

Proteome analysis of soybean root facing pod distortion syndrome

Maryam Alyari¹, Mahmoud Toorchi² , Mahdiye Parsaeiyan¹, Naser Farokhi³, Setsuko Komatsu⁴

1. M. Sc. and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahrud University of Technology, Shahrud, Iran.

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

3. Associate Professor, Department of Plant Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

4. Professor, Institute of Crop Science, NARO (NICS), Tsukuba, Japan.

Correspondence:

Mahmoud Toorchi

Email: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Received: 20, Nov. 2024

Accepted: 28, Feb. 2025

How to cite:

Alyari, M., Toorchi, M., Parsaeiyan, M., Farokhi, N., & Komatsu, N. (2025). Proteome analysis of soybean root facing pod distortion syndrome. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 1 -12. (DOI:[10.30473/cb.2025.72842.1990](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72842.1990))

ABSTRACT

Pod distortion syndrome (PDS) is a particular type of growth in which soybean plants remain green long after pod maturation. Green stems even sometimes leaves and green petiole impose different problems at harvesting and lead to yield reduction. Protein expression profile of PDS soybean cultivar Katul compared with non-PDS soybean to investigate the molecular mechanisms of this syndrome. Therefore, soybean leaf samples were collected at R6 vegetative stage from the field through survey sampling and protein extracted by phosphate buffer method. A total of 124 reproducible protein spots were distinguished by 2-dimensional electrophoresis through isoelectric focusing in the first and sds-PAGE in the second dimensions. Thirty-four spots indicated by induction factor in which 11 protein spots indicated significant expression changes, statistically. Proteins interfering in PDS were classified into metabolism and energy production, protein destination and storage, signal transduction, ROS scavenging and detoxification categories. Glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, methionine synthetase, stem 31 kDa glycoprotein, 14-3-3-like protein, germin like proteins, thioredoxin and one protein with unknown function were identified through mass spectrometry in which all the proteins were shown decrease in expression change. The finding suggests that the key regulators of PDS in soybean plants are 14-3-3 and germin like protein.

KEYWORDS

Proteomics, soybean pod distortion, two-dimensional electrophoresis.



«مقاله پژوهشی»

تجزیه پروتئوم بافت ریشه سویای مبتلا به سندروم غلاف‌بندی

مریم علیاری^۱، محمود تورچی^۲ , مهدیه پارساییان^۱، ناصر فرخی^۳، ستسوکو کوماتسو^۴

چکیده

عارضه ناهنجاری یا سندروم غلاف‌بندی سویا نوع ویژه‌ای از رشد است که گیاهان مدت‌ها پس از رسیدگی غلاف‌ها، همچنان سبز باقی می‌مانند. ساقه‌های سبز و حتی برخی اوقات برگ‌ها و دمبرگ‌های سبز می‌تواند مشکلات متعددی در زمان برداشت ایجاد کنند و منجر به کاهش عملکرد شوند. به منظور بررسی سازوکار مولکولی سندروم غلاف‌بندی سویا در رقم کتول، مقایسه پروفایل بیان پروتئین‌های گیاهان سالم و مبتلا انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌های برگ سویا در مرحله رویشی R6 به روش پیمایشی از مزارع برداشت و پروتئین بافت ریشه آنها به روش بافر فسفات استخراج شدند. الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به روش متمرکزسازی بر اساس نقطه ایزوالتریک و در بعد دوم به روش SDS-PAGE منجر به مشاهده ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرار پذیر شد. فاکتور القا منجر به تشخیص تعداد ۳۴ لکه پروتئینی با تغییرات بیان قابل ملاحظه گردید و با انجام آزمون t، تعداد ۱۱ لکه پروتئینی از نظر آماری تغییر بیان معنی دار داشتند. پروتئین‌های دخیل در ناهنجاری غلاف بندی از نظر کارکرد بیولوژیکی متعلق به گروه پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی، تقسیم و ذخیره‌سازی پروتئین، انتقال سیگنال، مهار گونه های فعال اکسیژن و سم زدایی بودند. در پاسخ به سندروم غلاف بندی، پروتئین های گلو تامات دهیدروژناز، مالات دهیدروژناز، متیونین سنتاز، گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای، 14-3-3-like protein، پروتئین شبه جرمین، تیوردوکسین و یک پروتئین ناشناخته به روش طیف سنجی جرمی شناسایی و همه آنها کاهش تغییرات بیان نشان دادند. نتایج نشان می‌دهد که کاهش بیان پروتئین‌های 14-3-3-like protein و پروتئین شبه جرمین که از تنظیم کننده های کلیدی به شمار می روند در ریشه گیاهان مبتلا نقش اساسی را در تظاهر سندروم غلاف‌بندی سویا دارند.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دو بعدی، پروتئومیکس، سندروم غلاف‌بندی.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
۲. استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. استاد، انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی، سوکوبا، ژاپن.

نویسنده مسئول:

محمود تورچی

رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۰

استناد به این مقاله:

علیاری، مریم؛ تورچی، محمود؛ پارساییان، مهدیه؛ فرخی، ناصر و کوماتسو، ستسوکو (۱۴۰۴). تجزیه پروتئوم بافت ریشه سویای مبتلا به سندروم غلاف‌بندی، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۳)، ۱-۱۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72842.1990](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72842.1990))

مقدمه

جمعیت جهان تا سال ۲۰۲۵ میلادی به حدود هشت میلیارد نفر و در سال ۲۰۵۰ از مرز نه میلیارد نفر خواهد گذشت که بخش عمده‌ای از این افزایش جمعیت در کشورهای فقیر و در حال توسعه اتفاق می‌افتد. پیش‌بینی می‌شود سطوح قابل کشت برای محصولات کشاورزی دنیا از متوسط ۰/۴۵ هکتار در سال ۱۹۶۰ به مساحت ۰/۱۸ هکتار برای هر نفر در سال ۲۰۵۰ کاهش پیدا کند (Alexandratos and Brainsma, 2012). در ایران، مصرف روغن‌های گیاهی با توجه به افزایش جمعیت و نیز تغییر الگوی غذایی مردم در حال افزایش است. همچنین، به دلیل پرهزینه بودن تولید پروتئین‌های حیوانی انتظار می‌رود کمبودها از طریق استفاده از پروتئین‌های گیاهی تامین شود و با توجه به جایگاه ارزشمند سویا، اهمیت تحقیقات روی عوامل موثر بر افزایش تولید سویا در سطح کشور را نشان می‌دهد (احمدی، ۱۳۷۸).

