

## بررسی پروتئوم برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و

### نتاج SC01 با استفاده از الکتروفورز دوبعدی

#### Proteome Analysis of the Leaves of Two Inbred Maize Lines (MS02 and TS01) and Their Hybrid (SC01) Using Two-Dimensional Electrophoresis

یگانه شفیعی<sup>۱</sup>، محمد محسن‌زاده گل‌فزاری<sup>۱\*</sup>، سجاد محرم‌نژاد<sup>۲</sup>، حبیب اله سمیع‌زاده لاهیجی<sup>۱</sup>، فرزاد بنائی اصل<sup>۳</sup>

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، دانشیار، استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)

۳- استادیار بخش تحقیقات زیست‌فناوری، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Shafiei Y<sup>1</sup>, Mohsenzadeh Golfazani M<sup>\*1</sup>, Moharramnejad S<sup>2</sup>, Samizadeh Lahiji H<sup>1</sup>, Banaei Asl F<sup>3</sup>

1- PhD Graduated, Associate Professor, Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Research Assistant Professor, Agricultural and Horticultural Science Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Training Center of Ardabil Province (Moghan)

3- Biotechnology Research Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۸)

#### چکیده

گیاه ذرت (*Zea mays* L.) یکی از غلات بسیار مهم در جهان محسوب می‌شود. پروتئومیکس، مطالعه کامل پلی‌پپتیدهای بیان شده به‌وسیله ژن‌های یک سلول در یک اندام یا بافت ویژه، در یک مرحله خاص از نمو و تحت شرایط رشدی خاص است. در این تحقیق از پروتئومیکس جهت مطالعه تغییرات الگوی پروتئینی برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01 استفاده شده است. برای بررسی تغییرات الگوهای پروتئینی، نمونه‌برداری‌ها در مرحله‌ی گیاه کامل و پس از اتمام گرده‌افشانی انجام شد. برای مطالعه و شناسایی پروتئین‌های مرتبط با لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01، پروتئین کل براساس روش TCA-استون از برگ گیاه ذرت در مرحله گیاه کامل بعد از گرده‌افشانی استخراج و با روش الکتروفورز دو بعدی جداسازی شدند. در نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum 6.0، جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک هر لکه تعیین شد و سپس برای شناسایی دقیق پروتئین‌ها، از طیف‌سنج جرمی استفاده شد. از مجموع ۵۳۹ پروتئین شناسایی شده در SC01 و ۲۵۸ پروتئین شناسایی شده در TS01 و ۱۵۷ پروتئین شناسایی شده در MS02، ۳۳ پروتئین تغییرات معنی‌داری نشان دادند که از این تعداد ۱۱ لکه در نتاج SC01 مقدار آن‌ها کاهش و ۲۲ لکه نیز افزایش بیان نشان دادند. اکثر پروتئین‌های شناسایی شده در برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01 پروتئین‌های دفاعی (۳۳ درصد)، پروتئین‌های فتوسنتزی (۲۱ درصد)، پروتئین‌های کانالی و پیام‌رسان (۲۱ درصد)، نقش داشتند و کمترین تغییرات در پروتئین‌های هتروزیس (۱۲ درصد)، پروتئین‌های متابولیسم و تولید انرژی (۹ درصد)، پروتئین‌های ساختاری و جایگزینی (۳ درصد) دیده شد. این پژوهش با استفاده از تکنیک پروتئومیکس و تجزیه الگوی پروتئینی برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج هیبریدی SC01، توانست مجموعه‌ای از پروتئین‌های کلیدی درگیر در فرآیندهای دفاعی، فتوسنتز، و پیام‌رسانی را شناسایی کند. این پروتئین‌ها با افزایش و کاهش بیان در هیبرید SC01، بهبودهای قابل توجهی در عملکرد و پایداری آن نسبت به والدین ایجاد کرده‌اند. این نتایج می‌توانند مبنای علمی برای بهبود ویژگی‌های ژنتیکی و تولید ارقام هیبرید مقاوم‌تر به شرایط محیطی و بیماری‌زا باشند.

#### واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی

پروتئین

پروتئومیکس

ذرت

طیف‌سنجی جرمی

## مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) یکی از گیاهان با ارزش است که تنوع، سازگاری بالا و ارزش غذایی فراوان، آن را در ردیف مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان قرار داده است (Saber et al. 2018). این محصول با توجه به دوره رویشی کوتاه، تولید بالای ماده خشک و عملکرد بالا نسبت به دیگر محصولات، مهم‌ترین محصول زراعی بعد از گندم و برنج در کشور است (Rezai Sohkt Abandani et al. 2018). ذرت به دلیل قدرت سازگاری با شرایط اقلیمی گوناگون، بسیار زود در تمام دنیا گسترش یافت. بدین جهت جزو عمده‌ترین محصولات مناطق معتدله، معتدله گرم، نیمه گرمسیری و مرطوب به شمار می‌رود (Noormohammadi et al. 2001). ذرت با نام علمی *Zea mays* از تیره غلات، گیاهی یک ساله (Movahhedi Dehnavi 2003)، تک لپه و ساقه بلند است که اغلب به منظور تولید دانه زراعت می‌شود و در سطح جهانی نیز یک محصول غله‌ای مهم در تغذیه انسان و حیوان به شمار می‌رود. ذرت بعد از گندم از لحاظ سطح زیر کشت مقام دوم را در بین غلات به خود اختصاص داده است (FAO 2020).

استفاده گسترده از هیبریدهای ذرت همراه با بهبود عملیات زراعی توانسته است عملکرد ذرت را طی ۵ دهه از سال ۱۹۳۰ به ۳ برابر افزایش دهد که در مورد هیچ محصول زراعی چنین اتفاقی رخ نداده است. روند سریع افزایش سطح زیر کشت ذرت دانه‌ای در کشور ضرورتاً باعث افزایش سطح و میزان تولید بذر هیبرید شد به‌طوری‌که تولید بذر از ۲۰۰۰ تن در سال ۱۳۷۲ به ۱۲۰۰۰ تن در سال ۱۴۰۱ بالغ شد (Ahmadi et al. 2007). عمده مناطق تولید بذر هیبرید ذرت کشور ایران منطقه مغان می‌باشد (Khodabandeh 2003). هتروزیس به‌صورت برتری یک هیبرید بر روی میانگین والدینش تعریف می‌شود. یک هیبرید می‌تواند یک دو رگه ساده، یک تلاقی سه جانبه یا یک تلاقی مضاعف باشد. هتروزیس در اصلاح نباتات طبق نظر (Shull 1908) به مفهوم تفسیر افزایش قدرت، اندازه، میوه، سرعت رشد، مقاومت به بیماری‌ها و آفات یا ناهنجاری‌های محیطی توسط موجودات، هیبرید در مقایسه با اینبردهای آن‌ها به علت عدم شباهت بین اتحاد گامت‌های والدینی می‌باشد. حداکثر هتروزیس در  $F_1$  است و در  $F_2$ ، ۵۰ درصد کاهش می‌یابد. لذا زارعین نیاز دارند که هر

سال بذر هیبرید جدید خریداری کنند. بهترین روش اصلاحی جهت افزایش عملکرد ذرت در واحد سطح، تولید ارقام هیبرید است (Hallauer and Miranda 1988). از طرف دیگر به‌خاطر کمبود زمین زراعی و منابع آبی می‌توان با استفاده از سیستم چندکشتی در سال، حداکثر استفاده از زمین زراعی را برد و برای این منظور بایستی هیبریدهای زودرس را بعد از برداشت غلات کشت نمود و ثانیاً آنکه با افزایش تراکم، کمبود عملکرد هیبریدهای زودرس نسبت به دیررس را جبران کرد (Poehlman 1986).

