

بررسی بیان افتراقی پروتئین‌های محافظ در گیاه آراییدوپسیس تحت تنش شوری با روش iTRAQ-2DLC-MS/MS و آنالیز شبکه ژنی مربوطه

محمدامین باقری^{۱*}، حمید نجفی زرنی^۲

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲. استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۱)

Investigation of differential protein expression of protective proteins under salinity stress in *Arabidopsis* by iTRAQ-2DLC-MS/MS and analysis of gene expression and related gene network

Mohammad Amin Bagheri^{1*}, Hamid Najafi Zarini

1. Ph.D Student of Plant Breeding, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

2. Assistant Professor of Plant Biotechnology, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

(Received: May 8, 2015 - Accepted: Dec. 11, 2015)

Abstract

Identification and quantification of proteins and genes that expressed in the salinity stress conditions could lead to better understanding of the response mechanisms. So, in this study iTRAQ comparative proteomic method was used to investigate the protein changes and quantification of them under salinity stress. Then, more studies about the function of identified genes were done using gene expression and co-expression data obtained from databases and analysis of related sequences. According to the results of iTRAQ-2DLC-MS/MS a set of proteins including P5CS1, KIN1, KIN2, ERD10, ERD14 and COR47 were identified. Results showed that expressions of the related genes were not just restricted to salinity stress. They were also involved in other osmotic stresses. Gene network based on identified proteins was evaluated by String software. Based on the results, during the expression of these genes, protective compounds such as compatible solutes, dehydrin proteins and etc. were produced in the cells. Presence of the compounds led to induction of resistance and tolerance mechanisms in plants against osmotic stress such as salinity.

Keywords: Arabidopsis, iTRAQ Comparative proteomics, Protective compounds, Gene network, Salinity.

چکیده

شناسایی و کمی‌سنجی پروتئین‌ها و ژن‌های بیان شده در شرایط تنش شوری می‌تواند منجر به درک هرچه بهتر مکانیسم‌های پاسخی شود. بدین منظور در این تحقیق از روش پروتئومیکس مقایسه‌ای iTRAQ جهت بررسی تغییرات پروتئینی در شرایط تنش شوری و کمی‌سنجی آن‌ها استفاده شد. سپس جهت بررسی‌های بیشتر پیرامون عملکرد ژن‌های شناسایی شده از اطلاعات بیان ژن و هم‌بیانی در پایگاه داده و آنالیز توالی‌های مربوطه استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از iTRAQ-2DLC-MS/MS مجموعه‌ای از پروتئین‌ها از جمله P5CS1، KIN1، KIN2، ERD10، ERD14 و COR47 شناسایی شد. نتایج بیان ژن‌های مربوطه نشان داد که بیان این ژن‌ها تنها به تنش شوری محدود نمی‌شود و در پاسخ به سایر تنش‌های اسمزی نیز دخالت دارند. شبکه‌ی ژنی پروتئین‌های شناسایی شده با نرم‌افزار String بررسی گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده در طی بیان این ژن‌ها ترکیبات محافظ از جمله مواد محلول سازگار، پروتئین‌های دهایدرین و غیره در سلول تولید می‌شود که حضور آن‌ها منجر به القای مکانیسم‌های مقاومت و تحمل در گیاه در برابر تنش‌های اسمزی از جمله شوری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آراییدوپسیس، پروتئومیکس مقایسه‌ای (iTRAQ)، ترکیبات محافظ، شبکه ژنی، شوری.

مقدمه

شوری از تنش‌های مهم غیر زنده می‌باشد که منجر به کاهش رشد و نمو گیاهان می‌شود. شوری دو محدودیت را بر گیاهان تحمیل می‌کند: اثر اسمزی ناشی از پتانسیل آب پایین‌تر خاک و اثر یونی ناشی از سمیت مستقیم یون‌های شور و عدم تعادل یونی در گیاهان (Munns and Tester, 2008). وضعیت آب از لحاظ شوری بسیار حساس است و در نتیجه، در تعیین پاسخ‌های گیاه به تنش بسیار مهم می‌باشد (Yeo *et al.*, 1985). برای حفظ محتوای نسبی آب در حضور NaCl، گیاهان نیاز به جذب برخی مواد معدنی (مانند Na^+ ، Cl^- و K^+) و تولید مواد محلول سازگار^۱ (مانند پرولین، قند و گلاسین بتائین) دارند (Munns and Tester, 2008). با این حال غلظت‌های بالاتر Na^+ و Cl^- برای گیاهان حساس به شوری اغلب زیان‌آور است. در نتیجه این اثرات اولیه، اغلب تنش‌های ثانویه، نظیر خسارت اکسیداتیو رخ می‌دهد (Zhu, 2001). قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش شوری می‌تواند گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)^۲ مانند رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را تولید کند. این ROSها به قدری واکنش‌پذیر هستند که اگر گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی کافی نداشته باشند، سوخت و ساز طبیعی آن‌ها را از طریق اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به‌طور جدی مختل می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). به‌طور کلی، گیاهان برای حفاظت از سلول‌های خود در برابر ROS دارای یک سیستم آنتی‌اکسیدان شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)^۳، کاتالاز (CAT)^۴، پراکسیداز (POD)^۵ و

