant negative relationships among proline, WSC and all the growth parameters (r over to - 0.8, P<0.001). PCA results also indicated that the indices could discriminate the tolerant genotypes are the R/S ratio (36.1% of contributions), CAT (30.6%), FGP (5.74%), which showed positive correlations with salt tolerance, and APX (12.5%), which showed a negative correlation with tolerance to salinity (Fig. 4B).

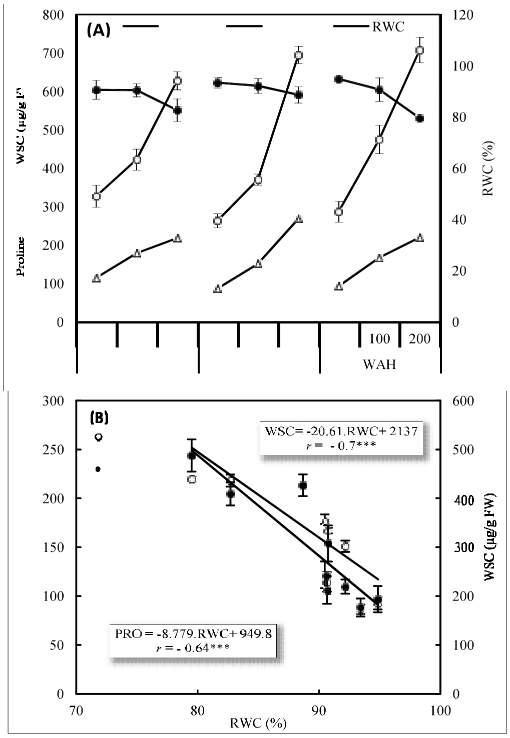


Fig. 2: Effect of salinity (mM) on (A) proline content (PRO), water soluble carbohydrates (WSC) and relative water content (RWC) of durum wheat genotypes; (B) Relationships of RWC with PRO and WSC contents. Values are means of three replicates ± SE.

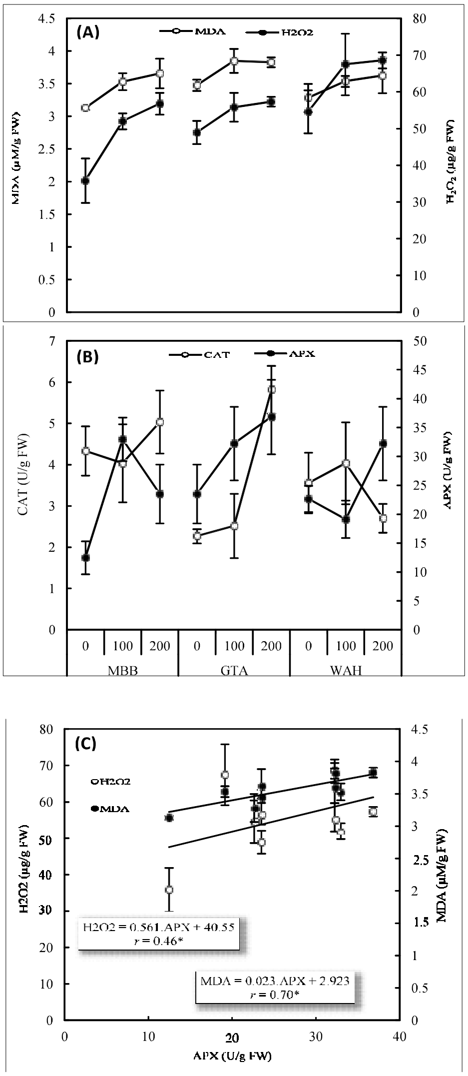


Fig. 3: Effect of salinity (mM) on (A) malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) contents; (B) catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities of durum wheat genotypes; (C) Relationships between the APX activity and H_2O_2 and MDA contents. Values are means of three replicates ± SE

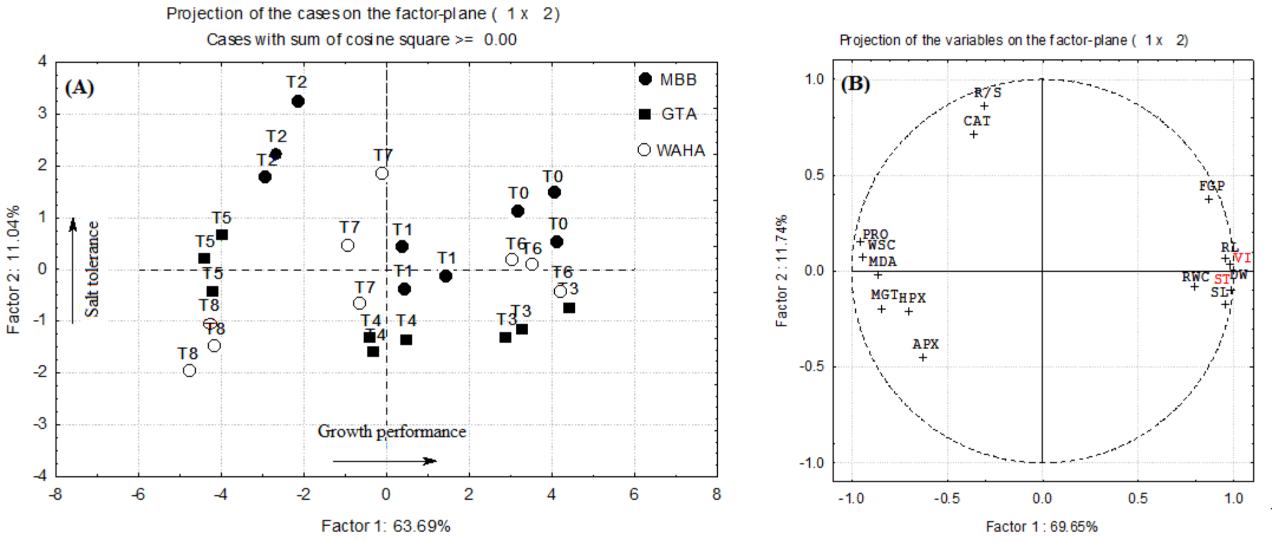


Fig. 4: Multifactorial comparison of the treatments and variables using PCA. Data are presented for each of three replicates for each treatment. The percent variance explained by each PC is provided.
Treatments: T0, T3, T6: control; T1, T4, T7: 100 mM NaCl; T2, T5, T8: 200 mM NaCl.
Variables codes: FGP: final germination percentage; MGT: mean germination time; DW: dry weight; RL: root length; SL: shoot length; R/S: root to shoot ratio; ST: salt tolerance index; VI: vigor index; PRO: proline; RWC: relative water content; WSC: water-soluble carbohydrates; APX: ascorbate peroxidase; CAT: catalase; HPX: hydrogen peroxide; MDA: malondialdehyde.