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌هایی هستند که به‌طور مستقیم مسئول بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی در یک سلول زنده هستند، در حالی که عملکرد پروتئین به‌طور مستقیم تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه‌ای قرار دارند و نمی‌توان آن‌ها را از طریق مطالعات ژنومی شناسایی نمود، بنابراین، انجام مطالعات پروتئومیکس برای تبیین حضور و نقش پروتئین در شرایط خاص محیط زیست لازم است (Cvjetko et al. 2014). با توجه به اینکه بیان پروتئین‌ها در طول نمو، تحت شرایط محیطی مختلف و در بافت‌های مختلف متغیر می‌باشد، همچنین از آنجا که پروتئین‌ها بهترین توصیف برای عمل تک تک ژن‌ها در سطح مولکولی هستند (Gucciardo et al. 2007)، مطالعه الگوی بیان پروتئین‌ها نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. امروزه با گسترش تکنیک‌هایی چون ژل الکتروفورز دو بُعدی امکان آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر شده است و در حقیقت پروتئومیکس دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند. اطلاعات حاصل از ژنوم به تنهایی بیانگر عملکرد ژن در یک مرحله خاص از زندگی گیاه و وقایع بیولوژی و شیمیایی که در هر مرحله رخ می‌دهد، نیست. علاوه بر ژنومیکس حتی اطلاعات حاصل از ترانسکریپتوم و متابولوم هم هیچکدام به تنهایی درک کاملی ایجاد نمی‌کنند. آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین علاوه بر این که تکمیل‌کننده داده‌های حاصل از ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و متابولومیکس می‌باشد مزیت‌های ویژه‌ای نیز دارد، زیرا پروتئین‌ها، بعنوان اجزا کلیدی به‌طور مستقیم مسئول اعمال سلولی هستند در حالی که ژنوم دارای

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل والد مادری (MS02) از گروه متوسط رس، والد پدری (TS01) از گروه دیررس از لاین‌های انتخاب شده طی ۶ سال بودند که برای تولید نتاج SC01 ذرت از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان) تهیه شد. خصوصیات زراعی ابتدا در سال زراعی ۱۴۰۲ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی مغان در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سه ردیف (فاصله بین ردیف ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بین بوته در ۱۸ سانتی‌متر به طول ۵/۶ با رعایت تراکم ۷۴۰۰۰ بوته در هکتار) کاشت شد.

## استخراج پروتئین:

تمام بررسی‌های آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه انجام شد. استخراج پروتئین با استفاده از روش دمروال و روش مصطفایی با کمی تغییرات انجام گرفت (Mostafaie et al. 2003; Damerval et al. 1989). به منظور رسوب پروتئین و شستشو روی هر تیوپ حدود ۱۰ برابر حجم مایع رویی محلول رسوب پروتئین سرد ۱۰ درصد (تری کلرواستیک اسید ۱۰ گرم، دی تیوتریتول ۲۰ میلی‌مولار و استون تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) اضافه و ورتکس شد و یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. نمونه‌ها از فریزر خارج و در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، سپس نمونه‌ها را به روی یخ منتقل و مایع رویی دور ریخته شد. سپس به هر تیوپ ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی (دی تیوتریتول ۲۰ میلی‌لیتر و استون تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) سرد ۲۰°C اضافه و با پستل رسوب ته ویال قطعه قطعه شد. تیوپ‌ها در دمای ۲۰°C به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس تیوپ‌ها را در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مرحله شستشو پنج بار تکرار شد. پس از دور ریختن آخرین مایع رویی، تیوپ‌ها ۲۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد تا رسوب خشک شد. جهت محلول کردن پروتئین به ازای هر ۲۰ میلی‌گرم رسوب، ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر لایز دو بعدی (Urea ۸ مولار، ۲ Tiurea مولار، ۴ CHAPS درصد، ۳۵ میلی‌مولار DTT، ۸۰ میلی‌مولار IPG Buffer حداکثر ۲٪) و ۳-۲ میکرولیتر pmsf

اطلاعات کدکننده است که برای رشد و نمو موجود زنده کفایت می‌کند (Nasiri et al. 2013). علاوه بر این مقدار پروتئین اغلب از روی میزان mRNA تولید شده در سلول قابل پیش‌بینی نیست و تغییرات پس از ترجمه‌ای که در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهد برای کنش بیولوژی آن ضروری می‌باشد، لذا مطالعه پروتئین‌ها برای بررسی فعالیت‌شان در بافت‌های خاص یا در پاسخ به شرایط محیطی از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است (Riccardi et al. 1998). تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که پروتئومیکس به‌عنوان ابزاری مؤثر برای بررسی تغییرات پروتئینی در هیبریدهای ذرت و سایر گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای مثال، Li et al. (2023) الگوهای بیان ژن در پاسخ به تنش گرما در چندین لاین اینبرد ذرت را بررسی کردند و تفاوت‌های معناداری در بیان ژن‌های پاسخ به گرما شناسایی کردند. همچنین، Nduwumuremyi et al. (2023) تحلیل ترنسکریپتومیک هیبریدهای ذرت تحت شرایط تنش خشکی را انجام دادند و ژن‌های کلیدی در پاسخ به تنش را شناسایی کردند (Zhou et al. 2024). پاسخ‌های ترنسکریپتونی لاین‌های مختلف ذرت به دسترسی نیتروژن را بررسی کردند و تغییرات بیان ژن مرتبط با کارایی استفاده از نیتروژن را برجسته کردند (Liu et al. 2023). از RNA-seq برای مقایسه بیان ژن در هیبریدهای ذرت والدین اینبرد آن‌ها تحت شرایط مختلف آب‌وهوایی استفاده کردند و الگوهای بیان متفاوت را شناسایی کردند. همچنین، Chen et al. (2024) بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در لاین‌های اینبرد ذرت و هیبریدهای آن‌ها در مواجهه با پاتوژن‌های قارچی را بررسی کردند و به بینش‌هایی در مورد پایه ژنتیکی مقاومت در برابر بیماری‌ها دست یافتند.

با توجه به این پیشینه، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تغییرات پروفایل پروتئین‌های هتروزیس نتاج SC01 در مقایسه با لاین‌های والدین ذرت انجام خواهد شد. این مطالعه می‌تواند بینش جدیدی در زمینه هتروزیس و کاربردهای آن در بهبود صفات ذرت فراهم کند و به درک بهتری از تأثیر پروتئومیکس در اصلاح نباتات کمک نماید.

پس از پایان 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 ImageMaster 2D Platinum 6.0 تولید شده توسط GE Healthcare، آنالیز شده، شناسایی لکه، تعیین مقدار پروتئین و جفت لکه‌ها با استفاده از این نرم‌افزار انجام شده و ژل‌ها به همراه تکرار آن‌ها بررسی شد و لکه‌های مشترک بین تکرارها توسط نرم‌افزار برجسب زده شد. وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی در ژل‌ها با انجام الکتروفورز هم‌زمان مارکرهای پروتئینی استاندارد تخمین زده شد. نقطه ایزوالکتریک با محل قرار گرفتن لکه پروتئینی بر روی نوار ۱۳ سانتی‌متری با محدوده pH ۳-۱۰ خطی مشخص شد. پس از اسکن ژل‌ها و تعیین جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک هر لکه با نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum 6.0، از طیف‌سنج جرمی برای شناسایی دقیق پروتئین‌ها استفاده شد. قطعات پروتئینی انتخاب‌شده از لکه‌های ژل دوبعدی جدا و برای طیف‌سنجی جرمی آماده شدند. این روش امکان شناسایی پروتئین‌های مشخص‌شده را بر اساس الگوی طیف‌های جرمی و مقایسه با پایگاه‌های داده پروتئینی فراهم کرد.

