ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۶۸-۲۵۹

بررسی پروتئوم پاسخ به تنش خشکی در گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از تکنولوژی DIGE

هنگامه طاهری*[۱]، محمدرضا بی همتا[۲]، عبدالهادی حسین زاده[۳]، محمدرضا نقوی[٤]، تیموتی مارچ[٥]

۱،۲،۳و۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

۵- محقق گروه اصلاح نباتات دانشگاه مارتین لوتر- آلمان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:hengame.taheri@gmail.com

(تاریخ دریافت:۹۰/۳/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد و نمو در گیاه جو است. در این تحقیق به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به خشکی، تجزیه پروتئوم بر پایه ژل الکتروفورز دوبعدی انجام گرفت. گلدان‌های آزمایشی به صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تیمار آبیاری (شرایط کنترل و تنش) و سه ژنوتیپ جو مرتب شدند. گیاهان تا مرحله چهار برگی به طور طبیعی آبیاری شدند و پس از آن به مدت ده روز در معرض تنش شدید خشکی قرار گرفتند. اثر خشکی روی شاخص‌های فیزیولوژیکی وزن خشک، وزن تر، محتوای رطوبت نسبی و میزان پرولین در مقایسه با شرایط نرمال رطوبتی در سطح یک درصد معنی‌دار بود. جهت مطالعه تغییرات میزان پروتئین، تجزیه پروتئوم بر اساس تکنولوژی DIGE به همراه یک استاندارد داخلی بکار گرفته شد. نتایج حاصل از تجزیه ژل‌های CyDyes نشان داد که از میان ۷۶۸ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، ۳۷ لکه تغییرات معنی‌داری را به عنوان اثرات ژنوتیپ یا اثرات متقابل سطوح آبیاری و ژنوتیپ نشان دادند و در نهایت تجزیه طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF منجر به شناسایی پروتئین‌هایی شد که در فرایندهای متابولیزم، انرژی، ساختار سلولی، واکنش‌های دفاعی، انتقال سیگنالی و تمایز سلولی نقش ایفاء می‌کنند.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی،
تنش خشکی،
جو زراعی،
طیف سنج جرمی،
DIGE.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

مقدمه

گیاهان اغلب به صورت فزاینده‌ای در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند (Bray et al. 2000) به طوری‌که حدود ۷۰ درصد از پتانسیل عملکردی محصولات کشاورزی تحت شرایط نامساعد محیطی از بین می‌رود (Salekdeh and Komatsu 2007). خشکی یکی از رایج‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و نمو گیاهان را از طریق تغییر در متابولیسم و بیان ژن‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهد و به این ترتیب مهمترین عامل کاهنده عملکرد در اکثر مناطق زراعی می‌باشد (Leopold 1990). ایران یکی از کشورهایی است که با شدیدترین خشکی‌های جهان روبرو بوده و پیش‌بینی می‌شود که در سال ۲۰۲۵ یکی از شدیدترین خشکسالی‌ها را تجربه کند (Agrawala et al. 2001). جو (*Hordeum vulgare* L.) یکی از مهمترین غلاتی است که اغلب در کشورهای در حال توسعه‌ای که در معرض تنش خشکی هستند کشت می‌گردد و به واسطه رویارویی با این پدیده عملکرد محصول به طور چشمگیری تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Guo and Baum 2009). بررسی مکانیزم‌های تحمل به خشکی در جو از طریق روش‌های و ژنومیکسی درک بهتری از اساس ژنتیکی تحمل به تنش خشکی را فراهم می‌آورد (Tuberosa and Salvi 2004). تغییر الگوی بیان ژن‌ها یکی از اصلی‌ترین راهکارهای کاهش اثرات تنش درگیاهان می‌باشد (Liu and Baird 2004; Hazen et al. 2005). برخی از ژن‌ها نقش مهمی در حفاظت گیاه در برابر تنش خشکی بواسطه دریافت، انتقال سیگنال و فعال‌سازی فاکتورهای نسخه‌برداری ایفاء می‌کنند و به این ترتیب محصول آنها پاسخ‌های دفاعی را در گیاه بر علیه استرس به دنبال خواهند داشت (Nakashima and Amaguchi-Shinozaki 2006). همچنین گیاهان قادرند با تغییر متابولیز از اثرات مخرب تنش کاسته و بر آن فائق آیند. به عنوان مثال گیاهان از طریق کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی نسبت به آب، به حفظ محتوای آبی خود در طول تنش خشکی، کمک شایانی می نمایند. این تنظیم اسمزی با تجمع اسمولیت‌ها همراه می باشد. پرولین، معمول‌ترین اسمولیتی است که در مطالعات مربوط به تنظیم اسمزی نقشی ویژه ایفاء می‌کند (Jang and Sheen 1997). هر چند که مطالعه تغییرات بیان ژن‌ها در سطح نسخه برداری در گیاه جو در مرحله رشد رویشی و زایشی با استفاده از روش ریز آرایه[1] منجر به شناسایی ژن‌هایی شده است که نقش اساسی در تقویت تحمل به استرس ایفاء می‌کنند (Talame and Ozturk 2007;Guo and Baum 2009; Abebe et al. 2010) اما ظهور پروتئومیکس به عنوان ابزاری جهت تجزیه بیان ژن در سطح پروتئین کاستی‌های بررسی بیان ژن در سطح mRNA (نظیر ریزآرایه) را تا حد زیادی مرتفع می‌نماید. از آنجا که این تکنولوژی مستقیماً بیوشیمی سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بنابراین تجزیه درست و دقیقی از تغییرات سیستم سلولی در طول دوره رشد و نمو و پاسخ به عوامل محیطی فراهم می‌آورد. در حقیقت پیشرفت‌های اخیر پروتئومیکس به واسطه ابداع روش‌های نوین طیف سنجی جرمی[2] جهت یونیزه نمودن ملایم ماکرومولکول‌های زیستی بویژه پروتئین‌ها و توالی‌یابی ژنومی است (Hasegawa et al. 2000). همچنین با پیدایش روش‌های نوین ژل الکتروفورز دو بعدی مبتنی بر رنگ‌های فلورسنتی نظیر DIGE[3] بسیاری از موانع و محدودیت‌های روش‌های مرسوم آن مرتفع شد. استفاده از این تکنیک، کاربرد گسترده پروتئومیکس کمی را از طریق بهبود کیفیت ژل‌های دو بعدی و افزایش توانایی تشخیص بین لکه‌هایی با تفاوت‌های بسیار جزئی بهبود می‌بخشد. در روش‌های معمول ژل الکتروفورز دوبعدی تفکیک نمونه‌های پروتئینی بر روی ژل‌های متفاوت صورت می گیرد، به این ترتیب که به ازاء هر نمونه پروتئینی یک ژل مورد استفاده قرار می گیرد، حال آنکه در روش مبتنی بر DIGE می توان سه مخزن پروتئینی جداگانه(که هر یک از تیمارهای جداگانه‌ای استخراج شده‌اند) را به صورت همزمان تنها بر روی یک ژل الکتروفورز دو بعدی تفکیک کرد و بدین ترتیب استفاده از این روش در مقایسه با روش‌های مرسوم می‌تواند تغییرات و تنوعات موجود در بین ژل‌های مختلف تیمارهای مختلف را به حداقل برساند. به این ترتیب که دو رنگ فلورسنتی Cy3 و Cy5 جهت نشان‌دار کردن دو نمونه

