دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی الگوی پروتئینی و مکانیسم تحمل به تنش خشکی در دو رقم گندم در مرحله گیاهچه‌ای

محمدرضا نقوی[1]، محمود تورچی[2] و للو زولا[3]

1- استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران، (نویسنده مسوول: mr_naghavi@ymail.com)
2- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
3- استاد گروه بیولوژی مولکولی، دانشگاه Tuscia، ایتالیا

تاریخ دریافت: 1395/2/7 تاریخ پذیرش: 1398/10/15
صفحه: 42 تا 56

چکیده

بمنظور ارزیابی تغییرات الگوی پروتئینی ارقام متحمل و حساس گندم به تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای و شناخت مکانیسم تحمل به تنش در آنها، دو رقم گندم بهاره شامل کویر (بعنوان رقم متحمل) و بهار (بعنوان رقم حساس) در اطاقک رشد کشت شدند. تجزیه پروتئوم از طریق الکتروفورز دوبعدی و رنگ‌آمیزی کوماسی بلو برای دو رقم انجام شد و بترتیب تعداد 20 و 86 لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای شاهد و تنش خشکی در رقم کویر و بهار مشخص شدند. با استفاده از روش MALDI-TOF/TOF تعداد 18 و 84 عدد از لکه‌های پروتئینی در رقم کویر و بهار شناسایی شدند. در مجموع کلیه پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار مربوط به رقم کویر در شش گروه عملکردی تفکیک شدند که شامل چرخه کالوین (هفت لکه پروتئینی)، واکنش نوری فتوسنتز (چهار لکه)، اسمیلاسیون نیتروژن و انتقال پروتون (دو لکه)، بیوسنتز نشاسته و گلیکولیز (یک لکه) و پروتئین‌های ناشناخته (سه لکه) بودند. تعداد گروه‌های عملکردی پروتئین‌ها در رقم بهار تنوع بیشتری داشت و در 11 گروه عملکردی قرار گرفتند، در حالی که در این رقم نیز مانند رقم کویر بیشترین درصد پروتئین‌ها مربوط به چرخه کالوین (35 لکه پروتئینی)، واکنش نوری فتوسنتز (22 لکه)، اسمیلاسیون نیتروژن (هشت لکه) و انتقال پروتون (پنج لکه) بودند. بطور کلی، در رقم کویر بیشترین پروتئین‌های مربوط به چرخه کالوین، فروکتوز-بیس فسفات آلدولاز (سه لکه) و پیش ماده زیرواحد کوچک روبیسکو (دو لکه) بودند. در حالی که در رقم بهار بیشترین پروتئین‌ها در چرخه کالوین، به ترتیب شامل پروتئین روبیسکو اکتیواز A (هفت لکه)، فروکتوز 1 و 6-بیس فسفات آلدولاز (شش لکه) و زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده روبیسکو (پنج لکه) بودند. از طرف دیگر در رقم بهار بیشترین پروتئین‌ها درگروه واکنش نوری فتوسنتز مربوط به، پروتئین‌های OEC (12 لکه) بودند. در حالی که در رقم کویر از هر پروتئین کمپلکس b6/f (Cyt)، پروتئین متصل شده به کلروفیل a/b، CYP38 و HCF136 یک پروتئین تحت تنش القا شدند. همچنین در ارقام کویر و بهار بیشترین پروتئین‌ها درگروه اسمیلاسیون نیتروژن، آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS) بود. در مجموع این نتایج، به شناسایی و درک بهتر مسیرهای متابولیکی و پروتئین‌های مهمتر و مؤثرتر در تحمل و حساسیت گندم کمک خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئومیک، تنش خشکی، گندم، مرحله رویشی

مقدمه

پروتئومیک بعنوان روشی که پروتئین‌های یک ارگانیسم، بافت یا سلول خاص را تجزیه و تحلیل می‌کند، تعریف می‌شود (21). واژه پروتئوم تمام پروتئین‌های بیان شده در ژنوم می‌باشد (23). پروتئوم در طی زمان و در پاسخ به پیام‌های داخلی و خارجی سلول در حال تغییر است (18). پروتئومیک بیانی[1] (بررسی تغییرات الگوی بیانی پروتئین‌ها تحت شرایط مختلف)، پروتئومیک نقشه سلول[2] (بررسی اثرمتقابل پروتئین‌ها روی یکدیگر) و پروتئومیک ساختاری[3] (مطالعه ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها) سه شاخه تشکیل‌دهنده پروتئومیک می‌باشند (23). اولین مطالعه در مورد تأثیر تنش‌های غیر زیستی روی پروتئوم گیاهی در دهه 1980 انجام شد. اگرچه در آن زمان بیشتر پروتئین‌های مشاهده شده فاقد نام بودند ولی این مطالعات توانست تأثیر تنش روی القای پروتئین (12)، وجود تغییرات در بخش‌های مختلف غشاء (13) و تنوع ژنتیکی در پاسخ به تنش (34) را نشان دهد. امروزه با توالی‌سنجی ادمن (Edman) می‌توان پروتئین‌های القا شده توسط تنش‌های غیرزیستی را شناسایی کرد (6). از طرف دیگر ابداع روش اسپکترومتری جرمی دریچه‌ای نو برای تشخیص پروتئین‌ها باز کرد. چانگ و همکاران (5) اولین کسانی بودند که برای تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها تحت تنش غیر زیستی از این روش استفاده کردند. مطالعاتی که به منظور درک مکانیسم پروتئینی پاسخ به تنش خشکی انجام می‌شود در راستای کمک به توسعه ارقام متحمل گندم به تنش خشکی انجام می‌گردد. گیاهان برای مقابله با شرایط نامطلوب رشد، حفظ همئوستازی، سم‌زدایی عناصر مضر و بازیابی رشد اقدامات متعددی در سطوح فیزیولوژیکی و مولکولی انجام می‌دهند (9،26). با این وجود دانش حاضر در مورد ژن‌های درگیر در مکانیسم پاسخ به تنش خشکی هنوز دارای محدودیت‌هایی است (3). خشکی باعث تجمع گروه پیچیده‌ای از پروتئین‌ها می‌شود که از سلول‌ها در برابر خسارت‌های ناشی از تنش حفاظت می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل چاپرون‌ها، پروتئین‌های دارای بیان بالا در مرحله آخر جنین‌زایی (LEA_s) و بازدارنده پروتئینازهای عمل‌کننده (تقاطعی)[4] هستند. اگرچه بخش عمده‌ای از پروتئین‌های درگیر هنوز ناشناخته هستند (31،32). تأثیر انواع تنش‌های غیر زیستی از جمله خشکی روی چهار رقم گندم توسط کمال و همکاران (15) بررسی شده و این پژوهشگران اظهار داشتند که ژن‌هایی که توسط پروتئومیک شناخته می‌شوند می‌تواند برای انتخاب از طریق نشانگر یا برنامه‌های

1- Expression proteomics 2- Cell map proteomics 3- Structural proteomics
4- Interceptor proteinase

انتقال ژن جهت بهبود عملکرد گیاهی و تحمل به تنش‌های غیر زیستی مورد استفاده قرار گیرند. در آزمایش دیگری روی گندم دوروم که توسط کاروسو و همکاران (4) انجام شد، مشخص شد که سهم نسبی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش بصورت دخالت در گلیکولیز، 18%؛ دخیل در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1]، 15%؛ دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه، 12%؛ در چرخه کالوین، 9%؛ در مکانیسم‌های دفاعی، 6% و در تنظیم پس از ترجمه، 3% بود.

