دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

بررسی عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا با رهیافت‌های پروتئومیک و بیوانفورماتیک

کمال پیغام‌زاده[۱]، محمود تورچی[۲] و مریم سادات شبر[۳]

۱- بخش تحقیقات علوم زراعی-باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران، (نویسنده مسوول: k.peyghamzade@areeo.ac.ir)
۲- گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱
صفحه: ۱۲۷ تا ۱۳۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: عارضه اختلال در غلاف‌بندی نوع ویژه‌ای از رشد همراه با ناهنجاری در تشکیل گل و غلاف است که در آن گیاهان سویا مدت‌ها پس از رسیدگی غلاف‌ها، سبز باقی می‌مانند و منجر به کاهش شدید عملکرد می‌گردد. به منظور بررسی و شناسایی پروتئین‌های دخیل در تظاهر عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا، پروفایل بیان پروتئین‌های گیاهان سالم و مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا در دو رقم کتول و گرگان ۳ بر اساس رهیافت‌های پروتئومیک و بیوانفورماتیک مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: برای این منظور نمونه‌های برگی گیاهان سالم و مبتلا از دو رقم فوق در مرحله گلدهی انتخاب و پروتئین آنها به روش TCA/Acetone استخراج شد. سپس تفکیک پروتئین‌ها و تجزیه افتراقی آنها به ترتیب با استفاده از ژل الکتروفورز دو بُعدی و طیف‌سنجی جرمی nESI-LC-MS/MS انجام شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل نتایج ژل الکتروفورز دو بُعدی نشان داد که سطح بیان ۵ تا از ۱۵۵ لکه پروتئینی در رقم کتول و ۱۱ تا از ۱۴۳ لکه پروتئینی در رقم گرگان ۳ در گیاهان سالم و مبتلا به طور معنی‌داری تغییر یافت. آنالیز افتراقی پروتئین‌ها با تغییر بیان معنی‌دار با nESI-LC-MS/MS نشان داد که در پاسخ به این عارضه بیشتر پروتئین‌های درگیر در فعالیت‌های تنظیم سلولی، تولید انرژی، متابولیسم، انتقال سیگنال، نسخه‌برداری و ترجمه ژن و نیز تقسیط و ذخیره‌سازی پروتئین‌ها شرکت دارند.

نتیجه‌گیری: در میان پروتئین‌های شناسایی شده احتمالا پروتئین‌های 14-3-3 like protein، OEE2، زیر واحد بزرگ رابیسکو و پروتئین NACA ممکن است از جمله تنظیم کننده‌های کلیدی عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا باشند.

واژه‌های کلیدی: پروتئوم سویا، پروتئولیز سلولی، رابیسکو، ژل الکتروفورز دو بُعدی، طیف‌سنجی جرمی، فنوتیپ سبز

مقدمه

سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) با داشتن تقریبا ۲۰ درصد روغن و ۴۰ درصد پروتئین از لحاظ اقتصادی، صنعتی، تغذیه‌ای، بهداشتی، اکولوژیکی و اجتماعی حائز اهمیت فراوانی است (۳۲،۲۷). با توجه به اهمیت آن سطح زیر کاشت آن در جهان سال به سال رو به افزایش است به‌طوری‌که در سال ۲۰۱۹ سطح سویای برداشت شده تقریبا برابر با ۱۲۰ میلیون هکتار با مقدار تولید دانه تقریبا برابر با ۳۳۴ میلیون تن گزارش شده است (۱۲). سطح زیر کاشت سویا در ایران با نوسان زیادی مواجه بوده به‌طوری‌که در سال ۱۳۹۸ سطح زیر کاشت آن تقریبا برابر با ۲۹ هزار هکتار با مقدار تولید دانه تقریبا برابر با ۶۸ هزار تن بوده است به گونه‌ای که استان گلستان با داشتن تقریبا ۱۵ هزار هکتار رتبه نخست سویا را به خود اختصاص داده است (۲). اما، عوامل متعددی به این محصول خسارت وارد می‌کنند و منجر به کاهش عملکرد آن می‌گردند. در بین این عوامل عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا یکی از مهمترین عوامل خسارت‌زا به سویا می‌باشد (۳۶). این عارضه با ظهور حالات مختلفی از جمله رشد علفی، کوتولگی، ریزش شدید گل‌ها و غلاف‌ها، تشکیل و تجمع گل‌ها و غلاف‌های غیر طبیعی، پیچیدگی ساقه و ضخیم شدن ساقه‌ها، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، سوختگی جوانه انتهایی، عدم تشکیل دانه در غلاف و نظایر آن همراه می‌باشد (۳۲). در طی سال‌های ۱۳۹۱ به طور میانگین ۱۴۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ هکتار به طور کامل به این عارضه مبتلا شدند و به طور میانگین مبلغی حدود ۲۰۰ میلیارد ریال به کشاورزان استان گلستان خسارت وارد شده است (۳۲). فرضیه‌های متفاوتی از جمله فرضیه آگرونومیکی (۲۳،۱۷)؛ فرضیه اقلیمی (۱۸)؛ فرضیه بیولوژیکی مانند آفات و بیماری‌ها (۳۹،۳۳،۲۰)؛ فرضیه فیزیولوژیکی (۳۳،۱۸) و فرضیه ژنتیکی (۲۳،۳۹،۵۰،۱۹،۲۱) در رابطه با تظاهر این عارضه پیشنهاد شده است. به هر حال، عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا در اثر واکنش گیاه نسبت به فاکتورهای مختلف ذکر شده در سطح مولکولی و تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در گیاه تظاهر می‌یابد. شناسایی این مکانیسم‌ها از طریق بررسی تغییرات سلولی در سطح پروتئین می‌تواند به روشن شدن نحوه تظاهر عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا کمک نموده و افق جدیدی را برای افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی از طریق اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک فراهم کند (۳۲،۲۷). انجام این کار در درجه نخست نیازمند شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده در برابر ابتلا یا گریز از این عارضه است و به دنبال آن با شناسایی نقش این پروتئین‌ها می‌توان زمینه لازم را برای اصلاح ارقام مقاوم یا متحمل به این عارضه را در آینده امکانپذیر ساخت.

بنابراین، بررسی پروتئوم گیاه با رهیافت پروتئومیک که دیدگاهی جامع از الگوی پروتئوم بافت‌های هوایی گیاه را ارائه کند یکی از راهکارهای تشخیص پروتئین‌های درگیر در این فرآیند در سطح مولکولی می‌باشد. پروتئومیک ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی است (۵۲،۴۴). با توجه به اینکه، پروتئومیک در شناسایی و بررسی ژن‌های پاسخ‌دهنده

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

به تنش‌ها نیز به کار برده می‌شود، هدف از این مطالعه بررسی تغییرات پروتئوم برگ‌های سویا در حضور و عدم حضور عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا، شناسایی، بررسی و تعیین نقش مولکولی و بیولوژیکی پروتئین‌های درگیر در عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا با رهیافت پروتئومیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های مزرعه‌ای

جهت بررسی تغییرات پروتئوم برگ گیاهان سالم و مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا در منطقه گرگان، از مزارع کشاورزان استفاده شد. برای این منظور در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در محدوده وسیعی از منطقه سویاکاری در شهرستان گرگان، مزارع مختلف سویا (ارقام گرگان ۳ و کتول) بطور تصادفی انتخاب شدند. در مرحله گلدهی (R_1) مزارع با علائم عارضه اختلال در غلاف‌بندی مشخص شد و از همان مزرعه نمونه‌های برگی از گیاهان سالم و مبتلا که در مجاورت یکدیگر قرار داشتند در سه تکرار بیولوژیک جمع‌آوری گردید و بلافاصله با تانک ازت به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این آزمایش از نمونه‌های برگی استفاده شد، زیرا اولین علائم عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا از طریق تغییر رنگ و شکل برگ‌ها قابل تشخیص می‌باشد. همچنین در مرحله زایشی R_1 برگ‌ها جوانتر بوده و لطافت بیشتری نسبت به سایر اندام‌ها دارند و این موضوع در استخراج پروتئین دارای اهمیت می‌باشد.