سویا (*Glycine max* L.) گیاهی دولپه، یک ساله از خانواده پروانه آسانان جزو دانه‌های روغنی می‌باشد. جایگاه ارزشمند این محصول به دلیل روغن زیاد و پروتئین فراوان دانه آن است که به ترتیب ۲۰ و ۴۰ درصد از وزن دانه را شامل می‌گردد. عوامل متعدد از جمله سندروم غلاف بندی^۱ منجر به کاهش عملکرد سویا می‌گردند. این سندروم با ظهور حالات مختلفی از جمله رشد علفی، کوتولگی، ریزش شدید گل‌ها و غلاف‌ها، تشکیل و تجمع گل‌ها و غلاف‌های غیر طبیعی، کوتاه شدن فاصله میانگره‌ها، عدم تشکیل دانه در غلاف و نظایر آن همراه است (Messina, 2010). فرضیه‌های متفاوتی از جمله فرضیه‌های آگرونومیکی (Leonard et al., 2011)؛ اقلیمی (Richard et al., 2004)؛ زیستی مانند آفات و بیماری‌ها (Giesler et al., 2002)؛ فیزیولوژیکی (Morrison and Bartlet, 2009; Holshouser, 2009) و ژنتیکی (Leonard et al., 2011) در رابطه با تظاهر این سندرم پیشنهاد شده است. به هر حال، سندروم سویای سبز در واکنش گیاه نسبت به عوامل مختلف و

تغییرات بیان پروتئین‌های متفاوت در گیاه تظاهر می‌یابد. بنابراین، تحلیل پروتئومیکس از راهکارهای تعیین علل موثر در پیدایش این سندروم می‌تواند باشد. پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات بیان پروتئین‌های مختلف در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و تعریف فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی است (Xing et al., 2002). در این راستا، هدف از انجام این پژوهش تحلیل تغییرات مولکولی در سطح بیان پروتئین‌ها در بافت ریشه‌ی سویای دارای ناهنجاری غلاف بندی می‌باشد تا به امکان سنجی تعیین پروتئین‌های کاندیدی دخیل در شکل‌گیری این عارضه پرداخته شود. با شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده و دارای تغییرات بیان در نتیجه این عارضه، نقش مولکولی این پروتئین‌ها در پاسخ با این عارضه ژنتیکی مورد بحث قرار می‌گیرد.

مروری بر پژوهش‌ها

در ایران در سال ۱۳۶۶ پروژه جامعی به مدت سه سال زراعی (۱۳۶۶ تا ۱۳۶۸) به منظور بررسی علل ایجاد این سندروم اجرا شد. بر اساس نتایج، تیمارهای به کار رفته در پروژه نتوانست شرایط مشابه سندروم را در بوته‌های سویا به وجود آورد و فقط در نتایج مربوط به بخش بیماری‌ها، از بوته‌های آلوده سه ویروس استخراج گردید که احتمال می‌رفت عامل آلودگی بوته‌های سویا به این سندروم باشند (چراغعلی، ۱۳۶۷). تحقیقات در سایر کشورها نشان داده است که گیاهان مبتلا به این عارضه به بیماری مرموزی با دلایل ناشناخته مبتلا شده‌اند (Morrison and Bartlet, 2009).

مطالعات نشان داده است که وارپته‌های مختلف سویا در تظاهر سندروم سویای سبز از همدیگر متفاوت هستند و از دلایل تظاهر این عارضه منشأ ژنتیکی است (Jadhav et al., 2013; Leonard et al., 2011). اصلاح ژنتیکی سویا و تولید سویای مقاوم به این عارضه یکی از محورهای اصلی تحقیقات به‌نژادی و مهندسی ژنتیک این گیاه می‌باشد. دلایل ایجاد این سندروم به طور دقیق مشخص نشده است و محققان می‌بایستی دلایل این ناهنجاری را مورد توجه و بررسی قرار دهند (Jadhav et al., 2013).

بعدی، الکتروفورز شدند. آنها گزارش کردند که ریشه حساس‌ترین اندام در پاسخ به تنش خشکی است به طوری که در تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو به ترتیب ۳۲، ۱۳ و ۱۲ نوع پروتئین به طور متمایزی بیان شدند. در این آزمایش سنتز پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم گیاه افزایش یافت و پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی و نیز پروتئین‌های سنتزی کاهش یافت. آلم و همکاران (Alam et al., 2010) تغییرات پروتئوم ریشه سویا که تحت تنش خشکی کوتاه مدت قرار داشت را با استفاده از رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تعداد ۴۵ پروتئین به طور معنی‌داری تغییر بیان داشتند. از بین این پروتئین‌ها مشخصات ۲۸ پروتئین با استفاده از طیف سنجی جرمی تعیین گردید به طوری که از بین این ۲۸ پروتئین، بیان ۵ لکه پروتئینی افزایش و بیان ۲۱ لکه پروتئینی کاهش و ۲ لکه پروتئینی نیز به عنوان لکه پروتئینی جدید شناخته شدند. کوماتسو و همکاران (Komatsu et al., 2013) اثر آبسازیک اسید در سویای تحت تنش غرقابی را با رهیافت پروتئومیک مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. هنگامی که گیاهان سویای دو روزه غرقاب شدند، محتوی آبسازیک اسید در ریشه گیاهان شاهد کاهش یافت. هنگامی که آبسازیک اسید در مدت تیمار غرقاب به گیاه اضافه شد نسبت بقاء در مقایسه با سویاهای غرقاب شده بدون تیمار آبسازیک اسید بهبود یافت. نتایج نشان داد که فراوانی ۳۴ پروتئین هسته‌ای از قبیل هیستون داستیلاز و ریبونوکلوپروتئین هسته‌ای کوچک U2 در تیمار غرقابی همراه با کاربرد آبسازیک اسید افزایش یافت. همچنین فراوانی ۳۵ پروتئین هسته‌ای از جمله ایمپورترین آلفا، فاکتور تغییر حالت کروماتین، پروتئین‌های انگشت روی، ترانسداکتین و ۵ پروتئین تقسیم سلولی کاهش یافت.