Discussion

It is evident from the results that NaCl salinity significantly decreases the percentage of germination (FGP) and delay the germination (MGT) in all the genotypes (Fig. 1A and Tab. 1). In this respect, Waha appears to be the most affected genotype. These results are in line with previous findings (Zhang et al., 2010). Salinity can affect germination of seeds either by imposing osmotic stress, which prevent water uptake, or by ion toxicity, which inhibits the metabolism of dividing and expanding cells, delaying germination and even leading to seed death (Zhang et al., 2010). The first visible evidence of germination is the protrusion of the radicle through the seed coat. This is the result of cell enlargement and, to a lesser extent, cell division (Haber and Luippold, 1960), both of which are very sensitive to dehydration, suggesting that salinity indirectly reduces growth of seminal roots by water privatization. Indeed, our results support this finding, since the decrease in germination performances was correlated to the decrease in RWC, particularly in Waha, and because a RWC of about 80% may trigger the accumulation of ABA that inhibit germination and radicle protrusion.

As on germination, salt stress decreases almost all of growth parameters (Fig. 1D) in all the wheat cultivars, which is may be attributed to either or both the osmotic and toxic effects of salinity as previously reported (Rashid et al., 1999; Sayar et al., 2010). In contrast to MBB, Waha appears to be the most affected by salinity.

Increasing salinity causes the reduction of cell turgor and the rate of shoot and root elongation (Munns and Tester, 2008). To maintain cell turgor by osmotic adjustment (OA), plants synthesize and accumulate several kinds of compatible osmolytes, such as PRO and WSC. Indeed, substantial increase in PRO content in all the genotypes was recorded under salt stress ($P<0.001$; Fig. 2A). However MBB, which exhibited the highest ST index, showed the lowest amount of PRO. On the other hand, the strong negative correlation found between PRO and RWC (r = -0.64***; Fig. 2B), from one side, and since the genotype GTA which exhibited the highest RWC at 200 mM NaCl, showed the greatest PRO accumulation from the other side, suggests that PRO is involved in OA. Besides OA, PRO plays an important role in stabilization of enzymes/proteins and protection of membrane integrity (Ashraf and Harris, 2004; Ashraf et al., 2012). In line with these findings, correlation analysis revealed a strong positive relationship between H_2O_2 and PRO (r = 0.49*; Fig. 3C) which corroborate recent suggestion that PRO could act as an antioxidant counteracting H_2O_2 (Ashraf et al., 2012).

Increase of WSC content has been considered as an adaptive response of plants to salt stress conditions (Parvaiz and Satyawati, 2008). WSC not only acts as an energy source, but it is also important to increase the biomass and provide the carbon backbones essential for the synthesis of numerous compounds that are involved in osmotic or anti-oxidative protection (Couee et al., 2006). In agreement with this, NaCl induced a significant ($P<0.001$) accumulation of WSC in all genotypes in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). Moreover, WSC content showed a strong negative correlation with RWC (r = -0.7***; Fig. 2B) and a positive correlation with H_2O_2 (r = 0.53**).

Consistent with our results, salinity induces the accumulation of H_2O_2 in a concentration-dependant manner (Ashraf et al., 2012; Lee et al., 2001). Despite its role as a signaling molecule, H_2O_2 itself is toxic at high concentrations (Costa et al., 2010). In agreement with our results (Fig. 3A), salt-induced oxidative stress causes the lipid peroxidation (LPO) resulting at cellular level in membranes degradation, suggesting that salt-induced LPO occurs early in the seedling tissues of all wheat cultivars. Correlation analysis also revealed the significant positive relationships among MDA vs. PRO (r = 0.58**) and MDA vs. WSC (r = 0.43*), suggesting the involvement of PRO and WSC in anti-oxidative protection.

To withstand salt-induced oxidative stress, plants evolved enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems. Among the ROS-scavenging enzymes, CAT and APX are primarily involved in the elimination of H_2O_2, and the most important antioxidant enzymes produced in different plant organelles (Costa et al., 2010). Our results support these aforementioned findings, showing that overall salt stress increases substantially the activity of APX in the three genotypes (Fig. 3B). Growing evidences suggests that ROS-scavenging enzymes are involved in the salt stress tolerance (Ashraf et al., 2012). While salt stress may result in a rapid increase in the activity of antioxidant enzymes, high concentration or long-term of salt stress inhibit the antioxidant enzyme activities (Ashraf

et al., 2012), which is partially in line with our results (Fig. 3B). Interestingly, LEE et al. (2001) showed that the overproduction of H_2O_2 promotes the induction of specific APX isoforms under catalase deactivation. Consistent with these findings, APX activity, but not CAT, was found positively correlated with the levels of both of H_2O_2 (r = 0.46*) and MDA (r = 0.70*) (Fig. 3C).

Based on PCA results it appears that the indices could discriminate the tolerant genotypes are the R/S (36.1% of contribution), CAT (30.6%), FGP (5.74%), which showed positive correlations with ST, and APX (12.5%), which showed a negative correlation with ST (Fig. 4B). This is in agreement with the fact that the most salt-tolerant cultivars are those with high germination rate, an important vigor index, able to maintain a vigorous root growth (high R/S) and showed relatively high antioxidant activity (ASHRAF et al., 2012; RASHID et al., 1999; SAYAR et al., 2010). In this case, MBB met the requirement.

Conclusion

Altogether, these results revealed that salt stress affects almost all studied aspects of germination and seedling growth in durum wheat in a concentration- and genotype-dependent manner. PCA results indicated that the most important variables that contributed to genotypic variation (GV) in salt tolerance among the tested genotypes were R/S ratio (36.1%), CAT (30.6%), APX (12.5%) and FGP (5.74%). While PRO and WSC have been shown to play a key role in salt tolerance by inducing osmotic adjustment (OA), these compounds do not appear to be involved in the GV for salinity tolerance among the tested genotypes. According to the response of wheat genotypes to high salinity (200 mM NaCl), it is suggested that MBB is the most tolerant genotype while Waha is the less tolerant one.

