

## Proteome analysis of susceptible and resistant genotypes of wild barley (*Hordeum spontaneum*) in response to drought stress

Hooman Shirvani<sup>1</sup>, Ali Ashraf Mehrabi<sup>2</sup>(ORCID: 0000000200603114), Mohsen Farshadfar<sup>3</sup>, Hooshmand Safari<sup>3</sup>, Ali Arminian<sup>1</sup>, Foad Fatehi<sup>4</sup>

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran.

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

3. Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

4. Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence:

Ali Ashraf Mehrabi

Email: [amehrabi@shahed.ac.ir](mailto:amehrabi@shahed.ac.ir)

Received: 25, Jul. 2024

Accepted: 10, Dec. 2024

### How to cite:

Shirvani, H., Mehrabi, A.A., Farshadfar, M., Safari, H., Arminian, A., & Fatehi, F. (2024). Proteome analysis of susceptible and resistant genotypes of wild barley (*Hordeum spontaneum*) in response to drought stress. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 83-96. (DOI: [10.30473/cb.2024.71844.1975](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71844.1975))

### ABSTRACT

The wild barley (*Hordeum spontaneum*) plays a crucial role in enhancing drought resistance in cultivated barley varieties. The genetic diversity of wild barley genotypes in Iran indicates their superiority in drought tolerance and agronomic traits. Proteomic studies help identify key pathways involved in plant stress responses and facilitate the development of drought-resistant cultivars. In this research, based on the grain yield data of 114 wild barley genotypes under both rainfed and irrigated conditions over two agricultural years (2019-2020 and 2020-2021) and using the STS index, drought-resistant and sensitive genotypes were identified. The experiment was conducted under two conditions: absence of drought stress and severe drought stress, with various genotypes examined. After seedling growth, drought stress was applied at the two-leaf stage, based on soil field capacity (FC), at two levels: 90-95% and 25-30% of field capacity. Following protein extraction, IPG strips with pH 3-10 and 13 cm in length were used for the first dimension, while 14% polyacrylamide gel was used for the second dimension. Results from two-dimensional electrophoresis showed that 224 protein spots were reproducible. In the drought-resistant genotype, 32 spots and in the sensitive genotype, 29 spots exhibited significant changes. The resistant genotype had 22 spots with increased expression and 10 with decreased expression, while the sensitive genotype had 16 spots with increased expression and 13 with decreased expression. Eight spots showed shared expression. These results indicate that various proteins are differentially expressed in response to drought stress in resistant and sensitive genotypes, highlighting the diverse strategies of plants in coping with environmental stresses.

### KEYWORDS

Isoelectric focusing, Two-dimensional electrophoresis, Proteomics, STS index.



## «مقاله پژوهشی»

**تحلیل پروتئوم ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) در پاسخ به تنش خشکی**

هومن شیروانی،<sup>۱</sup> علی، اشرف مهرابی،<sup>۲</sup> (ارکید: ۲۰۰۶-۲۰۱۱)، محسن فرشادفر،<sup>۳</sup> هوشمند صفری،<sup>۳</sup> علی، آرمینیان،<sup>۴</sup> فواد فاتحی،<sup>۴</sup>

## حکیدہ

جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) نقشی اساسی در افزایش مقاومت به خشکی در ارقام جو را ایفا می‌کند. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو وحشی در ایران نشان از برتری آن‌ها در تحمل خشکی و ویژگی‌های زراعی دارد. مطالعات پروتئومی مسیرهای مهم درگیر در پاسخ به تنش‌های گیاهی را شناسایی می‌کنند و مسیر ایجاد ارقام مقاوم به خشکی را هموار می‌سازند. در این پژوهش، با استفاده از داده‌های عملکرد دانه ۱۱۴ ژنوتیپ جو وحشی در دو شرایط دیم و آبی، طی دو سال زراعی (۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۳۹۹-۱۴۰۰) و شاخص STS، ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به خشکی شناسایی شدند. آزمایش در دو شرایط فاقد تنش خشکی و تنش خشکی شدید انجام شد و ژنوتیپ‌های مختلف بررسی شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، شرایط تنش خشکی در مرحله دو برگه و بر اساس ظرفیت زراعی خاک (FC) با دو سطح ۹۰-۹۵ درصد و ۲۵-۳۰ ظرفیت زراعی خاک اعمال شد. پس از استخراج پروتئین، در بعد اول از IPG با pH ۱۰-۳ و ۱۳ سانتی‌متر و در بعد دوم از ژل پلی اکریل آمید ۱۴ درصد استفاده شد. نتایج الکتروفورز دو بعدی نشان داد که ۲۲۴ نقطه پروتئینی تکرارپذیر بودند. در ژنوتیپ مقاوم ۳۲ لکه و در ژنوتیپ حساس ۲۹ لکه با تغییرات معنی‌دار شناسایی شدند. ژنوتیپ مقاوم ۲۲ لکه با افزایش بیان و ۱۰ لکه با کاهش بیان داشت، در حالی که ژنوتیپ حساس ۱۶ لکه با افزایش بیان و ۱۳ لکه با کاهش بیان نشان داد. برخی از لکه‌ها (۸ لکه) بیان مشترک داشتند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین‌های مختلفی در پاسخ به تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به‌طور متفاوتی بیان می‌شوند که نشان‌دهنده استراتژی‌های مختلف گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی است.

## واژه‌های کلیدی

اینوالکتریک فوکوسینگ، الکترودفوز دو بعدی، پروتئومیک، شاخص، STS.

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۳. بخش تحقیقات جنگلها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرمانشاه، ایران.
۴. گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تویسندہ مسئول:

علی اشرف مہرابی

ایماننامه: amehrabi@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۴

تاریخ بذمہ : ۱۴۰۳/۰۹/۲۰

استناد به این مقاله:

شیروانی، هومن؛ مهرابی، علی‌اشرف؛ فرشادفر، محسن؛ صفری، هوشمند؛ آرمینیان، علی و فاتحی، فواد (۱۴۰۳).  
تحلیل پروتئوم ژئوتیپ‌های حساس و مقاوم جو وحشی  
(*Hordeum spontaneum*) در پاسخ به تنش خشکی،  
فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۲)،  
۸۳-۹۶.

(DOI: [10.30473/cb.2024.71844.1975](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71844.1975))

## مقدمه

جو یک محصول غله‌ای چند منظوره است که به‌طور گسترده در سراسر جهان کشت می‌شود و در میان غلات رتبه چهارم را دارد (راج و همکاران، ۲۰۲۳؛ لوکیناچ و جوکیچ، ۲۰۲۲). این گیاه دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند بتا-گلوکان‌ها، فیبر محلول و ترکیبات زیست فعال مختلف است که آن را برای مصرف انسانی و خوراک دام ارزشمند می‌سازد (مگ و همکاران، ۲۰۲۳؛ لیو، ۲۰۲۳). جو زراعی (*H. vulgar*) و جد زراعی آن (*H. spontaneum*) به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب و هم‌چنین با صرفه اقتصادی مناسب برای کشت بهره‌برداری ژنتیکی مناسب می‌باشند. هر دو گونه، دیپلوئید و قابل تلاقی با یکدیگر بوده و مجموعه‌ای از ابزار ژنومیکس مشتمل بر نقشه‌های لینکازی، داده‌های QTL، ESTها، کتابخانه‌های BAC و آرایه‌ها برای تجزیه ژنوم H که همولوگ ژنوم‌های A، B و D گندم هگزاپلوئید است، موجود می‌باشد (هیز و همکاران، ۲۰۰۳). نواحی غرب ایران، خاورمیانه و هلال حاصل‌خیز شامل مرکز تنوع جو وحشی می‌باشند (مورل، ۲۰۱۱؛ نوو و چن، ۲۰۱۱).