آسکوربات پراکسیداز (APX)^۶ می‌باشد. SOD، اولین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی، O_2^- را به H_2O_2 و O_2 تبدیل می‌کند. CAT، APX و POD مولکول‌های پراکسید هیدروژن انباشته شده را به سطوح غیر سمی و یا به شکل H_2O و O_2 پاکسازی و مهار می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). شناخته شده است که مواد محلول سازگار، از جمله پرولین، تحت تنش شوری در بسیاری از گیاهان زراعی تجمع می‌یابند (Munns and Tester, 2008). نقش اصلی آن‌ها احتمالاً حفاظت از سلول‌های گیاهی در برابر نابسامانی و خسارت‌های ناشی از شوری به‌وسیله حفظ تعادل اسمزی، ثبات ساختارهای سلولی، مانند غشاهای پروتئین‌ها، و مهار ROS می‌باشد (Ashraf and Foolad, 2007). کاربرد پرولین به‌عنوان روشی موثر در بهبود تحمل به شوری بوته‌ها در بادام زمینی (Jain *et al.*, 2001)، *Panacratium* (Khedr *et al.*, 2003)، خربزه (Kaya *et al.*, 2007) و تنباکو (Hoque *et al.*, 2007) مطرح شده است. با این حال برخی از گزارش‌ها در رابطه با استفاده از آن هشدار داده‌اند (Hare *et al.*, 2002; Heuer, 2003; Lin and Kao, 2001). بنابراین، به‌هنگام استفاده از پرولین به‌عنوان عامل القای مقاومت به شوری، باید ابتدا اثربخشی آن مشخص شود. علاوه بر این مکانیسم عمل پرولین در گیاهان کاملاً شناخته نشده است.

در گیاهان دو پیش‌ساز مختلف برای پرولین وجود دارد. اولین مسیر از سمت گلوتامات است که طی دو واکنش کاهشی پی در پی به پرولین تبدیل می‌شود که به‌ترتیب توسط پایروولین ۵ کربوکسیلات سنتاز (P5CS)^۷ و پایروولین کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR)^۸ کاتالیز می‌شود. P5CS یک آنزیم دو

1. Compatible solutes
2. Reactive Oxygen Species
3. Superoxide dismutase
4. Catalase
5. Peroxidase

6. Ascorbate peroxidase
7. Pyrroline-5-carboxylate synthase
8. Pyrroline-5-carboxylate reductase

با این حال انباشت مواد محلول سازگار تنها روش برای مقابله با تنش شوری نیست. روشی دیگر برای محافظت از سلول‌ها در برابر کاهش پتانسیل آب تولید پروتئین‌های محافظ است. در این بین می‌توان به پروتئین‌های شبه دهایدرین اشاره کرد. دهایدرین‌ها (DHNs) گروه بیوشیمیایی متمایزی از پروتئین‌های LEA را تشکیل می‌دهند که با عنوان گروه ۲ پروتئین‌های LEA (LEA II) (Bray, 1996; Ingram and Bartels, 1993) یا پروتئین‌های LEA-D11 (Dure *et al.*, 1989) شناخته می‌شوند. بیان بسیاری از دهایدرین‌ها به‌وسیله فیتوهورمون آبسزیک اسید (ABA) افزایش می‌یابد، از اینرو آنها پروتئین‌های RAB نیز نامیده می‌شوند. دهایدرین‌ها نقش کلیدی در پاسخ گیاه و سازگاری آن نسبت به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. گزارش شده است که این پروتئین‌ها در اواخر دوران جنین زایی تجمع می‌یابند و یا می‌توانند در بافت‌های رویشی توسط فاکتورهای تنش‌زای مختلف که موجب از دست رفتن آب سلولی (دهیدراسیون) می‌شوند (خشکی، شوری، سرما، گرما و غیره) القا شوند (Hanin *et al.*, 2011). از دیگر پروتئین‌های محافظ می‌توان از KIN1 نام برد که به‌عنوان پروتئین شبه ضدیخ شناخته شده است. ژن KIN1، که حاوی موتیف عناصر حساس به دهیدراسیون (CRT/DRE) در پروموتور خود می‌باشد، می‌تواند به‌وسیله سرما، شوری، ABA و تیمار دهیدراسیون القا شود (Knight *et al.*, 1999). ژن KIN1 پروتئینی را کد می‌کند که ساختاری شبیه به پروتئین ضدیخ غنی از آلانین تولید شده توسط برخی از ماهی‌ها را دارا می‌باشد (Wang *et al.*, 1995). این شباهت در ساختار و بیان نشان می‌دهد که محصولات این ژن ممکن است عملکردی مشابه در گیاهان داشته باشند.

در سال‌های اخیر، علم پروتئومیکس به‌طور فزاینده‌ای بر تعیین کمیت پروتئین متمرکز بوده است.

کاربردی هست که اول به‌وسیله فسفریلاسیون فعال سازی گلوتامات و دوم احیای واسطه ناپایدار گلوتامیل فسفات^۱ به گلوتامات سیمی آلدئید (GSA)^۲ را که در تعادل با فرم P5C است کاتالیز می‌کند (Hu *et al.*, 1992). ارنیتین (Orn)^۳ پیش‌ماده جایگزین برای بیوسنتز پرولین می‌باشد، که می‌تواند توسط ارنیتین آمینو ترانسفراز (OAT)^۴ به P5C تغییر یابد. مسیر اصلی در طی تنش اسمزی چرخه گلوتامات می‌باشد. با این حال در گیاهان جوان آرایدوپسیس مسیر ارنیتین نیز نقش داشته و به‌کمک می‌آید و فعالیت d-OAT نیز افزایش می‌یابد (Roosens *et al.*, 1998). آرایدوپسیس در حین تنش اسمزی پرولین را انباشته می‌سازد (Verbruggen *et al.*, 1993; Yoshiba *et al.*, 1997). در طی تنش، بیان P5CS، اما نه ژن P5CS، به‌خوبی با محتوای پرولین همبستگی دارد (Yoshiba *et al.*, 1995; Savoure *et al.*, 1995). به‌تازگی دو ژن P5CS دارای ارتباط نزدیک در آرایدوپسیس تالیانا شناسایی شده است. در طول تنش P5CS1، اما نه ژن P5CS2، برای تجمع پرولین مورد نیاز می‌باشد (Fabro *et al.*, 2004; Szekely *et al.*, 2008). در هنگام تنش اسمزی و شوری مسیرهای سیگنالی مختلفی مسئول تنظیم ژن P5CS1 می‌باشند. در طول تنش شوری، اما نه تنش خشکی، در آرایدوپسیس تالیانا القای بیان P5CS1 بستگی به فسفولیپاز C دارد (Parre *et al.*, 2007). همچنین هورمون آبسزیک اسید (ABA) و تنش شوری از طریق عناصر پاسخی آبسزیک اسید (ABRE) بیان P5CS1 آرایدوپسیس را القا می‌کند (Strizhov *et al.*, 1997; Savoure *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 2003).

