ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
صفحه ۳۳۷ - ۳۲۵

بررسی بیان پروتئین‌های القاء شده برگ دو رقم سویا تحت تنش شوری توسط تکنیک الکتروفورز دو بعدی

Investigating the Expression of Induced Proteins in Leaves of Two Soybean Cultivars under Salt Stress by Two-Dimensional Electrophoresis Technique

یگانه شفیعی[۱]، سدابه جهانبخش گده کهریز*[۲]، سلیم فرزانه[۳]، سیده یلدا رئیسی ساداتی[۴]

۱- دانش‌آموخته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دکترای اصلاح نباتات ژنتیک مولکولی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Shafiei Y[1], Jahanbakhh Godehkahriz S[*2], Farzaneh S[3], Raisi Sadati SY[4]

1- MSc Graduated of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Professor, Department of plant genetics and production engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Associate Professor, Department of plant genetics and production engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4- PhD Plant Breeding (genetic molecular), Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲)

چکیده

گیاه سویا در تغذیه انسان از ارزش فراوانی برخوردار است، به‌طوری که پروتئین فرآوری شده سویا، جایگزین پروتئین‌های حیوانی مصرف روز افزون یافته است. عمده‌ترین تنش محیطی در اکثر مناطق جهان، شوری می‌باشد که رشد و عملکرد محصولات زراعی را محدود کرده است. لذا هدف از این تحقیق بررسی تغییرات الگوی پروتئینی دو رقم سویا تحت تنش شوری با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی می‌باشد. آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۹-۱۳۹۸ به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیل اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل فاکتور اول تنش شوری (۰، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر) و فاکتور دوم ژنوتیپ‌های سویا (DPX و آرین) بودند. یافته‌ها نشان داد با انجام الکتروفورز دو بعدی تعدادی لکه پروتئینی تکرار پذیر شناسایی شد که از این تعداد، ۱۴ لکه پروتئینی مربوط به رقم DPX در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و ۱۱ لکه پروتئینی در رقم آرین تغییرات بیان معنی‌داری را در سطوح مختلف تنش شوری نشان دادند. همچنین ۵۵ درصد از پروتئین‌های شناسایی شده کاهش بیان و ۱۹ درصد افزایش بیان داشتند. پروتئین‌های شناسایی شده در مسیرهای متابولیکی مختلف مانند متابولیسم انرژی، فتوسنتز، تنفس، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، انتقال پیام، ترجمه، نسخه‌برداری و دیواره سلولی نقش دارند. بیشتر پروتئین‌های مشترک در ارقام DPX و آرین از آنزیم‌های کلروپلاستی و تعدادی هم از آنزیم‌های میتوکندریایی بودند. بیشترین تغییرات در رقم DPX (متحمل به شوری) و نهایتاً کمترین تغییرات در رقم حساس آرین مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ تلاش بیشتر رقم DPX برای کاهش خسارت ناشی از تنش شوری است.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی
پروتئین کل
تنش شوری
سویا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

مقدمه

لوبیا روغنی با نام علمی *Glycine max* گیاهی است از تیره نخود که روغن استخراج شده از دانه‌های آن یکی از مهم‌ترین انواع روغن‌ها است. دانه سویا از لحاظ اسیدآمینه متیونین نسبت به کنجد فقیر است اما از لحاظ اسید آمینه لیزین در سطح بالایی قرار دارد. سویا بیش از سایر دانه‌ها به پروتئین حیوانی شباهت دارد. روغن سویا ۴۹ درصد لینولئیک اسید و ۲۵ درصد اسیداولئیک دارد. میزان پروتئین سویا با ۴۵-۳۰ درصد دو برابر سایر دانه‌های روغنی است اما درصد روغن (۲۵-۱۸ درصد) آن از سایر دانه‌های روغنی رایج کمتر است. وجود پروتئین زیاد سبب شده است که کنجاله روغن کشیده شده آن برای تغذیه انسان بسیار مناسب باشد (Daneshian and Babaei 1996). سطح زیر کشت سویا در کشور در سال‌های اخیر۶۰ تا ۸۰ هزار هکتار بوده است که حدود ۸۵ درصد آن آبی و ۱۵ درصد دیم می‌باشد. استان گلستان با حدود ۷۵ درصد سطح زیر کشت سویا کشور، بیشترین سطح و استان‌های مازندران و اردبیل به‌ترتیب با ۱۳ و ۱۰ درصد سطح سویا کشور، مقام‌های دوم و سوم را به خود اختصاص دادند (Faraji et al. 2016). شوری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی تولید محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک را به‌شدت کاهش می‌دهد (Dolatabadi et al. 2017). سالانه ۱۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان در اثر شوری حاصل از آبیاری و به‌دلیل شوری ثانویه ناشی از فعالیت‌های بشر از چرخه تولید خارج و به زمین‌های غیر قابل کاشت تبدیل می‌شوند (Pessarakli and Szabolcs 2011). شوری و آهکی بودن خاک و آب آبیاری و پایین بودن موادآلی در خاک‌های زراعی کشور موجب کمبود عناصر غذایی قابل جذب گیاه می‌شود (Jafarnejadi et al. 2022). کشور ایران از نظر اقلیمی در زمره مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار دارد. از ویژگی‌های این نوع مناطق می‌توان به تبخیر زیاد و بارش‌های اندک و پراکنده جوی اشاره نمود که باعث تجمع نمک‌ها در قشر سطحی خاک‌ها می‌شود. این وضعیت به‌دلیل مدیریت نادرست آبیاری تشدید شده و باعث شور شدن خاک‌های زراعی کشور می‌شود (Ranjbar and Pirasteh-Anosheh 2017). شوری رشد گیاهان را به دو صورت تحت تأثیر قرار می‌دهد. غلظت بالای نمک خاک از یک‌طرف باعث کاهش پتانسیل آب خاک شده (تنش اسمزی) و از طرف دیگر در گیاه ایجاد سمیت می‌کند (سمیت یونی) که باعث تغییرات بیوشیمیایی و پاسخ‌های فیزیولوژیک در گیاه می‌شود (Pirasteh-Anosheh et al. 2019). اثر زیان‌آور شوری بالا بر روی گیاهان را می‌توان در سطح کل گیاه، مثل مرگ گیاه و یا کاهش محصول مشاهده نمود (Chen et al. 2018; Zhong et al. 2019). شوری آب و خاک سبب بروز تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در گیاهان می‌شود، از تغییرات بیوشیمیایی که تحت تنش شوری رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که باعث آسیب اکسیداتیو و آسیب غشای سلولی می شود. این گونه‌های فعال اکسیژن بسیار فعال و سمی هستند و در غیاب یک مکانیسم محافظتی قوی می‌توانند به ساختار لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه بزنند، بنابراین با ایجاد تنش اکسیداتیو و آسیب به سلول‌های گیاهی، رشد گیاه کاهش می‌یابد (Hasanuzzaman et al. 2018). پاسخ گیاهان به تنش شوری در برگیرنده پاسخ‌های متنوع بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بوده، در عین حال این پاسخ‌ها پیچیده بوده و به عوامل متفاوتی همچون مرحله رشد گیاه، نوع و غلظت املاح، پتانسیل ژنتیکی گیاه و به عوامل محیطی، بستگی دارد (Dastneshan 2019). گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری، پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیم‌های مسیرهای متابولیکی با تنش وارد شده مقابله می‌کنند (Dolatabadi et al. 2017). در تحقیقی Parvej و همکاران (2016) بیان کردند که گیاه سویا به کاهش پتاسیم خاک حساس است به‌طوری که با کاهش کود پتاسیم در خاک میزان عملکرد دانه سویا کاهش پیدا می‌کند. سویا از جمله گیاهان روغنی حساس به شوری محسوب می‌شود و آبیاری با آب‌های شور پتانسیل بالای تولید آن را در معرض‌خطر قرار می‌دهد. مهم‌ترین واکنش گیاه سویا به افزایش شوری خاک، کاهش رشد است. از دست دادن تورژسانس سلولی در اثر کاهش پتانسیل آبی خاک، موجب بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز می‌شود (Gul et al. 2014). ساخت کلروفیل نیز از جمله فرآیندهایی است که تحت تأثیر غلظت بالای نمک قرار گرفته و میزان فتوسنتز و تولید انرژی در گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