صلواتی و همکاران (Salavati et al., 2012) تغییرات پروتئومیک در ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از تنش غرقابی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. تجزیه مقایسه‌ای ژل‌های الکتروفورز دو بعدی تیمار شاهد و ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از سه روز غرقابی،

Maurício et al., 2017; Ghayeb Zamharir et al., 2022). آنچه که مسلم است سندروم سویای سبز، از واکنش گیاه نسبت به عوامل ژنتیکی و محیطی ناشی می‌گردد و به نظر می‌رسد که صرف‌نظر از دلایل مختلف، پروتئین‌های مختلف در گیاه تغییر می‌یابند. بنابراین، بررسی تجزیه و تحلیل پروتئوم گیاه با ابزارهای پروتئومیک یکی از راهکارهای تشخیص پروتئین‌های درگیر در این سندروم در سطح مولکولی می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تا کنون در زمینه سندروم سویای سبز مطالعات مچندانی از طریق تکنولوژی پروتئومیک صورت نگرفته است. این رهیافت با شناسایی پروتئین‌های درگیر در تظاهر سندروم سویای سبز کمک می‌کند تا ساز و کار تحمل به سندروم سویای سبز در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرد و درک بهتری از پاسخ گیاه به این سندروم حاصل شود. در پاسخ به تنش‌های مختلف، بیان برخی ژن‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد. تغییر بیان ژن‌ها در گیاهان به وسیله تنش‌های مختلف، باعث تغییر پروتئین‌های خاص ساختاری، آنزیمی و یا میزان فعالیت آنها در مسیرهای متابولیکی خاص می‌گردد (Seki et al., 2003).

تورچی و همکاران (Toorchi et al., 2009) مکانیسم پاسخ سویا به تنش اسمزی در تیمار با پلی اتیلن گلیکول را مورد بررسی قرار دادند. تجزیه لکه‌های پروتئینی ریشه با الکتروفورز دو بعدی نشان داد، ۳۷ پروتئین از ۴۱۵ پروتئین شناسایی شده که با روش توالی یابی ادمن و انگشت نگاری توده‌ای پپتیدی تغییر می‌یابند، متعلق به گروه پروتئین‌های مرتبط با بیماری/دفاع بودند. بر اساس نتایج آنها در شرایط تنش اسمزی در مراحل اولیه رشد میزان کافنوتیل-کوا-او-متیل ترانسفراز که در چوبی شدن نقش دارد به عنوان یک پاسخ سازگاری کاهش ولی میزان زیر واحد A از آلفا پروتئازوم ۲۰ اس که در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی نقش دارد، افزایش می‌یابد. محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2012) گیاهچه‌های سه روزه سویا را تحت تیمار تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول ۱۰ درصد و ترکیبی از آن دو قرار دادند. پس از اعمال تیمار، پروتئین‌های بافت برگ، هیپوکوتیل و ریشه استخراج شد و سپس در ژل‌های دو

بصورت تصادفی نمونه‌گیری گردید. در انتخاب نمونه‌ها سعی شد که نمونه‌های موردنظر تا حد امکان از فاصله دور از یکدیگر قرار نگرفته باشند. همچنین نمونه‌های متعددی از مزارع انتخاب شدند که برای انجام الکتروفورز دو بعدی نمونه تصادفی کافی جهت تکرار دار بودن آزمایش وجود داشته باشد. نمونه‌های ریشه در فلاسک حاوی ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان استخراج پروتئین نگهداری شدند.

استخراج و تعیین غلظت پروتئین

برای استخراج پروتئین از بافت ریشه از روش بافر فسفات استفاده شد (Komatsu et al., 2007). به این ترتیب که یک گرم از بافت ریشه همراه با دو میلی‌لیتر بافر فسفات خنک در هاون خرد گردید و پس از انتقال نمونه به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روشناور به تیوب جدید منتقل و دوباره عمل سانتریفوژ با همان تنظیمات قبلی تکرار و روشناور به تیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید خالص اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد. پس از آن ورتکس انجام و با تنظیمات قبلی سانتریفوژ انجام شد. این بار روشناور دور ریخته شده و رسوب حاصله با ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتانول خنک شست‌شو داده و سپس به مدت ۲ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب پروتئینی در هاون چینی خشک و ۰/۱۲ گرم از نمونه با ۲۳۰ میکرولیتر بافر لیز محلول گردید. بافر لیز شامل ۷ مولار اوره، ۲٪ CHAPS و ۶۰ میلی مولار DDT و ۱٪ آمفولیت با ۱۰-۳ pH بود. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد.

الکتروفورز دو بعدی

برای تهیه ژل بعد اول از اوره، پلی آکریلامید ۳۰ درصد، APS، آمفولین‌های با pH های ۳-۱۰ و ۵-۸ و NP-40 با مقادیر مشخص استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله با ولتاژهای ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت

تعداد ۷۰ لکه پروتئینی با بیان متفاوت را از کل ۸۰ پروتئین شناسایی شده نشان داد. تعدادی از این پروتئین‌های بازبایی شده در فرآیندهای متابولیکی و ذخیره/تقسیم پروتئین‌ها درگیر هستند. تجزیه کلاستر مبتنی بر پروفایل ۷۰ پروتئین با بیان متمایز نشان داد که سه روز غرقاب و حتی در مدت سه روز پس از غرقابی تغییرات معنی داری در بیان پروتئین‌ها دارد. از طرفی، سه روز غرقاب گیاهچه‌های دو روزه سویا منجر به تنظیم پایین دست پروتئین‌های مرتبط با انتقال یون و تنظیم بالادست پروتئین‌های درگیر در سازماندهی مجدد اسکلت سلولی، توسعه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردد. علاوه بر این، تعداد ۷ لکه پروتئینی درگیر در تغییر دیواره سلولی و سنتز S-آدنوزین متیونین در ریشه گیاهچه‌های سویای بازبایی شده پس از مدت یک روز غرقاب ردیابی شد.

