

Proteome analysis of root in wheat (*Triticum aestivum* cv. Baran) under water deficit stress

Sayna Toraby¹, Mahmoud Toorchi²(ORCID: 0000000171239914), Mozafar Roustaii³

1. M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

3. Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh, Iran.

Correspondence:

Mahmoud Toorchi

Email: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Received: 21/May/2024

Accepted: 31/Dec/2024

How to cite:

Toraby, S., Toorchi, M., & Roustaii, M. (2024). Proteome analysis of root in wheat (*Triticum aestivum* cv. Baran) under water deficit stress. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 35-49.

(DOI: [10.30473/cb.2024.71391.1970](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71391.1970))

ABSTRACT

Cereals, especially wheat, is one of the most important food sources for humans. Approximately 55% of proteins, 15% of fats, 70% of glucosides, and generally 50-55% of calories consumed by human come from cereals. Water scarcity is an important limiting factor in wheat production in rainfed and irrigated farming can affect different traits. Therefore, adaptation of plants to drought stress is critical to increase production. Many factors such as genotype, growth stage, intensity and duration of stress, physiological growth stage, different patterns of gene expression and environmental factors can influence the response of plants to drought stress. Different methods have been used to study the expression of genes, and proteomic analysis has priority for the study of the final gene product. In this regard, the seeds of wheat cultivars were grown in plastic pots in a greenhouse and divided into two and root random groups one month after growing in which water deficit stress was imposed to half of the pot, randomly, by increment of irrigation internal. Twenty days after imposing stress, shoot and root length, shoot dry and wet weight, root volume and proline content were measured in both groups. Protein extraction was performed by phosphate buffer method and two-dimensional electrophoresis was performed by IEF in 1st dimension and SDS-PAGE in 2nd dimension. Proteomic analysis of root tissue by two-dimensional electrophoresis with Coomassie brilliant blue staining revealed 99 repeatable protein spots each gel. Among the identified protein spots, 15 spots were shown a significant change in expression under water deficit stress condition compared with the control, in such a way 13 spots increased expression and 2 spots with reduced expression. These spots were identified according to the isoelectric point and the molecular weight. These proteins based on functional groups were classified in starch synthesis, light respiration and metabolism, proteins involved in cell structure, stress response and defense, and various proteins. Proteins Peroxidase, Phosphoglycerate mutase, Triose phosphate-isomerase, Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, Glutathione S-transferase, Monomeric alpha-amylase inhibitor, Cytosolic-3-phosphoglycerate kinase, Probable voltage-gated potassium channel subunit beta, Serine hydroxy methyltransferase, late embryogenesis abundant protein D-29, β -Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 2-Cys peroxiredoxin BAS1 and other late embryogenesis abundant proteins were identified with increased changed expression under water deficit stress conditions indicating the importance of these proteins in reducing the effects of water deficit stress. The proteins S-Adenosylmethionine synthetase 3 and Germin-Like protein were shown reduced changed expression. The result of this research indicated that different groups of proteins interfering in reduction of destructive effects of water deficiency stress but the contribution of response / defense and metabolism proteins were more than the others.

KEYWORDS

Iso-electric focusing (IEF), Mass spectrometry, SDS-PAGE, Two-dimensional electrophoresis.



«مقاله پژوهشی»

تجزیه پروتئوم ریشه گندم رقم باران تحت تنش کمبود آب

ساینا ترابی^۱، محمود تورچی^۲ (رکید: ۱۷۱۳۳۹۹۱۴۰۰۰۰۰۰۰۰)، مظفر روستایی^۳

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. استاد پژوهش، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه، مراغه، ایران.

نویسنده مسئول:

محمود تورچی

رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱

استناد به این مقاله:

ترابی، ساینا؛ تورچی، محمود و روستایی، مظفر (۱۴۰۳).
تجزیه پروتئوم ریشه گندم رقم باران تحت تنش کمبود
آب، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی،
۱۴ (۲)، ۳۵-۴۹.

(DOI: 10.30473/cb.2024.71391.1970)

چکیده

غلات، بخصوص گندم یکی از مهمترین منابع غذایی انسان است و کمبود آب عامل محدودکننده مهمی در تولید گندم محسوب می‌شود. بنابراین تطابق آن با تنش خشکی، برای افزایش تولید حیاتی است. در این پژوهش ریشه‌ی گندم رقم باران که رقمی متحمل به کمبود آب است، برای بررسی صفات فیزیولوژیکی و تغییرات الگوی بیان پروتئینی، تحت تنش کمبود آب، مورد بررسی قرار گرفت. برای اجرای آزمایش از طرح کاملاً تصادفی در ده تکرار استفاده شد. ۲۰ روز پس از اعمال تنش، صفات طول اندام هوایی و ریشه، وزن تر و خشک، حجم ریشه و محتوای پروتئین ریشه در هر دو شرایط شاهد و تنش کمبود آب اندازه‌گیری شدند. استخراج پروتئین ریشه به روش بافر فسفات انجام و الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به روش IEF و بعد دوم به روش SDS-PAGE انجام گردید. تجزیه پروتئوم ریشه از طریق الکتروفورز دو بعدی با رنگ آمیزی آبی کوماسی باعث شناسایی ۹۹ لکه پروتئینی تکرار پذیر در هر ژل گردید. ۱۵ لکه دارای تغییر بیان معنی دار در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد شناسایی گردید که ۱۳ لکه افزایش بیان و ۲ لکه کاهش بیان داشتند. لکه‌های پروتئینی با تغییر بیان معنی دار با توجه به نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی در نرم افزار PDQuest برچسب زده شده و به روش طیف سنجی جرمی شناسایی شدند. این پروتئین‌ها در گروه‌های عملکردی، سنتز نشاسته، تنفس نوری و متابولیسم، پروتئین‌های درگیر در ساختار سلولی، پاسخ و دفاع در برابر تنش و سایر طبقه بندی شدند. پروتئین‌های اس-آدنوزیل متیونین سنتتاز-۳ و پروتئین شبه جرمین تحت تاثیر تنش کمبود آب کاهش بیان و پروتئین‌های پراکسیداز، فسفوگلیسرات موتاز، تریوز فسفات-ایزومراز، آدنوزین دی فسفات گلوکز پیروفسفوریلاز، گلوکاتایون اس-ترنسفراز، مونومریک-آلفا آمیلاز اینهیبیتور، ۳-فسفوگلیسرات کیناز سیتوسولی، زیر واحد بتا کانال پتاسیم حساس به ولتاژ، سرین هیدروکسی متیل ترنسفراز، پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی D-29، بتا-هیدروکسی ایزوبوتیل-کوا هیدرولاز و ۲-سیس پروکسی ردوکسینه BAS1 و سایر پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی افزایش بیان نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که گروه‌های متفاوتی از پروتئین‌ها در کاهش اثرهای مخرب حاصل از تنش کمبود آب دخیل می باشند ولی سهم پروتئین‌های پاسخ/دفاع در برابر تنش و متابولیسم بیش از سایر گروه‌ها می باشد.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی، متمرکزسازی بر اساس نقطه ایزوالکتریک (IEF)، SDS-PAGE، طیف‌سنجی جرمی.