(Jamil et al. 2014). تشدید روند شور شدن منابع آب و خاک، باعث افزایش توجه به پژوهش‌های مرتبط با راهکارهای بهبود عملکرد گیاهان زراعی در شرایط شور شده است. بر اساس گزارش‌های منتشر شده، سابقه پژوهش‌ها پیرامون شناخت جنبه‌های مختلف تنش شوری و روش‌های افزایش تحمل گیاهان به شوری در جهان به بیش از یک قرن می‌رسد (Pirasteh-Anosheh and Emam 2019). با توجه به افزایش روزافزون زمین‌های شور به واسطه کم‌آبی و آبیاری با آب‌های شور به‌نظر می‌رسد بررسی راهکارهای افزایش تحمل به تنش شوری ضروری می‌باشد (Shahraki et al. 2021). در مورد بسیاری از گیاهان، نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که ارقام متحمل به شوری، الزاما ارقام مناسب و پرمحصول برای شرایط شور نمی‌باشند (Ranjbar et al. 2018). اگرچه علی‌رغم آنچه تصور می‌شود، گیاهان مقاوم به شوری تحمل بسیار بالایی به شوری دارند، ولی این گیاهان در مرحله جوانه‌زنی، نسبت به تنش شوری حساس بوده و جوانه‌زنی مطلوب بذر آن‌ها در شوری‌های بسیار پایین صورت می‌گیرد (Ranjbar et al. 2019). حساس‌ترین مرحله رشدی گیاهان زراعی به شوری، مرحله استقرار گیاهچه است و اگر گیاهی این مرحله را با موفقیت سپری کند، تحمل به شوری آن در مراحل بعدی افزایش یافته و تولید قابل قبولی خواهد داشت (Pirasteh-Anosheh and Emam 2019). از آن جایی‌که گونه‌های گیاهی از نظر پاسخ به شوری متفاوت می‌باشند لذا مطالعه درباره مکانیزم‌های ایجاد کننده تحمل به شوری در گیاهان مختلف ضروری می‌باشد (Jahanbakhsh et al. 2017). امروزه بررسی الگوی پروتئینی به‌طور مستقیم برای بررسی اجزاء درگیر در یک پروسه بیولوژی و سطوح کمی آن‌ها می‌تواند به‌کار گرفته شود. در واقع پروتئین‌هایی که نقش آنزیمی، تنظیمی و ساختاری را دارا می‌باشند و محصول نهایی رونویسی بخش‌هایی از ژنوم هستند در این روش قابل ارزیابی و شناسایی خواهند بود. پیشرفت‌های بوجود آمده در الکتروفورز دو بعدی، افزایش تعداد پروتئین‌های توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی و استفاده از دستگاه طیف سنج جرمی[1] برای شناسایی پروتئین‌ها باعث شده است تا روش پروتئومیکس در شناسایی پروتئین کل بیان شده در شرایط گوناگون به ابزاری توانمند تبدیل شود (Mehrabi et al. 2013). گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری بر تنش وارد شده غلبه می‌کنند (Turan et al. 2012). این عمل از طریق تغییر بیان ژن‌ها در جهت کاهش و یا افزایش میزان پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی صورت می‌گیرد (Joseph and Jini 2010). تجزیه پروتئومیک یکی از بهترین راهبردها جهت بررسی دینامیک تظاهر پروتئین‌ها تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Guo et al. 2012). در پژوهشی Dolatabadi و همکاران (2017) بیان کردند با انجام الکتروفورز دو بعدی ۱۱۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شناسایی شد، که از بین آن‌ها ۴۴ لکه براساس شاخص فاکتور القا، دارای تغییرات بیان معنی‌داری بودند، که ۷ لکه پروتئینی همچنین در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شدند. همچنین Jahanbakhsh و همکاران (2017) بیان کردند که در گیاه گل گاوزبان نتایج حاصل از الکتروفورز دو بعدی نشان داد که میزان بیان برخی از پروتئین‌ها در سطح بالای شوری و سطح بالای کلرید کلسیم افزایش یافت و همچنین پروتئین‌های متفاوتی با شاهد بیان شدند که به احتمال زیاد این پروتئین‌ها مربوط به ایجاد مقاومت در برابر شوری می‌باشند. پروتئین‌ها در مقایسه با سایر ماکرومولکول‌ها در موقعیت ممتازی قرار دارند زیرا با آن که ارتباط خود را با ژن‌ها حفظ کرده‌اند، از این رو پروتئین‌ها می‌توانند بهترین توصیف برای عمل تک تک ژن‌ها در سطح مولکولی باشند. از طرف دیگر توجه به این نکته که واکنش به عوامل محیطی از طریق پروتئین‌ها انجام می‌شود، بر اهمیت نقش پروتئین‌ها در سلول می‌افزاید. لذا این پژوهش به‌منظور فهم بهتر مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) دو رقم DPX و آرین سویا که از طریق بررسی و شناسایی تغییراتی که تحت تنش شوری در سطح پروتئین‌های ساختاری یا آنزیمی رخ می‌دهد، با استفاده از رهیافت پروتئومیک طراحی و اجرا شد.

[1] Mass spectrometry

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۹-۱۳۹۸ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل فاکتور اول تنش شوری (۰، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر) و فاکتور دوم ارقام سویا (DPX (متحمل شوری) و آرین (حساس به شوری)) بود. بذور چغندرقند از بخش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل تهیه شد. برای اعمال تنش شوری و ایجاد تیمارهای مختلف شوری در هر گلدان به مقدار مناسب خاک ریخته شد و پس از تعیین درصد اشباع خاک با استفاده از نمودار ارائه شده توسط آزمایشگاه شوری خاک وزارت کشاورزی آمریکا میزان نمک (NaCl) مورد نیاز برای رسیدن به شوری‌های مورد نظر تعیین شد. گلدان‌ها به‌مدت یک هفته مرتب آبیاری شدند تا کل نمک در خاک پخش شود. بعد از اعمال تنش شوری هدایت الکتریکی خاک برای اطمینان از انجام صحیح شوری خاک، تعیین شد. همچنین در پایان آزمایش نیز هدایت الکتریکی خاک دوباره اندازه‌گیری شد. هفته نهم رشد گیاه یعنی مرحله میوه‌دهی نمونه برگ‌های سبز تازه در سه تکرار داخل فویل آلومینیومی بسته‌بندی شده و داخل ازت مایع منجمد قرار گرفتند و تا استخراج پروتئین جهت الکتروفورز دو بعدی در یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج پروتئین با استفاده از روش دمروال و همکاران با کمی تغییرات انجام شد (Damerval et al. 1989). بدین‌منظور ۰/۱ گرم از هر نمونه برگی وزن شد و با ازت مایع پودر شده و به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس حدود ۵۰۰ مایکرولیتر محلول تری‌کلریدریک اسید (TCA) استون سرد ۱۰ درصد اضافه و با پستل (وسیله‌ای برای له کردن بافت نمونه گیاهی) رسوب ته ویال قطعه قطعه شد، سپس تا جایی که تیوپ پر شد از محلول تری‌کلریدریک اسید استون اضافه و ورتکس گردید و یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها از فریزر خارج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، سپس مایع رویی را دور ریخته و نمونه‌ها را به روی یخ منتقل و به هر تیوپ ۵۰۰ مایکرولیتر محلول شستشو اضافه و با پستل رسوب ته ویال قطعه قطعه شد. سپس تیوپ‌ها را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ (مدل HAEMATOKRIT 200، کمپانی Hettich) شدند. مرحله شستشو پنج بار تکرار شد. برای محلول کردن پروتئین‌ها از روش مصطفایی استفاده شد (Mostafaie 2003). همچنین تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (Bradford 1979). به‌منظور انجام الکتروفورز در بعد اول، از ژل نواری ۱۸ سانتی‌متری pH= ۴-۷ خطی تهیه شده از شرکت Bio Rad استفاده شد. سپس بعد اول با دستگاه IPG phor3 و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با برنامه مشخص اجرا شد. این مرحله با شدت جریان ۷۵ میلی‌آمپر، ۱۰:۳۰ ساعت به‌طول انجامید. بعد دوم به روش SDS-PAGE روی ژل اکریل آمید ۱۱ درصد قرار گرفت و دستگاه الکتروفورز ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ۵۰ و سپس به‌مدت ۳ ساعت با ولتاژ ۱۶۵ انجام شد. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل‌ها با کوماسی بلو صورت گرفت. پس از مرحله رنگ‌بری ژل‌ها در وضوح تصویر ۳۰۰ نقطه در اینچ با استفاده از دستگاه اسکنر مدل GS-800 ساخت شرکت Bio-Rad اسکن شدند. سپس، تصاویر آن‌ها با نرم‌افزار Image Master 6.0 آنالیز شده، شناسایی لکه، تعیین مقدار پروتئین و جفت لکه‌ها با استفاده از این نرم‌افزار بررسی شدند. به‌منظور بررسی تغییرات کمی بیان پروتئین‌ها، از مقدار درصد حجمی هر لکه به‌عنوان یک مقدار نرمال شده استفاده شد.

