

بررسی پروتئوم برگ کلزای بهاره تحت تنش شوری

Proteomic Analysis of Spring Rapeseed Leaves under Salt Stress

نیما دولت‌آبادی^۱، محمود تورچی^{۲*}، مصطفی ولیزاده^۲، علی بنده‌حق^۳
Nima Dolatabadi¹, Mahmoud Toorchi^{2*}, Mostafa Valizadeh¹, Ali Bandehagh¹

۱- دانشجوی دکتری ۲- استاد ۳- دانشیار
گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۹)

چکیده

شوری یکی از مشکلات اساسی در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌رود. کلزا به علت کیفیت بالای روغن دانه، مقادیر زیاد اسیدهای چرب اشباع نشده و عملکرد بیشتر روغن در واحد سطح نسبت به دیگر دانه‌های روغنی، برتری دارد. اگرچه کلزا جزو گیاهان نیمه متحمل به شوری طبقه بندی می‌شود ولی در شوری بالاتر از حد آستانه، کاهش عملکرد بیشتری از سایر نباتات زراعی نشان می‌دهد، به همین دلیل اصلاح آن برای افزایش تحمل به تنش شوری ضروری به نظر می‌رسد. جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و مورفوفیزیولوژیکی تحمل به تنش شوری، تغییرات بیان پروتئین‌های رقم متحمل Safi7 تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. شوری از نوع کلرید سدیم با سطوح صفر (شاهد)، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار (mM) باعث کاهش معنی دار وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، پتاسیم برگ و نسبت K^+/Na^+ برگ و افزایش میزان سدیم برگ گردید. الکتروفورز دو بعدی متجر به شناسایی ۱۱۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شد، که از بین آنها ۳۷ لکه براساس شاخص فاکتور القا (Induction Factor)، دارای تغییرات بیان معنی‌دار بودند. پنج لکه پروتئینی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید، که یک لکه افزایش بیان و چهار لکه دیگر کاهش بیان نشان دادند. شناسایی این لکه‌ها با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی LC-MS/MS صورت گرفت، که پروتئین‌های شناسایی شده در چرخه تولید انرژی و فتوسنتز نقش داشتند.

واژه‌های کلیدی

کلزا،
پروتئوم،
تنش شوری،
الکتروفورز دو بعدی،
LC-MS/MS

مقدمه

شوری خاک مسئله‌ای جهانی است که تولید محصولات کشاورزی را با مشکل مواجه ساخته است (Joseph et al. 2010). شوری به عنوان یکی از مهمترین تنش‌های محیطی، میانگین عملکرد گیاهان زراعی را تا حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (Kandil et al. 2012). دانه‌های روغنی جایگاه سوم را در تامین نیازهای غذایی بشر بر عهده دارند، که در این بین گونه‌های کلزا از اهمیت زیادی برخوردارند (Gunstone 2004). با توجه به اینکه شوری آب و خاک از مهمترین عوامل محدودکننده تولید کلزا به شمار می‌روند (Purty et al. 2008)، اصلاح و به کارگیری ارقام متحمل می‌تواند راهکاری مناسب جهت حفظ میزان تولید در مواجهه با تنش شوری باشد (Ashraf and Akram 2009).

تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای موجب کاهش صفات رشدی نظیر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن و سطح برگ می‌شود (Zamani et al. 2011; Kandil et al. 2012; Su et al. 2013). در کلزا ژنوتیپ‌ها و ارقام با درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای بالا تحت تنش شوری، در سایر مراحل رشدی نیز نسبت به تنش شوری تحمل بیشتری از خود نشان داده و عملکرد بهتری دارند (Athar et al. 2009) و این امر اهمیت مطالعه تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای را دو چندان می‌نماید.

سطح بالای شوری خاک و آب آبیاری بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی را به دلیل افزایش فشار اسمزی محلول خاک و همچنین ایجاد عدم تعادل در عناصر مورد نیاز گیاه تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش تقسیم و رشد سلولی می‌شود (Gama et al. 2007). از طرف دیگر تنش شوری تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) را در سلول‌های گیاهی افزایش می‌دهد (Khan and Panda 2008). ROS ها بسیار فعال و سمی هستند و می‌توانند از طریق آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌های غشا و اسیدهای نوکلئیک منجر به مرگ سلولی شوند (Guo et al. 2012). به طور کلی در گیاهان عالی دو مکانیسم جهت تحمل شوری شناخته شده است: در مکانیسم اول، گیاه در عکس العمل به تنش شوری، یون‌های سمی مانند سدیم و

کلر را از برگ‌های خود دفع می‌کند (de Lacerda et al. 2005). در مکانیسم دوم، یون‌های جذب شده بوسیله سلول‌ها در واکنش‌ها انباشته می‌شوند (Parida and Das 2005). وجود غلظت بالای یون سدیم تعادل غذایی را بهم زده و باعث سمیت یونی و اختلال در تنظیم اسمزی می‌گردد (Munns and Tester 2008). از طرف دیگر غلظت بالای کاتیون‌هایی مثل Na^+ که از عناصر اصلی شوری هستند در بافت‌های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل و یا حتی می‌تواند از انجام آنها ممانعت به عمل آورد و سنتز پروتئین‌های لازم تحت چنین شرایطی دستخوش تغییرات کمی و کیفی می‌شود، که به نوبه خود باعث اختلال در فرایند رشد می‌گردد (Mer et al. 2000).