نانجو و همکاران (Nanjo et al., 2013) با استفاده از روش پروتئومیک، پروتئین‌های مرتبط با تحمل به تنش غرقابی در گیاهچه‌های سویا را مطالعه کردند. برای این منظور، گیاهچه‌های سویا طی سه روز تحت تیمار غرقابی قرار گرفتند و سپس از گیاهان نمونه برداری و استخراج پروتئین انجام شد. در این مطالعه پروتئین‌ها به گروه‌های درگیر در تغییر دیواره سلولی مانند پروتئین‌های شبه بازدارنده پلی گالاکتوروناز و پروتئین شبه B1 بسط دیواره سلولی طبقه بندی شدند که احتمالاً در سیستم دفاعی گیاه درگیر باشند. همچنین تغییرات پروتئینی در ریشه‌ها نیز مشاهده شد که از جمله آن پروتئین‌های شبه زیر واحد 2A پروتئین فسفاتاز بودند که احتمالاً در مرگ سلول‌های نوک ریشه درگیر هستند. از طرفی تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها نشان داد که فراوانی پروتئین‌های درگیر در سنتز دیواره سلولی از جمله سینامیل الکل دهیدروناز در طی سه روز بعد از غرقاب کاهش یافته است.

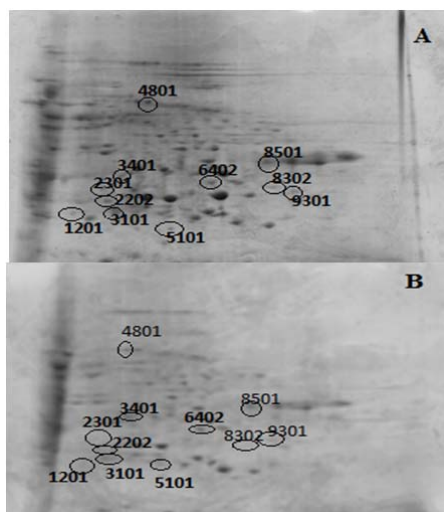
مواد و روش‌ها

نمونه برداری

برای نمونه‌گیری مزارع تحت کشت سویا در استان گلستان مورد بازدید قرار گرفت و از ریشه گیاهان سالم و بوته‌های مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویای سبز رقم کتول

نتایج و بحث

الکتروفورز دوبعدی با ژل‌های لوله‌ای در بعد اول و رنگ آمیزی به روش آبی کوماسی منجر به ظهور ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که از ۱۲۴ این لکه تکرارپذیر، ۳۴ لکه بر اساس شاخص IF دارای تغییرات بیان قابل ملاحظه‌ای می‌باشد که با انجام آزمون t، ۱۱ لکه پروتئینی از نظر آماری معنی دار گردید. تمامی لکه‌های پروتئینی معنی دار، کاهش بیان نشان دادند که این کاهش تغییرات بیان در شکل ۱ و اطلاعات لکه‌های پروتئینی مورد شناسایی در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. موقعیت نسبی و برچسب لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار شناسایی شده با استفاده از 2-DE از ریشه سویا در شرایط A: بیمار و B: شاهد

Figure 1. The relative positions and tags of proteins spots with significant expression changes identified using two-dimensional electrophoresis from soybean root under A: infected and B: control

از بین ۱۱ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار، لکه‌های شماره ۴۸۰۱، ۳۴۰۱ و ۸۵۰۱ در متابولیسم و تولید انرژی، لکه‌های شماره ۹۳۰۱ و ۶۴۰۲ در تقسیم و ذخیره سازی پروتئینی، لکه شماره ۲۳۰۱ در انتقال سیگنال، لکه‌های شماره ۵۱۰۱، ۳۱۰۱، ۲۲۰۳ و ۱۲۰۱ جزء پروتئین‌های مهارکننده ROS و سم زدایی طبقه بندی شده و بالاخره لکه شماره ۸۳۰۲ جزء پروتئین‌های ناشناخته محسوب می‌شود.

اجرا گردید. الکتروفورز بعد دوم به روش SDS-PAGE با استفاده از یک ژل دوقسمتی شامل ژل جداکننده (۱۵٪) و ژل تعیین مسیر (۵٪) انجام شد. قبل از اجرای بعد دوم الکتروفورز، ژل‌های بعد اول طی دو مرحله و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در بافر SDS متعادل سازی شدند و سپس روی ژل آکریل آمید بعد دوم قرار گرفتند. به ازای هر ژل، ۲۰۰ میکرولیتر نشانگر آبی بروموفنول به بافر رانش افزوده شد. سپس عملیات رانش با جریان ثابت ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل و مدت زمان حدود ۳ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید. پس از اتمام الکتروفورز رنگ آمیزی ژل‌ها توسط محلول رنگ‌آمیزی آبی کوماسی انجام شد. رنگ بری طی دو مرحله در مرحله اول در طول شب و در مرحله دوم به مدت حداکثر نیم ساعت انجام گردید تا لکه‌های پروتئینی آشکار شده و برای تصویربرداری آماده شوند.