بررسی‌های آزمایشگاهی

استخراج و حل کردن پروتئین: برای استخراج پروتئین از روش دامروال (۱۰) استفاده شد و غلظت پروتئین بدست آمده با روش برادفورد (۸) تعیین شد.

الکتروفورز بُعد اول

برای این منظور، ۴۰۰ mg/µl از پروتئین استخراج شده بر روی ژل‌های بُعد اول ۱۱ سانتی‌متری به قطر ۳ میلی‌متر که حاوی ۰/۱ مول اوره، ۱۴۵ میکرولیتر پلی‌آکریلامید ۳۰ درصد، ۲۵۰ میکرولیتر NP-40، ۳۱/۲۵ میکرولیتر آمفولیت (با pH: ۳/۵-۱۰ و pH: ۵-۸)، ۱/۸۷۵ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، ۱/۲۵۱ میکرولیتر N، N، N0، N0–تترامتیل اتیلن دای‌آمین و ۳۵۵ میکرولیتر ddH2O بود، بارگذاری شد. الکتروفورز بُعد اول در سه مرحله به ترتیب ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت صورت گرفت.

الکتروفورز بُعد دوم

ژل بُعد دوم (SDS-PAGE) به صورت دو قسمتی شامل ژل تجمعی در قسمت بالا و ژل تفکیکی در قسمت پایین می‌باشد که حاوی ۸/۵ میلی‌لیتر پلی‌آکریلامید، ۶/۳ میلی‌لیتر بافر ژل جدا کننده (pH: ۸/۸)، ۱۲۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، ۲۰ میکرولیتر N، N، N0، N0–تترامتیل اتیلن دای‌آمین و ۳۵۵ میکرولیتر ddH2O می‌باشد. الکتروفورز بُعد دوم به منظور پلیمریزاسیون ژل بُعد دوم به همراه یک نشانگر دو بُعدی (جهت تعیین نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها) در یک مرحله به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ژل: پس از اتمام الکتروفورز بُعد دوم، ژل با قرار گرفتن در ظرف مخصوص محلول رنگ آمیزی آبی کماسی[1] به مدت ۱/۵ ساعت بر روی شیکر رنگ‌آمیزی شد و سپس با آب مقطر دیونیزه به اندازه کافی شستشو و با استفاده از محلول رنگ‌بر حاوی ۳۵٪ متانول و ۱۰٪ اسید استیک رنگ‌زدایی گردید.

تصویربرداری و تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی

نظر به اینکه ژل‌های دو بُعدی پس از رنگ‌آمیزی دارای حداکثر وضوح و کیفیت می‌باشند و استفاده از این کیفیت به هنگام تجزیه ژل‌ها ضروری است، تصویربرداری بلافاصله پس از رنگ‌آمیزی توسط دستگاه اسکنر چگالی‌سنج (GS-800, Bio-Rad) انجام شد.

طیف‌سنجی جرمی

پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی که دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند، لکه‌های مورد نظر از روی ژل‌ها شناسایی و از ژل جدا شد و به طور جداگانه داخل تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی آب دیونیزه قرار داده شد و نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات طیف‌سنجی جرمی به آزمایشگاه پروتئومیکس و طیف‌سنجی جرمی[2] واقع در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی و دندانپزشکی دانشگاه آلبرتا در کانادا ارسال شد.

هضم پروتئین

برای این منظور، از روش هضم نمونه در ژل[3] با استفاده از آنزیم تریپسین استفاده شد. بدین ترتیب که ژل‌های حاوی لکه‌های پروتئینی دوبار با ۱۰۰ میلی‌مول بیکربنات آمونیوم (NH4HCO3)/استونیتریل (ACN) (به نسبت حجمی۵۰:۵۰) رنگ‌زدایی شدند. سپس، نمونه‌های به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حضور ۱۰ میلی‌مول BME همراه با ۱۰۰ میل‌مول بیکربنات آمونیوم احیا شد و در ادامه با ۵۵ میلی مول یدو استامید به همراه ۱۰۰ میلی‌مول بیکربنات آمونیوم به مدت ۳۰ دقیقه آلکیله شد. پس از دهیدراسیون، آنزیم تریپسین به اندازه‌ای که سطح ژل را پوشش دهد (۶ng/ul) به قطعات ژل اضافه شد و فرایند هضم در طول شبانه روز (تقریبا ۱۶ ساعت) در دمای اتاق انجام شد. در ادامه، برای استخراج پپتیدهای هضم شده، پپتیدهای موجود در نمونه‌های هضم شده برای بار اول با استفاده از محلولی با نسبت ۹۷٪ آب دیونیزه/۲٪ استونیتریل/۱٪ اسید فرمیک استخراج شد و مرحله دوم استخراج با استفاده از ۵۰٪ از بافر استخراج اول و ۵۰٪ استونیتریل انجام شد. سپس، بخش پپتیدی هضم شده در محلولی که حاوی ۲۵٪ (حجمی) استونیتریل و ۱٪ (حجمی) اسید فورمیک بود حل شد و برای تجزیه با طیف سنج جرمی Nanoflow-HPLC مجهز به LTQ-Orbitrap hybrid MS مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی پروتئین‌ها با روش nano LC-MS/MS

به منظور شناسایی پروتئین‌ها از دستگاه nanoflow-HPLC (Easy-nLC II, Thermo Scientific) مجهز به LTQ XL-Orbitrap hybrid MS (Thermo Scientific) استفاده شد. روش کروماتوگرافی نانوفلو و روش یونیزاسیون الکترواسپری با استفاده از تجهیزات PicoFrit آمیخته[4] با

1- Commasi Brliant Blue (CBB)
2- Prof. Jack Moore - Facility Supervisor-Alberta Proteomics and Mass Spectrometry Facility-4096 Katz Research, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, T6G 2E1
3- In gel digestion
4- Fused

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

ستون‌های کاپیلاری سیلیکا (ProteoPepII, C18) با قطر درونی ۱۰ میکرومتر انجام شد (300Å, 5µm, New Objective). ترکیبات پپتیدی با سرعت جریان ۳۰۰۰ نانو لیتر در دقیقه به درون ستون‌های کاپیلاری سیلیکا تزریق شدند و با استفاده از شیب غلظت صفر تا ۴۵ درصد (حجمی) استونیتریل با محلول ۰/۲ درصد اسید فرمیک مجددا حل شد. طیف‌سنجی جرمی با روش هدف‌یابی وابسته به داده راه اندازی شد و طیف جرمی کامل با درجه تبیین ۶۰۰۰۰ طیف‌های Orbitrap با دامنه m/z بین ۲۰۰۰-۴۰۰ را با دقت و وضوح بالا حاصل شد. فراوانترین ۱۴ یون غالب باردار شده با استفاده از تفکیک القایی با تصادم[1]، قطعه قطعه شد و طیف‌های حاصل از قطعاتشان به صورت مد خطی تله یونی[2] ثبت شد و برای ممانعت از انتخاب تکراری پپتیدها، خارج سازی دینامیکی به مدت ۶۰ ثانیه اعمال شد. طیف‌های از حاصل MS/MS با استفاده از نرم‌افزار Proteome Discoverer نسخه ۱/۴ (Thermo Scientific) پردازش شد. داده‌های حاصل با استفاده از جستجوگر سکوئست (Thermo Scientific) در بانک اطلاعاتی UniProt مربوط به سویا جستجو شد. کاربامیلاسیون سیستئین به عنوان تغییرات ثابت و اکسیداسیون متیونین و دآمیناسیون گلوتامین و آسپارژین به عنوان تغییرات متغیر، تریپسین به عنوان آنزیم پروتئولیتیک، یک برش گم شده، دامنه تغییرات جرم پپتیدی ۱۰ پی پی ام، دامنه تغییرات جرم قطعه تا ۰/۸ دالتون و ۱+، ۲+ و ۳+ برای بار پپتید از جمله پارامترهای تنظیمی برای جستجو در بان اطلاعاتی توسط نرم‌افزار مربوطه بود. پس از اتمام جستجو، لیستی از پروتئین‌ها بر اساس انطباق پپتیدهای شناسایی شده با توالی‌های پروتئینی موجود در بانک‌های اطلاعاتی توسط نرم‌افزار سکوئست برای هر لکه ارائه گردید. از میان لیست پروتئین‌های ارائه شده برای هر لکه، پروتئینی به عنوان پروتئین شناسایی شده گزارش گردید که میزان هم‌پوشانی، رتبه، وزن مولکولی و pI توالی پپتیدی شناسایی شده توسط طیف‌سنجی جرمی با توالی پروتئین موجود در بانک اطلاعاتی بیشتر باشد.