از طرفی تنش خشکی به‌عنوان تهدید قابل توجهی برای بهره‌وری محصول در سطح جهانی به شمار می‌رود که بر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان تأثیر می‌گذارد (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴؛ برائور و همکاران، ۲۰۲۴). به علت کمبود منابع آب و در نتیجه بروز تنش برای گیاه در ایران، عملکرد گیاهان به‌شدت کاهش می‌یابد. در همین راستا درک اثر تنش خشکی و رژیم‌های آبی بر عملکرد، می‌تواند گام مؤثری در توسعه ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا و پایدار داشته باشد (گارسا دل مورال، ۲۰۲۳). شبکه پیچیده آبشارهای سیگنالینگ، اصلاحات اپی‌ژنتیکی و تنظیم هورمونی، از جمله فیتوهورمون‌ها مانند اسید آبسزیک، آکسین، سیتوکینین و اتیلن نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی ایفا می‌کنند و پیچیدگی مکانیسم‌های سازگاری گیاهان در شرایط کمبود آب را برجسته می‌کنند (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴؛ سیم و همکاران، ۲۰۲۴). درک این پاسخ‌ها در سطوح مولکولی، سلولی و اندام برای توسعه

گونه‌های زراعی مقاوم به خشکی با صفات انعطاف‌پذیری بیشتر و پایداری عملکرد بالاتر در مواجهه با شرایط آب و هوایی متغیر ضروری است. (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴).

پروتئین‌ها نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی (کمبود آب) دارند. برخی مطالعات، پروتئین‌های کلیدی مانند پروتئازها و مهارکننده‌های پروتئاز را شناسایی کرده‌اند که در مکانیسم‌های سازگاری با خشکی در گیاهان دخیل هستند (مولای و نگارا، ۲۰۲۳). واژه پروتئوم (Proteome) به تمام پروتئین‌هایی اطلاق می‌گردد که به وسیله موجود زنده تولید می‌شود. برخلاف ژنوم (Genome) که دارای ماهیتی ثابت و پایدار است، پروتئوم ماهیتی دینامیک و متغیر دارد و به عنوان پروتئین‌های موجود در یک سلول، بافت و یا اندام ارگانیسم در یک مقطع زمانی مشخص تعریف می‌شود. این پروتئوم است که فاصله بین ژنوم و مکانیسم مولکولی رفتار سلولی را پر می‌کند (مچینف، ۲۰۰۳). پروتئومیک علم مطالعه گسترده پروتئوم شامل بیان، تغییرات پس از ترجمه و مطالعه برهم کنش پروتئین‌ها با سایر مولکول‌هاست. در حقیقت پروتئومیک دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند (گیگی اس پی و همکاران، ۲۰۰۰).

جهت غلبه بر طیف گسترده تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان مکانیسم‌های پیچیده‌ای را تکامل داده‌اند. تنش‌ها شبکه‌های پیچیده‌ای از سیگنال‌دهی انطباقی و دفاعی را فعال می‌کنند که منجر به تغییر در بیان ژن‌ها، دگرگونی‌های متابولیکی، تغییرات پروتئومیکی و کاهش سرعت رشد می‌شود؛ این فرآیندها در نهایت موجب افزایش مقاومت یا تحمل گیاه می‌گردند. مطالعه برهمکنش گیاه-محیط، بطور معمول با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی، ژنتیک و تکنیک‌های ترانسکریپتومیک صورت می‌پذیرد. پروتئومیک در حال حاضر سهم بزرگی در آشکار سازی اجزای دخیل در درک و ترانس‌اسی تنش دارد. برای چنین مطالعاتی، می‌توان از واژه "پروتئومیک محیطی" استفاده نمود (جوزف و جینی، ۲۰۱۰).

می‌باشد. Si انحراف معیار شاخص است که بعد از استاندارد کردن STS محاسبه می‌شود. b نیز ضریب رگرسیون خطی بین میانگین عملکرد در همه محیط‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج شاخص‌های مبتنی بر عملکرد دانه در مزرعه، ژنوتیپ موچش از کردستان ( $35.0571^{\circ} \text{ N}$ ,  $47.1522^{\circ} \text{ E}$ , MSL: 1368, Accession code: IUGB-01975) به عنوان ژنوتیپ حساس، و ژنوتیپ کوزران از کرمانشاه ( $34.4965^{\circ} \text{ N}$ ,  $46.5982^{\circ} \text{ E}$ , MSL: 1368, Accessioncode: IUGB-01657) به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش خشکی با استفاده از روش امتیازدهی تحمل تنش (STS) انتخاب گردیدند.

### آزمایشات گلخانه‌ای

ابتدا بذور هر یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه درون گلدان‌های پلاستیکی ( $20 \times 120$  سانتی‌متری) کشت شدند. شرایط رشدی گلخانه با دوره نوری ۸:۱۶ (روشنایی: تاریکی) و شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس در حد مطلوب برای رشد گیاهچه‌ها بهینه گردید. محتوای هر گلدان نیز شامل مخلوطی از خاک زراعی و ماسه با نسبت ۳:۱ (ماسه : خاک) در نظر گرفته شد. پس از جوانه‌زنی، در هر گلدان تعداد پنج بوته نگهداری و مابقی گیاهچه‌ها حذف شدند. آبیاری به صورت منظم و بر اساس نیاز گیاه هفته‌ای دو الی سه بار صورت گرفت. ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به خشکی در یک آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار بیولوژیکی در شرایط گلخانه کشت شدند. در این آزمایش دو سطح شاهد و تنش خشکی به عنوان فاکتور اول و ژنوتیپ‌های مورد بررسی به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. پس از رشد و استقرار گیاهچه‌ها شرایط اعمال تنش خشکی در مرحله دو برگ و براساس ظرفیت زراعی خاک (FC) و در دو سطح فاقد تنش خشکی (۹۰-۹۵ درصد FC) و تنش خشکی شدید (۲۵-۳۰ درصد FC) تعیین شد. تنش خشکی به مدت سه هفته تا ابتدای مرحله ساقه‌دهی (بادر، ۲۰۰۲) اعمال و پس از ظهور علائم آن مقدمات لازم جهت نمونه‌برداری و ارزیابی صفات فراهم گردید. پس از رشد و استقرار کامل

در این پژوهش، شناسایی و بررسی پروتئین‌ها بر اساس تکنیک الکتروفورز دو بعدی صورت گرفته و هدف آن شناسایی و معرفی پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های مقاومت به تنش خشکی در جو وحشی است. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به عنوان مبنایی برای انتخاب و به‌نژادی ارقام مقاوم به خشکی در شرایط اقلیمی ایران مورد استفاده قرار گیرد.

### روش‌شناسی پژوهش

#### محاسبه شاخص نمره تحمل به تنش (STS)

برای انتخاب ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به خشکی، در سال‌های زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۳۹۹-۱۴۰۰، تعداد ۱۱۴ ژنوتیپ جو وحشی که از چهار استان غربی ایران جمع‌آوری شده بودند تحت شرایط تنش خشکی و رطوبت نرمال ارزیابی شدند. این آزمایش با استفاده از طرح آگمنت با پنج تکرار و نه والد تکراری در ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت وابسته به مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه انجام گردید.

به دست آوردن یک افزایش ژنتیکی در عملکرد در محیط‌های تنش خشکی و بدون تنش خشکی برای اصلاح‌گران گیاهی، چالش‌های زیادی را به همراه داشته است. با این حال پیشرفت در میزان عملکرد دانه در محیط‌های مساعد بالاتر بوده است (ریچارد و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین شاخص‌های خشکی که براساس کاهش عملکرد ارقام تحت شرایط تنش خشکی می‌باشند، برای گزینش ارقام مقاوم به خشکی با شرایط نرمال مقایسه می‌شوند (میترا، ۲۰۰۱). مطابق با روش‌های چند متغیره پیچیده معادله STS به صورت زیر محاسبه می‌شود (عبدالشاهی و همکاران، ۲۰۱۳؛ ساردوئی نسب و همکاران، ۲۰۱۴):

$$STS = GMP + STI + HMP + MP - TOL - SSI - b$$

شاخص‌ها براساس فرمول زیر استاندارد شدند:

$$Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}) / S_i$$

$Z_{ij}$  در واقع مقدار استاندارد شده ژنوتیپ  $i$ ام در شاخص  $j$ ام می‌باشد.  $X_{ij}$  مقدار ژنوتیپ  $i$  در شاخص  $j$  می‌باشد و  $\bar{X}$  میانگین تمام ژنوتیپ‌ها برای شاخص  $j$ ام

مولار Urea، ۲ مولار Tiurea، ۴ درصد CHAPS، ۳۵ میلی مولار Tris، ۸۰ میلی مولار DTT و حداکثر ۲ درصد (IPG Buffer) و ۳-۲ میکرولیتر PMSF اضافه گردید، سپس رسوب در آن خوب حل شده و یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد.