مقدمه

کمبود آب عامل محدودکننده مهمی در تولید گندم در زراعت دیم و آبی محسوب می‌شود بنابراین تطبیق گیاهان با تنش خشکی، برای افزایش تولید حیاتی است. غلات، بخصوص گندم یکی از مهمترین منابع غذایی برای انسان است. تنش‌های محیطی همچون تنش کمبود آب، شوری و حرارت از عوامل مهم محیطی هستند که محصولات کشاورزی را در سراسر جهان به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند بسیاری از مناطق تولیدی در سرتاسر جهان به دلیل خشکسالی طولانی مدت آسیب‌های قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد کرده‌اند. مشابه بسیاری از محصولات زراعی، تولید گندم نان (*Triticum aestivum* L.) نیز تحت تأثیر خشکسالی قرار دارد. تغییرات اخیر در آب و هوا، دسترسی به آب آبیاری را کاهش داده و باعث شده است که تنش کمبود آب در رشد گیاهان و میزان تولید آن‌ها تغییرات مهمی را ایجاد کند (Zadrazilnik et al., 2013). پیش‌بینی می‌شود که خشکسالی‌های طولانی مدت در نتیجه تغییرات اقلیمی در سراسر جهان رخ دهند (Sengupta et al., 2011). از جمله تغییراتی که در اثر تنش خشکی در گیاه بوجود می‌آید، می‌توان تغییرات پروتئینی، تولید آنتی‌اکسیدان، تنظیم اسمزی، ترشح هورمون، بسته شدن روزنه‌ها، تغییر ضخامت کوتیکول، مهار فتوسنتز، کاهش محتوای کلروفیل و کاهش تعرق را نام برد (Yordanov et al., 2000). تنش کمبود آب همچنین سبب ناپایداری گرده و از دست دادن دانه‌ها در سنبله گندم‌های حساس به خشکی می‌شود. مطالعات نشان داده است که تغییرات بیان ژن در سطح رونویسی اغلب رابطه‌ای با تغییرات در سطح پروتئین ندارد. بنابراین مطالعه تغییرات پروتئوم گیاهان در پاسخ به تنش‌ها مهم و سودمند می‌باشد (Bogeat-Triboulot et al., 2007). بسیاری از پروتئین‌ها تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند که قابل رهایی با تجزیه ترانسکریپتوم نیست (Kosova et al., 2011). پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- پروتئین‌های مرتبط با تنش غیر زیستی مانند چپرون‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و پروتئین‌های

مرتبط با mRNA و ۲- پروتئین‌های تنظیمی یا (Regulatory Protein) که شامل پروتئین‌های کینازها، پروتئین فسفاتازها یا سایر پروتئین‌های مرتبط با پیام رسانی هستند (Ashoub et al., 2013). گیاهان با القای تولید دسته‌ای از پروتئین‌های تنشی که موجود را از آسیب سلولی محافظت می‌کنند، به انواع تنش‌های محیطی پاسخ می‌دهند (Kamal et al., 2010). پروتئین‌ها همچنین عملکردهای سازگاری به تنش را جهت‌دهی می‌کنند که منجر به بروز تغییر در غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم سلولی و ترکیب اجزای داخل سلولی می‌شوند که در نهایت خصوصیات آن‌ها مثل تمایل سیتوپلاسم سلولی به آب را تغییر می‌دهند (Kosova et al., 2011). علاوه بر این مطالعات نشان داده‌اند که تنش کمبود آب در گیاهان باعث افزایش تولید اسید آمینه پرولین که در تنظیم اسمزی نقش دارد (Ahmed et al., 2017) و نیز افزایش تولید پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی (LEA) که در حفاظت ساختارهای سلولی نقش دارند (Moons et al., 1995)، می‌گردد. تجزیه و تحلیل دقیق و همزمان پروتئوم و متابولوم در ارقام گیاهی تحمل به خشکی و مستعد، برای درک اصول فیزیولوژی سازگاری با استرس و بیوشیمی ضروری است. بنابراین با مطالعه الگوی پروتئوم، درک ساز و کار پاسخ به تنش کم آبی امکانپذیر است (Caruso et al., 2009). از آنجایی که پروتئین‌ها به طور مستقیم در پاسخ به تنش‌های محیطی درگیر هستند، تجزیه پروتئوم یک روش ایده‌آل شناسایی الگوی بیان و عملکرد پروتئین‌های مرتبط با تنش است (Bonhomme et al., 2012; Shi, Ye, and Chan 2013). تجزیه و تحلیل همزمان پروتئوم و متابولوم در ارقام گیاهی متحمل به خشکی و مستعد، برای درک فیزیولوژی سازگاری با تنش و بیوشیمی آن ضروری است. تکنیک‌های پر قدرت "omics" به محققان این امکان را می‌دهد تا در یک دیدگاه جامع تر پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی را مطالعه کنند. در راستای بررسی مکانیسم‌های پاسخ پروتئینی گندم به تنش کمبود آب، پژوهش حاضر برای

تغییریافته روی فتوسنتز تاثیر می‌گذارد. در مطالعه‌ی دیگری (Ge *et al.*, 2012) دو رقم گندم بهاره متحمل و حساس به تنش کمبود آب برای بررسی تغییرات پروتئوم در دانه‌های در حال نمو به روش پروتئومیک تحت تنش کمبود آب، مورد مقایسه قرار گرفتند. در مجموع ۱۵۲ لکه پروتئینی تغییر حداقل دو برابری در ژل‌های الکتروفورز دو بعدی نشان دادند. تعداد ۶۹ پروتئین شناسایی شده در دفاع و سمیت زدایی تنش، فتوسنتز، متابولیسم کربوهیدرات، متابولیسم نیتروژن، پروتئین‌های ذخیره‌ای و برخی فعالیت‌های مهم درگیر بودند. فورد و همکاران (Ford *et al.*, 2011) با استفاده از دسته‌ای از آزمایشات چندگانه، تغییرات در فراوانی لکه‌های پروتئینی روی ژل الکتروفورز دو بعدی را در سه رقم گندم نان استرالیایی در پاسخ به تنش کمبود آب مطالعه کردند. یک رقم حساس و دو رقم متحمل که در توانایی حفظ عملکرد دانه تحت شرایط تنش خشکی متفاوت بودند در گلخانه با تیمار خشکی دوره ای رشد داده شدند. این محققین با اعمال تنش ۱۴ و ۵۴ روزه بر گیاه و بررسی پروتئوم برگ موفق به ملاحظه ۵۱۳۳ لکه پروتئینی تکرارپذیر روی ژل‌ها شدند. عملکرد پروتئین‌های تغییر یافته به گلیکولیز و گلیکوزنز، تاشدگی پروتئین، پاسخ به تنش، چرخه کالوین، فتوسنتز، ترجمه و انتقال مربوط بودند. یکی از ارقام متحمل فاقد تغییرات معنی‌دار در پروتئین‌ها در طول مراحل اولیه کمبود آب بود ولی رقم متحمل دیگر تغییرات معنی‌داری نشان داد. هر سه گونه تغییرات مرتبط با افزایش متابولیسم در تنش اکسیداتیو و ظرفیت مهار گونه‌های فعال اکسیژن از طریق افزایش سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را داشتند. در مطالعه‌ای (Bazargani *et al.*, 2011) برای تعیین مکانیسم مولکولی مصرف ذخایر ساقه تحت شرایط خشکی، الگوی پروتئوم ساقه دو توده محلی گندم را تحت تنش کمبود آب بعد از گلدھی مقایسه کردند. با استفاده از الکتروفورز دو بعدی، تعداد ۹۰ پروتئین به عنوان پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب شناسایی شد. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین دو توده محلی، چندین پروتئین ساقه را به عنوان اعضای اصلی در انتقال ذخایر ساقه به دانه گندم معرفی کرد.

شناسایی مسیرهای متابولیکی مهم در ریشه گندم رقم باران جهت تحمل تنش کمبود آب طراحی و اجرا گردیده است. گندم باران از جمله گندم‌های نانوائی است که در سال ۱۳۹۳ معرفی توسط مرکز تحقیقات بین‌المللی دیم مراغه معرفی شده است. تیپ رشدی آن زمستانه بوده و درصد پروتئین دانه‌ی آن ۱۱/۲ درصد است.