در پایان کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های حاصل از این آزمایش، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 صورت گرفت. برای تعیین تغییرات بین درصد حجمی لکه‌ها در تیمارهای بدون تنش و سطوح مختلف تنش شوری از آزمونF در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

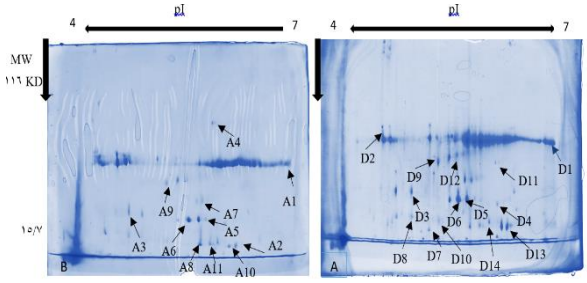
نتایج و بحث

نتایج آنالیز ژل‌ها نشان داد که بیشترین تغییرات پروتئوم تحت تنش شوری مربوط به پروتئین‌های درگیر در واکنش‌ها و مسیرهای متابولیسمی بودند. پروتئین‌هایی که دچار تغییرات معنی‌دار بودند در سه گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول و دوم پروتئین‌هایی بودند که به‌صورت کاملاً اختصاصی در ارقام DPX

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

(متحمل به تنش شوری) و آرین (حساس به شوری) دچار تغییرات معنی‌داری در میزان بیان شده بودند که تفاوت بین این دو گروه می‌تواند بیانگر پاسخ متفاوت ارقام مورد مطالعه نسبت به تنش شوری و علت تحمل و یا حساسیت آن‌ها در مواجهه با تنش باشد. گروه سوم پروتئین‌هایی بودند که در هر دو رقم به‌صورت مشترک و با روندی تقریباً مشابه دچار تغییر شدند که معرف پروتئین‌های می‌باشند که به‌صورت عمومی به تنش شوری واکنش نشان می‌دهند (شکل ۱).

لکه‌هایی که در رقم DPX دچار تغییر بیان شدند: نتایج نشان داد که از ۶۰ لکه پروتئینی تکرار پذیر شناسایی شده ۱۴ لکه فقط در رقم DPX (رقم متحمل به تنش شوری) تغییرات معنی‌دار نشان دادند که از این تعداد ۱۴ لکه دارای تغییرات با روند مشخص در سطوح مختلف تنش شوری بودند. ۱۲ لکه با افزایش سطح تنش افزایش بیان، و دو لکه نیز کاهش بیان نشان دادند (جدول ۱). لکهٔ D1 احتمالاً پروتئین شوک حرارتی (*HSP*)[1] می‌باشد که از نظر آماری افزایش بیان معنی‌داری به هنگام تنش شوری داشت. هنگامی‌که تنش گرمایی به گیاه اعمال می‌شود، پروتئین شوک گرمایی در کلروپلاست بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی شده و در طول واکنش به تنش، افزایش می‌یابد. پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه تجمع بیشتری پیدا می‌کنند که این افزایش باعث سازگاری گیاهان به تنش و تحمل آن می‌شود. پروتئین شوک حرارتی از مهم‌ترین گروه پروتئینی است که به بازسازی پروتئین‌های دناتوره شده کمک می‌کند. تاخوردگی بسیاری از پروتئین‌ها به کمک چاپرون‌ها صورت می‌گیرد. چاپرون‌های مولکولی جزء پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشند، بنابراین سنتز آن‌ها زمانی که در معرض دمای بالا قرار می‌گیرند به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. این عکس‌العمل یک سیستم بازخوردی را فعال کرده که به باز شدن تاخوردگی پروتئین‌ها با افزایش ساخت چاپرون‌ها پاسخ می‌دهد که باعث تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها می‌شود (Wieten et al. 2007). افزایش بیان پروتئین شوک حرارتی در پاسخ به تنش خشکی نیز گزارش شده است (Caruso et al. 2009).



شکل ۱- ژل‌های الکتروفورز دوبعدی برگ ارقام DPX (A) و آرین (B) سویا

Figure 1- Two-dimensional electrophoresis gels of DPX (A) and Arian (B) Soybean leaves cultivars

[1] Heat shock protein

جدول ۱- تغییرات پروتئین‌ها در رقم DPX و درصد حجمی هر لکه تحت تنش شوری

شماره لکه Spot	نام پروتئین Protein name	pI	وزن مولکولی MW(kD)	درصد حجمی کنترل Percent volume normal	درصد حجمی تنش شوری Percent volume salinity stress
D1	Heat shock Protein 7	6.80	73	0.059	0.320
D2	Alanine aminotransferase	4.6	93.5	0.171	0.337
D3	H^+ transporting two sector ATPase	7.00	62.5	0.067	0.266
D4	Chitinase	6.2	28.7	0.092	0.256
D5	DEP1	6.16	32	0.186	0.460
D6	Peptide methionine sulfoxide reductase (cPSMR)	5.67	32	0.132	0.917
D7	Lipocalin	5.2	22.1	0.107	0.662
D8	S-Adenosyl meethionin synthase	4.84	26.05	0.037	0.206
D9	High affinity phosphate transporter PT1	6.72	62	0.112	0.328
D10	Ferritin	5.3	29.2	0.110	0.393
D11	Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit	6.88	47.1	0.490	0.810
D12	ATPase alpha subunit	6.24	55.32	0.279	0.599
D13	Glutathione-stransferase	6.9	20.4	0.184	0.453
D14	Ferrodoxin-NADP(H)- Oxidoreductase	6.22	29	0.278	0.108

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

علاوه بر این افزایش بیان این آنزیم در نکروزه شدن برگ گندم و سایر تنش‌های غیر زیستی مشاهده شده است (Jiang et al. 2008; Kamal et al. 2010).

لکه D2 احتمالاً مربوط به آلانین آمینوترانسفراز[1] است. این پروتئین در مراحل مختلف تنش شوری افزایش بیان معنی‌داری را نشان داد. آمینوترانسفرازها نقش‌های مهم و متفاوتی در گیاهان دارند، از جمله در سنتز و کاتابولیسم اسیدهای آمینه، بیوسنتز ویتامین‌ها، مسیرهای کربن و نیتروژن و پاسخ به تنش‌های گیاهی دخالت دارند (Liepman et al. 2004). سطوح بالای فعالیت این آنزیم در طول بازیابی رشد گیاه باعث تبدیل سریع آلانین انباشته شده به پیروات می‌شود (Miyashita et al. 2007).

