ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحه ۲۵۵ - ۲۴۹

# شناسایی پروتئین‌های دخیل در مراحل مختلف نمو برگ گندم با استفاده از الکتروفورز دوبعدی

# Identifying the proteins contributing to different growth stages of wheat leaf development by using two dimensional electrophoresis

یگانه شفیعی[۱]، علی مهراس مهرابی*[۲]، علی مصطفایی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

**Shafiei Y[1], Mehrabi AM[*2], Mostafaie A[3]**

1- MSc Graduated, Young Researchers Club, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
3- Professor, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alimehrasmehrabi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

## چکیده

**با توجه به اهمیت گندم شناسایی پروتئین‌های بیان شده در مراحل مختلف رشد برای اصلاح و بالا بردن کارایی تولید از اهمیت خاصی برخوردار است. فاصله بین جوانه‌زنی و آغاز پنجه‌زنی را مرحله نمو برگ گویند. در مرحله نمو برگ جنین دانه دارای سه سلول آغازین برگ است که پس از جوانه زدن مریستم رویشی رأس ساقه شروع به تقسیم نموده و منجر به ظهور برگ می‌شود. در این تحقیق از الکتروفورز دو بعدی جهت مطالعه و شناسایی پروتئین‌های دخیل در مراحل مختلف نمو برگ استفاده شده است. نمونه‌برداری در سه مرحله تک برگی، دو برگی و سه برگی صورت گرفت. پروتئین‌ها براساس روش TCA- استون از نمونه‌های مختلف برگ استخراج و با روش الکتروفورز دو بعدی جداسازی شدند. با آنالیز ژل‌های حاصل از الکتروفورز دو بعدی تعداد ۳۶۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شناسایی شد. از این تعداد، ۳۱ لکه پروتئینی تغییرات معنی‌داری را در سطح پنج درصد در مراحل مختلف نمو برگ نشان دادند. ۵۵ درصد از پروتئین‌های شناسایی شده کاهش بیان و ۱۹ درصد افزایش بیان نشان دادند، و ۲۶ درصد از پروتئین های شناسایی شده تغییرات منظم و معنی‌داری را نداشتند. در نهایت هر لکه پروتئینی با تغییر بیان معنی‌دار، با توجه به وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شکل لکه و با جستجو در مقالات مرتبط و سایت uniprot، به‌طور احتمالی مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دامنه وسیعی از فعالیت‌های متابولیکی شامل فتوسنتز، تنفس، بیوسنتز پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها، مونتاژ و بسته‌بندی پروتئین‌ها، بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، سیستم انتقال پیام، سم زدایی و فرایندهای پایه‌ای ژنتیکی (همانندسازی، نسخه برداری و ترجمه) طی مراحل مختلف نمو برگ دچار تغییر شده‌اند. اکثر پروتئین‌هایی که کاهش بیان نشان دادند از آنزیم‌های کلروپلاستی و تعدادی هم از آنزیم‌های میتوکندریایی بودند و پروتئین‌هایی که روند تغییرات آن‌ها افزایشی بود اکثراً از گروه پروتئین‌های ترمیمی و محافظت کننده بودند.**

**واژه‌های کلیدی**

**الکتروفورز دو بعدی**
**پروتئومیکس**
**گندم**
**نمو برگ**

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

## مقدمه

گندم یکی از قدیمی‌ترین و با ارزش‌ترین گیاهان روی زمین است که بیش از هر محصول دیگری در دنیا کشت می‌شود و بیش از هر محصول دیگری تأمین کالری نموده و بیشترین پروتئین را در جیرهٔ غذایی انسان عرضه می‌کند (Noor Mohammadi et al. 1996). وجود شرایط خاص آب و هوایی و تعدد اقلیم، زراعت در مناطق دیم را با مشکلات زیادی مواجه ساخته است. با توجه به اهمیت گندم و نقش آن در تغذیه جامعه، بخش غلات مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، گندم نان آذر۲ را اصلاح و معرفی نموده است. رقم آذر۲ حاصل تلاقی سرداری (*Sefid*) با لاین *S Bb/Inia/Kvz/my 71/Maya* می‌باشد که بعد از دورگ‌گیری به علت برخورداری از ویژگی‌های خاص زراعی، لاین *Kvz/my S 71/Maya* تحت عنوان رقم آذر۲ در سال ۱۳۷۸ برای کشت در مناطق سردسیر و معتدل دیم کشور معرفی شد. رقم آذر۲، به علت دارا بودن صفاتی مانند زودرسی، تحمل به تنش‌های خشکی، سرما و دارا بودن عملکرد بیشتر نسبت به شاهدهای سرداری و سبلان به‌ترتیب (١٤ و ١٦ درصد) انتخاب شد.

