

بررسی تغییرپذیری‌های الگوی بیان پروتئین در رقم‌های متحمل و حساس کلزا در شرایط تنش شوری

معروف خلیلی* و محمدرضا نقوی

استادیار بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۵)

چکیده

به منظور بررسی سازوکار تحمل و حساسیت به تنش شوری در کلزا (*Brassica napus* L.)، رقم‌های SW5001 و Sarigol به ترتیب به عنوان رقم‌های متحمل و حساس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار در گلخانه کشت شدند. نمونه‌های برگ، دو هفته پس از اعمال تنش شوری و در پایان مرحله وردمانی (روزت) برداشت شدند. پروتئین از بافت برگ استخراج و الکتروفورز دوبعدی برای بررسی بیان پروتئین‌ها در گیاهان شاهد و در شرایط تیمار شوری انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی و تجزیه لکه‌های پروتئینی با نرم‌افزار PDQuest انجام و لکه‌های پروتئینی با استفاده از طیف‌سنجی (اسپکترومتری) جرمی و به روش MALDI TOF/TOF MS شناسایی شدند. شمار هفده لکه پروتئینی با اختلاف بیان معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمار تنش شوری، تشخیص داده شدند که از این شمار ده لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک و شمار چهار و سه لکه پروتئینی به ترتیب به رقم متحمل و حساس اختصاص داشتند. پروتئین‌های مشترک شناسایی شده در گروه‌های عملکردی شامل پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری نورساخت (فتوسنتز)، چرخه کالوین، حذف پاداکسنده (آنتی‌اکسیدانت)، انتقال پیام و پایداری ساختار پروتئین‌ها طبقه‌بندی شدند. در مجموع در رقم متحمل SW5001 عامل‌های پایداری ساختار، حفظ کارایی سوخت‌وساز (متابولیسم) کربن و دفاع در برابر تنش اکسایشی در شرایط تنش به نحو مؤثری موجب ایجاد مقاومت شدند. در ضمن بیشترین نقطه قوت رقم متحمل با اتکا به پروتئین‌های منحصربه‌فرد در قسمت واکنش نوری نورساخت بود و رقم حساس بیشترین آسیب را در چرخه کالوین متحمل شد.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز دوبعدی، پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش، تحمل تنش شوری، کلزا.

Assessment of changes in protein expression pattern in tolerant and sensitive cultivars of rapeseed under salt stress

Marouf Khalili* and Mohammad Reza Naghavi

Assistant Professor, Department of Agriculture, Payam Noor University, Iran
(Received: May 11, 2016 - Accepted: Jan. 14, 2017)

ABSTRACT

To investigate the mechanisms of tolerance and sensitivity to salinity stress in canola (*Brassica napus* L.), two spring canola cultivars such as SW5001 as tolerant cultivar and Sarigol as sensitive cultivar were evaluated at two levels of salinity in factorial based on randomized complete block design with four replications using a hydroponic culture system into green house. Sampling of leaves was performed in the rosette stage and two weeks after starting of salt stress. Proteins were extracted from leaf tissues and two-dimensional electrophoresis for the study of expression of proteins in both control and salt stressed plants was performed. Staining with commassie brilliant blue and quantitative analysis of protein spot by PDQuest software was performed and protein spots were identified by mass spectrometry using MALDI TOF/TOF MS method. 17 protein spots with significant expression differences between control and treatment plants to salinity, were identified that Of these, 10 protein spots was common between two cultivars and four and three proteins were assigned only to tolerant and sensitive cultivars respectively. Common proteins identified were classified in the functional groups of photo reaction of photosynthesis, Calvin cycle, proteins involved in remove of antioxidant, signal transduction and structural stability of proteins. In generally, in the tolerant cultivar of SW5001, sustainability factors of structure, maintaining of carbon metabolism efficiency and defense against to oxidative stress under stress conditions were effectively creates resistance. The highest strength point tolerant cultivar to rely on the unique proteins was in the light reaction of photosynthesis and the most of damage suffered in sensitive cultivar related to Calvin cycle.

Keywords: 2D electrophoresis, canola, responsive proteins to stress, tolerance to salt stress.

* Corresponding author E-mail: makhalily@yahoo.com

مقدمه

کلزا مهم‌ترین گیاه دانه روغنی خانواده چلیپاییان از جنس براسیکا^۱ (کلم‌سانان) بانام علمی *Brassica napus* L. پس از سویا و نخل روغنی سومین منبع تولید روغن در جهان به شمار می‌آید. دانه کلزا محتوی ۴۵-۴۰ درصد روغن و کنجاله آن ۴۰-۳۵ درصد پروتئین دارد. روغن کلزا، در مقایسه با روغن‌های دیگر مانند آفتابگردان و سویا، به دلیل وجود اسیدهای چرب اشباع‌نشده اهمیت بیشتری دارد (Raymer, 2002). تنش شوری، به‌ویژه در مرحله گیاهچه‌ای، یکی از بازدارنده‌های توسعه کشت گیاهان از جمله کلزا به شمار می‌آید. این موضوع با توجه به موقعیت ایران از لحاظ اراضی شور می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد، زیرا ایران با داشتن ۲۷ میلیون هکتار اراضی شور در مقام نخست کشورهای ناحیه جنوب غربی آسیا قرار دارد (Ozturk et al., 1995). تحمل به شوری در گیاهان پدیده پیچیده‌ای است و با انواع سازوکارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در ارتباط است لذا شناخت سازوکار مولکولی پاسخ به تنش اهمیت بالایی دارد. در این زمینه، بیان پروتئین (پروتئومیکس) یکی از راهکارهای مهم برای درک بنیان مولکولی تحمل به تنش شوری است تا تغییر القاشده توسط تنش در سطح پروتئین‌ها شناسایی و ارزیابی شود (Thiellement et al., 2002). یک نژادگان (ژنوتیپ) متحمل به تنش در شرایط تنش شوری در مقایسه با شرایط عادی و یا در مقایسه با نژادگان حساس، از لحاظ بود یا نبود پروتئین‌های خاصی و همچنین افزایش و یا کاهش بیان آن‌ها و دیگر الگوهای بیانی، قابل بررسی و تجزیه و تحلیل است. بنابراین، بررسی پروتئین‌هایی که تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرند می‌تواند به درک سازوکار فیزیولوژیک حساسیت یا تحمل به تنش کمک کند (Thiellement et al., 2002).

نورساخت (فتوسنتز) و رشد یاخته از نخستین فرآیندهایی است که تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد. هنگامی که گیاه با تنش شوری روبه‌رو

می‌شود، رشد کلی و عملکرد گیاه کاهش می‌یابد که این امر در نتیجه اختلال در عملکرد اجزای حیاتی نورساخت مانند: نظام نوری ۲ (فتوسیستم II) و آنزیم روبیسکو است (Manna et al., 2013). نورساخت از فرآیندهای بسیار مهم در گیاهان است و مرحله نوری آن مانند مرحله تاریکی اهمیت بالایی دارد. پروتئین Oxygen evolving photosystem II از پروتئین‌های درگیر در مرحله نوری نورساخت است. کمپلکس Oxygen evolving (OEC) جزء این دسته از پروتئین‌ها بوده و در پایداری نظام نوری ۲ (PSII) نقش دارد. در ضمن، این پروتئین نقش مهمی در پایداریسازی منگنز از راه ارتباط با کمپلکس منگنز OEC بر عهده دارد. به عبارت دیگر نتیجه فعالیت این پروتئین تولید اکسیژن در چرخه انتقال الکترون است (Holmstrom et al., 2000). بر پایه گزارش (Komatsu & Tanaka, 2004) در تجزیه بیان پروتئین غلاف برگ‌های برنج در شرایط تنش شوری کلوروفیل، فراوانی پروتئین Oxygen evolving photosystem II در پاسخ به تنش شوری افزایش یافته که بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش است. همچنین پروتئین‌های PSBO-2 (متعلق به خانواده Oxygen evolving) که در بررسی‌های تأثیر تنش شوری بر الگوی پروتئینی تغییر بیان داشته‌اند، باعث پایداری گروه منگنزی می‌شوند که سایت اصلی شکسته شدن مولکول آب است (Kumara et al., 2003). از سوی دیگر، مهم‌ترین آنزیم فعال در چرخه کالوین روبیسکو (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) است که دو نوع عملکرد دارد و در مرحله‌های اولیه، در دو مسیر سوخت‌وسازی (متابولیکی) متضاد، یعنی تثبیت کربن نورساختی (در چرخه کالوین) و فرآیند تنفس نوری شرکت می‌کند. شکل یک این آنزیم در گیاهان و جلبک‌های سبز وجود داشته و هشت زیر واحد بزرگ و کوچک دارد. اگرچه زیر واحدهای بزرگ فعالیت این آنزیم را بر عهده دارد ولی، نشان داده شده است که زیر واحدهای کوچک از راه اعمال تغییراتی در ساختمان زیر