[1] Microarray
[2] Mass Spectrometry
[3] Differential in- gel electrophoresis

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

پروتئینی(دو تیمار جداگانه) که بایستی مورد مقایسه قرار بگیرند استفاده می‌گردد و رنگ سوم Cy2 جهت نشان‌دار کردن یک استاندارد داخلی[1] که شامل مقادیر برابری ازتمام نمونه‌های پروتئینی مورد بررسی در آزمایش می‌باشد بکار می‌رود. استفاده از استاندارد داخلی با یکسان‌سازی پس زمینه در تمام ژل‌ها و تصحیح اشتباهات، امکان مقایسات کمی بیان پروتئین‌ها را بهبود می‌بخشد (Amme et al. 2006;Karp and Lilley 2005).

هر چند که در سال‌های اخیر تغییرات الگوی بیان پروتئین‌ها تحت تنش خشکی در مرحله رشد رویشی در چندین گیاه مورد مطالعه قرار گرفته و منجر به شناسایی تعداد بیشماری از پروتئین‌های پاسخ دهنده به خشکی نظیر پروتئین‌های دخیل در تنظیم استرس اکسیداتیو، انتقال سیگنالی ، فعالیت‌های چپرونی و سازماندهی دوباره سیتواسکلتون شده است (Salekdeh et al.2002;Hajheidari and Abdollahian 2005) اما تحقیقات اندکی در راستای ارزیابی پروتئوم گیاه جو در مرحله رشد رویشی تحت تنش خشکی صورت گرفته است لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی ارتباط بین شاخص‌های فیزیولوژیکی و تنش خشکی در مرحله رشد رویشی در سه ژنوتیپ جو با زمینه ژنتیکی متفاوت صورت گرفته است. همچنین جهت فهم بیشتر تغییرات بیوشیمیایی در پاسخ به تنش خشکی در سطح سلولی تغییرات الگوی پروتئوم این ژنوتیپ‌ها با استفاده از تکنیک پروتئومیکس و تجزیه دو بعدی مبتنی بر رنگ‌های فلورسنتی (2DE DIGE) مورد مطالعه قرار گرفت و منجر به شناسایی تعدادی پروتئین کاندید پاسخ دهنده به تنش خشکی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار خشکی