1. C-glutamyl phosphate
2. Glutamate semialdehyde
3. Ornithine
4. Orn-d-aminotransferase

سینی‌هایی حاوی ۱۵۰ میلی مولار NaCl برای یک دوره زمانی سه روزه قرار گرفت، و سپس در حدود ۱۰ برگ‌های آن جمع‌آوری گردید، گیاهان شاهد به‌داخل سینی‌هایی با همان میزان آب منتقل شد. استخراج پروتئین‌های غشای پلاسمایی با روش Larsson و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد. به‌طور خلاصه حدود ۱۰۰ گرم از ماده گیاهی با استفاده از مخلوط‌کن در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر همگن‌کننده هموژنیزه و همگن شد. سوسپانسیون ایجاد شده به وسیله یک لایه میراکلوز دو لایه فیلتر و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل شده به لوله‌های جدید منتقل و به‌مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از میکروزوم ته‌نشین شده بار دیگر سوسپانسیون تهیه شد. جهت تولید سیستم دو فاز پلیمر آبی، بخش میکروزمی به فاز ترکیبی شامل ۶/۴ درصد دکستران، ۶/۴ درصد پلی‌اتیلن گلیکول، ۵ میلی‌مولار بافر فسفات pH ۷/۸ و ۵ میلی‌مولار کلرید پتاسیم اضافه شد. بخش بالایی نهایی حداقل شش برابر رقیق شد و سپس غشای پلاسمایی به‌وسیله سانتریفوژ به‌مدت ۹۰ دقیقه ته‌نشین شد. از غشای پلاسمایی ته‌نشین شده حاوی ۲-۱/۵ میلی‌گرم پروتئین سوسپانسیون تهیه و در نیتروژن مایع منجمد برای استفاده‌های بعدی نگه‌داری شد. هضم پروتئین با تریپسین (Cat.: V511A, Promega) بدین ترتیب انجام گرفت که ابتدا یک تا دو ویال از تریپسین ترکیب شده با ۲۵ میکرولیتر آب میلی‌کیو تهیه شد. سپس به هر تیوپ نمونه ۲ تا ۱۰ میکرولیتر از محلول تریپسین تهیه شده اضافه شد. تیوپ‌ها در دمای ۳۷ درجه در طول شب (۱۲-۱۶ ساعت) انکوبات شدند. پس از آن پروتئین هضم شده به‌وسیله اسپین به انتهای تیوپ رسوب داده شد. برچسب گذاری iTRAQ بر اساس روش Applied Biosystem MDS sciex انجام شد. بدین منظور معرف iTRAQ تازه آماده‌سازی شد. محتوای هر معرف تازه تهیه شده به یک تیوپ نمونه منتقل شد.

جنبه مهمی از تحقیقات پروتئوم شناسایی و تعیین همزمان نسبت غلظت پروتئین‌های بیان شده در سلول یا بافت‌ها در شرایط مختلف (وضعیت عادی در مقابل تنش) می‌باشد. همراه با پیشرفت در طیف سنجی جرمی، تکنیک‌های در حال ظهور مختلفی مانند SILAC^۱، ICAT^۲، برچسب‌گذاری متابولیکی^۳ (15Nor 13C)، نشاننده‌های ایزوبار برای کمیت سنجی نسبی و مطلق (iTRAQ)^۴، نشانمند کردن فراوانی کدگذاری شده بر اساس جرم (MCAT)^۵ و کاربرد CyDye در روش شناسی الکتروفورز دو بعدی (2-DE)^۶، به‌منظور تحقق هدف تعیین کمیت پروتئین معرفی شدند. در این بین iTRAQ به‌عنوان روشی که دارای حساسیت و دقت خوبی می‌باشد مورد توجه قرار گرفته است (Chong et al., 2006). هدف از این تحقیق، بررسی بیان افتراقی پروتئین‌ها با روش iTRAQ-2DLC-MS/MS با تاکید بر ترکیبات محافظ در گیاه آراییدوپسیس و سپس تجزیه و تحلیل بیان ژنی و هم‌بیانی و ساختار پروتئینی این گروه با استفاده از داده‌های پایگاه‌های اطلاعاتی و ابزارهای مرتبط برای درک هرچه بیشتر تغییرات مولکولی در تنش شوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه، اعمال تنش، استخراج غشای پلاسمایی و برچسب گذاری گیاه آراییدوپسیس تحت شرایط ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی با دمای روز و شب به‌ترتیب ۲۱ و ۱۹ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد در گلدان‌های کوچک به حجم ۲۰۰ سانتی متر مکعب رشد داده شد و برای ایجاد تنش در چهار هفتگی گلدان‌ها داخل