References

ABDUL-BAKI, A.A., ANDERSON, J.D., 1973: Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. Crop Sci. 13, 630-633.

ASHRAF, M., HARRIS, P.J.C., 2004: Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166, 3-16.

ASHRAF, M.A., ASHRAF, M., SHAHBAZ, M., 2012: Growth stage-based modulation in antioxidant defense system and proline accumulation in two hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salinity tolerance. Flora 207, 388-397.

BAILLY, C., 2004: Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14, 93-107.

BARR, H.D., WEATHERLEY, P.E., 1962: A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. Aust. J. Biol. Sci. 15, 413-428.

BATES, L.S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D., 1973: Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39, 205-207.

BENMAHIOUL, B., DAGUIN, F., KAID-HARCHE, M., 2009: Effects of salt stress on germination and in vitro growth of pistachio (*Pistacia vera* L.). C. R. Biol. 332, 752-758.

BRADFORD, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

CANO, E.A., PEREZ-ALFOCEA, F., MORENO, V., CARO, M., BOLARIN, M.C., 1998: Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 53, 19-26.

CHANDLEE, J.M., SCANDALIOS, J.G, 1984: Analysis of variants affecting the catalyses development program in maize scutellum. Theor. Appl. Genet. 69, 71-77.

COSTA, A., DRAGO, I., BEHERA, S., ZOTTINI, M., PIZZO, P., SCHROEDER, J.I, POZZAN, T., SCHIAVO, F.L., 2010: H_2O_2 in plant peroxisomes: An in vivo analysis uncovers Ca^{2+}-dependent scavenging system. Plant J. 62, 760-772.

COUEE, I., SULMON, C., GOUESBET, G., EL-AMRANI, A., 2006: Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 57, 449-459.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

ELAVARTHI, S., MARTIN, B., 2010: Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. Methods Mol. Biol. 639, 273-281.

ELLIS, R.H., ROBERTS, E.H., 1981: The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Sci. Technol. 9, 373-409.

FAO, 2008: FAO land and plant nutrition management service. FAO, Rome, Italy. Available at: http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush (Accessed: 19 March 2011).

HABASH, D.Z., KEHEL, Z., NACHIT, M., 2009: Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. J. Exp. Bot. 60, 2805-2815.

HABER, A.H., LUIPPOLD, H.J., 1960: Separation of mechanisms initiating cell division and cell expansion in lettuce seed germination. Plant Physiol. 35, 168-173.

HAKIZIMANA, F., HALEY, S.D., TURNIPSEED, E.B., 2000: Repeatability and genotype × environment interaction of coleoptile length measurements in winter wheat. Crop Sci. 40, 1233-1237.

HEATH, R.L., PACKER, L., 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189-198.

HILL, T., LEWICKI, P., 2007: Statistics: Methods and Applications. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.

LEE, D.H., KIM, Y.S., LEE, C.B., 2001: The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). J. Plant Physiol. 158, 737-745.

MUNNS, R., TESTER, M., 2008: Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 651-681.

MUNNS, R., JAMES, R.A., XU, B., ATHMAN, A., CONN, S.J., JORDANS, C., BYRT, C.S., HARE, R.A., TYERMAN, S.D., TESTER, M., PLETT, D., GILLIHAM, M., 2012: Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na^+ transporter gene. Nat. Biotechnol. 30, 360-364.

NAKANO, Y., ASADA, K., 1981: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 22, 867-880.

PARVAIZ, A., SATYAWATI, S., 2008: Salt stress and phyto-biochemical response of plants – a Review. Plant Soil Environ. 54, 89-99.

PAULSEN, G.M., 1987: Wheat Stand Establishment. In: Heyne, E.G. (ed.), Wheat and wheat improvement, 384-389. ASA, CSSA and SSSA, Madison.

RASHID, A., QURESHI, R.H., HOLLINGTON, P.A., WYN JONES, R.G., 1999: Comparative responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at the seedling stage. J. Agron. Crop Sci. 182, 199-208.

SAYAR, R., BCHINI, H., MOSBAHI, M., KHEMIRA, H., 2010: Response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) growth to salt and drought stresses. Czech J. Genet. Plant Breed. 46, 54-63.

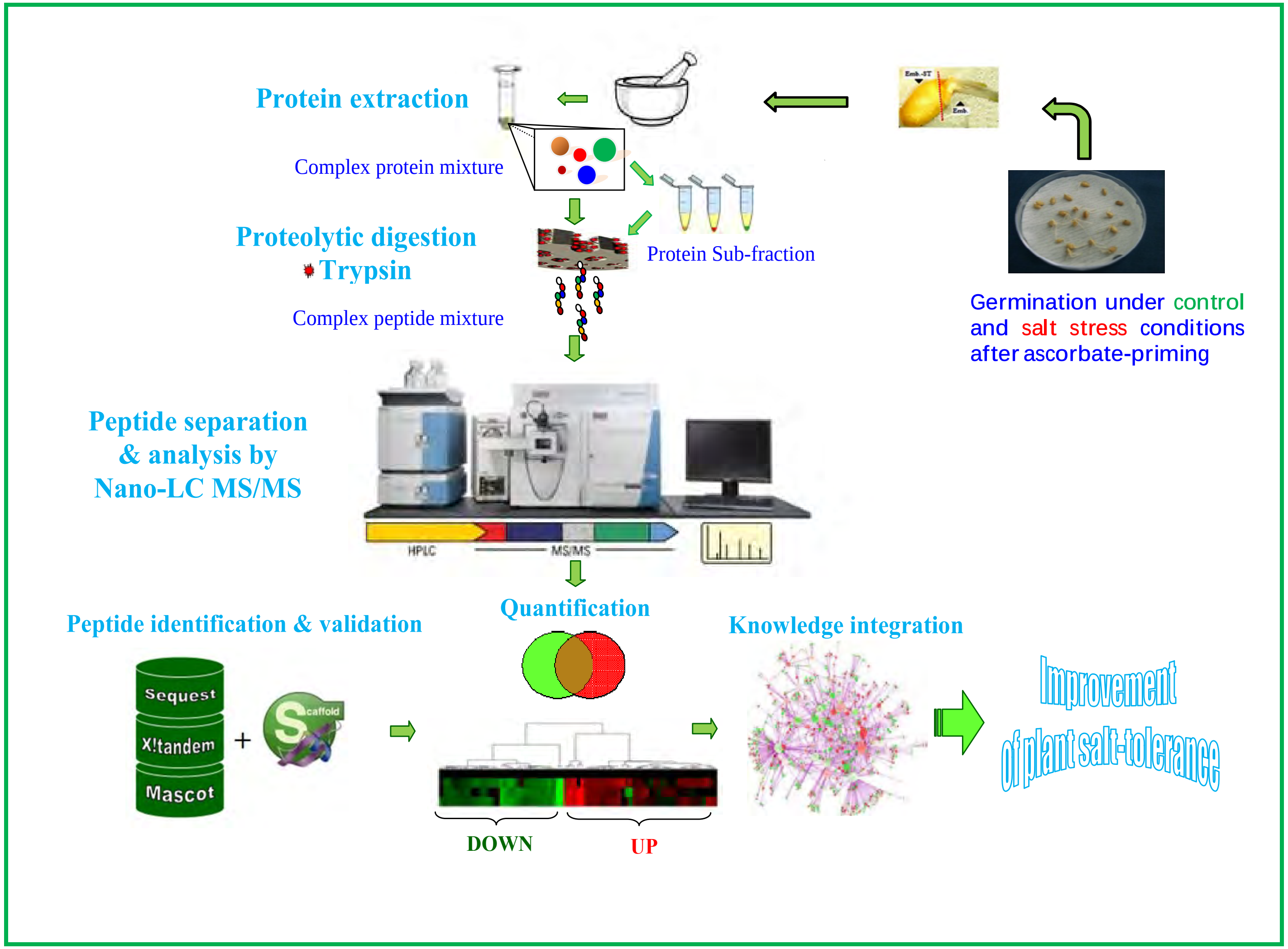
TAHIR, N.A., 2010: Germination characteristics and molecular characterizations of some wheat varieties in Sulaimanyah by SSR marker. Turk. J. Biol. 34, 109-117.