شناسایی پروتئین‌ها

تصویربرداری از ژل‌ها توسط دانسیومتر GS800 ساخت شرکت بیوراد و با انتخاب نوع ژل و روش رنگ‌آمیزی آبی کوماسی و نرم‌افزار Quantity one انجام شد. توسط نرم‌افزار PDQuest کلیه تصاویر ژل‌ها به همراه تکرارهای آنها فراخوانده شدند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب زده شد. پس از پایان لکه‌یابی درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون t برای درصد حجمی هر لکه پروتئینی بین تیمارها انجام شد. بدین ترتیب که لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار مشخص شدند و روند افزایشی و کاهش‌ی بیان آنها در اثر سندرم غلاف‌بندی بر اساس فاکتور القاء (IF^۱) 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 (Hajheidari et al., 2005). شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش انگشتنگاری جرم پپتیدی MALDI-TOF در انستیتو تحقیقات علوم گیاهان زراعی ژاپن صورت گرفت.

جدول ۱. مشخصات لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در پاسخ به سندرم غلاف‌بندی سویا در تطبیق با پروتئین‌های

پایگاه داده‌ای NCBI

Table 1. The characteristics of proteins spots with significant expression changes in response to pod distortion syndrome matching with NCBI protein databank

شماره لکه	pI - جرم مولکولی (آزمایشی)	pI - جرم مولکولی (تئوری)	شماره دسترسی	پروتئین همولوگ
۸۵۰۱	43.93 - 6.91	44.5 - 6.47	Q5F2M9	glutamate dehydrogenase
۸۳۰۲	30.74 - 6.96	36.1 - 6.8	I1MQN7	uncharacterized protein
۶۴۰۲	32.53 - 6.48	29.3 - 6.7	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۹۳۰۱	29.35 - 7.11	29.3 - 6.7	p10743	steam 31 KDa glycoprotein
۳۱۰۱	21.01 - 5.75	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein
۱۲۰۱	22.69 - 5.42	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein
۳۴۰۱	35.28 - 5.79	35.5 - 6.4	O48905	malate dehydrogenase
۲۳۰۱	30.21 - 5.65	29.1 - 4.75	A0A0B2QJ68	14- 3- 3- Like protein
۴۸۰۱	84.92 - 6	84.4 - 5.9	AAQ08403	methionine synthase
۵۱۰۱	18.72 - 6.17	17.4 - 6.1	AF442385	thioredoxin
۲۲۰۱	26.27 - 5.68	22 - 6.01	BAA74702	germing- Like protein

اسیدهای آمینه نقش دارد و برای رشد و سلامتی گیاه ضروری است (Zhang *et al.* 2011). پاتوژن‌ها معمولاً فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهند که مهمترین آنها فرآیند متابولیسم می‌باشد (Zhang *et al.*, 2011). بنابراین کاهش پروتئین متیونین سنتتاز در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف بندی نشان‌دهنده ایجاد اختلال در متابولیسم این گیاهان می‌باشد. در گیاه گندم کاهش این پروتئین در پاسخ به تنش غرقابی گزارش شده است (Huang *et al.*, 2006). میزان بیان لکه شماره ۳۴۰۱ که به عنوان آنزیم مالات دهیدروژناز شناسایی شد در گیاهان دارای سندرم غلاف بندی سویا کاهش یافت. این آنزیم یکی از آنزیم‌های چرخه کربس می‌باشد و مالات یکی از فراورده‌های گلیکولیز است. در گلیکولیز، آگزوالوستات توسط مالات دهیدروژناز به مالات احیا می‌شود که در این فرآیند از NADH به عنوان منبع الکترون استفاده می‌شود و به NAD^+ تبدیل می‌گردد. مالات حاصل می‌تواند در واکوئل ذخیره شود و یا وارد چرخه کربس در میتوکندری شود و به وسیله مالات دهیدروژناز به آگزوالوستات شود (Wang *et al.*, 2012). که در این واکنش NADH تولید می‌گردد که برای احیای نیترات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scheibe, 2004). کاهش بیان مالات دهیدروژناز حاکی

از پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی، لکه شماره ۸۵۰۱ مربوط به آنزیم گلوتمات دهیدروژناز می‌باشد. این آنزیم واکنش تبدیل ۲ اکسوجلوتارات و ال- گلوتمات را کاتالیز می‌کند و به عنوان گیرنده و دهنده نیتروژن ایفای نقش می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در فرآیندهای سیگنال‌دهی داشته و عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی در متابولیسم کربن و نیتروژن دارد (Fontaine *et al.*, 2012). این آنزیم تقریباً در تمام موجودات زنده وجود دارد (Dubois *et al.*, 2003) زیرا در سنتز اوره و متابولیسم واسطه‌ای اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها ایفای نقش می‌کند (Liu *et al.*, 2008; Forde and Lea, 2007). کاهش بیان این آنزیم منجر به کاهش ترکیبات اسمزی در گیاه می‌گردد و از این طریق منجر به حس تنش می‌گردد (Xu and Zhou, 2006). نقش فیزیولوژیکی اصلی این آنزیم در تامین ۲- اکسوجلوتارات برای چرخه کربس است. بنابراین، کاهش بیان این آنزیم در گیاهان مبتلا به سندرم غلاف‌بندی سویا منجر به کاهش محصول ۲- اکسوجلوتارات برای چرخه کربس و کاهش انرژی خواهد شد (Robinson *et al.* 1992). لکه پروتئینی شماره ۴۸۰۱ که بیان آن در گیاهان مبتلا به سندرم غلاف بندی سویا به طور معنی‌دار کاهش یافت مربوط به متیونین سنتتاز است که در سوخت و ساز

از کاهش تبدیل ملات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- اگسوجلوتارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- اگسوجلوتارات و ملات میزان جریان چرخه کربس را محدود خواهد کرد و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربس کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم سویای کتول است بطوری که در این واکنش NADH تولید می‌گردد و برای احیای نیترات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scheibe, 2004). کاهش بیان ملات دهیدروناز حاکی از کاهش تبدیل ملات به اگزالواستات و بالعکس است. بنابراین، مقادیر ۲- اگسوجلوتارات در گیاه مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا کاهش خواهد یافت. مقادیر پایین ۲- اگسوجلوتارات و ملات میزان جریان چرخه کربس را محدود می‌کند و در نتیجه، به دلیل عدم دسترسی کافی به اگزالواستات، جریان چرخه کربس کاهش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده عملکرد غیر طبیعی این چرخه در رقم کتول سویا است. ین و همکاران (Yin et al., 2009) تاثیر دامنه‌های حرارتی مختلف (۴، ۱۰ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد) را بر رشد سویا را با رهیافت پروتئومیک مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تحت تاثیر تیمار سرمایی پروتئین‌های درگیر در متابولیسم‌های میتوکندریایی از جمله ملات دهیدروناز کاهش بیان داشتند.