## نتایج و بحث

### بررسی الگوی پروتئینی

بعد از اسکن ژل‌ها، تصاویر آن‌ها با نرم‌افزار Image Master 6.0 مورد آنالیز قرار گرفتند و تفاوت‌های الگوی پروتئینی در برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و همچنین نتایج SC01 مورد بررسی قرار گرفتند. در نرم‌افزار Image Master 6.0 جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای هر لکه تعیین شد. سپس طیف سنجی جرمی<sup>۱</sup> لکه‌ها انجام شد، به منظور بررسی تغییرات کمی بیان پروتئین‌ها، از مقدار درصد حجمی هر لکه به عنوان یک مقدار نرمال شده استفاده شد. داده‌های حاصل سپس با نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. برای تعیین تغییرات بین درصد حجمی لکه‌ها در برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتایج SC01 از آزمون F در سطح اطمینان ۵٪ استفاده

اضافه شد، سپس رسوب در آن خوب حل شده و ۱ ساعت در دمای محیط روی شیکر قرار داده شد. تیوپ‌ها در دمای محیط به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از مایع رویی مقدار کمی برای تعیین غلظت جدا شد (حدود ۵۰ میکرولیتر). برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش برادفورد (Bradford 1979) استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

### الکتروفورز دو بعدی

در بعد اول به منظور انجام الکتروفورز، از ژل نواری (IPG Strip) ۱۳ سانتی‌متری با pH=3-10 خطی تهیه شد از شرکت Bio Rad استفاده شد. ریهیدراسیون کامل ژل‌های نواری با محلول ریهیدراسیون در طول شب انجام گرفت. سپس بعد اول با دستگاه IPG phor3 و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بارگذاری کردن ژل نیاز به ۵۲ هزار ولت ساعت (52KvH) است این مرحله با شدت جریان 75mA، ۱۰:۳۰ ساعت به طول انجامید. پس از اتمام بعد اول نوارهای ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول متعادل سازی اول (۷ Urea، ۳۰ Tris-HCL pH= ۷/۵ میلی‌مولار، ۷ Glycerol، ۳۰ درصد، ۲ SDS درصد، برموفنل بلو چند کریستال) حاوی ۱٪ DTT متعادل سازی شد. محلول اول را کاملاً دور ریخته شد و نوارها را با آب مقطر دو بار تقطیر شسته و نوارها را در محلول دوم (۷ Urea، ۳۰ Tris-HCL pH= ۷/۵ میلی‌مولار، ۷ Glycerol، ۳۰ درصد، ۲ SDS درصد، برموفنل بلو چند کریستال) که حاوی ۵٪ idoacetamide می‌باشد قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد. سپس نوار بر روی ژل آکریلامید (Mostafaie 2003) با غلظت ۱۱ درصد قرار گرفته شد. دستگاه الکتروفورز با برنامه مورد نظر روشن گردید، ران نمودن ژل تا زمانی که رنگ برموفنل بلو به ۱ تا ۲ میلی‌متری انتهای ژل برسد ادامه یافت. پس از اتمام الکتروفورز، مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتوکول بلوم (Blum et al. 1987) انجام شد، سپس بر روی ژل ۲۰۰ میلی لیتر محلول رنگ بر شامل ۴۰ میلی‌لیتر متانول، ۲۰ میلی لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۱۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. اینکار تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف و باندهای پروتئینی نمایان شد انجام شد.

### شناسایی پروتئین

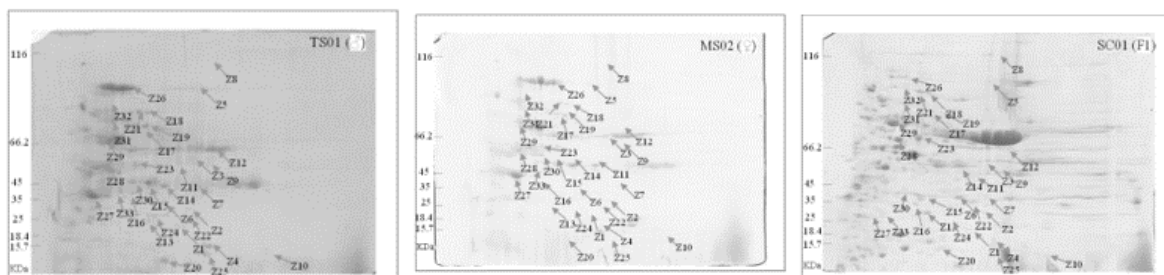
<sup>۱</sup> Mass Spectrometry

شده است. در این مطالعه هر لاین اینبرد ذرت با سه تکرار و مجموعاً ۹ ژل بررسی شد.

#### لکه‌هایی که فقط در رقم MS02 دچار تغییر بیان شدند

نتایج نشان داد که از مجموع ۱۵۷ پروتئین شناسایی شده ۱۶ لکه فقط در رقم MS02 تغییرات معنی دار نشان دادند که از این تعداد ۸ لکه در رقم MS02 مقدار آن‌ها کاهش و ۸ لکه نیز افزایش بیان

نشان داد. پس از شناسایی، پروتئین‌ها در گروه‌های عملکردی شامل پروتئین‌های درگیر در متابولیسم و تولید انرژی (۲۵ درصد)، پروتئین‌های کانالی و پیام‌رسان (۷ درصد)، پروتئین‌های دخیل در ساختار سایر پروتئین‌ها (۲۵ درصد) و پروتئین‌های تنظیم‌کننده رونویسی (۴۳ درصد) تقسیم شدند. (جدول ۴-۱).



شکل ۴-۱- مکان لکه‌های معنی‌دار شده دارای روند در دو لاین اینبرد ذرت MS02 و TS01 و نتایج SC01

جدول ۴-۱- پروتئین‌های که فقط در رقم MS02 تغییرات با روند مشخصی نشان دادند

| Spot | Proten Name                                               | Ac. No <sup>a</sup> | Average | Changes           |                   |                   | Function                         |
|------|-----------------------------------------------------------|---------------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
|      |                                                           |                     |         | MS02 <sub>1</sub> | MS02 <sub>2</sub> | MS02 <sub>3</sub> |                                  |
| M1   | B3 domain-containing transcription factor ABI3            | Q01593              | 0.320   | 0.089             | 0.059             |                   | transcriptional regulator        |
| M2   | Adenine phosphoribosyltransferase 4                       | Q9SU38              | 0.337   | 0.171             | 0.153             |                   | Metabolism and energy production |
| M3   | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 14                        | P42747              | 0.066   | 0.067             | 0.074             |                   | Metabolism and energy production |
| M4   | Protein NTM1-like 9                                       | F4JN35              | 0.092   | 0.091             | 0.066             |                   | transcriptional regulator        |
| M5   | D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial         | O23240              | 0.230   | 0.260             | 0.386             |                   | Structural protein               |
| M6   | Histone-lysine N-methyltransferase MEDEA                  | O65312              | 0.917   | 0.399             | 0.132             |                   | transcriptional regulator        |
| M7   | Cold shock protein                                        | Q41188              | 0.507   | 0.319             | 0.062             |                   | transcriptional regulator        |
| M8   | Protein Trygalactosyl D-Acyl Glycerol 5, chloroplastic    | Q8VY77              | 0.037   | 0.056             | 0.106             |                   | Channel and messenger proteins   |
| M9   | Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic          | Q9SYI0              | 0.008   | 0.112             | 0.126             |                   | Metabolism and energy production |
| M10  | Nuclear transcription factor Y subunit B-2                | Q5QMG3              | 0.393   | 0.256             | 0.110             |                   | transcriptional regulator        |
| M11  | Protein mago nashi homolog 1                              | A0A0P0XB70          | 0.490   | 0.541             | 0.810             |                   | Metabolism and energy production |
| M12  | Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic                  | P27140              | 0.222   | 0.279             | 0.379             |                   | Structural protein               |
| M13  | Transcription factor ILI6                                 | Q0DUR2              | 0.184   | 0.102             | 0.053             |                   | transcriptional regulator        |
| M14  | Isoform 3 of Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase 2 | Q64J17              | 0.078   | 0.099             | 0.138             |                   | Structural protein               |
| M15  | Peptide chain release factor PrfB3, chloroplastic         | F4J264              | 0.268   | 0.236             | 0.190             |                   | Structural protein               |
| M16  | Transcription factor TGA10                                | E3VNM4              | 0.150   | 0.203             | 0.229             |                   | transcriptional regulator        |