لکه D3 احتمالاً پروتئین *H^+- transporting two sectors ATPase* است. میزان بیان این پروتئین با افزایش شدت تنش شوری افزایش یافت. این پروتئین متعلق به خانوادهٔ ATPaseها بوده و در غشاء تیلاکوئیدهای کلروپلاست یافت می‌شود. نقش این آنزیم تولید آدنوزین تری‌فسفات از آدنوزین دی‌فسفات در حضور شیب پروتون و یا شیب سدیم می‌باشد (Donnelly et al. 2005). افزایش بیان این آنزیم در پاسخ به تنش خشکی و تنش اکسیداتیو در گندم گزارش شده است (Bazargani et al. 2011).

لکه D4 احتمالاً پروتئین کیتیناز[2] می‌باشد. کیتیناز، روند تغییرات این پروتئین در نمونه‌های تحت تنش افزایش نشان داد و تفاوت مقدار آن در مراحل مختلف تنش شوری معنی‌دار بود. کیتیناز دسته‌ای از آنزیم‌های گلیکوزید هیدرولاز می‌باشد. کیتیناز باعث تخریب و شکسته شدن پیوندهای گلیکوزیدی در ساختار کیتین می‌شود. آنزیم کیتیناز اکثراً جرم مولکولی در محدوده ۱۵ کیلو دالتون و ۴۳ کیلو دالتون دارد.

لکه D5 احتمالاً پروتئین *DEP1* است. نتایج نشان داد که میزان بیان پروتئین *DEP1* با افزایش شدت تنش شوری کاهش یافت. این آنزیم در مسیر انتقال پیام دخالت داشته و متعلق به خانواده ATPaseها می‌باشد و شامل پروتئین‌های مونومری مانند *RAS* و *EF-TU* است. *DEP1* از اجزای کمپلکس داستیلاز هیستون می‌باشد که مسئول داَستیله شدن باقی‌مانده لایزین در انتهای N بدنه هیستون‌ها (H2A، H2B، H3 و H4) است. داَستیله شدن هیستون‌ها نقش مهمی را در تنظیم نسخه‌برداری، پیشرفت چرخه سلولی و رشد سلول ایفا می‌کند (Huang et al. 2016). نتایج این پژوهش با نتایج دیگر محققان مطابقت داشت (Kamal et al. 2010).

لکهٔ D6 احتمالاً پپتید متیونین سولفوکسید B1[3] کلروپلاستی می‌باشد. میزان بیان این پروتئین در این تحقیق با افزایش شدت تنش شوری افزایش یافت. این آنزیم در پلاست‌ها و به‌ویژه کلروپلاست یافت شده و در برگ‌ها و گل‌ها بیان می‌شود. این آنزیم باعث احیای متیونین سولفوکسید (MetSO) در پروتئین‌ها شده و در تنش‌های غیر زیستی درگیر می‌باشد و نقش حفاظتی را در برابر تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. این نقش حفاظتی از طریق فعال کردن مجدد پروتئین‌هایی که توسط اکسیداسیون متیونین غیر فعال شده‌اند میسر می‌شود. همچنین افزایش بیان این آنزیم در پاسخ به افزایش دما توسط برخی محققان گزارش شده است (Rouhier et al. 2006; Rinalducci et al. 2011). غلظت بالای کاتیون‌هایی مثل Na^+ که از عناصر اصلی شوری هستند در بافت‌های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کرده و یا حتی می‌توانند از انجام آن‌ها ممانعت به عمل آورده و سنتز پروتئین‌های لازم را دستخوش تغییرات کمی و کیفی نمایند، که به نوبه خود باعث اختلال در فرآیند رشد می‌شود. مواد آلی محلول همانند مواد قندی، اسیدهای آلی، پلیول‌ها و بسیاری از ترکیبات حاوی نیتروژن مانند اسیدهای آمینه، آمیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات آمونیوم در تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیمی گونه‌های گیاهی حضور فعال و مفیدی دارند و بنابراین، چنین موادآلی اسمزی می‌توانند نقش مهمی را در تحمل تنش شوری بر عهده داشته باشند (Dolatabadi et al. 2017).

از پروتئین‌های دیگری که در این تحقیق شناسایی شد، پروتئین لیپوکالین[4] بود (لکهٔ D7). در این مطالعه افزایش معنی‌داری در سطح بیان پروتئین لیپوکالین مشاهده شد. لیپوکالین‌ها گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌های کوچک و اکثراً خارج سلولی هستند که در مهره‌داران و بی‌مهرگان، گیاهان و باکتری‌ها یافت می‌شوند.

[1] Alanine aminotransferase
[2] Chitinase
[3] Peptide methionine sulfoxide B1
[4] Lipocalin

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

لیپوکالین‌ها علاوه بر اینکه پروتئین‌های انتقال‌دهنده هستند، برخی از آن‌ها دارای نقش‌های مهم دیگری از جمله مدولاسیون رشد سلولی و متابولیسم، اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی، رشد عصبی و تولید مجدد، تنظیم پاسخ ایمنی و تعمیر دارند (Dolferus et al. 1994).

لکه D8 احتمالاً پروتئین S- ادنوزیل متیونین سنتتاز می‌باشد، که یک آنزیم کلیدی در متابولیسم گیاهان است که از ATP و متیونین، S- ادنوزیل متیونین ایجاد می‌کند. در این پروتئین از نظر آماری در نمونه‌های تحت تنش، افزایش بیان معنی‌داری را نشان داد. این پروتئین حاصل واکنش متیونین و آدنوزین تری فسفات است و یکی از کوآنزیم‌های واکنش‌های سلولی جهت انتقال گروه متیل می‌باشد. SAM یک نقش حیاتی بیوشیمیایی با بخشیدن یک گروه متیل تک کربنه در فرآیندی به نام ترانس متیلاسیون ایفا می‌کند. Sánchez و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که تولید متیونین نیازمند افزایش بیان متیونین سنتاز و S- آدنوزیل متیونین سنتاز است که در گیاه سیب‌زمینی تحت تنش شوری افزایش می‌یابد، که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی گندم نان تحت تنش شوری انجام گرفته بود با کاربرد روش پروتئومیکس نشان داده شد که آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز، پروتیین فریتین، متیونین سنتاز و پروتئین ناقل افزایش بیان داشتند (Flower 1996).

لکه D9 احتمالاً پروتئین انتقال‌دهنده فسفات با میل ترکیبی بالا (*PT1*)[1] می‌باشد. میزان بیان این پروتئین با افزایش شدت تنش شوری افزایش نشان داد. این پروتئین در غشاء پلاسمایی و ارگانل‌های درونی سلول یافت می‌شود. همچنین به‌عنوان یک انتقال‌دهندهٔ مواد از یک سمت غشاء پلاسمایی به سمت دیگر عمل می‌کند. نقش مولکولی و اختصاصی این آنزیم انتقال فسفات از یک سمت غشاء به سمت دیگر بر اساس یک شیب غلظت می‌باشد (Donnelly et al. 2005).

احتمالاً لکه شماره D10، پروتئینی بهنام فریتین[2] می‌باشد. این پروتئین جزء پروتئین‌های سم‌زدا است (Ge 2012). روند تغییرات این پروتئین در شرایط تنش شوری معنی‌دار بود، به‌طوری که در شرایط نرمال بیان کمتر و تحت تنش شوری بیان بیشتری مشاهده شد. فریتین از جمله مولکول‌های مهم دخیل در تنظیم هموستازی آهن است که در تمام سلسله‌های موجودات زنده یافت می‌شود و با اکسید کردن Fe^{+2} بهFe^{+3}، آهن را در هسته مرکزی خود ذخیره می‌کند (Chasteen and Harrison 1999). اهمیت این عنصر به‌علت ثابت نگه داشتن غلظت مورد نیاز آهن در سلول می‌باشد که با توانایی ذخیره ۴۵۰۰ اتم آهن در هر ملکول خود نقش ارزنده‌ای در هموستازی این عنصر در سلول دارد.