فاصله بین جوانه‌زنی و آغاز پنجه‌زنی را مرحله نمو برگ گویند. در مرحله نمو برگ جنین دانه دارای سه سلول آغازین برگ است که پس از جوانه زدن مریستم رویشی رأس ساقه شروع به تقسیم نموده و منجر به ظهور برگ می‌شوند. میزان سطح برگ نمو یافته تأثیر بسیار مهم و قابل ملاحظه‌ای در تولید دارد.

در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی در شناسایی بخش‌هایی از ژنوم گیاهان مدل مانند آرابیدوپسیس، برنج و ذرت صورت گرفته است، اما اطلاعات حاصل از ژنوم به تنهایی بیانگر عملکرد ژن در یک مرحله خاص از زندگی گیاه و وقایع بیولوژیکی و شیمیایی که در هر مرحله رخ می‌دهد، نیست. برای بررسی این فرایندها و تکمیل کردن کارهای قبلی، به‌کارگیری روش‌هایی که میزان کمیت و کیفیت محصول بیان شده توسط یک ژن را مشخص کند، ضروری است. امروزه در سطح ترانسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم امکان اینگونه بررسی‌ها به‌وجود آمده است. اگر چه می‌توان به‌کمک روش‌های میکروآری[1]، SAGE[2]، آنالیزهای مربوط به ترانسکریپتوم را از لحاظ کیفی انجام داد، اما سطح کمی mRNA و پروتئین به‌صورت یک رابطه خطی و منطبق با هم نیست. با این حال بررسی الگوی پروتئینی به‌طور مستقیم برای بررسی اجزاء درگیر در یک پروسه بیولوژی و سطوح کمی آن‌ها می‌تواند به‌کار گرفته شود. در واقع پروتئین‌هایی که نقش آنزیمی، تنظیمی و ساختاری را دارا می‌باشند و محصول نهایی رونویسی بخش‌هایی از ژنوم هستند در این روش قابل ارزیابی و شناسایی خواهند بود. پیشرفت‌های به‌وجود آمده در الکتروفورز دو بعدی[1]، افزایش تعداد پروتئین‌های توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی و استفاده از دستگاه طیف سنج جرمی[2] برای شناسایی پروتئین‌ها باعث شده است تا روش پروتئومیکس در شناسایی پروتئین کل بیان شده در شرایط گوناگون به ابزاری توانمند تبدیل شود (Mehrabi et al. 2013).

پروتئین‌ها در مقایسه با سایر ماکرومولکول‌ها در موقعیت ممتازی قرار دارند زیرا با آنکه ارتباط خود را با ژن‌ها حفظ کرده‌اند، از تمام خصوصیات کاتالیک، ساختمانی و دیگر لوازم ضروری برای انجام کنش خود برخوردارند. از این‌رو پروتئین‌ها می‌توانند بهترین توصیف برای عمل تک تک ژن‌ها در سطح مولکولی باشند. از طرف دیگر توجه به این نکته که واکنش به عوامل محیطی از طریق پروتئین‌ها انجام می‌شود، بر اهمیت نقش پروتئین‌ها در سلول می‌افزاید (Rossignol et al. 2006). از آن‌جایی که پروتئین‌ها نتیجه بیان ژن می‌باشند، در این تحقیق سعی شده است که تغییرات انواع پروتئین‌های محلول در گندم در مراحل نمو برگی (یک برگی، دو برگی و سه برگی) مطالعه و شناسایی پروتئین‌ها در برگ با استفاده از پروتئومیکس بررسی شود. اولین مطالعه در مورد پروتئین‌های بذر گندم توسط Osborn در سال ۱۹۷۰ میلادی انجام شد. در این مطالعه پروتئین‌های بذر گندم بر اساس حلالیت به چهار گروه تقسیم شدند که شامل دو گروه آلبومین‌ها و گلوبولین‌های محلول در آب و محلول در حلال‌های نمکی بودند که دارای فعالیت متابولیک هستند. دو گروه دیگر گلیادین و پرولامین‌های غیر فعال و نامحلول هستند (Weegel et al. 1996). در ادامه آن مطالعات، قصد بر این است که انواع پروتئین‌هایی که در مراحل نمو برگی (یک برگی، دو برگی و سه