### لکه‌هایی که فقط در رقم TS01 دچار تغییر بیان شدند

نتایج نشان داد که از مجموع ۵۳۹ پروتئین شناسایی شده ۲۰ لکه فقط در رقم TS01 تغییرات معنی دار نشان دادند که از این تعداد ۱۲ لکه در رقم TS01 مقدار آن‌ها افزایش و ۸ لکه نیز کاهش بیان نشان داد. پس از شناسایی، پروتئین‌ها در گروه‌های عملکردی که شامل پروتئین‌های درگیر در متابولیسم و تولید انرژی (۵

درصد)، پروتئین‌های کانالی و پیام‌رسان (۱۰ درصد)، پروتئین‌های دخیل در ساختار و جایگیری پروتئین‌های دیگر (۵۰ درصد)، پروتئین‌های درگیر در مقاومت گیاه (۵ درصد) و سایر پروتئین‌های تغییر بیان یافته (۳۰ درصد) بودند تقسیم شدند (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲- پروتئین‌های که فقط در رقم TS01 تغییرات با روند مشخصی نشان دادند

| Spot | Proten Name                                        | Ac. No <sup>a</sup> | Changes           |                   |                   | Function                              |
|------|----------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
|      |                                                    |                     | TS01 <sub>1</sub> | TS01 <sub>2</sub> | TS01 <sub>3</sub> |                                       |
| T1   | Scar-like domain-containing protein WAVE 5         | A1X8B8              | 0.091             | 0.107             | 0.195             | Structural protein                    |
| T2   | Oxido redoctase, acting on NADH or NADPH           | gi 18423437         | 0.120             | 0.367             | 0.375             | Metabolism and energy production      |
| T3   | E3 ubiquitin-protein ligase UPL2                   | Q8H0T4              | 0.118             | 0.133             | 0.150             | Structural protein                    |
| T4   | Putative elongation factor 1 beta                  | gi 7711024          | 0.048             | 0.063             | 0.055             | Structural protein                    |
| T5   | Heat shock protein 90                              | gi 110270510        | 0.038             | 0.061             | 0.180             | Structural protein                    |
| T6   | Stromal 70 kDa heat shock-related protein,         | gi 77554415         | 0.255             | 0.172             | 0.065             | Structural protein                    |
| T7   | PDI                                                | gi 47118046         | 0.269             | 0.471             | 0.542             | Structural protein                    |
| T8   | Putative tubulin folding cofactor A                | gi 50915868         | 0.137             | 0.080             | 0.025             | Structural protein                    |
| T9   | Tubulin beta-2 chain(beta-2 tubulin)               | gi 8928425          | 0.264             | 0.190             | 0.124             | Structural protein                    |
| T10  | Kinesin-like protein KIN-12F                       | B9GE13              | 0.068             | 0.098             | 0.106             | Structural protein                    |
| T11  | Translationally controlled tumor protein           | gi 21070379         | 0.027             | 0.034             | 0.043             | Altered expressed proteins            |
| T12  | Chromatin structure-remodeling complex protein SYD | F4IHS2              | 0.024             | 0.032             | 0.045             | Altered expressed proteins            |
| T13  | Nonribosomal peptide synthetase VLMS               | A0A024F910          | 0.536             | 0.976             | 0.997             | Proteins involved in plant resistance |
| T14  | Putative ethylene receptor                         | gi 7547007          | 0.646             | 0.411             | 0.380             | Channel and messenger proteins        |
| T15  | BEACH domain-containing protein B                  | F4I9T0              | 0.530             | 0.514             | 0.192             | Altered expressed proteins            |
| T16  | Auxin transport protein BIG                        | B9G2A8              | 0.103             | 0.169             | 0.455             | Channel and messenger proteins        |
| T17  | Serine/threonine protein kinase ATM                | Q57987              | 0.039             | 0.181             | 0.237             | Altered expressed proteins            |
| T18  | Serine/threonine-protein kinase ATR                | A2VH41              | 1.116             | 1.065             | 0.134             | Altered expressed proteins            |
| T19  | Serine/threonine-protein kinase TOR2               | NP-012719/2         | 0.018             | 0.068             | 0.074             | Altered expressed proteins            |
| T20  | 50 S ribosomal protein L22, chloroplast            | AOA375              | 0.139             | 0.080             | 0.029             | Structural protein                    |

جدول ۴-۳- پروتئین‌های که فقط در رقم SC01 تغییرات با روند مشخصی نشان دادند

| Spot | Proten Name                                       | Ac. No <sup>a</sup> | Changes           |                   |                   | Function                  |
|------|---------------------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|      |                                                   |                     | SC01 <sub>1</sub> | SC01 <sub>2</sub> | SC01 <sub>3</sub> |                           |
| S1   | Thioredoxin H3                                    | Q42403              | 0.625             | 0.460             | 0.162             | Structural protein        |
| S2   | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 3       | O65378              | 0.035             | 0.205             | 0.336             | Metabolism                |
| S3   | Dehydration-responsive element-binding protein 2A | O82132              | 0.049             | 0.037             | 0.018             | transcriptional regulator |
| S4   | Metacaspase-4                                     | O64517              | 0.048             | 0.390             | 0.414             | Structural protein        |
| S5   | Putative casein kinase II subunit beta-4          | O80507              | 0.056             | 0.084             | 0.1               | transcriptional regulator |

|     |                                                               |        |       |       |       |                                |
|-----|---------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| S6  | Protein Chloroplast Unusual Positioning 1                     | Q9L174 | 0.023 | 0.027 | 0.081 | Channel and messenger proteins |
| S7  | Small RNA 2'-O-methyltransferase                              | Q9C5Q8 | 0.197 | 0.015 | 0.014 | transcriptional regulator      |
| S8  | Soluble inorganic pyrophosphatase 1                           | Q93V56 | 0.020 | 0.022 | 0.512 | Structural protein             |
| S9  | Basic leucine zipper 24                                       | Q8GTS1 | 0.053 | 0.169 | 0.406 | transcriptional regulator      |
| S10 | Dual specificity protein phosphatase 1B                       | Q9M8K7 | 0.007 | 0.182 | 0.352 | Defense proteins               |
| S11 | Auxin-responsive protein IAA5                                 | P33078 | 0.037 | 0.076 | 0.586 | transcriptional regulator      |
| S12 | Dehydrin HIRD11                                               | Q9SLJ2 | 0.318 | 0.295 | 0.015 | transcriptional regulator      |
| S13 | Anthranilate O-methyltransferase 2                            | B6SU46 | 0.189 | 0.111 | 0.004 | Metabolism                     |
| S14 | Homeotic protein knotted-1                                    | P24345 | 0.040 | 0.066 | 0.822 | transcriptional regulator      |
| S15 | Equilibrative nucleotide transporter 1                        | Q8VXY7 | 0.259 | 0.357 | 0.439 | Metabolism                     |
| S16 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] GPDHC1, cytosolic | O22216 | 0.042 | 0.153 | 0.157 | Structural protein             |

### لکه‌هایی که فقط در رقم SC01 دچار تغییر بیان شدند

نتایج نشان داد که از مجموع ۵۳۹ پروتئین شناسایی شده ۱۶ لکه فقط در رقم SC01 تغییرات معنی‌دار نشان دادند که از این تعداد ۵ لکه در رقم SC01 مقدار آن‌ها کاهش و ۱۱ لکه نیز افزایش بیان نشان داد. پس از شناسایی، پروتئین‌ها در گروه‌های عملکردی که شامل پروتئین‌های درگیر در متابولیسم و تولید انرژی (۱۸ درصد)، پروتئین‌های کانالی و پیام‌رسان (۷ درصد)، پروتئین‌های دفاعی (۷ درصد)، پروتئین‌های دخیل در ساختار سایر پروتئین‌ها (۲۵ درصد) و پروتئین‌های تنظیم‌کننده رونویسی بیان یافته (۴۳ درصد) بودند تقسیم شدند. (جدول ۴-۳).