تنش‌های محیطی معمولاً باعث اختلالات پروتئینی می‌گردند (Joseph and Jini 2010). گیاهان در مواجهه با شرایط واجد تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری بر تنش وارد شده غلبه می‌کنند (Turan et al. 2012). این عمل از طریق تغییر بیان ژن‌ها در جهت کاهش و یا افزایش میزان پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها نه تنها می‌توانند به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرند، بلکه نقشی اساسی در سازگاری به تنش‌های محیطی ایفا کنند (Joseph and Jini 2010). از این رو مطالعه پروتئین‌های مذکور جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی تحمل به تنش‌های محیطی ضروری به نظر می‌رسد. رهیافت پروتئومیک ابزاری قدرتمند و مناسب جهت بررسی تغییرات بیان و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی است (Sobhanian et al. 2011). از طرفی تجزیه پروتئومیک یکی از بهترین راهبردها جهت بررسی دینامیک تظاهر پروتئین‌ها تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Guo et al. 2012).

در این پژوهش مکانیسم‌های فیزیولوژیکی تحمل به تنش شوری در رقم متحمل کلزا با استفاده از رهیافت پروتئومیک مورد مطالعه قرار گرفت. برای شناسایی پروتئین‌ها و مسیرهای مولکولی دخیل در ایجاد تحمل به تنش شوری از طیف‌سنجی جرمی به روش LC-MS/MS بهره‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش کلزای بهاره متحمل به شوری Safi7 (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج) در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) به روش کشت هیدروپونیک ارزیابی شد (Dolatabadi et al. 2016). تیمار شوری از نوع کلرورسدیم در سه سطح صفر (شاهد)، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار (mM)، یک هفته پس از استقرار گیاهچه‌ها در بستر کاشت به شکل طرح بلوک‌های کامل تصادفی اعمال گردید. سپس تنش تدریجی به میزان ۵۰ میلی‌مولار در روز تا رسیدن به مقدار مورد نظر اعمال شد.

۲۸ روز پس از اعمال تنش و در پایان مرحله رویشی صفت‌های وزن خشک قسمت هوایی، ارتفاع بوته و میزان یون‌های سدیم و پتاسیم اندازه‌گیری شد. وزن خشک قسمت هوایی بعد از خشک شدن نمونه‌ها در دمای 75°C به مدت ۴۸ ساعت، تعیین گردید. برای اندازه‌گیری یون‌های Na^+ و K^+ از نمونه‌های خشک شده در دمای 75°C استفاده شد. حل کردن نمونه‌های گیاهی با استفاده از اسید نیتریک ۷/۲ نرمال و حرارت دادن آنها روی هات پلیت انجام شد. اندازه‌گیری یون‌های سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه فلاپم فتومتر (Model PFP/C, Germany) صورت گرفت (Toorchi et al. 2010).

تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام پذیرفت و برای تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم‌افزارهای کامپیوتری IBM SPSS Statistics 20, MSTATC و Excel استفاده شد.

به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری، سومین برگ رشد یافته تحت شرایط شاهد و تیمار ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، در سه تکرار به طور جداگانه برداشت و داخل فویل آلومینیومی بسته‌بندی شده و نمونه‌ها داخل ازت مایع منجمد و تا استخراج پروتئین در فریزر -80°C نگهداری شدند. جهت استخراج پروتئین کل برگ از روش TCA/acetone (Salekdeh et al. 2002) استفاده شد. نیم گرم از نمونه برگ منجمد شده توزین و پودر گردید. بعد از خشک شدن، به مقدار

۰/۰۱۲ گرم از پودر پروتئینی داخل تیوب‌های تمیز، وزن شده و ۲۳۰ میلی‌لیتر بافر لیز (اوره، تیو اوره، چپس، آمفولین ۱۰-۳ pH) به آنها اضافه گردید. تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر انجام شد (Bradford 1976). پس از تعیین غلظت نمونه‌ها الکتروفورز دوبعدی انجام شد. بعد اول الکتروفورز بر اساس Iso Electric Focusing (IEF) انجام گرفت. برای این منظور ژل‌های لوله‌ای با اوره هشت مولار، پلی‌آکرلامید ۳/۵ درصد، NP-40 ۲ درصد، آمفولیت، آمونیوم پرسولفات و TEMED تهیه گردید. الکتروفورز بعد اول به صورت سه مرحله‌ای (۲۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت) انجام شد. بعد دوم به روش SDS-PAGE با ژل پلی‌آکرلامید ۱۵ درصد و رنگ‌آمیزی ژل‌ها پس از اتمام الکتروفورز بعد دوم با آبی کوماسی صورت گرفت.

تصویربرداری از ژل‌ها با استفاده از اسکنر Bio-Rad GS-800 بلافاصله بعد از رنگ‌زدایی انجام شد. سپس ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار PDQuest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون t -استیوندت برای داده‌های کمی هر لکه توسط نرم‌افزار انجام و لکه‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند. لکه‌های مورد نظر جهت انجام آزمایشات طیف‌سنجی جرمی به آزمایشگاه پروتئومیکس و طیف‌سنجی جرمی (Alberta Proteomics and Mass Spectrometry Facility) دپارتمان بیوشیمی در دانشکده پزشکی و دندانپزشکی دانشگاه آلبرتا در کانادا فرستاده شدند. نمونه‌ها با استفاده از روش LC-MS/MS طیف‌سنجی شده و لیستی از پروتئین‌ها بر اساس انطباق پپتیدهای شناسایی شده با توالی‌های پروتئینی موجود در بانک‌های اطلاعاتی توسط نرم‌افزار Sequest برای هر لکه ارائه گردید. برای شناسایی نهایی پروتئین‌ها از داده پایگاه UniprotKB استفاده شد.