[1] Microarray
[2] Serial Analysis of Gene Expression



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

برگی) بیان می‌شوند و تغییرات کمی و کیفی آن‌ها مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی گندم نان رقم آذر۲ انجام شد که به آبیاری تکمیلی نیاز دارد. در ابتدا بذور گندم را با محلول ضدعفونی $HgCl_2$ ۰/۱ درصد به علاوه چند قطره توین ۲۰ به‌مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق ضد عفونی کرده و در خاک زراعی مرغوب که مخلوطی با ماسه بود کشت شدند. تعداد سه بذر در هر گلدان ۱۵×۱۵ کاشته شدند. گلدان‌ها را در اتاقک رشد در دمای ثابت شب و روز ۱ ± ۲۰ ℃ با شدت نور مشخص و ۱۲ ساعت روشنایی قرار داده و به‌طور یکسان آبیاری شدند. قبل از نمونه‌برداری، گلدان‌ها را تنک کرده و در هر گلدان تنها یک گیاهچه که دارای رشد بهتری بود باقی گذاشته و بقیهٔ گیاهچه‌های ضعیف حذف شدند. برای بررسی تغییرات الگوهای پروتئینی نمونه برداری‌ها در سه مرحله شامل تک برگی، دو برگی و سه برگی صورت گرفت که به‌عنوان ماده آزمایشی برای انجام تحقیق استفاده شد. نمونه‌ها به سرعت در نیتروژن مایع فریز و تا زمان استخراج پروتئین به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

تمام بررسی‌های آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. استخراج پروتئین با استفاده از روش Damerval et al. (1989) و تغییرات انجام شده توسط Mostafaie (2003) انجام گرفت. به‌منظور رسوب پروتئین و شستشو بر روی هر تیوپ حدود ۱۰ برابر حجم مایع رویی محلول رسوب پروتئین سرد ۱۰ درصد (تری کلرواستیک اسید ۱۰ گرم، دی تیوترتیول ۲۰ میلی‌مولار و استون تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) اضافه و ورتکس شد و یک ساعت در فریزر ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها از فریزر خارج و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، سپس نمونه‌ها را به روی یخ منتقل و مایع رویی آن دور ریخته شد. در مرحله بعد به هر تیوپ ۲۰۰۰ مایکرولیتر محلول شستشوی (دی تیوترتیول ۲۰ میلی‌لیتر و استون تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) سرد ۲۰- درجه سانتی‌گراد اضافه و با استفاده از پستل رسوب ته ویال قطعه قطعه شد. تیوپ‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شده و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مرحله شستشو پنج بار تکرار و پس از دور ریختن آخرین مایع رویی، تیوپ‌ها ۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و رسوب خشک شد. جهت محلول کردن پروتئین به ازای هر ۲۰ میلی‌گرم رسوب، ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر لایز دو بعدی (جدول۱) و ۳-۲ میکرولیتر PMSF اضافه و سپس رسوب در آن حل و یک ساعت در دمای محیط روی شیکر قرار داده شد.