### لکه‌هایی که به‌صورت مشترک در برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و همچنین نتاج SC01 دچار تغییر بیان شدند

نتایج نشان داد که از مجموع ۵۳۹ پروتئین شناسایی شده در SC01 و ۲۵۸ پروتئین شناسایی شده در (TS01) و ۱۵۷ پروتئین شناسایی شده در (MS02)، ۳۳ پروتئین تغییرات معنی‌داری نشان دادند که از این تعداد ۱۱ لکه در نتاج SC01 مقدار آن‌ها کاهش و ۲۲ لکه نیز افزایش بیان نشان دادند. پروتئین‌ها در فرایندهای اساسی نظیر، فتوسنتز، متابولیسم و تولید انرژی، انباشت پروتئین‌های سنتزی، پروتئین‌های مؤثر در متابولیسم، پروتئین‌های دفاعی، پروتئین‌های ذخیره‌ای و پروتئین‌های انتقالی نقش دارند. اکثر پروتئین‌های شناسایی شده در برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01 پروتئین‌های دفاعی (۳۳ درصد)، پروتئین‌های فتوسنتزی (۲۱ درصد)، پروتئین‌های کانالی و پیام‌رسان (۲۱ درصد)، نقش داشتند و کمترین تغییرات در پروتئین‌های هتروزیس (۱۵ درصد)، پروتئین‌های متابولیسم و تولید انرژی (۶ درصد)، پروتئین‌های ساختاری و جایگزینی (۳ درصد) دیده شد (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴- پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار و دارای روند مشخصی در دو لاین اینبرد ذرت MS02 و TS01 و نتاج SC01

| Spot | Proten Name                                                                                           | Ac. No <sup>a</sup> | Average changes |       |       | Function                |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|-------|-------|-------------------------|
|      |                                                                                                       |                     | SC01            | TS01  | MS02  |                         |
| Z1   | Peroxisredoxin-2E, chloroplastic                                                                      | Q949U7              | 0.365           | 0.141 | 0.119 | Photosynthetic proteins |
| Z2   | Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 2, chloroplastic                                        | Q9SYW8              | 0.115           | 0.102 | 0.023 | Photosynthetic proteins |
| Z3   | Bifunctional dolabella-3,7-dien-18-ol synthase/dolathalia-3,7,11-triene synthase TPS20, chloroplastic | A0A178U9Y5          | 0.07            | 0.114 | 0.238 | Photosynthetic proteins |
| Z4   | Peptide methionine sulfoxide reductase B2, chloroplastic                                              | Q9C5C8              | 0.064           | 0.113 | 0.168 | Photosynthetic proteins |
| Z5   | Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic                                                      | Q9SYI0              | 0.031           | 0.06  | 0.09  | Photosynthetic proteins |
| Z6   | Magnesium-chelatase subunit chlI-1, chloroplastic                                                     | P16127              | 0.183           | 0.066 | 0.041 | Photosynthetic proteins |
| Z7   | ATP synthase subunit gamma, chloroplastic                                                             | P0C1M0              | 0.074           | 0.234 | 0.249 | Photosynthetic proteins |
| Z8   | Phosphoenolpyrhvate carboxylase 1                                                                     | P04711              | 0.323           | 0.128 | 0.064 | heterosis               |
| Z9   | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1                                                                   | O24592              | 0.273           | 0.593 | 1.401 | heterosis               |
| Z10  | Photosystem I reaction center subunit VI                                                              | O65101              | 0.071           | 0.067 | 0.025 | heterosis               |
| Z11  | UDP-glycosyltransferase 707A6                                                                         | A0A096SRM5          | 0.056           | 0.116 | 0.150 | heterosis               |
| Z12  | Pentatricopeptide repeat-containing protein                                                           | A0A1D6IEG9          | 0.128           | 0.162 | 0.249 | heterosis               |

|     |                                                               |             |       |       |       |                                  |
|-----|---------------------------------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|----------------------------------|
| Z13 | Putative UMP/CMP kinase a                                     | gi 50915240 | 0.016 | 0.033 | 0.049 | Metabolism and energy production |
| Z14 | ATP synthase beta subunit                                     | gi 525291   | 0.018 | 0.036 | 0.059 | Metabolism and energy production |
| Z15 | Tubulin beta-3 chain(beta-3 tubulin)                          | gi 8928429  | 1.453 | 0.925 | 0.856 | Structural protein               |
| Z16 | Vacuolar protein sorting-associated 35B                       | F4I0P8      | 1.667 | 0.633 | 0.499 | Channel and messenger proteins   |
| Z17 | Protein TIC110, chloroplastic                                 | Q8LPR9      | 0.951 | 1.105 | 2.346 | Channel and messenger proteins   |
| Z18 | Calmodulin-binding transcription activator 4                  | Q9FYG2      | 0.06  | 0.129 | 0.368 | Channel and messenger proteins   |
| Z19 | Exportin-T                                                    | Q7PC79      | 0.06  | 0.111 | 0.150 | Channel and messenger proteins   |
| Z20 | Protein Trygalactosyl D-Acyl Glycerol 5, chloroplastic        | Q8VY77      | 0.019 | 0.022 | 0.044 | Channel and messenger proteins   |
| Z21 | Isoform 2 of Protein translocase subunit SECA2, chloroplastic | D8WUA4      | 0.16  | 0.247 | 0.296 | Channel and messenger proteins   |
| Z22 | Phytolongin Phyl2.2                                           | Q9LVV3      | 0.078 | 0.129 | 0.197 | Channel and messenger proteins   |
| Z23 | Cryptochrome-1                                                | Q43125      | 0.088 | 0.186 | 0.270 | Defense proteins                 |
| Z24 | Peroxidase 42                                                 | A5H453      | 0.168 | 0.294 | 0.375 | Defense proteins                 |
| Z25 | V-type proton ATPase subunit F                                | Q9ZQX4      | 0.013 | 0.087 | 0.174 | Defense proteins                 |
| Z26 | Transportin MOS14                                             | Q8GUL2      | 0.022 | 0.074 | 0.106 | Defense proteins                 |
| Z27 | Cathepsin B-like protease 1                                   | F4HVZ1      | 0.035 | 0.098 | 0.189 | Defense proteins                 |
| Z28 | (S)-beta-macrocarypene synthase                               | Q1EG72      | 0.094 | 0.133 | 0.143 | Defense proteins                 |
| Z29 | Putative defensin-like protein 188                            | P82756      | 0.136 | 0.139 | 0.257 | Defense proteins                 |
| Z30 | Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 12              | Q5Z9J0      | 0.037 | 0.048 | 0.161 | Defense proteins                 |
| Z31 | BAG family molecular chaperone regulator 6                    | O82345      | 0.043 | 0.104 | 0.294 | Defense proteins                 |
| Z32 | Elongator complex protein 2                                   | F4I1S7      | 0.12  | 0.115 | 0.001 | Defense proteins                 |
| Z33 | Probable trehalose-phosphate phosphatase 2                    | Q9FWQ2      | 0.32  | 0.059 | 0.089 | Defense proteins                 |

پروتئین‌های مربوط به سیستم دفاعی (et al. 2010) پیشنهاد کردند که یکی از زیرواحدهای این پروتئین، سیستیک القای ژن دفاعی در گیاه آرابیدوپسیس تنظیم می‌کند. AtELP2 برای القای سریع ژن دفاعی و ایجاد ایمنی کامل پایه و اثرگذار (ETI) مورد نیاز بوده و القای بیولوژیکی یا بیوشیمیایی مقاومت، یک مصونیت عمومی در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، مقاومت بیمارگر را به گیاهان جهش‌یافته Atelp2 بازبایی می‌کند. حذف این پروتئین، مقاومت در برابر دو پاتوژن مختلف القاکننده ETI را کاملاً از بین می‌برد. این نتایج نشان می‌دهد که AtELP2 یک تسریع‌کننده القای ژن دفاعی است که مستقل از ژن مقاومت در ایجاد ایمنی گیاه عمل می‌کند.

