دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تغییرات الگوی پروتئوم برگ گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) تحت تنش شوری با استفاده از الکتروفورز دوبعدی

علی اصغر حاتم نیا[۱]، رضا درویش‌زاده[۲،۳]، ناصر عباس‌پور[۴]، فاطمه رحمانی[۴]، سید رضا علوی[۵] و فرزاد بنایی[۶]

۱- استادیار، دانشکده علوم دانشگاه ایلام
۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
۳- استاد، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه
۴- دانشیار، دانشکده علوم دانشگاه ارومیه
۵- محقق مرکز تحقیقات توتون ارومیه
۶- دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۴/۲۳

چکیده

برای بررسی واکنش گیاه توتون به تنش شوری، آنالیز مقایسه‌ای پروتئوم برگ ژنوتیپ Basma S. 31 انجام گرفت. گیاهان به مدت ۱۲ روز در معرض سطوح شوری صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در کشت هیدروپونیک قرار گرفتند. پروتئین برگ استخراج شده و به وسیله الکتروفورز دوبعدی جداسازی شد. وزن تر و همچنین طول اندام هوایی در ژنوتیپ مورد مطالعه با افزایش سطح شوری کاهش نشان داد. تحت تنش شوری تعداد ۱۹ لکه پروتئینی (از ٤٦٨ لکه شناسایی شده) دارای بیان متفاوتی بودند. در حالی‌که سطوح برخی از پروتئین‌ها به وسیله تیمار شوری کاهش یافت، اما افزایش انباشتگی تعدادی از پروتئین‌ها نیز مشاهده شد. در ژنوتیپ مورد مطالعه تعداد لکه‌های پروتئینی که در برگ افزایش بیان داشتند بیشتر از تعداد لکه‌های پروتئینی بود که کاهش بیان داشتند (به ترتیب ۱۰ و ۹ لکه پروتئینی). نتایج نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین افزایش بیان مربوط به لکه‌های ١٦ و ۷ به ترتیب با ٦/١ و ١/٤٨ برابر افزایش بیان، می‌باشد. همچنین بیشترین کاهش بیان در بین لکه‌ها مربوط به لکه پروتئینی ۱۸ با ٤/٤ برابر کاهش بیان، می‌باشد. شوری یک پدیده پیچیده می‌باشد که تنها سبب اثرات اسمزی و سمی یونی نمی‌شود، بلکه سبب بهم خوردن تعادل مواد غذایی و متابولیسم نیز می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد گیاه توتون با تغییر در سطح بیان پروتئین‌های مختلف می‌تواند شرایط تنش را تا حدودی تحمل کند، به‌طوری‌که گمان می‌رود افزایش بیان پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین که به احتمال زیاد پروتئین‌های تنظیم‌کننده فعالیت سلولی هستند، در تحمل تنش شوری موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز دوبعدی، پروتئوم، تنش شوری، تحمل‌پذیری، لکه پروتئین

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی است یکساله، بهاره و متعلق به خانواده سولاناسه می‌باشد. این گیاه دارای یک ریشه اصلی عمیق است که از آن انشعابات جانبی زیادی تولید می‌گردد (۷). تنش شوری شایع‌ترین تنش زیستی در گیاهان می‌باشد (۱۳،۱۹). مهار رشد رویشی اولین و مهم‌ترین پاسخ به شوری بوده که توسط مطالعات فراوانی ذکر شده است (۲۱). از آنجایی که گیاهان نمی‌توانند از تنش‌های غیر زیستی فرار کنند، راهکارهای متفاوتی را در طول تکامل جهت سازگاری با شرایط محیطی متغیر در خود توسعه داده‌اند تا از این طریق با تنش به مقابله برخاسته و اثرات تنش را به حداقل برسانند. سازگاری گیاهان به تنش شامل دریافت و درک تنش، انتقال سیگنال‌های تنش و در آخر پاسخ گیاه به تنش می‌باشد.