احتمالاً لکه D11، آنزیم ریبولوز ۱-۵- بیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز[3] می‌باشد. این پروتئین جزء پروتئین‌های متابولیسم (کربوهیدرات، آمینواسید و کربن) است (Maldonado 2008). ریبولوز ۱-۵- بیس فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز یا همان روبیسکو یک آنزیم درگیر در مرحله اصلی جذب کربن می‌باشد. مهم‌ترین آنزیم فعال در چرخهٔ کالوین روبیسکو است که دو نوع عملکرد دارد. در مرحله‌های اولیه، در دو مسیر سوخت و سازی متضاد، یعنی تثبیت کربن در چرخهٔ کالوین و فرآیند تنفس نوری شرکت می‌کند (Yıldız 2015). در این تحقیق آنزیم ریبولوز ۱-۵- بیس فسفات در شرایط تنش شوری افزایش بیان معنی‌داری را نشان داد.

لکه D12 احتمالاً زیرواحد آلفا *ATPase*[4] می‌باشد. این پروتئین جزء پروتئین‌های متابولیسمی است که در میتوکندری کد می‌شود (Hou 2009). در ترکیب غشایی میتوکندری، این پروتئین مسئول ساخت ATP است و ATP را از ADP در حضور یک شیب پروتون در طول غشاء بوسیله نیروی الکترون‌های حامل در طی زنجیره تنفسی تولید می‌کند. با توجه به اینکه گیاه برای مقابله با تنش و رشد و نمو به مقدار زیادی ATP نیاز دارد، پروتئین ATP سنتاز به‌عنوان یک تولیدکننده ATP محسوب می‌شود. در مقایسه نقشه پروتئوم گیاهان شاهد و تنش دیده، لکه شماره D12 در گیاهان تنش دیده افزایش بیان معنی‌داری را نشان داد.

لکه‌ی D13 احتمالاً پروتئین گلوتاتیون S- ترانسفراز[5] می‌باشد، که در گیاهان تحت تنش شوری افزایش بیان معنی‌داری نشان داد.

[1] High affinity phosphate transporter (PT1)
[2] Ferritin
[3] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit
[4] ATPase alpha subunit
[5] Glutathione - s transferase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

گلوتاتیون ترانسفرازها نقش آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی و دخالت در پیام‌رسانی سلولی خصوصاً در زمان تنش را به عهده دارند. این آنزیم از طریق حذف گونه‌های اکسیژن فعال مانند پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن که از تنش اکسیداتیو حاصل می‌شود نقش مهمی در پاسخ دفاعی گیاه بر علیه تنش‌های محیطی دارد. نتایج تحقیق حاضر با تحقیق Caruso و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. گلوتامین به‌عنوان یک دهنده نیتروژن، در بیوسنتز ترکیبات نیتروژن آلی مثل اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها و کلروفیل نقش عمده‌ای دارد. گلوتامین سنتتاز به‌عنوان آنزیمی که ترکیبات غیرآلی را به گلوتامین کاتالیز می‌کند، یک فاکتور کنترل کننده جذب نیتروژن در گیاهان است.

لکهٔ D14 احتمالاً آنزیمی بنام فرودوکسین اکسیدوردوکتاز[1] می‌باشد. میزان بیان این آنزیم با افزایش تنش شوری کاهش یافت. فرودوکسین اکسیدوردوکتاز، آخرین آنزیم در چرخه انتقال الکترون در فتوسنتز از فتوسیستم یک به NADPH می‌باشد. سپس NADPH به‌عنوان احیاء کننده در واکنش‌های چرخه کالوین به‌کار می‌رود. چرخه الکترون از فرودوکسین به NADPH فقط در بخش نوری فتوسنتز انجام شده و از فعالیت آن در بخش تاریکی جلوگیری می‌شود. در اندامک‌های غیر فتوسنتزی، FNR به‌عنوان احیاء کننده فرودوکسین برای مسیرهای متابولیکی مختلفی شامل تثبیت نیتروژن، بیوسنتز ترپنوئیدها، متابولیسم استروئیدها و پاسخ به تنش اکسیداتیو عمل می‌کند (Gummadova 2003). *FNR* یک پروتئین محلول بوده و هم به‌صورت آزاد در استرومای کلروپلاست و هم باند شده به غشاء تیلاکوئید دیده می‌شود (Caruso et al. 2009). همچنین این محققین شاهد کاهش بیان این آنزیم در پاسخ به تنش شوری در گندم بودند.

لکه‌هایی که فقط در رقم آرین دچار تغییر بیان شدند: از میان کلیهٔ لکه‌های تکرارپذیر، تعداد لکه‌هایی که فقط در رقم آرین (رقم حساس به تنش شوری) تغییرات معنی‌دار نشان دادند، ۱۱ لکه از آن‌ها دارای روند تغییرات معینی در سطوح مختلف تنش شوری بودند. از ۱۱ لکهٔ ذکر شده ۶ لکه با افزایش شدت تنش شوری افزایش بیان نشان دادند، در حالی‌که ۵ لکه کاهش بیان داشتند (جدول ۲). لکه A2 که تحت تنش شوری در گیاه سویا کاهش بیان نشان داد، احتمالاً پروتئینی بنام آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز ۴[2] می‌باشد. پروتئین آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز ۴ منجر به تشکیل آدنوزین مونو فسفات[3] AMP می‌شود و انرژی آن با صرفه‌تر از سنتز مجدد آن است، کاتالیز می‌کند. همچنین ممکن است در بازیافت آدنین به نوکلئوتیدهای آدنیلات نقش داشته باشد و به‌وسیله فسفوریبوزیلاسیون به غیرفعال‌سازی سیتوکینین‌ها کمک کند.

[1] Ferrodoxin: NADP(H) oxidoreductase

[2] Adenine phosphoribosyl transferase 4

[3] Adenosine monophosphate

جدول ۲- تغییرات پروتئین‌ها در رقم آرین و درصد حجمی هر لکه تحت تنش شوری

شماره لکه Spot	نام پروتئین Protein name	pI	وزن مولکولی MW(kD)	Percent volume کنترل Normal	Percent volume تنش شوری Salinity stress
A1	Heat shock Protein 70	6.80	73	0.150	0.229
A2	Adenine phosphoribosyltransferase 4	5.28	19.58	0.291	0.107
A3	H^+ transporting two sector ATPase	4.8	34	0.120	0.367
A4	Protein translocase subunit SECA1, chloroplasti	63.5	15.111	0.333	0.118
A5	DEP1	6.16	32	0.148	0.055
A6	Peptide methionine sulfoxide reductase (cPSMR)	5.67	32	0.038	0.180
A7	Vacular protein sorting-associated 35B	6.20	3.59	0.255	0.065
A8	Cathepsin B-like protease 1	6.13	29.88	0.471	0.269
A9	High affinity phosphate transporter PT1	6.72	62	0.137	0.325
A10	Isoform 3 of Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase 2	6.96	21.66	0.190	0.424
A11	Transcription factor ILI 6	6.62	29.05	0.068	0.206

پروتئین‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد در پروتئوم برگ ژنوتیپ سویا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