پروتئین‌های مربوط به سیستم دفاعی لکه Z32 مربوط به پروتئین کمپلکس الونگاتور<sup>۱</sup> می‌باشد که فراوانی آن در هیبرید نسبت والدین خود حدود ۱۲ برابر افزایش داشته است (جدول ۴-۴). پاسخ ایمنی در یوکاریوت‌ها شامل برنامه‌ریزی مجدد رونویسی است. اگرچه مکانیسم‌هایی که بیان ژن در سیستم دفاعی را تنظیم می‌کنند به‌طور گسترده مشخص شده‌اند، مکانیسم‌هایی که سرعت القای ژن دفاعی را کنترل می‌کنند به‌خوبی شناخته نشده‌اند. DeFraia و همکاران (DeFraia

<sup>1</sup> Elongator complex protein 2

آنزیم دی‌کیناز پیرووات ارتوفسفات<sup>۵</sup> تبدیل pyruvate به phosphoenolpyruvate را با مصرف یک مولکول ATP و تولید یک مولکول AMP را کاتالیز می‌کند (Moons et al. 1998). مصرف ATP ممکن است برای گیاهانی که دسترسی محدودی به منابع انرژی دارند مانند زمانی که منابع ATP در طول تنش کاهش می‌یابد، مطلوب نباشد. بنابراین بازدارنده‌های تولید آن یا فعالیت آنزیم دی‌کیناز پیرووات ارتوفسفات می‌تواند منجر به کاهش در شدت تنش شوری و به دنبال آن افزایش تحمل تنش شوری بواسطه حفاظت از ذخایر ATP در سلول می‌شود. از سوی دیگر این نشان می‌دهد که درحالی‌که تنش غیر زیستی می‌تواند دی‌کیناز پیرووات ارتوفسفات را افزایش دهد، تلقیح با باکتری محرک رشد گیاه می‌تواند در کاهش فعالیت این آنزیم در کلزا نقش داشته باشد. به‌طور کلی اثر متقابل کلزا با باکتری محرک رشد گیاه می‌تواند در کاهش فعالیت phosphoenolpyruvate مؤثر باشد که در نتیجه از منابع ATP در سلول محافظت می‌شود (Banaei-Asl et al. 2015). ترپن‌ها بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند و مشخص شده است که عملکردهای مختلفی هم در داخل گیاه و هم در ارتباط با سایر موجودات زنده دارند. بیشتر تنوع ساختاری بین ترپن‌ها را می‌توان به ترپن سنتازها نسبت داد (Wink 2011). ترپن سنتازها مسئول ایجاد تنوع گسترده‌ای در ساختارهای کربنی ترپن‌های موجود در گیاهان هستند. این آنزیم‌ها از یک مکانیسم واکنش مبتنی بر تشکیل کربوکاتیون‌ها (یون‌های کربن مثبت) استفاده می‌کنند که می‌تواند چندین محصول متفاوت را از یک بستر پرنیل دی‌فسفات ایجاد کند. در ذرت دو ژن شناسایی شد که سنتازهای مشابهی از نوع سسکوئین ترپن به نام TPS6 و TPS11 را رمزگذاری می‌کنند، که هر دو -بیزابولن<sup>۶</sup>، یک سسکوئین ترپن تک حلقه‌ای رایج، و ماکروکارپن<sup>۷</sup>، یک الفین دو حلقه‌ای غیر معمول تولید می‌کنند. TPS6 و TPS11 هر دو در برگ و ریشه ذرت رونویسی می‌شوند، اما محصولات ترپن مربوطه فقط در ریشه شناسایی شدند. بیان این ژن‌ها در ریشه‌ها با آسیب فیزیکی به برگ‌ها القا شد که نشان دهنده ترانسسانی علامتی گسترده در فاصله طولانی

تنش‌های زیستی عملکرد و اجزای عملکرد ذرت را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بیماری‌های مختلف ناشی از بیمارگرهای باکتریایی، قارچی و ... از جمله این تنش‌ها محسوب می‌شوند (Gadag et al. 2021). سرعت مهار بیماری از طریق القای زود هنگام مقاومت ژنتیکی در گیاه منجر افزایش عملکرد آن خواهد شد. با توجه به اینکه هیبرید SC01 از نظر صفات مورفولوژیک و عملکرد بهتر از والدین خود می‌باشد، سهم زیادی از این ویژگی را می‌توان به افزایش بیان ژن‌های مربوط پروتئین پروتئین کمپلکس الونگاتور<sup>۲</sup> نسبت داد.

سطوح قابل توجهی از تریولوز در باکتری‌ها، قارچ‌ها و بی‌مهرگان تجمع می‌یابد، جایی که به‌عنوان یک کربوهیدرات ذخیره‌ای یا محافظ در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی عمل می‌کند. در گیاهان عالی، این متابولیت در سطوح نسبتاً پایین مشاهده می‌شود. در بسیاری از موجودات، تریولوز -۶-فسفات فسفاتاز<sup>۱</sup> آنزیمی است که مرحله نهایی بیوسنتز تریولوز را کنترل می‌کند (Shima et al. 2007). شناسایی و بررسی خصوصیات عملکردی ژن‌های بیوسنتز ترهالوز، تولید این متابولیت را در گیاهان عالی ممکن ساخته است. با این حال، تجمع سطوح پایین ترهالوز در گیاهان، نشان‌دهنده عملکرد متمایز این ماده نسبت به نقش آن در سایر موجودات است. سازماندهی این ژن‌های بیوسنتز ترهالوز نیز در گیاهان عالی کاملاً منحصر به فرد است. تنها یک یا دو نسخه از ژن‌های TPS<sup>۱</sup> و TPP<sup>۲</sup> در اکثر باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات وجود دارد، در حالی که این ژن‌ها یک خانواده ژنی بزرگ را در گیاهان عالی تشکیل می‌دهند. به‌عنوان مثال، در آرکیدوپسیس، ۱۱ ژن TPS و ۱۰ ژن TPP از اطلاعات ژنومی شناسایی شده است (Eastmond and Graham 2003, Leyman et al. 2001). بررسی میزان تغییرات در فراوانی آنزیم ترهالوز-فسفات فسفاتاز<sup>۲</sup> (Z33) مشخص شد که در پروفایل پروتئینی افزایش ۳۰۰ درصدی نسبت به TS01 وجود دارد (جدول ۴-۴).