۳۴ لکه پروتئینی دارای افزایش بیان و بیست لکه دارای کاهش بیان در شرایط تنش بودند. تجزیه پروتئین‌ها از راه طیف‌سنجی جرمی و جستجو در بانک اطلاعات پروتئینی منجر به شناسایی دوازده لکه شد. سه لکه معرف انولاز، چهار لکه معرف پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به شوری و پنج پروتئین دیگر نیز جدید بودند. این پروتئین‌ها در سوخت‌وساز (متابولیسم) انرژی، نیتروژن و کربوهیدرات، حذف ROS، ساخت پروتئین‌ها و mRNA و پایداری ساختار یاخته‌ای دخیل بودند. نتایج این تحقیق نشان داد، تنش شوری با تنظیم تولید و میزان پروتئین‌های مختلف، مهارشدنی است (Yan et al., 2005). همچنین در آزمایشی که روی کلزا و در شرایط تنش شوری ناشی از کلوروسدیم انجام شد، تجزیه ژل‌های دوبعدی منجر به شناسایی یک پلی‌پپتید 12KD شد که افزایش بیان معنی‌داری داشت (Reviron et al., 1992). این پروتئین که BnD22 نامیده شد، نقش بازدارندگی برای پروتئازها را دارد و منجر به تعویق در پیری برگ‌ها می‌شود.

این پژوهش با هدف مقایسه الگوی پروتئینی الکتروفورز دوبعدی رقم‌های حساس و متحمل کلزا به منظور شناسایی پروتئین‌های دارای تغییر بیان در شرایط تنش شوری به روش طیف‌سنجی جرمی انجام شد. همچنین نقش این پروتئین‌ها در مسیرهای انتقال پیام مولکولی و ایجاد تحمل به تنش شوری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

در این پژوهش دو رقم کلزای بهاره به نام SW5001 به عنوان رقم متحمل و Sarigol به عنوان رقم حساس در مرحله گیاهچه‌ای به روش آبکشتی (هیدروپونیک) با استفاده از محلول هوگلند در سال ۱۳۹۴ در گلخانه دانشگاه مهاباد از نظر پاسخ به تنش شوری ارزیابی شدند. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عامل‌های آزمایش شامل شوری از نوع کلریدسدیم در دو سطح ۰ (شاهد) و ۳۰۰ میلی‌مولار و دو رقم کلزا

واحد‌های بزرگ، سرعت فعالیت آن‌ها را افزایش می‌دهند (Vaidyanathan et al., 2003). Yildiz et al. (2015) در نتایج بررسی بیان پروتئین‌های برگ‌های کلزا در شرایط تنش شوری به افزایش بیان این آنزیم و همبستگی آن با سازوکاری که توان نورساختی گیاه را افزایش می‌دهد، اشاره کردند. لازم به یادآوری است که در شرایط تنش فراوانی رادیکال‌های هیدروکسیل افزایش می‌یابد، که این موضوع منجر به شکسته شدن زیر واحد بزرگ می‌شود. در تنش شوری افزون بر آسیب در اجزای دخیل در نورساخت، گیاهان در شرایط تنش اکسایشی (اکسیداتیو) قرار می‌گیرند. در این راستا از اصلی‌ترین مسیرهای حذف ROS^۱ در گیاهان، فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدانت) مانند پروتئین‌های گروه superoxide dismutase (SOD) هستند که در تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به اکسیژن مولکولی دخالت دارند (Cakmak, 2005). تجمع SOD در رقم متحمل برنج و کاهش فراوانی آن در رقم حساس در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu & Tanaka, 2004). همچنین در آزمایش دیگری، فعالیت SOD در رقم حساس برنج کاهش یافت (Ashraf & Harris, 2004). از سوی دیگر، پروتئین‌های peroxiredoxin به صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان یاخته‌ای این پروتئین‌ها بیانگر نقش بسیار مهم پاداکسندگی آن‌ها در اندامک‌های یاخته‌ای است. این پروتئین‌ها افزون بر فعالیت پاداکسندگی، در کنترل انتقال سیگنال هم فعال هستند. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H₂O₂ انجام شده و آنزیم type 2 peroxiredoxin مولکول H₂O₂ را احیا می‌کند (Hosseini Salekdeh & Komatsu, 2007; Hashimoto, et al., 2009).

نتیجه یک بررسی تجزیه بیان پروتئین‌های گیاه برنج در شرایط تنش شوری نشان داد که در مجموع

افزایش و تکوان داده شد. پس از این مرحله نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد و هر ۱۵ دقیقه یک بار به مدت سی ثانیه (تا یک دقیقه) تکوان داده شد. سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰۰۰g و به مدت پنج دقیقه انجام شد؛ که با حذف مایع رویی، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره ۲ به رسوب اضافه و تکوان داده شد. این مرحله، دو بار دیگر نیز تکرار شد و در نهایت با حذف مایع رویی، رسوب خشک شد و در بافر لیزکننده حل شد.

حل کردن پروتئین‌ها

رسوب به دست‌آمده از مرحله پیش توسط ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز (0.2ml NP-40, 4.8 g Urea) و 0.2ml Ampholine (pH=3.5-10) در دمای اتاق تکوان داده شد. سپس سانتریفوژ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد؛ با انتقال مایع رویی به لوله آزمایش جدید، سانتریفوژ با مشخصات پیش تکرار و در نهایت ۱۲۰ میکرولیتر از مایع رویی برای بارگذاری در لوله‌های بعد اول استفاده شد.

الکتروفورز بعد اول و بعد دوم

به منظور انجام الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG از Bio Rad) PROTEAN IEF focusing tray (و دستگاه Bio Rad) PROTEAN IEF cell) استفاده شد. در ضمن متعادل‌سازی (equilibration) نوارها نیز انجام شد (Herbert, 1999). ژل‌های بعد دوم به صورت دو تکه (شامل ژل جداکننده (Separating gel) و ژل نگه‌دارنده (Stacking gel) تهیه شدند. در آغاز ژل جداکننده از ترکیب (Acrylamide for separating gel) 6.3ml separating gel buffer (pH=8.8), 8.5ml TEMED, 120µl APS 10%, 2ml distilled water (20µl آماده شد. سپس ژل نگه‌دارنده با استفاده از ترکیب (Acrylamide for stacking gel) 1ml, 3ml stacking gel buffer (pH=6.8) distilled water 2ml, 30µl APS 10%, 20µl TEMED) تهیه

بودند. در مدت آزمایش، دوره روشنایی ۱۴ ساعت در نظر گرفته شد و برای تنظیم نور از روشنایی طبیعی و مصنوعی با استفاده از لامپ‌های فلورسانت و التهابی استفاده شد. دمای روزانه ۲۵±۳ و شبانه ۱۵±۳ درجه سلسیوس برای رشد گیاهچه‌ها فراهم شد. رطوبت نسبی گلخانه در طول مدت انجام آزمایش بین ۴۵-۶۰ درصد در نوسان بود. برای یکنواختی کار و بدون تداخل سرعت جوانه‌زنی بذرها بر تیمارهای شوری اقدام به تهیه نشاء از رقم‌های مختلف شد. زمان نشاء پنج روز پس از خیساندن آخرین رقم و آغاز تنش سه هفته پس از نشاء گیاهچه‌ها در بستر اصلی بود. دو هفته پس از اعمال تنش شوری و در پایان مرحله ورودمانی (روزت) نمونه‌برداری برای استخراج پروتئین انجام شد. همزمان نمونه‌گیری برگ برای اندازه‌گیری پتانسیل کل آب برگ توسط محفظه فشار، محتوای آب نسبی برگ به روش مورانت (Morant-Manceau *et al.*, 2004) و پتانسیل اسمزی با اسمزسنج (اسمومتر) انجام شد. همچنین شاخص‌های سبزینه (کلروفیل) توسط SPAD و فلورسانس سبزینه توسط پرتوسنج (فلورومتر) در روز نمونه‌برداری اندازه‌گیری و ارتفاع بوته و وزن خشک توسط آون و ترازو مشخص شدند.