در راستای اهمیت شناخت دقیق‌تر پاسخ پروتئینی گندم، بعنوان گیاهی زراعی مهم، تحت تنش خشکی، پژوهش حاضر برای شناسایی مسیرهای متابولیکی مهمتر در تحمل و حساسیت گندم تحت تنش خشکی انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

دو رقم گندم بهاره شامل رقم کویر (بعنوان متحمل) و بهار (بعنوان حساس) (10،22) در اطاقک رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه Tuscia ایتالیا در ژانویه 2014 میلادی کشت شدند. بذور هر رقم در سه تکرار و دو سطح شاهد و تنش خشکی بصورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و درون ظروفی به ابعاد 8×10×10 سانتی‌متر در خاک آماده زراعی کشت شدند. در هر واحد آزمایشی 10 عدد بذر کاشته شد. دمای روز در محفظه رشد 24 درجه سانتی‌گراد و دمای شب 20 درجه سانتی‌گراد بود و همچنین میزان رطوبت نسبی محفظه در طول آزمایش 40 درصد تنظیم شد. آبیاری بصورت روزانه برای کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد و بعد از گذشت ده روز از شروع کشت، تنش خشکی از طریق قطع آبیاری به مدت یک هفته اعمال شد. در طی این مدت آبیاری واحدهای آزمایشی شاهد ادامه یافت. قبل از نمونه‌گیری، ارتفاع محل طوقه تا بلندترین برگ گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌گیری از واحدهای آزمایشی جهت اندازه‌گیری وزن تر بوته، وزن خشک بوته، محتوای آب نسبی برگ به روش مورانت مانسیو و همکاران (20) و سطح ویژه برگ از طریق محاسبه نسبت سطح برگ (سانتی‌متر مربع) به وزن خشک برگ (گرم) (2) انجام شد. برای تجزیه پروتئوم، از برگ گیاهچه‌های هر واحد آزمایشی بطور تصادفی به مقدار 0/5 گرم وزن شد و درون فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج پروتئین در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و محلول کردن پروتئین‌ها

برای استخراج پروتئین از روش دامروال و همکاران (7) با تغییرات اندک انجام شد. برای محلول کردن پروتئین‌ها از بافر محلول‌سازی[2] پروتئین (9M Urea، 4% CHAPS(w/v)، 1% DTT (w/v)، 35mM Tris HCl pH=8.9، 1mM PMSF و 0.1mM EDTA) استفاده شد (7). برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌ها از روش 2-D Quant Kit استفاده شد.

الکتروفورز دوبعدی و رنگ آمیزی ژل برای انجام الکتروفورز دوبعدی در بعد اول از نوارهای IPG و برای بعد دوم از SDS-PAGE استفاده شد. همچنین رنگ آمیزی ژل‌ها با کوماسی بلو انجام شد (7).

لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش و تشخیص آنها پس از آماده شدن کلیه ژل‌ها و اسکن کردن آنها، فایل‌های مربوط به اسکن ژل‌ها در نرم‌افزار Same spot progenesis اجرا شدند و پس از علامت‌گذاری لکه‌های مشترک و یا غیرمشترک تکرارپذیر و مشخص شدن حجم آنها توسط نرم‌افزار، تجزیه آماری روی آنها صورت گرفت و لکه‌هایی که مقدار معیار Fold آنها بزرگتر یا مساوی 1/5 بود (یا لکه‌های پروتئینی معنی‌دار در سطح اطمینان 95 درصد) بعنوان لکه‌های پروتئینی هدف مشخص شدند. سپس لکه‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار در زیر نور فلورسانت به دقت جدا شدند. فرآیند هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی با تریپسین انجام شد. شناسائی پروتئین‌ها با استفاده از روش طیف سنجی جرمی MALDI-TOF/TOF صورت گرفت. در ادامه شناسایی پروتئین‌های مربوطه با استفاده از برنامه اینترنتی MASCOT انجام شد. مبنای انتخاب، امتیاز بالای 66 ($P<0.05$) بود و علاوه بر این حداقل 10 درصد همپوشانی توالی‌های پروتئینی در انتخاب پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج حاصله با استفاده از بانک های اطلاعاتی NCBI و Expasyمورد جستجو و بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از آماده شدن داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه، تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و با توجه به دو سطح بودن کلیه فاکتورهای آزمایشی، معنی‌دار بودن آزمون F نشاندهنده اختلاف میانگین بین دو سطح در نظر گرفته شد. در مواردی هم که اثر متقابل رقم با تیمار آبی معنی‌دار شد، نمودار مقایسه میانگین توسط نرم افزار Excell ترسیم شد. همچنین برای شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار توسط نرم‌افزار Same spot progenesis حجم نرمال شده لکه‌های پروتئینی بدست آمد و از طریق روش آماری ANOVA در سطح احتمال 5% و مقایسه میانگین LSD ($P<0.05$) معنی‌داری لکه‌های پروتئینی بررسی شد. در ضمن نمودارهای گروهبندی پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

نتایج و بحث

ارقام کویر و بهار در آزمایش‌های قبلی برای تنش خشکی به ترتیب بعنوان ارقام متحمل و حساس شناخته شده‌اند (10،22). نتایج تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در مرحله گیاهچه‌ای در جدول 1 آمده است. طبق نتایج بدست آمده بین ارقام و سطوح تنش از نظر کلیه صفات ارزیابی شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول 1). همچنین اثرمتقابل رقم × تیمار آبی تنها برای صفت محتوای آب نسبی برگ معنی‌دار بود. کمترین و بیشترین مقدار ضریب تغییرات مربوط به صفات محتوای آب نسبی برگ (0/46) و وزن خشک گیاهچه (22/22) بود. در جدول 2 مقایسه میانگین ارقام و سطوح تنش آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود میانگین کمی صفات رقم کویر از لحاظ کلیه صفات مورد

1- Reactive oxygen species

2- Solubilization buffer

مطالعه بهتر از میانگین مربوطه در رقم بهار می‌باشد. در ضمن در مورد صفت محتوای آب نسبی برگ با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل رقم با تنش، ترکیب تیماری ارقام و سطوح تنش مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل 1).

جدول 1- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تحت تیمارهای آبی برای دو رقم کویر و بهار

Table 1. Analysis of variance of studied traits under water treatments for Kavir and Bahar cultivars

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		محتوای آب نسبی برگ (درصد)	سطح ویژه برگ (سانتی‌متر مربع بر گرم)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر)	وزن تر گیاهچه (گرم)	وزن خشک گیاهچه (گرم)
تیمار آبی	1	239/96**	2983/01*	27/30**	0/006*	0/004**
رقم	1	195/09**	5790/27**	13/44**	0/022**	0/008**
رقم× تیمار آبی	1	30/30*	683/73	3/10	0/002	0/001
خطا	8	0/62	323/00	2/99	0/0011	0/0005
ضریب تغییرات (%)		0/46	9/78	7/70	7/09	22/22

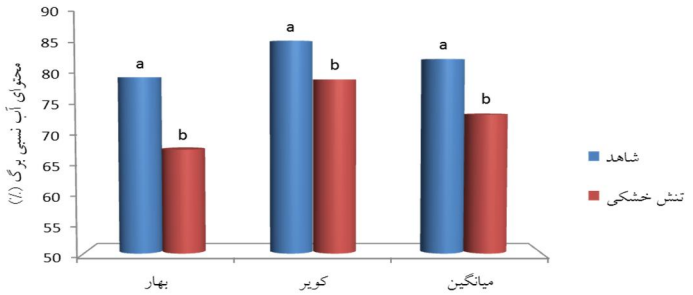
* و **: بترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 5% و 1% می‌باشد

جدول 2- مقایسه میانگین سطوح تنش و ارقام کویر و بهار برای صفات مورد مطالعه

Table 2. Mean comparison of stress levels and Kavir and Bahar cultivars for studied traits

