مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۸۰-۱۷۰

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5

DOR:20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی پروتئوم رقم متحمل به خشکی سویا با استفاده از روش دی متیل لیبلینگ

Analysis of Soybean Drought-Tolerant Cultivar Proteome Using Dimethyl Labeling Method

عطیه مرادی[۱]، علیرضا افشاریفر*[۲] و علی نیازی[۱]
Atieh Moradi[1], Alireza Afsharifar[2] and Ali Niazi[1]

۱- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
۲- مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
1. Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: afshari@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۴)

چکیده

سویا یکی از مهمترین محصولات تجاری کشاورزی در سرتا سر دنیا است که تولید آن به دلیل آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی محدود شده است. از جمله مهمترین تنش‌ها می توان به خشکی یا کمبود آب خاک اشاره کرد. در این تحقیق از یک نوع روش نشاندار کردن به نام Isotope dimethyl labeling برای پروتئومیکس کمی و یا بررسی تغییرات پروتئینی مرتبط با پاسخ به تنش خشکی در دو رقم حساس و متحمل به خشکی سویا ، استفاده شد. با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از کروماتوگرافی مایع طیف سنجی جرمی LC-MS/MS، ۱۷۷۸۷ پپتید شناسایی شدند که از این تعداد، ۸۷٤ پپتید (مربوط به ۲٦۰ گروه پروتئینی) بعنوان تکرارپذیر و منحصر به فرد (Non-redundant/ unique repeatable peptides) در رقم متحمل، که دارای تغییرات معنادار بیان در مقایسه با رقم حساس بودند تعیین گردیدند. همچنین یافته‌ها نشان داد که از میان این ۲٦۰ گروه پروتئینی در رقم متحمل ، ۱٤۲ (۵۵٪) گروه افزایش بیان و ۱۱۸ (٤۵٪) گروه کاهش بیان نشان دادند. فعالیت و دومین‌های این پروتئین‌های دارای سطوح بیان معنی‌دار، با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های Gene Ontology و InterPro protein domain انجام و نشان داده شد که اکثر این پروتئین‌ها، در گروه‌های پروتئینی مرتبط با سوخت و ساز انرژی، فعالیت‌های فتوسنتزی، مهار گونه‌های فعال اکسیژن، فعالیت کانالی و انتقال مواد، تنظیم کننده‌ی بیان ژن و ترجمه، سوخت و ساز مشتقات قندی و مواد ارگانیک و کاتابولیک قندهای الکلی قرار دارند.

واژه‌های کلیدی

پروتئومیکس،
رقم متحمل به خشکی سویا،
دومین،
نشاندار کردن،
Gene Ontology

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

مقدمه

سویا (Glycine Max (L.) Merr) درکنار ذرت، گندم، برنج و کتان یکی از مهمترین محصولات تجاری کشاورزی در بازارهای جهانی است (Jiang *et al*. 2019). دانه‌های سویا به میزان وسیعی در تغذیه انسان، حیوان و همچنین در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dronne. 2018). سویا از جمله گیاهان ارزشمند دانه‌های روغنی است که بدلیل ارزش غذایی زیاد دانه (حاوی ٤٠٪ پروتئین، و٢٠ ٪ روغن) و پتانسیل بالا در تثبیت بیولوژیک نیتروژن یک گیاه استراتژیک محسوب می شود (شرکت سهامی خاص توسعه کشت دانه‌های روغنی). میزان پروتئین دانه سویا بسیار بیشتر از سایر دانه‌های روغنی بوده و نسبت به سایر دانه‌ها شباهت بیشتری به پروتئین‌های حیوانی دارد. بروز تنش‌های محیطی مختلف، بویژه تنش خشکی در مراحل مختلف رشد گیاه سویا تاثیر بسزایی در کاهش عملکرد دانه سویا می‌گذارد بنحوی که در مناطق نیمه خشک میزان کاهش عملکرد بین ٢٠٪ تا ٤٩٪ تخمین زده شده است (Vogel *et al*. 2019). علیرغم مطالعات گسترده در دهه‌ی اخیر در زمینه پاسخ‌های مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژی، مورفولوژی و آناتومی‌گیاهان در مواجه با خشکی، ابهامات و سوالات زیادی در خصوص چگونگی تاثیر خشکی بر فرایندهای مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه مانند تقسیم سلولی، رشد گیاه، تکامل و تولید مثل ، وجود دارد و از جمله موضوعات مهم و جالب تحقیقاتی برای بسیاری از زیست شناسان گیاهی است (Demiral *et al*. 2011). افزایش تحمل محصولات کشاورزی به شرایط کم آبی یکی از مهمترین راهکارهای اقتصادی برای افزایش تولید محصولات کشاورزی و کاهش مصرف آب است که برای رسیدن به این هدف مهم شناسایی سازوکارها و فاکتورهای دخیل در تحمل به تنش خشکی ضروری می باشند.