1. Stable isotope labeling of amino acid in cell cultures
2. Isotope-coded affinity tags
3. Metabolic labeling
4. Isobaric tags for relative and absolute quantitation
5. Mass-coded abundance tagging
6. Two-dimensional electrophoresis

مخلوط شدند و در یک ستون موئین (C18 Pep Map 300, 75µm × 150 mm, 3 µm particle size, LC-Packing, Amsterdam, The Netherlands) جدا گشته و کروماتوگرافی LC-Packing, Amsterdam, The Netherlands) انجام شد. آنالیز اسپکترومتری جرمی با یک تحلیل‌گر پروتئومیکس ۴۸۰۰ انجام شد Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از اسپکترومتری جرمی به‌وسیله نرم افزار Protein Pilot v 2.0 کمی سازی شد. اطلاعات مرتبط با ژن‌ها و عملکرد احتمالی آن‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی و نیز ساختار پروتئین‌های مربوطه با استفاده از پایگاه داده‌های NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) و TAIR (www.arabidopsis.org) بررسی شد. موتیف‌ها و دمنین‌ها و پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده از ابزار Motifscan موجود در وبسایت myhits (myhits.isb-sib.ch) بررسی شدند. داده‌های مربوط به شدت بیان ژن‌های موردنظر در شرایط رشدی، مراحل رشدی و نمونه‌های متفاوت با استفاده از نرم‌افزار سایت Genevestigator (genevestigator.com) استخراج گردید. همچنین شرایط رشدی و تنش‌های مشابهی که برای ژن‌های مورد نظر دارای مقادیر نسبی نزدیک با مقادیر بیانی به‌دست آمده در این آزمایش دارند توسط وبسایت Genevestigator، بررسی شد. ضمناً با استفاده از نرم‌افزار سایت STRING (string-db.org) شبکه ژنی برای مجموعه ژنی ترکیبات محافظ شناسایی و همچنین ژن‌های موجود در این شبکه و همچنین گروه‌های پارالوگ و ارتولوگ مشخص گردید.

هر تیوپ جهت مخلوط شدن ورتکس و اسپین شد. pH محلول آزمون و در صورت نیاز به‌وسیله بافر انحلال در محدوده ۷/۵ تا ۸/۵ تنظیم شد. تیوپ‌ها در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبات شدند. بعد از برچسب‌گذاری نمونه‌ها در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت بررسی تغییرات پروتئینی که در اثر تنش شوری در سطح غشا ایجاد شده است، تعیین کمیت با استفاده از تکنیک iTRAQ انجام شد. دو تکرار بیولوژیکی استفاده شد. دو نمونه غشای پلاسمایی تیمار شده با NaCl با tag115 و tag117 و دو نمونه شاهد با tag116 و tag114 برچسب‌گذاری شدند. تعیین کمیت نسبی پروتئین بر اساس پپتیدهای نشاندار شده با استفاده از نرم‌افزار Protein Pilot به‌دست آمد. تفاوت‌های نسبی که دارای P-Value کمتر از ۰/۰۵ و تغییرات پروتئینی که اختلاف بیشتر از ۱/۲ برابر را نشان داد، به‌عنوان اختلاف معنی‌دار آماری شناخته شد.

جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی

برای جداسازی اولیه پپتیدها از ستون تبادل یونی (SCX) استفاده شد. جداسازی بر روی سیستم Amersham Biosciences (Ettan-MDLC) (AB, Uppsala, Sweden) با میزان جریان ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه انجام شد. دو نوع بافر تهیه گردید، بافر A: 10 mM KH₂PO₄-H₃PO₄, pH 2.7, 25% acetonitrile (ACN) و بافر B: 10 mM KH₂PO₄-H₃PO₄, pH 2.7, 25% ACN, 1M KCl استفاده شدند. نمونه‌های برچسب‌گذاری شده قبل از اینکه بارگذاری شوند در بافر A حل شدند و شست و شوی نمونه‌ها با بافر B انجام شد. پپتیدهای حاصل، در محلول ۰/۱ درصد TFA^۲

1. Strong cation exchange
2. Trifer acetic acide

نتایج و بحث

بیان افتراقی پروتئین‌های گروه ترکیبات محافظ با روش iTRAQ-2DLC-MS/MS

از مجموعه ژنی ترکیبات محافظ، پروتئین‌های P5CS1، ERD10، ERD14، COR47، KIN1 و KIN2 در پروفایل پروتئومی مشاهده شدند. جدول ۱ نتایج حاصل از کروماتوگرافی تبادل یونی و تعیین کمیت پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. میانگین میزان بیان ژن در دو تکرار بیولوژیکی شوری ۱۵۰ mM در مقایسه با نمونه‌های شاهد برای ژن‌های P5CS1، KIN1، KIN2، ERD10، ERD14 و COR47 به ترتیب ۱/۴۳۱، ۱/۶۹۶، ۶/۵۰۸، ۲/۱۵۹، ۱/۳۴۸، ۱/۹۰۴ برابر افزایش داشته که نشان دهنده افزایش بیان این ژن‌ها در شرایط تنش شوری می‌باشد. احتمالاً این افزایش میزان بیان باعث افزایش مقاومت گیاه به شرایط تنش شوری می‌شود که این نتایج با سایر بررسی‌های صورت گرفته تطابق دارد. نشان داده شده است که از طریق بیان بالای ژن P5CS1 افزایش در سطح پرولین به دست می‌آید که منجر به افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی می‌شود (Konstantinova et al., 2002). از سوی دیگر کاهش تجزیه پرولین از طریق معرفی ساختار آنتی‌سنس از ژن پرولین دهیدروژناز (Mani et al., 2002) یا از بین بردن این آنزیم (Nanjo et al., 2003) منجر به افزایش تجمع پرولین آزاد و عملکرد رشدی بهتر در شرایط تنش شوری می‌شود (Maggio et al., 2002). Brini و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که بیان ژن دهایدرین (DHN-5) گندم دوروم در آراییدوپسیس منجر به افزایش در تحمل تنش شوری