تیوپها در دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رویی مقدار کمی را برای تعیین غلظت جدا گردید (حدود ۵۰ میکرولیتر). طبق نتایج تعیین غلظت نمونه در دمای ۸۰- سانتی گراد قرار داده شدند. تعیین غلظت پروتئین مورد نظر به روش برادفورد (۰/۱ گرم رنگ G-250، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد و ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد) انجام گرفت.

#### بعد اول: ایزوالکتریک فوکوسینگ<sup>۵</sup>

##### رهیدراسیون نوارهای IPG

ابتدا محلول رهیدراسیون تهیه گردید، انتخاب محلول رهیدراسیون مناسب بستگی به میزان محلولیت پروتئین نمونه دارد. یک محلول رهیدراسیون معمولاً دارای اوره، شوینده غیر یونی یا ژوئیر یونیک (IPG بافر)، DTT، IPG بافر مناسب و رنگ می باشد. سینی رهیدراسیون تمیز و کاملاً خشک شد و با استفاده از پیچهای مخصوص متعادل گردید. نوارهای IPG را به تعداد لازم از فریزر بیرون آورده و اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسند. در این تحقیق از IPG با pH ۳-۱۰ و ۱۳ سانتی متر استفاده گردید. پروتئنیهای استخراج شده به آرامی در امتداد شیارهای سینی پخش گردید طوری که در کل طول آن میزان یکنواختی جای گیرد. نوار IPG را برداشته و محافظ آن را جدا کرده و طوری که قسمت ژل آن رو به پایین باشد در شیار قرار داده شد. باید دقت شود که حباب ایجاد نشود. در انتها روی هر نوار ۳ میلی لیتر روغن معدنی ریخته شد. رهیدراسیون کامل در طول شب انجام گرفت.

گیاهچهها، نمونه برداری در یک بازه زمانی معین و یکسان از گیاهچهها صورت گرفت.

#### استخراج پروتئین

برگهای جو وحشی با استفاده ازت مایع، بخوبی پودر گردید بطوری که یک پودر نرم و یکدستی بوجود آید. نمونهها بصورت ۰/۱ گرمی وزن و در میکروتیوپهای دو میلی لیتری ریخته شدند. به هر تیوپ حاوی نمونه حدود ۲۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲۰ میلی مولار Tris-Hcl، pH= 8.5، ۲۵۰ میلی مولار Sucrose، ۱ میلی مولار DTT<sup>۱</sup>، ۱۵ میلی مولار EDTA<sup>۲</sup> و ۱ درصد Triton x-100) و ۲۰ میکرولیتر بازدارنده پروتئازها (PMSF) اضافه و با پستل بخوبی بهم زده شد تا یک مخلوط همگن بدست آمد، سپس تیوپ حدود یک الی دو دقیقه ورتکس گردید و ۱۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد. سپس تیوپها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله مایع رویی را برداشته و در تیوپهای جدید ریخته و رسوب باقی مانده دور ریخته شد. روی هر تیوپ حدود ۱۰ برابر حجم مایع رویی TCA/ACETON (۱۰ گرم TCA، ۲۰ میلی مولار DTT و تا ۱۰۰ میلی لیتر ACETON) سرد ۱۰ درصد اضافه و ورتکس گردید و یک شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد گذاشته شد. به هر تیوپ ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی (۲۰ میلی مولار DTT و تا ۱۰۰ میلی لیتر ACETON) سرد (۲۰-°C) اضافه و با پستل رسوب ته ویال قطعه قطعه گردید. تیوپها در دمای ۲۰-°C به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. تیوپها را درآورده و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن آخرین مایع رویی، تیوپها ۲۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد تا رسوب خشک شود. به ازای هر ۲۰ میلی گرم رسوب، ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر لایز (۸)

1. Dithio Threitol
2. Ethylen dinitro tera acetic acid
3. Protease Inhibitor
4. Trichloroacetic acid

### متمرکز کردن ایزوالکتریک پروتئین‌ها

نوارهای IPG را از سینی خارج کرده و به پشت روی کاغذ تمیز قرار داده شد تا روغن اضافی آن گرفته شود. نوارهای IPG را با پنس گرفته و با پیست حاوی آب مقطر دو بار تقطیر به آرامی شسته شدند. سپس نوارها را از طرف طلق روی کاغذ صافی قرار داده تا آب آن گرفته شود. نوارها رو به بالا (ژل به سمت بالا) در کانال‌های دستگاه ایزوالکتریک قرار داده شدند. قطب مثبت نوار می‌بایست سمت مثبت سینی و قطب منفی هم سمت منفی قرار می‌گرفت. روی ژل با روغن معدنی پوشانده شد. دستگاه IEF را برنامه ریزی کرده (جدول ۱) و پس از اتمام برنامه بلافاصله ژل‌ها درون محلول متعادل‌سازی و یا در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جدول ۱. برنامه دستگاه IEF

Table 1. IEF device program

| ولتاژ     | مرحله    | زمان     |
|-----------|----------|----------|
| Voltage   | Stage    | Time     |
| Volt 500  | Gradient | 1 hour   |
| Volt 500  | step     | 2 hour   |
| Volt 5000 | Gradient | 2.5 hour |
| Volt 5000 | step     | 4 hour   |

### بعد دوم SDS-PAGE

برای هر نوار ۱۰ میلی لیتر محلول متعادل‌سازی (جدول ۲) از فریزر بیرون آورده شد تا به دمای اتاق برسد. سپس به دو قسمت مساوی ۵ میلی‌لیتری تقسیم شده و هر کدام در لوله آزمایش سرپوش‌دار ریخته شد. نوارهای IPG نیز از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و در محلول متعادل‌سازی اول که حاوی یک درصد DTT است گذاشته و به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد. محلول اول کاملاً دور ریخته و نوارها با آب مقطر دو بار تقطیر شسته و سپس با کاغذ صافی آب آن گرفته و نوارها در محلول دوم که حاوی یدواستامید پنج درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد.

در حین انجام این مرحله آگارز یک درصد را در بافر الکتروود (۳ گرم Tris، ۱۴/۴ گرم Glycine و ۱ گرم SDS) آماده کرده و حرارت داده تا حل گردید. نوارها با آب مقطر

شسته و بر روی ژل پلی اکریل آمید پلیمریزه شده در قالب شیشه‌ای قرار داده شد، سپس دستگاه الکتروفورز با برنامه مورد نظر روشن گردید. الکتروفورز به روش ژل پلی اکریل آمید با ژل ۱۴ درصد انجام شد (لاملی، ۱۹۷۰). پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها از شیشه خارج گردید. حدود ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول رنگ کوماسی بلو G250 (۱ گرم رنگ کوماسی بلو بلرینانت G250، ۳۴۰ میلی‌لیتر متانول، تا حجم یک لیتر آب مقطر، ۳۵ میلی‌لیتر فسفریک اسید و ۱۷۰ گرم آمونیوم سولفات  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) اضافه گردید. سپس روی ژل ۲۵۰ میلی لیتر محلول رنگ‌بر (۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ریخته شد. اینکار تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف شود انجام گردید. ژل‌ها با دستگاه اسکنر مدل Epson expression اسکن شدند. بعد از اسکن کردن، ژل‌ها با نرم افزار Melanie 9 آنالیز شدند، در نهایت هر لکه پروتئینی با تغییر بیان معنی‌دار، با توجه به وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و شکل لکه با جستجو در مقالات مرتبط و سایت Uniprot به طور احتمالی شناسایی گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad Prism 8 و Excel رسم گردید.