تجزیه بیان پروتئین‌ها

استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین، محلول شماره ۱ شامل ۹ میلی‌لیتر استن، ۲ میلی‌لیتر TCA^۱ (۱۰۰ درصد) و ۱۴ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول تهیه شد. ۰/۵ گرم بافت برگ در نیتروژن مایع خرد و در ۲ میلی‌لیتر از محلول شماره ۱ همگن (هموزن) شد. در مرحله بعد، عصاره اولیه به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد و هر ۱۵ دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه به‌طور کامل تکوان (ورتکس) داده شد. سپس سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس، با دور ۹۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. با حذف مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر از محلول شماره ۲ (متشکل از ۱۰ میلی‌لیتر استون و ۷ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول) به رسوب

1. Trichloroacetic acid

بود، انتخاب شدند. بیان نقطه‌ای که IF بزرگ‌تر و کوچک‌تر از واحد دارد در شرایط تنش شوری به ترتیب افزایش و کاهش یافته است. لذا برای کاهش خطرپذیری میزان IF به ترتیب بزرگ‌تر از ۲ و کمتر از ۰/۵ مدنظر قرار گرفت. در نهایت پس از شناسایی پروتئین‌ها با طیف‌سنجی (اسپکترومتری) جرمی و تعیین نقش آن‌ها نمودارهای گروه‌بندی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excell ترسیم شد.

نتایج و بحث

ارزیابی صفات ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و فیزیولوژیکی در شرایط تنش شوری

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بین رقم‌ها و سطوح تنش از نظر همه صفات ارزیابی‌شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت ولی اثر متقابل رقم×تنش برای هیچ‌کدام از صفات معنی‌دار نبود. کمترین و بیشترین میزان ضریب تغییرپذیری مربوط به صفات شاخص سبزینه (۲/۳۹) و ارتفاع بوته (۱۵/۱۷) بود. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که در شرایط تنش شوری میزان کمی صفات ریخت‌شناختی و ارزش صفات فیزیولوژیک بررسی‌شده کاهش یافت. افزون بر آن میانگین رقم SW5001 از لحاظ همه صفات بررسی‌شده بهتر از میانگین رقم Sarigol است.

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری

با انجام الکتروفورز دوعده‌ای در مجموع ۱۰۹ لکه پروتئینی تکرارپذیر توسط نرم‌افزار PDQuest شناسایی و برچسب‌گذاری شد. شمار پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش شوری چنانچه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است به ترتیب در رقم SW5001 و Sarigol، ۱۴ و ۱۳ بود که از این شمار ده لکه پروتئینی بین دو رقم مشترک بودند و چهار لکه تنها در رقم SW5001 و سه لکه هم تنها در رقم Sarigol در شرایط تنش تغییر بیان معنی‌دار داشتند. به عبارت دیگر در مجموع هفده لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش در این آزمایش در هر دو رقم شناسایی شدند.

شد. در ادامه نوارهای بعد اول با استفاده از آگارز ۱درصد روی ژل‌های بعد دوم متصل شدند. در نهایت از جریان ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل استفاده شد. در ضمن، رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از محلول آبی کوماسی انجام شد.

تصویربرداری از ژل‌ها و شناسایی لکه‌های پروتئینی

تصویربرداری ژل‌ها با استفاده از دستگاه اسکنر GS-800Bio-Rad و تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی با نرم‌افزار PDQuest انجام شدند. پس از تعیین لکه‌های پروتئینی با تغییر بیان معنی‌دار از دستگاه طیف‌سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MS/MS) برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد. داده‌های حاصل از اسپکترومتری با نرم‌افزار بیوورکس (Bioworks software (ver. 3.3.1, Thermo Fisher) به فرمت قابل استفاده با موتور جستجوگر مسکات تبدیل شد (Twyman, 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس صفات بررسی‌شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و با توجه به دو سطح بودن همه عوامل‌های آزمایشی، معنی‌دار بودن آزمون F نشان‌دهنده اختلاف میانگین بین دو سطح در نظر گرفته شد. همچنین شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار با استفاده از نرم‌افزار PDQuest و با شناسایی لکه‌های پروتئینی روی ژل‌ها و سازگاری آن‌ها با یکدیگر انجام شد. با مشخص شدن نقاط کمینه و بیشینه pH، pI و وزن مولکولی هر لکه با استفاده از نشانگر استاندارد (سایز مارکر) به دست آمد. پس از غربال کردن لکه‌ها از نظر کیفیت مطلوب و حذف نقاط ناخواسته در نرم‌افزار، داده‌های به دست آمده از ژل‌ها به صورت یک فایل excel ذخیره شدند. سپس تجزیه واریانس درصد حجمی نقاط تکراردار، برای انتخاب نقاط پروتئینی که نسبت به تنش واکنش معنی‌داری داشتند، در سطح احتمال ۵درصد انجام شد. در نهایت از بین نقاط انتخاب‌شده معنی‌دار، نقاطی که IF¹ آن‌ها بزرگ‌تر از ۲ و یا کوچک‌تر از ۰/۵

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی کلزا در شرایط تنش شوری

S.O.V	df	Mean of squares						
		LWP (MPa)	RWC (%)	Osmotic Potential (MPa)	SPAD	Fluorescence	Plant Height (cm)	Plant Dry Weight (g)
Replication	3	0.008 ^{ns}	2.87 ^{ns}	0.007 ^{ns}	1.33 ^{ns}	0.001 ^{ns}	37.65 ^{ns}	0.12 ^{ns}
Stress	1	0.32 [*]	273.01 ^{**}	0.24 ^{**}	19.25 ^{**}	0.007 ^{**}	90.78 ^{**}	2.19 ^{**}
Cultivar	1	0.39 ^{**}	389.27 ^{**}	0.28 ^{**}	20.28 ^{**}	0.008 ^{**}	99.87 ^{**}	4.56 ^{**}
Cultivar × stress	1	0.002 ^{ns}	3.73 ^{ns}	0.001 ^{ns}	4.6 ^{ns}	0.001 ^{ns}	38.60 ^{ns}	0.47 ^{ns}
Error	9	0.19	4.37	0.008	6.3	0.003	46.42	1.15
CV (%)		7.53	9.56	8.89	2.39	12.19	15.17	9.98

* **, Significantly in 5% and 1% probability levels, respectively.