پروتئین‌های دخیل در تقسیم و ذخیره سازی پروتئینی لکه‌های شماره ۹۳۰۱ و ۶۴۰۲ می‌باشند که مربوط به گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای می‌باشد. پروتئین‌های ذخیره‌ای رویشی یا گلیکوپروتئین‌ها که گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای یکی از این پروتئین‌ها است، اولین بار به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای برگی در گیاهان سویای غلاف‌زدایی شده مشاهده شد و دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می‌باشد (Mason et al., 1988). بر اساس الگوی تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای، مکان تجمع این پروتئین‌ها واکوئل سلول‌های غلاف آوندی بوده و تجمع آن‌ها در پاسخ به حذف اندام‌های زایشی ناشی از بلوکه شدن انتقال آن‌ها از طریق آوندهای

برگ می‌باشد. یافته‌ها نشان می‌دهد (Sözen, 2004) که این پروتئین‌ها نه تنها به عنوان مخزن ذخیره‌سازی موقت کربن و نیتروژن ایفای نقش می‌کنند بلکه نقش مهمی در تغذیه و سازگاری به تنش‌ها در مدت رشد و توسعه گیاه دارند. این پروتئین می‌تواند در ترمیم غشاء آسیب‌دیده در اثر تنش‌های مختلف نقش داشته باشد و در نتیجه این گونه از ارقام سویا نمی‌تواند به طور مناسب پاسخ مناسبی در برابر تنش‌های مختلف نشان دهند (Aghaei et al., 2009). افروز و همکاران (Afroz et al., 2010)، وجود این نوع گلیکوپروتئین در اندام‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ گیاهچه‌های ۷ روزه سویا را گزارش کردند و بیان کردند که وجود و تجمع این پروتئین‌های ذخیره‌ای، نشان دهنده مصرف این پروتئین‌ها به عنوان منبع غذایی و تولید انرژی برای رشد و نمو است. کاهش بیان گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی ساقه‌ای در بافت‌های مختلف در اثر تنش شوری (Yin et al., 2014) و تنش غرقاب (Komatsu et al., 2010) توسط محققین گزارش شده است.

لکه پروتئینی شماره ۲۳۰۱ مربوط به 3- 3- 14- Like protein است و در انتقال سیگنال دخیل می‌باشد. این پروتئین در واکنش‌های فیزیولوژیکی و تنظیمی متعدد و در پر شدن دانه ایفای نقش می‌کند (Hajduch et al., 2005) و نقش تنظیمی مهمی در فعالیت H-ATPase غشاء پلاسمایی دارند (Shanko et al., 2003). به طوری که این آنزیم در ایجاد شیب غلظت پروتئین در سرتاسر غشاء نقش دارد و به این وسیله انرژی مورد نیاز برای انتقال ثانویه، تنظیم تورژسانس سلولی و pH درون سلولی را تامین کند (Santos et al., 2016) در مطالعه نوری و کوماتسو (Nouri and Komatsu, 2010) پروتئین 3- 3- 14- Like protein تحت تنش اسمزی ایجاد شده به وسیله پلی اتیلن گلیکول تا ۱۰ درصد کاهش بیان داشته است. در گیاه ذرت نیز کاهش بیان 3- 3- 14- Like protein در گیاهان تحت تنش شوری گزارش شده است (Zörb et al., 2010). از آنجایی که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی دارد و وجود آن‌ها در مدت پر شدن دانه ضروری می‌باشد (Hajduch et al., 2005)، احتمال دارد

مهم برای از بین بردن ROS می‌باشد و در گیاهان سویای تحت تنش اسمزی، افزایش بیان این پروتئین با تحمل بالای سویا به تنش همراه بود (Toorchi et al. 2009). لکه شماره ۸۳۰۲ متعلق به یک پروتئین ناشناخته بود که تحت عنوان پروتئین Methylecgonone reductase شناسایی شد که تحت شرایط ابتلا به عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا در مطالعات فیلوی کاهش بیان داشته است (Payghamzadeh et al., 2017).

بطور خلاصه تجزیه و تحلیل پروتئوم روی بافت ریشه سویای رقم کتول منجر به شناسایی ۱۲۴ لکه پروتئینی تکرارپذیر با تکنولوژی الکتروفورز دوبعدی و رنگ آمیزی با آبی کوماسی شد. از بین لکه‌های پروتئینی مشاهده شده روی ژل‌های پلی‌آکریل‌امید تعداد ۱۱ پروتئین به طور معنی‌داری از نظر آماری تغییر بیان داشتند. این پروتئین‌ها بر اساس عملکرد بیولوژیک، در پنج گروه پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی، پروتئین‌های مرتبط با تقسیم و ذخیره‌سازی، پروتئین‌های مرتبط با انتقال سیگنال، پروتئین‌های مرتبط با مهار ROS و پروتئین ناشناخته طبقه‌بندی شدند. تمامی این پروتئین‌ها در سویای مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی کاهش بیان را نشان دادند. به نظر می‌رسد که کاهش بیان پروتئین‌های 14-3-3-like protein و پروتئین شبه جرمین که از تنظیم‌کننده‌های کلیدی به شمار می‌روند در ریشه گیاهان مبتلا نقش اساسی را در تظاهر سندروم غلاف‌بندی سویا دارند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

کاهش بیان این پروتئین به طرز ناشناخته‌ای منجر به عدم توسعه دانه در گیاهان مبتلا به ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد. به طور کلی در این مطالعه، تغییر بیان 14-3-3-Like protein ممکن است به طرق مختلف و ناشناخته فعالیت ATPase غشاء پلاسمایی، محرک‌های سیگنال‌دهی، رشد سلول و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق منجر به ایجاد عارضه ناهنجاری غلاف‌بندی سویا گردد.