### جدول ۲. محلول متعادل سازی

Table 2. Equilibration solution

| ماده             | غلظت           |
|------------------|----------------|
| Material         | Concentration  |
| Tris-Hcl pH=7.5  | 30 millimolar  |
| Urea             | 7 molar        |
| Glycerol         | 30%            |
| SDS              | 2%             |
| Bromophenol blue | A few crystals |

### یافته‌های پژوهش

تحمل خشکی یک صفت کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود (بلوم، ۲۰۱۰). بنابراین انتخاب هم زمان برای همه معیارهای مهم انتخاب با در نظر گرفتن قابلیت‌های توارثی و همبستگی آن‌ها با میزان تحمل خشکی مؤثرترین روش برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر می‌باشد. در این روش یک شاخص با

در وحشی تبت به سختی نشان می‌دهد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه دیگری بر روی پاسخ پروتئوم برگ جو تحت تنش شوری، بیش از ۵۰۰ لکه پروتئینی با تکرارپذیری بالا شناسایی شدند و تعداد ۱۲۴ لکه تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان دادند. با استفاده از طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF-TOF، ۲۱ لکه پروتئینی شناسایی شد که شامل پروتئین‌هایی بودند که در مکانیسم‌های فتوسنتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل بودند (فاتحی و همکاران، ۲۰۱۱).

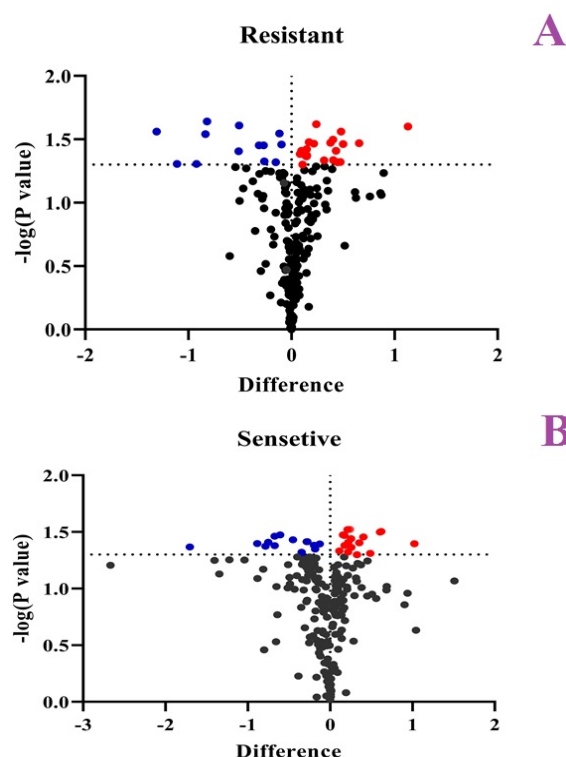
نقاط برچسب خورده و درصد حجمی نقاط به‌عنوان میزان تظاهر پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. طبق دستورالعمل Inter Class Report ذکر شده در نرم افزار Melanie لکه‌هایی که درصد حجمی آن‌ها در مقایسه دو تیمار بیشتر از ۱/۵ و یا کمتر از ۰/۵ بوده و مقدار t-Test آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود به‌عنوان پروتئین‌های کاندیدا شناخته شدند. در حقیقت تعیین درصد حجمی لکه‌ها روش مناسبی برای بررسی تفاوت‌های کمی لکه‌ها بین ژل‌های مختلف یک تیمار و ژل‌های تیمارهای مختلف است. در آنالیز ژل الکتروفورز دو بعدی برای هر دو ژنوتیپ، ۲۲۴ نقطه پروتئینی که دارای تکرارپذیری بودند مشخص گردید. با توجه به نتایج حاصله از این تجزیه در ژنوتیپ مقاوم و حساس به ترتیب ۳۲ و ۲۹ لکه که دارای افزایش یا کاهش معنی‌داری بین دو ژنوتیپ بودند انتخاب شدند (شکل ۱ منحنی آتشفشانی این لکه‌ها را نشان می‌دهد).

در بررسی الگوی پروتئوم و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت جو تحت تنش شوری، ژنوتیپ مقاوم ۹۷ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار (۷۸ درصد افزایش و ۲۲ درصد کاهش بیان) و ژنوتیپ حساس ۹۴ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار (۳۷ درصد افزایش و ۶۳ درصد کاهش بیان) نشان دادند. طیف‌سنجی جرمی منجر به شناسایی پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید انرژی شد (رسول‌نیا و همکاران، ۲۰۱۳). در بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیک و الگوی بیان پروتئین‌ها در جو، ژنوتیپ مقاوم یوسف ۲۳ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار و ژنوتیپ حساس مورکو ۳۰ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار نشان دادند (کشاورز نیا، ۲۰۱۳).

کمک کلیه صفات مورد ارزیابی تعریف و ژنوتیپ‌های ایده‌آل بر مبنای این شاخص منفرد گزینش می‌شوند (فیضیاصل و همکاران، ۲۰۱۰). معادله STS بسیار آسان‌تر از تجزیه به عامل‌ها است و پیشنهاد می‌شود به عنوان یک ابزار برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و شوری از آن استفاده شود (عبدالشاهی و همکاران، ۲۰۱۳؛ ساردوئی نسب و همکاران، ۲۰۱۴). بر اساس نتایج شاخص‌های مبتنی بر عملکرد در مزرعه در سال‌های زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۳۹۹-۱۴۰۰، ژنوتیپ موجش از کردستان به عنوان ژنوتیپ حساس، و ژنوتیپ کوزران از کرمانشاه به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش رطوبتی انتخاب گردیدند (شیروانی و همکاران، ۲۰۲۴). ویژگی روش STS در این است که انتخاب بر مبنای یک شاخص مقاومت نمی‌باشد، بلکه همزمان چندین شاخص مد نظر قرار داده خواهد شد.

نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل پروتئومیک دو بعدی ژل‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به تنش خشکی در گیاه جو وحشی است. بررسی‌های انجام‌شده بر روی لکه‌های پروتئینی نشان داد که هر دو ژنوتیپ، به روش‌های متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. این تفاوت‌ها در بیان پروتئین‌های مختلف نشان‌دهنده مکانیسم‌های مختلفی است که گیاهان برای مقابله با شرایط تنش به کار می‌برند. فراوانی پروتئین‌ها تحت تنش خشکی در ژنوتیپ مقاوم نسبت به حساس بیانگر فعالیت‌های متابولیکی خاص برای مقابله با تنش خشکی است. فراوانی بیشتر یکسری از پروتئین‌ها در ژنوتیپ حساس نسبت به مقاوم نیز با توجه به مطالعات مختلف، به پروتئین‌های بازدارنده نسبت داده می‌شود.

در مطالعه آنالیز پروتئومی مقایسه‌ای ژنوتیپ جو وحشی تبتی (XZ5) مقاوم به خشکی و XZ54 حساس به خشکی) منجر به شناسایی ۳۸ پروتئین مرتبط با تحمل به خشکی شد که در دسته عملکردی فتوسنتز، پاسخ استرس، فرآیند متابولیک، انرژی و بیوسنتز اسید آمینه قرار گرفتند. از ۳۸ پروتئین، ۲۰ پروتئین در XZ5 تنظیم شده و به طور همزمان در XZ54 کاهش یافت، که اهمیت پروتئین‌های خاص مرتبط با تحمل به خشکی را در تحمل به خشکی



شکل ۱. منحنی آتشفشانی برای ۲۲۴ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری. A: ژنوتیپ مقاوم و B: ژنوتیپ حساس

رنگ قرمز: افزایش بیان، رنگ آبی: کاهش بیان و رنگ مشکی: غیر معنی دار می‌باشد.

**Figure 1.** Volcano plot for 224 reproducible protein spots. A: Resistant genotype and B: Sensitive genotype  
Red color: increased expression, blue color: decreased expression, and black color: non-significant.