مروری بر پژوهش‌ها

در مطالعه‌ای (Michaletti *et al.*, 2018) روی ارقام گندم ایرانی، پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی با روش 2D-PAGE و طیف‌سنجی جرمی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در مجموع ۸۵ لکه پروتئینی متفاوت در رقم بهار (حساس به خشکی) و ۲۰ لکه پروتئینی معنی‌دار در رقم کویر (متحمل به خشکی) در مقایسه با شاهد وجود دارد. در تحقیق دیگری (Hao *et al.*, 2015) تجزیه پروتئومیک از پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی در ریشه، برگ و میان‌گره‌های دو رقم گندم چینی، حساس به خشکی (CS) و مقاوم به خشکی (HX-10) انجام گرفت. نتایج نشان داد که HX-10 تحمل بیشتری نسبت به CS در برابر تنش خشکی داشت. بطوریکه بر خلاف HX-10، گیاهان CS پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تنش، دچار پژمردگی شدند. پروتئوم بافت‌های ارقام HX-10 و CS بوسیله الکتروفورز دو بعدی مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۹۶۵، ۹۹۳ و ۷۳۳ لکه پروتئینی بترتیب در بافت‌های ریشه، میان‌گره و برگ شناسایی گردید. از این تعداد توسط روش طیف‌سنجی جرمی تعداد ۱۰۰ لکه پروتئینی با بیان متفاوت در ریشه، ۱۱۵ پروتئین در میان‌گره و ۱۶۳ پروتئین در برگ، مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش طول دوره خشکی، بیان پروتئین‌های دفاعی و اکسیداتیو مانند پروتئین‌های شوک حرارتی و پراکسیداز برای سازگاری با شرایط تنش را افزایش می‌یابد.

کمال و همکاران (Kamal *et al.*, 2013) با مطالعه الگوی پروتئوم در برگ گندم گونه Keumkang تحت تنش کمبود آب به مدت سه روز به روش 2-DE و طیف‌سنجی دریافتند که عمدتاً پروتئین‌های کلروپلاستی

هر واحد آزمایشی وزن گردید و درون فویل آلومینیومی داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای -80°C - درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در مرحله استخراج پروتئین یک گرم بافت ریشه داخل هاون چینی به همراه ۲ میلی لیتر بافر استخراج پروتئین و شن کوارتز، کاملاً له گردید. میکروتیوب‌های حاوی عصاره یک دقیقه ورتکس شده سپس با تنظیمات ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند و روشناور به تیوب جدید منتقل گردید. بافر استخراج پروتئین شامل (K_2HPO_4 65mM, KH_2PO_4 2.6 mM, NaCl 400 mM, NaN_3 3mM) در $\text{pH} = 7.6$ می‌باشد. تمام مراحل استخراج پروتئین روی یخ انجام گردید. برای تعیین غلظت پروتئین استخراج شده از روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید.

الکتروفورز بعد اول (IEF) Isoelectric focusing

برای تفکیک پروتئین‌ها، الکتروفورز دو بعدی (در بعد اول به روش IEF و بعد دوم SDS-PAGE) در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. ژل بعد اول شامل (اوره ۶۰۰ میلی گرم، آب دیونیزه ۳۵۵ میکرولیتر، استوک آکریل آمید ۳۰ درصد ۱۴۵ میکرولیتر، آمفولین (pH 5-8) $31/25$ میکرولیتر، آمفولین (pH 3-10) $31/25$ میکرولیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد $1/875$ میکرولیتر و TEMED $1/25$ میکرولیتر) می‌باشد.

مخزن دستگاه الکتروفورز تا نصف با H_3PO_4 با غلظت 0.02% نرمال پر شد. درون لوله‌های شیشه‌ای حاوی ژل بعد اول، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی و ۲۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه گردید. سپس الکتروفورز با ولتاژهای ۲۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت (در مجموع $17/5$ ساعت) اجرا شد.

الکتروفورز بعد دوم

ژل‌های بعد دوم به صورت دو قسمتی، شامل ژل جداکننده و ژل نگه دارنده تهیه شدند. ابتدا محلول ژل جداکننده

مواد و روش‌ها

آماده سازی و کشت گیاه

ماده گیاهی مورد استفاده در این آزمایش گندم رقم باران می‌باشد که از مرکز تحقیقات بین‌المللی دیسم مراغه تهیه شد. آزمایش در گلدان‌های پلاستیکی به وزن سه کیلوگرم انجام شد که با خاک زراعی معمولی پر شده بود. برای انجام آزمایش تعداد ۳۰ گلدان آماده گردید و بذور در عمق $1/5$ سانتی‌متری خاک کاشته شدند. ۱۵ روز پس از کاشت که گیاهان سبز شدند آن‌ها را تنک کرده و تعداد ۵ گیاه در هر گلدان حفظ شد. گلدان‌ها تا مرحله سه برگی که حدود یک ماه طول کشید بطور روزانه آبیاری شدند. کشت بذور با متوسط دمای روزانه‌ی $26-28^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد و شبانه $17-19^{\circ}\text{C}$ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت.

طرح آزمایشی و نحوه اعمال تنش کمبود آب

برای اجرای آزمایش از طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تکرار استفاده شد. سطوح آبیاری شامل آبیاری عادی و تنش کمبود آب، تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند. گلدان‌های شاهد بصورت روزانه آبیاری شدند و تیمار تنش کمبود آب با قطع آبیاری در مرحله سه برگی برای گلدان‌های تحت تنش به فاصله سه روز در میان، بمدت ۲۰ روز اعمال گردید. پس از ۲۰ روز علائم ظاهری تنش در بخش هوایی گیاهان قابل مشاهده بود.

صفات مورد اندازه گیری

حدود ۲۰ روز پس از اعمال تنش کمبود آب، صفات رشدی شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، حداکثر طول و حجم ریشه و بالاخره غلظت پرولین به روش نین‌هیدرین (Bates et al., 1973) مورد اندازه گیری قرار گرفتند. برای تجزیه‌های آماری صفات مورفولوژیکی و تجزیه بیان پروتئین‌ها از برنامه SAS و رسم نمودارها از Excel استفاده شد.

استخراج پروتئین

برای تجزیه پروتئوم، نمونه‌های ریشه گیاهچه‌های تصادفی از

درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون t برای درصد حجمی هر لکه پروتئینی بین تیمارهای آبیاری انجام شد. بدین ترتیب که لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند و روند افزایشی و کاهش‌ی بیان آنها در اثر تنش کمبود آب بر اساس فاکتور القاء (IF) مشخص شدند. نقاطی که دارای IF بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند (Toorchi *et al.*, 2014). فرآیند هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی با تریپسین انجام شد. شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش انگشت‌نگاری جرم پپتیدی MALDI-TOF در مرکز ژنومیکس و پروتئومیکس دانشگاه Tucsia ایتالیا صورت گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل صفات

ابتدا آزمون نرمال بودن برای داده‌های صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه انجام شد و نتایج نشان داد که کلیه صفات دارای توزیع نرمال بودند. نتایج حاصل از آزمون t برای صفات مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. اختلاف بین شرایط شاهد و تنش کمبود آب برای صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه (شکل ۱-ب) و طول ریشه از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۱ و صفات وزن تر ریشه و میزان پرولین (شکل ۱-الف) در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار شد که نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین دو گروه از لحاظ این صفات است. این درحالی است که برای صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی و طول اندام هوایی، اختلاف بین میانگین شرایط شاهد و تنش کمبود آب غیر معنی‌دار گردید. به نظر می‌رسد به دلیل نمونه برداری در مراحل اولیه رشد، گیاهان فرصت کافی برای پاسخ به تنش در مورد برخی صفات مورفولوژیکی را نداشتند.

(آکریل‌آمید برای ژل جداکننده ۸/۵ میلی لیتر، بافر ژل جداکننده (pH= ۸/۸) ۶/۳ میلی لیتر، آب دیونیزه ۲ میلی لیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۱۲۰ میکرولیتر، TEMED ۲۰ میکرولیتر) تهیه گردید. بافر ژل جداکننده شامل (تریس ۷/۷۵ گرم، گلیسرول ۱۰۰ میلی لیتر، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲۵ گرم، مرکاپتواتانول ۵۰ میلی لیتر) می‌باشد.

ژل نگه دارنده (شامل آکریل‌آمید برای ژل تعیین مسیر ۱ میلی لیتر، بافر ژل جداکننده (pH= ۶/۸) ۳ میلی لیتر، آب دیونیزه ۲ میلی لیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۳۰ میکرولیتر، TEMED ۲۰ میکرولیتر) تهیه شد. غلظت ژل‌های نگه دارنده و جداکننده به ترتیب ۵٪ و ۱۵٪ بود. در نهایت مخزن پایین و فضای بین دو شیشه با بافر رانش SDS-PAGE (تریس ۷/۵ گرم، SDS ۲۵ گرم، گلایسین ۳۶ گرم و مابقی حجم تا ۲/۵ لیتر آب دیونیزه) پر گردید. عملیات رانش با جریان ۳۵ میلی آمپر برای هر ژل انجام شد.