سه ژنوتیپ جو بنام‌های S42IL.121 و S42IL.135 و Scarlett به عنوان مواد ژنتیکی جهت اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی و بررسی بیان پروتئین تحت تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفتند. دو ژنوتیپ S42IL.121 و S42IL.135 در نتیجه چندین نسل تلاقی برگشتی و خودگشنی حاصل از تلاقی ژنوتیپ Scarlett (رقم مورد کشت در آلمان و والد تکراری) و *Hordeum spontanium (ISR42-8)* (والد بخشنده) حاصل شده‌اند (Schmalenbach et al. 2008). از آنجا که زمینه ژنتیکی دو ژنوتیپ S42Il.121 و S42Il.135 نسبت به ژنوتیپ Scarlett تا حدی متفاوت می‌باشد بدین‌ترتیب که منطقه‌ای از کروموزوم شماره ۷ و ۴ Scarlett بترتیب در ژنوتیپ‌های S42IL.135 و S42IL.121 بوسیله *Hordeum spontaneum* جایگزین شده، لذا تحقیق حاضر به منظور مقایسه پاسخ‌های سلولی این دو ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ Scarlett تحت تنش خشکی صورت گرفته است. بذور در گلدان‌هایی به ابعاد ۱۳×۱۳ سانتی‌متر که شامل خاک زراعی(تجاری) بودند، کشت شدند (ده بذر در هر گلدان). آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تیمار آبیاری (شرایط کنترل که در آن رطوبت خاک در حد ۱۰۰ درصد رطوبت مزرعه[2] حفظ شد و تنش تدریجی که تقریباً پس از گذشت یک هفته از توقف آبیاری رطوبت خاک به ۲۰ درصد رطوبت مزرعه رسید) و سه ژنوتیپ و سه تکرار در هر آزمایش تحت شرایط کنترل شده گلخانه‌ای در دانشگاه مارتین لوتر آلمان (هاله–ویتنبرگ)[3] به انجام رسید. برای تعیین ظرفیت زراعی خاک مورد نظر ابتدا خاک بوسیله آب اشباع شده و سپس وزن آن پس از هدررفت آب اضافی یادداشت شد. آنگاه وزن خاک قبل و بعد از قرار گرفتن در آون (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت) جهت تعیین میزان آب خاک اندازه‌گیری شد و بدین‌ترتیب جهت حفظ رطوبت خاک در شرایط رطوبت زراعی مورد نظر، گلدان‌ها هر روز وزن و آب مورد نیاز آنها تأمین شد (Samarah et al. 2009). گیاهان تحت شرایط دمائی روز ۲۲ درجه سانتی گراد و شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵۸ درصد رشد یافتند. از آنجا که هدف آزمایش مطالعه تغییرات پاسخ سلولی به تنش خشکی در مرحله رشد رویشی بود لذا تیمار خشکی در مرحله چهاربرگی آغاز شد. پس از اعمال تنش به مدت ۱۰ روز، نمونه‌گیری از برگ کاملاً

[1] Internal Standard

[2] Field Capacity (FC)
[3] Martin- Luther University, Halle, Wittenberg (Germany)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

توسعه یافته چهارم (جهت شمارش از بالا) انجام شد. سپس نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و تا هنگام استخراج پروتئین در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مراحل آزمایش جهت تأیید تکرارپذیری نتایج، دو بار تکرار شد.

اندازه گیری شاخص های فیزیولوژیکی

در پایان آزمایش، گیاهان جهت اندازه‌گیری وزن تر و خشک جمع‌آوری شدند. دو گیاه از هر گلدان به طور تصادفی انتخاب و پس از برش، فورا وزن تر آنها یادداشت شد. جهت تعیین وزن خشک، وزن هر گیاه پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، اندازه‌گیری شد. کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج (SPAD 502 Chlorophyll Meter) پس از گذشت یک، دو، چهار، شش، هشت و ده روز از اینکه رطوبت زراعی خاک به ۲۰ درصد رسید در گیاهان تحت تنش و کنترل اندازه‌گیری شد. از آنجا که پرولین می‌تواند در شرایط اسیدی در ترکیب با نینهیدرین محلول قرمز رنگی تولید نماید، از این روش رنگ‌سنجی جهت تعیین غلظت پرولین استفاده شد (Bates et al. 1973). مقدار آب گیاه در طول تنش خشکی بوسیله محتوای نسبی آب[1]، که به عنوان شاخص ارزشمندی جهت ارزیابی ژنوتیپ‌ها بکار می‌رود، بر روی برگ چهارم اندازه‌گیری شد (Barr and Weatherley 1962)

استخراج پروتئین و الکتروفورز دو بعدی

استخراج پروتئین از بافت برگ (برگ چهارم) بر اساس روش مبتنی بر فنل- آمونیوم استات در متانول صورت گرفت. از کیت 2-D Quant (Biosciences, GE Healthcare/Amersham) Freiburg,Germany و BSA (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان استاندارد استفاده شد. از فلوئوروفورهای متفاوتی (Cy2، Cy3، Cy5) جهت نشان‌دار کردن نمونه‌های پروتئینی استفاده شد. ابتدا نشانگرها با استفاده از دای متیل فورمامید[2] به غلظت نهایی ۴۰۰ پیکو مول بر میکرولیتر رسیدند. همه نمونه‌های پروتئینی (هر کدام به غلظت ۲۵ میکروگرم) در یک ویال باهم مخلوط شدند. بسته به تعداد نمونه‌های پروتئینی (حاصلضرب سطوح آبیاری× بلوک× ژنوتیپ) ۳۰ میکرولیتر Cy2 به ویال اضافه شد. نشانگر Cy2 به عنوان استاندارد داخلی جهت بررسی دقیق‌تر کمی و کیفی لکه‌ها به کار گرفته شد. ۵۰ میکروگرم از هر کدام از نمونه‌های پروتئینی در ویال‌های جداگانه قرار گرفت و به میزان یک میکرولیتر نشانگر (به طور تصادفی برخی نمونه‌ها با نشانگر Cy3 و برخی دیگر با Cy5 رنگ آمیزی شدند) به ویال‌ها اضافه شد و در نهایت نشان‌دار کردن نمونه‌های پروتئینی با استفاده از کیت labeling Kit- Dye AGNOSTICS انجام گرفت و در پایان تمام نمونه‌های پروتئینی نشان‌دار شده (Cy5، Cy3،Cy2) در یک ویال قرار گرفتند. در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل‌های IP*G* ۲۴ سانتی متری با دامنه pH ۱۱-۳ ، پروتئین‌ها در استوک بازجذب[3] حل شده و همزمان با عمل بازجذب وارد ژل شدند. عمل بازجذب در طول شب و در تاریکی (به دلیل حساسیت نشانگرها به نور) در دمای اتاق (به طور متوسط ۱۴ تا ۱۶ ساعت) صورت پذیرفت. آنگاه نوارهای IPG بازجذب شده جهت انجام بعد اول (IEF) به دستگاه IPGphor (GE Healthcare) منتقل شدند. جهت انجام SDS-page به عنوان بعد دوم از ۱۴ قالب شیشه‌ایی بزرگ (۲۴×۲۰cm) که به موازات هم قرار گرفته بودند استفاده شد. پس از قرار گرفتن ژل‌های IPG در قسمت بالای فضای بین دو شیشه ژل اکریلامید ۱۲/۵درصد ، شیشه‌ها در تانک Ettan™ DALT twelve tank جاسازی شده و ۱۲ ژل به طور همزمان تحت شرایط الکتروفورزی ۱۵ وات (به ازای هر ژل) قرار گرفتند. آنگاه ژل‌ها با استفاده از Typhoon با قدرت تفکیک ۱۰۰ میکرومول اسکن شده و جهت بررسی کمّی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف در برنامه نرم‌افزاری (Decodon, Delta 2D 4.0 Greifswald, Germany) وارد شدند. پس از استخراج درصد حجمی لکه‌ها و تجزیه واریانس داده‌های مورد نظر، جهت مقایسه میانگین پروتئین‌های بیان شده در ژنوتیپ‌های مذکور در شرایط تنش و نرمال رطوبتی در مقایسه با ژنوتیپ Scarlett (به عنوان شاهد) آزمون دانِت[4] انجام شد و لکه‌هایی که مقادیر کمّی بیان آنها تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با ژنوتیپ Scarlett نشان دادند، به عنوان لکه‌های کاندید شناخته شدند. این لکه‌ها به منظور شناسایی