و اسمزی شد. به‌همین ترتیب، RoyChoudhury و همکاران (۲۰۰۷) نیز در گیاهان تنباکوی تراریخته شده با ژن دهایدرین ($Rab16A=Rab21$) از برنج هندی وارپته پوکالی، افزایش تحمل به تنش شوری و خشکی مشاهده کردند. از طرف دیگر Li و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقات اخیر خود مشاهده کردند که KIN1 پاسخ فوق حساسیت نسبت به شوری در گیاهان تراریخت نشان می‌دهد. بنابراین اگرچه تنش آبی و تنش سرما برای این پروتئین نقشی اصلی و رایج تر محسوب می‌شود اما احتمالاً در تنش شوری نیز مانند تحمل یخ زدگی نقش حفاظتی برای گیاه ایفا می‌کنند. Kim و همکاران (۲۰۱۴) گزارش دادند که در شرایط شوری بیان ژن P5CS1 افزایش می‌یابد. Hsieh و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی، اسمزی و حرارتی بیان ژن‌های COR15A، COR15B، PLC1، P5CS1، KIN1، KIN2 و LEA14 افزایش یافت و این افزایش موجب تجمع پرولین و ABA و بسته‌شدن روزنه‌ها شد و بدین ترتیب تحمل نسبت به تنش‌های مذکور حاصل شد.

بیان افتراقی ژنی پروتئین‌ها

با استفاده از پایگاه داده ATTED-II نمودارهای میزان بیان ژن‌های مورد بررسی تحت تنش‌های غیر زیستی به دست آمد (شکل ۱). نشان داده شد (شکل ۱-الف) که شدت بیان ژن P5CS1 تحت تنش‌های شوری و اسمزی خصوصاً در اندام‌های هوایی نسبت به کنترل بیشتر می‌شود. از طرف دیگر ژن‌های KIN1، KIN2 و ERD10 نیز افزایش بیان قابل توجهی تحت تنش‌های سرما، اسمزی و شوری نسبت به کنترل به‌ویژه در ریشه‌ها نشان دادند (شکل ۱-ب، پ، ت). همینطور بیان ژن‌های ERD14 و COR47 نیز در پاسخ به تنش‌های سرما، اسمزی و شوری با شدتی کمتر افزایش دیده شد (شکل ۱-ث، ج). برآیند این داده‌ها با نتایج پروتئومیکس مقایسه‌ای

1. DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1
2. EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 10
3. EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14
4. COLD-REGULATED 47

۳- ب) مشخص شد اختلالاتی که نزدیک‌ترین تشابه در شدت بیان برای ژن‌های مشاهده شده در پروتئوم را در پی دارند عبارت از سرما، جوانه زنی و خشکی می‌باشد. این داده‌ها مطابق مطالعات قبلی نشان داد که ترکیبات محافظ علاوه بر تنش شوری در پاسخ به سایر تنش‌های اسمزی مانند سرما، خشکی و غیره نیز موثرند.

و مطالعات قبلی مطابقت داشت. نتایج بررسی با Genevestigator (شکل ۲- الف) نشان داد که از نظر دوره‌های رشدی ژن‌های مورد نظر در تمامی مراحل به‌جز مرحله پیری، دارای بیان متوسط رو به بالا هستند که در این بین مرحله روزت توسعه یافته به‌طور متوسط دارای بالاترین بیان نسبت به سایر مراحل بود. ضمناً با توجه به خروجی نرم‌افزار (شکل

جدول ۱- فهرست پروتئین‌های بالا و پایین تنظیم شده در پروفایل پروتئوم

Accession	Standard gene annotation according to sequence source database (TAIR)	iTRAQ ratio	pValue	Gene expression
AT2G39800.2	P5CS1 (Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthase 1)	1.431	0.0002	3.71
AT5G15970.1	KIN2 (cold responsive)	1.696	0.0000	25.86
AT5G15960.1	KIN1(cold and ABA inducible protein kin1. possibly functions as an anti-freeze protein)	6.508	0.0001	25.86
AT1G20450.2	ERD10,LTI45 (early responsive to dehydration)	2.159	0.0000	26.23
AT1G76180.1	ERD14 (early responsive to dehydration 14)	1.348	0.0000	3.608
AT1G20440.1	COR47 (cold regulated 47)	1.904	0.0000	14.71

توضیحات: شماره دستیابی‌ها بر اساس طرح ژنوم آرکیدوبیس (AGI) در ستون ۱ داده شده است. نام پروتئین‌ها به‌همراه اختصارات معمول استفاده شده و حاشیه نویسی بر اساس توالی بازایی شده از TAIR و PPDB در ستون ۲ داده شده است. نسبت iTRAQ (ستون ۳) تغییر فراوانی پروتئین نمونه‌های تیمار شده با نمک نسبت به شاهد (نمک/شاهد) است و مقدار نشان داده شده میانگینی از دو تکرار با سطح احتمال مرتبط ($p < 0.05$) پذیرفته شده می‌باشد. داده‌های بیان ژن، در آخرین ستون از پایگاه داده eFP به‌دست آمده و نسبت بین بیان ژن مربوطه در ساقه گیاه تیمار شده با نمک (در معرض ۱۵۰ میلی مولار NaCl به‌مدت ۲۴ ساعت) و گیاه شاهد می‌باشد.