جدول۱- بافر لایز دو بعدی

| ماده شیمیایی | مقدار |
|---|---|
| Urea | ۸ مولار |
| Tiurea | ۲ مولار |
| CHAPS | ٤ درصد |
| Tris | ۳۵ میلی‌مولار |
| DTT | ۸۰ میلی‌مولار |
| IPG Buffer | حداکثر ۲٪ |

تیوپ‌ها در دمای محیط به‌مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رویی مقدار کمی برای تعیین غلظت جدا شد (حدود ۵۰ میکرولیتر). برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین‌های نمونه در این آزمایش از روش برادفورد (Bradford 1979) استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

در بعد اول به‌منظور انجام الکتروفورز، از ژل نواری (IPG Strip) ۱۳ سانتی‌متری با pH=3-10 خطی (تهیه شده از شرکت Bio Rad) استفاده شد. رهیدراسیون کامل ژل‌های نواری با محلول رهیدراسیون در طول شب انجام گرفت. سپس بعد اول با دستگاه IPG phor3 و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با برنامه مشخص (جدول ۲) انجام شد. برای بارگزاری کردن ژل نیاز به ۵۲ هزار ولت ساعت (52 KVh) است این مرحله با شدت جریان ۰/۷۵ میلی‌آمپر (۰/۷۵ mA)، ۱۰:۳۰ ساعت به‌طول انجامید.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

جدول۲- برنامه فوکوسینگ مورد استفاده مولتی فور

| زمان | ولتاژ (ولت) | برنامه |
|---|---|---|
| ۱۵ دقیقه | ۵۰۰ | Gradient |
| ۱ ساعت | ۵۰۰ | Step |
| ۱ ساعت | ۳۰۰۰ | Gradient |
| ۱:۳۰ ساعت | ۳۰۰۰ | Step |
| ۳ ساعت | ۸۰۰۰ | Gradient |
| ۳:۴۵ ساعت | ۸۰۰۰ | Step |

پس از اتمام بعد اول نوارهای ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول متعادل‌سازی اول (۷/۵ =Tris-HCL pH ۳۰ میلی‌مولار، Urea ۷ مولار، Glycerol ۳۰ درصد، SDS ۲ درصد، برموفنل بلو چند کریستال) حاوی DTT 1% متعادل‌سازی شد. محلول اول را کاملاً دور ریخته و نوارها را با آب‌مقطر دو بار تقطیر شستشو داده و در محلول دوم (۷/۵ =Tris-HCL pH ۳۰ میلی‌مولار، Urea ۷ مولار، Glycerol ۳۰ درصد، SDS ۲ درصد، برموفنل‌بلو چند کریستال) حاوی Idoacetamide ۵ درصد قرار داده و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شدند.

سپس نوارها بر روی ژل اکریل آمید با غلظت ۱۱ درصد (Mostafaie 2003) قرار گرفتند. برای ساخت ژل اکریلامید ابتدا بافر ژل پایین (Tris ۱۸/۲ گرم، SDS ۰,٤ گرم، آب مقطر تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) و استوک اکریل‌آمید ( اکریل‌آمید ۳۰ گرم، بیس‌اکریل‌آمید ۰/۸ گرم، آب‌مقطر تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس مواد طبق مقادیر (بافر ژل پایین ۷/۵ میلی‌لیتر، آب‌مقطر دوبار یونیزه ۱۱/٤۹ میلی‌لیتر، اکریل آمید ۱۰/۷۱ میلی‌لیتر، TEMED ۱۵۰ میکرولیتر، پرسولفات آمونیوم ۱۵۰ میکرولیتر) با هم مخلوط شدند. در حین انجام این مرحله محلول آگارز را که شامل آگارز پنج درصد در بافر الکترود (تریس بازی سه گرم، گلایسین ۱٤/٤ گرم و SDS یک گرم) است را آماده کرده و حرارت داده تا حل شود و سپس آن را بر روی نوار IPG آگارز ذوب شده ریخته شد تا اتصال نوار و ژل به خوبی بر قرار شود. دستگاه الکتروفورز با برنامه مورد نظر تنظیم شده و ران کردن ژل‌ها تا زمانی که رنگ برموفنل بلو به ۱ تا ۲ میلی‌متری انتهای ژل برسد ادامه یافت.