رنگ آمیزی ژل

رنگ آمیزی ژل‌ها با محلول کوماسی بلو (شامل کوماسی بلو ۷/۵ گرم، متانول ۱۲۵۰ میلی لیتر، استیک اسید ۲۵۰ میلی لیتر و مابقی حجم تا ۲/۵ لیتر آب دیونیزه) انجام گرفت.

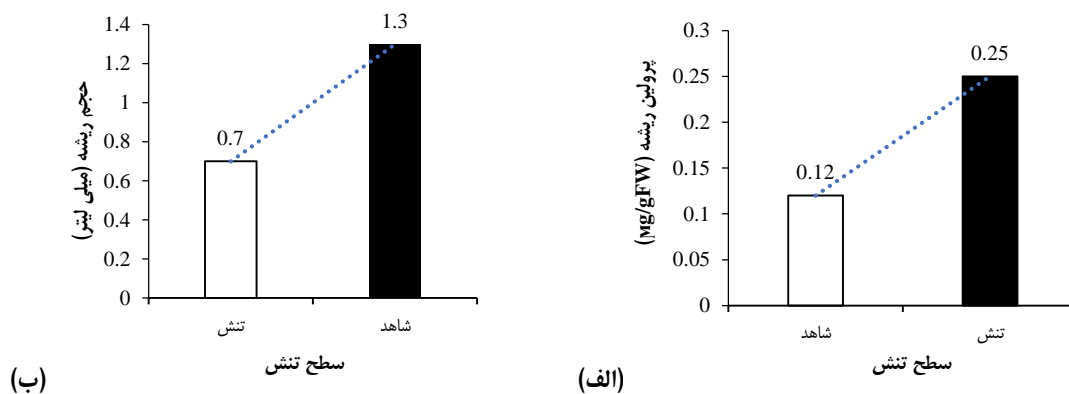
تصویر برداری و تجزیه لکه‌های پروتئینی

تصویربرداری از ژل‌ها توسط دانسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیوراد و با انتخاب نوع ژل و روش رنگ‌آمیزی (آبی کوماسی) با نرم افزار Quantity one انجام گردید. توسط نرم‌افزار PDQuest کلیه تصاویر ژل‌ها به همراه تکرارهای آنها فراخوانده شدند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب زده شد. با مشخص نمودن نقاط حداقل و حداکثر (pH در بازه ۵ تا ۸)، نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی هر لکه پروتئینی با استفاده از مارکر پروتئینی به دست آمد. پس از غربال نمودن لکه‌ها از نظر کیفیت و حذف نقاط ناخواسته در نرم افزار، داده‌های کمی حاصل از ژل‌ها بصورت فایل Excel ذخیره شدند. پس از پایان لکه‌یابی،

جدول ۱. میانگین صفات مورد مطالعه در گندم رقم باران و سطح معنی داری آماره‌ی t برای شرایط شاهد و تنش کمبود آب
Table 1. The mean of traits studied in wheat cultivar Baran and significance level of t-statistic for normal and water deficit stress conditions

صفات	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	طول اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	طول ریشه	حجم ریشه	پرولین ریشه
شاهد	۰/۲۵	۰/۰۳	۲۱/۶۹	۰/۱۸	۰/۱۰	۲۵/۵۷	۱/۳۴	۰/۱۱
تنش	۰/۲۳	۰/۰۳	۲۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۰۴	۱۲/۶۸	۰/۷	۰/۲۶
P-value	۰/۲۳ ns	۰/۲۵ ns	۰/۱۰ ns	۰/۰۲*	۰/۰۱**	۰/۰۱**	۰/۰۰**	۰/۰۲*
CV(%)	۱۴/۵۹	۱۰/۲۴	۹/۰۰	۳۹/۶۲	۲۷/۵۳	۳۱/۲۷	۳۱/۵۹	۴۴/۷۷

ns, * and **: Indicate non-significant and significant at the probability levels 5% and 1%, respectively. ns, * and **: به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد.

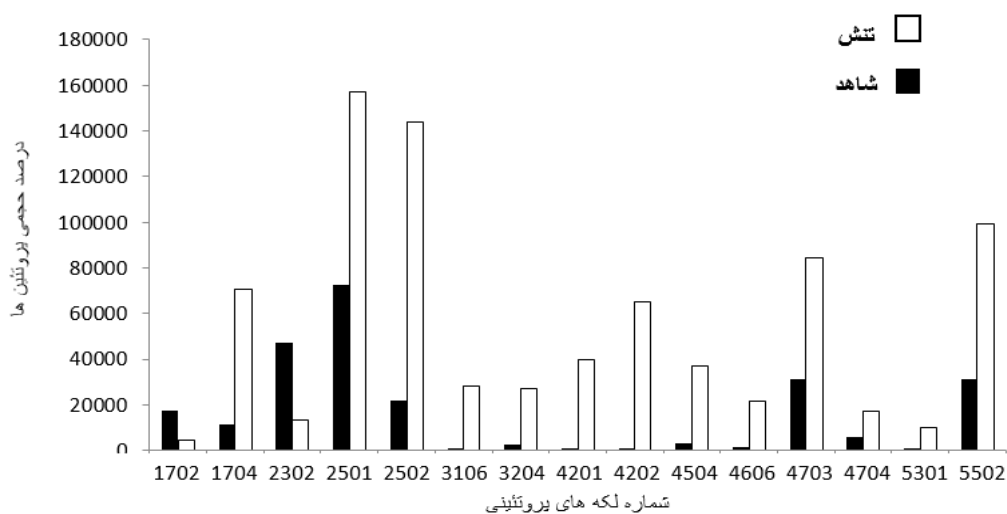


شکل ۱. میانگین محتوای حجم ریشه (الف) و پرولین ریشه (ب) در شرایط شاهد و تنش کمبود آب در گندم رقم باران
Figure 1. (a) The mean of root volume (a) and root proline content (b) under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

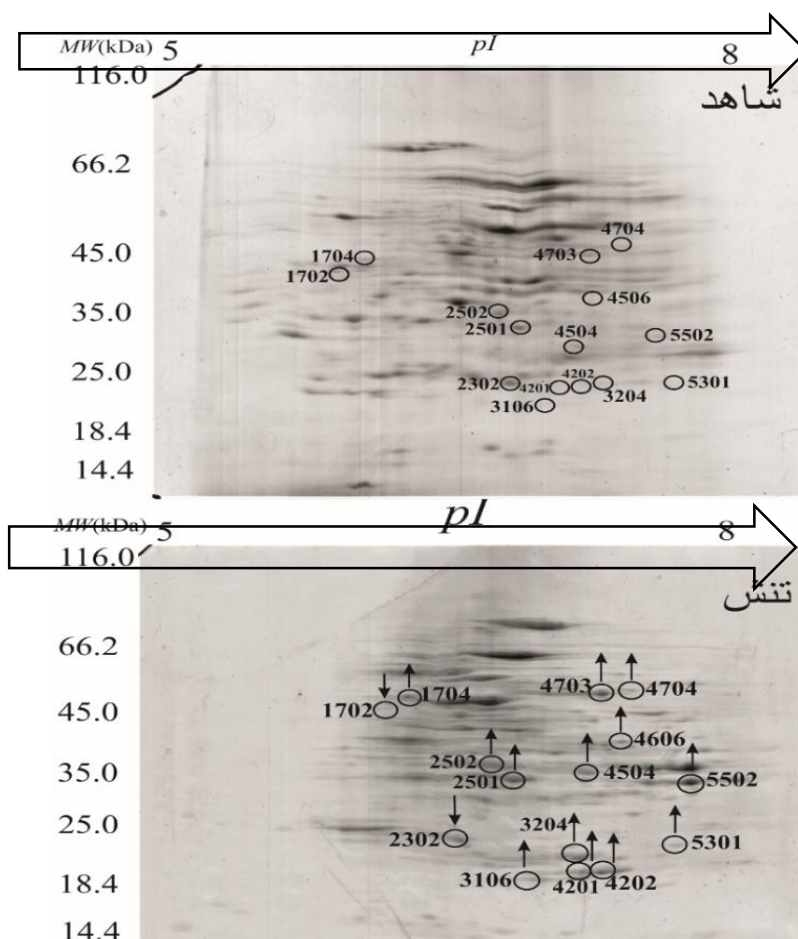
نشان دادند که تعداد لکه‌های دارای افزایش تغییر بیان ۱۳ و لکه‌های با کاهش تغییر بیان و برابر ۲ بود. عامل القا بزرگتر از دو و کوچکتر از ۵/۰ بترتیب برای افزایش و کاهش تغییر بیان تعیین شدند (Hajheidari *et al.*, 2005). شماره و میزان افزایش یا کاهش بیان لکه‌های پروتئین انتخابی در شکل ۲ و موقعیت این لکه‌ها روی ژل‌های پلی‌آکریل‌امید دو بعدی در شکل ۳ نشان داده شده است. تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلفی را تحت تاثیر قرار می‌دهد که هر کدام جزئی از متابولیسم‌ها و چرخه‌های حیاتی سلول می‌باشند. بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که در طی تنش یکسری از پروتئین‌ها افزایش بیان یا کاهش بیان می‌یابند و برخی از پروتئین‌ها در طی تنش بیان نمی‌شوند (Hashimoto and Komatsu 2007; Zang and Komatsu, 2007).