لکه‌های پروتئینی شماره ۳۱۰۱، ۲۲۰۲ و ۱۲۰۱ مربوط به پروتئین مشابه جرمین می‌باشند که جزو پروتئین‌های مهارکننده ROS و سم‌زدایی طبقه‌بندی می‌شوند. این پروتئین در طی جوانه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند. برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبیه اگسالات اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز نشان می‌دهند (Gucciardo et al., 2007). تولید H_2O_2 در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسموتازی حاکی از نقش این پروتئین‌ها در استحکام دیواره سلولی و مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و تنش‌های غیر زیستی است (Lane, 1994). لکه شماره ۵۱۰۱ احتمالاً مربوط به پروتئین Thioredoxin می‌باشد. Thioredoxin، آنزیم آنتی اکسیدان می‌باشد که در بهبود فرآیندهای سلولی نقش دارد و در گیاهان حائز اهمیت می‌باشد. در فرآیندهای متعدد از جمله متابولیسم چربی، حمل و نقل غشاء، متابولیسم هورمون‌ها و سنتز ATP نقش دارد (Collet and Messens, 2010). این آنزیم یک آنتی اکسیدان

منابع

- احمدی، م. (۱۳۷۸). کیفیت و کاربرد دانه‌های روغنی، ناگراج، اس. (مؤلف). چاپ اول. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، ۱۱۳ ص.
- چراغعلی، ع. (۱۳۶۷). نتایج بررسی‌های طرح علل پیدایش اختلال در غلاف‌بندی سویا- منطقه گرگان و گنبد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گنبد، ص ۵۳.
- Afroz, A., Hashiguchi, A., Khan, M.R., & Komatsu, S. (2010) Analyses of the proteomes of the leaf, hypocotyl, and root of young soybean seedlings. *Protein & Peptide Letters* 17(3): 319-31. doi: 10.2174/092986610790780341.
- احمدی، م. (۱۳۷۸). کیفیت و کاربرد دانه‌های روغنی، ناگراج، اس. (مؤلف). چاپ اول. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، ۱۱۳ ص.
- چراغعلی، ع. (۱۳۶۷). نتایج بررسی‌های طرح علل پیدایش اختلال در غلاف‌بندی سویا- منطقه گرگان و گنبد،

- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Shah, A.H., & Komatsu, S. (2009). Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*, 36(1), 91-8. doi: 10.1007/s00726-008-00367.
- Alam, I., Sharmin, S.A., Kim, K.H. *et al.* (2010). Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant and Soil*, 333, 491-505. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0365-7>.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050, the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.
- 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.
- Collet, J.F., & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signaling*, 13(8), 1205-16. doi:10.1089/ars.2010.3114.
- Dubois, F., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M-B., Estavillo, J-M., Sangwan, R., André Gallais, A., Bertrand Hirel, B., *et al.* (2003). Glutamate dehydrogenase in plants, is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6), 565-576.
- Fontaine, J.X., Tercé-Laforgue, T., Armengaud, P., Clément, G., Renou, J.P., Pelletier, S., Catterou, M., Azzopardi, M., Gibon, Y., Lea, P.J., Hirel, B., & Dubois, F. (2012). Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. *Plant Cell*, 24(10), 4044-65.
- Forde, B.G., & Lea, P.J. (2007). Glutamate in plants, metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339-58. doi: 10.1093/jxb/erm121. Epub 2007 Jun 19.
- Ghayeb Zamharir, M., Shameli, S., & Bertaccini, A. (2022b). Molecular evidence of seed transmission of soybean bud proliferation and seed pods abortion phytoplasma disease. *Indian Phytopathology*, 75, 889-893. doi: 10.1007/s42360-022-00518-4.
- Giesler, L.J., Ghabrial, S.A., Hunt, T.E., & Hill, J.H. (2002). Bean pod mottle virus, A Threat to U.S. Soybean Production. *Plant Disease*, 86(12), 1280-1289. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.12.1280.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J., Brewin, N., & 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, 1161-1171. doi: 10.1093/jxb/erl282.
- Hajdudch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W., & Thelen, J.J. (2005). A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, 137(4), 1397-419. doi: 10.1104/pp.104.056614.
- 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.
- Hill, C.B., Bowen, C.R., & Hartman, G.L. (2013). Effect of fungicide application and cultivar on soybean green stem disorder. *Plant Disease*, 97(9), 1212-1220. doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1191-RE.
- Holshouser, D. (2009). Green stem syndrome in soybean. Agricultural and Food Sciences. Available at, <https://pubs.ext.vt.edu/2912/2912-1430/2912-1430.html>
- Huang B., Chu C. H., Chen S. H., Juan H. F., & Chen Y. M. (2006). A proteomics study of the mung bean glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulated by brassinosteroids under conditions of chilling stress. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(2), 264-78. doi: 10.2478/s11658-006-0021-7.
- Jadhav, P. V., Mane, S.S., Nandanwar, R.S., Kale, P.B., Dudhare, M.S., Moharil, M.P., & Dani, R.G. (2013). Floral bud distortion in soybean and incidence in central India. *Egyptian Journal of Biology*, 15, 59-65. doi.org/10.4314/ejb.v15i1.9
- Keep, N.R., Schapaugh, W.T., Prasad, P.V.V., & Boyer, J.E. (2016). Changes in physiological traits in soybean with breeding advancements. *Crop Science*, 56, 122-131. doi.org/10.2135/cropsci2013.07.0499.
- Komatsu, S., Han, C., Nanjo, Y., Altaf-Un-Nahar, M., Wang, K., He, D., & Yang, P. (2013). Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 4769-84. doi: 10.1021/pr4001898.
- Komatsu, S., Kobayashi, Y., Nishizawa, K., Nanjo, Y., & Furukawa, K. (2010). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids*, 39(5), 1435-49. doi: 10.1007/s00726-010-0608-1
- Komatsu, S., Toorchi, M. and Yukava, K. 2007. Soybean proteomics. *Current Proteomics* 4, 182-186.