تجزیه‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشگاهی: کلیه تصاویر ژل به همراه تکرارهای آن به وسیله نرم‌افزار PDQUEST (Ver. 8.0) فراخوانده شدند و به طور همزمان آزمون معنی‌داری آنها با نرم‌افزار SAS (Ver. 9.1) (۳۸) انجام شد و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب[3] زده شد. پس از پایان لکه‌یابی درصد حجمی لکه‌ها برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون t-استیودنت برای درصد حجمی هر لکه در سطوح تنش انجام شد. در آخر لکه‌های پروتئینی که تغییرات معنی‌داری داشتند مشخص شدند و روند افزایشی و یا کاهشی میزان بیان آنها در اثر تنش بر اساس ضریب IF[4] مشخص شد. لکه‌هایی که دارای IF بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان[5] و لکه‌هایی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان[6] معرفی شدند. شاخص IF بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$IF = \frac{\text{درصد حجمی لکه پروتئینی در حالت ابتلا به عارضه}}{\text{درصد حجمی لکه پروتئینی در حالت بدون ابتلا به عارضه}}$$

طبقه‌بندی پروتئین‌ها

از نظر مکان سلولی و عملکرد انجام گرفت. برای طبقه‌بندی از نظر مکان سلولی از موتور جستجوگر WOLFPSOT[7] استفاده شد. توالی‌های به دست آمده از جستجوی ماسکوت در NCBI در این موتور بارگذاری و مکان احتمالی پروتئین‌ها مشخص شد. برای گروه‌بندی پروتئین‌های شناسایی شده از نظر عملکرد از روش طبقه‌بندی بیوان و همکاران (۷) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

برای بررسی الگوهای پروتئین‌های ناشناخته از ScanProsite، برای بررسی دومین‌های پروتئینی از InterProScan، برای بررسی تشابه از Blastp با الگوریتم PSI و برای همردیفی پروتئین هدف با پروتئین‌های مشابه از نرم‌افزار ClustalW استفاده شد.

نتایج و بحث

تغییر بیان پروتئین‌ها در شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا

بررسی الگوی تغییرات بیان پروتئین در برگ‌های گیاهان سالم و مبتلا در دو رقم کتول و گرگان ۳، به‌ترتیب منجر به شناسایی ۱۵۵ و ۱۴۳ لکه پروتئین به‌طور تکرارپذیر شدند (جدول ۱). از بین این پروتئین‌ها ۵ لکه در رقم کتول و ۱۱ لکه در رقم گرگان ۳ به طور معنی‌داری تغییر بیان داشتند (شکل ۱ و جدول ۱).

نقش پروتئین‌های دخیل در عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا

لکه پروتئینی (۶۶۰۳) در رقم کتول و (۵۶۰۲) در رقم گرگان ۳ تحت عنوان آنزیم زیر واحد بزرگ ریبولوز ۱-۵ بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز یا آنزیم رابیسکو (EC 4.1.1.39) مشهور است. رابیسکو یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های گیاهی است که مرحله اول تثبیت کربن در چرخه کلوین را انجام می‌دهد به طوری که در این چرخه پیش ماده دی اکسید کربن اتمسفری و ریبولوز ۱-۵ بیس فسفات به مولکول‌های غنی از انرژی مانند گلوکز تبدیل می‌گردد. افزایش بیان آنزیم رابیسکو تحت شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا حاکی از افزایش تثبیت کربن و تخمیر اکسیداتیو پیش مواد پنتوز در فرآیند تنفس نوری است به طوری که هر دوی این واکنش‌ها به طور همزمان و در رقابت بر سر یک جایگاه فعال مشابه آنزیم انجام می‌شود و این موضوع نشان از نقش حفاظتی و فعالیت بیشتر دستگاه تثبیت کربن دارد (۴۰). گیاهان سویا در اواخر مرحله رشد و توسعه حاوی مقادیر کمی از کلروپلاست بالغ هستند و در نتیجه فرآیندهای فتوسنتزی کمی را انجام می‌دهند. همچنین، فاز پیری با شروع زرد شدن برگ‌ها از طریق کاهش پلی‌زوم‌ها و ریبوزوم‌های کلروپلاستی از طریق تخریب و یا کاهش سنتز آن (۶)، کاهش پروتئین‌های برگ (غالبا رابیسکو) و انتقال مواد به اندام‌های در حال رشد (مخزن) آغاز می‌گردد (۴۳). اما گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا دارای برگ‌های سبز هستند که

1- Collision induced fragmentation
2- Linear ion trap
3- Lable
4- Induction Factor (IF)
5- Up-regulation
6- Down-regulation
7- http://wolfpsot.org

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

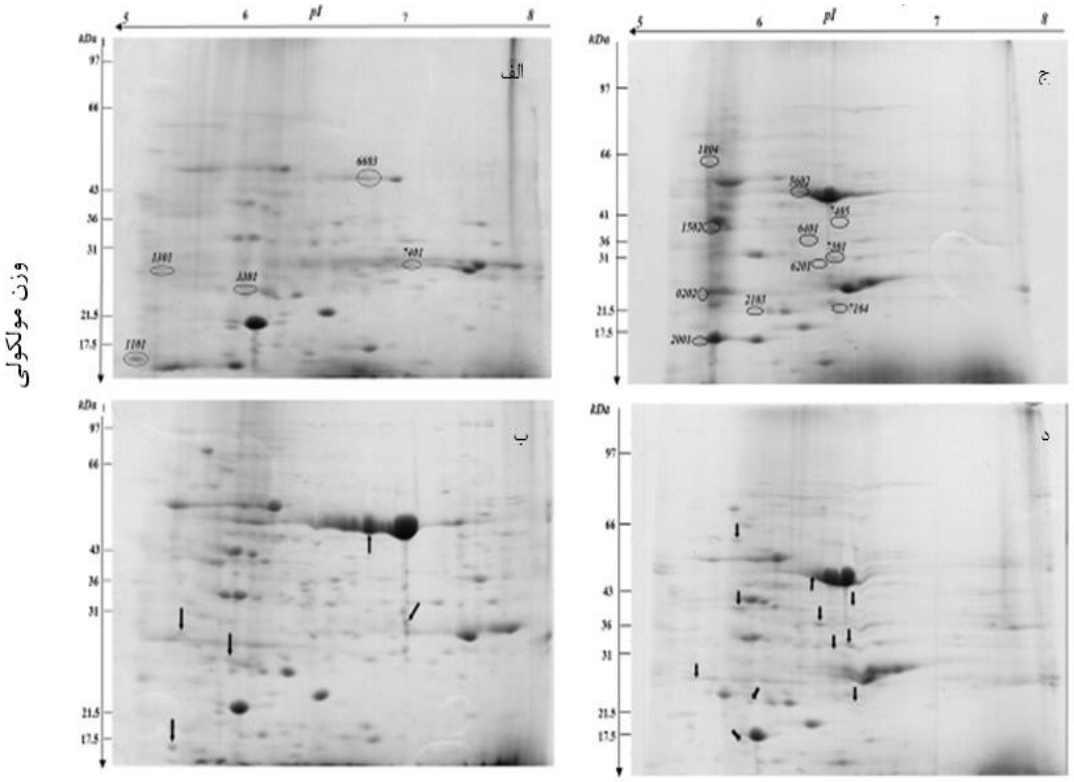
این نشان از عدم تخریب یا افزایش سنتز پروتئین‌های کلروپلاستی می‌باشد و از طرفی با توجه به افزایش بیان آنزیم رابیسکو به نظر می‌رسد فتوسنتز در این نوع گیاهان فعال باشد. اما، گیاهان سویای مبتلا به این عارضه نسبتا یا در حالات شدید بدون گل و غلاف بارور می‌باشند و در نتیجه مخزن کمی برای ذخیره‌سازی مواد فتوسنتزی تولید شده دارند. در نتیجه، این مواد در برگ‌ها و ساقه‌ها ذخیره می‌شوند و منجر به افزایش ماده خشک اندام هوایی می‌گردند و پیری گیاه را به تاخیر می‌اندازند. کرافتس–براندر و همکاران (۹) گزارش کردند که کاهش فعالیت و میزان کاهش آنزیم ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز[1] و مقدار کلروفیل در گیاهان گره‌زا که غلاف‌هایشان حذف شده بودند نسبت به گیاهان شاهد و نیز گیاهان غیره گره‌زا کمتر بود و رسیدگی در این گیاه ۱ تا ۲ هفته به تاخیر افتاد. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان غلاف‌زدایی شده نسبت به گیاهان شاهد کمتر است و این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد برگ‌های سبزتری دارند. ویتنبک (۴۷) یافت که حذف غلاف‌ها در مقایسه با تیمار شاهد (عدم حذف غلاف‌ها) منجر به حفظ کلروفیل و پروتئین‌ها توسط برگ‌ها شد. بنابراین او پیشنهاد کرد که ممکن است برگ‌های گیاهان غلاف‌زدایی شده که به عنوان منبع عمل می‌کنند به اندام ذخیره‌ای یا مخزن تبدیل شوند. ظاهرا، حذف غلاف تامین مواد فتوسنتزی به گره‌ها را افزایش می‌دهد و منجر به تحریک و نیز افزایش طول دوره فعالیت گره‌های تثبیت کننده ازت می‌گردد که به عنوان منبع نیتروژن برای اندام هوایی گیاه است. با توجه به این نکته که بیان آنزیم‌های دیگر چرخه کلوین تغییری نکرده است (جدول ۱ و شکل ۱) بنابراین با تولید مقادیر کافی از سوبسترا (RuBP) و وجود برگ‌های سبز و نیز شرایط رویشی مناسب و از طرفی با کاهش بیان رابیسکو اکتیواز و نقش غیر مستقیم حفاظتی آن بر آنزیم رابیسکو، آشکار است که بیان پروتئین رابیسکو افزایش پیدا خواهد کرد (۳۱) و منجر به تولید بیوماس بیشتر در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا شود. همچنین، اوزون (۱۵)، اشعه UV-B اتمسفر (۴۹) و کاهش بیان رابیسکو اکتیواز (۱۴) نیز بیان پروتئین زیر واحد بزرگ رابیسکو را افزایش داده است. از طرفی، به نظر می‌رسد که گیاه از مکانیسم‌های خاص و متعددی از جمله تجمع اسیمیلات‌ها، آنزیم رابیسکو اکتیواز، غلظت یون، قندهای فسفاته، نسبت ATP/ADP، غلظت فسفات، غلظت دی اکسید کربن، اکسیژن و نور برای کنترل فعالیت آنزیم ربیسکو استفاده می‌کند (۲۵).