با اینکه فعالیت کم‌تری نسبت به آدنین دارد، اما می‌تواند در تبدیل کردن سیتوکینین‌ها از پایه‌های آزاد (فرم فعال) به نوکلئوتیدهای سازگار (فرم غیر فعال) مفیدتر باشد. فرآیند متابولیکی سایتوکینین از جمله بیوسنتز آن، تخریب، تعامل و غیر فعال کردن آن نقش مهمی در رشد گیاهان دارد (Zhang et al. 2013). با این حال Allen و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که ارتباط فیزیولوژیکی APT[1] با متابولیسم و واکنش سیتوکینین دارای پاسخ قطعی نیست. برخلاف یافته‌های برخی از پژوهشگران که با اعمال تنش، میزان آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز در ریشه اکوتیپ apt1-1 گیاه آرابیدوپسیس افزایش بیان داشته و موجب مهار ریشه‌های جانبی و بیوسنتز آنتوسیانین در ریشه‌ها می‌شود (Laplaze et al. 2007). همچنین محققان گزارش کردند که در شرایط تنش شوری آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز یک آنزیم متابولیکی کلیدی است که هورمون سایتوکینین را با فسفوریبوزیلاسیون غیر فعال می‌کند (Zhang et al. 2013; Zwack and Rashotte 2015). محققین دیگری نیز با قرار دادن گیاه آرابیدوپسیس در شرایط شوری، بیان کردند که ژن‌های متابولیکی سایتوکینین ابتدا در اثر افزایش آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز، کاهش یافته و در نهایت با افزایش شدت شوری آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز کاهش یافته و در نتیجه میزان سایتوکینین‌ها افزایش می‌یابد (Nishiyama et al. 2012). با توجه به این یافته‌ها، در گیاه سویا نیز احتمالاً شوری باعث کاهش این پروتئین در گیاه شده است.

لکه A4 زیرواحد پروتئین ترانسلوکاز *SECA1*، کلروپلاستی[2] احتمالاً پروتئین فسفوریبولوکیناز[3] است که در چرخه تولید کربوهیدرات و هیدرولیز ATP برای اتصال به پروتئین‌ها در سراسر غشاء تیلاکوئید نقش دارد. همچنین درگیر ترکیبات فتوسنتزی بوده و برای خروج پروتئین‌ها از کلروپلاست مورد نیاز است (Skalitzky et al. 2011). با قرار گرفتن گیاهان در شرایط تنش اکسیداتیو کلروپلاست‌ها در برگ‌ها در اثر جهش در تیلاکوئیدها تخریب شده و تکامل نمی‌یابند (Liu et al. 2010). در پژوهشی Liu و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که *SECA* در گیاه آرابیدوپسیس با قرار گرفتن گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو القا می‌شود. همچنین بررسی‌های آن‌ها نشان داد که با اعمال تنش اکسیداتیو، کمپلکس‌های فتوسنتزی پروتئین‌های رونویسی کلروپلاست را وادار به کدگذاری می‌کنند و کمپلکس تنفسی دچار جهش می‌شود. اما بیان این پروتئین در گیاه سویا رقم آرین در تیمار شوری نسبت به گیاه شاهد با کاهش بیان همراه شد که ممکن است به‌دلیل تخریب کلروپلاست‌ها در برگ‌ها در اثر اعمال تنش شوری باشد.

لکه A7 احتمالاً پروتئین *Vacular protein sorting-associated 35B* است. این پروتئین ممکن است برای جداسازی دقیق کروموزوم مورد نیاز باشد. این پروتئین یک کمپلکس بنام کمپلکس رترومر[4] را با *MAG2*، *MIP2* و *MIP3* در سلول‌های اندوپلاسمی تشکیل می‌دهد، که ممکن است مسئول انتقال پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه باشد (Yamazaki et al. 2008). همچنین این محققان گزارش کردند که *VPS35* (به‌عنوان یک جزء از کمپلکس رترومر) با استفاده از *VPS29* و *MAG1* که از دیگر مؤلفه‌های کمپلکس رترومر می‌باشند، رسوب داده می‌شود. آن‌ها نشان دادند که *VPS35* عمدتاً *VPS35b* در دسته‌بندی پروتئین‌ها در دانه‌ها و نیز در رشد و پیری گیاه در اندام‌های رویشی دخیل است. پروتئین *VPS* جهت تحمل شوری پروتئین صادر کننده سدیم را *NaE1p*[5] در غشای پلاسمایی فعال می‌کند (Logget et al. 2008). Logget و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که تش شوری با تأثیر بر روی سلول‌های اندوپلاسمی باعث اختلال در *VPS* و باعث کاهش فعالیت *Ena1p* در غشای پلاسمایی شده و در نتیجه غلظت یون‌ها در سلول‌ها بالا رفته و باعث آسیب به گیاه می‌شود. این شرایط در سویا نیز با قرار گرفتن در شرایط شوری به وجود آمده و کاهش این پروتئین در اثر تنش شوری بیانگر این موضوع می‌باشد.

لکه A8 احتمالاً پروتئین کسپسین B شبه پروتئاز۱[6]می‌باشد. این پروتئین نقش مهمی را در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های گیاهی (PCD[7]) ایفا می‌کند. علاوه بر نقش آن در تخریب پروتئین، ممکن

[1] Adenine phosphoribosyltransferase
[2] Protein translocase subunit SECA1, chloroplasti
[3] Phosphoribulokinase

[4] Retromer
[5] Na Exporter Protein
[6] Cathepsin B-like protease 1
[7] Programmed cell death

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

است چندین پروتئین هدف را از بین ببرد و یا تجزیه کند و سیگنالینگ را به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده فعال کند. به افزایش فعالیت کاسپاز۳ پس از مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از UV-C کمک می‌کند و برای مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از تنش غیر زیستی مورد نیاز است (Danon et al. 2004). بیش از حد با *CATHB2* و *CATHB3* در دفاع پایه و فرم‌های متمایز از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده گیاهی درگیر است. در ایجاد مقاومت پایه علیه پوسیدگی باکتری پزودوموناس سیرنگی[1] در گوجه فرنگی *DC3000* شرکت می‌کند و درگیر تنظیم پیری، توسعه فرم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در گیاهان است (Ge et al. 2016). محققان پس از قرار دادن گیاه آرابیدوپسیس تحت شرایط تنش زیستی، بیان کردند که در گیاهان زیر واحد 20s پروتئازوم *Cathepsin B* و *PAB1*، دو عامل اصلی در فعالیت کاسپاز۳ در pH=5 می‌باشند (Ge et al. 2016). در تحقیقی دیگر محققان گزارش کردند که این پروتئین در گیاهان بیشتر مربوط به شرایط تنش و آسیب دیدگی است. آن‌ها همچنین گزارش کردند که در گیاهان خانواده سولاناسه رونوشت‌های *Cathepsin B* در سیستم گیاهی در پاسخ به محرک‌های غیرزیستی، زخم بافت و قطع اندام‌ها بیان می‌شود (Thul et al. 2011). در تحقیق حاضر پروتئین کسپسین B شبه پروتئاز۱ پس از تیمار با تنش شوری در سویا رقم آرین کاهش بیان داشت. بنا بر گزارش‌های فوق، ممکن است این کاهش بیان، بیانگر کاهش مقاومت گیاه در اثر تنش باشد.

لکه A10 احتمالاً ایزوفرمی از ۳ پروتئین L –ایزوآسپارتات–O – متیل ترانسفراز۲[2]می‌باشد. این پروتئین با استری کردن متیل L– ایزوآسپاراتیل را در پپتیدها و پروتئین‌ها کاتالیزه می‌کند که منجر به تجزیه خود به خود باقی‌مانده L– آسپارتیل و L– آسپاراژینیل می‌شود، که نقش مهمی در تعمیر یا تخریب پروتئین‌های آسیب دیده ایفا می‌کند (Villa et al. 2006). این پروتئین در گیاه گندم تحت تنش شوری کاهش بیان داشته است (Fercha et al. 2014). محققان با اعمال تنش سرما بر روی گیاه آرابیدوپسیس گزارش کردند که حداکثر فعالیت *PIMT*[3] در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و فعالیت آن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد و نیز در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن متوقف می‌شود (Villa et al. 2006). همچنین Xu و همکاران (2004) بیان کردند که تنش‌های محیطی می‌توانند در بذرها و گیاهچه‌های آرابیدوپسیس رونوشت *PIMT1* و *PIMT2* را با بالا بردن آبسیزیک اسید افزایش دهند. در آزمایش حاضر، با اعمال تنش شوری بر روی سویا رقم آرین، این پروتئین افزایش بیان داشت که می‌تواند بیانگر این باشد که این پروتئین جهت ترمیم پروتئین‌های آسیب دیده ناشی از تنش شوری افزایش بیان داشته است و ممکن است نشان‌دهنده تلاش گیاه برای مقابله با تنش شوری باشد.