پس از اتمام الکتروفورز، مراحل رنگ‌آمیزی طبق پروتکل بلوم (Blum et al. 1987) با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ کوماسی‌بلو R-250 (استوک رنگ کوماسی‌بلوبلریانت R-250 ۱۰۰ میلی‌لیتر، اسید استیک گلاسیال ۸۰ میلی‌لیتر، آب‌مقطر ۲۰ میلی‌لیتر) انجام شد. برای این مرحله حداقل زمان توصیه شده ۱٦ ساعت می‌باشد. سپس ژل‌ها در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ‌بر شامل ٤۰ میلی‌لیتر متانول، ۲۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۱٤۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر قرار داده شدند. رنگ‌بری تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف و باندهای پروتئینی نمایان شدند ادامه یافت.

پس از پایان مرحله رنگ‌بری ژل‌ها با وضوح تصویر ۳۰۰ نقطه در اینچ با استفاده از دستگاه اسکنر مدل GS-800 ساخت شرکت Bio-Rad اسکن شدند. سپس، تصاویر آن‌ها با نرم‌افزار Image Master 6.0 آنالیز شده، شناسایی لکه، تعیین مقدار پروتئین و جفت لکه‌ها با استفاده از این نرم‌افزار انجام شده و بررسی شدند. وزن مولکولی لکه‌های پروتئینی در ژل‌ها با انجام الکتروفورز هم‌زمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد تعیین و نقطه ایزوالکتریک با محل قرار گرفتن لکه پروتئینی بر روی نوار ۱۳ سانتی‌متری با محدوده pH= ۳-۱۰ خطی مشخص شد.

## نتایج و بحث

تحقیق حاضر به‌منظور مطالعه و شناسایی پروتئین‌های دخیل در مرحله نمو برگ گندم نان در مراحل مختلف نمو برگ طراحی و اجرا شد. بدین منظور گندم رقم آذر۲ در مراحل یگ برگی، دو برگی و سه برگی نمو برگ قبل از پنجه زنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از اسکن ژل‌های حاصل از الکتروفورز دو بعدی، تصاویر حاصل با استفاده ار نرم‌افزار Image Master 6.0 مورد آنالیز قرار گرفتند و تفاوت‌های الگوی پروتئینی در مراحل نمو برگ قبل از پنجه زنی (یک برگی، دو برگی و سه برگی) در گندم نان رقم آذر۲ بررسی شد. وزن مولکولی پروتئین‌ها در ژل‌ها با انجام الکتروفورز هم‌زمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد تعیین و نقطه ایزوالکتریک با محل قرار گرفتن لکه پروتئینی بر روی نوار ۱۳ سانتی‌متری با محدوده pH=۳-۱۰ خطی مشخص شد. به‌دلیل هزینه سنگین طیف‌سنجی جرمی لکه‌ها انجام نشد، اما در نرم‌افزار Image Master 6.0 جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای هر لکه تعیین و با جستجو در مقالاتی که در این زمینه کار شده بود،



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

با اطلاعات موجود لکه‌ها، شکل و محل قرار گرفتن لکه‌ها به‌طور احتمالی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که از مجموع ۳۶۰ پروتئین شناسایی شده ۳۱ پروتئین تغییرات معنی‌داری نشان دادند و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. به‌منظور بررسی تغییرات کمی بیان پروتئین‌ها، از مقدار درصد حجمی هر لکه به‌عنوان یک مقدار نرمال شده استفاده شد. داده‌های حاصل سپس با نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. برای تعیین تغییرات بین درصد حجمی لکه‌ها در مراحل مختلف نمو برگ از آزمون F در سطح اطمینان پنج درصد استفاده شد. جدول زیر پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار و روند مشخص در مراحل مختلف نمو برگی را نشان می‌دهد.

جدول۸- پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار و دارای روند مشخصی در مراحل مختلف نمو برگی