لکه پروتئینی (۱۸۰۴) در رقم گرگان ۳ به عنوان زیر واحد آلفا پروتئین اتصال به زیر واحد بزرگ رابیسکو شناسایی شد که به طور معنی‌داری کاهش بیان داشت. این در حالی است که چنین تغییری در رقم کتول مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۱). پروتئین اتصال به زیر واحد رابیسکو (یا چاپرون‌های cpn60 کلروپلاستی که دارای زیر واحدهای آلفا و بتا هستند)، پروتئین‌ها را از عدم تاخوردگی یا تاخوردگی نسبی محافظت می‌کند و از این طریق باعث حلالیت بیشتر، فعالیت بهتر، عدم تجمع آنها در مکان سلولی و یا عدم شرکت در مسیرهای متابولیکی غیر مرتبط (که با تغییر خصوصیات فیزیکوشیمیایی رخ می‌دهد) دیگر جلوگیری می‌کند (۱۱). کاهش بیان این آنزیم نشان‌دهنده کنترل میزان فعالیت آنزیم رابیسکو به صورت کاهشی در رقم گرگان ۳ است و عدم تغییر بیان این پروتئین در رقم کتول حاکی از توانایی این رقم در تولید ماده خشک در واحد سطح تحت شرایط ابتلا به این عارضه می‌باشد.

لکه پروتئینی (۳۳۰۱) در رقم کتول و (۲۱۰۳) در رقم گرگان ۳ به عنوان پروتئین القاگر رهاسازی اکسیژن ۲ (OEE2) شناسایی شد که به صورت متمایز در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا به صورت کاهشی تغییر یافت (جدول ۱ و شکل ۱). آسیب به OEE2 در فتوسیستم II عموما در شرایط تنش خشکی (۲۲)، تنش حرارتی (۳) و تنش اوزون (۴) گزارش شده است. به نظر می‌رسد افزایش یا کاهش سطح برخی پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز در طی مدت تنش در جهت تعدیل سطح دی اکسید کربن برای حفظ نسبی فتوسنتز صورت می‌گیرد (۴۸). احتمالا کاهش فعالیت فتوسیستم II از طریق کاهش سطح OEE2 مکانیسم حفاظت‌کننده برای حفظ یکپارچگی تیلاکوئیدها در شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا باشد به طوری که کاهش در بیان پروتئین OEE2 با کاهش در میزان فعالیت فتوسنتزی در ارتباط است (۵) و این موضوع می‌تواند با تنظیم فعالیت رابیسکو در ارتباط باشد. در این آزمایش کاهش سطح OEE در هر دو رقم می‌تواند عامل اولیه برای صرفه جویی در مراحل بعدی تثبیت کربن و اولویت حفظ فرایندهای اولیه نظر سلامت غشاء باشد. ویلسون و همکاران (۴۶) با روش الکتروفورز دو بُعدی و MALDI/TOF پروتئوم پیری برگ در شبدر سفید را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که در زمان پیری برگ فراوانی پروتئین کمپلکس آزادسازی اکسیژن فتوسیستم II به طور معنی‌داری کاهش یافته است. در رقم گرگان ۳ لکه پروتئینی (۷۱۰۴) با عنوان آنزیم کربنیک آنهیدراز (EC 4.2.1.1) به صورت متمایز در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا به صورت کاهشی تغییر بیان یافت به طوری که در رقم کتول چنین تغییری مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۱) و این موضوع توانایی این رقم در انجام فتوسنتز و تولید کربوهیدرات‌های بیشتر تحت شرایط ابتلاء به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا را نشان می‌دهد. این آنزیم با تنظیم دی اکسید کربن درون کلروپلاست به افزایش کربوکسیلاسیون رابیسکو کمک می‌کند (۲۸). کربنیک آنهیدراز HCO_3^- تجمع یافته را به CO_2 تبدیل کرده و وارد چرخه کلوین می‌کند. نتیجه متابولیکی این فرآیند افزایش غلظت CO_2 تبدیل شده است و هزینه این سازگاری مصرف مقداری ATP اضافی برای افزایش غلظت CO_2 است. کاهش بیان آنزیم کربنیک آنهیدراز در رقم گرگان ۳ نشان از نقش این آنزیم در تنظیم فعالیت آنزیم رابیسکو دارد و عدم تغییر بیان این آنزیم در رقم کتول حاکی از توانایی این رقم در افزایش یا حفظ پتانسیل فتوسنتزی است.

1- Ribulose bisphosphate carboxylase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]



شکل ۱- الگوی پروتئوم گیاه سالم و مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا در رقم کتول و گرگان ۳ در مرحله زایشی R1.
الف: پروتئین‌های برگ گیاه سالم رقم کتول. ب: پروتئین‌های برگ گیاه مبتلا رقم کتول. ج: پروتئین‌های برگ گیاه سالم رقم گرگان ۳. د: پروتئین‌های برگ گیاه مبتلا رقم گرگان ۳. اعداد داخل شکل مربوط به شماره لکه‌های پروتئینی است. دایره‌ها موقعیت هر لکه در گیاهان سالم و فلش‌ها جهت تغییرات آنها در شرایط ابتلاء به عارضه اختلال به غلاف‌بندی را نشان می‌دهد. وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک بر اساس پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) نشان داده شده است.