تنش شوری یک مشکل جدی و در حال افزایش می‌باشد، بنابراین شناسایی مکانیسم‌هایی جهت بهبود تحمل شوری در گیاهان با تکنولوژی‌های زیست مولکولی از اهمیت خاصی برخوردار است. تنش شوری سبب تنش اسمزی، بهم خوردن هموستازی سلولی و سمیت یونی در سلول‌های گیاهی می‌شود. اثرات ملایم تنش شوری سبب کاهش رشد و نمو در گیاهان و در صورت شدت بالای تنش شوری سبب مرگ گیاه می‌شود (۴). سازگاری و تحمل شوری در گیاهان یک فرآیند کاملاً پیچیده هم در سطح سلولی و هم در سطح کل گیاه می‌باشد و نیازمند تغییرات در سطح بیان ژن‌ها می‌باشد که این تغییرات به نوبه خود منجر به تغییرات در بیان پروتئین می‌شود (۲۲) بر اساس مطالعات فیزیولوژیک و پروتئومیکس، چندین مکانیسم سازگاری و تحمل شوری در گیاهان تحت تنش شوری شناسایی شده‌اند. از جمله این موارد می‌توان به افزایش در گلیکولیز، چرخه تری کربوکسیلیک اسید، متابولیسم اسیدهای آمینه، بیوسنتز ATP و بیوسنتز پروتئین‌های مرتبط با دفاع جهت سمیت‌زدایی اشاره کرد (۲۴). مطالعات فیزیولوژیک، ژنتیک مولکولی و ژنومیکس باعث افزایش دانش فیزیولوژیک و مولکولی درباره تحمل تنش شوری در گیاهان شده است. این دستاوردها منجر به شناسایی، جداسازی و کلون کردن ژن‌ها و پروتئین‌های مهمی برای سنتز اسمولیت‌ها، کانال‌های یونی، فاکتورهای علامت‌دهی و آنزیم‌های مرتبط با شوری شده است. به عبارت دیگر این دستاوردها منجر به شناسایی عملکرد اساسی ژن‌ها و پروتئین‌هایی شده‌اند که سبب ایجاد پاسخ و سازگاری گیاهان به تنش شوری می‌شوند (۲۶). البته مطالعات

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]

ترانسکریپتومیک قادر است اطلاعاتی از بیان ژن در سطح mRNA را آشکار سازد. به هر حال، تغییرات بعد از رونویسی و بعد از ترجمه از قبیل فسفوریله شدن و گلیکوزیله شدن سبب می‌شود که بیان mRNA با سطح پروتئین بیان شده که مستقیماً مرتبط با فرآیندهای علامت‌دهی و متابولیسم تحت تنش شوری می‌باشند، کاملاً متناسب نباشد (۲۸). بنابراین کاملاً ضروری است که پاسخ گیاه به تنش شوری در سطح پروتئین بررسی شود. با وجود ظهور تکنیک‌های جدید هم اکنون الکتروفورز دوبعدی روش اصلی برای جداسازی پروتئین‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که برای شناسایی پروتئین‌ها و تغییرات پروتئومی القاء شده به وسیله‌ی تیمارها و تغییرات محیطی از الکتروفورز دوبعدی استفاده می‌شود (۲۲). تحقیقات اخیر بیشتر روی پروتئوم در گیاهان متمرکز شده است، زیرا اطلاعات جامعی برای درک مکانسیم‌های پیچیده پاسخ و سازگاری گیاهان به تنش شوری را ارائه می‌دهد (۱۶).

پژوهش حاضر به منظور بررسی تغییرات الگوی پروتئوم برگ در ژنوتیپ Basma S. 31 توتون تحت تیمار شوری صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و بررسی واکنش مولکولی و فیزیولوژیکی این گیاه به تنش شوری انجام گردید.

مواد و روش‌ها

اعمال تنش

بذور ژنوتیپ Basma S. 31 از مرکز تحقیقات توتون ارومیه تهیه و مراحل اولیه کاشت بذر، جوانه‌زنی و رشد دانه رست‌ها تا مرحله دو برگی در داخل مخلوطی از پیت و پرلیت (به نسبت ۱ به ۱) انجام گرفت. بعد از مرحله دو برگی دانه رست‌ها به گلدان‌های ۲ لیتری حاوی محلول هوگلند در فیتوترون پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه منتقل شدند. بعد از ۳۰ روز که گیاهان در سیستم آب‌کشت (هیدروپونیک) رشد کردند و به مرحله ۵ برگی رسیدند، تنش شوری اعمال شد. برای بررسی پاسخ مورفولوژیکی گیاه به تنش شوری از سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار بر لیتر کلرید سدیم و برای بررسی الگوی پروتئوم از سطوح صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار بر لیتر کلرید سدیم استفاده شد. تنش شوری به مدت ۱۲ روز اعمال و سپس نمونه گیری از برگ‌ها انجام گرفت.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین‌های محلول از قطعات برگی گیاه توتون پس از ۱۲ روز رشد در محیط کشت بدون کلرید سدیم (شاهد) و محیط کشت دارای ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، با استفاده از روش دامروال و همکاران (۸) با اندکی تغییرات انجام گرفت. ابتدا مقدار یک گرم از بافت گیاهی نگهداری شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد را در هاون با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر نموده و سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) حاوی ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید و β- مرکاپتواتانول (۰/۵٪) که از قبل تهیه شده بود به پودر حاصل اضافه شد. مخلوط در هاون مجدداً ساییده شده و سپس نمونه‌ها با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی را دور ریخته و به رسوب ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول لیزیز (CHAPS[1] ۵ درصد، DTT[2] ۱۰۰ میلی‌مولار، اوره ۸/۵ میلی‌مولار، تیو اوره ۲/۵ میلی‌مولار و آمفولیت با pH 3-10 و pH 5-8) اضافه شد، سپس محلول‌ها با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. مایع رویی در حقیقت عصاره پروتئینی است که پس از تعیین غلظت با استفاده از روش برادفورد (۵) جهت انجام الکتروفورز دوبعدی مورد استفاده قرار گرفت.