تجزیه و تحلیل پروتئومیک

برای بررسی تغییرات پروتئوم، استخراج پروتئین از بافت ریشه در شرایط تنش کمبود آب و آبیاری عادی انجام شد. الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به روش متمرکزسازی براساس نقطه ایزوالکتریک و در بعد دوم به روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل لکه‌های پروتئینی بوسیله نرم افزار PDQuest با مقایسه درصد حجمی لکه‌های پروتئینی بین شاهد و تیمار تنش کمبود آب منجر به شناسایی تعداد ۹۹ لکه پروتئین تکرار پذیر شد. درصد حجمی لکه‌های مشابه در شرایط شاهد و تنش کمبود آب توسط نرم افزار محاسبه و آزمون t برای شناسایی لکه‌های با افزایش یا کاهش بیان معنی دار استفاده گردید. در مجموع تعداد ۱۵ لکه تفاوت تغییرات بیان معنی‌داری نسبت به شرایط شاهد



شکل ۲. درصد حجمی پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی دار تحت شرایط کمبود آب در گندم رقم باران
Figure 2. The volume percentage of the protein with significant expression changes under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

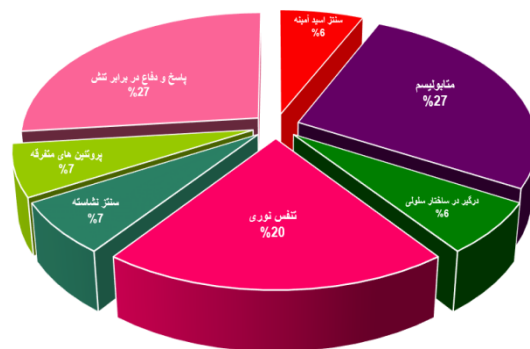


شکل ۳. موقعیت نسبی و برچسب لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در الکتروفورز دو بعدی تحت شرایط عادی و تنش کمبود آب در گندم رقم باران

Figure 3. The relative positions and tags of proteins spots with significant expression changes in two-dimensional electrophoresis under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

آمیلاز می‌توان به محافظت در برابر تنش اکسیداتیو اشاره کرد. علاوه بر این به حفظ نشاسته دانه، یک جزء حیاتی برای جوانه زنی کمک می‌کنند (Hajheidari *et al.*, 2007). همچنین این آنزیم نقش مهمی در مقاومت در برابر آسیب ناشی از حمله حشرات در گیاهان دارند (Gibbs and Alli, 1998). لکه شماره ۴۷۰۴ که نسبت به حالت شاهد افزایش بیان نشان داد با وزن ۴۸/۰۸ کیلو دالتون و ۷/۱۱ pI در بیان پروتئین Late embryogenesis abundant protein D-29 تنش کمبود آب نقش دارد. یکی از پروتئین‌های اصلی تشکیل‌دهنده‌ی بذر در گیاهان، پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی (LEA) می‌باشد. تجمع این دسته از پروتئین‌ها باعث ایجاد سازگاری در عملکرد گیاهان در مقابل تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو شده است (Mertens, Aliyu, and Cowan 2018). پروتئین‌های LEA از توده‌های مولکولی تشکیل شده اند که عمدتاً در مرحله دوم و سوم رشد بذر جمع می‌شوند، یعنی زمانی که مواد ذخیره شده در بذر به منظور آماده سازی آن برای ورود به مرحله خواب شروع به خشک شدن می‌کنند (Mukherjee *et al.*, 2006). لکه پروتئینی ۵۵۰۲ با افزایش بیان در رقم باران بعنوان پروتئین 2-Cys peroxiredoxin BAS1 مورد شناسایی قرار گرفت. تیوردوکسین‌ها پروتئین‌های کوچکی با دامنه سایت فعال Cys-Gly-Pro-Cys هستند که قادر به احیای پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین‌های هدف هستند (Eklund *et al.*, 1991). علاوه بر عملکرد کلی در تنظیم فعالیت آنزیم از طریق کنترل واکنش‌های اکسایش-کاهش تیول، تیوردوکسین‌ها در بسیاری از فرآیندها مانند جذب سولفات، تجمع فایز، رونویسی DNA و آپوپتوز سلولی شرکت می‌کنند (Holmgren 1979; Schenk *et al.*, 1994). مطالعات نشان داده‌اند که این پروتئین در باکتری‌ها، مخمرها و گیاهان، در پاسخ تنش‌های اکسیداتیو نقش دارند.

تجزیه و تحلیل بیان لکه‌های پروتئینی در ژل‌ها بوسیله نرم افزار PDQuest نشان داد که ۱۵ لکه پروتئینی تغییر معنی‌دار داشتند بطوریکه ۲ لکه کاهش بیان و ۱۳ لکه افزایش بیان نشان داده است. خلاصه اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده توسط نرم افزار Mascot در جدول ۲ ارائه شده است. پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار در شش گروه عملکردی (شکل ۴) تفکیک شده‌اند. تعداد پروتئین‌های درگیر در پاسخ و دفاع در برابر تنش (۴ لکه)، متابولیسم (۴ لکه)، تنفس نوری (۳ لکه)، درگیر در ساختار سلولی (۱ لکه)، سنتز نشاسته (۱ لکه)، سنتز اسیدآمینه (۱ لکه) و پروتئین متفرقه (۱ لکه) گروه بندی شدند.