سطوح تنش	سطح ویژه برگ (سانتی‌متر مربع بر گرم)	ارتفاع گیاهچه (سانتی متر)	وزن تر گیاهچه (گرم)	وزن خشک گیاهچه (گرم)
شاهد	156/09a	17/15a	0/34a	0/10a
تیمار آبی	187/63b	14/14b	0/29b	0/06b
ارقام				
کویر	149/89a	16/70a	0/356a	0/11a
بهار	193/82b	14/59b	0/269b	0/06b

حروف متفاوت در هر ستون نشاندهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون F می‌باشد



شکل 1- مقایسه میانگین ترکیب تیماری ارقام کویر و بهار با دو سطح شاهد و تنش خشکی برای صفت محتوای آب نسبی برگ

Figure 1. Comparison of mean treatment composition of Kavir and Bahar cultivars with two levels of control and drought stress for leaf relative water content

تحلیل الگوی پروتئینی ارقام گندم بهاره تحت تنش خشکی

الکتروفورز دوبعدی با رنگ‌آمیزی به روش کوماسی بلو منجر به شناسایی تعداد 20 لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای تفاوت معنی‌دار بین دو شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم کویر و تعداد 86 لکه پروتئینی تکرارپذیر دارای تفاوت معنی‌دار بین شرایط شاهد و تنش خشکی در رقم بهار شد (جدول 3، شکل 2 و 3). همانطور که در جدول 3 دیده می‌شود 20 لکه پروتئینی در رقم کویر بین شرایط فاقد تنش (شاهد) و تنش خشکی تفاوت بیان معنی‌دار داشتند که از بین آنها 9 لکه پروتئینی فقط در شرایط شاهد توسط نرم‌افزار Same spot progenesis شناسایی و نشانمند شدند. بقیه لکه‌های پروتئینی در شرایط تنش کاهش بیان نشان دادند (جدول 3 و شکل 2). علاوه بر این در رقم بهار 40 لکه پروتئینی کاهش

بیان و 46 لکه پروتئینی فقط در شرایط شاهد دیده شدند (جدول 3 و شکل 3). علاوه بر این تعداد 10 لکه پروتئینی دارای تفاوت معنی‌دار بین شرایط شاهد و تنش خشکی بین دو رقم مشترک بودند (جدول 3).

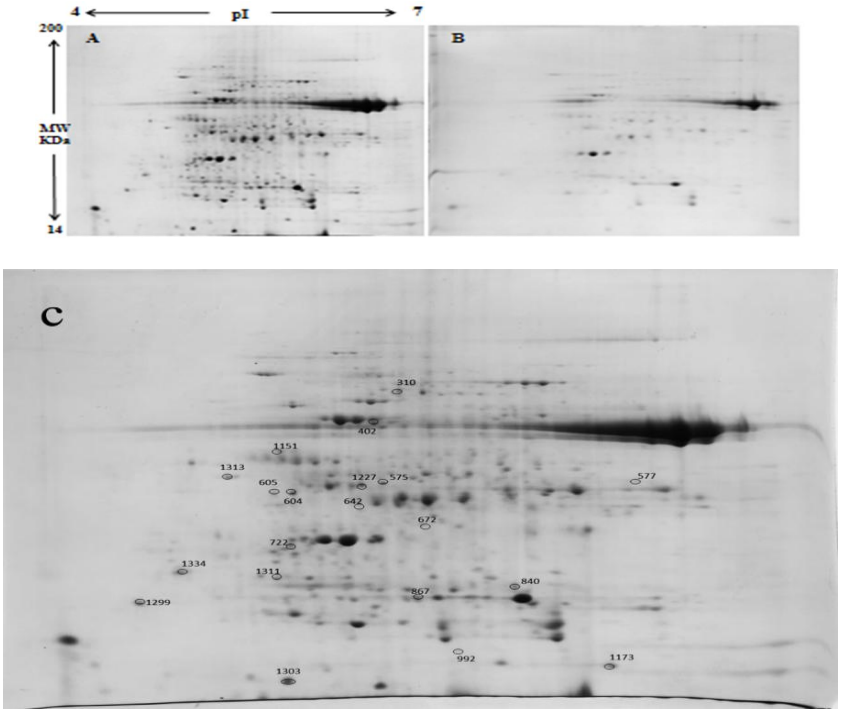
بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که در طی تنش یکسری از پروتئین‌ها افزایش بیان یا کاهش بیان می‌یابند و برخی از پروتئین‌ها در طی تنش بیان نمی‌شوند (11،33). مشتاق و همکاران (21) عنوان کردند که در برنج تحت تنش کمبود آب تعداد لکه‌های پروتئینی دارای کاهش بیان بیشتر است. از طرف دیگر، مشخص شده است که تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطوح بالاتر تنش بیش از سطوح پائین است. به عبارتی هرچه سطح تنش بیشتر شود پروتئین‌های بیشتری برای مقابله با تنش واکنش نشان می‌دهند و همچنین رقم متحمل کمتر از رقم حساس تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد (11).

جدول 3- لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار در دو رقم کویر و بهار و نوع تغییر آنها تحت تنش خشکی

Table 3. Protein spots with significant expression change in Kavir and Bahar cultivars and their variation type under drought stress

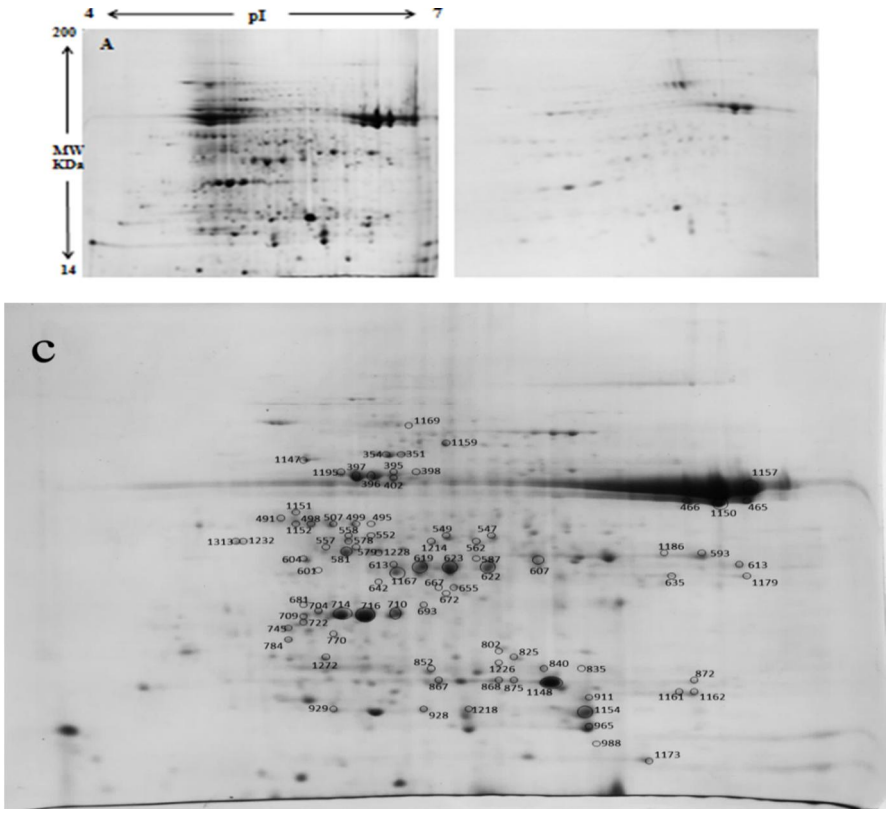
لکه‌های پروتئینی دارای کاهش بیان معنی‌دار در رقم کویر	لکه‌های پروتئینی رویت شده فقط در شرایط شاهد در رقم کویر	لکه‌های پروتئینی دارای کاهش بیان معنی‌دار در رقم بهار		لکه‌های پروتئینی رویت شده فقط در شرایط شاهد در رقم بهار		
1311	867*	395	562	604*	840*	667
310	1299	499	351	704	911	398
604*	992	507	1148	802	709	1161
1303	1173*	710	1147	578	770	1167
840*	577	875	714	557	693	1228
575	722*	1154	1195	558	491	552
1313*	672*	354	601	1159	929	
402*	605	498	872	581	1214	
1227	642*	988	1162	745	672*	
1151*		619	1157	642*	1232	
1334		716	402*	825	928	
		868	1150	579	722*	
		396	1226	852	613	
		867*	465	1152	835	
		549	784	1169	655	
		623	635	587	1179	
		965	547	631	607	
		397	622	1313*	495	
		466	1272	681	1151*	
		593	1186	1173*	1218	