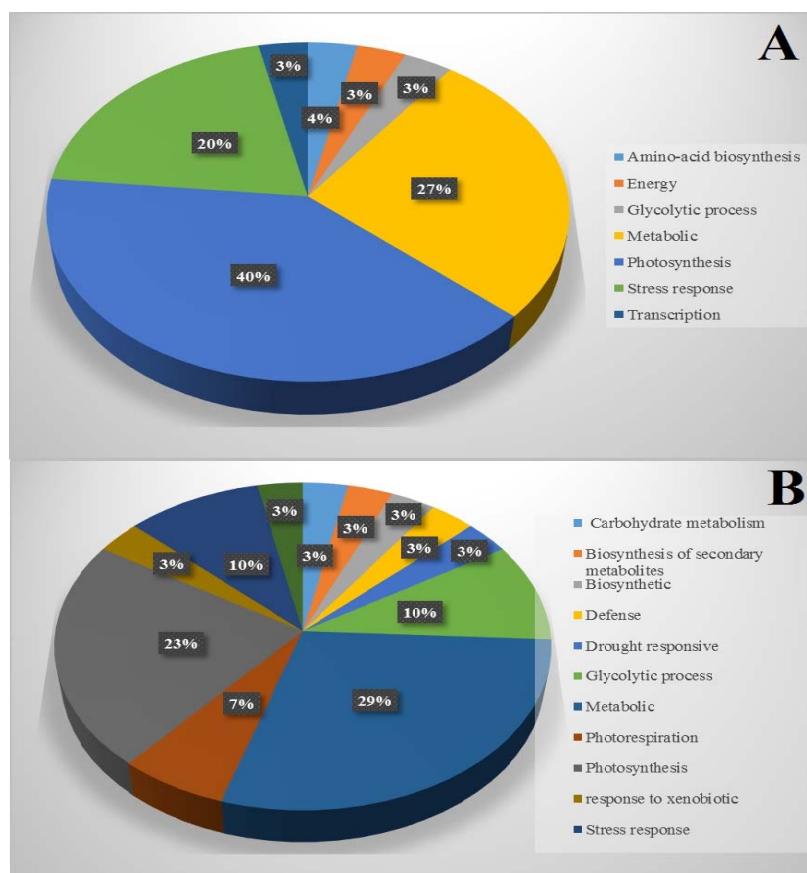
طاہری و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی پروتئوم پاسخ به تنش خشکی در گیاه جو *Hordeum vulgare* L با استفاده از تکنولوژی DIGE عنوان داشتند از میان ۷۶۸ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، ۳۷ لکه تغییرات معنی داری را به عنوان اثرات ژنوتیپ یا اثرات متقابل سطوح آبیاری و ژنوتیپ نشان دادند و در نهایت تجزیه طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF منجر به شناسایی پروتئین‌هایی شد که در فرایندهای متابولیسم، انرژی، ساختار سلولی، واکنش‌های دفاعی، انتقال سیگنالی و تمایز سلولی نقش ایفاء می‌کنند. بوستانی و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه پاسخ پروتئوم برگ جو وحشی *H. marinum* در شرایط تنش شوری بیان کردند پروتئین‌های شناسایی شده شامل روییسکو، روییسکو اکتیواز، پروتئین‌های ریبوزومی، کولین فامیلی، پروتئین‌های متصل شونده به RNA، ملات دهیدروژناز

نتایج حاصل از ژل‌های دو بعدی دو ژنوتیپ حساس و مقاوم جو وحشی در شرایط عدم تنش خشکی (۹۰-۹۵ درصد FC) و تنش خشکی (۲۵-۳۰ درصد FC) نشان داد که الگوی پروتئوم برگ در هنگام پاسخ گیاه به تنش خشکی در مقایسه با عدم تنش خشکی به طور وسیعی تغییر کرده است. این تغییرات حاکی از طیف وسیع پروتئین‌های پاسخ دهنده پس از اعمال تنش خشکی بود. از ۳۲ و ۲۹ لکه پروتئین معنی دار در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس، پس از انطباق با پایگاه داده‌ها از نظر وزن ملکولی و نقطه ایزو الکتریک و هم چنین تطبیق با تصاویر ژل، تعداد هشت لکه مشترک شناسایی شدند. ژنوتیپ مقاوم در ۲۲ لکه افزایش بیان و ۱۰ لکه کاهش بیان نشان داد. هم چنین ژنوتیپ حساس نیز در ۱۶ لکه افزایش بیان و ۱۳ لکه کاهش بیان نشان داد که برخی لکه‌ها (هشت لکه) نیز بیان مشترک داشتند.

منتسب به هر گروه را نشان می‌دهد. در تجزیه و تحلیل پروتئوم مقایسه‌ای دو رقم مقاوم به خشکی و حساس به خشکی، پروتئین‌های متفاوتی تحت تنش خشکی شناسایی شدند. پروتئین‌های دخیل در متابولیسم، شامل لیپواکسیژناز، آنزیم مالیک وابسته به NADP، ساکارز سنتاز و بتاآلدئید دهیدروژناز، در رقم حساس افزایش یافتند. آنزیم‌های مربوط به سم‌زدایی سلول‌ها و کنترل تنفس نوری در رقم مقاوم به خشکی افزایش یافتند، در حالی که تغییری در رقم حساس مشاهده نشد. پروتئین‌های مرتبط با تولید ترکیبات فعال اسمزی در ژنوتیپ حساس افزایش یافت که نشان می‌دهد تنش خشکی پاسخ‌های اسمزی قوی‌تری را در ژنوتیپ حساس ایجاد می‌کند (آشوب و همکاران، ۲۰۱۳).

سیتوزولی، فروکتوکیناز، تیوردوکسین، پروتئین‌های مرتبط با سیستمین بودند. این پروتئین‌ها در مراحل نموی گوناگون و مسیرهای متابولیکی مختلف مانند متابولیسم انرژی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترجمه، پردازش، تجزیه پروتئین، فتوسنتز، انتقال سیگنال نقش دارند.

اسامی پروتئین‌های شناسایی شده بر اساس گروه‌بندی انجام شده و سایر مشخصات مربوطه در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است. گروه‌های پروتئینی شناسایی شده شامل: پروتئین‌های دخیل در متابولیسم، پروتئین‌های درگیر در دفاع اکسیداتیو و مقابله با تنش، پروتئین‌های درگیر در نسخه برداری، پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای انرژی و پروتئین‌های ساختاری بودند. شکل ۲ درصد پروتئین‌های



شکل ۲. درصد پروتئین‌های دارای تغییرات معنادار بر اساس نقش و عمل آنها. A: ژنوتیپ مقاوم و B: ژنوتیپ حساس  
**Figure 2.** Percentage of proteins with significant changes based on their role and action. A: Resistant genotype and B: Sensitive genotype

بالایی بوده و بنابراین نقش مهمی در اکسیداسیون و احیای سلولی دارند. این آنزیم از آنزیم‌های مهم در مسیرهای متابولیک و تنظیمی دیگر همچون چرخه کالوین، متابولیسم انرژی، فتوسنتز، پیمایش پروتئین‌ها و سنتز آمینواسیدها محسوب می‌گردند (سانچز و هوشتراسر، ۱۹۹۹). علاوه بر این، خاصیت آنتی اکسیدانی تیوردوکسین‌ها باعث محافظت سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو حاصل از تنش‌ها می‌شود و از طریق حذف  $H_2O_2$  و برخی رادیکال‌های آزاد، در فرایند سمزدایی این ترکیبات شرکت می‌نمایند (زو، ۲۰۰۱).

لکه شماره ۲۳۳ به عنوان Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش خشکی بود Ribulose biphosphate carboxylase. رویسکو دو واکنش را کاتالیز می‌کند: تنش خشکی است. اولاً 1,5-bisphosphate D-ribulose را در ابتدای رویداد تثبیت دی اکسید کربن کربوکسیله می‌کند و ثانیاً پیش ماده پنتوز را بوسیله فعالیت اکسیداتیو خرد می‌کند. پروسه‌های بیولوژیکی آن شامل سیکل کلون، تثبیت دی اکسیدکربن، حساسیت نوری و فتوسنتز می‌باشد.