Figure 1. Proteome patterns of PDS and non PDS of soybean cultivars Katul and Gorgan 3. A: Leaf proteins of non-PDS Katul. B: Leaf proteins of PDS -Katul. C: Leaf proteins of non- PDS Gorgan 3, and D: Leaf proteins of PDS- Gorgan 3. The circles indicate the proteins whose expression was altered in PDS plants. The upward and downward arrows display the increase and decrease of protein expression level, respectively. The molecular weight and isoelectric focusing was indicated based on standard protein (Bovine Serum Albumin)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

جدول ۱- مشخصات پروتئین‌های با بیان متمایز در رقم‌های سویای مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا
Table 1. Identification of proteins with different experission in soybean cultivars infected to pod distortion anomaly

رقم	شماره لکه	پروتئین همولوگ	شماره دسترسی[a]	امتیاز[b]	٪ همپوشانی[c]	pI-جرم آزمایش	pI-جرم تئوری		فاکتور القا (IF)[d]	نقش[e]	مکان[f]
کتول	۶۶۰۳	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	R9RPL1	۶۵۳/۷۹	۴۴/۸۴	۶/۸۶ - ۴۵/۵۳	۶/۴۳- ۵۲/۶	↑	۶/۱۱۹	انرژی	کلروپلاست
	۷۴۰۱	Uncharacterized protein	I1KJJ8	۲۹/۸۹	۱۸/۸	۷/۰۶ - ۲۷/۸۵	۸/۰۶ - ۳۳/۲	↓	۰/۱۴۶	سنتز پروتئین	سیتوپلاسم
	۱۳۰۱	14-3-3- like protein	A0A0B2QJ68	۴۹/۱۶	۴۴/۴۰	۵/۷۶ - ۲۶/۴۶	۴/۷۵ - ۲۹/۱	↓	۰/۱۹۹	انتقال سیگنال	هسته- پلاستید
	۳۳۰۱	Oxygen-evolving enhancer protein 2	A0A0B2R4F3	۲۳/۶۴	۳۲/۴۵	۷/۸۷ - ۲۸/۴	۶/۰۵ - ۲۳/۰۵	↓	۰/۴۸۷	انرژی	کلروپلاست
	۱۱۰۱	Uncharacterized protein	I1JYG8	۳۶/۲۷	۴۳/۳۸	۵/۷۱ - ۱۴/۷۲	۵/۱۵ - ۱۴/۸	↓	۰/۳۲۸	نامشخص	میتوکندری
گرگان ۳	۱۸۰۴	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	A0A0B2NTV4	۱۵۰/۶۷	۶۱/۲	۵/۷۹ - ۶۳/۸۲	۵/۴ - ۶۱/۷	↓	۰/۳۷۷	انرژی	کلروپلاست
	۵۶۰۲	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	R9RPL1	۳۸۰/۵	۴۵/۲۶	۶/۲۵ - ۵۱/۱۲	۶/۴۳ - ۵۲/۶	↑	۴/۴۷۲	انرژی	کلروپلاست
	۱۵۰۲	Rubisco activase	D4N5G3	۲۸۰/۲۰	۵۱/۲۴	۵/۸۱ - ۴۰/۲۲	۶/۶۵ - ۴۸/۶	↓	۰/۴۵۳	متابولیسم	کلروپلاست
	۷۴۰۵	Glutamate dehydrogenase	Q5F2M9	۴۱/۰۷	۲۳/۱۱	۶/۵۳ - ۴۰/۸	۶/۴۷ - ۴۴/۵	↓	۰/۲۶۱	متابولیسم	سیتوپلاسم
	۶۴۰۱	Malate dehydrogenase	A0A0B2NT30	۱۶۶/۶۶	۴۵/۱۸	۶/۳۲ - ۳۶/۱۴	۶/۳۰ - ۳۵/۴	↓	۰/۵۷۹	متابولیسم	سیتوپلاسم
	۷۳۰۱	Uncharacterized protein	I1MQN7	۶۸/۶۸	۴۷/۵۲	۶/۵۱ - ۳۱/۴۲	۶/۸۰ - ۳۶/۱۰	↓	۰/۴۴۹	نامشخص	سیتوپلاسم
	۶۲۰۱	Stem 31 kDa glycoprotein	A0A0B2RJ79	۳۸/۷۹	۳۵/۵۶	۶/۴۱ - ۲۸/۹۴	۶/۴۳ - ۲۶	↓	۰/۱۰۵	تقسط و ذخیره پروتئین	سیتوپلاسم
	۰۲۰۲	14-3-3- like protein	A0A0B2QZ56	۵۶/۸۶	۴۸/۶۴	۵/۵۱ - ۲۵/۰۳	۴/۷۵ - ۲۹	↓	۰/۳۲۷	انتقال سیگنال	پلاستید
	۲۱۰۳	Oxygen-evolving enhancer protein 2	A0A0B2NW14	۶۳/۵۷	۲۵/۱۹	۵/۸۷ - ۲۱/۴۱	۷/۴۴ - ۲۸/۲	↓	۰/۲۷۰	انرژی	کلروپلاست
	۷۱۰۴	Carbonic anhydrase	I1N5Q8	۲۸/۳۶	۳۲/۹۸	۶/۵۵ - ۲۱/۲۲	۶/۵۴ - ۲۸/۱۰	↓	۰/۲۰۶	انرژی	سیتوپلاسم
	۲۰۰۱	Uncharacterized protein	I1JYG8	۳۶/۲۷	۴۳/۳۸	۵/۸۲ - ۱۶/۳۷	۵/۱۵ - ۱۴/۸	↓	۰/۲۵۱	نامشخص	میتوکندری

a: شماره دسترسی در پایگاه داده‌های پروتئین UniProt؛ b: امتیاز حاصل از جستجوگر سکوئست؛ c: درصد همپوشانی بین قطعات پپتیدی نمونه با قطعات موجود در پایگاه داده؛ d: سطح احتمال محاسبه شده در مقایسه تغییرات حجم لکه‌ها در گیاهان سالم و مبتلا از طریق آزمون t استیودنت؛ e: نقش پیش‌بینی شده بر اساس گروه‌بندی بیون و همکاران (۷) ؛ f: محل درون سلولی بر اساس پیش‌بینی با WOLFPSORT

لکه پروتئینی شماره (۱۵۰۲) مربوط به آنزیم رابیسکو اکتیواز است که تنها در پروتئوم مربوط به رقم گرگان ۳ مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱) اما عدم تغییر بیان این پروتئین در گیاه مبتلا به عارضه اختلال در رقم کتول نشان از پتانسیل بالقوه این رقم در فتوسنتز و تولید انرژی دارد. در این آزمایش، کاهش بیان آنزیم رابیسکو اکتیواز با افزایش بیان آنزیم رابیسکو بدون تغییر در سایر آنزیم‌های درگیر در چرخه کربس مشاهده شد. وظیفه اصلی رابیسکو اکتیواز فعال کردن و تنظیم فعالیت رابیسکو از طریق فراهم کردن زمینه برای کاربامیلاسیون آنزیم و کربوکسیلاسیون بیس فسفات می‌باشد. افزایش بیان پروتئین ATPase_AAA_core که دارای فعالیت پروتئولیزی می‌باشد منجر به تسریع فرایند پیری می‌شود (۴۶). وجود دومین ATPase_AAA_core در این پروتئین و نیز کاهش بیان آن، ممکن است که یکی از دلایل عدم تخریب پروتئین‌های کلروپلاستی و در نتیجه تظاهر صفت سبز ماندن در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا باشد. از طرفی، یافته‌های ما با نتایج فوکایاما و همکاران (۱۵) مطابقت دارد به طوری که نامبردگان گزارش کردند که کاهش بیان رابیسکو اکتیواز منجر به افزایش بیان آنزیم رابیسکو شده است و بالعکس بیان زیاد آنزیم رابیسکو اکتیواز منجر به کاهش مقدار آنزیم رابیسکو شده است در حالی که کاهش بیان رابیسکو اکتیواز تاثیری بر بیان آنزیم‌های دیگر چرخه کلوین نداشته است. همچنین، کاهش میزان بیان رابیسکو اکتیواز در گیاه مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی ممکن است با کاهش هدایت روزنه‌ای و در نتیجه کاهش غلظت CO_2 مزوفیلی و نهایتا کاهش فعالیت رابیسکو از طریق دکاربامیلاسیون آن همراه باشد (۲۸) و این موضوع نشانگر اثر عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا بر دستگاه فتوسنتزی است.