شکل ۴. گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب در گندم رقم باران

Figure 4. Functional group of proteins responded to water deficit stress in wheat cultivar Baran

پروتئین‌های درگیر در پاسخ و دفاع در برابر تنش تعداد ۴ لکه (۲۷٪) جزو پروتئین‌های شناخته شده در پاسخ و دفاع در برابر تنش بودند که از این میان لکه‌های شماره ۴۲۰۱ و ۴۲۰۲ با داشتن وزن مولکولی و pI تقریباً مشابه هم، به عنوان پروتئین Monomeric alpha-amylase inhibitor مورد شناسایی قرار گرفتند. مطابق مطالعات انجام گرفته مهارکننده‌های پروتئاز عموماً در بسیاری از گیاهان به‌ویژه در بافت‌های ذخیره‌سازی مانند دانه‌ها و غده‌ها پس از القای یک تنش زیستی، با افزایش بیان ظاهر می‌شوند (Van Dam *et al.*, 2001; Dombrowski, 2003). از نقش‌های مهارکننده‌های آلفا

جدول ۲. مشخصات ۱۵ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در پاسخ به تنش کمبود آب گندم رقم باران

Table 2. The characteristics of 15 protein spots with significant expression changes under water deficit stress in wheat cultivar Baran

گروه عملکردی	شماره لکه	شماره دسترسی	نام پروتئین	Theoretical		Experimental	
				MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI
سنتز اسید آمینه	۱۷۰۲	XP_002881476	S-adenosylmethionine synthase 3	42.5	5.76	43.94	5.60
متابولیسم	۱۷۰۴	gi/474004599	Peroxidase	46.23	5.85	46.88	5.83
درگیر در ساختار سلولی	۲۲۰۲	EMS51159	Germin-Like protein	24	6	21.85	6.08
متابولیسم	۲۵۰۱	32400802	Phosphoglycerate mutase	30	5.43	30.64	6.48
تنفس نوری	۲۵۰۲	136063	Triose phosphate- isomerase	32.0	6.00	32.85	6.32
سنتز نشاسته	۲۱۰۶	gi 21322655	Adenosindiphospha glucose	21.97	5.68	18.43	6.69
پروتئین متفرقه	۲۲۰۴	AAP58395	Glutathione S-transferase 5	23.9	6.8	20.62	6.88
پاسخ و دفاع در برابر تنش	۴۲۰۱	ABO45950.1	Monomeric alpha-amylase inhibitor	19.2	6.9	19.2	6.90
پاسخ و دفاع در برابر تنش	۴۲۰۲	ABO45950.1	Monomeric alpha-amylase inhibitor	19.2	6.9	19.19	6.98
متابولیسم	۴۵۰۴	gi 20302473	Cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	40.5	6.9	31.36	6.93
تنفس نوری	۴۶۰۶	ANS54490	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.61	6.67	37.07	7.0
متابولیسم	۴۷۰۳	NP_193129	Serine hydroxymethyltransferase 4	51.7	6.80	47.35	6.97
پاسخ و دفاع در برابر تنش	۴۷۰۴	gi 734319188	Late embryogenesis abundant protein D-29	48.3	7.1	48.08	7.11
متابولیسم	۵۳۰۱	Q9LKJ1	β -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase 1	23.25	7.66	21.93	7.3
پاسخ و دفاع در برابر تنش	۵۵۰۲	gi 657999067	2-cys Peroxiredoxin BASI	29.5	7.7	30.21	7.36

پروتئین های درگیر در تنفس نوری و متابولیسم

گروه بعدی پروتئین ها در گروه عملکردی متابولیسم و تنفس نوری قرار دارند. از بین پروتئین های شناسایی شده در این گروه، لکه های ۱۷۰۴، ۲۵۰۱، ۲۵۰۲، ۴۵۰۴، ۴۷۰۳ و ۵۳۰۱ در مسیرهای متابولیسم گیاهان نقش دارند. پروتئین شماره ۲۵۰۱ با وزن مولکولی ۳۰/۶۴ و pI ۶/۴۸ مربوط به Phosphoglycerate mutase می باشد که تحت تنش کمبود آب در ریشه های گندم افزایش یافت. فسفوگلیسرات موتاز یا PGM یک آنزیم گلیکولیزی است که باعث تبدیل گلیسرات-۳ فسفات و گلیسرات-۲ فسفات به یکدیگر می شود (Yan et al., 2006). افزایش بیان این آنزیم ممکن است به تولید انرژی بیشتر مورد نیاز در فرآیندهای دفاعی متعدد کمک کند. از دیگر ترکیباتی که در چرخه تنفس

نوری (متابولیسم) شناسایی شده اند، فروکتوز بیس فسفات^۱، تریوز فسفات ایزومراز سیتوسولی^۲، آلدولاز^۳ و اینولاز^۴ هستند که جزء مرحله اولیه گلیکولیز می باشند. در این مرحله کربوهیدرات ها به هگزوز فسفات^۵ و سپس به تریوز فسفات^۶ تبدیل می شوند (Rocco et al., 2019). لکه ۲۵۰۲ که بعنوان تریوز فسفات ایزومراز^۷ شناسایی شد در مسیر گلیکولیز (مرحله اولیه تولید انرژی) درگیر می باشد که ایزومریزاسیون دی هیدروکسی استون فسفات^۸ و D-گلیسرآلدئید-۳

1 Fructose-bis phosphate

2 Cytosolic Triosephosphate isomerase

3 Aldolase

4 Enolase

5 Hexose phosphates

6 Triose phosphates

7 Triosephosphate isomerase

8 dihydroxyacetone phosphate

۴۷۰۳ به عنوان پروتئین دخیل در متابولیسم کربن شناسایی گردید. این پروتئین در شرایط تنش کمبود آب افزایش بیان معنی دار داشت. این لکه پروتئینی بعنوان سرین هیدروکسی متیل تراستفراز^۴ در تبادلات مسیر تراهایدروفولات دخیل است که بخشی از متابولیسم کربن بوده و در متابولیسم آمینواسیدها و نوکلئوتیدها درگیر هستند (Lovell et al., 1990). پروتئین سرین هیدروکسی متیل تراستفراز مسئول کاتالیز تبادلات سرین و گلیسین می باشد. لکه شماره ۵۳۰۱ بعنوان بتا-هیدروکسی ایزوبوتیریل- کوآ هیدرولاز^۵ در متابولیسم والین نقش دارد. والین نقش بسزایی در گرده افشانی و در مقاومت به شرایط تنش های محیطی دارد (Zolman et al., 2001). لکه مربوط به پروتئین بتا-هیدروکسی ایزوبوتیریل- کوآ هیدرولاز در شرایط تنش کمبود آب دارای افزایش بیان بود. این افزایش بیان می تواند مربوط به افزایش پرولین در گیاه باشد. می توان گفت پرولین نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش های محیطی از جمله تنش شوری و کمبود آب در گیاه دارد و سایر مسیرها را نیز تحت تاثیر قرار می دهد (Zolman et al., 2001).

پروتئین درگیر در بیوسنتز نشاسته

لکه ی شماره ۳۱۰۶ یکی دیگر از پروتئین های شناسایی شده است که با افزایش بیان همراه گردید. این لکه بعنوان ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)^۶ مورد شناسایی قرار گرفت. در غلات در حال رشد، ساکارز از طریق یک مسیر متابولیکی که شامل چندین مرحله متوالی آنزیمی است، به نشاسته تبدیل می شود. در سنتز نشاسته آدنوزین بیس فسفات، گلوکز پیرو فسفات، نشاسته سنتتاز و آنزیم منشعب کننده^۷ فعالیت دارند. وزن تقریبی پروتئین AGPase، در حدود ۲۰ کیلو دالتون می باشد. همچنین این پروتئین در گیاهان دارای ساختار نوع چهارم^۸ است و از دو زیر واحد متفاوت تشکیل شده اند که توسط ژن های متفاوت کد می شوند. AGPase واکنش تشکیل

فسفات را کاتالیز می کند (Kishor et al., 2005). نتایج حاصل از مطالعه دیگری نشان می دهد که این آنزیم ها برای کارایی در هر دو مسیر گلیکولیز و کالوین نقش اساسی دارند (Rocco et al., 2019). لکه ۱۷۰۴ از پروتئین های دیگری است که در تنفس نوری و فرآیند متابولیسم دخیل است، این لکه بعنوان آنزیم پراکسیداز شناسایی شد که افزایش بیان داشته است. طی بیست سال اخیر به طور پیوسته آنزیم پراکسیداز به عنوان شاخص تغییرات اکولوژیکی در گیاه معرفی شده است و تغییرات کمی و کیفی این آنزیم در فرآیند فتوسنتز و نیاز نوری گیاه به اثبات رسیده است (Salin 1991). لکه پروتئینی ۴۵۰۴ که بعنوان ۳- فسفوگلیسرات کیناز سیتوسولی^۹ مورد شناسایی قرار گرفت، هفتمین آنزیم چرخه گلیکولیز است که واکنش ۱،۳ بیس فسفوگلیسرات و ADP را برای تولید تری فسفوگلیسرات و ATP کاتالیز می کند (Xiong et al., 2017). فسفوگلیسرات کیناز یکی از آنزیم های حیاتی در چرخه گلیکولیز است، افزایش آن در ریشه احتمالاً نشان دهنده الگوهای تغییر شکل کربن در پاسخ به افزایش نیاز برای تنظیم اسمزی باشد (Xiong et al., 2017). لکه پروتئینی ۴۶۰۶ با وزن مولکولی ۳۷،۰۷ کیلو دالتون و pI برابر ۷ به عنوان پروتئین گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز^{۱۰} مورد شناسایی قرار گرفت. گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز یک واکنش کلیدی در مسیر گلیکولیز را کاتالیز می کند و نقش مهمی در تولید انرژی و تجزیه متابولیت های کربوهیدرات ایفا می کند (Guo et al., 2014). افزایش گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز ممکن است تجمع قندهای محلول را افزایش دهد و انرژی بیشتری برای گیاهان تحت تنش ایجاد کند. از این رو این آنزیم می تواند به عنوان شاخص تحمل به تنش باشد. افزایش این آنزیم توسط بنایی و همکاران، نیز در ریشه کلزا گزارش شده است (Banaei-Asl et al., 2015). همچنین افزایش فعالیت این آنزیم (Tanou et al., 2009) تحت تنش های محیطی به عنوان یک راهکار موثر تحمل تنش، در گندم (Kang et al., 2012) نیز گزارش شده است. لکه شماره