لکه شماره ۷۱۱ مربوط به پروتئین Dehydroascorbate reductase (DHAR)-Oxidoreductase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان نشان داد. که بیان آن در رقم مقاوم به دلیل وجود مکانیسم تحمل بیشتر بود. دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) وابسته به گلوکاتیون (GSH) دهیدروآسکوربات را کاتالیز می‌کند و نقش مستقیمی در بازسازی اسید اسکوربیک، یک آنتی اکسیدان گیاهی ضروری برای دفاع در برابر استرس اکسیداتیو دارد. DHAR مجموعه‌ای از آسکوربات کاهش یافته را بازسازی می‌کند و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را سم‌زدایی می‌کند. آنزیم‌های DHAR تشابه ساختاری نزدیکی با ابرخانواده آنزیم‌های گلوکاتیون ترانسفراز (GST) دارند و حاوی همان موتیف سایت فعال هستند، اما اکثر GSTها فعالیت DHAR

لکه شماره ۴۰۵ مربوط به پروتئین Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان نشان داد. آنزیم سیتوزولی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPC) یک واکنش کلیدی در گلیکولیز را کاتالیز می‌کند، اما سهم آن در متابولیسم و رشد گیاه به‌خوبی تعریف نشده است. حذف یا بیان بیش از حد GAPCها باعث تغییرات قابل توجهی در سطح واسطه‌ها در مسیر گلیکولیتیک و نسبت‌های ATP/ADP و NAD(P)H/NAD(P) می‌گردد. سطوح GAPC نقش مهمی در تولید کلی سلولی احیاکننده‌ها، انرژی و متابولیت‌های کربوهیدرات دارد.

لکه شماره ۷۱۷ به عنوان Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس بود. این پروتئین یک پروتئین فتوسنتزی است که سطح بیان این پروتئین با افزایش غلظت نمک کاهش پیدا می‌کند، کاهش فعالیت Rubisco large subunit باعث محدود شدن تثبیت  $CO_2$  و نقص تنظیم آنزیم‌هایی می‌شود که وابسته به سیکل کلون هستند که همین امر سبب انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها می‌شود و پروتئین‌هایی که مسئول محافظت از گیاه در برابر زیان‌های فتواکسیداتیو هستند کاهش می‌یابند.

لکه شماره ۲۰۴ مربوط به پروتئین Trx- Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (M) بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان داشت که در رقم مقاوم به دلیل وجود مکانیسم تحمل این نرخ بیش‌تر بود. تیوردوکسین‌ها (Trxs) اکسیدو ردوکتازهای دی سولفیدی هستند که بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی را تنظیم می‌کنند. آنالیزهای بیوشیمیایی و پروتئومی گسترده بسیاری از پروتئین‌های هدف TrxA را در موجودات فتوسنتزی مختلف شناسایی کرده‌اند. این پروتئین‌ها طی تنش خشکی بیان می‌شوند و دارای توان احیا کننده‌گی

انرژی در یوکاریوت‌ها است که تبدیل مالات به اگزوالاستات (OAA) را در رابطه با نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD<sup>+</sup>) به NADH کاتالیز می کند. سه ایزوآنزیم MDH گزارش شده است: MDH1، MDH2 و MDH3. MDH3 یک آنزیم گلی اکسیژومال است که در اکسیداسیون مجدد NADH که در طی اکسیداسیون اسید چرب بتا تولید می شود، نقش دارد.

لکه شماره ۱۳۲ به عنوان Putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان دهنده کاهش بیان این پروتئین در اثر تنش در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس بود. این پروتئین عنصر پایانی زنجیره تنفسی میتوکندری و گیرنده الکترون از سیتوکروم c جهت احیای اکسیژن است. تغییر نرخ این پروتئین رابطه معکوس با تنش داشته که با مکانیسمی متفاوت افزایش تنش موجب کاهش این پروتئین شد. هم چنین می توان کاهش این پروتئین را با افزایش مجدد فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و خسارت غشایی مرتبط با تنش مرتبط دانست که در ژنوتیپ مقاوم نیز با افزایش تنش بیش از آستانه تحمل، امکان کاهش این پروتئین محتمل است (حیدروند، ۲۰۱۲).

را نشان نمی دهند. وجود یک سیستمین در محل فعال برای عملکرد کاتالیزوری DHAR ضروری است، زیرا جهش این سیستمین فعالیت را از بین می برد.

لکه شماره ۲۲۷ به عنوان Cp31AHv protein شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش در ژنوتیپ مقاوم بود. در ژنوتیپ حساس این پروتئین کاهش بیان داشت. Cp31AHv نوعی پروتئین متصل شونده به RNA (RBPs) می باشد. به نظر می رسد بیان این پروتئین تحت کنترل مثبت نور است. در مطالعات متعددی افزایش بیان این پروتئین در ژنوتیپ‌های مقاوم و کاهش بیان آن در ژنوتیپ‌های حساس گزارش شده است که ممکن است یکی از دلایل حساسیت گیاه به تنش همین پروتئین باشد (فاتحی و همکاران، ۲۰۱۲؛ مولر و همکاران، ۲۰۱۱).

لکه شماره ۲۷۶ مربوط به پروتئین Glyoxysomal malate dehydrogenase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. مالات دهیدروژناز (MDH)، یک آنزیم متابولیسم کربوهیدرات و

### جدول ۳. پروتئین‌های دارای تغییرات معنی دار در ژنوتیپ مقاوم

Table 3. Proteins with significant changes in the resistant genotype

| Match ID | pI    | MW     | Name                                                                       | Organism                     | Function                |
|----------|-------|--------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 861      | 5.900 | 80.860 | Melanoma-associated antigen p97                                            | <i>Gallus gallus</i>         | Stress response         |
| 276*     | 6.960 | 37.754 | Glyoxysomal malate dehydrogenase                                           | <i>Zea mays</i>              | Metabolic               |
| 965      | 6.300 | 25.100 | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit)        | <i>Welwitschia mirabilis</i> | Photosynthesis          |
| 204*     | 8.700 | 44.000 | Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (Trx-M)                          | <i>Spinacia oleracea</i>     | Metabolism              |
| 170      | 6.010 | 53.979 | ATP synthase subunit alpha                                                 | <i>Secale strictum</i>       | Metabolic               |
| 649      | 7.000 | 21.000 | Alternative oxidase                                                        | <i>Triticum aestivum</i>     | Photosynthesis          |
| 405*     | 6.670 | 36.605 | cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | <i>Pisum sativum</i>         | Glycolytic process      |
| 401      | 5.710 | 35.765 | Stress-responsive protein                                                  | <i>Zea mays</i>              | Stress response         |
| 717*     | 6.400 | 31.000 | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain precursor                      | <i>Pisum sativum</i>         | Photosynthesis          |
| 227*     | 4.500 | 31.900 | Cp31AHv protein                                                            | <i>Hordeum vulgare</i>       | Transcription           |
| 233*     | 8.000 | 41.800 | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor | <i>Hordeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 52       | 7.200 | 53.000 | Putative dihydropyrimidine Dehydrogenase                                   | <i>Oryza sativa</i>          | Metabolic               |
| 42       | 6.880 | 83.000 | Ribulose1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase                              | <i>Hordeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 625      | 5.400 | 21.400 | Elongation factor G                                                        | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | Amino-acid biosynthesis |
| 916      | 6.000 | 18.500 | Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic                              | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 661      | 5.500 | 23.300 | Adenosylhomocysteinase                                                     | <i>Nicotiana tabacum</i>     | Amino-acid biosynthesis |
| 642      | 6.800 | 18.000 | chloroplast-localized cyclophilin                                          | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 712      | 4.600 | 26.100 | Proteasome subunit alpha type 5                                            | <i>Glycine max</i>           | Metabolic               |
| 711*     | 6.300 | 26.500 | Dehydroascorbate reductase (DHAR)- Oxidoreductase                          | <i>Triticum aestivum</i>     | Stress response         |
| 600      | 7.700 | 28.600 | Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein                                         | <i>Ricinus communis</i>      | photosynthesis          |
| 146      | 5.100 | 53.500 | ATP synthase beta subunit                                                  | <i>Catabrosa aquatica</i>    | Energy                  |
| 251      | 4.650 | 33.448 | Chitinase class III                                                        | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 132*     | 4.350 | 40.000 | putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1                                 | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 961      | 5.200 | 28.100 | LHCI                                                                       | <i>Hordeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 699      | 6.700 | 22.000 | Thaumatin-like protein                                                     | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 266      | 7.000 | 48.300 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic                        | <i>Zea mays</i>              | Stress response         |
| 131      | 8.290 | 62.179 | Chloroplastic leucine aminopeptidase                                       | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 662      | 7.428 | 25.000 | type homeodomain protein – IBE                                             | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | Stress response         |
| 912      | 5.500 | 15.100 | Transketolase, chloroplast                                                 | <i>Zea mays</i>              | Photosynthesis          |
| 700      | 7.850 | 20.000 | High-affinity phosphate transporter PT1- transmembrane                     | <i>Medicago sativa</i>       | Photosynthesis          |
| 650      | 6.900 | 24.000 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                                   | <i>Triticum aestivum</i>     | Stress response         |