لکه پروتئینی شماره (۷۴۰۵) در رقم گرگان ۳ مربوط به آنزیم گلوتامات دهیدروژناز می‌باشد که بیان آن در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که این لکه پروتئینی در رقم کتول وجود نداشت (جدول ۱ و شکل ۱). گلوتامات

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

دهیدروژناز واکنش تبدیل ۲ اگسوگلوتارات و ال–گلوتامات را کاتالیز می‌کند و به عنوان گیرنده و دهنده نیتروژن ایفای نقش می‌کند و نقش مهمی در سنتز اوره، متابولیسم واسطه‌ای اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها دارد (۲۴). کاهش بیان گلوتامات دهیدروژناز حاکی از کاهش آمین‌زدایی اسید آمینه گلوتامین است (۱۳). بنابراین، مقادیر ۲–اگزوگلوتارات در گیاه مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی کاهش خواهد یافت. در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربن کاهش می‌یابد و این موضوع نشان‌دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم گرگان ۳ است. در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا بیوماس بیشتری نسبت به گیاهان شاهد وجود دارد به طوری که تجمع بیوماس ناشی افزایش کربوهیدرات‌ها در گیاه است و در نتیجه ممکن است این کربوهیدرات‌ها منجر به کاهش بیان آنزیم گلوتامات دهیدروژناز شده باشد و از این طریق پیری گیاه را به تاخیر انداخته باشد.

لکه پروتئینی شماره (۶۴۰۱) در رقم گرگان ۳ به عنوان آنزیم مالات دهیدروژناز شناسایی شد که در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا کاهش بیان داشت این در حالی است که در رقم کتول چنین تغییراتی مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۱). مالات دهیدروژناز یکی از آنزیم‌های چرخه کربس می‌باشد و مالات یکی از فرآورده‌های نهایی گلیکولیز است. کاهش سطح مالات دهیدروژناز سیتوسولی در رقم گرگان ۳ نشان می‌دهد که در شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا مسیر تولید پیروات فعال‌تر است و تولید مالات از طریق احیای اگزالواستات کاهش می‌یابد. کاهش بیان مالات دهیدروژناز حاکی از کاهش تبدیل مالات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲–اگزوگلوتارات در گیاه مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲–اگزوگلوتارات و مالات میزان جریان چرخه کربس را محدود خواهد کرد و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربن کاهش می‌یابد و این موضوع نشان‌دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم گرگان ۳ است. در این آزمایش کاهش بیان آنزیم مالات دهیدروژناز با افزایش بیان آنزیم رابیسکو و نیز افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی مشاهده شد به‌طوری که این نتایج با نتایج نانس–نسی و همکاران (۲۹) مطابقت دارد به طوری که آنها گزارش کردند که در گیاهان گوجه فرنگی تراریخت با کاهش بیان آنزیم مالات دهیدروژناز، میزان کارایی فتوسنتزی و رشد اندام هوایی افزایش یافته و از طرفی مقدار تنفس به مقدار قابل توجه‌ای کاهش یافته است. لکه پروتئینی شماره (۶۲۰۱) در رقم گرگان ۳ تحت شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا تغییر بیان معنی‌داری نشان داد این در حالی است که در رقم کتول چنین تغییراتی مشاهده نشد. این لکه¬های پروتئینی گلیکوپروتئین ۳۱ کیلودالتونی ساقه‌ای شناسایی شد (جدول ۱ و شکل ۱). این گروه از پروتئین‌ها ۹ درصد از پروتئین‌ها را شامل می‌شوند که همه آنها کاهش بیان داشتند (شکل ۱). پروتئین‌های ذخیره‌ای رویشی یا گلیکوپروتئین‌ها که گلیکوپروتئین ۳۱ کیلودالتونی ساقه‌ای یکی از این پروتئین‌هایی است که اولین بار به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای برگی در گیاهان سویا غلاف‌زدایی شده مشاهده شد و دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می‌باشد (۲۶). این پروتئین‌ها نه تنها به عنوان مخزن رویشی برای ذخیره‌سازی موقت کربن و نیتروژن ایفای نقش می‌کنند بلکه نقش مهمی در تغذیه و سازگاری به تنش‌ها در مدت رشد و توسعه گیاه دارد (۴۱). این پروتئین می‌تواند در ترمیم غشاء آسیب دیده در اثر تنش‌های مختلف نقش داشته باشد و در نتیجه این گونه از ارقام سویا نمی‌توانند به طور مناسب پاسخ مناسبی در برابر تنش‌های مختلف نشان دهند (۱). در گیاهان گرگان ۳ مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا به علت عدم وجود غلاف و یا غلاف‌های بسیار کم و عقیم، به نظر می‌رسد که انتقال مجدد در این گیاهان فعال نیست و یا بسیار کم است و در نتیجه ممکن است پروتئین‌های ذخیره‌ای اندام‌ها تجزیه و منتقل نشده و احتمالا عدم نیاز به این پروتئین‌ها منجر به کاهش بیان ژن و در نتیجه بیان پروتئین در این گیاهان گردد. علاوه بر این، رقم گرگان ۳ دارای تیپ رشد محدود است یعنی پس از گلدهی رشد رویشی در این گیاه اتفاق نمی‌افتد و با ریزش اندام زایشی رشد رویشی القا نشده یا بسیار کم است. در نتیجه، مخزن جدیدی برای منابع پروتئینی ذخیره شده در این رقم وجود نخواهد داشت. عدم تغییر بیان این پروتئین در رقم کتول نشان از عملکرد طبیعی این پروتئین در این گیاه دارد. یکی از دلایل احتمالی دیگر عدم تغییر در بیان این پروتئین در رقم کتول با نحوه رشد گیاه در ارتباط می‌باشد به طوری که رقم کتول دارای تیپ رشد نیمه محدود است. یعنی این رقم پس از گلدهی و یا ریزش اندام زایشی می‌تواند جهت جبران اندام‌های زایشی از دست رفته رشد رویشی خود را ادامه دهد و پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در ساقه‌ها را به مخازن جدید از جمله برگ‌ها، گل‌ها و غلاف‌های جدید انتقال دهد.

لکه‌های پروتئینی شماره (۰۲۰۲) در رقم گرگان ۳ و (۱۳۰۱) در رقم کتول تحت شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا تغییر بیان معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱ و شکل ۱). این لکه‌های پروتئینی 14-3-3 like protein شناسایی شدند که کاهش بیان معنی‌داری داشتند. همانگونه که بیان شد پروتئین 14-3-3 like protein خانواده‌ای از مولکول‌های تنظیم‌کننده محافظت شده هستند که در سلول‌های همه یوکاریوت‌ها بیان می‌شوند. این پروتئین‌ها به طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های مرتبط با سیگنال‌دهی آبشاری از جمله کینازها، فسفاتازها و گیرنده‌های تراغشایی متصل می‌شوند (۳۴). طیف عمل این پروتئین با بسیاری از پروتئین‌های دیگر نشان از نقش مهم آنها در طیف گسترده‌ای از فرایندهای تنظیمی حیاتی از قبیل انتقال سیگنال تنش از طریق عمل فعال‌گری و سرکوب‌گری، خاصیت چاپرونی و سازگار کنندگی‌شان (۴۲)؛ انتقال سیگنال میتوژنی، مرگ سلول آپوپتیک و کنترل چرخه سلولی است (۳۰)، پر شدن دانه (۱۶)، تغییر وضعیت تحمل به تنش خشکی (۴۲)، بیوسنتز اتیلن (۵۱)، تنظیم فعالیت فسفو پروتئین ۲ (۴۵) و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