*: نشان‌دهنده لکه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم کویر و بهار می‌باشد



شکل 2- مقایسه الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم کویر در شرایط شاهد (A) با تنش خشکی (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار روی ژل مرجع (C)

Figure 2. Comparison of two-dimensional electrophoresis pattern of Kavir cultivar in control condition (A) with drought stress (B) and protein spots with significant change on reference gel (C).

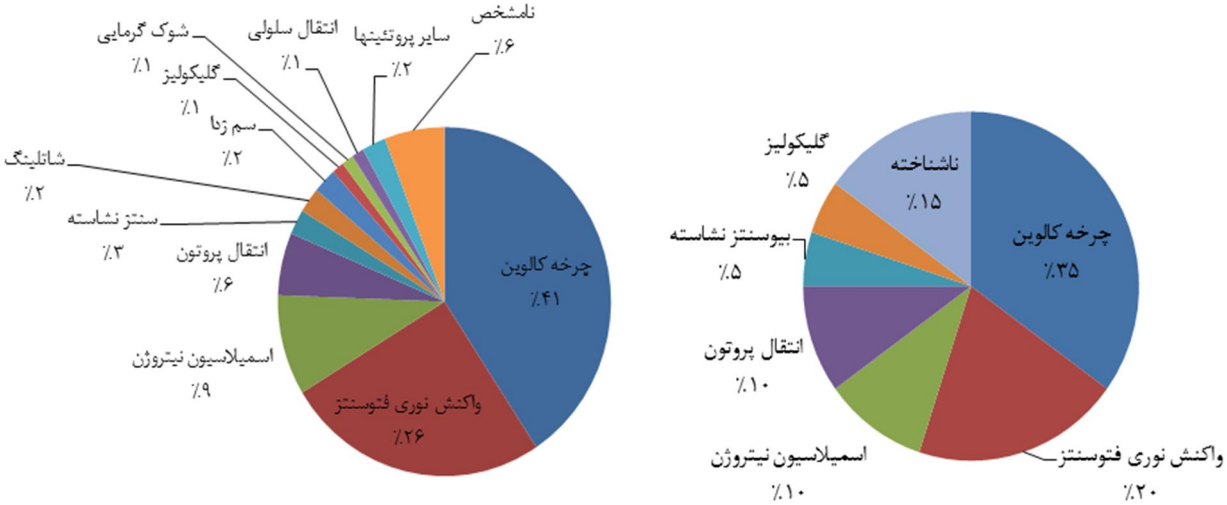


شکل 3- مقایسه الگوی الکتروفورز دوبعدی رقم بهار در شرایط شاهد (A) با تنش خشکی (B) و لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار روی ژل مرجع (C)

Figure 2. Comparison of two-dimensional electrophoresis pattern of Bahar cultivar in control condition (A) with drought stress (B) and protein spots with significant change on reference gel (C).

نتایج نشان داد که در رقم کویر تعداد 20 لکه پروتئینی تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند که از این تعداد با استفاده از روش MALDI-TOF تعداد 18 پروتئین شناسایی شدند و مشخصات این پروتئین‌ها در جدول 4 آورده شده است. سپس از طریق جستجو در پایگاه اینترنتی Universal Protein Sequence database (http://www.uniprot.org) و تحقیقات انجام شده در این زمینه پروتئین‌های دارای تغییرات بیان مشخص شدند. پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار مربوط به رقم کویر در شش گروه عملکردی که در شکل 4 بصورت نموداری تفکیک شده‌اند قرار گرفتند. چرخه کالوین (هفت لکه پروتئینی)، واکنش نوری فتوسنتز (چهار لکه)، اسمیلاسیون نیتروژن (دو لکه)، انتقال پروتون (دو لکه)، بیوسنتز نشاسته (یک لکه)، گلیکولیز (یک لکه) و سه لکه پروتئینی نیز پروتئین‌های ناشناخته بودند. از طرف دیگر در رقم بهار تعداد 86 لکه پروتئینی تغییر بیان معنی‌دار نشان دادند که از این تعداد با استفاده از روش MALDI-TOF تعداد 84 عدد از آنها شناسایی شدند و مشخصات این پروتئین‌ها در جدول 5 آورده شده است. بر این اساس تعداد گروه‌های عملکردی پروتئین‌ها در رقم بهار تنوع بیشتری داشت و در 11 گروه قرار گرفتند (شکل 4). در حالی که در این رقم نیز مانند رقم کویر بیشترین درصد پروتئین‌ها مربوط به چرخه کالوین (35 لکه پروتئینی)، واکنش نوری فتوسنتز (22 لکه)، اسمیلاسیون نیتروژن (هشت لکه) و انتقال پروتون (پنج لکه) می‌باشد.

در مجموع کلیه پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار مربوط به رقم کویر در شش گروه عملکردی قرار گرفتند (شکل 4). در حالی که پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در رقم بهار در 11 گروه قرار گرفتند (شکل 4). در هر دو رقم بیشترین درصد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش مربوط به چرخه کالوین و واکنش نوری فتوسنتز بود. بعبارت دیگر، در مجموع بیشترین تعداد پروتئین‌ها مربوط به پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات بودند. در این گروه عملکردی بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی از قبیل واکنش نوری فتوسنتز، چرخه کالوین، بیوسنتز قندها، گلیکولیز و سیستم شاتلینگ مالات/اگزالواستات و ... وجود داشتند. در نتیجه میزان مشارکت بالای پروتئین‌ها در این گروه نشاندهنده اهمیت بالای این دسته از پروتئین‌ها در رشد و نمو گیاه و مقابله با تنش خشکی است. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده در مطالعه پروتئوم ذرت (25) و برنج (24) می‌باشد.



شکل4- فراوانی نسبی گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در رقم کویر (سمت راست) و رقم بهار (سمت چپ)

Figure 4. Relative frequency of responsive protein groups to drought stress in Kavir (right) and Bahar (left)

در رقم کویر بیشترین پروتئین‌ها درگروه چرخه کالوین، فروکتوز بیس فسفات آلدولاز[1](شامل لکه‌های پروتئینی 310، 577 و 1151) و همچنین پیش ماده زیرواحد کوچک روبیسکو (شامل لکه‌های پروتئینی 992 و 672) بودند بودند. در حالی که در رقم بهار بیشترین پروتئین‌ها در چرخه کالوین به ترتیب شامل پروتئین روبیسکو اکتیواز A (شامل لکه‌های پروتئینی شماره 549، 593، 587، 562، 1214و 613 و 547)، فروکتوز 1 و 6-بیس فسفات آلدولاز[2] (لکه‌های پروتئینی شماره 619، 623، 607، 1151، 1167 و 1186)، زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده روبیسکو (لکه‌های پروتئینی466، 1169، 1157، 1150 و 465)، زیر واحد کوچک تنظیم‌کننده (لکه‌های پروتئینی 1154، 988 و 835)، پروتئین اتصال یافته به زیر واحد بزرگ روبیسکو (لکه‌های پروتئینی 354، 351 و 1195)، سدوهپتولوز 1 و 7-بیس فسفات[3] (لکه‌های پروتئینی شماره 581، 579 و 1228) و فسفوریبولوکیناز (لکه‌های پروتئینی 557، 558 و 552) بودند.