[1] Relative water content (RWC)
[2] Dimethylformamide (DMF)
[3] Rehydration
[4] Dunnett test

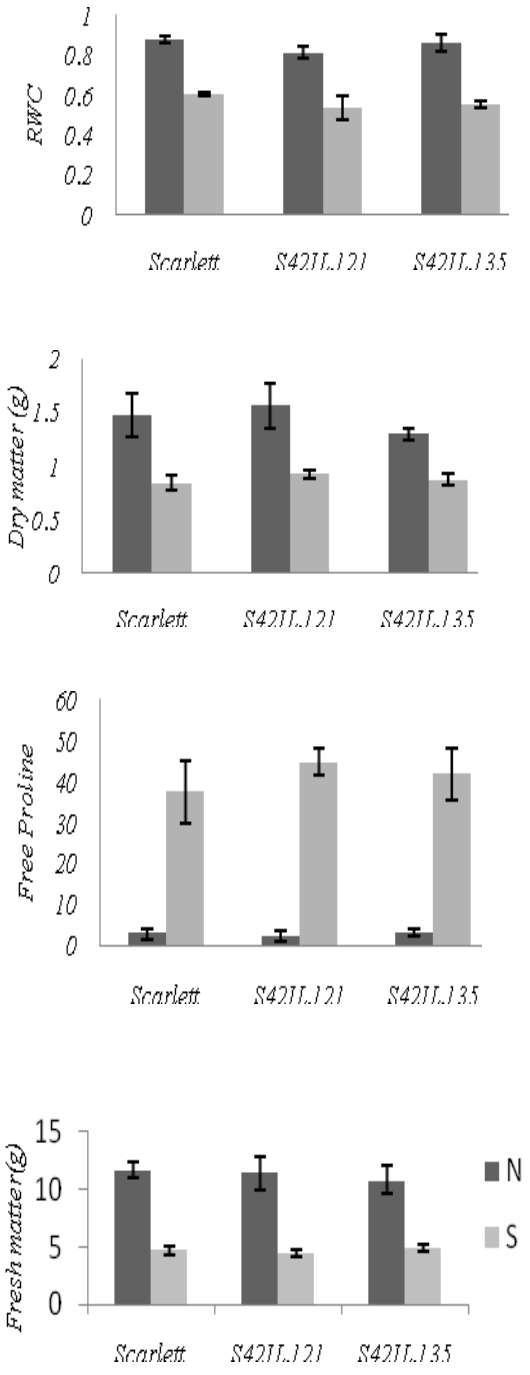
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

به وسیله طیف سنج جرمی از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده به وسیله Colloidal Coomassie Brilliant Blue 250 جدا شدند. تجزیه طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF در موسسهٔ Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany انجام گرفت.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی

پس از آنکه رطوبت خاک به ۲۰ درصد ظرفیت زراعی رسید، گیاهچه‌ها به مدت ده روز در این شرایط رطوبتی خاک نگه داشته شدند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$) بین سطوح آبیاری یعنی تنش خشکی و شرایط کنترل در شاخص‌های وزن تر، وزن خشک، محتوای آب نسبی و محتوای پرولین آزاد در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد. اما هیچگونه تفاوت معنی‌داری به عنوان اثرات ژنوتیپ و اثرات متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری در مورد صفات ذکر شده مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که به دلیل شباهت زمینه ژنتیکی دو ژنوتیپ مورد بررسی نسبت به اسکارلت، پاسخ‌های فیزیولوژیکی آنها نیز نسبت به تنش خشکی تقریباً مشابه ژنوتیپ اسکارلت می‌باشد. نمودارها نشان می‌دهند که وزن خشک، وزن تر و محتوای آب نسبی پس از اعمال تنش کاهش یافته حال آنکه محتوای پرولین پس از اعمال تنش خشکی در مقایسه با شرایط نرمال افزایش چشمگیری یافته است (شکل ۱). روند تغییرات محتوای کلروفیل تحت تنش خشکی در طی ده روز در ژنوتیپ‌های یاد شده در شکل ۲ نشان داده شده است. هرچند که محتوای کلروفیل در گیاهان تحت تنش نسبت به شرایط کنترل از روز ششم کاهش پیدا کرد ($P < ۰/۰۵$)، اما نتایج حاصل از آزمون دانِت نشان داد که تا پیش از روز دهم تنش، هیچ‌گونه کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل گیاهان تحت تنش در دو ژنوتیپ مورد نظر در مقایسه با ژنوتیپ اسکارلت در شرایط متناظر مشاهده نشد و تنها تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد در روز دهم تنش مشاهده شد.