مطالعات مولکولی و ژنتیکی در گیاه مدل آرابیدوپسیس، باعث افزایش دانش ما در مورد پایه و اساس مولکولی پاسخ‌های گیاه به تنش خشکی گردیده و نشان داده است شبکه‌ای متشکل از اجزای علامت‌دهی و فاکتورهای رونویسی، فرآیند تحمل به خشکی را تنظیم می‌کنند (Takahashi *et al*. 2018) که از مهمترین آن‌ها می‌توان به پیام‌رسان‌های ثانویه (کلسیم، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و اینوزیتول فسفات‌ها)، (Saxena *et al*. 2016)، هورمون گیاهی آبسیزیک اسید (ABA) (Takahashi *et al*. 2018). و صدها ژن تنظیم کننده (SnRK2s، MAPKs، DREBs، AREBs، mRNA decapping factors) (Zhu *et al*. 2002) اشاره کرد.

با توجه به پتانسیل بالای پروتئومیکس در آنالیز جامع پروتئین‌ها بویژه تفاوت آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها، مطالعه پروتئوم گیاهان در مواجه به تنش شوری یا خشکی می‌تواند به فهم دقیق‌تری از چگونگی پاسخ سلول‌ها و موجودات زنده به این تنش‌ها در سطح پروتئین کمک نماید. در این شاخه از علم علاوه بر بررسی پروتئین‌هایی که در یک سلول دریک شرایط مشخص بیان می‌شوند، عملکرد و رفتار پروتئین‌ها، برهمکنش‌های میان پروتئین‌های مختلف و تغییرات پس از ترجمه نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

با استفاده از روش‌های مختلف کمی سازی پروتئومیکس مانند پروتئومیکس مبتنی بر نشان دار کردن با ایزوتوپ‌های پایدار (Stable isotope labelling-based quantitative proteomics) و پروتئومیکس مستقل از نشان دار کردن (Label-free quantitative proteomics) ، نشان داده شد که در مواجه با تنش خشکی، مسیرهای تنظیم اسمزی، سیگنالینگ ردکس (Redox signaling)، سیگنالینگ کلسیم، تولید و تنظیم انرژی و مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول، در گیاهان سویا نقش ایفا می‌کنند (Wang *et al*. 2017). همچنین نشان داده شده است که تحت تنش خشکی میزان پروتئین‌های پراکسیداز وآلدهید دهیدروژیناز افزایش پیدا می‌کنند (Khan *et al*. 2016). این یافته‌ها با واکنش‌های عمومی پاسخ به خشکی در مطالعات پروتئومیکس گیاهان مدل، محصولات زراعی مهم و گیاهان چوبی در معرض تنش خشکی، با توجه به تغییرات مهمی که در مسیرهای سیگنالینگ، پاکسازی فعال اکسیژن، تنظیم اسمزی، بیان ژن، سنتز پروتئین و متابولیسم کربوهیدرات و انرژی صورت می‌گیرد، مطابقت دارد (Wu *et al*. 2019).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

استفاده از دو نوع رقم متحمل به خشکی و حساس به خشکی در مطالعات کمی پروتئومیکس گیاهان زراعی تحت تنش خشکی، باعث ایجاد چشم‌اندازی جدید در فهم ساز و کار مولکولی تحمل به خشکی شده است (Wang *et al*. 2017) . به عنوان مثال در یک مطالعه‌ی پروتئومیکس بر روی دو رقم سویا نشان داده شد که در رقم متحمل، پروتئین RNA polymerase transcription II protein-like بیان شده و همچنین میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به طور قابل توجهی افزایش بیان یافته است (Katam *et al.* 2020).