لکه A11 احتمالاً فاکتور رونویسی *ILI 6*[4] است. این عامل رونویسی *bHLH*[5] غیر وابسته به DNA می‌باشد که به‌عنوان یک تنظیم کننده مثبت اندازه دانه عمل می‌کند. مهار کننده رونویسی APG بوده و یکی از عوامل آنتاگونیستی رونویسی *bHLH* را تنظیم می‌کند که طول و وزن دانه را با کنترل طول عمر سلولی در لما و پالئا تنظیم می‌کند (Heang and Sassa 2012). فاکتور رونویسی *ILI* دارای ۱۶ زیر خانواده پروتئینی *bHLH* می‌باشد. *bHLH* که جزئی از خانواده فاکتورهای رونویسی می‌باشد، در گیاهان نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی مختلف از جمله رشد، تکامل و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کند (Chen et al. 2015). در یک پژوهشی محققین گزارش کردند که ژن‌های *bHLH* در گیاه هویج تحت شرایط تنش خشکی کاهش بیان داشتند و در شرایط تنش شوری افزایش بیان نشان دادند (Chen et al. 2015). در تحقیق حاضر، این لکه پروتئینی با تیمار تنش شوری افزایش بیان داشت.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی اکثراً پروتئین‌های مشترک در ارقام DPX و آرین در پاسخ به تنش شوری کاهش بیان داشتندکه جزو آنزیم‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی بودند. این امر می‌تواند مؤید این موضوع باشد که افزایش شدت تنش شوری باعث کاهش بیان تعدادی از آنزیم‌های میتوکندریایی شده که نتیجه آن افزایش میزان

[1] *Pseudomonase syringae pv*.
[2] Isoform 3 of Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
[3] Protein Isoaspartate Methyl Transferase
[4] Transcription factor ILI 6
[5] Basic Helix-Loop-Helix Protein

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

شدت تنفس در گیاه می‌شود. از طرف دیگر تعداد بسیار زیادی از پروتئین‌های کاهش بیان یافته از آنزیم‌های کلروپلاستی و مخصوصاً فتوسنتزی می‌باشند که نشان‌دهندهٔ مدیریت گیاه جهت کاهش میزان تولیدات خود از طریق کاهش فتوسنتز و جلوگیری از هدر رفت انرژی در شرایط تنش است. همچنین بیشتر پروتئین‌هایی که در رقم متحمل DPX دچار تغییر بیان شدند یا از گروه پروتئین‌های ترمیمی و محافظت‌کننده می‌باشند که باعث جلوگیری از فعالیت‌های گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد خسارت بیشترمی‌شود و یا در ساماندهی مصرف انرژی نقش دارند و گیاه را به سمت مصرف بهینه و اقتصادی‌تر انرژی سوق می‌دهند، در صورتی‌که پروتئین‌های تغییر بیان یافته در رقم حساس آرین بیشتر از انواع کینازها و ATP آزها بودند و کمتر پروتئین‌های محافظتی و ترمیمی در میان آن‌ها یافت شد. پیشنهاد می‌شود که آزمایشات پروتئینی بر روی پروتئوم اندام‌های دیگر گیاه سویا و در مراحل رشدی دیگری انجام شود.

سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت اشخاص حقیقی و حقوقی در انجام پژوهش کمال تشکر را دارم. همچنین از سرکار خانم دکتر سیده یلدا رئیسی ساداتی که در این پژوهش نهایت همکاری را داشتند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع

Allen M, Qin WS, Moreau F, Moffatt B (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. Physiologia Plantarum11556-68.

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 72:248-254.

Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Science 177:570-576.

Chasteen ND, Harrison PM (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. Journal of structural biology 126:182-194.

Chen C, Wang C, Liu Z, Liu X, Zou L, Shi J, Chen S, Chen J, Tan M. (2018) Variations in physiology and multiple bioactive constituents under salt stress provide insight into the quality evaluation of Apocyni Veneti Folium. International journal of molecular sciences 19:3042.

Chen YY, Li MY, Wu XJ, Huang Y, Ma J, Xiong AS (2015) Genome-wide analysis of basic helix− loop− helix family transcription factors and their role in responses to abiotic stress in carrot. Molecular Breeding 35:1-2.

Damerval C, Zivy M, Granier F, Devienne D (1989) Two-dimentional electrophoresis in plant biology. Adv. Electrophoresis Springer.

Daneshian J, Babaei HR (1996) The principles of planting, growing and harvesting soybeans. The Institute of Improvement and Supply of Seedlings and Seeds, Oilseeds Research (In Farsi)

Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, Gallois P (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. Journal of Biological Chemistry 279:779-787.

Dastneshan, S (2019) Evaluation of tolerance rate of some genotypes of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to salinity stress. Journal of Crop Breeding 11:184-194. (In Farsi)

Daulatabadi N, Turchi M, Valizade M, Bandeh Haq A (2016) Investigating the proteome of rapeseed leaves (*Brassica napus* L.) under salinity stress conditions. Journal of Agricultural Biotechnology 9:51-64. (In Farsi)

Dolatabadi N, Toorchi M, Valizadeh M, Bandehagh A (2017) The proteomic analysis of leaf in Rapeseed (*Brassica napus* L) under salt stress. Agricultural Biotechnology Journal 9:51-64. (In Farsi).

Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis *Adh* gene, Plant Physiology 105:1075-1087.

Donnelly BE, Madden RD, Ayoubi P, Porter DR, Dillwith JW (2005) The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome. *Proteomics* 5:1624-1633.

Faraji A, Reisee S, Kiani AR (2016) Soybean production in Golestan province. Golestan Province Agricultural and Natural Resources Research Center 1-30. (In Farsi).

Fercha A, Capriotti AL, 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 108:238-57.

Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function, Biochemical journal 318:1-14.

Ge P, Ma C, Wang S, Gao L, Li X, Guo G, Yan Y (2012) Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402:1297-1313.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

Joseph B, Jini D (2010) Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. Asian Journal of Plant Sciences 9:307-313.
Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Choi JS, Baik BK, Tsujimoto H, Heo HY, Park CS, Woo SH (2010) Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Australian journal of crop science 4:196-208.
Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. The Plant Cell 19:3889-3900.
Liepman AH, Olsen LJ (2004) Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. Critical Reviews in Plant Sciences 23:73-89.
Liu D, Gong Q, Ma Y, Li P, Li J, Yang S, Yuan L, Yu Y, Pan D, Xu F, Wang NN (2010) Cp SecA, a thylakoid protein translocase subunit, is essential for photosynthetic development in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 61:1655-1669.
Logg K, Warringer J, Hashemi SH, Käll M, Blomberg A (2008) The sodium pump Ena1p provides mechanistic insight into the salt sensitivity of vacuolar protein sorting mutants. Biochimica ET Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1783:974-984.
Maldonado AM, Echevarría-Zomeño S, Jean-Baptiste S, Hernández M, Jorrín -Novo JV (2008) Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. Journal of proteomics 71:461-472.
Mehrabi A, Mostafaie A, Harvan E, Reza H (2013) The comparison of leaf protein patterns between two tolerant and susceptible varieties of wheat under drought stress. Ecology, Environment and Conservation 19:935-946.
Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 49:1108-1121.
Bazargani MM, Sarhadi E, Bushehri AAS, Matros A, Mock HP, Naghavi MR, Hajihoseini V, Mardi M, Hajirezaei MR, Moradi F, Ehdaie, B Salekdeh GH (2011) A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. Journal of proteomics 74:1959-1973.
Mostafaie A (2003) "Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Press Yadavaran Publishers.
Nishiyama R, Le DT, Watanabe Y, Matsui A, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. PloS one 7:e32124.
Parvej MR, Slaton NA, Purcell LC, Roberts TL (2016) Soybean yield components and seed potassium concentration responses among nodes to potassium fertility. Agronomy Journal 108:854-863.
Pessarakli M, Szabolcs I (2011) Soil Salinity and Sodicity as Particular Plant/Crop Stress Factors. In: Pessarakli M