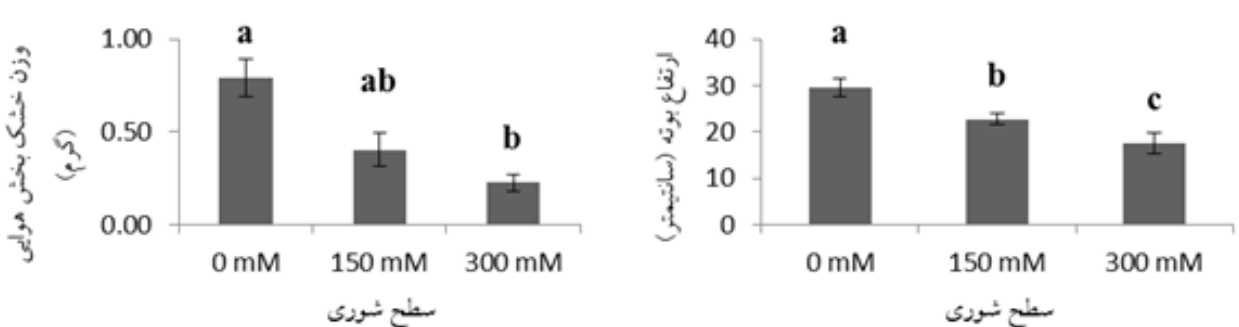
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در Safi7 تحت تنش شوری

Table 1. Analysis of variance for studied traits in Safi7 under salinity treatments.

* و **: بترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* Significant at the 5% probability level; ** significant at the 1% probability level; ns: Not significant.

میانگین مربعات						منابع تغییر
درجه آزادی	وزن خشک بخش هوایی	ارتفاع بوته	میزان سدیم برگ	میزان پتاسیم برگ	نسبت پتاسیم به سدیم برگ	
۲	۰/۰۷۹ ^{ns}	۲۵/۲۶۶*	۴۰۲/۵۸۹ ^{ns}	۷۲/۸۷۳ ^{ns}	۱/۰۸۵ ^{ns}	تکرار
۲	۰/۲۵۳*	۱۰۹/۰۶۶**	۵۷۹۴/۳۹۹**	۷۹۰/۸۱۱*	۲۷/۷۱۵**	شوری
۴	۰/۰۳۱	۲/۶۳۵	۳۰۹/۵۰۹	۵۳/۳۱۲	۰/۴۶۰	خطا
	۳۷/۳۴	۶۷۸	۳۴/۶۰	۲۲/۶۲	۳۰/۳۰	ضریب تغییرات (%)



شکل ۱- تأثیر تنش شوری (۰، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی مولار) بر وزن خشک بخش هوایی و ارتفاع بوته Safi7. حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 1. Effects of salinity treatments (0, 150, 300 mM NaCl) on shoot dry weight and shoot height of Safi7. Columns with the same letters are not significantly different at (P>0.05) levels by Duncan's multiple range test.

سریعتر از شاخص‌های مورفولوژیکی دیگر کاهش می‌یابد (Bandehagh et al. 2013; Hajiaghahi Kamrani et al. 2013).

گزارشات متعددی مبنی بر افزایش میزان سدیم در بخش هوایی و همچنین نسبت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی در اثر تنش شوری وجود دارد (Ashraf and McNeilly 2004; Parida and Das 2005). همین گزارش‌ها حاکی از کاهش میزان پتاسیم در بخش هوایی و ریشه بر اثر تنش شوری است که به دلیل رابطه آنتاگونیستی یون Na^+ با یون K^+ رخ می‌دهد. بطوری که حضور یون Na^+ به مقدار فراوان در محیط مانع جذب یون K^+ می‌شود.

نتایج و بحث

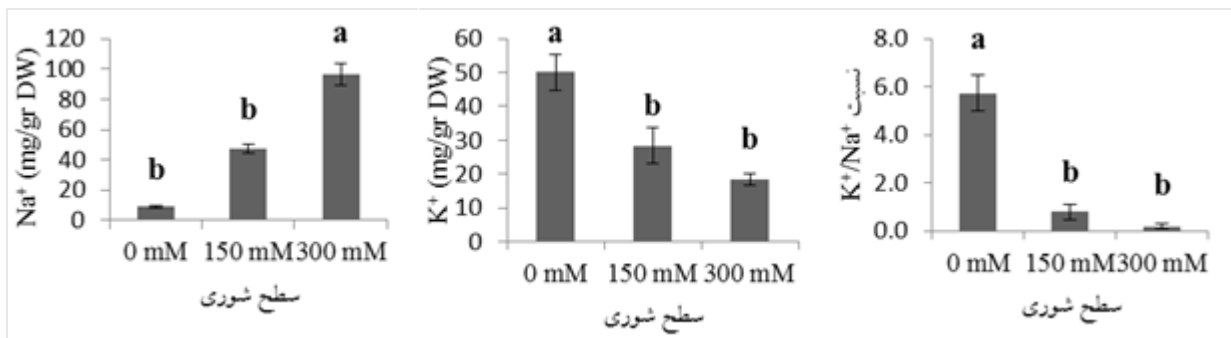
در تمامی صفات بین سطوح تنش شوری، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع بوته در اثر تنش شوری کاهش معنی‌داری پیدا کردند (شکل ۱). مطالعات پیشین نیز چنین کاهشی را نشان داده‌اند (Ashraf and McNeilly 2004; Bahrani 2013; Gul et al. 2014). در اثر تنش شوری، گسترش سطح برگ و ارتفاع خیلی