توسعه گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نقش مهمی داشته باشند (۳۵). از آنجایی که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی دارند، ممکن است وجود آنها در مدت پر شدن دانه ضروری باشد (۱۶) و ممکن است کاهش بیان این پروتئین به طریق ناشناخته‌ای منجر به عدم توسعه دانه در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا گردد. به طور کلی در این مطالعه، تغییر بیان 14-3-3-like protein ممکن است به طرق مختلف و ناشناخته فعالیت ATPase غشاء پلاسمایی، محرک‌های سیگنال‌دهی، رشد سلول و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق منجر به ایجاد عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا گردد. با توجه به تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی ویژگی‌های لکه‌های پروتئینی (۱۱۰۱) در رقم کتول و (۲۰۰۱) در رقم گرگان ۳ که دارای کاهش بیان معنی‌دار بودند که با استفاده از BLASTp و ClustalW تحت عنوان NACA شناسایی شدند. پروتئین NAC نه تنها نقش مهمی در سقط جنین دارد بلکه در فرایندهای وابسته به پروتئولیز نقش مهمی ایفا می‌کند (۳۷). در این مطالعه، احتمالا یکی از دلایل ناهنجاری ایجاد شده در گل و غلاف و نیز تاخیر در رسیدگی یا عدم پیری گیاه در گیاهان مبتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی سویا با کاهش بیان پروتئین NACA در هر دو رقم باشد به گونه‌ای که تغییر در اندام گل و افزایش پیری برگ‌ها با افزایش بیان ژن‌های NACA توسط محققین مختلفی گزارش شده است. به‌علاوه، تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی منجر به شناسایی خصوصیات لکه پروتئینی (۷۳۰۱) در رقم گرگان ۳ و (۷۴۰۱) در رقم کتول شد که تحت شرایط ابتلا به عارضه اختلال در غلاف‌بندی کاهش بیان داشتند (جدول ۱ و شکل ۱). این لکه پروتئینی به‌ترتیب تحت عنوان methylecgonone reductase (مشارکت در بیوسنتز کاکوئین) و ۵۰ S ribosomal protein L4 (مشارکت در سنتز پروتئین‌ها) شناسایی شدند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری تخصصی در رشته بیوتکنولوژی گیاهی-کشاورزی دانشگاه تبریز می‌باشد. از مسئولین دانشگاه تبریز جهت فراهم‌آوری امکانات آزمایشگاهی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Aghaei, K., A.A. Ehsanpour, A.H. Shah and S. Komatsu. 2009. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. Amino Acids, 36: 91-98.
2. Ahmadi, K., H.R. Abadzadeh, F. Hatami, H. Abdshah and A. Kazemian. 2020. Agricultural statistics of 2018-19: Crop plants (Section 1). Ministry of Agriculture Jihad, Vice President of Plan and Budget, Departement of Statistics and Information, (1): 92 (In Persian).
3. Ahsan, N., T. Donnart, M.Z.Z. Nouri and S. Komatsu. 2010. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. Journal Proteome Research, 9(8): 4189-4204.
4. Ahsan, N., Y. Nanjo, H. Sawada, Y. Kohno and S. Komatsu. 2010. Ozone stress- induced proteomic changes in leaf total soluble and chloroplast proteins of soybean reveal that carbon allocation is involved in adaptation in the early developmental stage. Proteomics, 10(14): 2605-2619.
5. Bahrman, N., J. Le Gouis, L. Negroni, L. Amilhat, P. Leroy, A.A.L. Lainé and O. Jaminon. 2004. Differential protein expression assessed by two-dimensional gel electrophoresis for two wheat varieties grown at four nitrogen levels. Proteomics, 4(3): 709-719.
6. Baker, N.R. and H.C. Thomas. 2013. Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants. Elsiver press, 471 p.
7. Bevan, M., I. Bancroft, E. Bent, K. Love, H. Goodman, C. Dean, R. Bergkamp, W. Dirkse, M. Van Staveren, W. Stiekema, L. Drost, P. Ridley, S.A. Hudson, K. Patel, G. Murphy, P. Piffanelli, H. Wedler, E. Wedler, R. Wambutt, T. Weitzenegger, T.M. Pohl, N. Terryn, J. Gielen, R. Villarroel, R. De Clerck, M. Van Montagu, A. Lecharny, S. Auborg, I. Gy, M. Kreis, N. Lao, T. Kavanagh, S. Hempel, P. Kotter, K.D. Entian, M. Rieger, M. Schaeffer, B. Funk, S. Mueller-Auer, M. Silvey, R. James, A. Montfort, A. Pons, P. Puigdomenech, A. Douka, E. Voukelatou, D. Milioni, P. Hatzopoulos, E. Piravandi, B. Obermaier, H. Hilbert, A. Düsterhöft, T. Moores, J.D. Jones, T. Eneva, K. Palme, V. Benes, S. Rechman, W. Ansorge, R. Cooke, C. Berger, M. Delseny, M. Voet, G. Volckaert, H.W. Mewes, S. Klosterman, C. Schueller and N. Chalwatzis. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana. Nature, 391(6666): 485-488.
8. Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye biding. Annuals of Biochemistry, 72: 248.
9. Crafts-Brandner, S.J., F.E. Below, J.E. Harper, R.H. Hageman and U. States. 1984. Effects of pod removal on metabolism and senescence of nodulating and nonnodulating soybean isolines II. Enzymes and Chlorophyll. Plant physiology, 75(2): 311-317.
10. Damerval, C. and M. Zivy. 1986. Technical improvements in two-dimensional electro- phoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, 7: 52-54.
11. Ellis, R.J. 2006. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. Trends in Biochemical Sciences, 31(7): 395-401.
12. FAOSTAT. 2022. Food and Agriculture Organization Crop Production Statistics: World sorghum production and utilization.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

13. Fontaine, J.X., T. Tercé-Laforgue, P. Armengaud, G. Clément, J.P. Renou, S. Pelletier, M. Catterou, M. Azzopardi, Y. Gibon and P.J. Lea. 2012. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of Arabidopsis demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. The Plant Cell, 24(10): 4044-4065.
14. Fukayama, H., C. Ueguchi, K. Nishikawa, N. Katoh, C. Ishikawa, C. Masumoto, T. Hatanaka and S. Misoo. 2012. Overexpression of Rubisco activase decreases the photosynthetic CO2 assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. Plant Cell Physiolgy, 53(6): 976-986.
15. Galant, A., R.P. Koester, E.A. Ainsworth, L.M. Hicks and J.M. Jez. 2012. From climate change to molecular response: redox proteomics of ozone-induced responses in soybean. New Phytologist, 194: 220-229.
16. Hajduch, M., A. Ganapathy, J.W. Stein and J.J. Thelen. 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. Plant Physiology, 137(4): 1397-1419.
17. Harbach, C., S. Chawla, C.R. Bowen, C.B. Hill, E.D. Nafziger and G.L. Hartman. 2016. Association of green stem disorder with agronomic traits in soybean. Agronomy Journal, 108(6): 2263-2268.
18. Harbach, C.J., T.W. Allen, C.R. Bowen, J.A. Davis, C.B. Hill, M. Leitman, B.R. Leonard, D.S. Mueller, G.B. Padgett, X.A. Phillips, R.W. Schneider, E.J. Sikora, A.K. Singh and G.L. Hartman. 2016. Delayed senescence in soybean: Terminology, research update, and survey results from growers. Plant Health Progress, 17(2): 76-83.
19. Hill, C.B., G.L. Hartman, R. Esgar and H.A. Hobbs. 2006. Field evaluation of green stem disorder in soybean cultivars. Crop Science, 46(2): 879-885.
20. Hill, C.B.B., C.R.R. Bowen, G.L.L. Hartman, C. Sciences, C.R.R. Bowen and U. States. 2013. Effect of fungicide application and cultivar on soybean green stem disorder. Plant Disease, 97(9): 1212-1220.
21. Isobe, K., K. Ozaki, K. Saito, D. Hatoya, M. Higo, K. Isobe, K. Ozaki, K. Saito, D. Hatoya, M. Higo and Y. Torigoe. 2015. Varietal difference in the occurrence of delayed stem senescence and cytokinin level in the xylem exudate in soybeans. Plant Production Science, 18(3): 356-364.
22. Kottapalli, K.R., R. Rakwal, J. Shibato, G. Burow, D. Tissue, J. Burke, N. Puppala, M. Burow and P. Payton. 2009. Physiology and proteomics of the water- deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. Plant, Cell and Environment, 32(4): 380-407.
23. Leonard, B.R., D.J. Boquet, B. Padgett, S.R. DavisJA, J.L. Griffin, R.A. Valverde, R.J. Levy Jr, J.A. Davis, R. Schneider, J.L. Griffin, R.A. Valverde and J.J. Ronald Levy. 2011. Soybean green plant malady: Contributing factors and mitigation. Louisiana Agriculture, 54(2): 32-34.
24. Liu, J., Y.H. Wu, J.J. Yang, Y.D. Liu and F.F. Shen. 2008. Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. Journal of Plant Biology, 51(1): 11-19.
25. Masclaux, C., M.H.H. Valadier, N. Brugière, J.F.F. Morot-Gaudry, B. Hirel, Â. Masclaux, Á. Valadier, N. Brugie, Ë. Morot-gaudry, B. Hirel, C. Masclaux, M.H.H. Valadier, N. Brugière, J.F.F. Morot-Gaudry and B. Hirel. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. Planta, 211(4): 510-518.
26. Mason, H.S., F.D. Guerrero, J.S. Boyer and J.E. Mullet. 1988. Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of darkgrown soybean seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. Plant Molecular Bology, 11: 845-856.
27. Masoudi, B. 2021. Screening of soybean genotypes at seedling stage under salinity stress. Journal of Crop Breeding, 13(38): 124-137 (In Persian).
28. Merewitz, E.B., T. Gianfagna and B. Huang. 2011. Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. Journal of Experimental Botany, 62(15): 5311-5333.
29. Nunes-nesi, A., F. Carrari, A. Lytovchenko, A.M.O. Smith, M.E. Loureiro, R.G. Ratcliffe, L.J. Sweetlove, A.R. Fernie, M. Pflanzenphysiologie and A.N. Germany. 2005. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. Plant Physiology, 137(2): 611-622.
30. Obsil, T. and V. Obsilova. 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. Seminars in Cell Developemental Biology, 22(7): 663-672.
31. Parry, M.A.J., A.J. Keys, P.J. Madgwick, A.E. Carmo-Silva and P.J. Andralojc. 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. Journal of Experimental Botany, 59(7): 1569-1580.
32. Payghamzadeh, K. 2016. Investigation of soybean pod distortion syndrome by proteomics and bioinformatics approaches. PhD thesis, Tabriz University, Tabriz, Iran, 146 pp (In Persian).
33. Phillips, X.A., A.K. Singh, Y.R. Kandel and D.S. Mueller. 2017. Effect of pod removal, foliar fungicides, and cultivar on green stem disorder of soybean. Agronomy Journal, 109(6): 2680-2688.
34. Purwestri, Y.A., Y. Ogaki, S. Tamaki, H. Tsuji and K. Shimamoto. 2009. The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. Plant Cell Physiolgy, 50(3): 429-438.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