شکل ۱- میانگین و انحراف معیار شاخص های فیزیولوژیک (وزن تر، وزن خشک، محتوای رطوبت نسبی، محتوای پرولین) تحت شرایط کنترل (N=100%FC) و تنش خشکی (S=20%FC).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

جدول۱- پروتئین‌های با بیان متمایز به عنوان اثرات ژنوتیپ یا ژنوتیپ × سطوح آبیاری شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF-TOF در ژنوتیپ‌های S42IL-121 و S42IL-135 در مقایسه با ژنوتیپ اسکارلت

Spot No	Genotype	Treatment[۱]	*LS Mean*[۲] *Genotype*	*LS Mean Scarlett*	Fold change[۳]	P-value[۴]	Uni Ref 90 No.[۵]	Protein name	MW/ PI[۶]	Organism
239	S42IL-135	Both	109.31	95.59	1.14	0.028	Q95NX2	Glucose phosphomutase	62.67/5.34	*Bromus inermis*
249	S42IL-135	Both	108.94	90.72	1.2	0.013	Q40002	v. type proton ATpase catalytic subunit A	64.09/5.38	*Hordeum vulgare*
461	S42IL-121	Both	104.95	96.53	1.08	0.018	*P26302*	Phosphoribulo kinase	45.14/5.72	*Triticum aestvum*
467	S42IL-121	Both	101.1	84.75	1.19	0.002	Q01KC0	Aminomethyl transferase	43.9/8.53	*Oryza sativa*
510	S42IL-121	Both	172.62	125.41	1.13	0.037	P17784	Fructose. bis phosphate aldolase cytoplasmic isozyme	38.86/6.96	*Oryza sativa*
527	S42IL-121	Both	99.24	90.63	1.09	0.039	Q40677	Fructose bisphosphate aldolase	42/6.39	*Oryza sativa*
723	S42IL-135	Both	129.6	101.22	1.28	0.004	Q41522	Thiol protease	41.44/6.76	*Triticum aestvum*
725	S42IL-135	Both	135.13	111.14	1.21	0.029	Q41523	Thiol protease	41.44/6.76	*Triticum. aestvum*
745	S42IL-135	Both	115.29	100.29	1.15	0.034	Q6ER94	2. cys peroxiredoxin BAS1	28.09/5.67	*Oryza sativa*
776	S42IL-135	Both	286.32	176.84	1.61	0.041	Q00434	Oxygen evolving enhancer protein 2	27.26/8.84	*Triticum aestvum*
841	S42IL-121	Both	138.29	118.6	1.16	0.049	Q6XPZ4	Cyclophilin like protein photosystemII	25.89/9.59	*Triticum aestvum*
902	S42IL-135	Both	126.71	105.64	1.19	0.029	Q5Z5A8	stability/assembly factor HCF 136	45.47/9.02	*Oryza sativa*
535	S42IL-135	Both	118.56	147.18	-1.24	0.015	Q65XA1	Os05g0116000(putative legumin)	38.2/5.82	*Oryza Sativa*
642	S42IL-135	Drought	185.66	133.89	1.38	0.015	Q7G227	Glutathione S- Transferase	30.79/5.17	*Oryza sativa*
753	S42IL-135	Drought	143.4	106.03	1.35	0.028	Q9M5G3	Translationally – controlled tumor protein homolog	18.88/4.53	*Hordeum vulgare*
776	S42IL-135	Drought	367.28	179.09	2.05	0.019	Q00434	Oxygen evolving enhancer protein 2	27.26/8.84	*Triticum aestvum*
812	S42IL-135	Drought	307.09	195.57	1.57	0.014	O49871	Germin- like protein 1 precursor	21.82/5.68	*Hordeum vulgare*
711	S42IL-135	Drought	97.21	168.2	-1.73	0.008	Q93WC0	Flavin containing polyamine oxidase	56.51/6.19	*Hordeum vulgare*
445	S42IL-121	Watered	129.56	107.38	1.2	0.048	Q01KC0	Aminomethyl transferase	43.9/8.53	*Oryza sativa*
723	S42IL-135	Watered	115.99	79.3	1.46	0.02	Q41522	Thiol protease	41.44/6.76	*Triticum aestvum*

[۱] Both : لکه هایی با بیان متمایز در یکی از ژنوتیپ های S42IL.121 و S42IL.135 در هر دو شرایط تنش و نرمال نسبت به ژنوتیپ اسکارلت (اثر ژنوتیپ) و لکه هایی با بیان متمایز در یکی از ژنوتیپ های مورد مطالعه تحت شرایط تنش یا ترمال (اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری)

[۲] میانگین درصد حجمی لکه هایی با بیان متمایز در ژنوتیپ های مورد مطالعه

[۳] نسبت میانگین درصد حجمی لکه‌های بیان شده در ژنوتیپ های مورد مطالعه به میانگین درصد حجمی لکه های بیان شده در ژنوتیپ اسکارلت در شرایط متناظر