VELIKOVA, V., YORDAVOV, I., EDREVA, A., 2000: Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151, 59-66.

ZHANG, H., IRVING, L.J., MCGILL, C., MATTHEW, C., ZHOU, D., KEMP, P., 2010: The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: Sodium as an osmotic regulator. Ann. Bot. 106, 1027-1035.

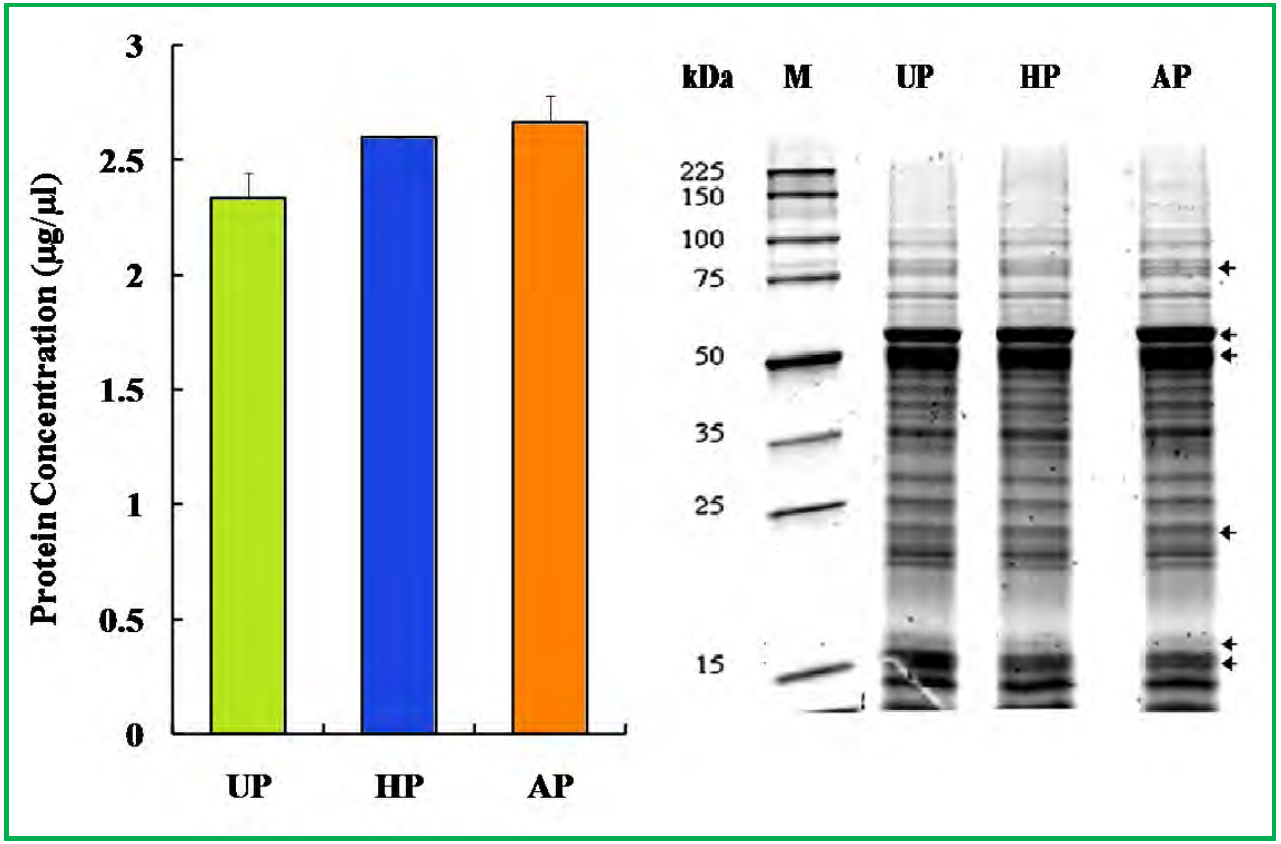
Address of the corresponding author:
Dr. Azzedine Fercha, Department of Biology, Abbes Laghrour, University, Khenchela-40000, Algeria
E-mail: ferchazzed@yahoo.fr