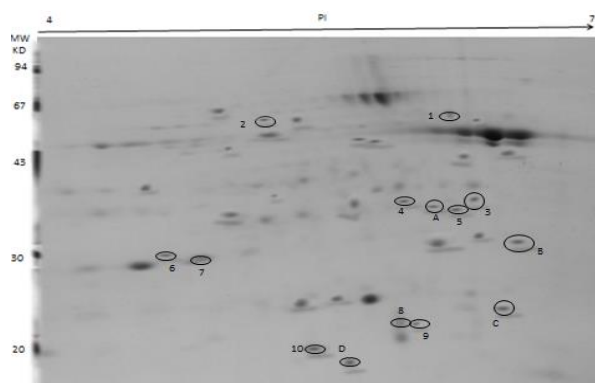
* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

جدول ۲. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش شوری و رقم‌ها برای صفات بررسی شده در کلزا

	LWP (MPa)	RWC (%)	Osmotic Potential (MPa)	SPAD	Fluorescence	Plant Height (cm)	Plant Dry Weight (g)
Control	-1.33	77.21	-0.86	42.2	0.8567	29.5	13.61
Salt stress	-1.78	65.36	-1.17	38.5	0.7934	20.5	8.09
Difference	±0.45 [*]	±11.85 ^{**}	±0.31 ^{**}	±3.7 ^{**}	±0.0633 ^{**}	±9.0 ^{**}	±5.52 ^{**}
SW5001	-1.20	79.26	-1.22	45.6	0.8889	33.5	14.50
Sarigol	-1.98	61.73	-0.81	36.5	0.7654	18.4	7.80
Difference	±0.78 ^{**}	±17.53 ^{**}	±0.41 ^{**}	9.1 ^{**±}	±0.1235 ^{**}	±15.1 ^{**}	±6.70 ^{**}

* **, are significantly in 5% and 1% probability levels, respectively.

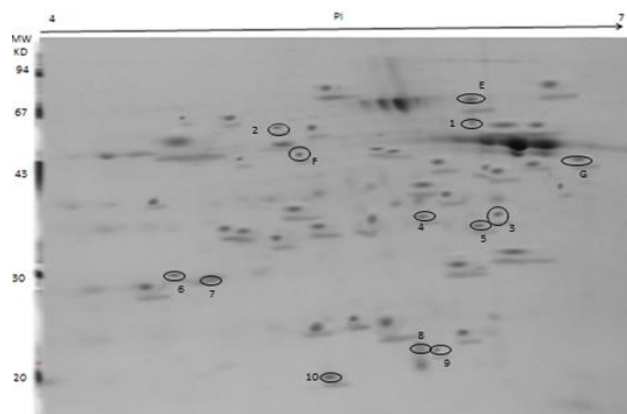
* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.



شکل ۱. ژل مرجع رقم SW5001 که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری با رقم Sarigol با شماره و

لکه‌های غیرمشترک با حرف‌های انگلیسی مشخص شده است.

Figure 1. Reference gel of SW5001 cultivar where responsive common protein spots to salt stress with Sarigol cultivar by numbers and non-common protein spots with English letters are marked



شکل ۲. ژل مرجع رقم Sarigol که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری با رقم SW5001 با شماره و

لکه‌های غیرمشترک با حرف‌های انگلیسی مشخص شده است.

Figure 2. Reference gel of Sarigol cultivar where responsive common protein spots to salt stress with SW5001 cultivar by numbers and non-common protein spots with English letters are marked

متحمل کاهش بیان داشتند (مانند پروتئین شماره ۱).
 ب- پروتئین‌هایی که در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش بیان داشتند (مانند پروتئین شماره ۴).
 ج- پروتئین‌هایی که تنها در رقم متحمل تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد A). د- پروتئین‌هایی که تنها در رقم حساس تظاهر داشتند (مانند پروتئین با کد E).

پروتئین‌های درگیر در نورساخت و سوخت‌وساز کربن
 از میان لکه‌های پروتئینی مشترک بین دو رقم شمارش لکه پروتئینی مربوط به دو مرحله نوری (چهار پروتئین) و مرحله تاریکی (دو پروتئین) نورساخت بودند. به عبارت دیگر، چهار لکه پروتئینی دخیل در واکنش نوری نورساخت شامل لکه‌های شماره ۳، ۴، ۶ و ۷ شناسایی شدند که از این شمار دو پروتئین مربوط به پروتئین‌های OEC¹ و دو لکه نیز مربوط به پروتئین‌های PSBO-2 بودند. بنابراین هر چهار پروتئین مربوط به مرحله نوری نورساخت، در مرکز نظام نوری ۲ نقش داشتند (جدول ۳ و شکل ۴). از سوی دیگر دو لکه پروتئینی شماره ۱ و ۱۰ که درگیر در چرخه کالوین بودند به‌عنوان زیر واحد بزرگ روبیسکو شناسایی شدند (شکل ۵ و جدول ۳).

تجزیه شیمیایی آب در نتیجه نیروی تابشی در مجموعه درگیر اکسیژن (OEC) در مرکز واکنش نظام نوری ۲ انجام می‌شود (Heide *et al.*, 2004). زیر واحد فرعی کمپلکس PSII پروتئین‌هایی هستند که در نظام نورساختی نقش دارند و به‌عنوان پروتئین‌های OEC شناخته می‌شوند، همچنین در پایداری کمپلکس PSII نقش دارند (Ifuku *et al.*, 2008) و اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان نوری به نظام نوری ۲ می‌شود (Takahashi & Murata, 2008). بنابراین کاهش بیان یا بدون بیان این پروتئین‌ها در رقم حساس Sarigol که شامل لکه‌های پروتئینی ۳، ۴، ۶ و ۷ هستند (شکل ۴)، باعث اختلال در فعالیت نظام نوری ۲ شده و در نهایت کارایی واکنش نوری کاهش می‌یابد. درحالی‌که در رقم متحمل SW5001 این پروتئین‌ها افزایش بیان داشتند. این نتایج نشان

بنابر نتایج یادشده در جدول ۳ می‌توان اظهار داشت شمار پروتئین‌های دارای افزایش بیان در رقم متحمل کلزا در شرایط تنش شوری نسبت به رقم حساس بیشتر بود. بیشتر بودن شمار پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در رقم SW5001 و همچنین افزایش بیان بیشتر پروتئین‌های معنی‌دار در این رقم نسبت به رقم حساس بیانگر این است که این رقم با دخالت دادن پروتئین‌های مختلف و افزایش بیان آن‌ها در شرایط تنش شوری واکنش بهتری نسبت به رقم حساس برای حفظ رشد خود داشته است. در بررسی الگوی بیان پروتئینی رقم‌های حساس و متحمل برنج نسبت به تنش خشکی، فراوانی بالاتر شمار پروتئین‌های دارای افزایش بیان در رقم متحمل گزارش شده است (Hosseini Salekdeh *et al.*, 2002) که این نتایج با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

شناسایی و طبقه‌بندی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در برگ‌های دو رقم کلزا

هفده پروتئین دارای تغییر معنی‌دار بین شرایط عادی و تنش با استفاده از روش MALDI TOF/TOF MS شناسایی شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است گروه‌بندی این پروتئین‌ها بنا بر عملکردشان درون‌یاخته انجام شد. بیشترین درصد پروتئین‌های مشترک به ترتیب مربوط به واکنش نوری نورساخت (۴۰درصد)، چرخه کالوین (۲۰درصد)، حذف پاداکسنده (۲۰درصد)، ترانسانی علامت (۱۰درصد) و تولید انرژی (۱۰درصد) بودند. چهار لکه پروتئینی که تنها در رقم متحمل تظاهر داشتند بیشتر مربوط به واکنش نوری نورساخت هستند که افزایش بیان آن‌ها در تنش شوری در جهت تقویت جذب و استفاده از نور است (جدول ۳). درحالی‌که سه لکه پروتئینی که تنها در رقم حساس مشاهده شدند بیشتر مرتبط با چرخه کالوین بودند که با توجه به کاهش بیان آن‌ها نشان‌دهنده کاهش روند تولید قند در شرایط تنش در رقم حساس است. در مجموع بر پایه الگوی بیان پروتئین‌ها در شرایط عادی و همچنین تنش شوری می‌توان ۴ گروه (حالت) را برای پروتئین‌ها مشاهده کرد: الف- پروتئین‌هایی که در هر دو رقم حساس و

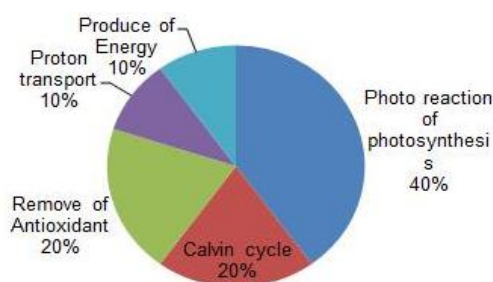
Tanaka (2004)، در تجزیه بیان پروتئین‌ها غلاف برگ‌های برنج در شرایط تنش شوری کلرور سدیم، فراوانی این گروه از پروتئین‌ها در پاسخ به تنش شوری افزایش یافته است که بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش است.