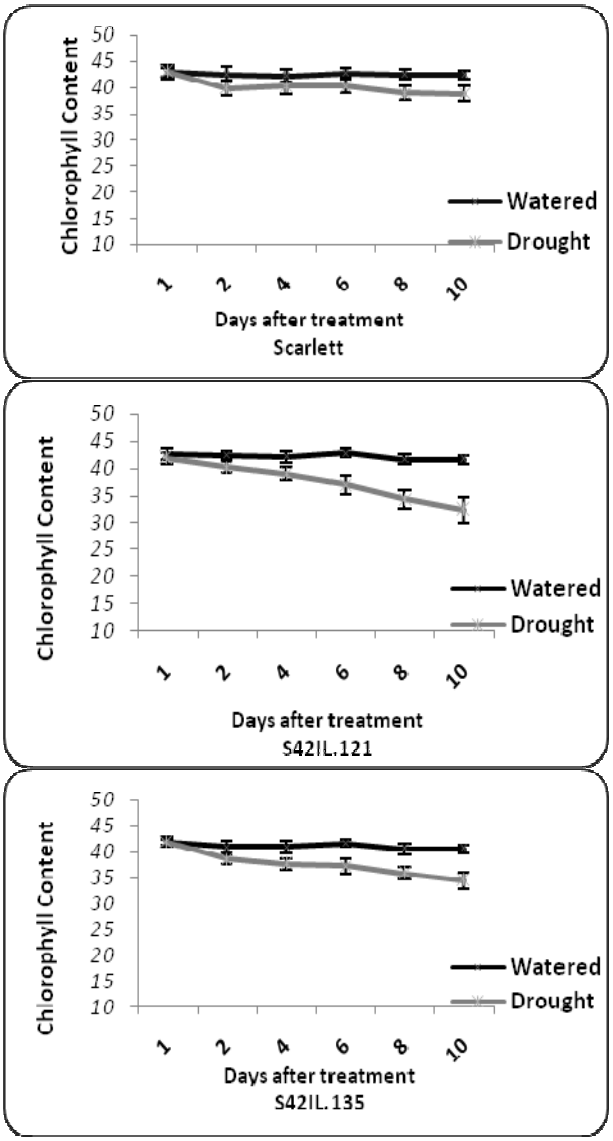
[۴] سطح معنی‌دار پروتئین‌هایی با بیان متمایز

[۵] Uni Ref 90 معرف بانک اطلاعاتی گروه جامعی از شناسه پروتئین‌هائی است که بر اساس ۹۰ درصد شباهت توالی با پروتئین‌های شناخته شده گردآوری شده است.

[۶] وزن مولکولی (MW) و نقطه ایزوالکتریک(IP) پروتئین‌هایی با بیان متمایز که بوسیله سایت www.uniprot.org محاسبه شده است

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

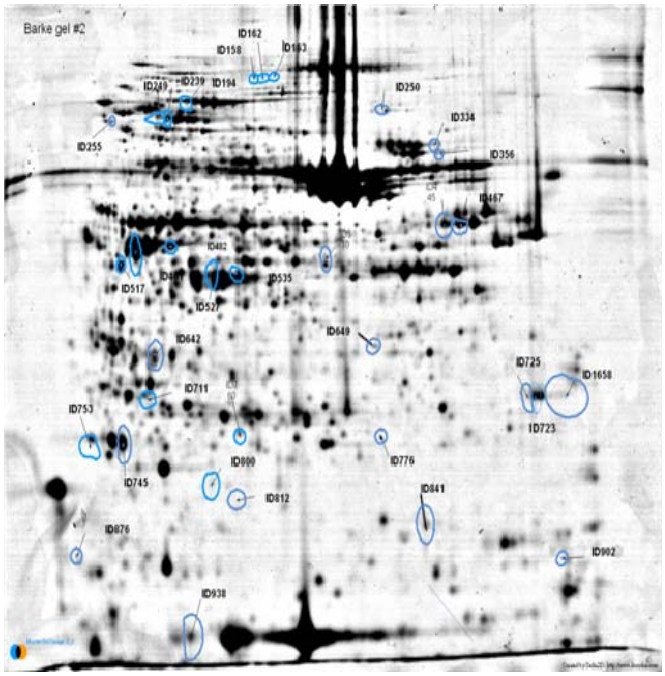
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]



شکل۲- روند تغییرات محتوای کلروفیل سه ژنوتیپ در طی ده روز پس از اعمال تنش . خطوط سیاه و خاکستری به ترتیب تمایانگر محتوای کلروفیل در شرایط نرمال (100 % FC) و تنش (20 % FC) در روزهای پس از اعمال تنش می‌باشد.

بررسی الگوی پروتئوم برگ

جهت تشخیص پروتئین‌هایی که بیان متفاوتی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی تحت تیمار خشکی و شاهد نسبت به اسکارلت داشته‌اند، الگوی بیان پروتئوم در قالب آزمایش فاکتوریل در قالب



شکل ۳- تجزیه پروتئوم پروتئین‌هایی با بیان متمایز در ژنوتیپ های) در مقایسه با ژنوتیپ Scarlett به عنوان اثرات ژنوتیپ یا اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری تحت شرایط کنترل و تنش نشان دادند. لکه‌های پروتئینی شناسایی شده با خطوط حلقوی آبی رنگ مشخص شده‌اند.