بررسی شبکه ژنی و هم‌بیانی ژن‌ها

با کمک نرم‌افزار String شبکه ژنی متشکل از ژن‌های ترکیبات محافظ مشاهده شده در پروتئوم (شکل ۳- الف)، طراحی شد. مهمترین ژن‌های همکار پیش‌بینی شده که از نظر عملکردی دارای بیشترین ارتباط با مجموعه ژن‌های مورد مطالعه می‌باشند عبارتند از GDH3، GDH2، GDH1، P5CR، LTI78 و ERD5. ژن LTI78 یکی از اعضای خانواده LEA می‌باشد. شناخته شده ترین نقش این ژن پاسخ سرما است اما در سایر تنش‌های اسمزی از جمله شوری نیز نقش محافظتی دارد. Shinozaki و Yamaguchi-Shinozaki (۱۹۹۴)

Kim و همکاران (۲۰۱۴) بیان داشتند که ژن rd29A (LTI78) نقش مهمی در پاسخ به تنش شوری و تحمل به آن دارد و در شرایط تنش‌های اسمزی دارای بیان بالا می‌باشد. P5CR کد کننده ی آنزیم پایرولین-۵-کربوکسیلاز ردوکتاز می‌باشد که آخرین مرحله از بیوسنتز پرولین از گلوتامات و اورنیتین را کاتالیز می‌کند. P5CR ۱-پایرولین-۵-کربوکسیلات (P5C) تولید شده توسط P5CS را به L-پرولین تبدیل می‌کند. Jung و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که پاسخ اولیه به تنش اسمزی در گیاه *Arabis stelleri* در مقایسه با P5CS وابستگی بیشتری به P5CR دارد. ژن ERD5 یا ProDH بیشتر توسط تنش‌های دهیدراسیون سرکوب و به‌وسیله L-پرولین آزاد القا می‌شود. ProDH عملکرد تنظیمی در

¹ LOW-TEMPERATURE-INDUCED 78

² PYRROLINE-5- CARBOXYLATE (P5C) REDUCTASE

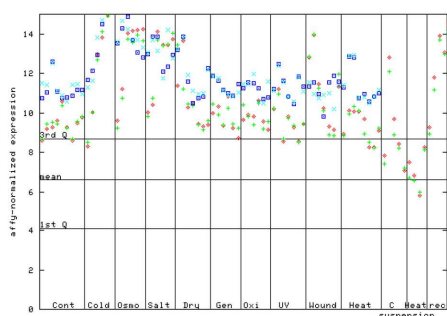
³ GLUTAMATE DEHYDROGENASE

⁴ EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5

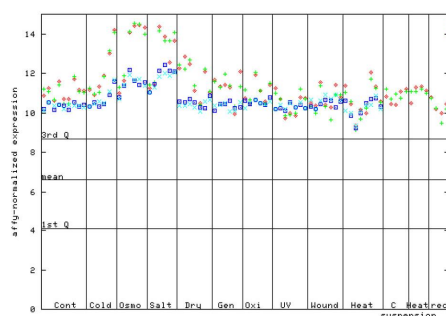
⁵ PROLINE DEHYDROGENASE

بیوستنتر پرولین نقش دارد. Skopelitis و همکاران (۲۰۰۶) در مورد نقش این ژن‌ها در تنش شوری چنین بیان داشتند که سیگنال (گونه‌های اکسیژن فعال) تولید شده به وسیله شوری بیان زیر واحدهای GDH را القا می‌کند و ایزو گلوتامات دهیدروژنازها با جذب آمونیاک به عنوان آنزیم‌های ضد تنش در سم‌زدایی آمونیاک و تولید گلوتامین برای سنتز پرولین عمل می‌کنند.

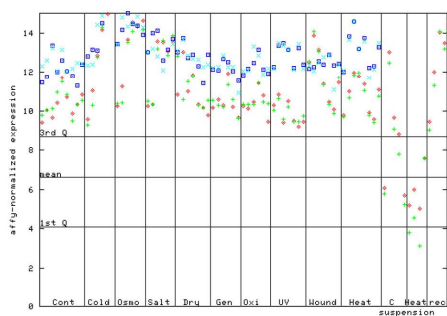
نرخ بیوستنتر پرولین دارد (Nakashima *et al.*, 1998; Trovato *et al.*, 2008). همانطور که بیشتر نیز گفته شد (Mani *et al.*, 2002; Nanjo *et al.*, 2003) اختلال در فعالیت این آنزیم می‌تواند موجب افزایش پرولین آزاد و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های اسمزی شود. GDH‌ها که دککنده‌ی زیر واحدهای گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADH می‌باشند در تجزیه گلوتامات در چرخه



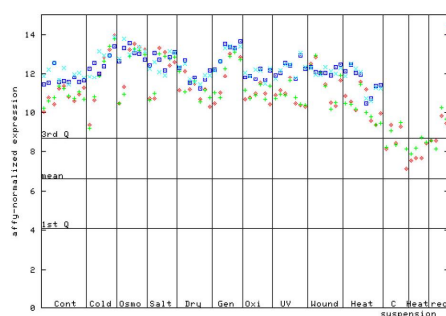
(ب)



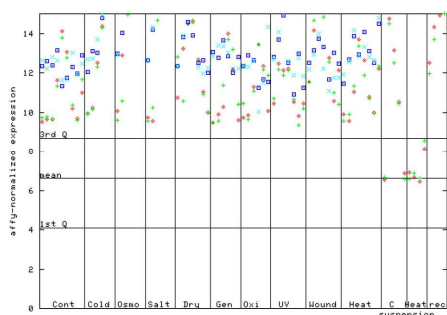
(الف)