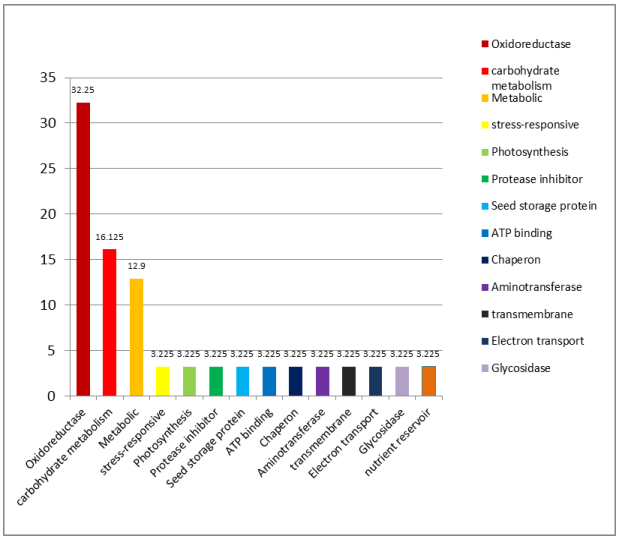
| NUM | Name | pI | MW(KDa) |
|---|---|---|---|
| ۱ | Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- Oxidoreductase | 7.63 | 32.6 |
| ۲ | Ferredoxin-NADP(۱H) oxidoreductase- Oxidoreductase activitiy | 6.36 | 43 |
| ۳ | 3-dehydroquinate dehydratase- Carbohydrate metabolism | 7.61 | 36 |
| ٤ | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase isoform1- Carbohydrate metabolism | 5.48 | 48.3 |
| ٥ | Dehydroascorbate reductase (DHAR۲)- Oxidoreductase | 6.3 | 26.5 |
| ٦ | sesquiterpene cyclase | 6 | 36 |
| ۷ | Peroxidase Precursor-Oxidoreductase | 7.01 | 38.2 |
| ۸ | Globulin 3- nutrient reservoir | 7.78 | 66 |
| ۹ | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast Metabolic - | 7.34 | 42.61 |
| ۱۰ | Class II chitinase- Glycosidase | 8.66 | 28 |
| ۱۱ | Thioredoxin M (TRX-M۳)- Electron transport | 8.7 | 19 |
| ۱۲ | Manganese superoxide dismutase- Oxidoreductase | 7.89 | 25 |
| ۱۳ | Carbonic anhydrase-like protein- Metabolic | 4.63 | 27 |
| ۱٤ | High-affinity phosphate transporter PT1- transmembrane | 7.85 | 20 |
| ۱٥ | Ferredoxin-nitrite reductase Precursor- Oxidoreductase | 7.18 | 64 |
| ۱٦ | Ferritin-Oxidoreductase | 5.34 | 27.5 |
| ۱۷ | Malate dehydrogenase glyoxysomal precursor-Oxidoreductase | 8.25 | 35 |
| ۱۸ | Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase , chloroplast- Carbohydrate metabolism | 5.98 | 44.7 |
| ۱۹ | Aspartate aminotransferase- Aminotransferase | 6.77 | 42 |
| ۲۰ | RuBisCO Small subunit- Chaperone | 7.06 | 15 |
| ۲۱ | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- Metabolic | 7.50 | 39.5 |
| ۲۲ | ATP synthase subunit gamma- Metabolic | 8.44 | 39.8 |
| ۲۳ | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform 1- Oxidoreductase | 7.43 | 55.9 |
| ۲٤ | Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit- Oxidoreductase | 8.47 | 23.7 |
| ۲٥ | Ribulose bisphosphate carboxylase activase B- ATP binding | 8.10 | 44.5 |
| ۲٦ | Glutelin Precursor- Seed storage protein | 8.20 | 14.50 |
| ۲۷ | Bowman-Birk type proteinase inhibitor II-4- Protease inhibitor | 8.45 | 59.41 |
| ۲۸ | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase- Carbohydrate metabolism | 8.62 | 47.1 |
| ۲۹ | 23 KDa Oxygen-evolving protein of photosystem II- Photosynthesis | 8.84 | 27 |
| ۳۰ | Putative fructose 1-,6 biphosphate aldolase - Carbohydrate metabolism | 7.72 | 48.5 |
| ۳۱ | unidentified protein- stress-responsive | 8.30 | 50 |