طرح بلوک‌های کامل تصادفی مقایسه گردید. اثرات ژنوتیپ و اثرات متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری برای ۳۷ لکه از میان ۷۶۸ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، معنی‌دار بود و در نهایت ۱۹ لکه که تغییرات معنی‌داری در بیان نسبت به اسکارلت داشتند، انتخاب شدند. شکل ۳ موقعیت این پروتئین‌ها را روی ژل نشان می دهد. از بین لکه‌های پروتئینی که تغییر معنی‌داری($P<0.05$) در بیان نسبت به اسکارلت داشتند تعداد ۱۹ لکه با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF شناسایی شدند. پروتئین‌های شناسایی شده در جدول ۱ آورده شده است. بر این اساس پروتئین‌های بیان شده در دو دسته مجزا قرار گرفتند. دسته اول پروتئین‌هایی بودند که بیان متفاوتی در یکی از ژنوتیپ‌های S42IL.121 و S42IL.135 نسبت به Scarlett داشتند (اثر ژنوتیپ) و دسته دوم پروتئین‌هایی بودند که بیان متمایزی در یکی از ژنوتیپ‌های فوق الذکر نسبت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

به ژنوتیپ Scarlett در شرایط تنش یا نرمال داشتند (اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح آبیاری). در دسته اخیر همه پروتئین‌هایی که تحت تنش خشکی افزایش بیان نسبت به اسکارلت نشان دادند متعلق به ژنوتیپ S42IL.135 بودند. این پروتئین‌ها شامل گلوتاتیون S– ترانسفراز، پروتئین شبه جرمین[1]، پروتئین تومور کنترل شده در مرحله ترجمه[2] و Oxygen-evolving enhancer protein می‌باشند. تنها پروتئینی که تحت شرایط تنش در ژنوتیپ 42IL.135 نسبت به اسکارلت کاهش بیان ۱/۷۳ برابری نشان داد، لکه (شماره ۷۱۱) پلی آمین اکسیداز می باشد. پلی آمین اکسیداز از طریق اکسیداسیون اسپرمین و اسپرمیدین سبب آزادسازی پراکسید هیدروژن می شود. در گیاهان تولید پراکسیدهیدروژن حاصل از پلی آمین اکسیداز با تولید و لیگنینی شدن دیواره سلولی در طی رشد یا حمله پاتوژنها ارتباط دارد (Capell et al. 2004;Laurenzi et al. 1999). لکه شماره ۸۱۲ پروتئین شبه جرمین می باشد که به میزان ۱/۵۷ برابر در ژنوتیپ S42IL.135 نسبت به اسکارلت در شرایط تنش افزایش بیان نشان داده است. جرمین‌ها و پروتئین‌های شبه جرمینی گلیکوپروتئین‌های دیواره سلولی هستند که به واسطه مقاومت غیر معمولشان نسبت به تیمارهای دترجنتی و هضم بوسیله پروتئازها، نقش مهمی در گسترش دیواره سلولی و مقاومت در برابر تنش های زیستی و غیرزیستی ایفاء می‌کنند (Bray 2004; Lee et al.2007). تحقیقات نشان داده که بیان این پروتئین‌ها در بافت‌های ریشه و برگ جو تحت تنش خشکی و شوری سبب سخت شدن دیواره سلولی و تقویت موانع فیزیکی شده و گیاه را در مقابل اثرات نامطلوب تنش کمبود آب حفاظت می‌کند (Hurkman et al.1991; Ozturk et al.2002). لکه شماره ۷۷۶ پروتئین OEE2 (oxygen-evolving enhancer2) می‌باشد که افزایش بیان دو برابری در ژنوتیپ S42IL.135 نسبت به اسکارلت در شرایط تنش داشته است. این پروتئین‌ها در افزایش میزان اکسیژن فتوسنتزی و پایدار سازی مجموعه فتوسیستم II نقش مهمی ایفاء می‌کنند (Garcia et al. 2009) افزایش بیان این پروتئین در برگ‌های برنج تحت تنش شوری و بادام‌زمینی تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Abbasi and Komatsu 2004;Katam et al. 2007). لکه شماره ۷۵۳ به عنوان پروتئین تومور کنترل شده در مرحله ترجمه شناسایی شد که به میزان ۱/۳۵ برابر در ژنوتیپ S42IL.135 نسبت به اسکارلت در شرایط تنش افزایش بیان نشان داد. این پروتئین یکی از جدیدترین پروتئین‌های مرتبط با رشد و تمایز سلولی می‌باشد و از طریق اتصال انتهای C–ترمینال آن با توبولین‌های آلفا و بتا، با شبکه‌های میکروتوبولی سیتواسکلتونی در ارتباط است (Bommer and Thiele 2004; Woo and Hawes 1997). خاموشی ژن کد کننده این پروتئین باعث اختلال در روند چرخه سلولی، کاهش اندازه سلولی، تاخیر در تشکیل ریشه های جانبی و موئی در گیاه آرابیدوپسیس شده است. همچنین نتایج حاصل از تحقیقات پیشین نشان داده است که انتقال این ژن به گیاه سبب تسریع رشد در طول مرحله رویشی از گیاهچه به گیاه جوان می‌شود و گیاهان تراریخته تحمل بیشتری در مقابل تنش‌های محیطی در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته داشته‌اند (Berkowitz et al. 2008; Liu et al. 2005). لکه شماره ۶۴۲ تحت عنوان گلوتاتیون S – ترانسفراز شناسایی شد که به میزان ۱/۳۸ برابر افزایش در ژنوتیپ S42IL.135 تحت تنش خشکی نسبت به اسکارلت داشته است. این آنزیم از طریق حذف ترکیبات ROS (گونه های فعال اکسیژن) نظیر پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید هیدروژن حاصل از تنش اکسیداتیو نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه بر علیه تنش‌های محیطی ایفا می کنند (Edwards et al. 2000). انتقال این ژن به توتون، مقاومت زیادی را به تنش خشکی در توتون تراریخته ایجاد نمود (George et al. 2010).