<sup>۱</sup> trehalose-6-phosphate phosphatase<sup>۲</sup> Trehalose Phosphate Synthase<sup>۳</sup> Trehalose Phosphate Phosphatase<sup>۴</sup> trehalose-phosphate phosphatase 2<sup>۵</sup> pyruvate orthophosphate dikinase<sup>۶</sup> δ-Bisabolene<sup>۷</sup> Macrocarpene

بین برگ‌ها و ریشه‌ها است (Kollner et al. 2008). S- بتا- ماکروکارپن سنتاز<sup>۱</sup> مربوط به لکه Z28، کاهش در فراوانی به میزان ۶۵ درصد در هیبرید نسبت به TS01 داشت (جدول ۴-۴). با توجه به اینکه افزایش این نوع ترپنوئیدها در نتیجه افزایش میزان آسیب فیزیکی افزایش می‌یابند، به نظر می‌رسد کاهش میزان این پروتئین با افزایش میزان آستانه تحمل هیبرید در تنش‌های محیطی در ارتباط باشد. از طرفی تعدادی از پروتئین‌های مربوط به مکانیسم دفاعی گیاه کاهش فراوانی در هیبرید نسبت به والدین داشتند که می‌توان اظهار داشت که رشد بهتر هیبرید به علت کاهش معنی‌دار در فرآیندهای مصرف کننده انرژی مانند متابولیسم پروتئین است. به عبارت دیگر ال‌های ضعیف در هیبرید بیان نمی‌شوند. به دلیل این تنظیم مثبت در بیان ژن‌ها، ژنوتیپ هیبرید قادر به صرفه جویی در انرژی مورد نیاز متابولیسم پایه و صرف آن در تولید بیوماس است. در این راستا پروتئین‌های کیناز<sup>۲</sup> UMP/CMP a (Z13) و زیرواحد بتا سنتاز ATP<sup>۳</sup> (Z14) دخیل در متابولیسم انرژی هستند و حدود ۳۰ درصد کاهش در فراوانی در هیبرید داشتند که می‌تواند به علت مذکور باشد.

در این پژوهش، بررسی‌های انجام شده نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های هیبریدی مورد بررسی افزایش چشم‌گیری داشته و با بهبود سیستم دفاعی گیاه همراه بوده است. به ویژه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز که در پاسخ به تنش اکسیداتیو و به عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی دفاعی گیاه شناخته می‌شود، در نمونه‌های آزمایشی افزایش یافت. نتایج این مطالعه هم‌راستا با یافته‌های مقاله‌ی Shafiei et al. (2024) است، که در آن افزایش فعالیت ایزوفورم‌های سوپراکسید دیسموتاز و بیان پروتئین‌های مرتبط با سیستم دفاعی در گیاهان نخود آلوده به بلایت آسکویشیتا<sup>۴</sup> مشاهده شد. در آن تحقیق نیز استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی، اطلاعات دقیق‌تری درباره‌ی واکنش‌های دفاعی و سازوکارهای حفاظتی گیاه ارائه کرد که نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در مقاومت گیاهی است.

پروتئین‌های درگیر در فرایند هتروزیس و فتوسنتز

گیاهان به‌عنوان ارگانیسم‌هایی با توانایی سازگاری بالا، باید به تغییرات سریع عوامل محیطی مانند نور، دما و رطوبت پاسخ دهند. ذرت که به‌عنوان یکی از کشت‌شده‌ترین محصولات جهان شناخته می‌شود، ظرفیت فتوسنتز بالایی به‌عنوان یک گیاه C4 از خود نشان می‌دهد و در ظهر به بالاترین میزان فتوسنتز خالص می‌رسد (Sage 2004). درک پاسخ‌های فیزیولوژیکی ذرت به تغییرات روزانه و شناسایی مکانیسم‌های اساسی بهبود عملکرد آن بسیار حائز اهمیت است. تجزیه و تحلیل پروتئین‌هایی با تغییرات قابل توجه در فراوانی و فسفوریلاسیون نشان می‌دهد که پاسخ به محرک‌های حرارتی شامل تغییر در فراوانی پروتئین‌های متعدد است. از سوی دیگر، نور زیاد در ظهر و شرایط نوری در حال تغییر، تغییراتی را در سطح فسفوریلاسیون پروتئین‌های دخیل در فرآیندهایی مانند جابه‌جایی کلروپلاست، فتوسنتز و مسیرهای C4 ایجاد می‌کند. فسفوریلاسیون در تنظیم فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها نقش دارد (Ehleringer & Monson 1993).

در مطالعه اخیر، ارتباط عملکردهای آنزیمی و پروتئینی با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات مختلف به‌وضوح نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها نقش اساسی در تحمل تنش‌ها و بهبود ویژگی‌های رشد گیاهان دارند. برای مثال، در مقاله‌ای که به بررسی پروتئین‌های دخیل در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هیبرید ذرت (SC01) پرداخته شده است، نتایج نشان می‌دهد که فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مهم در پدیده هتروزیس باشد. این نتایج با مطالعات پیشین که بیان کردند پروتئین‌های گوناگون در شرایط تنش افزایش یافته و منجر به بهبود عملکرد گیاهان می‌شود، همخوانی دارد (Shafiei et al. 2024).

همچنین، در تحقیقاتی که به بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پروتئین‌های درگیر در فرآیند فتوسنتزی گیاهچه‌های ذرت تحت تنش شوری پرداخته‌اند، نشان داده شده است که افزایش این آنزیم‌ها به حفظ تعادل یونی و افزایش تولید انرژی (ATP) کمک می‌کند که برای تحمل تنش اکسیداتیو ضروری است (Moharramnejad et al. 2021).

نتایج مشابهی نیز در تحقیق دیگری مشاهده شد که در آن افزایش بیان پروتئین‌های مسیر ترانسسانی علامت GTP گزارش شد و به

<sup>۱</sup> S-beta-macrocarpene synthase

<sup>۲</sup> Putative UMP/CMP kinase a

<sup>۳</sup> synthase beta subunit ATP

<sup>۴</sup> Ascochyta blight

## نتیجه‌گیری کلی

پروتئومیکس علمی با دقت بسیار بالا در شناسایی و تحلیل پروتئین‌ها، کاربردها و الگوهای بیان آنهاست. این علم به‌عنوان یکی از بهترین روش‌ها برای به‌دست آوردن اطلاعات دقیق و ارزشمند از فرایندهای بیولوژیکی عمل می‌کند و امکان تهیه داده‌های همزمان از این فرایندها را فراهم می‌آورد. بنابراین می‌توان از آن در تجزیه و تحلیل فرایندهای مرتبط با برگ گیاه ذرت استفاده کرده در این تحقیق تغییرات الگوی پروتئوم برگ‌های دو لاین اینبرد ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01 به‌منظور بررسی تغییرات الگوی پروتئینی برگ ذرت و تغییرات مقدار پروتئین‌های مختلف در لاین‌های ذرت (MS02) و (TS01) و نتاج SC01 و شناسایی پروتئین‌های دخیل در این لاین‌ها، مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دامنه وسیعی از فعالیت‌های متابولیکی شامل فتوسنتز، متابولیسم و تولید انرژی، بیوسنتز پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها، موتاز و بسته‌بندی پروتئین‌ها، پروتئین‌های دفاعی، پروتئین‌های ذخیره‌ای، سیستم انتقال پیام، سم زدایی و فرایندهای پایه‌ای ژنتیکی (هماندسازی، نسخه‌برداری و ترجمه) طی لاین‌های مختلف برگ ذرت دوچار تغییرات شده‌اند. توجه به این نکته ضروری است که بررسی پروتئوم برگ ذرت در لاین‌های مختلف تنها از طریق ترکیب روش‌های مختلف ژنومیکس، از جمله ترانس کریپتومیکس و پروتئومیکس، همراه با مطالعات فیزیولوژیکی گیاه ممکن است. این رویکرد می‌تواند به درک بهتر فرایند پیچیده شناسایی پروتئین‌های دخیل در پیشرفت گیاه کمک کند.

بهبود انتقال پیام‌های سلولی و بیان به موقع پروتئین‌ها در شرایط تنش کمک کرد (shafiei et al., 2023). این نتایج حاکی از آن است که عملکردهای آنزیمی و پروتئینی در بهبود مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی و بهبود ویژگی‌های زراعی نقش کلیدی دارند.