\*: Common proteins in resistant and sensitive genotypes

\*: پروتئین‌های مشترک در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس

## جدول ۴. پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار در ژنوتیپ حساس

Table 4. Proteins with significant changes in sensitive genotype

| Match ID | pI    | MW     | Name                                                                       | Organism                    | Function                |
|----------|-------|--------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 159      | 7.430 | 55.900 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform 1- Oxidoreductase | <i>Oryza sativa</i>         | Biosynthesis            |
| 135      | 6.9   | 64.2   | Elongation factor EF-G                                                     | <i>Brassica napus</i>       | Metabolic               |
| 405*     | 6.670 | 36.605 | cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | <i>Pisum sativum</i>        | Glycolytic process      |
| 717*     | 6.6   | 52.73  | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain precursor                      | <i>Pisum sativum</i>        | Photosynthesis          |
| 826      | 5.6   | 19     | FTSH1 (FtsH protease 1); ATP-dependent peptidase/ATPase/ metallopeptidase  | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Stress response         |
| 136      | 6.200 | 53.400 | Ribulose-1,5-bisphosphate                                                  | <i>Oryza sativa</i>         | Photorespiration        |
| 204*     | 8.7   | 44     | Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (Trx-M)                          | <i>Spinacia oleracea</i>    | Metabolism              |
| 688      | 7.890 | 25.000 | Manganese superoxide dismutase- Oxidoreductase                             | <i>Zea mays</i>             | response to xenobiotic  |
| 233*     | 8     | 41.8   | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor | <i>Hordeum vulgare</i>      | Photosynthesis          |
| 694      | 7.42  | 36.500 | G protein beta-subunit-like protein                                        | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Defense                 |
| 195      | 7.720 | 48.500 | Putative fructose 1-,6 biphosphate aldolase                                | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Carbohydrate metabolism |
| 733      | 6.300 | 25.000 | Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast                            | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Photosynthetic          |
| 553      | 7.700 | 29.800 | Probable glutathione S-transferase DHAR2, chloroplastic                    | <i>Oryza sativa</i>         | Metabolism              |
| 798      | 5.3   | 29.3   | Glutathione S-transferase 1                                                | <i>Triticum aestivum</i>    | Stress response         |
| 176      | 6.300 | 55.000 | Adenosyl homocysteinease1 NP                                               | <i>Lupinus luteus</i>       | Metabolism              |
| 711*     | 6.3   | 25.000 | Dehydroascorbate reductase (DHAR)- Oxidoreductase                          | <i>Triticum aestivum</i>    | Stress response         |
| 267      | 9.700 | 39.200 | Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 2, chloroplastic             | <i>Oryza sativa subsp</i>   | Biosynthetic            |
| 227*     | 4.500 | 31.900 | Cp31AHv protein                                                            | <i>Hordeum vulgare</i>      | Transcription           |
| 346      | 6.040 | 39.500 | putativ fructose 1,6 by phpsphat carbohydrat metabolism aldolas            | <i>Solanum lycopersicum</i> | Metabolism              |
| 276*     | 6.854 | 40.000 | Glyoxysomal malate dehydrogenase                                           | <i>Zea mays</i>             | Metabolism              |
| 132*     | 4.350 | 40.000 | putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1                                 | <i>Oryza sativa</i>         | Photosynthesis          |
| 437      | 6.2   | 43     | Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase                                           | <i>Triticum aestivum</i>    | Photosynthesis          |
| 888      | 5.7   | 15     | Rubisco small subunit                                                      | <i>Triticum aestivum</i>    | Drought responsive      |
| 113      | 7.640 | 33.733 | Triosephosphate isomerase, chloroplastic                                   | <i>Fragaria ananassa</i>    | Metabolism              |
| 85       | 5.830 | 92.863 | Sucrose synthase                                                           | <i>Triticum aestivum</i>    | Metabolism              |
| 835      | 4.6   | 18.8   | Type I chlorophyll a/b-binding protein b                                   | <i>Amaranthus tricolor</i>  | Photosynthesis          |
| 418      | 5.900 | 28.000 | Ribulose bisphosphate carboxylase small chain                              | <i>Nicotiana tabacum</i>    | Photorespiration        |
| 427      | 6.600 | 28.000 | Oxygen- evolving enhancer protein                                          | <i>Zea mays</i>             | Photosynthetic          |
| 376      | 6.800 | 32.600 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit                             | <i>Oryza sativa subsp</i>   | Metabolism              |

\*: Common proteins in resistant and sensitive genotypes

\*: پروتئین‌های مشترک در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس

پاسخ به تنش خشکی نقش دارند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم، دفاع اکسیداتیو، فتوسنتز، ساختار سلولی و تنظیم متابولیک هستند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئومیک یک ابزار قدرتمند برای مطالعه مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در گیاهان است. شناسایی پروتئین‌های کلیدی که در پاسخ به تنش خشکی نقش دارند، می‌تواند به ما در درک بهتر این مکانیسم‌ها کمک کند. همچنین، این اطلاعات می‌تواند برای توسعه ارقام جدید گیاهان با مقاومت بیشتر به خشکی مورد استفاده قرار گیرد.

پروتئین‌های شناسایی شده به چند گروه عمده تقسیم شدند: که شامل، پروتئین‌های دخیل در متابولیسم؛ افزایش بیان GAPC در هر دو ژنوتیپ نشان می‌دهد که این آنزیم نقش مهمی در تولید انرژی و متابولیت‌های کربوهیدرات در شرایط تنش ایفا می‌کند. پروتئین‌های دفاعی و مقابله با تنش (DHAR) که نقش مهمی در دفاع آنتی‌اکسیدانی دارند، افزایش بیان در ژنوتیپ مقاوم و حساس داشتند. این پروتئین‌ها با تنظیم اکسیداسیون و احیا و همچنین بازسازی آنتی‌اکسیدان‌های مهم مانند اسید اسکوربیک، نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش خشکی ایفا

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه حاضر با هدف شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به خشکی در جو وحشی، با مقایسه پروتئوم دو ژنوتیپ مقاوم و حساس به تنش خشکی پرداخت. نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی تغییرات قابل توجهی در بیان پروتئین‌های دو ژنوتیپ ایجاد می‌کند. بین ژنوتیپ مقاوم و حساس به تنش خشکی، تفاوت‌های معنی‌داری در بیان پروتئین‌ها مشاهده شد. این تفاوت‌ها نشان می‌دهد که هر دو ژنوتیپ از استراتژی‌های متفاوتی برای مقابله با تنش خشکی استفاده می‌کنند. ژنوتیپ مقاوم با افزایش بیان پروتئین‌هایی که در متابولیسم انرژی، فتوسنتز و دفاع اکسیداتیو نقش دارند، به‌طور مؤثرتری با تنش خشکی مقابله می‌کند. این پروتئین‌ها در شرایط کم آبی به گیاه کمک می‌کنند تا انرژی مورد نیاز خود را تأمین واز آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری کرده و به فتوسنتز ادامه دهد. ژنوتیپ حساس با کاهش بیان برخی از پروتئین‌های کلیدی، نتوانسته است به‌طور مؤثری با شرایط تنش مقابله کند. این کاهش بیان، نشان‌دهنده اختلال در عملکرد برخی از فرایندهای سلولی در این ژنوتیپ است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که پروتئین‌های مختلفی در