1- Fructose-bisphosphate aldolase 2- Fructose 1,6-biphosphate aldolase 3- Sedoheptulose-1,7-biphosphate

روبیسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز است که از چندین زیر واحد بزرگ کاتالیز کننده (لکه‌های 466، 1169، 1157، 1150 و 465 در رقم بهار) و چند زیر واحد کوچک تنظیم‌کننده (لکه‌های 1154، 988 و 835 در رقم بهار) تشکیل شده است (27). در این آزمایش لکه شماره 992 و لکه 672 در رقم کویر نشان‌دهنده پیش‌ماده تشکیل‌دهنده زیرواحد کوچک آنزیم روبیسکو بود. در تجزیه پروتئوم غلاف برگ برنج در طی تنش کمبود آب توسط علی و کوماتسو (1) گزارش شده است که زیر واحد بزرگ و کوچک روبیسکو کاهش یافته است. همچنین کاهش بیان زیرواحد کوچک روبیسکو در طی تنش خشکی در لاین‌های حساس گندم گزارش شده است که نشان‌دهنده نقش آن در تحمل به تنش خشکی در گندم می‌باشد (8). از طرف دیگر، گزارش شده است که پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز مانند پروتئین اتصال یافته به روبیسکو، روبیسکو اکتیواز (لکه‌های شماره 549، 593، 587، 562، 1214، 613 و 547 در رقم بهار) در رقم حساس جو کاهش بیان نشان دادند، در حالی که این پروتئین‌ها در رقم متحمل جو تغییر بیان نداشته و یا افزایش بیان نشان دادند (16).

از طرف دیگر، مرحله یا فاز سوم چرخه کالوین توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (19). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این فاز شامل سدوهپتولوز 1 و 7-بیس فسفات (لکه‌های شماره 581، 579 و 1228 در رقم بهار و لکه شماره 575 در رقم کویر) و فروکتوز 1 و 6-بیس فسفات آلدولاز (لکه‌های شماره 619، 623، 607، 1151، 1167 و 1186 در رقم بهار و لکه‌های 310، 577 و 1151 در رقم کویر) در این آزمایش شناسایی شدند. این دو آنزیم با همدیگر واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت نتیجه آن تشکیل ریبولوز-5-فسفات[1] (لکه شماره 1272 در رقم بهار و 1311 در رقم کویر) می‌باشد. سپس ریبولوز-5-فسفات فسفریله شده و RuBP را تشکیل دهد که این فسفریله شدن توسط فسفوریبولوکیناز (لکه شماره 557، 558 و 552 در رقم بهار) انجام می‌شود که در مطالعه حاضر شناسایی شد. بعضی از تریوزفسفات‌های تولید شده در چرخه کالوین برای بیوسنتز قند و نشاسته استفاده می‌شوند (30). در مجموع با توجه به کاهش یا عدم بیان پروتئین‌های ذکر شده، رقم بهار در مسیر متابولیکی چرخه کالوین تحت تنش خشکی آسیب بیشتری می‌بیند (1،8).

از طرف دیگر تعداد 22 پروتئین از رقم بهار در گروه واکنش نوری فتوسنتز قرار گرفتند که شامل لکه‌های پروتئینی 704، 710، 578، 875، 825، 716، 868، 867، 631، 1313، 1148، 714، 1173، 709، 872، 1162، 929، 1232، 928، 1218، 398 و 1161 بودند. چهار پروتئین از رقم کویر شامل لکه‌های شماره 867، 1173، 1313 و 1227 نیز در این گروه قرار داشتند. در مجموع در رقم بهار بیشترین پروتئین‌ها درگروه واکنش نوری فتوسنتز مربوط به، پروتئین‌های OEC[2] (شامل لکه‌های پروتئینی 704، 710، 875، 716، 868، 1148، 714، 709، 872، 1162، 929 و 1161) و همچنین پروتئین پپتیدیل-پرولیل سیس-ترانس ایزومراز یا CYP38 (شامل لکه‌های پروتئینی 1232 و 1313) بودند. در حالی که در رقم کویر از هر پروتئین کمپلکس b6/f (Cyt) (لکه پروتئینی 1173)، پروتئین‌های متصل شده به کلروفیل a/b (لکه پروتئینی 867)، CYP38 (لکه پروتئینی 1313) و HCF136 (لکه پروتئینی 1227) یک پروتئین تحت تنش القا شدند. پروتئین‌های OEC در پایداری کمپلکس فتوسیستم II نقش دارند (14) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به فتوسیستم II می‌شود (29). بنابراین با توجه به کاهش بیان یا عدم بیان این پروتئین‌ها در رقم حساس بهار، باعث اختلال در فعالیت فتوسیستم II شده و در نهایت کارایی واکنش نوری کاهش می‌یابد. در حالی که در رقم متحمل کویر این پروتئین‌ها تغییر معنی‌داری نشان ندادند. از طرف دیگر، پروتئین CYP38 تنظیم فعالیت فسفاتاز پروتئین D1 داخل غشای تیلاکوئید را بر عهده دارد. بنابراین با توجه به نقش این پروتئین فسفاتاز در تجمع و سنتز زیر واحد D1 فتوسیستم II می‌توان اذعان داشت که پروتئین CYP38 در تجمع و ساخت فتوسیستم II نقش دارد و گزارش شده است که این پروتئین در رقم حساس تحت تنش عدم بیان نشان می‌دهد (18) که این نتایج مشابه نتایج بدست آمده از این آزمایش می‌باشد.

در ارقام کویر و بهار بیشترین پروتئین‌ها درگروه اسمیلاسیون نیتروژن، آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS) (شامل لکه‌های پروتئینی 604، 499، 507، 498، 1152، 601، 491 و 784 در رقم بهار و لکه‌های پروتئینی 604 و 605 در رقم کویر) بود. این آنزیم، آنزیم کلیدی مسیر اصلی ساخت نیتروژن معدنی و انتقال مجدد آن در گیاهان است و گزارش شده است که در پاسخ به تنش خشکی و شوری فراوانی پلی‌پپتیدهای آنزیم GS و فعالیت آن کاهش می‌یابد (27) که با توجه به کاهش بیان و عدم بیان پروتئین‌های بیشتری در رقم حساس بهار در مقایسه با کویر، این رقم در این گروه پروتئینی نیز تحت تنش خشکی بیشتر آسیب‌پذیر است.

در سایر گروه‌های پروتئینی، بیشترین تعداد پروتئین‌ها در رقم بهار، زیر واحد بتای کمپلکس ATP سنتاز مربوط به گروه انتقال پروتون (شامل لکه‌های پروتئینی 395، 396، 397) و مالات دهیدروژناز مربوط به گروه شاتلینگ مالات/اگزالواستات (شامل لکه‌های پروتئینی 635 و 1179) بودند. در حالی که در رقم بهار و کویر بقیه گروه‌های پروتئینی شامل تک پروتئین منحصر به فرد بودند و در مجموع تعداد کل پروتئین‌های کاهش بیان یافته یا عدم بیان داشته در هر گروه در رقم بهار بیشتر بود که منجر به آسیب بیشتر این رقم تحت تنش خشکی شد (جدول3 و 4).