4Serine hydroxymethyltransferase
5β-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase
6ADP-glucose pyrophosphorylase
7Branching enzyme
8Tetrameric

1D-glyceraldehyde-3-Phosphate
23-phosphoglycerate kinase Cytosolic
3Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

دارد. این لکه با وزن مولکولی $43/94$ کیلو دالتون و pI $5/6$ که به عنوان اس-آدنوزیل متیونین سنتاز- 3 شناسایی شد در رقم باران کاهش بیان معنی دار نشان داد. اس-آدنوزیل متیونین سنتاز- 3 یک آنزیم حیاتی است که میان کنش اتصال متیونین و ATP و تشکیل اس-آدنوزیل متیونین را کاتالیز می کند (Horikawa et al., 1990). بنایی و همکاران (Banaei-Asl et al., 2015) کاهش بیان این آنزیم را در ریشه کلزا تحت تنش شوری را گزارش کرده اند.

پروتئین های متفرقه

لکه شماره 3204 با وزن مولکولی $20/62$ و pI $6/88$ که در گروه پروتئین های متفرقه قرار دارد، در شرایط تنش دارای افزایش بیان بود و به عنوان گلوکوتایون اس-ترانسفراز^۴ شناسایی گردید. این پروتئین ها در سم زدایی و محافظت در برابر تنش اکسیداتیو از طریق مهار رادیکال های آزاد دخیل هستند. GST به عنوان آنزیم سم زدایی در کاتالیز ترکیب گلوکوتایون با انواع ترکیبات هدف به خوبی شناخته شده است (Droog 1997; Dixon et al., 2002). برخی از مطالعات پروتئومیک نشان دادند که بیشتر ایزوفرم های GST در ریشه های *Arabidopsis* (Jiang et al., 2007)، برنج (Liu et al., 2014; Chitteti and Peng, 2007)، گندم (Wang et al., 2008) و جو (Sugimoto and Takeda, 2009) القا می شوند.

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میانگین صفات وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه و حجم ریشه در شرایط تنش کمبود آب در گندم رقم باران نسبت به شاهد کاهش و میزان پرولین ریشه افزایش معنی دار داشته است. تجزیه پروتئوم بافت ریشه منجر به شناسایی ۹۹ لکه پروتئینی تکرار پذیر در الکتروفورز دو بعدی شد. از بین لکه های پروتئینی ظاهر شده روی ژل

ADP-glucose و پیروفسفات را از ATP و گلوکز- 1 فسفات کاتالیز می کند. محصول نهایی این واکنش ADP-glucose است که پیش ماده برای سنتز نشاسته محسوب می شود (Boehlein et al., 2005). نشاسته کربوهیدرات اصلی ذخیره ای در غلات است از این رو عامل مهمی است که عملکرد دانه را تعیین می کند و منبع انرژی برای فرآیندهای متابولیکی مختلف می باشد (Balan et al., 2018).

پروتئین های درگیر در ساختار سلولی

لکه دیگری که مورد شناسایی قرار گرفت و در گروه عملکردی ساختار سلولی درگیر است، لکه 2302 با وزن مولکولی $27/85$ و pI $6/08$ می باشد که به عنوان پروتئین شبه جرمین^۲، در طی جوجه زنی دانه در گیاهچه های جوان گندم و همچنین در برگ های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می شوند. پروتئین های شبه جرمین به عنوان پروتئین های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده اند، برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبیه اگزالات اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز نشان می دهند (Gucciardo et al., 2007). در گندم رقم باران نیز احتمال می رود لکه شماره 2302 جزو این پروتئین ها باشد که در شرایط تنش کاهش بیان داشت. بررسی میزان بیان Germin-Like در گندم تحت تنش کمبود آب دریافتند که Germin-Like یکی از فراوان ترین پروتئین های موجود در دیواره سلولی گیاهان عالی است و از طریق تقویت دیواره سلولی و جلوگیری از آسیب بافت، نقش مهمی در دفاع گیاهان دارند. در این بررسی مشاهده کردند که پروتئین فوق در ریشه تحت تنش کمبود آب رقم متحمل ابتدا افزایش و سپس کاهش بیان داشته است (Membré et al., 2000).

پروتئین درگیر در سنتز اسید آمینه

لکه 1702 در گروه عملکردی سنتز اسید آمینه قرار

3S-Adenosylmethionine synthetase 3

4Glutathione S-transferase (GST)

1Glucose-1- phosphate

2Germin-Like

افزایش بیان معنی‌دار داشتند، می‌توان اظهار داشت که گندم رقم باران در شرایط تنش کمبود آب می‌تواند با افزایش هموستازی به تنش و حفظ پروتئین‌های عملکردی تحمل لازم را داشته باشد. این افزایش بیان پروتئین‌ها نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی است که به گیاه کمک می‌کنند تا با شرایط نامساعد محیطی مقابله کند. پروتئین‌های شناسایی شده می‌توانند نقش مهمی در حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌ها ایفا کنند. همچنین، افزایش بیان آنزیم‌های مرتبط با سنتز اسمولیت‌ها مانند پرولین می‌تواند به حفظ تعادل اسمزی و کاهش اثرات منفی تنش آبی کمک کند. در مجموع، این مکانیسم‌ها به گندم رقم باران امکان می‌دهند تا در شرایط کمبود آب، عملکرد بهتری داشته باشد و از کاهش شدید محصول جلوگیری کند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

الکتروفورز دو بعدی تعداد ۱۵ لکه دارای تغییر بیان معنی‌دار در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد بودند. پروتئین‌های دخیل در تحمل به تنش خشکی رقم باران در فرآیندهای بیولوژیکی تنفس نوری و متابولیسم، سنتز نشاسته، پروتئین‌های درگیر در ساختار سلولی، پاسخ و دفاع در برابر تنش و پروتئین متفرقه درگیر می‌باشند. پروتئین‌های پراکسیداز، آدنوزیل متیونین سنتتاز-۳، پروتئین شبه جرمین، فسفوگلیسرات-موتاز، تریوز فسفات-ایزومراز، آدنوزین دی فسفات گلوکز، گلوکاتیون-ترنسفراز-۵، مونومریک-آلفا آمیلاز، ۳-فسفو گلیسرات کیناز سیتوسولی، گلیسرالدهید-۳ فسفات دهیدروژناز، سرین هیدروکسی‌متیل ترنسفراز-۴، پروتئین‌های LEA، بتا-هیدروکسی‌بوتیریل-هیدرولاز ۱ و ۲-سیس پروکسی ردوکسین در شرایط تنش کمبود آب افزایش بیان نشان دادند که نشان‌گر اهمیت این دسته از پروتئین‌ها در کاهش اثرهای مخرب حاصل از تنش کمبود آب می‌باشد. بطور کلی با توجه به گروه‌های عملکردی پروتئین‌هایی که