بررسی صفات فیزیولوژیک مرتبط با خشکی در دو ژنوتیپ S42IL.121 و S42IL.135 نسبت به ژنوتیپ اسکارلت تحت تنش خشکی نشان داد که تطابق خوبی بین نتایج حاصل از بررسی‌های فیزیولوژیکی و میزان شباهت ژنتیکی این سه ژنوتیپ وجود دارد اما با بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی مشخص شد که همه پروتئین‌هایی با بیان افزایشی تحت تنش خشکی (نسبت به ژنوتیپ Scarlett) در این آزمایش متعلق به

[1] Germin like protein(GLP)
[2] Translationally-controlled tumor protein

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

ژنوتیپ S42IL.135 می‌باشند. در این تحقیق به دلیل ترکیب نتایج حاصل از مطالعات فیزیولوژیکی و پروتئومیکسی، درک کامل‌تری از مکانیزم پاسخ به تنش در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت به ژنوتیپ اسکارلت بدست آمد. همچنین شناسایی پروتئین‌های کاندید می‌تواند به عنوان گامی مثبت جهت اصلاح و بهبود گیاهان بر علیه تنش خشکی بکار رود.

منابع

Abbasi FM, Komatsu S (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. Proteomics 4: 2072–2081

Abebe T, Melmaiee K, Berg V (2010) Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. Funct Integr Genomics 10:191–205

Agrawala S, Barlow M, Cullen H, Lyon B (2001) The Drought and Humanitarian Crisis in Central and Southwest Asia: A Climate Perspective IRI Special Report 01-11 24pp.

Amme S, Matros A, Schlesier B, Mock HP (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE - technology. Journal of experimental botany 57(7):1537-1546.

Barr HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity for estimating water deficit in leaves. Australian Journal of Biological Sciences 15:413-428

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies, Plant Soil 39 : 205–207

Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, Masle J (2008) Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. The plant cell 20: 3430–3447

Bommer UA, Thiele BJ (2004) The translationally controlled tumor protein (TCTP). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36: 379–385.

Bray E, Bailey-Serres E, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchannan, R Jones (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants American Society of Plant Biologists Rockville MD 158–124

Bray E (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 55(407): 2331–2341

Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Plant Biology 101(26): 9909–9914

Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends in Plant Science 5: 193–198

Garcia J, Souza G, Eberlin M, Arruda M (2009) Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) leaves through proteomic changes. Metabolomics 1: 107–113

George S, Venkataraman G, Parida A (2010) A chloroplast-localized and auxin- induced glutathione S-transferase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confer drought tolerance on tobacco. Journal of Plant Physiology 167:311–318

Guo P, Baum M (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought- sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. Journal of Experimental Botany 60(12): 3531–3544

Hajheidari M, Abdollahian M (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics 5: 950–960

Hasegawa P, Bressan R, Zhu J, Bohnert H (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 463-499

Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A, Baxter I, Dunn M, Estes B, Chang HS, Zhu T, Kreps JA, Nguyen HT (2005) Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. Functional and Integrative Genomics, 5: 104– 116

Hurkman W, Peggy Tao H, Tanaka C (1991) Germin-Like Polypeptides Increase in Barley Roots during Salt Stress. Plant Physiology l97: 366-374

Jang JC, Sheen J (1997) Sugar sensing in higher plants, Trends in Plant Science 2: 208–214

Karp NA, Lilley KS (2005) Maximizing sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDyes. Proteomics, 5(12):3105-15

Katam R, Basha S, Vasanthaiah H, Naik K (2007) Identification of drought tolerant groundnut genotypes employing proteomics approach. An Open Access Journal published by ICRISAT 5(1): 1-4

Laurenzi M, Rea G, Federico R, Tavladoraki P, Angelini R (1999) De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase of polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: a role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation. Planta 208:146–154

Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Lee BH (2007) An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. C R Biol 330(3):215-25.

Leopold AC (1990) Coping with desiccation .In: Stress response in plants: adaptation and acclimation mechanisms. New York: Wiley- Liss 37-56

Liu X, Baird WV (2004) Identification of a novel gene, HAABRC5, from *Helianthus annuus* (Asteraceae) that is up regulated in response to drought, salinity, and abscisic acid. American Journal of Botany 91: 184–191

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]

Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF (2005) Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. Mol Cell Biol 25: 3117–3126.
Nakashima KY, Amaguchi-Shinozaki K (2006) Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. Physiologia Plantarum 126: 62–71.
Ozturk Z, Talam V, Deyholos M (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. Plant Molecular Biology 48: 551–573
Salekdeh GH, Siopongco J, Wade L, Ghareyazie B, Bennett J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2: 1131–1145
Salekdeh GH, Komatsu S (2007) Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. Proteomics 7: 2976-2996.
Samarah NH, Alqudah AM, Amayreh JA, McAndrews GM (2009) The effect of late-terminal drought stress on yield components of four barley cultivars. Journal of Agronomy and Crop Science 195: 427-441.
Schmalenbach I, Ko¨rber N, Pillen P (2008) Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of QTL effects for resistance to powdery mildew and leaf rust. Theoretical and Applied Genetics 117:1093–1106
Talame V, Ozturk N (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. Journal of Experimental Botany 58 (2):229-240
Tuberosa R, Salvi S (2004) QTLs and genes for tolerance to abiotic stress in cereals. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 253–315
Woo H, Hawes MC (1997) Cloning of genes whose expression is correlated with mitosis and localized in dividing cells in root caps of *Pisum sativum* L. Plant Molecular.Biology35:1045–1051

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.7.6]