الملحق 4

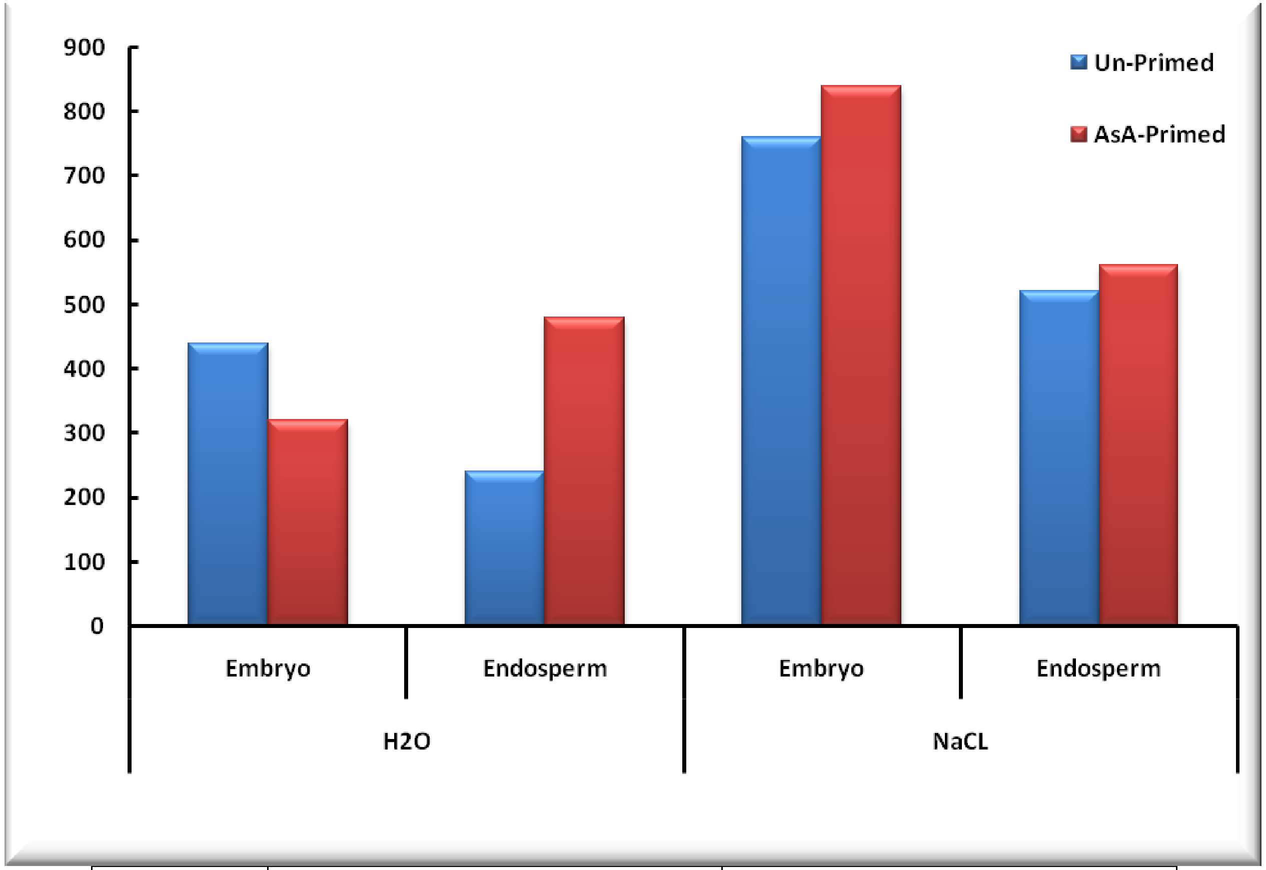


Schematic layout of the shotgun proteomic workflow adapted to identify salt-responsive proteins.

تصميم تخطيطي لمراحل عملية التحليل البروتيومي و تكييفها لتحديد بروتينات الاستجابة للملوحة في القمح.



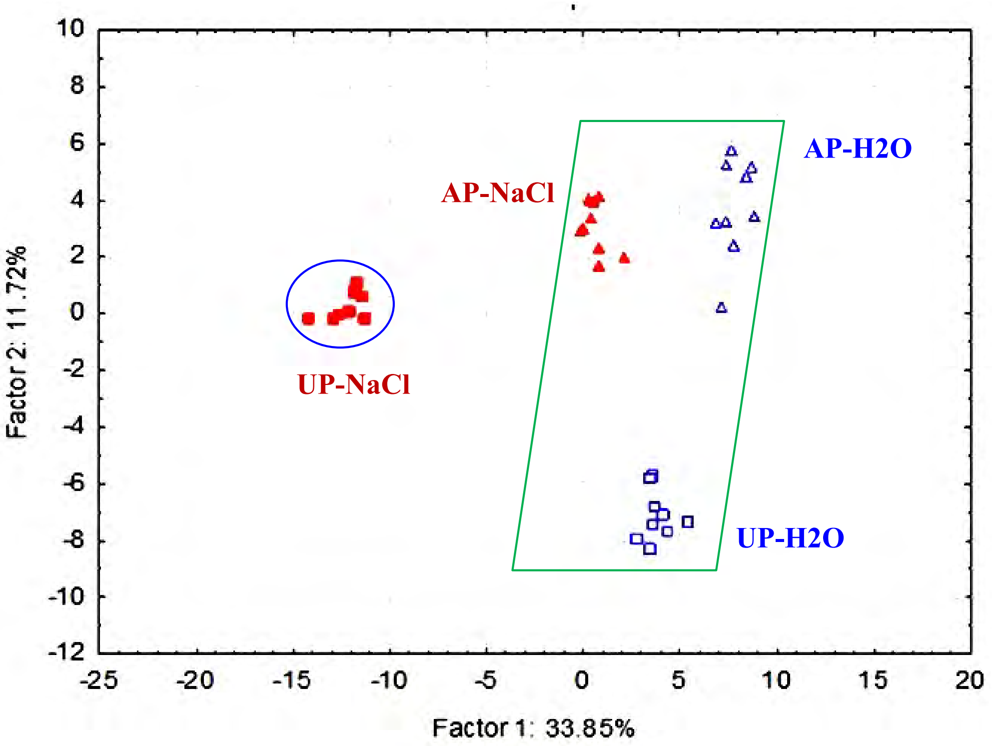
نتائج إضافية لتقدير البروتينات الأيضية في العينات التجريبية الثلاثة و كذا الهجرة الكهربائية على الجال لهذه البروتينات.