پروتئومیک تعاملی، می‌توان شبکه‌های تعاملی پروتئین‌ها را در شرایط تنش خشکی بررسی کرد و درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به خشکی به‌دست آورد. با مطالعه تغییرات اپی‌ژنتیکی در پاسخ به تنش خشکی، می‌توان به نقش اپی‌ژنتیک در تنظیم بیان ژن‌ها و مقاومت به خشکی پی برد. با استفاده از اطلاعات حاصل از مطالعات پروتئومیک، می‌توان نشانگرهای مولکولی جدیدی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی توسعه داد. با انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، می‌توان به توسعه ارقام جدید گیاهان با عملکرد بالاتر و مقاومت بیشتر به تنش‌های محیطی کمک کرد و در نتیجه، امنیت غذایی را افزایش داد.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

### References

- Abdolshahi, R., Safarian, A., Nazari, M., Pourseyedi, S., & Mohamadi-Nejad, G. (2013). Screening drought-tolerant genotypes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using different multivariate methods. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(5), 685-704. (in Farsi).
- Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., & Brüggemann, W. (2013). Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta*, 237, 771-781.
- Bauder, J. (2002). When necessary, Just-in-time, irrigating can save water. MSU Extension Publications. 406-994-3273.
- Berauer, B. J., Steppuhn, A., & Schweiger, A. H. (2024). The multidimensionality of plant drought stress: The relative importance of edaphic and atmospheric drought. *Plant, Cell & Environment*, 47(9), 3528-3540.
- Blum, A. (2010). *Plant breeding for water-limited environments*. Springer Science & Business Media.
- Boustani, A., Fatehi, F., & Azizinezhad, R. (2018). Study on leaf proteome response of *H. marinum* to salinity stress. *Modern Genetics Scientific Quarterly*, 13(1), 143-155. (in Farsi).
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Haji Abbasi, M., & Shabani, A. (2011). Studying the response of barley leaf proteome under salinity stress conditions. *Iranian Plant Sciences*, 42(3): 617-626. (in Farsi).
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Brimavandi, T., & Struik, P. C. (2012). The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. *Molecular Biology Reports*, 39, 6387-6397.
- Feiziasl, V., Jafarzadeh, J., Ahmed, A. M. R. I., Ansari, Y., Mousavi, S. B., & Chenar, M. A. (2010). Analysis of yield stability of wheat genotypes using new Crop Properties Balance Index (CPBI) method. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 228-233.
- Gusain, S., Kumari, K., & Joshi, R. (2024). Physiological, hormonal and molecular dynamics of root system architectural response to drought stress signaling in crops. *Rhizosphere*, 100922.
- Gygi, S. P., Rist, B., & Aebersold, R. (2000). Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current opinion in biotechnology*, 11(4), 396-401.
- Hayes, P. M., Castro, A., Marquez-Cedillo, L., Corey, A., Henson, C., Jones, B. L., ... & Sato, K. (2003). Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In *Developments in plant genetics and breeding* (Vol. 7, pp. 201-226). Elsevier.
- Heidarvand, L. (2012). Evaluation of chickpea proteome in early stages of cold. Ph. D thesis in plant breeding. University of Tehran. (In Farsi).

می‌کنند. پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز شامل: افزایش بیان پروتئین‌های Ribulose در هر دو ژنوتیپ نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در حفظ فرایندهای فتوسنتزی تحت شرایط تنش خشکی است. با این حال، کاهش فعالیت Rubisco می‌تواند منجر به محدودیت در تثبیت CO<sub>2</sub> و نقص در تنظیم آنزیم‌های وابسته به سیکل کالوین شود که باعث انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها می‌شود. پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی: پروتئین‌های مانند Cp31AHv و MDH نقش مهمی در ساختار و تنظیم متابولیک سلول‌ها ایفا می‌کنند. افزایش بیان این پروتئین‌ها در ژنوتیپ مقاوم نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی است.

پیشنهادات کاربردی این پژوهش این است که توالی دقیق پروتئین‌های شناسایی شده را می‌توان با تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی تعیین کرد و عملکرد دقیق آن‌ها را در گیاهان مشخص نمود. همچنین با استفاده از تکنیک‌های

- Joseph, B., & Jini, D. (2010). Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(6), 307.
- Keshavarznia, R. (2013). Investigating the effect of drought stress on physiological traits and expression pattern of proteins in barley. Master's thesis. Faculty of Agriculture, University of Tehran. (in Farsi).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Liu, D. (2023) Barley: From Molecular Basis of Quality to Advanced Genomics-Based Breeding. In *Compendium of Crop Genome Designing for Nutraceuticals* (pp. 1-38). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-3627-2\\_4-1](https://doi.org/10.1007/978-981-19-3627-2_4-1)
- Lukinac, J., & Jukić, M. (2022). Barley in the production of cereal-based products. *Plants* 2022, 11, 3519.
- Mechin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., & Damerval, C. (2003). An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *PROTEOMICS: International Edition*, 3(7), 1299-1302.
- Meng, G., Rasmussen, S. K., Christensen, C. S., Fan, W., & Torp, A. M. (2023). Molecular breeding of barley for quality traits and resilience to climate change. *Frontiers in Genetics*, 13, 1039996.
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science* 80: 758-763
- Møller, A. L., Pedas, P. A. I., Andersen, B., Svensson, B., Schjoerring, J. K., & Finnie, C. (2011). Responses of barley root and shoot proteomes to long-term nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, cell & environment*, 34(12), 2024-2037.
- Moloi, S. J., & Ngara, R. (2023). The roles of plant proteases and protease inhibitors in drought response: a review. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1165845.
- Morrel, P. L. (2011). Hordeum. pp. 309-320, In: C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*,
- Nevo, E., & Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, cell & environment*, 33(4), 670-685.
- Raj, R., Shams, R., Pandey, V. K., Dash, K. K., Singh, P., & Bashir, O. (2023). Barley phytochemicals and health promoting benefits: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100677.
- Rasul Nia, A., Bi Hamta, m., Peighambari, S., Alizadeh, H., Teklo, S., & Mujahid.K. (2013). Investigating the proteome pattern and activity of some antioxidant enzymes of barley under salinity stress. *Iranian Plant Sciences*, 43(2), 231-241. (in Farsi).
- Richard, A.J., & Dean, W.W. (2002). Applied multivariate statistical analysis. Prentice Hall, London. 265.
- Sanchez, J. C., & Hochstrasser, D. F. (1999). *High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis* (pp. 227-233). Humana Press.
- Sardouie-Nasab, S., Mohammadi-Nejad, G., & Nakhoda, B. (2014). Field screening of salinity tolerance in Iranian bread wheat lines. *Crop Science*, 54(4), 1489-1496.
- Seem, K., Kaur, S., Selvan, T., & Kumar, S. (2024). Plant response to drought stress: epigenomic perspective. In *Current Omics Advancement in Plant Abiotic Stress Biology* (pp. 323-341). Academic Press.
- Shirvani, H., Mehrabi, A. A., Farshadfar, M., Safari, H., Arminian, A., Fatehi, F., ... & Poczai, P. (2024). Investigation of the morphological, physiological, biochemical, and catabolic characteristics and gene expression under drought stress in tolerant and sensitive genotypes of wild barley [*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (K. Koch) Asch. & Graebn.]. *BMC Plant Biology*, 24(1), 214.
- Taheri, H., Bi Hamta, M. Hosseinzadeh, A. Naqvi, M., & March, T. (2013). Investigation of proteome response to drought stress in barley plant (*Hordeum vulgare* L.) using DIGE technology. *Modern Genetics Scientific Quarterly*, 7(3). (In Farsi).
- Wang, N., Zhao, J., He, X., Sun, H., Zhang, G., & Wu, F. (2015). Comparative proteomic analysis of drought tolerance in the two contrasting Tibetan wild genotypes and cultivated genotype. *BMC genomics*, 16, 1-19.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.