الکتروفورز دوبعدی

جهت جداسازی پروتئین‌ها از الکتروفورز دوبعدی استفاده شد که در بعد اول آن از نوارهای IPG (Immobilized pH Gradient) با طول ۱۸ سانتی‌متر و شیب pH ۴ تا ۷ و در بعد دوم از SDS-PAGE استفاده گردید (۲۰). در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل‌ها، ابتدا پروتئین‌ها در محلول باز جذب (رهیدراسیون Rehydration) حل شدند و سپس همزمان با بازجذب بارگیری روی نمونه‌ها انجام گرفت. عمل بازجذب در طول شب و به طور متوسط ۱۶ ساعت به طول انجامید. برای انجام بعد اول الکتروفورز از دستگاه مولتی فور II ساخت شرکت آمرشام بیوساینس (ایالات متحده) استفاده شد. برای بارگیری پروتئین‌ها روی ژل ۱۸ سانتی‌متری به طور متوسط نیاز به ۴۲ هزار ولت ساعت (42KVh) است که این میزان در چندین مرحله با ولتاژهای مختلف تامین شد. پس از پایان بعد اول مرحله متعادل سازی نوارها صورت گرفت و سپس بعد دوم الکتروفورز انجام گرفت که برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت بیورَد (ایالات متحده) استفاده شد.

اکتساب تصاویر

پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز دوبعدی تفکیک شده و با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دانسیومتر GS800 ساخت شرکت بیورد (ایالات متحده) اسکن شده و به فرمت خام ژل‌های دوبعدی (Raw 2d) ذخیره شدند و در نهایت به وسیله نرم افزار PDQuest (توسعه یافته توسط شرکت بیورد) به فرمت تیف درآورده شدند. پس از بدست آوردن تصاویر به فرمت دیجیتالی، ژل‌ها میان سلفون قرار داده شده، اطراف آنها مهر و موم و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت قرار داده شدند. جهت بررسی تغییرات کمی بیان پروتئین‌ها از مقدار درصد حجمی هر لکه استفاده شد و برای شناسایی اختلاف بین لکه‌ها در سطوح شوری صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم از آزمون t- استیودنت در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

آنالیز آماری

برای بررسی‌های مورفولوژیک از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. برای همه آزمایش‌های انجام شده سه تکرار در نظر گرفته شد. اختلاف بین سطوح مختلف شوری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵) انجام گرفت. برای بررسی کمّی و کیفی لکه‌های

1-3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

2- Dithiothreitol

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]

پروتئینی حاصل از تیمارهای مختلف از نرم‌افزار Melanie 6.2 (GeneBio, Geneva, Switzerland) استفاده شد. پس از جفت نمودن لکه‌ها و جفت نمودن ژل‌های مربوط به تیمارهای مختلف، اختلاف درصد حجمی (Vol%) لکه‌های پروتئینی با استفاده از آماره تی- استیودنت (t- Student) آزمون شده و لکه‌هایی که بیانشان تغییر یافته و در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری نشان دادند به‌عنوان لکه‌های کاندیدا شناسایی شدند.