	H_2O		NaCL	
	Embryo	Endosperm	Embryo	Endosperm
Un-Primed	440	240	760	520
AsA-Primed	320	480	840	560

نتائج إضافية الفصل الخامس: تأثير التحفيز-بحمض الأسكوربيك و الملوحة على محتوى البروتينات الأيضية في كل من الجنين و السويداء (ميكروغرام/غ مادة جافة).

A



B

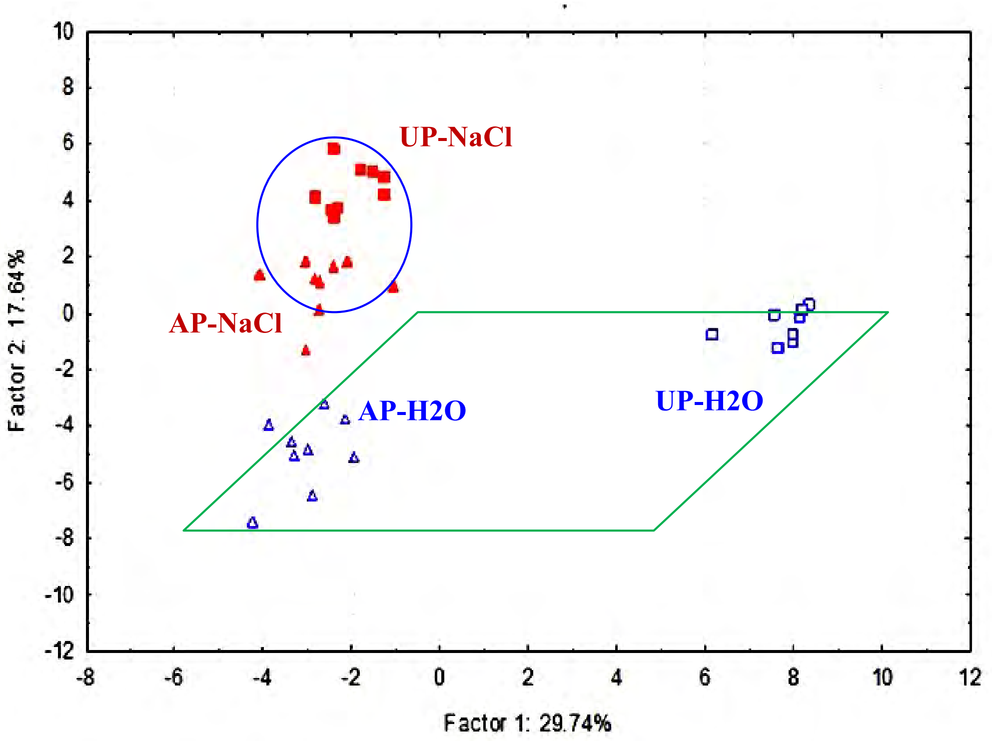
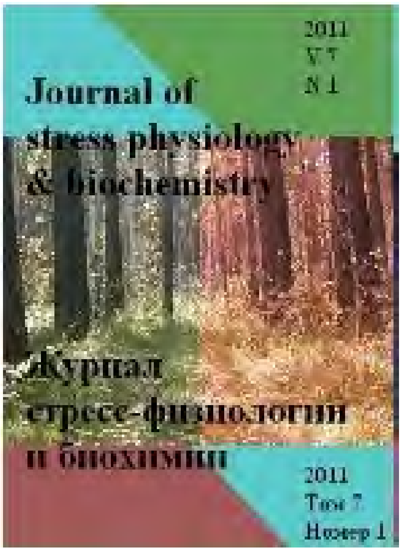


Fig. S1. Multifactorial comparison of the treatments using PCA. Data are presented for each of nine replicate for each treatment using the significantly varied proteins from Embryo (A) and Embryo-surrounding tissues (B). The percent variance explained by each PC is provided.

التحليل المقارن المتعدد الأوجه لمعطيات التجربة الخامسة (مجموع البروتينات التي تغيرت بصورة معنوية) في الجنين و الأنسجة المحيطة به.

الملحق 5

لمحة عن بعض المقالات و المداخلات ذات الصلة بموضوع الرسالة



Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 7 No. 1 2011, pp. 27-37

ISSN 1997-0838

Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application

Fercha Azzedine [1,2,*]. Hocine Gherroucha[2] and Mebarek Baka[2]

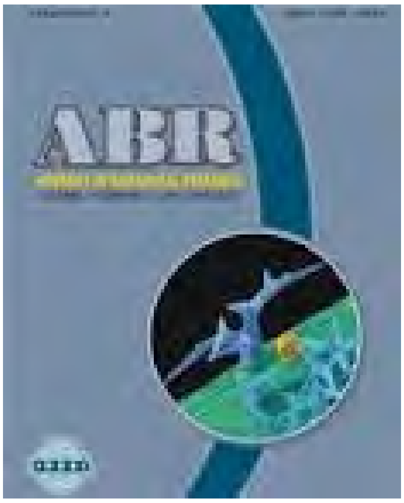
[1] *Department of biology, University of Abbas Laghrour Khenchela, Algeria*

[2] *Laboratory of plant physiology, University of Mentouri Constantine, Algeria.*

* Phone: +213-772977498 E-mail- Ferchazzed@yahoo.fr

Received January 7, 2011

*****



Advances in Biological Research 5 (6): 315-322, 2011

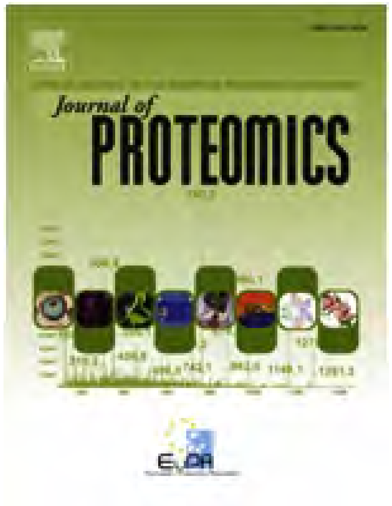
ISSN 1992-0067

Some Physiological and Biochemical Effects of NaCl Salinity on Durum Wheat (Triticum durum Desf.)

A Fercha[1,*]

1 Azzedine Fercha, Department of Biology, Abbès Laghrour University Center, Khenchela-Algeria.

*E-mail: Ferchazzed@yahoo.fr.