می‌دهد که تنش شوری یکی از اجزای مهم ماشین نوساخت یعنی، چرخش اکسیژن و کمپلکس نظام نوری ۲ را بشدت تحت تأثیر قرار داده است و از این‌رو، در پیری برگ‌ها و به‌احتمال مرگ تدریجی یاخته‌ای مشارکت خواهد داشت. بر پایه گزارش Komatsu &

جدول ۳. مشخصات ده لکه پروتئینی مشترک شناخته‌شده از کل لکه‌های معنی‌دار به همراه چهار لکه غیرمشترک در رقم SW5001 و سه لکه غیرمشترک در رقم Sarigol کلزا در شرایط تنش شوری

Table 3. Characteristics of 10 known common protein spots from all of significant spots along with four non-common spots in SW5001 cultivar and three non-common spots in Sarigol

Functional group of protein	Spot number	Experimental		Theoretical		name of protein	Accession number	Expression in SW5001	Expression in Sarigol
		MW	pI	MW	pI				
Calvin cycle	1	64.0	6.00	52.5	6.09	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-large subunit	52001641	Further increase	Increased less
proton transport	2	61.01	5.1	53.88	5.06	ATP synthase CF1 beta subunit	14017579	Further increase	Increased less
photoreaction of photosynthesis	3	37.5	6.2	37	6.78	Oxygen evolving photosystem II protein	474352688	Further increase	Increased less
photoreaction of photosynthesis	4	37.2	5.92	27.42	8.84	Oxygen-evolving enhancer protein 2, (OEE2)	131394	Up-regulated	Down-regulated
Produce of energy	5	35.0	6.14	33	7.67	Triose-phosphate isomerase	1174749	Further increase	Increased less
photoreaction of photosynthesis	6	31.0	4.95	35	5.92	PSBO-2/PSBO2 (photosystem II subunit o-2) oxygen evolving	15230324	Up-regulated	Down-regulated
photoreaction of photosynthesis	7	30.1	5.05	35	5.92	PSBO-2/PSBO2 (photosystem II subunit o-2) oxygen evolving	15230324	Up-regulated	Down-regulated
Remove of antioxidant	8	25.0	5.67	17	5.37	Type 2 peroxiredoxin	473787383	Further increase	Increased less
Remove of antioxidant	9	24.5	5.95	22.2	6.28	Copper/Zinc superoxide dismutase	3273753	Further increase	Increased less
Calvin cycle	10	20.2	5.35	17.7	5.43	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	156143205	Further increase	Increased less
photoreaction of photosynthesis	A	36.0	6.00	24.44	8.11	light-harvesting complex I, partial (chloroplast)	544700	Up-regulated	-
photoreaction of photosynthesis	B	31.62	6.38	29.30	8.69	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	474121685	Up-regulated	-
photoreaction of photosynthesis	C	26.0	6.3	14	9.71	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	474352688	Up-regulated	-
Remove of antioxidant	D	18.2	5.45	22.2	6.28	Copper/Zinc superoxide dismutase	3273753	Up-regulated	-
Heat shock protein	E	73.2	6.1	76.36	6.16	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	473970552	-	Down-regulated
Calvin cycle	F	47.2	5.2	42.21	5.94	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic	473848356	-	Down-regulated
Calvin cycle	G	52.5	6.5	51.24	6.9	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic	474153435	-	Down-regulated



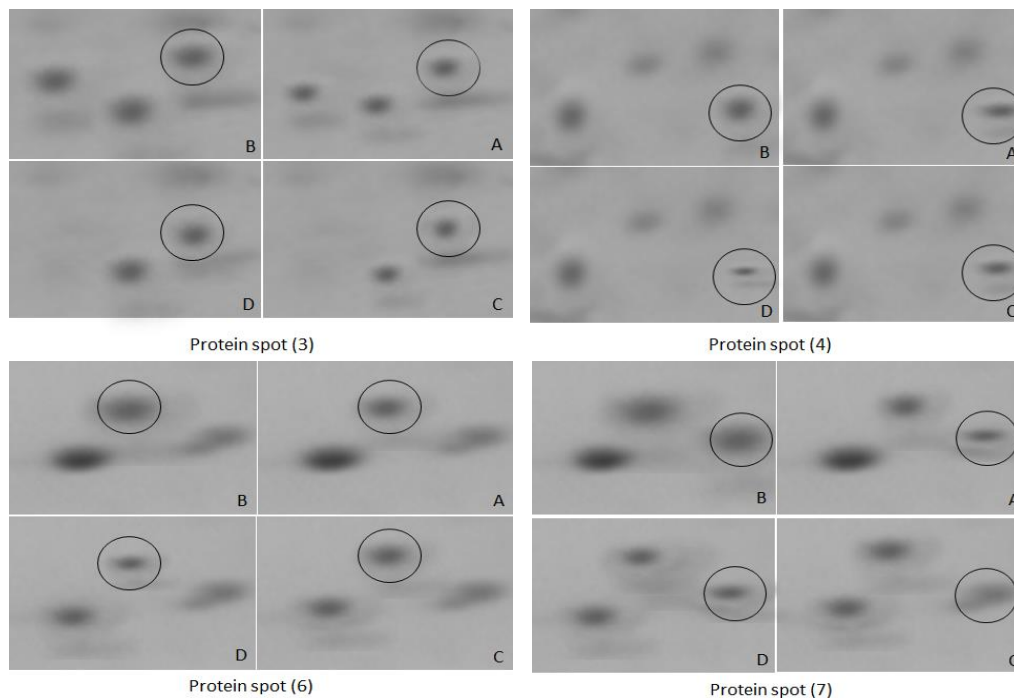
شکل ۳. گروه‌بندی عملکردی پروتئین‌های مشترک پاسخ‌دهنده به تنش شوری در دو رقم متحمل و حساس کلزا

Figure 3. Functional grouping of responsive common proteins to salt stress in the tolerant and sensitive canola

به رقم Sarigol در شرایط تنش نشان دادند (شکل ۵).
 Ye *et al.* (2013) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند که پس از تنش ۷۲ ساعته پلی‌اتیلن‌گلیکول میزان روبیسکو در برگ‌های گندم افزایش می‌یابد. آنان همچنین اظهار داشتند که این افزایش و تغییر، به گندم در طی تنش اسمزی کمک می‌کند تا با افزایش مصرف دی‌اکسیدکربن و افزایش کارایی نورساخت بر تنش چیره شود. Wan & Liu (2008) و Naghavi (2010) نیز همسان این نتایج افزایش این آنزیم را به ترتیب در برگ گیاهچه‌های برنج و کلزا تحت تنش پراکسیددهی‌روژن و اسمزی گزارش کردند.

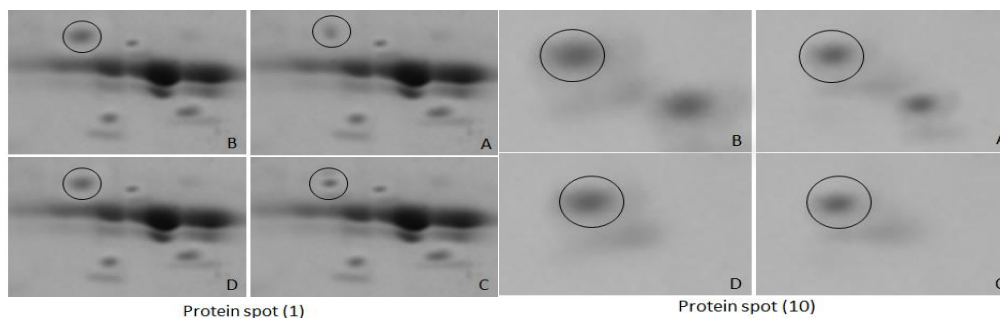
در مجموع با توجه به نقش پروتئین‌های این گروه عملکردی و افزایش بیشتر بیان آن‌ها در رقم متحمل SW5001 به نظر می‌رسد این رقم سازوکار بهتری در شرایط تنش در مسیر نورساخت و سوخت‌وساز کربن نسبت به رقم حساس Sarigol دارد (جدول ۳ و شکل‌های ۴ و ۵).