در این پژوهش نیز این موضوع به وضوح مشاهده شد (شکل ۲). غلظت بالای یون Na^+ در بافت‌های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کرده و یا حتی می‌تواند از اجرای آنها ممانعت به عمل آورد (Mer et al. 2000).

الکتروفورز دو بعدی منجر به شناسایی ۱۱۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شد. از بین ۱۱۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر ظاهر شده در ژنوتیپ Safi7، ۳۷ لکه براساس شاخص فاکتور القا (IF)، دارای تغییرات بیان معنی‌دار بودند و پنج لکه پروتئینی با انجام آزمون t-استیودنت در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید. لکه ۷۲۰۴ افزایش بیان و لکه‌های ۳۴۰۳، ۴۱۰۴، ۶۲۰۱ و ۷۲۰۴ کاهش بیان نشان دادند (شکل ۳).

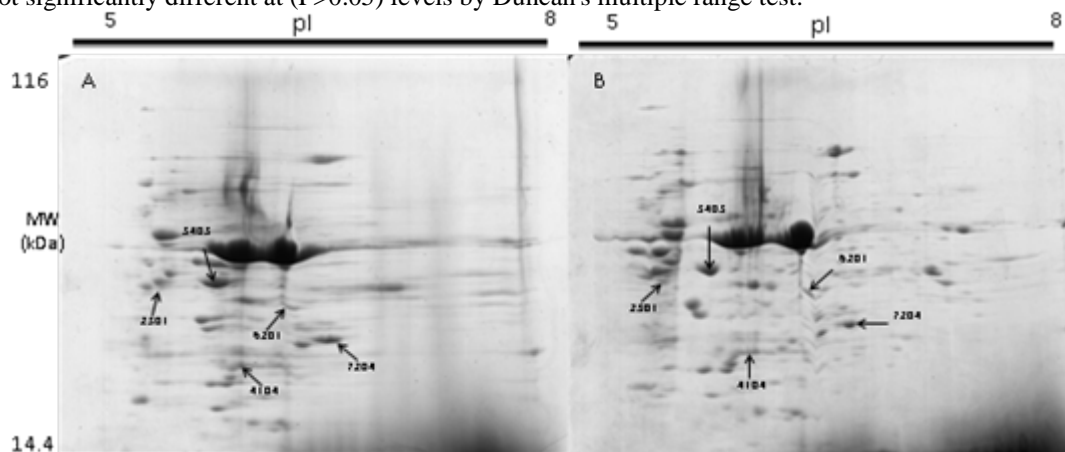
در این پژوهش نیز این موضوع به وضوح مشاهده شد (شکل ۲). غلظت بالای یون Na^+ در بافت‌های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کرده و یا حتی می‌تواند از اجرای آنها ممانعت به عمل آورد (Mer et al. 2000).

گزارشات متعددی مبنی بر افزایش میزان سدیم در بخش هوایی و همچنین نسبت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی در اثر تنش شوری وجود دارد (Ashraf and McNeilly 2004; Parida and Das 2005). همین گزارش‌ها حاکی از کاهش میزان پتاسیم در بخش هوایی و ریشه بر اثر تنش شوری است که به دلیل رابطه آنتاگونیستی یون Na^+ با یون K^+ رخ می‌دهد. بطوری که حضور یون Na^+ به مقدار فراوان در محیط مانع جذب یون K^+ می‌شود.



شکل ۲- تأثیر تنش شوری (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار) بر روابط یونی Safi7. حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 2. Effects of salinity treatments (0, 150, 300 mM NaCl) on ionic relations of Safi7 leaves. Columns with the same letters are not significantly different at ($P>0.05$) levels by Duncan's multiple range test.



شکل ۳- ژل‌های الکتروفورز دو بعدی برگ Safi7 تحت شرایط فاقد تنش (A) و شوری ۳۰۰ میلی مولار (B). شماره لکه‌های با تغییرات بیان معنی‌دار که تیپ‌سنجی شدند در ژل‌ها نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Representative 2-DE gels of Safi7 leaves under 0 (A) and 300 mM (B) NaCl treatment. Numbered spots correspond to salt-responsive proteins, which analyzed by LC-MS/MS.

جدول ۲- پروتئین‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ در پروتئوم برگ ژنوتیپ Safi7.

Table 2. Identification of differentially expressed proteins of Safi7 leaves after salt stress.