Journal of Proteomics, 2013, 91, 486–499.

Gel-free proteomics reveal potential biomarkers of priming-induced salt tolerance in durum wheat

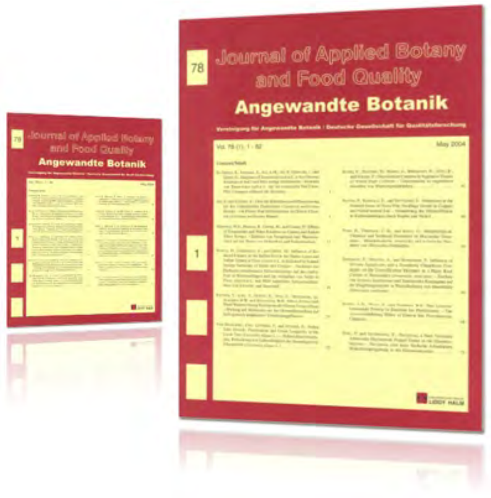
Azzedine Fercha [b, c], Anna Laura Capriotti[a], , , Giuseppe Caruso[a], Chiara Cavaliere[a], Hocine Gherroucha[c], Roberto Samperi[a], Serena Stampachiacchiere[a], Aldo Lagana[a]

a Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

b Department of Biology, University of Abbès Laghrour Khenchela, 40000 Khenchela, Algeria

c Department of Biology, University of Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algeria

Received 23 March 2013, Accepted 12 August 2013, Available online 21 August 2013



Journal of Applied Botany and Food Quality 87, 74 - 79 (2014), DOI:10.5073/JABFQ.2014.087.011

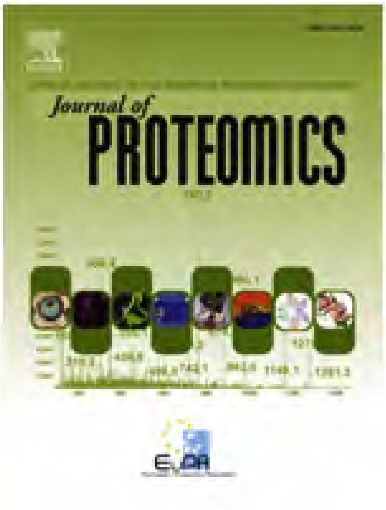
1Department of Biology, Abbes Laghrour University, Khenchela, Algeria

2Department of Biology, Mentouri University, Constantine, Algeria

The role of osmoprotectants and antioxidant enzymes in the differential response of durum wheat genotypes to salinity

A. Fercha[1], H. Gherroucha[2]*

(Received August 25, 2013)



Journal of Proteomics, 2014, 108, 238–257.

Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress

Azzedine Fercha [b, c,] Anna Laura Capriottia, , , Giuseppe Carusoa, Chiara Cavalierea, Roberto Samperia, Serena Stampachiacchierea, Aldo Laganàa.

a Department of Chemistry, Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

b Department of Biology, University of Abbès Laghrour Khenchela, 40000 Khenchela, Algeria

c Department of Biology, University of Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algeria

Received 3 March 2014, Accepted 26 April 2014, Available online 21 May 2014

****

Azzedine Fercha* et al., 2014.

Shotgun proteomic analysis of ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salinity conditions (Abstract). J Biotechnol Biomater 2014, 3 (5) 272-311 ; http://dx.doi.org/10.4172/2155-952X.S1.029 ;

*E-mail: Ferchazzed@yahoo.fr.

دور الهرمونات النباتية ومضادات الأكسدة في تحمل القمح الصلب للملوحة

الملخص:

تعد ملوحة التربة من المشاكل الرئيسية والمتزايدة التي تواجهها الزراعة في جميع أنحاء العالم، ولاسيما في مناطق زراعة القمح. يعد القمح الصلب (*Triticum durum* Desf) من أهم المحاصيل الزراعية إذ أنه مصدر الغذاء الأساسي لكثير من البلدان، على غرار الجزائر، أين تشكل الملوحة تهديدا أساسيا لإنتاجه. أجريت هذه الدراسة لغرضين اثنين، تمثل الأول في دراسة إمكانية تعزيز مقدرة القمح الصلب على تحمل الملوحة عن طريق تحفيز البذور بواسطة الهرمونات النباتية (حمض الجبريليك، GA_3) و/أو مضادات الأكسدة (حمض الأسكوربيك، AsA). دلت النتائج على أن التأثير السلبي للملوحة على جل معايير الإنبات و النمو الخضري وكذا مظاهر الأيض العام للجنين و الشتلات يمكن التقليل منه من خلال المعاملة المسبقة للبذور بواسطة GA_3 أو AsA. أما الغرض الثاني، فتعلق باستخدام تقنية البروتيوميك لدراسة المؤشرات الحيوية المحتملة للآليات الجزيئية التي تتحكم في تحمل الملوحة المحدث عبر تحفيز البذور بواسطة حمض الأسكوربيك الذي أبدى أفضل تأثير. كشفت النتائج عن تورط أكثر من 160 من بروتينات الأيض في تحديد قوة البذور و تحملها للملوحة المحدث عبر تحفيز البذور، أهمها ما تعلق بعمليات الوقاية من تأثير المواد الأكسوجينية التفاعلية (ROS)، تخليق و إعادة تدوير البروتين و تخليق الهرمونات النباتية كالأكسين. تتيح هذه النتائج في مجملها فهما أفضل لاستجابة القمح الصلب للملوحة عند المراحل الأولى من نموه، بالإضافة إلى توفير معلومات مفتاحيه لتحسين كفاءة القمح الصلب على تحمل الملوحة من خلال استغلال هذه المعلومات في برامج تربية القمح.

الكلمات المفتاحية: الإجهاد الملحي، تحفيز البذور، حمض الجبريليك، حمض الأسكوربيك، التحليل البروتومي الخالي من الجال، .*Triticum durum* Desf.