1- Ribulose-5-phosphate

2- Oxygen-evolving complex

جدول 4- اسامی و خصوصیات پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در رقم کویر

Table 4. Names and characteristics of responsive proteins to drought stress in Kavir

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	score	Theoretical MW (KDa)	Theoretical pI	Experimental MW (KDa)	Experimental pI	Taxonomy
چرخه کالوین	1311	gi|473954256	putative ribose-5-phosphate isomerase	375	22/50	4/75	34/58	5/18	*Triticum urartu*
	310	gi|473848356	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	1012	42/21	5/94	79/73	5/71	*Triticum urartu*
	992	gi|82619	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone 234) - wheat (fragment)	130	15/57	8/95	19/62	5/96	*Triticum aestivum*
	577	gi|475552156	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	932	37/23	6/38	57/31	6/73	*Aegilops tauschii*
	575	gi|1173347	Full=Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	389	42/55	6/04	57/41	5/64	*Triticum aestivum*
	1151	gi|119745	Full=Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	261	44/70	5/16	64/88	5/20	*Triticum aestivum*
	672	gi|82619	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone 234) - wheat (fragment)	68	15/57	8/95	47/51	5/80	*Triticum aestivum*
واکنش نوری	867	gi|474121685	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	510	29/30	8/69	30/24	5/78	*Triticum urartu*
	1173	gi|68566191	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic	357	24/11	8/47	16/78	6/63	*Triticum aestivum*
	1313	gi|474219338	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	741	46/10	4/82	58/62	4/97	*Triticum urartu*
	1227	gi|357117071	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like	812	37/01	5/40	56/91	5/55	*Brachypodium distachyon*
اسمیلاسیون نیتروژن	604	gi|121340	Full=Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	684	47/41	5/11	55/09	5/25	*Hordeum vulgare*
	605	gi|121340	Full=Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	450	47/41	5/11	54/99	5/17	*Hordeum vulgare*
انتقال پروتون	1299	gi|475627717	ATP synthase delta chain, chloroplastic	361	17/72	4/49	28/73	4/59	*Aegilops tauschii*
	402	gi|525291	ATP synthase beta subunit	1265	59/33	5/56	71/65	5/60	*Triticum aestivum*
بیوسنتز نشاسته	722	gi|473787383	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic	369	31/70	5/00	42/77	5/24	*Triticum urartu*
گلیکولیز	840	gi|1174749	Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic	149	27/14	5/24	32/67	6/21	*Secale cereale*
ناشناخته	1303	-					15/13	5/63	
	1334	gi|226533870	cp31BHv [*Triticum aestivum*]	314	18/99	4/85	36/00	4/76	*Triticum aestivum*
	642	-					51/05	5/54	

جدول 5- اسامی و خصوصیات پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در رقم بهار

Table 5. Names and characteristics of responsive proteins to drought stress in Bahar

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	score	Theoretical MW (KDa)	Theoretical pI	Experimental MW (KDa)	Experimental pI	Taxonomy
چرخه کالوین	557	gi|125580	Phosphoribulokinase, chloroplastic	770	45/51	5/72	53/39	5/33	*Triticum aestivum*
	558	gi|125580	Phosphoribulokinase, chloroplastic	912	45/51	5/72	53/39	5/41	*Triticum aestivum*
	581	gi|1173347	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	1193	42/55	6/04	51/59	5/40	*Triticum aestivum*
	1154	gi|132107	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain clone 512	136	13/28	5/84	26/01	6/39	*Triticum aestivum*
	354	gi|474438538	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	2284	83/35	7/79	67/04	5/58	*Triticum urartu*
	988	gi|132107	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain clone 512	204	13/28	5/84	21/80	6/42	*Triticum aestivum*
	619	gi|473848356	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	870	42/21	5/94	49/25	5/72	*Triticum urartu*
	579	gi|1173347	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	1020	42/55	6/04	51/83	5/50	*Triticum aestivum*
	549	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1728	51/24	6/90	53/86	5/82	*Triticum urartu*
	623	gi|357157399	fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic-like	987	42/19	6/26	48/94	5/83	*Brachypodium distachyon*
	466	gi|31087879	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	1425	53/74	6/22	59/94	6/79	*Hordeum comosum*
	1169	gi|3334480	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	501	53/47	6/13	71/80	5/62	*Digitalis purpurea*
	593	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1453	51/24	6/90	50/97	6/85	*Triticum urartu*
	587	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1008	51/24	6/90	51/44	5/94	*Triticum urartu*
	562	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	925	51/24	6/90	53/23	5/95	*Triticum urartu*
	351	gi|474438538	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	2310	83/35	7/79	67/19	5/64	*Triticum urartu*
	1147	gi|134102	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplasticPrecursor	2224	57/66	4/83	66/26	5/25	*Triticum aestivum*
	1195	gi|474438538	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	1802	83/35	7/79	67/19	5/54	*Triticum urartu*
	1157	gi|31087879	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	1603	53/74	6/22	60/95	6/96	*Hordeum comosum*
	1150	gi|31087879	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	1691	53/74	6/22	59/63	6/92	*Hordeum comosum*
	1214	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1433	51/24	6/90	53/08	5/77	*Triticum urartu*

ادامه جدول 5

Continued Table 5

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	Score	Theoretical MW (KDa)	Theoretical pI	Experimental MW (KDa)	Experimental pI	Taxonomy
چرخه کالوین	672	gi|82619	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone 234) - wheat (fragment)	68	15/57	8/95	44/57	5/80	*Triticum aestivum*
	465	gi|31087879	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	1457	53/74	6/22	60/10	6/95	*Hordeum comosum*
	613	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1274	51/24	6/90	49/49	6/94	*Triticum urartu*
	835	gi|473721334	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain PW9, chloroplastic	280	19/81	8/81	33/42	6/40	*Triticum urartu*
	655	gi|475397076	50S ribosomal protein L4, chloroplastic	476	31/10	5/27	46/29	5/85	*Aegilops tauschii*
	547	gi|474153435	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	1356	51/24	6/90	53/93	6/01	*Triticum urartu*
	607	gi|573961186	fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic-like	649	42/21	6/38	50/03	6/19	*Oryza brachyantha*
	495	gi|473912215	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic	628	47/33	6/03	56/43	5/52	*Triticum urartu*
	1151	gi|119745	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	261	44/70	5/16	57/99	5/20	*Triticum aestivum*
	1272	gi|357111403	probable ribose-5-phosphate isomerase-like	512	29/08	5/72	34/67	5/32	*Brachypodium distachyon*
	1167	gi|473848356	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	913	42/21	5/94	48/40	5/61	*Triticum urartu*
	1228	gi|1173347	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	332	42/55	6/04	51/67	5/56	*Triticum aestivum*
	1186	gi|473936969	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	1117	69/88	8/55	50/97	6/70	*Triticum urartu*
	552	gi|125580	Phosphoribulokinase, chloroplastic	593	45/51	5/72	53/78	5/49	*Triticum aestivum*
واکنش نوری	704	gi|474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	818	34/64	5/75	42/00	5/30	*Triticum urartu*
	710	gi|474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	1254	34/64	5/75	41/77	5/61	*Triticum urartu*
	578	gi|473965828	Chlorophyll a-b binding protein 1, chloroplastic	106	30/44	5/25	52/06	5/32	*Triticum urartu*
	875	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	467	27/42	8/84	31/08	6/10	*Triticum aestivum*
	825	gi|473781575	Thylakoid lumenal 29 kDa protein, chloroplastic [Triticum urartu]	830	38/45	7/59	34/82	6/10	*Triticum urartu*
	716	gi|474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	1197	34/64	5/75	41/45	5/49	*Triticum urartu*
	868	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	790	27/42	8/84	31/24	6/01	*Triticum aestivum*