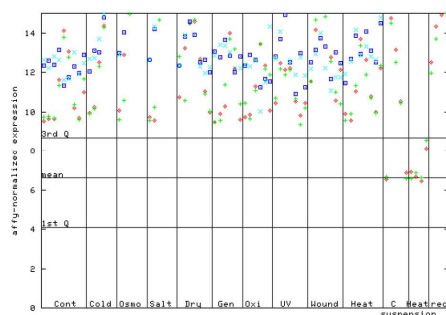
(ت)



(پ)



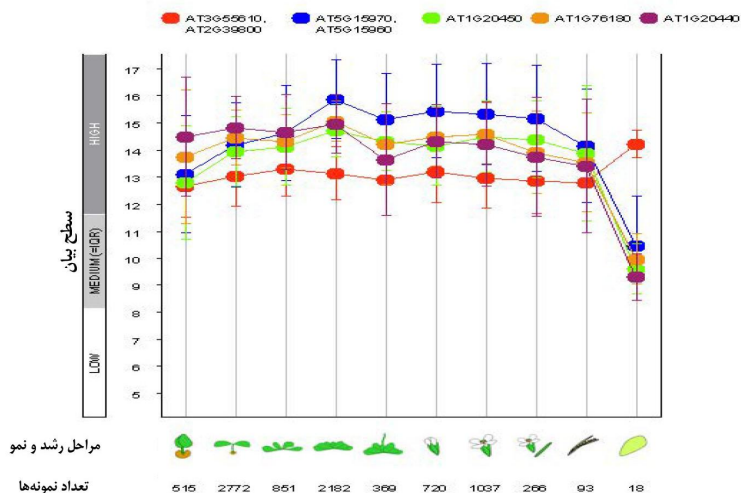
(ج)



(ث)

شکل ۱- نمودار میزان بیان ژن‌های الف) P5CS1، ب) KIN2، پ) KIN1، ت) ERD10، ث) ERD14 و ج) COR47 تحت تنش‌های غیر زیستی مختلف. محور Y داده‌های نرمال شده بیان، محور X نمونه‌ها شامل کنترل (Cont)، تنش سرما (Cold)، تنش شوری (Osmo)، تنش خشکی (Salt)، تنش خشکی (Dry)، تنش ژنوتوکسیک (Gen)، تنش اکسیداتیو (Oxi)، تنش فرابنفش (UV)، تنش زخمی شدن (Wound)، تنش حرارتی (Heat)، کشت سوسپانسیون تنش حرارتی یافته (C-Heat rec suspension).

الف



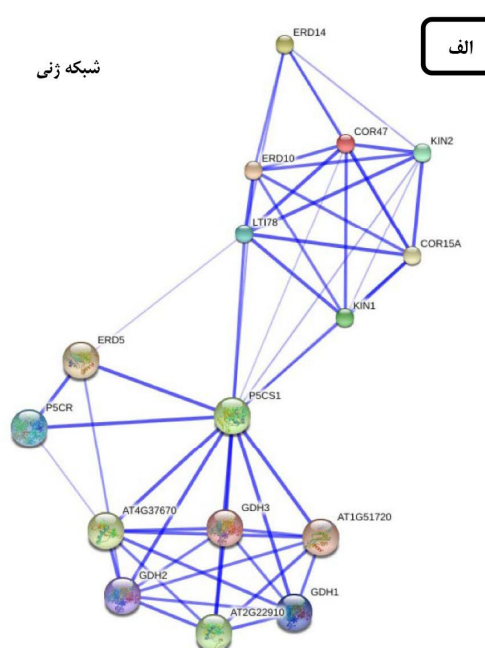
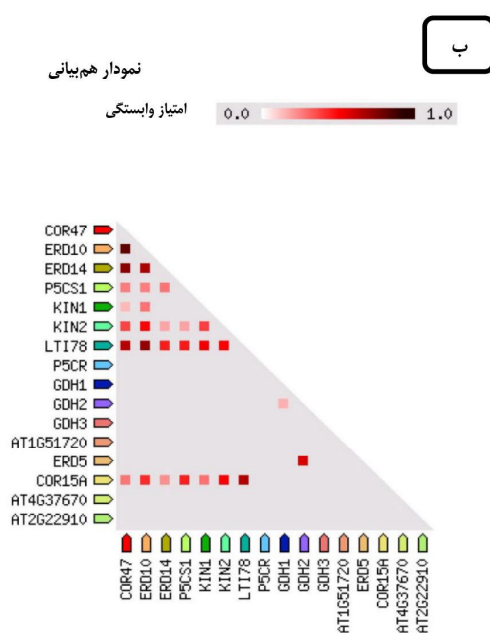
ب



شکل ۲- نمودارهای بیانی ژن‌های پروتئوم مربوط به: الف) شدت بیان در مراحل رشدی و ب) اختلالات دارای نزدیک‌ترین شدت بیان در مقایسه با نتایج پروتئوم.

مشابه هستند، ضمن این که لازم به توضیح است که همه این ژن‌ها در گروه پروتئین‌های LEA قرار می‌گیرند. ژن‌های فاقد رابطه هم‌بیانی با یکدیگر احتمالا یا عملکردی عکس دیگری دارند (مانند P5CS1 و ERD5) و یا در مسیر بیوشیمیایی دارای عملکردی پس یا پیش یکدیگر (مانند GDHها، P5CS و P5CR که عملکردشان یکی پس از دیگری است) می‌باشند.