[1] Nicotinamide adenine dinocleotide phosphate



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

پروتئین‌ها در فرایندهای اساسی نظیر، پاسخ گیاه در برابر تنش، فتوسنتز، متابولیسم انرژی، انباشت پروتئین‌های سنتزی، پروتئین‌های مؤثر در متابولیسم، پروتئین‌های ذخیره‌ای و پروتئین‌های انتقالی نقش دارند (Feller and Fischer 1994). درصد پروتئین‌های شرکت کننده در فرایندهای مختلف رشد گیاه در شکل (۹) خلاصه شده است. کل پروتئین‌هایی که افزایش و یا کاهش بیان نشان دادند به‌طور احتمالی شناسایی و نقش آن‌ها در مسیر تکامل گیاه بررسی شد (جدول ۸). اکثر پروتئین‌های شناسایی شده در مراحل مختلف نمو برگ قبل از پنجه‌زنی اکسیدوردوکتاز ۳۲/۲۵ درصد، متابولیسم کربوهیدرات‌ها ۱۶/۱۲ درصد، متابولیسم ۱۲/۹ درصد نقش داشتند و کمترین تغییرات در پروتئین‌های پاسخ به تنش، فتوسنتزی، مهارکننده پروتئاز، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، باند شونده به ATP، چاپرون‌ها، آمینوترانسفرازها، حمل و نقل غشایی، انتقال الکترون، گلیکوزیدازها و انتقال مواد غذایی دیده شد.




شکل ۹- درصد پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌داری بر اساس نقش و عمل آن‌ها

با یک نگاه کلی‌تر مشخص می‌شود که پروتئین‌هایی که در مراحل مختلف نمو برگ تغییر بیان نشان دادند اکثراً دچار کاهش بیان شدند و بیشتر این پروتئین‌ها از آنزیم‌های کلروپلاستی و تعدادی هم از آنزیم‌های میتوکندریایی بودند. این امر می‌تواند مؤید این موضوع باشد که افزایش تعداد برگ باعث کاهش بیان تعدادی از آنزیم‌های میتوکندریایی شده و در نتیجه باعث افزایش میزان شدت تنفس در گیاه می‌شود. از طرف دیگر تعداد بسیار زیادی از پروتئین‌های کاهش بیان یافته از آنزیم‌های کلروپلاستی و مخصوصاً فتوسنتزی می‌باشند که نشان دهنده مدیریت گیاه جهت کاهش میزان تولیدات خود از طریق کاهش فتوسنتز و جلوگیری از هدر رفت انرژی می‌باشد. این دسته از پروتئین‌ها بیشتر از انواع کینازها و ATP آزها بودند و پروتئین‌های محافظتی و ترمیمی کمتر در میان آن‌ها یافت شد (Cabello et al. 2006). با دقت بیشتر در نحوه وقوع این تغییرات معلوم می‌شود که پروتئین‌هایی که روند تغییرات آن‌ها در مراحل مختلف نمو برگ افزایشی بوده یا از گروه پروتئین‌های ترمیمی و محافظت کننده می‌باشند که باعث جلوگیری از به‌وجود آمدن خسارت بیشتر و جلوگیری از فعالیت‌های عوامل خسارت‌زا مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود و یا در ساماندهی و مصرف انرژی نقش دارند و گیاه را به سمت مصرف بهینه و اقتصادی‌تر انرژی سوق می‌دهند (Thomas and James 1993). نتایج نشان داد که مهم‌ترین پروتئین‌های شناسایی شده عبارتند از فریتین، آسکوربات پراکسیداز و روبیسکو اکتیواز، پروتئین‌های مذکور همگی آنزیم بوده و در سازوکارهای سم زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)، هموستازی آهن (فریتین) و یا فعال‌سازی دیگر آنزیم‌ها (روبیسکواکتیواز) نقش دارند.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که رفتار گیاهان در مراحل رویشی بسیار متفاوت و فوق العاده پیچیده و شناسایی این رفتارها، تفسیر و پی بردن به روابط بین صفات مرتبط با رشد رویشی برگ، مستلزم انجام آزمایشات بسیار دقیق و گوناگون و تلفیق نتایج حاصل می‌باشد (Mehrabi et al. 2013). به‌عنوان مثال اگر در مطالعه حاضر امکان تعیین خصوصیت همه پروتئین‌های تغییر یافته در مرحله نمو برگ فراهم می‌شد، شاید اطلاعات بیشتری در خصوص ارتباط پروتئین‌ها و مرحله نمو برگ به‌دست می‌آمد. به هر حال، با افزایش دانش ما از ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و یافتن ارتباط دقیق‌تر این ترکیبات اساسی در سلول، شاید به‌توان



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]

به کاربردهای علمی‌تر در شناخت پروتئین‌های مرحله نمو برگ دست یافت.