از سوی دیگر، پروتئین‌های PSBO-2 که در این تحقیق در دو ایزوفرم مختلف ظاهر شدند (لکه‌های ۶ و ۷)، متعلق به خانواده Oxygen evolving هستند و موجب پایداری گروه منگنز می‌شوند که سایت اصلی شکسته شدن مولکول آب است (Kumara *et al.*, 2003). بیان این پروتئین‌ها در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش یافت (شکل ۴). در این راستا، Zhu *et al.* (2010) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند که در کلزا در نتیجه تنش آبسیزیک اسید بیان پروتئین‌های دخیل در نورساخت مانند PSBO در رقم متحمل افزایش یافت. از سوی دیگر، روبیسکو یک آنزیم کلیدی برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در نورساخت است که از چندین زیر واحد بزرگ کاتالیزکننده (Catalytic large subunits) (لکه‌های شماره ۱ و ۱۰) و چند زیر واحد کوچک تنظیم‌کننده (Regulative small subunits) تشکیل شده است (Spreitzer & Salvucci, 2002). در این آزمایش هر دو لکه شماره ۱ و ۱۰ در رقم SW5001 افزایش بیان بیشتری نسبت



شکل ۴. چگونگی تغییر بیان لکه‌های پروتئینی مشترک دخیل در واکنش نوری نورساخت شامل لکه‌های شماره ۳، ۴، ۶ و ۷. در این شکل‌ها قسمت A و B به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم SW5001 و قسمت C و D به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم Sarigol است.

Figure 4. How change expressed common protein spots including protein spots 3, 4, 6 and 7 involved in photo reaction of photosynthesis. In this figure A and B are related to control and stress conditions in SW5001 while C and D are related to control and stress condition in Sarigol respectively.



شکل ۵. چگونگی تغییر بیان لکه‌های پروتئینی مشترک دخیل در چرخه کالوین شامل لکه‌های ۱ و ۱۰. در این شکل‌ها قسمت A و B به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم SW5001 و قسمت C و D به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم Sarigol است.

Figure 5. How change expressed common protein spots including protein spots 1 and 10 involved in Calvin cycle. In this Figure A and B are related to control and stress conditions in SW5001 while C and D are control and stress condition in Sarigol respectively.

peroxiredoxin های پروتئین‌های دیگر، از سوی دیگر، (al., 2006). به صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان یاخته‌ای این پروتئین‌ها بیانگر نقش مهم پاداکسندگی آن‌ها در اندامک‌های یاخته‌ای یادشده است. این پروتئین‌ها افزون بر فعالیت پاداکسندگی، در مهار انتقال پیام هم فعال هستند. انتهای آمین این پروتئین که حاوی سیستمین است، به اسید سولفونیک اکسیده شده که این خود پلی برای واکنش با پراکسیدها است. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H_2O_2 انجام شده و آنزیم type 2 peroxiredoxin مولکول H_2O_2 را احیا می‌کند. در بسیاری از بررسی‌ها پروتئین peroxiredoxin به‌عنوان پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش مطرح شده است (Hashimoto *et al.*, 2009). حضور بیشتر و فعال‌تر این پروتئین در رقم متحمل SW5001 (لکه ۹) نقش این پروتئین را در تحمل تنش شوری نشان می‌دهد (شکل ۹).

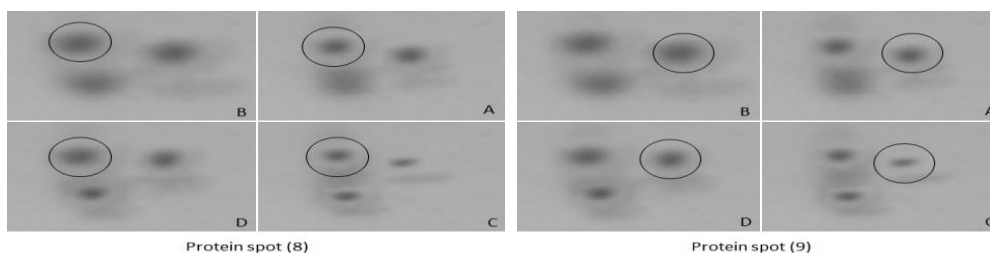
دیگر گروه‌های پروتئینی درگیر در تنش شوری کلزا Triosephosphate isomerase (لکه مشترک شماره ۵) یک آنزیم درگیر در مسیر گلیکولیز است که همپارزایی (ایزومریزاسیون) dihydroxyacetone phosphate و D- glyceraldehyde-3-P را کاتالیز می‌کند (Cui *et al.*, 2005). (Xue *et al.*, 2008) گزارش کردند که در تجزیه

پروتئین‌های درگیر در دفاع در برابر تنش اکسایشی حضور پروتئین‌های (لکه ۹) copper/zinc superoxide dismutase و (لکه ۸) type 2 peroxiredoxin دلالت بر القاء تنش اکسایشی در شرایط تنش شوری است (جدول ۳، شکل ۳ و شکل ۶). پروتئین‌های گروه superoxide dismutase (SOD) در واقع نخستین خط دفاعی در برابر ROS به شمار می‌آیند که سوپر اکسید را به مولکول‌های پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌کنند. در صورت نبود دی‌اکسید کربن کافی به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون، الکترون‌ها از غشا نورساختی به سمت مولکول‌های اکسیژن از راه واکنش Mehler جابه جا شده و یون‌های سوپر اکسید را به وجود می‌آورند (Cakmak, 2005). در پاسخ به تنش شوری، فراوانی Cu-Zn SOD کلروپلاستی (لکه ۹) در رقم حساس (Sarigol) و رقم متحمل SW5001 به ترتیب افزایش بیان کمتر و بیشتری داشت. همسو با این نتایج، تجمع SOD در رقم متحمل برنج و کاهش فراوانی آن در رقم حساس در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Komatsu & Tanaka, 2004). کمتر بودن این پروتئین در برگ‌های تحت تنش Sarigol بیانگر سطح بالای تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در کلروپلاست این رقم است. به عبارت دیگر، در شرایط تنش شوری که میزان تولید ROS افزایش می‌یابد، تعادل بین تولید و حذف آن، میزان اثرگذاری سوء تنش اکسایشی و همچنین میزان حساسیت نسبت به آن را تعیین می‌کند (نقل از Sun *et al.*

زیر واحد آلفا، بتا (لکه شماره ۲)، گاما، دلتا و اپسیلون داشته و CF_0 سه زیر واحد a، b و c دارد (Von Ballmoos & Dimroth, 2007). زیر واحد بتا، یک catalytic and ADP-binding unit است و نقش مهمی در سوخت‌وساز انرژی به‌واسطه تبدیل ADP به ATP در صورت وجود شیب پروتون بین غشایی دارد (Ye *et al.*, 2013). افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با ساخت (سنتز) ATP در شرایط تنش‌های غیرزیستی شامل خشکی و شوری در بررسی‌های پیشین گزارش شده است (Guo *et al.*, 2012). افزایش سطح بیان چنین پروتئین‌هایی مانند ATP سنتاز بر نقش غیرمستقیم آن در جهت یکنواخت‌سازی (همئوستازی) یون تحت تنش (به‌ویژه تنش شوری) دلالت می‌کند، زیرا افزایش سطوح ATP تحریک‌کننده H^+ -ATPases برای ایجاد شیب پروتون ضروری است و این عمل آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ را برای انتقال یون‌های Na^+ و Cl^- به واکوئل و تونوپلاست تحریک می‌کند (Gao *et al.*, 2011).