- Lane, B.G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB Journal*, 8(3), 294-301. doi: 10.1096/fasebj.8.3.8143935.
- Leonard, B. R., Boquet, D., Padgett, B., Davis, J. A., Schneider, R., Griffin, J. L., Valverde, A., & Levy, R. J. J. (2011). Soybean green plant malady contributing factors and mitigation. *Louisiana Agriculture*, 54, 32-24.
- Liu, J. Wu, Y., Yang, J., Liu, Y., & Shen, Fa. (2008). Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *Journal of Plant Biology*, 51, 11-19. doi: 10.1007/BF03030735.
- Martínez-Zaguilán, R., & Sennoune, S. R., (2016). Vacuolar H⁺-ATPase Signaling in Cancer. In Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPase. Springer, pp.371-392.
- Mason, H.S., Guerrero, F.D., Boyer, J.S., & Mullet, J.E. (1988). Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of dark-grown soybean seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. *Plant Molecular Biology*, 11(6), 845-56. doi: 10.1007/BF00019524.
- Maurício, C.M., Favoreto, L., Klepker, D., Francismar, C., & Marcelino, G. (2017). Soybean green stem and foliar retention syndrome caused by *Aphelenchoides besseyi*. *Tropical plant pathology*, 42, 403-409. doi:10.1007/s40858-017-0167-z.
- Messina, M. (2010). Insights gained from 20 years of soy research. *Journal of Nutrition*, 140(12), 2289S-2295S. doi: 10.3945/jn.110.124107.
- Mohammadi, P.P., Moieni, A., Hiraga, S., & Komatsu, S. (2012). Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1906-23. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.041.
- Morrison, J., & Bartlett, R.V. (2009). Green stem still a mystery. Education week. Edweek/go/commentary.
- Nouri, M.-Z., & Komatsu, S. (2010). Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics* 10(10), 1930-1945. doi: 10.1002/pmic.200900632.
- Payghamzadeh, K., Toorchi, M. and Shobbar, Z.S. (2017). Proteome alteration of soybean as a function of pod distortion syndrome. *Legume Research* 40, 1-10. doi: 10.18805/lr.v0i0.7836.
- Radwan, O., Wu, X., Govindarajulu, M., Libault, M., Neece, D.J., Oh, M.H., Berg, R.H., Stacey, G., Taylor, C.G., Huber, S.C., & Clough, S.J. (2012). 14-3-3 proteins SGF14c and SGF14l play critical roles during soybean nodulation. *Plant Physiology*, 160(4), 2125-36. doi: 10.1104/pp.112.207027.
- Richard, M., Shibles, J.E., Harper, R.F., & Wilson, R.C. (2004). Soybeans, Improvement, Production, and Uses. Crop Science Society of America, Inc. Agronomy Monographs. doi:10.2134/agronmonogr16.3ed.
- Robinson, S. A., Stewart, G. R., & Phillips, R. (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 98(3), 1190-1195. doi.org/10.1104/pp.98.3.1190.
- Salavati, A., Khatoona, A., Nanjoa, Y., & Komatsua, S. (2012). Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding. *Journal of Proteomics*, 75, 878-893.
- Santos, J.M., Martínez-Zaguilán, R., Facanha, A.R., Hussain, F., & Sennoune, S.R. (2016). Vacuolar H⁺-ATPase in the nuclear membranes regulates nucleo-cytosolic proton gradients. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311, C547-C558. doi:10.1152/ajpcell.00019.
- Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum*, 120(1), 21-26. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0222.x.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost, common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 194-9. doi: 10.1016/s0958-1669(03)00030-2.
- Shanko, A.V., Mesenko, M.M., Klychnikov, O.I., Nosov, A.V., & Ivanov, V.B. (2003). Proton pumping in growing part of maize root, its correlation with 14-3-3 protein content and changes in response to osmotic stress. *Biochemistry* 68(12), 1320-6. doi: 10.1023/b:biry.0000011653.46422.c3.
- Sözen, E. (2004). Vegetative Storage Proteins in Plants. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 5(1), 1-7.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M.-Z., & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides*, 30(12), 2108-17. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.006.
- Wang, L., Ma, H., Song, L., Shu, Y., Gu, W. (2012). Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2109-27. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.007.

- Xing, T., Ouellet, T., & Miki, B.L. (2002). Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7(5), 224-30. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02255-0.
- Xu, Z.Z., & Zhou, G.S. (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224(5), 1080-90. doi: 10.1007/s00425-006-0281-5.
- Yin, G., Sun, H., Xin, X., Qin, G., Liang, Z., & Jing, X. (2009). Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiology*, 50(7), 1305-18. doi: 10.1093/pcp/pcp074.
- Yin, Y., Yang, R., & Gu, Z. (2014). Organ-specific proteomic analysis of NaCl-stressed germinating soybeans. *J Agric Food Chem*. Jul 23; 62(29), 7233-44. doi: 10.1021/jf500851r.
- Zanzarin, D.M., Hernandez, C.P., Leme, L.M., Silva, E., Porto, C., Martin do Prado, R., Meyer, M.C., Favoreto, L., Nunes, E.de, O., & Pilau, E.J. (2020). Metabolomics of soybean green stem and foliar retention (GSFR) disease using mass spectrometry and molecular networking. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(S3), 1-8.
- Zhang, Y., Zhao, J., Xiang, Y. et al. (2011). Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. *Proteome Science* 9, 52. doi.org/10.1186/1477-5956-9-52.
- Zörb, C., Schmitt, S., & Mühling, K. H. (2010). Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. *Proteomics*, 10(24), 4441-4449. doi: 10.1002/pmic.201000231.