**نتیجه‌گیری کلی**

در این تحقیق مطالعه و شناسایی پروتئین‌های دخیل در مرحله نمو برگ گندم نان رقم آذر۲ در مراحل یک برگی، دو برگی و سه برگی مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که دامنه وسیعی از فعالیت‌های متابولیکی شامل فتوسنتز، تنفس، بیوسنتز پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها، مونتاژ و بسته بندی پروتئین‌ها، بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، سیستم انتقال پیام، سم‌زدایی و فرایندهای پایه‌ای ژنتیکی (همانندسازی، نسخه‌برداری و ترجمه) طی مراحل مختلف نمو برگ دچار تغییرات شده‌اند. توجه به این نکته ضروری است که بررسی پروتئوم برگ گندم نان در مراحل مختلف نمو برگ از طریق تلفیق روش‌های مختلف ژنومیکس کاربردی نظیر ترانس‌کریپتومیکس و پروتئومیکس با مطالعه فیزیولوژی گیاه امکان‌پذیر خواهد بود و بدین ترتیب است که فرایند پیچیده نحوهٔ شناسایی پروتئین‌های دخیل در مرحله رشد رویشی گیاه روشن خواهد شد. برای تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود که این آزمایش بر روی ارقام دیگر گندم نان تکرار و الگوی تغییرات پروتئوم آن‌ها با این تحقیق مورد مقایسه قرار گیرد. آزمایشات پروتئینی بر روی پروتئوم اندام‌های دیگر گیاه و در مراحل رشدی دیگری تکرار شود. تلفیق نتایج پروتئومیکس و ژنومیکس به‌طوری‌که پروتئوم گونه‌های مختلف تجزیه و نقشه‌برداری پروتئوم صورت پذیرد. تغییرات در سطح ترانس‌کریپتوم به‌همراه تغییرات پروتئوم بررسی شده و داده‌های حاصل با یکدیگر مقایسه شوند. شناسایی و انجام اسپکتروفوتومتری جرمی ۳۱ لکه پروتئینی یافت شده در این تحقیق ممکن است بینش بیشتری را در مسیر شناسایی پروتئین‌های دخیل در پیشرفت مرحله نمو برگ مشخص کند.

## منابع

Blum L, Monelus R,Vincent D, Carpin S, Claverol S, Lomeneeh AM, Labas V, Plomion CH, Brignolas F, Morabito D (1987) Genetic variation and drought response euramericans genotypes through 2-DE proteomic Analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. Photochemistry 70: 988-1002.

Bradford MM (1979) A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-day binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cabello P, Aguera E, Haba P (2006) Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. Physiologia Plantarum 128: 175–185.

Damerval C, Zivy M, Granier F, Devienne D (1989) Two-dimensional electrophoresis in plant biology. Adv. Electrophoresis Springer.

Feller U, Fischer A (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. Critical Reviews in Plant Science 13: 241-273.

Mehrabi A M, Mostafaie A, MajidiHarvan A, Haghparast R, Kahrizi D (2013) The comparison of leaf protein patterns between two tolerant and susceptible varieties of wheat under drought stress. International Journal of Food, Agriculture & Environment 19: 935-946.

Mostafaie A (2003) Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Yadavaran Publishers (In Farsi).

Noor Mohammadi Q, Kashani E (1996) Agriculture grain, Ahvaz Chamran martyr University Press (In Farsi).

Reddy K, Perrotta P (2004) Proteomics in transfusion medicine. Transfusion, 44: 601-604.

Rossignol M, Peltier JB, Mock H, Matros A, Maldonado A, Jorrin J (2006) Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. Proteomics, 6: 5529-5548.

Thomas H, James AR (1993) Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. Annals of Botany 72: 249-254.

Weegls PL, Hamer RJ, Schofield JD (1996) Functional Properties of Wheat glutenin. Cereal Science 23: 1-17.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.3.8 ]