THE ROLE OF PHYTOHORMONES AND ANTIOXIDANTS IN SALT TOLERANCE OF DURUM WHEAT

Abstract:

Soil salinity is one of the major and increasing problems of the agriculture worldwide, particularly in wheat growing areas. Durum wheat (Triticum durum Desf.) is an important cereal crop and source of staple food for many countries, where its production is mainly threatened by salinity. The present study was conducted for two purposes. The first one was to promote the salt tolerance of durum wheat by priming seeds with hormones (GA_3) and/or antioxidants (ascorbic acid). The results indicated that the effect of salinity upon almost all the germination, growth and metabolism parameters of wheat embryo or seedling can be alleviated by seed priming using GA_3 and/or AsA. The second was to investigate the potential biomarkers of mechanisms underlying salt tolerance induced by ascorbate-priming by using proteomic technology. Our results revealed the involvement of more than 160 metabolic proteins on the determination of seed vigor or priming-induced salt tolerance, predominantly those involved in oxidative stress defense, protein synthesis and turnover and phytohormones biosynthesis namely auxin. Altogether, these results extend our understanding about salt stress tolerance in plants, and provide valuable information for breeding programmes to improve salt tolerance in durum wheat.

Keywords: Salt stress, Seed priming, Gibberellic acid, Ascorbic acid, Gel-free proteomic, Triticum durum Desf.

ROLE DES PHYTOHORMONES ET DES ANTIOXYDANTS DANS LA TOLERANCE DU BLE DUR A LA SALINITE

Résumé :

La salinité du sol est l'un des plus grands et croissants problèmes qui menacent l'agriculture à travers le monde, particulièrement dans les régions productrices de blé. Le blé dur (Triticum durum Desf.) est une céréale importante et source d'aliment de base pour de nombreux pays, où la salinité des sols met en péril sa production. La présente étude a été réalisée pour deux raisons: la première était de promouvoir la tolérance au sel de blé dur par l'induction des semences avec les hormones (GA_3) et/ou les antioxydants (acide ascorbique). Les résultats indiquent que l'effet adverse de la salinité sur l'ensemble des paramètres de germination, de croissance et le métabolisme peut être atténué par le traitement pré-germinatif des semences avec l'AG_3 et/ou AsA. La seconde étant l'utilisant de la technologie protéomique pour étudier les bio-marqueurs potentiels des mécanismes impliqués dans la tolérance à la salinité induite par le 'seed-priming' (cas de l'acide ascorbique). Nos résultats ont révélé l'implication de plus de 160 protéines métaboliques dans la détermination de la vigueur et la tolérance au sel induite par seed-priming, plus particulièrement celles impliquées dans la protection contre les espèces d'oxygène réactivées (ROS), la synthèse et le turnover des protéines, la synthèse des phytohormones telles que l'auxine. Ensemble, ces résultats permettent une meilleure compréhension de la tolérance au sel induite, et fournissent également des informations clés pour les programmes d'amélioration génétique en vue d'améliorer la tolérance au sel chez le blé dur.

Mots-clés: Stress salin, l'induction des semences, acide gibbérellique, acide ascorbique, Triticum durum Desf.

الإسم : عزالـدين،   اللقب: فـرشة   تاريخ المناقشة : 2015/03/16

عنوان الأطروحة

دور الهرمونات النباتيـة ومضـادات الأكسـدة في تحمل القمـح الصلب للملوحـة

The role of phytohormones and antioxidants in salt tolerance of durum wheat (*Triticum durum* Desf.)

نوع الشهـادة: دكتـوراه في العلـوم

الملخص:

تعد ملوحة التربة من المشاكل الرئيسية والمتزايدة التي تواجهها الزراعة في جميع أنحاء العالم، ولاسيما في مناطق زراعة القمح. يعد القمح الصلب (*Triticum durum* Desf) من أهم المحاصيل الزراعية إذ أنه مصدر الغذاء الأساسي لكثير من البلدان، على غرار الجزائر، أين تشكل الملوحة تهديدا أساسيا لإنتاجه. أجريت هذه الدراسة لغرضين اثنين، تمثل الأول في دراسة إمكانية تعزيز مقدرة القمح الصلب على تحمل الملوحة عن طريق تحفيز البذور بواسطة الهرمونات النباتية (حمض الجبريليك، GA3) و/أو مضادات الأكسدة (حمض الأسكوربيك، AsA). دلت النتائج على أن التأثير السلبي للملوحة على جل معايير الإنبات و النمو الخضري وكذا مظاهر الأيض العام للجنين و الشتلات يمكن التقليل منه من خلال المعاملة المسبقة للبذور بواسطة GA_3 أو AsA. أما الغرض الثاني، فتعلق باستخدام تقنية البروتيوميك لدراسة المؤشرات الحيوية المحتملة للآليات الجزيئية التي تتحكم في تحمل الملوحة المحدث عبر تحفيز البذور بواسطة حمض الأسكوربيك الذي أبدى أفضل تأثير. كشفت النتائج عن تورط أكثر من 160 من بروتينات الأيض في تحديد قوة البذور و تحملها للملوحة المحدث عبر تحفيز البذور، أهمها ما تعلق بعمليات الوقاية من تأثير المواد الأكسوجينية التفاعلية (ROS)، تخليق و إعادة تدوير البروتين و تخليق الهرمونات النباتية كالأكسين. تتيح هذه النتائج في مجملها فهما أفضل لاستجابة القمح الصلب للملوحة عند المراحل الأولى من نموه، بالإضافة إلى توفير معلومات مفتاحيه لتحسين كفاءة القمح الصلب على تحمل الملوحة من خلال استغلال هذه المعلومات في برامج تربية القمح.

الكلمات المفتاحية: الإجهاد الملحي، تحفيز البذور، حمض الجبريليك، حمض الأسكوربيك، التحليل البروتومي الخالي من الجال، *Triticum durum* Desf.

مخبر البحث: تثمين و تطوير الموارد الوراثية النباتية

مدير البحث: د. غروشة حسين	أستاذ التعليم العالي	جـــامـــعـــة الإخـوة منتوري– قسنطينـة
أعضاء اللجنة:		
د. باقـــة مبـــارك	أستاذ التعليم العـالي	جـــامـــعـــة الإخـوة منتوري– قسنطينـة
د. بـــدور ليلـــى	أستاذة التعليم العالي	جـــامـــعـــة الإخـوة منتوري– قسنطينـة
د. حـــرزالله داود	أستاذ التعليم العالي	جامعـة فرحات عباس سطيـف 1 – سطيـف
د. يحي عبد الوهاب	أستاذ التعليم العـالي	م الجامعي ع الحفيظ بوالصـوف – ميلـــة
د. حزمون الطـــاهر	أستاذ محـــــاضر	جامعـة 20 أوت 55 سكيكـــدة – سكيكـدة