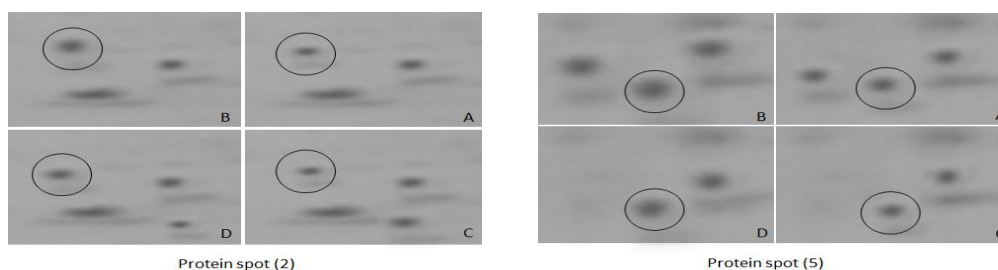
بیان پروتئین‌ها، بیان این آنزیم در فرآیند تنش خشکی کاهش یافته است. همچنین Naghavi (2014) اظهار داشت که میزان بیان این پروتئین در رقم حساس گندم کمتر از رقم متحمل است. این در حالی است که، افزایش بیان این آنزیم در فرآیند تنش غیرزیستی و در رقم متحمل گندم، گزارش شده است که با نتایج این تحقیق (جدول ۳ و شکل ۷) همخوانی دارد (Moller *et al.*, 2011) (جدول ۳ و شکل ۷).

گروه دیگر از پروتئین‌ها از نظر نوع عمل مربوط به پروتئین‌های دخیل در انتقال پروتون هستند. لکه مشترک شماره ۲ (جدول ۳) نشان‌دهنده زیر واحد بتای ATP synthase complex است. فراوانی نسبی لکه در دو رقم و سطوح تنش در شکل ۷ نشان داده شده است. از نظر ساختاری ATP سنتاز کلروپلاستی دارای دو جزء اصلی می‌باشد که عبارت‌اند از CF_1 (بخش خارج از غشای ATP سنتاز) و CF_0 (بخش درون غشای آن) که ATP سنتاز با کمک آن‌ها باعث انتقال پروتون از غشای تیلاکوئید می‌شود. CF_1 پنج



شکل ۶. چگونگی تغییر بیان لکه‌های پروتئینی مشترک دخیل در حذف پاداکسنده شامل لکه‌های ۸ و ۹. در این شکل‌ها قسمت A و B به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم SW5001 و قسمت C و D به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم Sarigol است.

Figure 6. How change expressed common protein spots including protein spots 8 and 9 involved in remove of antioxidant. In this Figure A and B are related to control and stress conditions in SW5001 while C and D are related to control and stress condition in Sarigol respectively.



شکل ۷. چگونگی تغییر بیان لکه‌های پروتئینی مشترک دخیل در ترانسپورت پروتون و تولید انرژی شامل لکه‌های ۲ و ۵ است. در این شکل‌ها قسمت A و B به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم SW5001 و قسمت C و D به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری در رقم Sarigol است.

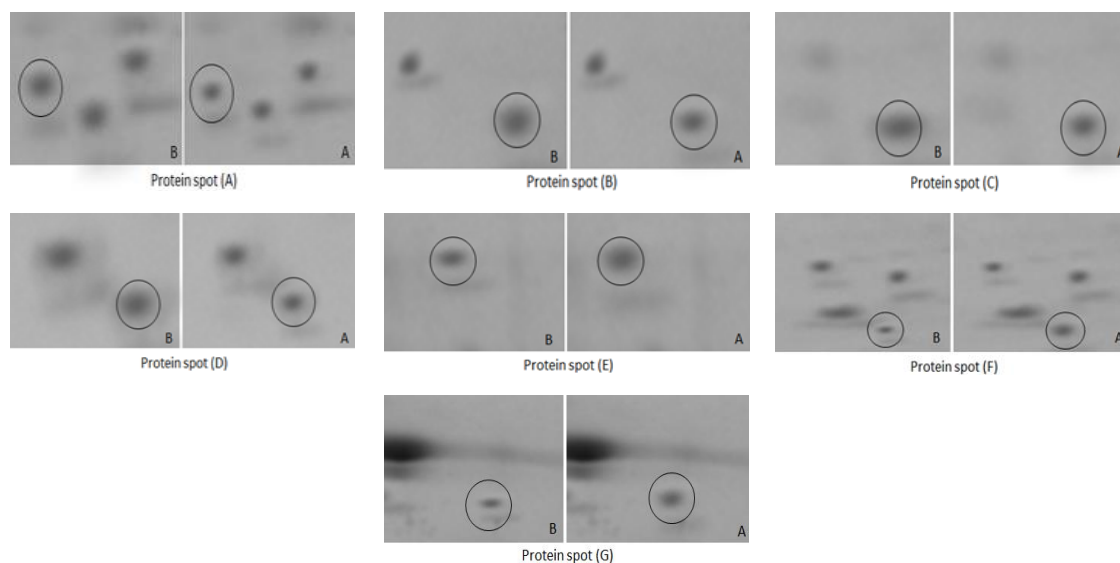
Figure 7. How change expressed common protein spots including protein spot 2 involved in proton transport and protein spot 5 involved in produce of energy. In this figure A and B are related to control and stress conditions in SW5001 while C and D are related to control and stress condition in Sarigol respectively.

لکه‌های پروتئینی غیرمشترک

از چهار لکه غیرمشترک در رقم SW5001، سه لکه پروتئینی در واکنش نوری نورساخت و یک لکه هم در حذف پاداکسند و از بین سه لکه پروتئینی غیرمشترک در رقم Sarigol، دو لکه پروتئینی در چرخه کالوین و یک لکه در پایداری ساختار پروتئین درگیر بودند. بیان هر چهار لکه غیرمشترک در رقم متحمل و سه لکه غیرمشترک در رقم حساس در شرایط تنش شوری به ترتیب افزایش و کاهش یافت (شکل ۸).

انرژی نوری جذب‌شده توسط پروتئین‌های متصل شده به سبزینه a/b (لکه B) در فعال‌سازی اکسیایشی وابسته به نور استفاده‌شده و مولکول اکسیژن آزاد می‌شود. بنابراین با توجه به افزایش بیان آن در رقم SW5001 به نظر می‌رسد که کارایی این قسمت در این رقم بیشتر است (شکل ۸). از سوی دیگر، گیاهان برای جلوگیری از زیان نوری به دستگاه نورساختی، چندین سازوکار شامل تعدیل (Modulation) آنتن‌های جذب‌کننده نور (پروتئین‌ها در این آنتن‌ها LHC (light-harvesting complex) نامیده می‌شوند) (لکه A) و کاهش اندازه آنتن‌ها به منظور کاهش جذب نور را انجام می‌دهند (Eberhard *et al.*, 2008). اما در

این آزمایش با توجه به افزایش بیان پروتئین‌های چرخه کالوین و دیگر پروتئین‌های درگیر در واکنش نوری نورساخت، این پروتئین‌ها نیز افزایش بیان داشتند. چرخه کالوین شامل سه مرحله است که در مرحله سوم (احیاء) مولکول‌های RuBP دوباره ساخته می‌شوند و چرخه کالوین از نو آغاز می‌شود. مرحله احیاء توسط واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند. برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این مرحله شامل fructose 1,6- و sedoheptulose-1,7-biphosphate aldolase (لکه F) هستند. این دو آنزیم واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت منجر به تشکیل ribulose-5-phosphate می‌شود. سپس ribulose-5-phosphate فسفریله شده و RuBP را تشکیل می‌دهد (Tamoi *et al.*, 2005). در نتیجه کاهش آنزیم واسطه در این فرآیند (لکه F) در رقم حساس Sarigol منجر به کاهش کارایی چرخه کالوین و کاهش تولید قند می‌شود. از سوی دیگر، گزارش شده است که بیان پروتئین‌های مرتبط با نورساخت مانند پروتئین اتصال یافته به روبیسکو و روبیسکو اکتیواز (لکه G) (شکل ۸) در رقم حساس جو کاهش یافته است (Kausar *et al.*, 2013).



شکل ۸. چگونگی تغییر بیان لکه‌های پروتئینی غیرمشترک. لکه‌های A، B، C و D تنها در رقم SW5001 و لکه‌های E، F و G تنها در رقم Sarigol بیان شدند. در این شکل‌ها قسمت A و B به ترتیب مربوط به شرایط شاهد و تنش شوری است.