نتایج و بحث

پاسخ مورفولوژیکی گیاه توتون به تنش شوری

رشد طولی اندام هوایی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح مختلف شوری قرار گرفت، به‌طوری‌که با افزایش سطح شوری کاهش معنی‌داری در رشد طولی اندام هوایی مشاهده شد (شکل ۱). کاهش شدیدی در وزن تر اندام هوایی در سطح شوری ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نسبت به شاهد مشاهده شد، با این حال بیشترین کاهش رشد در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد (شکل ۲). با افزایش سطح شوری، پتانسیل آب کاهش یافته و در نتیجه جذب آب توسط ریشه‌ها کمتر می شود. در چنین شرایطی برگ‌ها و اندام‌های هوایی تحت تاثیر قرار گرفته و سطح برگ‌ها و نهایتاً وزن تر گیاه کاهش می‌یابد. از طرف دیگر با بسته شدن روزنه‌ها در نتیجه کاهش آب، ورود دی اکسید کربن کاهش و در نتیجه میزان فتوسنتز کم شده و میزان تنفس افزایش می یابد. بنابراین از یک طرف برگ‌ها کوچک شده و از طرف دیگر ذخیره مواد کربوهیدراتی حاصل از فتوسنتز کاهش می یابد. این عوامل روی هم رفته منجر به کاهش در تعداد و اندازه‌ی سلول‌ها و در نهایت کاهش وزن تر گیاه می‌شود (۱۵). نتایج بدست آمده مشابه با نتایج سلیک و آتاک (۷) و همچنین رضوی‌زاده و همکاران (۲۳) می‌باشد که نشان دادند با افزایش غلظت کلرید سدیم وزن تر اندام هوایی توتون کاهش می‌یابد. همچنین، کاهش وزن تر اندام هوایی در گیاهان کلزا (۶)، ذرت (۱۰)، سیب زمینی (۱) و تربچه (۱۸) گزارش شده است که با افزایش سطح شوری وزن تر اندام هوایی در آنها کاهش یافته است و نتایج حاصل از این آزمایش را تایید می کنند.

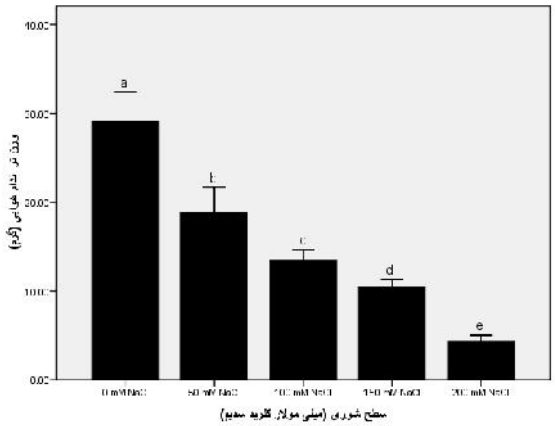


شکل ۱- تغییرات مورفولوژیک ژنوتیپ Basma S. 31 در سطوح شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (۱۲ روز بعد از شروع تنش شوری)

Figure 1. Morphological variations of Basma S. 31 genotype in salinity levels of 0, 50, 100, 150 and 200 millimolar of NaCl (12 days after onset of salinity stress)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]



شکل ۲- تغییرات وزن تر اندام هوایی ژنوتیپ Basma S. 31 در سطوح شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (۱۲ روز بعد از شروع تنش شوری). ستون‌های عمودی نشانگر میانگین و انحراف معیار هستند. میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند

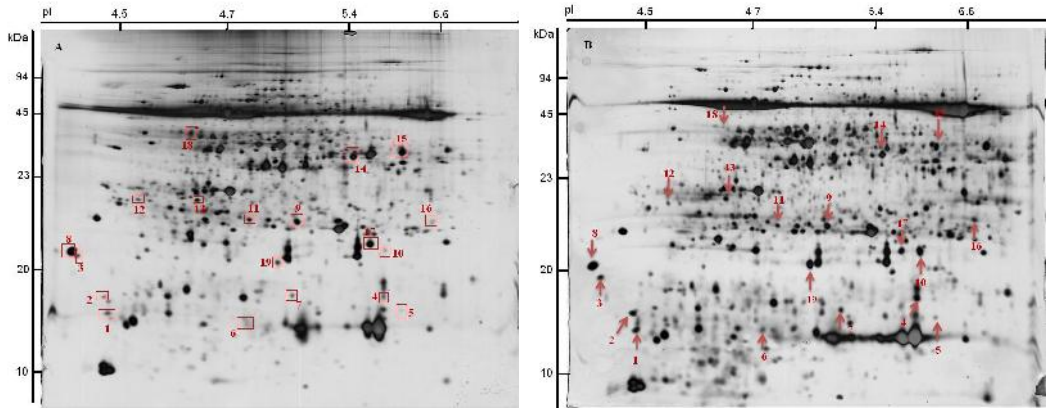
Figure 2. Variation in aerial part fresh weight of Basma S. 31 genotype in salinity levels of 0, 50, 100, 150 and 200 millimolar of NaCl after12 days from onset of salinity stress. Vertical columns show means and standard deviations. Means with the same letters for each column haven't significant difference at 5% probability level