References

- Ahmed, M., Fayyaz, H., Ghulam, Q., Farid, A.S., & Muhammad, A.A. (2017). Response of proline accumulation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed conditions. *Journal of Agricultural Meteorology*, D-14-00047.
- Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., & Bruggemann, W. (2013). Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta*, 237, 771-81.
- Balan, D., Tokas, J., & Singal, H.R. (2018). UDP-glucose pyrophosphorylase, Isolation, purification and characterization from developing thermotolerant wheat (*Triticum aestivum*) grains. *Protein Expression and Purification*, 148, 68-77. doi: 10.1016/j.pep.2018.04.007.
- Banaei-Asl, F., Bandehagh, A., Dorani, E., Farajzadeh, D., Sakata, K., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *Journal of Proteomics*, 124, 88-111.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-07.
- Bazargani, M.M., Sarhadi, E., Bushehri, A.A., Matros, A., Mock, H.P., Naghavi, M.R., Hajihoseini, V. et al. (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, 74(10), 1959-73.
- Boehlein, S. K., Sewell, A.K. Cross, J., Stewart, J. D., & Hannah, L. C. (2005). Purification and characterization of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase from maize/potato mosaics. *Plant Physiology*, 138(3), 1552-62. doi: 10.1104/pp.105.060699.
- Bogeat-Triboulot, M. B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjärvi, J., & Dreyer E. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, 143(2), 876-92. doi: 10.1104/pp.106.088708.
- Bonhomme, L., Valot, B., Tardieu, F., & Zivy, M. (2012). Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(10), 957-72. doi: 10.1074/mcp.M111.015867.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà. A. (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177, 570-76.
- Chitteti, B. R., & Peng, Z. (2007). Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *Journal of Proteome Research*, 6, 1718-27. doi: 10.1021/pr060678z.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3, 1-10. doi: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004.
- Dombrowski, J.E. (2003). Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 132(4), 2098-107. doi: 10.1104/pp.102.019927.
- Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Plant Growth Regulation*, 16, 95-107. doi.org/10.1007/PL00006984.
- Eklund, H., Gleason, F. K., & Holmgren A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*, 11(1), 13-28. doi: 10.1002/prot.340110103.
- Ford, K.L., Cassin, A., & Bacic, A.F. 2011. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2, 44.
- Ge, P., Ma, C., Wang, S., Gao, L., Li, X., Guo, G., Ma, W. *et al.* 2012. Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(3), 1297-1313.
- Gibbs, B. F., & Alli, I. (1998). Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, 31(3), 217-25.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J. P., Brewin, N.J., & Bornemann, S. (2007). A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1161-71. doi: 10.1093/jxb/erl282.
- Guo, L., Ma, F., Wei, F., Fanella, B., Allen, D. K., & Wang, X. (2014). Cytosolic phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases affect *Arabidopsis* cellular metabolism and promote seed oil accumulation. *The Plant Cell*, 26(7), 3023-35. doi: 10.1105/tpc.114.126946.
- Hajheidari, M. Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I., & Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research*, 6(4), 1451-60. doi: 10.1021/pr060570j.
- Hao, P., Zhu, J., Gu, A., Lv, D., Ge, P., Chen, G., Li, X. *et al.* (2015). An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. *Proteomics*, 15(9), 1544-1563.
- Hashimoto, M., & Komatsu, S. (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*, 7, 1293-302.
- Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 9627-32.
- Horikawa, S., Sasuga, J., Shimizu, K., Ozasa, H., & Tsukada, K. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the rat kidney S-adenosylmethionine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 13683-86.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., & Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3591-607. doi: 10.1093/jxb/erm207.
- Kamal, A. H. M., Kim, K. H., Kwang-Hyun, S., Choi, J. S., Baik, B. K., Tsujimoto, H., Heo, H. Y., Park, C. S., & Woo, S. H. (2010). Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 196-208.
- Kamal, A.H.M., Cho, K., Choi, J.-S., Bae, K.-H., Komatsu, S., Uozumi, N., & Woo, S.H. 2013. The wheat chloroplastic proteome. *Journal of Proteomics*, 93, 326-342.
- Kang, G., Li, G., Zheng, B., Han, Q., Wang, C., Zhu, Y., & Guo T. (2012). Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins, and Proteomics*, 1824, 1324-33. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.07.012.
- Kishor, P., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, M., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants, its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88, 424-38.
- Kosova, K., Vitamvas, P., Prasil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74, 1301-22. doi: 10.1016/j.jprot.2011.02.006.
- Liu, C.W., Chang, T. S., Hsu, Y.K., Wang, A.Z., Yen, H.C., Wu, Y.P., Wang, C.S., & Lai C.C. (2014). Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice. *Proteomics*, 14, 1759-75. doi: 10.1002/pmic.201300276.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., & Ljungdahl, L. G. (1990). Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry*, 29(24), 5687-94.

- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A. (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins, common and specific features point to a variety of functions. *Planta*, 211(3), 345-54.
- Mertens, J., Aliyu, H., & Cowan. D. A. (2018). LEA proteins and the evolution of the WHY domain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84, e00539-18. doi: 10.1128/AEM.00539-18.
- Michaletti, A., Naghavi, M.R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific reports*, 8(1), 5710.
- Moons, A., Bauw, G., Prinsen, E., Van Montagu, M and Van Der Straeten, D. (1995). Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiology*, 107, 177-86.
- Mukherjee, K., Choudhury, A. R., Gupta, B., Gupta, S., & Sengupta, D. N. (2006). An ABRE-binding factor, OSBZ8, is highly expressed in salt tolerant cultivars than in salt sensitive cultivars of indica rice. *BMC Plant Biology*, 6, 18. doi: 10.1186/1471-2229-6-18.
- Rocco, M., Tartaglia, M., Izzo, F. P., Varricchio, E., Arena, S., Scaloni, A., & Marra, M. (2019). Comparative proteomic analysis of durum wheat shoots from modern and ancient cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 253-62.
- Salin, M. L. (1991). Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Radical Research Communications*, 13, 851-58. doi: 10.3109/10715769109145867.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrügger, W., Dröge, W., & Osthoff, K. S. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 91, 1672-76.
- Sengupta, D., Kannan, M., & Reddy, A. R. (2011). A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta*, 233, 1111-27. doi: 10.1007/s00425-011-1365-4.
- Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2013). Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. *Journal of Proteome Research*, 12, 4951-64. doi: 10.1021/pr400479k.
- Sugimoto, M., & Takeda, K. (2009). Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 2762-65. doi: 10.1271/bbb.90456.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, M., & Job, D. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal*, 60, 795-804. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04000.x.
- Toorchi, M., Dolati, M., & Adalat-zadeh-Aghdam, S. (2014). Differentially expressed proteins in canola leaf induced by salt stress-a proteomic approach. *International Journal of Biosciences*, 5, 433-42.
- Van Dam, N. M., Horn, M., Mareš, M., & Baldwin, I. T. (2001). Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 547-68.
- Wang, M. C., Peng, Z.Y., Li, C.L., Li, F., Liu, C., & Xia, G.M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/Thinopyrum ponticum. *Proteomics*, 8, 1470-89. doi: 10.1002/pmic.200700569.
- Xiong, J., Sun, Y., Yang, Q., Tian, H., Zhang, H., Liu, Y., & Chen, M. (2017). Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Science*, 15, 19. doi: 10.1186/s12953-017-0127-z.
- Yan, S. P., Zhang, Q.Y., Tang, Z. C., Su, W. A., & Sun, W. N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 484-96. doi: 10.1074/mcp.M500251-MCP200.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38, 171-86.
- Zadražnik, T., Hollung, K., Egge-Jacobsen, W., Meglič, V., & Šuštar-Vozlič, J. (2013). Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, 78, 254-72. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.021.
- Zang, X., & Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68, 426-37.
- Zolman, B.K., Monroe-Augustus, M., Thompson, B., Hawes, J. W., Krukenberg, K. A., Matsuda, S. P., & Bartel, B. (2001). chy1, an *Arabidopsis* mutant with impaired β -oxidation, is defective in a peroxisomal β -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31037-46. doi: 10.1074/jbc.M104679200.