شماره لکه	نام پروتئین	درصد همپوشانی	گونه مرجع	شماره دسترسی*	تئوری		آزمایشی		فاکتور القا
					pI	MW	pI	MW	
۲۳۰۱	Fructose-bisphosphate aldolase	۳۵/۷۷	<i>Brassica napus</i>	A0A078DMP5	۴۱/۳	۵/۸۵	۳۸/۹۸	۵/۵۹	۲/۴۷۰۷
۳۴۰۳	Phosphoribulokinase	۳۳/۱۰۰	<i>Brassica napus</i>	A0A078GC16	۴۴/۴	۵/۷۷	۴۲/۳۱	۵/۸۲	۰/۰۶۶۷
۴۱۰۴	Triosephosphate isomerase	۶۵/۳۵	<i>Brassica napus</i>	A0A078CJ83	۲۷/۲	۵/۸۳	۲۴/۹۶	۶/۰۵	۰/۰۶۲۲
۶۲۰۱	Malate dehydrogenase	۴۶/۳۹	<i>Brassica napus</i>	A0A078DKQ9	۳۵/۷	۶/۵۵	۳۶/۰۳	۶/۴۲	۰/۳۸۰۲
۷۲۰۴	BnaC08g04620D protein	۵۳/۲۶	<i>Brassica napus</i>	A0A078IBV0	۲۹/۹	۶/۵۴	۳۱/۴۷	۶/۶۰	۰/۴۰۰۸

*Accession number according to UniprotKb data base. UniprotKB داده پایگاه شماره دسترسی بر اساس

شوری (Tanou *et al.* 2009) در پژوهش‌های مختلف گزارش شده‌است (Bandehagh *et al.* 2011; Podda *et al.* 2013).

پروتئین‌های دخیل در تولید انرژی

لکه ۲۳۰۱ که تحت تنش شوری افزایش بیان پیدا کرده‌است مربوط به پروتئین فروکتوز بیس فسفات آلدولاز (Fructose-bisphosphate aldolase) می‌باشد، که آنزیم کلیدی در مسیر گلیکولیز قندها است و واکنش شکسته شدن D- فروکتوز ۱،۶- بیس فسفات (D-fructose 1,6-bisphosphate) به دی هیدروکسی استون فسفات (Dihydroxyacetone phosphate) و D- گلیسرآلدئید ۳- فسفات (-3- D-Glyceraldehyde phosphate) را کاتالیز کرده و نقش مهمی در تولید انرژی برعهده دارد (Murad *et al.* 2014). علاوه بر این، آلدولاز می‌تواند بطور مستقیم و فیزیکی با H⁺-ATPase تونوپلاست تعامل داشته باشد و فعالیت نقل و انتقالی آنرا فعال کند و بدین ترتیب نقش مهمی در بسته‌بندی یون‌های موثر شوری در واکوئل برعهده دارد (Parihar *et al.* 2014). تغییرات بیان این آنزیم در بسیاری از مطالعات پیشین و در گیاهان مختلف گزارش شده‌است. کاهش بیان این آنزیم در برگ‌های گندم دوروم (Caruso *et al.* 2008) و نیشکر (Murad *et al.* 2014) گزارش شده‌است. با این حال گزارش‌های

این لکه‌ها جهت شناسایی پروتئین مربوطه از ژل‌ها استخراج و طیف‌سنجی شدند. پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار از نظر عملکرد در دو گروه اصلی، پروتئین‌های دخیل در تولید انرژی و پروتئین‌های فتوسنتزی قرار گرفتند (جدول ۲).

پروتئین‌های فتوسنتزی

لکه ۳۴۰۳ مربوط به پروتئین فسفوریبولوکیناز (Phosphoribulokinase)، که با تسریع فسفریلاسیون وابسته به ATP ریبولوز ۵ فسفات به ریبولوز ۱،۵- بیس فسفات، در چرخه تولید کربوهیدرات نقش دارد، کاهش بیان یافت. کاهش فعالیت این پروتئین در گندم دوروم (Caruso *et al.* 2008) و کلزا (Bandehagh *et al.* 2011) تحت تنش شوری گزارش شده است.

کاهش آسمیلاسیون CO₂ با کاهش در فراوانی چند آنزیم مرتبط با آسمیلاسیون CO₂ از جمله فسفوریبولوکیناز در گیاهان مرتبط است (Caruso *et al.* 2008). پروتئین فسفوریبولوکیناز باعث تسریع فسفریلاسیون وابسته به ATP ریبولوز ۵ فسفات به ریبولوز ۱،۵- بیس فسفات شده، که یک مرحله مهم در مسیر پنتوز فسفات به حساب می‌آید که به نوبه خود در آسمیلاسیون CO₂ نقش دارد. کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی مثل فسفوریبولوکیناز به عنوان یک راهکار موثر در مواجهه با تنش