Ge Y, Cai,YM, Bonneau L, Rotari,V, Danon A, McKenzie EA., Gallois P (2016) Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in Arabidopsis. Cell death and differentiation 23:1493-1501.
Gul H, Ahmed R, Hamayun M, Qasim M (2014) Growth performance of canola grown under different salinity regimes. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering 4:59-68.
Gummadova JO (2003) Two different isoforms of ferredoxin-NADPH oxidoreductase (fnr) in wheat: some aspects of their regulation. Manchester University, Manchester, United Kingdom.
Guo G, Ge P, Ma C, Li X, Lv D, Wang S, Ma W, Yan Y (2012) Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. Journal of Proteomics 75:1867-1885.
Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Bhuyan MB, Mahmud JA, Baluska F, Fujita M (2018) Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. Plant Biotechnology Reports 12:77-92.
Heang D, Sassa H (2012) Antagonistic actions of *HLH*/ *bHLH* proteins are involved in grain length and weight in rice. PLoS One 7:e 31325.
Hou DY, Xu H, Du GY Lin JT, Duan M, Guo AG (2009) Proteomics analysis chloroplast proteins in stage albinism line of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) FA85. BMB Report 42:450-455.
Huang C, Zhou J, Jie Y, Xing H, Zhong Y, Yu W, She W, Ma Y, Liu Z, Zhang Y (2016) A ramie *bZIP* transcription factor *BnbZIP2* is involved in drought, salt, and heavy metal stress response. DNA and cell biology 35:776-86.
Jafarnejadi AR, Meskini-Vishkaee F, Mousavi Fazl MH, Ayeneh GL, Behbahani L (2022) Evaluating the effect of iron and zinc micronutrient on wheat quantitative and qualitative yield under salinity stress in Khuzestan climate. Journal of Agricultural Engineering Soil Science and Agricultural Mechanization (Scientific Journal of Agriculture) 44:367-381. (In Farsi).
Jahanbakhsh Gade-Kahriz S, Khadem Siddiqui S, Ebadi A, Tawakli N, Davari M (2016) The effect of salinity stress on the expression of salinity resistance proteins and antioxidant activity in the medicinal plant Borage with calcium application. Genetic Engineering and Biosafety 6:117-129. (In Farsi).
Jahanbakhsh Godehkahriz S, Khadem Sedighi S, Ebadi A, Tavakoli N, Davari M (2017) Effect of calcium on salt tolerance protein expression and activity of antioxidants in borage under salinity condition. Genetic Engineering and Biosafety Journal 6:117-129. (In Farsi).
Jamil M, Rehman S, Rha ES (2014) Response of Growth, PSII Photochemistry and Chlorophyll Content to salt stress in four *Brassica* Species. Life sciences Journal 11:139-145.
Jiang Q, Chen H, Pan X, Pan Q, Shi Y, Li X, Zhang G, Wang Y, Xie S, Shen S (2008) Proteomic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrid necrosis. Plant Science 175:394-401.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

(Ed.), Handbook of Plant and Crop Stress. (3rd Ed.), Revised and Expanded. Taylor and Francis, Florida, USA.
Pessarakli, M. (Ed.). (2019). *Handbook of plant and crop stress*. CRc press.
Pirasteh-Anosheh H, Emam Y (2019) The role of plant growth regulators in enhancing crop yield under saline conditions: from theory to practice. Iranian Journal of Crop Sciences 21:188-209. (In Farsi).
Pirasteh-Anosheh H, Emam Y, Pessarakli M (2019) Grain filling pattern of *Hordeum vulgare* as affected by salicylic acid and salt stress. Journal of Plant Nutrition 42:278-286. (In Farsi).
Ranjbar G, Pirasteh-Anosheh H (2017) Improving the yield of wheat and barley in saline conditions using salicylic acid foliar application. Extension Bulletin. AREEO press, Tehran, Iran. (In Farsi).
Ranjbar G, Pirasteh-Anosheh H, Banakar MH, Miri HR (2018) A review on halophytes researches in Iran: explanation of challenges and solutions. Plant Ecophysiology 32:117-129. (In Farsi).
Ranjbar G, Dehghani F, Pirasteh-Anosheh H, Banakar MH (2019). Improving salt tolerance threshold of *Salicornia bigelovii* at germination stage using gibberellic acid pretreatment at different levels of seawater salinity. Iranian Journal of Range and Desert Research 26:62-72. (In Farsi).
Rinalducci S, Egidi MG, Mahfoozi S, Godehkahriz SJ, Zolla L (2011) The influence of temperature on plant development in a vernalization-requiring winter wheat: A 2-DE based proteomic investigation. Journal of Proteomics 74:643-659.
Rouhier N, Santos CVD, Tarrago L, Rey P (2006) Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. Photosynthesis research 89:247-262.
Růžička K, Šimášková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu MC, Benková E (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. Proceedings of the National Academy of Sciences106:4284-4248.
Sánchez-Aguayo I, Rodríguez-Galán JM, García R, Torreblanca J, Pardo JM (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. Planta 220:278-285.
Thul ST, Khan F, Khanuja SP (2011) Cathepsin B-like Protease from Chili Pepper Revealed by'in silico'Approach. Plant Omics 4:120-125.
Shahraki H, Mahdi Nezhad N, Fakheri BA (2021) The effect of synthesis nanosilver by plant extract on morphological and antioxidant properties of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) under salinity stress. Plant Productions 44:103-114. (In Farsi)
Skalitzky CA, Martin JR, Harwood JH, Beirne JJ, Adamczyk BJ, Heck GR, Cline K, Fernandez DE (2011) Plastids contain a second sec translocase system with essential functions. Plant physiology 155:354-369.
Turan S, Cornish K, Kumar S (2012) Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering. Australian Journal of Crop Science 6:1337-1348.
Villa ST, Xu Q, Downie AB, Clarke SG (2006) Arabidopsis protein repair L-isoasparty l methyltransferases: predominant activities at lethal temperatures. Physiologia Plantarum 128:581-592.
Wieten L, Broere F, van der Zee R, Koerkamp EK, Wagenaar J, van Eden W (2007) Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators?. FEBS letters 581:3716-3722.
Xu Q, Belcastro MP, Villa ST, Dinkins RD, Clarke SG, Downie AB (2004) A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus. Plant Physiology 136:2652-2664.
Yamazaki M, Shimada T, Takahashi H, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2008) Arabidopsis VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. Plant and cell physiology 49(2):142-156.
Yıldız M, Akçalı N, Terzi H (2015) Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid. Journal of plant physiology 179:90-99.
Zhang X, Chen Y, Lin X, Hong X, Zhu Y, Li W, He W, An F, Guo H (2013) Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in Arabidopsis. Molecular plant 6:1661-1672.
Zhong M, Wang Y, Zhang Y, Shu S, Sun J, Guo S (2019) Overexpression of transglutaminase from cucumber in tobacco increases salt tolerance through regulation of photosynthesis. International journal of molecular sciences 20:894.
Zwack PJ, Rashotte AM (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. Journal of experimental botany 66:4863-4871.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]