ادامه جدول 5

Continued Table 5

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	score	Theoretical MW (KDa)	Theoretical pI	Experimental MW (KDa)	Experimental pI	Taxonomy
واکنش نوری	867	gi|474121685	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	510	29/30	8/69	31/24	5/78	*Triticum urartu*
	631	gi|357117071	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like	872	37/01	5/40	48/32	5/54	*Brachypodium distachyon*
	1313	gi|474219338	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	741	46/10	4/82	53/15	4/97	*Triticum urartu*
	1148	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	886	27/42	8/84	30/61	6/24	*Triticum aestivum*
	714	gi|474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	1068	34/64	5/75	41/53	5/39	*Triticum urartu*
	1173	gi|68566191	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic	357	24/11	8/47	18/52	6/63	*Triticum aestivum*
	709	gi|474352688	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	889	34/64	5/75	41/77	5/25	*Triticum urartu*
	872	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	462	27/42	8/84	31/16	6/82	*Triticum aestivum*
	1162	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	688	27/42	8/84	29/05	6/82	*Triticum aestivum*
	929	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	280	27/42	8/84	26/48	5/36	*Triticum aestivum*
	1232	gi|474219338	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic	602	46/10	4/82	53/39	5/01	*Triticum urartu*
	928	gi|544700	light-harvesting complex I, partial (chloroplast)	325	24/44	8/11	26/56	5/73	*Hordeum vulgare*
	1218	gi|18650668	temperature stress-induced lipocalin	491	21/81	5/50	26/01	5/90	*Triticum aestivum*
	398	gi|474105633	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic	500	71/99	5/70	63/53	5/67	*Triticum urartu*
	1161	gi|131394	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	610	27/42	8/84	29/13	6/78	*Triticum aestivum*
اسمیلاسیون نیتروژن	604	gi|121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	684	47/41	5/11	50/42	5/25	*Hordeum vulgare*
	499	gi|71362640	plastid glutamine synthetase isoform GS2c	1161	47/02	5/75	56/12	5/43	*Triticum aestivum*
	507	gi|121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	224	47/41	5/11	55/96	5/34	*Hordeum vulgare*
	498	gi|121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	372	47/41	5/11	56/12	5/27	*Hordeum vulgare*
	1152	gi|121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	583	47/41	5/11	56/51	5/21	*Hordeum vulgare*
	601	gi|121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	588	47/41	5/11	50/50	5/34	*Hordeum vulgare*

ادامه جدول 5

Continued Table 5.

گروه عملکردی	شماره لکه	Accession number	نام پروتئین	Score	Theoretical MW (KDa)	Theoretical pI	Experimental MW (KDa)	Experimental pI	Taxonomy
اسمیلاسیون نیتروژن	491	gi|71362640	plastid glutamine synthetase isoform GS2c	670	47/02	5/75	56/82	5/14	*Triticum aestivum*
	784	gi|71361900	glutamine synthetase isoform GS1a	156	39/40	5/41	37/71	5/18	*Triticum aestivum*
انتقال پروتون	395	gi|14017579	ATP synthase CF1 beta subunit	1665	53/88	5/06	63/92	5/59	*Triticum aestivum*
	396	gi|14017579	ATP synthase CF1 beta subunit	1951	53/88	5/06	63/68	5/53	*Triticum aestivum*
	397	gi|14017579	ATP synthase CF1 beta subunit	1876	53/88	5/06	63/61	5/45	*Triticum aestivum*
	402	gi|525291	ATP synthase beta subunit	1265	59/33	5/56	63/22	5/60	*Triticum aestivum*
	1226	gi|47607439	mitochondrial ATP synthase precursor	829	27/09	7/71	33/34	6/03	*Triticum aestivum*
سنتز نشاسته	965	gi|21322655	adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase	151	21/97	5/68	23/59	6/39	*Triticum aestivum*
	722	gi|473787383	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic	369	31/70	5/00	40/91	5/24	*Triticum urartu*
سیستم شاتلینگ	635	gi|475577109	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	613	34/93	5/26	48/08	6/72	*Aegilops tauschii*
	1179	gi|475577109	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	639	34/93	5/26	47/85	6/95	*Aegilops tauschii*
سم‌زدا	911	gi|474023258	Glutathione S-transferase DHAR2	593	45/26	8/30	28/12	6/38	*Triticum urartu*
	667	gi|7619802	putative glyoxalase I	463	31/83	5/39	45/28	5/74	*Triticum aestivum*
گلیکولیز	840	gi|1174749	Triosephosphate isomerase, cytosolic	149	27/14	5/24	33/11	6/21	*Secale cereale*
شوک گرمایی	1159	gi|473970552	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	745	76/36	6/16	70/63	5/83	*Triticum urartu*
انتقال سلولی	681	gi|475620929	Alpha-soluble NSF attachment protein	776	35/16	4/96	43/40	5/25	*Aegilops tauschii*
سایر پروتئین-ها	852	gi|473965118	Proteasome subunit alpha type-2	481	41/13	6/05	32/72	5/75	*Triticum urartu*
	693	gi|461682256	tetratricopeptide repeat containing protein	623	36/53	7/49	42/70	5/71	*Triticum monococcum*
ناشناخته	802	gi|475516614	hypothetical protein F775_17756	222	37/52	8/33	36/46	6/06	*Aegilops tauschii*
	745	gi|475619395	Protein grpE	526	33/99	5/50	39/58	5/17	*Aegilops tauschii*
	642	-					47/30	5/54	
	770	gi|38679331	harpin binding protein 1	697	29/52	9/51	38/65	5/37	*Triticum aestivum*
	622	-					49/18	5/99	

نتایج تجزیه پروتئوم نشان داد که پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار مربوط به ارقام کویر و بهار بترتیب در شش و 11 گروه عملکردی قرار گرفتند. همچنین، در هر دو رقم بیشترین درصد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش مربوط به چرخه کالوین و واکنش نوری فتوسنتز بودند. بعبارت دیگر، در مجموع بیشترین تعداد پروتئین‌ها مربوط به پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات بودند که در این گروه عملکردی بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی از قبیل واکنش نوری فتوسنتز، چرخه کالوین، بیوسنتز قندها، گلیکولیز و سیستم شاتلینگ مالات/اگزالواستات وجود داشتند. بطور کلی، بیشترین پروتئین‌ها درگروه چرخه کالوین بترتیب در رقم کویر و بهار پروتئین‌های فروکتوز بیس فسفات آلدولاز و روبیسکو اکتیواز A بودند. از طرف دیگر در رقم بهار بیشترین پروتئین‌ها درگروه واکنش نوری فتوسنتز مربوط به، پروتئین‌های OEC بودند. در حالی که در رقم کویر از هر پروتئین کمپلکس b6/f (Cyt)، پروتئین متصل شده به کلروفیل a/b، CYP38 و HCF136 یک پروتئین تحت تنش القا شدند. بر طبق این نتایج، در مجموع چندین گروه پروتئینی در تحمل و حساسیت گندم بیشتر دخیل بودند که در هر گروه پروتئینی نیز پروتئین‌های خاصی در مکانیسم تحمل و حساسیت بیشتر نقش داشتند.