اثرات تنش شوری روی کمیت، کیفیت و درصد حجمی لکه‌های پروتئینی در برگ

جهت بررسی مولکولی پاسخ توتون به تنش شوری، گیاهان توتون در سطوح شوری صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم ۱۲ روز بعد از شروع تنش شوری برای آنالیز پروتئوم مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که در پروتئوم ژنوتیپ Basma S. 31 در سطح شوری ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۹ لکه پروتئینی از بین ۴۶۸ لکه شناسایی شده تغییرات بیان معنی‌داری در سطح ۵٪ در مقایسه با شاهد داشتند که لکه‌های دارای افزایش بیان در مقایسه با شاهد شامل لکه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۱۶ و ۱۹ و لکه‌های دارای کاهش بیان نسبت به شاهد شامل لکه‌های شماره ۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ بودند (شکل ۳). از مجموع ۴۶۸ لکه پروتئینی شناسایی شده توسط الکتروفورز دوبعدی در pH بین ۴ تا ۷ (بعد اول) و تا وزن مولکولی ۹۴ کیلو دالتون (بعد دوم) تعداد ۱۹ لکه پروتئینی در برگ ژنوتیپ مورد مطالعه در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵٪ بیان متفاوت نشان دادند (جدول ۱). بر اساس تحلیل‌ها از مجموع ۱۹ لکه پروتئینی تعداد ۶ لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۲۰ کیلو دالتون، ۱۰ لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۲۳ کیلو دالتون و ۳ لکه پروتئینی دارای وزن مولکولی بین ۲۳ تا ۴۵ کیلو دالتون می‌باشند. بنابراین نزدیک به ۵۳ درصد لکه‌های پروتئینی که تفاوت معنی‌داری نشان داده‌اند وزن مولکولی بین ۲۰ تا ۲۳ کیلو دالتون دارند. همچنین از این ۱۹ لکه پروتئینی بیشترین میزان لکه‌ها (۷ لکه پروتئینی معادل ۳۷٪ لکه‌ها) دارای نقطه ایزوالکتریکی بین ۵/۴ تا ۶/۶ می‌باشند. در نقطه ایزوالکتریک بین ۶/۶ تا ۷ هیچ لکه پروتئینی که بیان آن تحت تاثیر تنش شوری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان دهد، مشاهده نشد (جدول ۱).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]



شکل ۳- اثرات تنش شوری روی الگوی بیان پروتئین در برگ ژنوتیپ Basma S. 31 در سطوح شوری صفر (A) و ۲۰۰ (B) میلی‌مولار کلرید سدیم

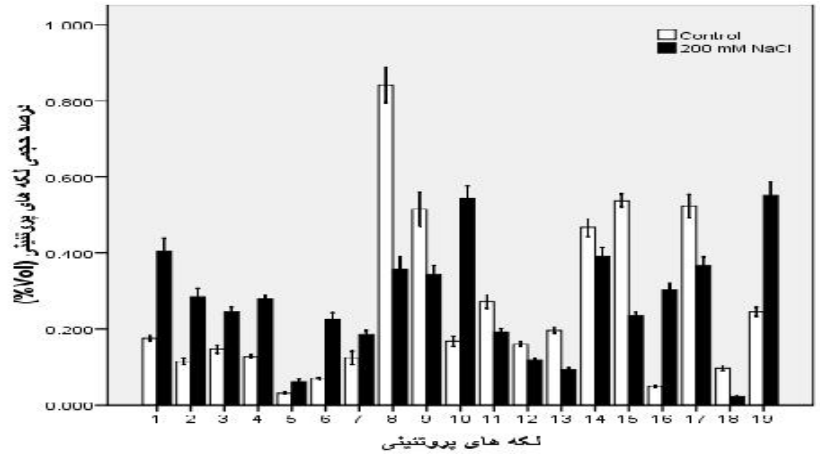
Figure 3. Effects of salinity stress on protein expression pattern in leaf of Basma S.31 genotype at 0 (A) and 200 (B) millimolar of NaCl

جدول ۱- نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی حاصل از الکتروفورز دوبعدی در برگ ژنوتیپ Basma S. 31

Table 1. Isoelectric point and molecular weight of protein spots resulting from two-dimensional gel electrophoresis of Basma S. 31 leaf protein

kDa	pI				
	۴-۴/۵	۴/۵-۴/۷	۴/۷-۵/۴	۵/۴-۶/۶	۶/۶-۷
۴۵-۹۴	–	–	–	–	–
۲۳-۴۵	–	۱	–	۲	–
۲۰-۲۳	۲	۲	۳	۳	–
۱۰-۲۰	۲	–	۲	۲	–
۰-۱۰	–	–	–	–	–

آنالیز داده‌های مربوط به درصد حجمی لکه‌های پروتئینی برگ ژنوتیپ Basma S. 31 نشان می‌دهد که تحت تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) بیشترین و کمترین افزایش بیان مربوط به لکه‌های ۱۶ و ۷ به ترتیب با ۶/۱ و ۱/۴۸ برابر افزایش بیان، می‌باشد (شکل ۴). همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیشترین کاهش بیان مربوط به لکه پروتئینی ۱۸ با ۴/۴ برابر کاهش بیان، می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- درصد حجمی (Vol%) لکه‌های پروتئینی برگ ژنوتیپ Basma S. 31. میزان هر ستون نشان دهنده میانگین درصد حجمی و انحراف معیار از ۳ تکرار بیولوژیک می‌باشد.