در سلول حفظ شده و در نتیجه واکنش مالات دهیدروژناز را به سمت تشکیل آگزالواستات بکشاند. چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA) یکی از مراحل تخریب قندها است که طی آن پیرووات حاصل از گلیکولیز به انرژی تبدیل می‌شود. پیرووات طی یک سری واکنش‌های منظم، اکسید شده به استیل تبدیل می‌شود. استیل حاصل با کوآنزیم A ترکیب شده استیل کوآنزیم A را می‌سازد. چرخه TCA با ترکیب واحد چهارکربنی آگزالواستات و واحد دو کربنی گروه استیل از استیل کوآنزیم A شروع و با تبدیل مالات به آگزالواستات که توسط آنزیم دهیدروژناز کاتالیز می‌شود، به پایان می‌رسد. در طی چرخه کربس چهار مرحله اکسایش انجام می‌گیرد که منجر به خروج دو مولکول دی‌اکسید کربن شده و انرژی حاصل از این اکسیداسیون‌ها صرف احیاء سه مولکول NAD^+ و یک مولکول FAD و تولید یک مولکول GTP یا ATP شده، و در پایان چرخه، یک مولکول آگزالواستات مجدداً تولید می‌شود. تغییرات بیان این آنزیم در گیاهان مختلف تحت تنش شوری گزارش شده است (Dooki et al. 2006; Jiang et al. 2008; Wang et al. 2007). این آنزیم در سیتوسل، میتوکندری و پراکسی زوم، وابسته به NAD^+ و در کلروپلاست وابسته به $NADP^+$ می‌باشد. در سیتوسل، آنزیم مالات دهیدروژناز وابسته به NAD^+ واکنش تبدیل آگزالواستات به مالات را کاتالیز کرده، سپس مالات از طریق ناقل دکربوکسیلات وارد میتوکندری شده و در آنجا وارد چرخه TCA می‌شود. این موضوع عملکرد بهتر این چرخه را در پی دارد (Kumar et al. 2000). افزایش بیان این آنزیم در راستای حفظ عملکرد چرخه TCA (Wang et al. 2008) و یا جبران افزایش تقاضا برای ATP جهت رشد سریع در گیاهچه‌های جوان ارزیابی شده است (Dooki et al. 2006). با این حال کاهش بیان این آنزیم در ریشه آرابیدوپسیس (Jiang et al. 2007)، ریشه گندم (Guo et al. 2012) و ریشه کلزا (Banaei-Asl et al. 2015) گزارش شده است، که این کاهش بیان با افزایش تحمل تنش شوری مرتبط دانسته شده است. افزایش بیان مالات دهیدروژناز به منظور افزایش کارایی چرخه TCA در جهت تامین بیشتر ATP از طریق گلیکولیز قندها، برای مقابله با اثرات منفی تنش شوری از جمله ROS ها باعث تخلیه گیاه از نظر منابع قندی شده، که تولید این منابع در اثر بسته شدن

بسیاری نیز در رابطه با افزایش فراوانی این آنزیم تحت تنش شوری در برگ گندم (Gao et al. 2011)، ریشه کلزا (Toorchi et al. 2013) و همچنین برگ کلزا (Toorchi et al. 2014) در دست می‌باشد. افزایش بیان این آنزیم تحت تنش شوری در ارقام متحمل به عنوان نقش مهمی که این آنزیم در آسیمیلایون در شرایط بی‌هوای ایجاد شده بوسیله تنش شوری برعهده دارد، تعبیر شده است (Sobhanian et al. 2011).

لکه ۴۱۰۴ که مربوط به پروتئین تریوز فسفات ایزومراز (Triosephosphate isomerase) می‌باشد، کاهش بیان نشان داد. این پروتئین واکنش تبدیل دو طرفه دی‌هیدروکسی استون فسفات و دی‌گلیسرآلدئید تری فسفات را کاتالیز کرده و در چرخه تولید انرژی نقش اساسی بر عهده دارد. افزایش بیان این آنزیم در برگ گندم نان (Wang et al. 2008; Gao et al. 2011)، گندم دوروم (Caruso et al. 2008) و برگ کلزا (Banaei-Asl et al. 2015; Toorchi et al. 2014) تحت تنش شوری گزارش شده است. به نظر می‌رسد افزایش بیان این آنزیم به علت نیاز به انرژی جهت سمیت‌زدایی و بازسازی آسیب‌های ناشی از تخریب اکسیداتیو باشد. با این حال کاهش فعالیت این پروتئین در پروتئوم برگ‌های گندم (Kang et al. 2012) و ریشه کلزا (Banaei-Asl et al. 2015) گزارش شده است. بیان تریوز فسفات ایزومراز به عنوان یک پروتئین سیتوپلاسمی، تحت تنش متیل گلائیوکسال افزایش می‌یابد ولی در اثر تنش‌هایی که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود فعالیت آن احتمالاً کاهش یافته و بنا به روش تنظیم ژن این پروتئین، بیان آن نیز کاهش می‌یابد (Sharma et al. 2012).

لکه ۶۲۰۱ که کاهش بیان نشان داده است مربوط به پروتئین مالات دهیدروژناز (Malate dehydrogenase) می‌باشد. این آنزیم که واکنش تبدیل مالات به آگزالواستات و برعکس را کاتالیز می‌کند، در تولید انرژی نقش دارد. در شرایط ترمودینامیکی استاندارد، تعادل این واکنش بیشتر به سمت تولید مالات می‌باشد، ولی آگزالواستات در سلول‌های سالم بطور مداوم توسط واکنش به شدت انرژی‌زای سترات سنتاز برداشت می‌شود و این امر سبب می‌گردد تا غلظت آگزالواستات در مقادیر فوق العاده پایین

پروتئین شناسایی نشده

لکه ۷۲۰۴ با اینکه به طور دقیق شناسایی نگردید، ولی در گیاه کلزا پیش از این نیز گزارش شده است و در داده پایگاه UniprotKB دارای کد دسترسی می باشد. مطمئناً شناسایی دقیق تر این پروتئین به درک بهتر فرآیند تحمل در گیاه کلزا تحت تنش شوری خواهد کرد.