35. Radwan, O., X. Wu, M. Govindarajulu, M. Libault, D.J. Neece, M.H. Oh, R.H. Berg, G. Stacey, C.G. Taylor and S.C. Huber. 2012. 14-3-3 proteins SGF14c and SGF14l play critical roles during soybean nodulation. Plant Physiology, 160(4): 2125-2136.
36. Rahi, A.R., H.N. Zarini, G. Ranjbar and M. Ghajar Spanlo. 2019. Evaluation of tolerance of some soybean senotypes to srought stress. Journal of Crop Breeding, 11 (32): 11-115 (In Persian).
37. Rospert, S., Y. Dubaquie, M. Gautschi, Y. Dubaquié and M. Gautschi. 2002. Nascent-polypeptide-associated complex. Cellular and Mollecular Life Science, 59(10): 1632-1639.
38. SAS Institute. 1997. SAS/STAT. Usersguid. [Version 6.12]. Cary, NC, SAS Inst.
39. Schneider, R., G. Padgett, D. Boquet and R. Valverde. 2010. Factors affecting the development of the green stem malady in soybean. In: Phytopathology Proceeding. S115 p.
40. Sengupta, S. and A.L. Majumder. 2009. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, Porteresia coarctata: a physiological and proteomic approach. Planta, 229(4): 911-929.
41. Sözen, E. 2004. Vegetative storage proteins in plants. Anadolu University Journal of Science and Technology, 5 (1): 1-7.
42. Sun, X., X. Luo, M. Sun, C. Chen, X. Ding, X. Wang, S. Yang, Q. Yu, B. Jia, W. Ji, H. Cai and Y. Zhu. 2014. A *Glycine soja* 14-3-3 protein GsGF14o participates in stomatal and root hair development and drought tolerance in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiolgy, 55(1): 99-118.
43. Thomas, H. 2013. Senescence, ageing and death of the whole plant. New Phytologist, 197(3): 696-711.
44. Toorchi, M., K. Yukawa, M.Z.Z. Nouri and S. Komatsu. 2009. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. Peptides, 30(12): 2108-2117.
45. Tseng, T.S., C. Whippo, R.P. Hangarter and W.R. Briggs. 2012. The role of a 14-3-3 protein in stomatal opening mediated by PHOT2 in Arabidopsis. The Plant Cell., 24(3): 1114-1126.
46. Wilson, K.A., M.T. McManus, M.E.M.E. Gordon and T.W.W. Jordan. 2002. The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). Proteomics, 2(9): 1114-1122.
47. Wittenback, W.A. 1983. Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field-grown soybeans. Plant Physiology, 73(1): 121-124.
48. Xiao, X., F. Yang, S. Zhang, H. Korpelainen and C. Li. 2009. Physiological and proteomic responses of two contrasting Populus cathayana populations to drought stress. Physiologia Plantarum, 136(2): 150-168.
49. Xu, C., J.H. Sullivan, W.M. Garrett, T.J. Caperna, S. Natarajan and J.H. Sullivan. 2008. Impact of solar Ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. Phytochemistry, 69: 38-48.
50. Yamada, T., S. Shimada, M. Hajika, K. Hirata, K. Takahashi, T. Nagaya, H. Hamaguchi, T. Maekawa, T. Sayama, T. Hayashi, M. Ishimoto and J. Tanaka. 2014. Major QTLs associated with green stem disorder insensitivity of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Breeding Science, 64(4): 331-338.
51. Yoon, G.M. and J.J. Kieber. 2013. 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in Arabidopsis. The Plant Cell, 25(3): 1016-1028.
52. Zanzarin, D.M., C.P. Hernandes, L.M. Leme, E. Silva, C. Porto, R. Martin do Prado, M.C. Meyer, L. Favoreto, E. de O. Nunes and E.J. Pilau. 2020. Metabolomics of soybean green stem and foliar retention (GSFR) disease using mass spectrometry and molecular networking. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 34(S3): 1-8.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

Investigation of Soybean Pod Distortion Anomaly by Proteomics and Bioinformatics Approaches

Kamal Payghamzadeh[1], Mahmood Toorchi[2] and Zahra Sadat Shobbar[3]

1- Horticulture Crops Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran, (Corresponding author: k.peyghamzade@areeo.ac.ir)
2- Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Received: 15 August, 2021 Accepted: 22 November, 2021

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1401.14.42.13.6]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.127]

Extended Abstract

Introduction and Objective: Pod distortion anomaly (PDA) is a particular type of growth along with flower and pod abnormality in that soybean plants remain green long after pod maturation which caused significantly yield reduction. To identification of proteins that involved in soybean pod distortion anomaly incidence, the proteins expression profiles of PDA and non-PDA soybean cultivars viz. Katul and Gorgan 3 were compared via proteomics and bioinformatics approaches.

Material and Methods: Therefore, leaf samples of two cultivars were collected at flowering growth stage and subjected to protein extraction using TCA/acetone extraction method. Protein separation and comparative analysis was performed using two-dimensional gel electrophoresis and nESI-LC-MS/MS mass spectrometery, respectively.

Results: The 2-DE analysis revealed that 5 out of 155 protein spots in Katul and 11 out of 143 protein spots in Gorgan 3 had significantly different expression levels in PDA and non-PDA plants. The differential analysis of significantly expressed spots by nESI-LC-MS/MS showed that most of these protein had already been discovered to regulate cellular activities as diverse as energy production, metabolism, signal transduction, gene transcription and translation as well as protein destination and storage.

Conclusion: Taken together, it is possible that 14-3-3 like protein, OEE2, ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunite and NACA proteins are among the most important regulators of pod distortion anomaly incidence.

Keywords: Cell proteolysis, Green-stay phenotype, Mass spectrometery, Rubisco, Soybean proteome, Two dimentional gel electrophoresis