Figure 4. Volume percentage of Basma S. 31`s leaf protein spots. The value in each column show the mean volume percentage and standard deviation calculating from 3 biological replicates.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]

پاسخ‌های گیاهان به تنش شوری شامل سم‌زدایی مواد مضر، حفظ هموستازی سلول و احیاء رشد می‌باشد (۱۴). بنابراین می‌توان گفت که گیاهان برای مقابله با تنش شوری و کاهش اثرات زیان‌بار آن، الگوی بیان ژن‌ها و الگوی پروتئین‌های داخل سلولی‌شان را تغییر می‌دهند (۱۷). تکنیک الکتروفورز دوبعدی برای مطالعه اثرات تنش شوری روی بیان پروتئین در برگ‌ها، ریشه‌ها و سوسپانسیون‌های سلولی تعدادی از گونه‌های حساس به شوری در خانواده گندمیان از قبیل برنج (۲۲،۱۱)، گندم (۲۷) استفاده شده است. علاوه بر خانواده گندمیان، چندین محصول اقتصادی دیگر از قبیل توتون (۲۳)، سیب‌زمینی (۱) و سویا (۲۵،۲) که حساسیت متوسطی نسبت به شوری دارند و تولید محصول‌شان به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرند، با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تنش شوری موجب ایجاد تغییرات متفاوت و معنی‌داری در الگوی پروتئین‌های برگ ژنوتیپ Basma S. 31 شده است. با آنالیز ژل‌های رنگ آمیزی شده تعداد ۴۶۸ لکه پروتئینی در ژنوتیپ Basma S. 31 به صورت تکرارپذیر شناسایی و مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و درصد بیشتری از این تعداد لکه افزایش بیان داشته‌اند. لکه‌هایی که نسبت به شاهد افزایش بیان داشته‌اند بیشتر شامل لکه‌هایی می‌باشند که دارای وزن مولکولی کم بوده و بر عکس، لکه‌هایی که کاهش بیان داشته‌اند بیشتر شامل لکه‌هایی می‌باشند که دارای وزن مولکولی بالا هستند. علاوه بر این نتایج مربوط به این آزمایش نشان داد که درصد بالایی از لکه‌ها (۶۳٪) در ژنوتیپ Basma S.31 دارای نقطه ایزوالکتریک بالای ۴/۷ هستند. نتایج این مطالعه تا حدودی مشابه با نتایج رضوی‌زاده و همکاران (۲۳) بوده، به‌طوری‌که در مطالعه ایشان تحت تنش شوری، در مجموع ۱۸ لکه پروتئینی الگوی بیان‌شان تغییر یافته و پروتئین‌های با وزن مولکولی کم معمولا افزایش بیان و پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا کاهش بیان نشان داده‌اند. ولی بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه ایشان (۲۳) تعداد بیشتری از لکه‌ها کاهش بیان (۱۰ لکه پروتئینی) و تعداد کمتری افزایش بیان داشتند (۸ لکه پروتئینی). نتایج مربوط به تحقیق رضوی‌زاده و همکاران (۲۳) بر روی توتون نشان داد که از مجموع ۱۸ لکه پروتئینی که الگوی بیان‌شان تغییر یافته است، بیش از ۸۳٪ آنها دارای وزن مولکولی زیر ۴۵ کیلو دالتون هستند که با نتایج آزمایش حاضر شباهت دارد، ولی برخلاف نتایج این مطالعه، تنها ۱۷٪ از لکه‌ها دارای نقطه ایزوالکتریک بالاتر از ۴/۷ بوده و درصد بالایی از این لکه‌ها (۸۳٪) دارای نقطه ایزوالکتریک زیر ۴/۷ می‌باشند. تغییرات الگوی پروتئوم در آپوپلاست برگ گیاه توتون تحت تنش شوری توسط دانی و همکاران (۹) بررسی شده است. بر روی ژل‌های دوبعدی ۱۵۰ پروتئین به صورت تکرارپذیر ظاهر شدند. از این تعداد پروتئین ۲۰ لکه پروتئینی دارای تغییر قابل ملاحظه بودند. تعداد ۱۳ لکه پروتئنی کاهش بیان نشان داده، ۳ لکه پروتئینی تحت تنش شوری به وجود آمدند و ۴ لکه پروتئینی افزایش بیان داشتند. از این ۴ لکه پروتئین دو لکه جزء کیتینازها بوده، یک لکه پروتئین Germin-like و لکه آخر آلفا- گالاکتوزیداز بود. بر خلاف آزمایش حاضر، نتایج دانی و همکارن (۹) نشان داد که بیشتر لکه‌ها کاهش بیان داشته‌اند ولی ۵۰٪ لکه‌ها وزن مولکولی زیر ۴۵ کیلو دالتون داشتند. سبحانیان و همکاران (۲۵) با مطالعه بر روی برگ سویا تحت تنش شوری نشان دادند که تعداد ۱۹ لکه پروتئینی الگوی بیان‌شان تغییر یافته که از این تعداد، ۱۱ لکه پروتئینی افزایش بیان و ۸ لکه پروتئینی کاهش بیان داشتند، که مشابه با این آزمایش بیشتر لکه‌ها افزایش بیان داشتند. امینی و احسانپور (۳) با مطالعه بر روی برگ گوجه فرنگی نشان دادند که تعداد ۱۸ لکه پروتئینی تحت تنش شوری الگوی بین‌شان تغییر یافته که از این تعداد لکه پروتئینی ۸ عدد افزایش بیان، ۳ عدد کاهش بیان و تعداد ۷ لکه پروتئینی تحت تنش شوری به وجود آمدند، که هم راستا با نتایج آزمایش حاضر بوده و تعداد بیشتری از لکه‌ها افزایش بیان داشتند. فاتحی و همکاران (۱۲) با مطالعه بر روی برگ‌های جو تحت تنش شوری تعداد ۳۷۷ لکه پروتئینی شناسایی کردند که از این تعداد ۱۲۴ لکه پروتئینی در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۵٪ اختلاف بیان داشتند. در آزمایش فاتحی و همکاران (۱۲) بر خلاف نتایج آزمایش حاضر، از ۱۲۴ لکه پروتئینی تعداد بیشتری از لکه‌ها کاهش بیان داشته (۶۹ لکه پروتئین) و تعداد کمتری افزایش بیان داشتند (۵۵ لکه پروتئین).