به طور کلی چنین نتیجه گیری می شود که تنش شوری باعث کاهش معنی دار وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته و میزان پتاسیم برگ و افزایش میزان سدیم برگ گردید. با توجه به داده های حاصل از تجزیه پروتئوم، ژنوتیپ Safi7 با فعال سازی آنزیم های درگیر در تولید انرژی، و حفظ کارایی چرخه TCA و فتوسنتز به تنش شوری پاسخ می دهد. افزایش بیان آنزیم فروکتوز بیس فسفات آلدولاز با دخالت در مسیر گلیکولیز قندها موجب تولید انرژی بیشتر شده و از طرف دیگر این آنزیم بطور مستقیم و فیزیکی با H^+ -ATPase تونوپلاست تعامل داشته و فعالیت نقل و انتقالی آنرا فعال می کند و نقش مهمی در بسته بندی یون های موثر شوری در واکوئل برعهده دارد و با کمک به دفع یون های نامطلوب (Na^+ و Cl^-) و جذب یون مطلوب (K^+) در ایجاد هومئوستازی درون سلولی نقش داشته و منجر به افزایش تحمل رقم Safi7 نسبت به تنش شوری در مرحله گیاهچه ای شده است.

روزنه ها تحت تنش اسمزی و کمبود دی اکسید کربن با سختی همراه شده است و باعث افت عملکرد و رشد گیاه می شود.

گیاهان در مواجهه با تنش شوری نرخ تولید ATP را در جهت کاهش تولید ROS ها کاهش می دهند (Jiang et al. 2007). با این حال تولید بیشتر انرژی از یک طرف در مراحل اولیه به رشد سریع گیاه کمک می کند (Murad et al. 2014) و از طرف دیگر فعال سازی مسیرهای تولید انرژی جهت تامین انرژی مورد نیاز بیوسنتز پروتئین های پاسخ دهنده و اسمولیت ها و به همان نحو انتقال فعال یون های نمک تحت تنش شوری لازم و ضروری به نظر می رسد (Banaei-Asl et al. 2015). در این مطالعه نیز ژنوتیپ Safi7 با افزایش بیان آنزیم دخیل در مسیر گلیکولیز (فروکتوز بیس فسفات آلدولاز) ATP مورد نیاز خود را تحت تنش شوری تامین کرده است. فراوانی ملات دهیدروژناز که از آنزیم های کلیدی چرخه TCA می باشد در ژنوتیپ Safi7 کاهش یافته است. از آنجاییکه پیش ماده مورد نیاز چرخه TCA محصول نهایی گلیکولیز قندها یعنی پیروات می باشد، می توان اینگونه توجیه نمود که ژنوتیپ Safi7 آنزیم های مسیر گلیکولیز قند را تحت تنش شوری فعال کرده و با افزایش میزان پیروات به عنوان پیش ماده مورد نیاز چرخه TCA کارکرد این چرخه را تضمین نموده و با کاهش بیان آنزیم ملات دهیدروژناز میزان تولید ATP را با وجود کاهش منابع قندی در دسترس در اثر کمبود CO_2 ، بواسطه بسته شدن روزنه ها در اثر تنش اسمزی، مدیریت می نماید.

منابع

- Ashraf M, Akram NA. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances* 27:744–752.
- Ashraf M, McNeilly T. 2004. Salinity Tolerance in Brassica Oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:157–174.
- Athar HR, Ashraf M, Wahid A, Jamil A. 2009. Inducing salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) by exogenous application of glycinebetaine and proline: Response at the initial growth stages. *Pakistan Journal of Botany* 41:1311–1319.
- Bahrani A. 2013. Effect of Salinity on Growth , Ions Distribution , Accumulation and Chlorophyll Concentrations in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 13:683–689.
- Banaei-Asl F, Bandehagh A, Uliaei ED, 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.
- Bandehagh A, Salekdeh GH, Toorchi M, Mohammadi A, Komatsu S. 2011. Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics* 11:1965–1975.
- Bandehagh A, Uliaie ED, Salekdeh GH. 2013. Proteomic analysis of rapeseed (*Brassica napus* L.) seedling roots under salt stress. *Annals of Biological Research* 4:212–221.

- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248–254.
- Caruso G, Cavaliere C, Guarino C, Gubbiotti R, Foglia P, Laganà A. 2008.** Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:381–390.
- de Lacerda CF, Cambraia J, Oliva MA, Ruiz HA. 2005.** Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environmental and Experimental Botany* 54:69–76.
- Dolatabadi N, Toorchi M, Valizadeh M, Bandehagh A. 2016.** Effect of salinity stress on some physiological traits of spring rapeseed genotypes at seedling stage. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 9:135–142.
- Dooki AD, Mayer-Posner FJ, Askari H, Zaiee AA, Salekdeh GH. 2006.** Proteomic responses of rice young panicles to salinity. *Proteomics* 6:6498–6507.
- Gama PBS, Inanaga S, Tanaka K, Nakazawa R. 2007.** Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 6:79–88.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W, Yan Y. 2011.** Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72:1180–1191.
- Gul H, Ahmed R, Hamayun M, Qasim M. 2014.** Growth Performance of Canola Grown Under Different Salinity Regimes. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 4:59–68.
- Gunstone FD. 2004.** Rapeseed and canola oil: production, processing, properties and uses. CRC Press.
- Guo G, Ge P, Ma C, Li X, Lv D, Wang S, Ma W, Yan Y. 2012.** Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *Journal of Proteomics* 75:1867–1885.
- Hajiaghahi Kamrani M, Hosseiniya H, Azam R chegeni. 2013.** Effect of salinity on the growth characteristics Of canola (*Brassica napus* L.). *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 3:2327–2333.
- Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK. 2007.** Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany* 58:3591–3607.
- Joseph B, Jini D, Sujatha S. 2010.** Biological and physiological perspectives of specificity in abiotic salt stress response from various rice plants. *Asian Journal of Agricultural Sciences* 2:99–105.
- Joseph B, Jini D. 2010.** Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences* 9:307–313.
- Kandil a a, Sharief a E, Abido W a E, Ibrahim MMO. 2012.** Response of some canola cultivars (*Brassica napus* L.) to salinity stress and its effect on germination and seedling properties. *Journal of Crop Science* 3:95–103.
- 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 (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824:1324–1333.
- Khan MH, Panda SK. 2008.** Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:81–89.
- Kumar RG, Shah K, Dubey RS. 2000.** Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science* 156:23–34.
- Mer RK, Prajith PK, Pandya DH, Pandey AN. 2000.** Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185:209–217.
- Munns R, Tester M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology* 59:651–681.
- Murad AM, Molinari HBC, Magalhães BS, Franco AC, Takahashi FSC, De Oliveira NG, Franco OL, Quirino BF. 2014.** Physiological and proteomic analyses of *Saccharum* spp. grown under salt stress. *PLoS ONE* 9:1–12.
- Parida AK, Das AB. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324–349.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM. 2014.** Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22:4056–4075.
- Podda A, Checcucci G, Mouhaya W, Centeno D, Rofidal V, Del Carratore R, Luro F, Morillon R, Ollitrault P, Maserti BE. 2013.** Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na⁺ and Cl⁻ accumulation behaviour. *Journal of Plant Physiology* 170:1101–1112.
- Purty RS, Kumar G, Singla-Pareek SL, Pareek A. 2008.** Towards salinity tolerance in *Brassica*: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14:39–49.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. 2002.** A proteomic approach to analyzing drought-and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research* 76:199–219.

- Sharma S, Mustafiz A, Singla-Pareek S, Shankar Srivastava P, Sopory S. 2012.** Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice. *Plant Signaling & Behavior* 7:1337-1345.
- Sobhanian H, Aghaei K, Komatsu S. 2011.** Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *Journal of Proteomics* 74:1323-1337.
- Su J, Wu S, Xu Z, Qiu S, Luo T, Yang Y, Chen Q, Xia Y, Zou S, Huang BL, Huang B. 2013.** Comparison of Salt Tolerance in Brassicas and Some Related Species. *American Journal of Plant Sciences* 4:1911-1917.
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D. 2009.** Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant Journal* 60:795-804.
- Toorchi M, Dolati M, Adalatzadeh-Aghdam S. 2014.** Differentially expressed proteins in canola leaf induced by salt stress-a proteomic approach. *International Journal of Biosciences* 5:433-442.
- Toorchi M, Naderi R, Shakiba MR, Kazemnia H. 2010.** Ion accumulation and water relations in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under salinity. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8: 852-856.
- Turan S, Cornish K, Kumar S. 2012.** Review article Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering. *Australian Journal of Crop Science* 6:1337-1348.
- Wang MC, Peng ZY, Li CL, Li F, Liu C, Xia GM. 2008.** Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics* 8:1470-1489.
- Zamani S, Nezami MT, Bybordi A, Behdad M, Khorshid MB. 2011.** Effect of Different NaCl Salinity on Antioxidant Enzyme Activity and Relative Water in Winter Canola (*Brassica. napus*). *Journal of Research in Agricultural Science* 7:49-57.

Proteomic Analysis of Spring Rapeseed Leaves under Salt Stress

Nima Dolatabadi, Mahmoud Toorchi*, Mostafa Valizadeh, Ali Bandehagh

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

*Corresponding Author: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Abstract

Excess salinity is one of the most important problems of agricultural production. Rapeseed is a superior oilseed due to the high quality of oil, large amounts of polyunsaturated fatty acids and oil yield. Rapeseed is classified as a semi-salt-tolerant plant although yields decrease more than in many other crops when salinity is higher than the threshold. Therefore breeding for increasing salt tolerance would be of interest. Changes of protein expression were investigated in a Safi7 tolerant genotype in order to identify the molecular mechanisms of salinity tolerance in rapeseed. NaCl concentrations of 0 (control), 150 and 300 mM caused a significant increase of Na⁺ content in leaves and a decrease of shoot dry weight, shoot height, leaf K⁺ content and the leaf K⁺/Na⁺ ratio. 110 repeatably-appearing protein spots were identified on two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels and among them, 37 spots showed significant expression changes based on changes in the induction factor (IF). Among them, 5 spots showed significant statistically changes at the 95% confidence level, with 1 spot being up-regulated and the other four spots down-regulated. Identification of the spots was performed by LC-MS/MS mass spectrometry analysis. The identified proteins play a key role in energy production and photosynthesis. Our results indicated that these proteins can also play a role in rapeseeds tolerance to salt stresses.

Key words: Rapeseed, proteome, salt stress, two-dimensional electrophoresis, LC-MS/MS.