Figure 8. How change expressed non-common protein spots. Protein spots of A, B, C and D only in SW5001 and protein spots of E, F and G only in Sarigol were expressed. In this Figures A and B are related to control and stress conditions respectively.

نتیجه‌گیری کلی

رقم SW5001 با دخالت دادن پروتئین‌های پر شمار و با افزایش بیان بیشتر تحت تنش شوری واکنش بهتری نسبت به رقم حساس Sarigol برای حفظ رشد خود داشت. اغلب پروتئین‌های شناسایی شده، در فرآیند نورساخت و سوخت‌وساز کربن حضور داشتند و در شرایط تنش‌زا، این مسیر سوخت‌وسازی در رقم حساس نسبت به رقم متحمل بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت. از سوی دیگر، دفاع در برابر تنش اکسایشی ناشی از تنش شوری، با پروتئین‌های Cu-Zn SOD و type 2 peroxiredoxin انجام شد و این دفاع در برابر تنش اکسایشی در رقم متحمل SW5001، بهتر از رقم حساس بود. همچنین پاسخ اختصاصی واکنش‌های مقاومت در رقم متحمل تحت تنش شوری بیشتر مربوط به مسیر پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری نورساخت بود در حالی که رقم حساس بیشترین آسیب را در مسیر چرخه کالوین متحمل شد.

پروتئین‌های تکانه (شوک) گرمایی (لکه E) (شکل ۸) جزء خانوادهٔ چاپرون‌های مولکولی هستند و باعث پایداری و بهبود پیچ‌خوردگی دوبارهٔ پروتئین‌هایی که در طی تنش‌های گوناگون آسیب‌دیده و تجزیه شده‌اند می‌شوند و نقش تعیین‌کننده در حفاظت گیاه علیه تنش برای برگرداندن پروتئین‌ها به شکل طبیعی اولیهٔ آن‌ها و در نتیجه یکنواخت‌سازی یاخته بر عهده دارند (Wang et al., 2004). Toorchi et al. (2009) کاهش بیان این پروتئین را در طی تنش اسمزی در سویا گزارش نموده‌اند. Naghavi (2010) افزایش بیان این پروتئین در رقم متحمل کلزا در شرایط تنش اسمزی را گزارش کرد. از سوی دیگر بیان پروتئین Heat shock cognate 70KDa در بررسی بیان پروتئین‌های رقم‌های جو تحت تنش خشکی در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش نشان داد، با توجه به نقش این پروتئین‌ها می‌تواند نشان‌دهندهٔ نقش آن‌ها در تحمل به تنش خشکی باشد (Kausar et al., 2013).

REFERENCES

- Ashraf, M. & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166, 3-16.
- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 521-530.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y. & Liu, J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12), 3162-3172.
- Eberhard, S., Finazzi, G. & Wollman, F. A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42, 463-515.
- Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, G., Hu, Y., Ma, W. & Yan, Y. (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Photochemistry*, 72(10), 1180-1191.
- Guo, G., Ge, P., Ma, C., Li, X., Lv, D., Wang, S., Ma, W. & Yan, Y. (2012). Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1867-1885.
- Hashimoto, M., Toorchi, M., Matsushita, K., Iwasaki Y. & Komatsu, S. (2009). Proteome analysis of rice root plasma membrane and detection of cold stress responsive proteins. *Protein & Peptide Letters*, 16, 685-697.
- Heide, H., Kalisz, H. M. & Follmann, H. (2004). The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology*, 161, 139-149.
- Herbert, B. (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 20(4-5), 660-663.
- Holmstrom, K.O., Somersalo, S., Manda, A., Palva, T.E. & Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany*, 51, 177-185.
- Hosseini Salekdeh, G. & Komatsu, S. (2007). Crop Proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics*, 7, 2976-2996.
- Hosseini Salekdeh, Gh., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B. & Bennett, J. (2002). Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2, 1131-1145.

13. Ifuku, K., Ishihara, S., Shimamoto, R., Ido, K. & Sato, F. (2008). Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants. *Photosynthesis Research*, 98, 427-437.
14. Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A. & Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44, 345-359.
15. Komatsu, S. & Tanaka, N. (2004). Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. *Proteomics*, 4, 938-949.
16. Kumara, S. G., Reddya, A. M. & Sudhakar, C. (2003). NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Science*, 165, 1245-1251.
17. Manna, A., Mimouni, H., Wasti, S., Gharbi, E., Aschi-Smiti, S., Faurobert, M. & Ben Ahmad, H. (2013). Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. *Plant Omics Journal*, 6, 268-277.
18. Moller, A. L., Pedas, P., Andersen, B., Svensson, B., Schjoerring, J. K. & Finnie, C. (2011). Responses of barley root and shoot proteomes to longterm nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, Cell and Environment*, 34(12), 2024-2037.
19. Morant-Manceau, A., Pradier, E. & Tremblin, A. (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.
20. Naghavi, M. R. (2014). *Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones*. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Iran. (in Farsi)
21. Naghavi, M. R. (2010). *Response and 2-Dimensional electrophoresis pattern of spring rapeseed genotypes under osmotic stress*. M.Sc. Dissertation. Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran. (in Farsi)
22. Ozturk, M., Dzdemir, F., Eser, B., Adiyahsi, O. I. & Ilbi, H. (1995). Studies on the salt-hormone interactions in the germination and seedling growth of some vegetable species. In: M. Khan & I. A. Ingar (Eds.). *Biology of salt tolerant plants*. (pp.59-64.). University of Karach, Kharachi, Pakistan.
23. Raymer, P. L. (2002). Canola: An emerging oilseed crop. In: J. Janick, & A. Whipkey, (Eds.). *Trends in new crops and new uses*. (pp. 44-56.). ASHS Press, Alexandria, VA.
24. Reviron, M. P., Vartanian, N. M., Sallantin, J. C., Huet, J. C., Pernollet, J. & de Vienne, D. (1992). Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology*, 100(3), 1486-1493.
25. Spreitzer, R. J. & Salvucci, M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 449-475.
26. Sun, Y., Ahokas, R. A., Bhattacharya, S. K., Gerling, I. C., Carbone, L. D. & Weber, K. T. (2006). Oxidative stress in aldosteronism. *Cardiovascular Research*, 71, 300-309.
27. Takahashi, S. & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photo inhibition? *Trends Plant Science*, 13, 178-182.
28. Tamoi, M., Nagaoka, M., Yabuta, Y. & Shigeoka, S. (2005). Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnology*, 22, 355-360.
29. Thiellement, H., Zivy, M. & Plomion, C. (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. *Chromatography B*, 782, 137-149.
30. Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M. Z. & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybeans roots. *Peptides*, 30, 2108-2117.
31. Twyman, R. M. (2004). *Principles of proteomics* (1st ed.). BIOS Scientific Publishers.
32. Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. & Thomas, G. (2003). Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Science*, 165, 1411-1418.
33. von Ballmoos, C. & Dimroth, P. (2007). Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry*, 46, 11800-11809.
34. Wan, X. Y. & Liu, J. Y. (2008). Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7, 1469-1488.
35. Wang, W., Vinocur, B., Soseyov, O. & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science*, 9, 244-52.
36. Xue, G. P., Mcintyre, C. L., Glassop, D. & Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 67, 197-214.
37. Yan, S., Su, Z., Tang, W. & Sun, W. (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5, 235-244.

38. Ye, J., Wang, S., Zhang, F., Xie, D. & Yao, Y. (2013). Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG₆₀₀₀ stress and rewatering. *Plant Omics Journal*, 6(4), 286-294.
39. Yıldız, M., Akçalı, N. & Terzi, H. (2015). Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid. *Journal of Plant Physiology*, 179, 90-99.
40. Zhu, M., Simons, B., Zhu, N., David, G., Oppenheimer, M. & Chen, S. (2010). Analysis of abscisic acid responsive proteins in *Brassica napus* guard cells by multiplexed isobaric tagging. *Journal of Proteomics*, 73, 790-805.