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات توتون ارومیه به خاطر تامین هزینه اجرای طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]

منابع

1. Aghaei, K., A.A. Ehsanpour and S. Komatsu. 2008a. Proteome analysis of potato under salt stress. Journal of Proteome Research, 7: 4858-4868.
2. Aghaei, K., A.A. Ehsanpour, A.H. Shah and S. Komatsu. 2008b. Proteome analysis of soybean hypocotyls and root under salt stress. Amino Acids, 36: 91-98.
3. Amini, F. and A.A. Ehsanpour. 2010. Study of protein changes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under salt stress using two dimensional electrophoresis Iranian Journal of Plant Biology, 1: 13-24 (In Persian).
4. Aoki, A., A. Kanegami, M. Mihara, T.T. Kojima, M. Shiraiwa and H. Takahara. 2005. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress. Gene, 356: 135-145.
5. Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
6. Bybordi, A., S.J. Tabatabaei and A. Ahmedov. 2010. The influence of salinity stress on antioxidant activity in canola cultivars (*Brassica napus* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment, 8: 122-127.
7. Celik, O. and C. Atak. 2012. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. Turkish Journal of Biology, 36: 339-356.
8. Damerval, C., D. De Vienne, M. Zivy and H. Thiellement. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, 7: 52-54.
9. Dani, V., W.J. Simon, M. Duranti and R.R.D. Croy. 2005. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome inresponse to salt stress. Proteomics, 5: 737-745.
10. Deng, C.N., G.X. Zhang, X.L. Pan and K.Y. Zhao. 2010. Chlorophyll fluorescence and gas exchange responses of maize seedlings to saline-alkaline stress. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 16: 49-58.
11. Dooki, A.D., F.J. Mayer-Posner, H. Askari, A.A. Zaiee and G.H. Salekdeh. 2006. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. Proteomics, 6: 6498-6507.
12. Fatehi, F., A. Hosseinzadeh, H. Alizadeh, M. Haji Abbasi and A. Shabani. 2011. The study of proteomic salinity responses in barley. Iranian Journal of Field Crop Science, 42: 617-626 (In Persian).
13. Ghasemi Bezdi, K. and B. Aidin. 2013. Study of callus formation and salinity tolerance in different explants of cotton (*Gossypium sp.*) cultivars *in vitro*. Journal of Crop Breeding, 4(10): 94-108 (In Persian).
14. Hajheidari, M., M. Abdollahian-Noghabi, H. Askari, M. Heidari, S.Y. Sadeghian, E.S. Ober and G. Hosseini Salekdeh. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics, 5: 950-960.
15. Hasaneen, M.N.A., M.E. Younis and S.M.N. Tourky. 2009. Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions XXIII. Salinity-biofertility interactive effects on growth, carbohydrates and photosynthetic efficiency of *Lactuca sativa*. Plant Omics, 2: 60-69.
16. Jiang, Y., B. Yang, N.S. Harris and M.K. Deyholos. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress- responsive proteins in Arabidopsis roots. Journal of Experimental Botany, 58: 3591-3607.
17. Kanlaya, K.N., D. Sakda, W. Chaisiri, B. Sumontip, K. Manit and T. Piyada. 2005. Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. Science Asia, 31: 403-408.
18. Munir, S., E.H. Siddiqi, K.H. Bhatti, K. Nawaz, K. Hussain, R. Rashid and I. Hussain. 2013. Assessment of inter-cultivar variations for salinity tolerance in winter radish (*Raphanus sativus* L.) using photosynthetic attributes as effective selection criteria. World Applied Sciences Journal, 21: 384-388.
19. Nemati, I., F. Moradi ,M.A. Esmaeili and S. Gholizadeh. 2011. Change in soluble sugars and mineral ions distribution pattern in rice seedlings grown under saline condition. Journal of Crop Breeding, 3(8): 62-80 (In Persian).