منابع

1. Ali, G.M. and S. Komatsu. 2006. Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. Journal of Proteome Research, 5(2): 396-403.
2. Arias, D. 2007. Calibration of LAI-2000 to Estimate Leaf Area Index and Assessment of its Relationship with stand productivity in six Native and Introduced tree Species in costarica. Forest Ecology and Management, 247: 85-193.
3. Bray, E.A. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data. Annals of Botany, 89: 803-811.
4. Caruso, G., C. Cavaliere, P. Foglia, R. Gubbiotti, R. Samperi and A. Laganà. 2009. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Science, 177: 570-576.
5. Chang, W.W., L. Huang, M. Shen, C. Webster, A.L. Burlingame and J.K. Roberts. 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment and identification of proteins by mass spectrometry. Plant Physiology, 122: 295-318.
6. Costa, R., N. Bahrman, J.M. Frigerio, A. Kremer and C. Plomion. 1998. Water deficit-response proteins in maritime pines. Plant Molecular Biology, 38: 587-596.
7. 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 roteins. Electrophoresis, 7: 52-4.
8. Demirevska, K., D. Zasheva, R. Dimitrov, L. Simova-Stoilova, M. Stamenova, and M. Feller. 2009. Drought stress effects on rubisco in wheat: Changes in the rubisco large subunit. Acta Physiologiae Plantarum, 31: 1129-1138.
9. Derogar, H., B. Fakheri, N. Mehdinezhad and R. Mohammadi. 2019. Evaluation of some biochemical traits in cultivars and wild species of wheat under drought stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 12(3): 685-696. (In Persian).
10. Firoozi, B., O. Sofalian, M. Shokrpour, A. Rasoulzadeh and F. Ahmadpoor. 2012. Assessment of Drought Tolerance Indices and their Relation with ISSR Markers in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). Notulae Scientia Biologicae, 4(3): 143-150.
11. Hashimoto, M. and S. Komatsu. 2007. Proteomic analysis of rice seedling during cold stress. Proteomics, 7: 293-302.
12. Hurkman, W.J. and C.K. Tanaka. 1987. The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. Plant Physiology, 83: 517-524.
13. Hurkman, W.J., C.K. Tanaka and F.M. Dupont. 1988. The effects of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. Plant Physiology, 88: 1263-1273.
14. Ifuku, K., S. Ishihara, R. Shimamoto, K. Ido and F. Sato. 2008. Structure, function, and evolution of the *PsbP* protein family in higher plants. Photosynthesis Research, 98: 427-437.
15. Kamal, A.H.M., K-H. Kim, K-H. Shin, J-S. Choi, B-K. Baik, H. Tsujimoto, H.Y. Heo, C-S. Park and S-H. Woo. 2010. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Australian Journal of Crop Science, 4: 196-208.
16. Kausar, R., M. Arshad, A. Shahzad and S. Komatsu. 2013. Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. Amino Acids, 44: 345-359.
17. Komatsu, S. 2006. Plant proteomics databases: Their status in 2005. Current Bioinformatics, 1: 33-36.
18. Lepedu, H., A. Toma, S.A. Juri, Z. Katani, V. Cesar and H. Fulgosi. 2009. Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana*. Food Technology and Biotechnology, 47(3): 275-280.
19. Macdonald, F.D. and B.B. Buchanan. 1997. The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: Dennis, D.T., D.H. Turpin, D.D. Lefebvre and D.B. Layzell. (Eds.), Plant Metabolism (2nd ed., pp. 299-313). Essex: Addison Wesley Longman.
20. Morant-Manceau, A., E. Pradier and G. Tremblin. 2004. Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species salt stress. Journal of Plant Physiology, 169: 25-33.
21. Mushtaq, R., S. Katiyar and J. Bennett. 2008. Proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in rice endosperm affecting grain quality. Journal of Crop Science and Biotechnology, 11: 227-232.
22. Naghavi, M.R. 2014. .Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. PhD Thesis in Plant Breeding (Biometrical Genetics). Department of Plant Breeding and Biotechnology. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Iran. (In Persian).
23. Ng, J.H. and L.L. Ilag. 2002. Functional proteomics: separating the substance from the hype. Drug Discovery Today, 7: 504-505.
24. Nozu, Y., A. Tsugita and K. Kamijo. 2006. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. Proteomics, 6: 3665-3670.

25. Porubleva, L., K. Vander Velden, S. Kothari, D.J. Oliver and P.R. Chitnis. 2001. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. Electrophoresis, 22: 1724-1738.
26. Rampino, P., S. Pataleo, C. Gerardi, G. Mita and C. Perrotta. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant, Cell and Environment, 29: 2143-2152.
27. Santos, C., A. Pereira, S. Pereira and J. Teixeira. 2004. Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. Scientia Horticulturae, 103: 101-111.
28. Spreitzer, R.J. and M.E. Salvucci. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. Annual Review of Plant Biology, 53: 449-475.
29. Takahashi, S. and N. Murata. 2008. How do environmental stresses accelerate photo inhibition? Trends Plant Science, 13: 178-182.
30. Tamoi, M., M. Nagaoka, Y. Yabuta and S. Shigeoka. 2005. Carbon metabolism in the Calvin cycle. Plant Biotechnology, 22: 355-360.
31. van Wijk, K.J. 2001. Challenges and prospects of plant proteomics. Plant Physiology, 126: 501-508.
32. Wang, W., B. Vinocur, O. Soseyov and A. Altman. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sciences, 9: 244-52.
33. Zang, X. and S. Komatsu. 2007. A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochemical, 68: 426-437.
34. Zivy, M. 1987. Genetic variability for heat shock proteins in common wheat. Theoretical Applied Genetics, 74: 209-213.

Evaluation of Protein Pattern and Tolerance Mechanism in Two Cultivars of Wheat under Drought Stress in Seedling Stage

Mohammad Reza Naghavi[1], Mahmoud Toorchi[2] and Lello Zolla[3]

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Iran
(Corresponding author: mr_naghavi@ymail.com)
2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Molecular Biology, Tuscia University, Italy
Received: April 26, 2016 Accepted: January 5, 2020

Abstract

In order to assess the protein pattern changes in tolerant and susceptible cultivars of wheat under drought stress in seedling stage and for understanding their mechanism of stress tolerance, two cultivars of spring wheat, including Kavir (as tolerant) and Bahar (as susceptible) were cultured in the growth chamber. Proteome analysis by 2D electrophoresis and staining of gels by Commassie brilliant blue for two cultivars was performed and 20 and 86 protein spots with significant difference between control and drought condition in the Kavir and Bahar cultivars were identified, respectively. Using MALDI-TOF/TOF, 18 and 84 protein spots of them in the Kavir and Bahar was identified. Total of proteins with significant expression changes related to the Kavir were divided into six functional groups, including Calvin cycle (seven protein spots), light reaction of photosynthesis (four spots), nitrogen assimilation and proton transfer (each two spots), the biosynthesis of starch and glycolysis (each one spot) and the unknown proteins (three spots). The number of protein functional groups in the Bahar was more diversity and these proteins were divided into 11 functional groups, while in Bahar as well as Kavir the highest numbers of proteins was related to the Calvin cycle (35 protein spots), light reaction of photosynthesis (22 spots), assimilation of nitrogen (eight spots) and proton transfer (five spots). Generally, the most protein amounts in the Kavir were related to Calvin cycle such as Fructose-bisphosphate aldolase (three spots) and RuBisCO small subunit precursor (two spots), respectively. While more of proteins involved in the Calvin cycle of Bahar cultivar such as RuBisCO activase A proteins (seven spots), fructose 1, 6-biphosphate aldolase (six spots) and catalytic large subunit of RuBisCO (five spots) were. On the other hand, in Bahar, proteins of OEC (12 spots) were the largest of protein groups involved in light reaction of photosynthesis. While in the Kavir, Cytochrome b6-f complex, Chlorophyll a-b binding protein, CYP38 and HCF136 protein under drought stress just one of each apiece were induced. Also in the Kavir and Bahar, the largest of protein groups related to nitrogen assimilation were Glutamine synthetase (GS) enzyme. Generally, these results to identify and better understand of the metabolic pathways, effective proteins and important proteins involved in tolerance and sensitivity of wheat will help.

Keywords: Drought Stress, Proteomics, Vegetative stage, Wheat