کلروپلاست گیاهان دارای دو نوع رنگدانه پروتئینی فتوسیستم I و فتوسیستم II است که درون غشای تیلاکئیدی جای گرفته‌اند (اوزاکا، ۲۰۱۳). فتوسیستم I یک ترکیب چند زیرواحدی پروتئینی غشایی بوده که انتقال الکترون در کلروپلاست را کاتالیز می‌کند (Amunts and Nelson 2008). عوامل محیطی نظیر دما، نور فرابنفش، پرتوتابی، خشکی و شوری فتوستز گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. Banaei-Asl و همکاران در میان پروتئین‌های درگیر در فرایندهای فتوستزی در برگ‌های کلزای تلقیح شده با باکتری محرک رشد گیاه، در مقایسه با کلزای تلقیح نشده، افزایش معنی‌داری در زیرواحد D-1 و D-2 فتوسیستم I مشاهده کردند که این افزایش برای تولید بیشتر ATP برای تامین انرژی لازم برای فرایندهای مربوط به تحمل تنش اکسیداتیو انجام گرفته است (Banaei-Asl et al. 2016). Peroxiredoxin با نقشی که در فعالیت آنتی اکسیدانی در داخل سلول دارد و همچنین افزایش سه برابری SC01 مقابل والدین خود تأییدی بر این واقعیت دارد که یکی از مکانیسم‌های مهم در پدیده هتروزیس ناشی از فعالیت بالای آنتی اکسیدانی است بررسی صفات آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها به‌طور مستقیم به فعالیت بالای آنتی اکسیدانی مرتبط هستند و نمی‌توانند چنین فرآیندی را رد کنند.

## منابع

- Ahmadi A, Ehsanzadeh P and Jabbari F (2007) Introduction to Plant Physiology. University of Tehran Press. pp: 680.
- Amunts A, Nelson N (2008) Functional organization of a plant Photosystem I: evolution of a highly efficient photochemical machine. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:228-237.
- Banaei-Asl F, Bandehagh A, Uliaei ED, Farajzadeh D, Sakata K, Mustafa G, Komatsu S (2015) Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *Journal of Proteomics* 124:88-111.

- Banaei-Asl F, Farajzadeh D, Bandehagh A, Komatsu S (2016) Comprehensive proteomic analysis of canola leaf inoculated with a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas fluorescens*, under salt stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1864:1222-1236.
- Blum H, Beier H, Bremer E (1987) *Electrophoresis* 8:93-99.
- Bradford MM (1979) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Chen X, Li Y, Zhang J (2024) Gene expression related to defense in inbred maize lines and their hybrids in response to fungal pathogens. *Plant Pathology* 73:1247-1260
- Cvjetko P, Zovko M, Balen B (2014) Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 65:1-17.
- Damerval C, Zivy M, Granier F, Devienne D (1989) Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophoresis*, Springer.
- Defraia CT, Zhang X, Mou Z (2010) Elongator subunit 2 is an accelerator of immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 64:511-523.
- Eastmond PJ, Graham IA (2003) Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology* 6:231-235.
- Ehleringer JR, Monson RK (1993) Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:411-439
- FAO. (2020). Food Outlook Global Market Analysis. <http://www.Fao.org>.
- Gadag, R., Bhat, J. S., Mukri, G., Gogoi, R., Suby, S., Das, A. K., Yadav, S., Yadava, P., Nithyashree, M., & Naidu, G. K. (2021). Resistance to biotic stress: theory and applications in maize breeding. *Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Cereal Crops*, 129-175.
- Gucciardo S, Wisniewski JP, Brewin NJ, Bornemann S (2007) A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany* 58:1161-1171.
- Hallauer AR, Miranda FJB (1988) *Quantitative Genetics in Maize Breeding* (2nd ed.). Iowa University Press, Iowa, USA.
- Khodabandeh N (2003) *Ghalat* (7th ed.). Publishing and Printing Institute of Tehran University.
- Kollner TG, Schnee C, Li S, Svatos A, Schneider B, Gershenzon J, Degenhardt J (2008) Protonation of a neutral (S)- $\beta$ -bisabolene intermediate is involved in (S)- $\beta$ -macrocypene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11. *Journal of Biological Chemistry* 283:20779-20788.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM (2001) An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 6:510-513.
- Li X, Zhang Y, Liu W (2023) Patterns of gene expression in response to heat stress in several inbred lines of maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 195:230-238.
- Liu J, Chen H, Li X (2023) RNA-seq comparison of gene expression in maize hybrids and their inbred parents under various climatic conditions. *Frontiers in Plant Science* 14:501-515.
- Moharramnejad S, Bandeh Haq A, Shafiei Y (2021) Evaluation of superoxide dismutase enzyme activity, proteins involved in photosynthetic systems, and sodium and potassium levels in maize seedling lines under salt stress. *Journal of Agricultural Plant Breeding* 13:185-196.
- Moons A, Valcke R, Van M, Montagu M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C3 plant. *The Plant Journal* 15:89-98.
- Mostafaie, A. (2003). *Theoretical and Practical Guide Protein Electrophoresis in Gel*. Yadavaran Publishers.
- Movahhedi Dehnnavi M, Modarres Sanavi SA, Soroshzade A, Jalali M (2003) Changes in proline, soluble sugars, SPAD and chlorophyll fluorescence in winter safflower cultivars under drought stress and spraying zinc and manganese. *Biaban J* 9:93-110. (In Persian)
- Nasiri N, Nematzadeh QA, Askari H, Shukri A (2013) Studying the proteome response of plant leaves *Aeluropus littoralis* under salt stress conditions. *Cell-Molecular Biotechnology News* 2:27-35.
- Nduwumuremyi A, Zhang R, Wang J (2023) Transcriptomic analysis of maize hybrids under drought stress conditions. *BMC Genomics* 24:456.
- Noormohammadi Q, Siadat SA, Kashani A (2001) *Cereal Cultivation* (Vol. 1, 3rd ed.). Chamran University Press.
- Poehlman JM (1986) *Breeding Field Crops* (3rd ed.). Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York.
- Rezai Sohkt Abandani R, Cherati Arai A, Akbari Nodehi D, Mobasro HR, Ramezani M (2018) The effect of irrigation cycle and nitrogen levels on the yield and yield components of single cross 704 seed corn in Mazandaran province. *Journal of Research in Agricultural Sciences* 2:81-92.
- Riccardi F, Gazeau P, De Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology* 117:1253-1263.
- Saberi AR, Faiz Bakhsh MT, Mukhtarpour H, Muosavat A, Askar M (2018) The effect of plant density and planting arrangement on the yield and yield components of single cross 704 seed corn. *Seedling and Seed Horticultural Journal* 26:123-136.
- Sage RF (2004) The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist* 161:341-370.
- Shafiei Y, Jahangir Gadeh Kahriz S, Farzaneh S, Reisi Sadati SY (2023) Investigation of the expression of proteins induced in the leaves of two soybean cultivars under salt stress using two-dimensional electrophoresis. *Journal of New Genetics* 18:10-14.
- Shafiei Y, Mohsenzadeh Golafzani M, Moharramnejad S, Samiazadeh Lahiji H, Banaei Asl F (2024) Investigation of genetic characteristics of agro-physiological traits and antioxidant defense system of maize hybrid (SC01) from the medium maturity group. *Biotechnology and Biochemistry of Cereals* 3:15-36.
- Shafiei Y, Mohsenzadeh Golfazani M, Mostafaie A, Taghvaei MM, Samizadeh Lahiji H, Raza A (2024) Evaluation of superoxide dismutase isoforms activity and defense system-related proteins' expression in *Ascochyta* blight-infected chickpea using 2D electrophoresis technique. *Biology Bulletin* 106:3590.
- Shima S, Matsui H, Tahara S, Imai R (2007) Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes. *FEBS Journal* 274:1192-1201.
- Shull GH (1908) The composition of a field of maize. *American Breeders' Association Report* 4:296-301.

Wink M (2011) *Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. John Wiley & Sons.

Zhou L, Wu X, Yang Q (2024) Transcriptomic responses of different maize lines to nitrogen availability. *Molecular Plant* 17:348-361.