20. O' Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250: 4007-4021.
21. Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 324-349.
22. Parker, R., T.J. Flowers, A.L. Moorem and N.V.J. Harpham. 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. Journal of Experimental Botany, 57:1109-1118.
23. Razavizadeh, R., A.A. Ehsanpour, N. Ahsan and S. Komatsu. 2009. Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. Peptids, 30: 1651-1659.
24. Sobhanian, H., K. Aghaei and S. Komatsu. 2011. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? Journal of Proteomics, 74: 1323-1337.
25. Sobhanian, H., R. Razavizadeh, Y. Nanjo, A.A. Ehsanpour, F. Rastgar Jazii, N. Motamed and S. Komatsu. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Science, 8: 1-15.
26. Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. Methods in Enzymology, 428:419-438.
27. Wang, M.C., Z.Y. Peng, C.L. Li, F. Li, C. Liu and G.M. Xia. 2008. Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/*Thinopyrum ponticum*. Proteomics, 8: 1470-1489.
28. Zhang, Y.Y., J.B. Lai, S.H. Sun, Y. Li, Y.Y. Liu, L.M. Liang, M.S. Chen and Q. Xie. 2008. Comparison analysis of transcripts from the halophyte *Thellungiella halophila*. Journal of Integrative Plant Biology, 50:1327-1335.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]

Proteome Analysis of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaves under Salt Stress using Two–Dimensional Electrophoresis

Ali Asghar Hatamnia[1], Reza Darvishzadeh[2, 3] Nasser Abbaspour[4], Fatemeh Rahmani[4], Seyyed Reza Alavi[5] and Farzad Banaei[6]

1-Assistant Professor, Faculty of Science, Ilam University
2- Professor, Faculty of Agriculture, Urmia University (Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
3-Professor, Institute of Biotechnology, Urmia University
4- Associate Professor, Faculty of Science, Urmia University
5- Researcher, Urmia Tobacco Research Center
6- PhD Student in Plant Breeding, University of Tabriz
Received: April 24, 2016 Accepted: July 13, 2016

Abstract

In order to understand the response of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to salt stress, the comparative analysis of leaf proteome of Basma S. 31 genotype were performed. Plants were treated with or without 200 mM NaCl for 12 days. The proteins were extracted from leaves, and then separated by two-dimensional electrophoresis. The fresh weight and length of shoot of studied genotype showed greater decrease with increasing salinity. The number of 19 protein spots (out of 468 protein spots) was differentially expressed in leaves under NaCl treatment. Although the levels of some proteins were reduced by salt-treatments, an increase of accumulations in some proteins was observed under salt stress. The number of protein spots with increased expression, were higher than the number of protein spots with decreased expression (10 and 9 protein spots, respectively). Results revealed that, spots of 16 and 7 were highly and lowly up-regulated with 6.1-fold and 1.48- fold, respectively. Also, the spot of 18 with 4.4- fold was highly down-regulated among all spots. Salinity is a complex phenomenon that causes not just osmotic and toxic ion effects, but also nutritional and metabolism imbalance. According to the results, it seems that salinity can change the expression levels of some special proteins in leaves of tobacco that may in turn play a role in the tolerance to saline conditions. So, it is believed that increased expression of proteins with low molecular weight that regulate cellular activity, can be effective in tobacco salt tolerance.

Keywords: Proteome, Protein spot, Salt stress, Two dimensional electrophoresis, Tolerance

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.29252/jcb.9.23.138]