در شکل ۳- ب نمودار هم‌بیانی مربوط به ژن‌های موجود در شبکه در گیاه آرابیدوپسیس و سایر موجودات نشان داده شده است. بیشترین امتیاز هم‌بیانی از بین ژن‌های شناسایی شده در شبکه متعلق به ژن COR47 با ژن‌های ERD10 و ERD14 و نیز ژن ERD10 با ژن‌های LTI78 و ERD14 می‌باشد. احتمال بالای هم‌بیانی این ژن‌ها نشان دهنده این است که احتمالا آن‌ها دارای عملکردی



شکل ۳- الف) شبکه ژنی پیش‌بینی شده برای ترکیبات محافظ مشاهده شده در پروتئوم برگ آرابیدوپسیس ب) نمودار هم‌بیانی ژن‌ها.

احتمالا شامل تنظیم کامل فیزیولوژی گیاه به‌منظور برقراری مجدد تعادل سلولی تحت کمبود آب و مسمومیت یونی می‌باشد. در واقع پاسخ گیاه نسبت به تنش شوری تنها محدود به یک یا چند ژن خاص نیست بلکه نتیجه‌ی فعالیت شبکه‌ای از ژن‌ها در تعامل و تقابل با یکدیگر می‌باشد. فعالیت این شبکه در نهایت منجر به تولید یکسری ترکیبات محافظ می‌شود که حضور آن‌ها مکانیسم‌های مقاومت و تحمل در گیاه را نسبت به تنش‌های اسمزی از جمله تنش شوری القا می‌نماید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه به‌منظور شناسایی پروتئین‌های درگیر در پاسخگویی به تنش شوری از نمونه‌های بافتی با کیفیت و تکنیک نشانه گذاری iTRAQ استفاده شد. پس از آن به‌منظور تامین اطلاعات بیشتر و بررسی تکمیلی در این زمینه از پایگاه داده‌های بیانی مختلف استفاده شد. در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده از پروتئومیکس مقایسه‌ای و بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیشتر در این راستا نشان می‌دهد که پاسخ گیاه به تنش شوری یک فرآیند پیچیده است و

REFERENCES

- Abrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 51(3): 363-372.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Ashraf M, Foolad M (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59(2): 206-216.
- Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103(4): 1035-1040.
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 26(11): 2017-2026.
- Chong PK, Gan CS, Pham TK, Wright PC (2006) Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: implication of multiple injections. *J. Proteome Res.* 5(5): 1232-1240.
- Dure Iii L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12(5): 475-486.
- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME (2004) Proline accumulation and *atp5cs2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(4): 343-350.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav.* 6(10): 1503-1509.
- Hare P, Cress W, Van Staden J (2002) Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. *S. Afr. J. Bot.* 68(3): 393-396.
- Heuer B (2003) Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Sci.* 165(4): 693-699.
- Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J. Plant Physiol.* 164(5): 553-561.
- Hsieh EJ, Cheng MC, Lin TP (2013) Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor *aterf53* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 82(3): 223-237.
- Hu C, Delauney AJ, Verma D (1992) A bifunctional enzyme (Delta 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(19): 9354-9358.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47(1): 377-403.
- Jain M, Mathur G, Koul S, Sarin N (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.* 20(5): 463-468.
- Jung Y, Park J, Choi Y, Yang JG, Kim D, Kim BG, Roh K, Lee DH, Auh CK, Lee S (2010) Expression analysis of proline metabolism-related genes from halophyte *Arabis stelleri* under osmotic stress conditions. *J. Integr. Plant Biol.* 52(10): 891-903.
- Kaya C, Tuna AL, Ashraf M, Altunlu H

- (2007) Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environ. Exp. Bot.* 60(3): 397-403.
- Khedr AH, Abbas M, Wahid AA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.* 54(392): 2553-2562.
- Kim K, Jang YJ, Lee SM, Oh BT, Chae JC, Lee KJ (2014) Alleviation of salt stress by enterobacter sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Mol. Cells* 37(2): 109-117.
- Knight H, Veale EL, Warren GJ, Knight MR (1999) The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif. *Plant Cell* 11(5): 875-886.
- Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci.* 163(1): 157-164.
- Larsson C, Widell S, Kjellbom P (1987) Preparation of high-purity plasma-membranes. *Meth. Enzymol.* 148: 558-568.
- Li J, Han Y, Zhao Q, Li C, Xie Q, Chong K, Xu Y (2013) The E3 ligase AtRDUF1 positively regulates salt stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(8): e71078.
- Lin CC, Kao CH (2001) Cell wall peroxidase against ferulic acid, lignin, and NaCl-reduced root growth of rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 158(5): 667-671.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* 31(6): 699-712.
- Mani S, Van De Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N (2002) Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128(1): 73-83.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118(4): 1233-1241.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K (2003) Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* t-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44(5): 541-548.
- Parre E, Ghars MA, Leprince AS, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savauré A (2007) Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144(1): 503-512.
- Roosens NH, Thu TT, Iskandar HM, Jacobs M (1998) Isolation of the ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 117(1): 263-271.
- Roychoudhury A, Roy C, Sengupta DN (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Rep.* 26(10): 1839-1859.
- Savauré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N (1997)

- Abcisic acid-independent and abcisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 254(1): 104-109.
- Savouré A, Jaoua S, Hua XJ, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N (1995) Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 372(1): 13-19.
- Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell* 18(10): 2767-2781.
- Strizhov N, Abraham E, Ökrész L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12(3): 557-569.
- Székely G, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E (2008) Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53(1): 11-28.
- Trovato M, Mattioli R, Costantino P (2008) Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei* 19(4): 325-346.
- Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103(3): 771-781.
- Wang H, Datla R, Georges F, Loewen M, Cutler AJ (1995) Promoters from kin1 and cor6.6, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol. Biol.* 28(4): 605-617.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6(2): 251-264.
- Yeo A, Caporn S, Flowers T (1985) The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J. Exp. Bot.* 36(8): 1240-1248.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7(5): 751-760.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38(10): 1095-1102.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6(2): 66-71.