با توجه به نامشخص بودن بسیاری از فرایندهای پاسخ به تنش خشکی در سویا، انجام مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری می‌باشد. بمنظور تشخیص و شناسایی بیشتر پروتئین‌های دخیل در پاسخ سویا به تنش خشکی، در این مطالعه از روش Isotope dimethyl labelling-based quantitative proteomics (Liu *et al*. 2018) و دو رقم متحمل و حساس به خشکی استفاده شد. این روش که از الحاق ایزوتوپ‌های پایدار در سطح پپتیدی، به کمک نشاندار کردن دیمتیل استفاده می‌شود، یک روش مطمئن، کم‌هزینه، با دقت بالا، سریع و دارای واکنش‌های جانبی کمتر نسبت به سایر روش‌های دیگر نشان‌دار کردن، می‌باشد. در این روش می‌توان پپتیدهای نمونه‌های مختلف را با ایزوتوپ‌های پایدار متفاوت نشاندار کرد که باعث ایجاد تفاوت در وزن پپتیدهای مختلف می‌شود که در نهایت می‌توان این پپتیدهارا با هم ترکیب نموده و تنها با انجام یک LC-MS/MS آن‌ها را از یکدیگر متمایز ساخت (Liu *et al*. 2018).

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دپارتمان علوم زیستی دانشگاه علم و صنعت هنگ کنگ انجام شده است و رقم‌های سویا از طریق این دانشگاه تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

کاشت گیاه و القای تنش خشکی: در این پژوهش از دو ژنوتیپ سویا شامل رقم حساس به خشکی (Glycine max cv. Union) و رقم تراژن متحمل به خشکی (Glycine max cv. Longhuang #3) استفاده شد. به منظور جوانه‌زنی، دانه‌های سویا به مدت پنج روز بر روی دستمال کاغذی‌های مرطوب شده با آب دوبار تقطیر قرار داده شد و بعد از این مدت گیاهچه‌های سویا به گلدان‌های پلاستیکی (40 cm × 20 cm × 8 cm) حاوی خاک و ماسه به نسبت ۲:۱ منتقل شدند (هرگلدان حاوی۳۵ گیاهچه). گلدان‌ها در اطاقک رشد با شرایط: دما ۲۳ ±۱ °C، رطوبت ٦٥٪ – ٤٥٪ و شدت نور ۱٤۰–۱۸۰ $\mu E/m^2s^2$ نگهداری شدند. تا زمانی‌که گیاهان به سن ۲۱ روز برسد تمام گلدان‌ها هر روز تا حد اشباع آبیاری شدند (حدود ٦۰۰ میلی‌لیتر آب برای هر گلدان). پس از این مدت (۲۱ روز) تنش خشکی با قطع آبیاری به مدت ۱۰ روز القا شد (Makbul et al. 2011). میزان آب (water content) برگ‌ها در هر دو ژنوتیپ سویا (شکل ۱) در حین تنش خشکی در روزهای ۰، ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ براساس فرمول زیر محاسبه گردید (Yao et al. 2018):

100 Fresh weight × / (Fresh weight - Dry weight)

ده روز پس از اعمال تنش خشکی (سن ۳۱ روزگی گیاه)، گیاهان از بالای کوتیلیدون جدا و به سرعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای ºC ۸۰– نگهداری شدند. این پژوهش با سه تکرار و هر تکرار شامل دو رقم مقاوم و حساس به خشکی انجام گرفت.

استخراج پروتئین کل: چهل و پنج گرم بافت دو رقم فریز شده سویا با استفاده ازهاون از پیش سرد شده و نیتروژن مایع پودر شدند. پودر حاصله با بافر استخراج پروتئین مبتنی بر اوره (Urea-based Extraction Buffer (UEB)) و براساس دستورالعمل مربوطه (Liu et al. 2018) به نسبت ۱ به ٤ وزنی حجمی (w/v) به خوبی مخلوط شد (Guo et al. 2011). در ادامه به منظور رسوب دادن پروتئین از محلول سرد حاوی استون و متانول (۱۲ :v/v) استفاده شد و در نهایت غلظت پروتئین از روش DC assay و کیت مربوطه ی آن (Bio- Rad DC Protein Assay Kit, Hungary) اندازه گیری شد.

هضم آنزیمی پروتئین‌ها (In-Solution Trypsin Digestion): مراحل انجام هضم پروتئین‌های هردو رقم سویا با استفاده از آنزیم تریپسین انجام شد (Liu et al. 2018). در ابتدا به هر تیوب حاوی پروتئین (۱۹۷–۳۱۰ mg/ml) به منظور کاهش باندهای دی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

سولفیدی پروتئین‌ها، ماده احیا کننده دی‌تیوتریتول (DTT) با غلظت نهایی ۵ میلی مولار و سپس به منظور آلکیله کردن اسید امینه‌های سیستئین (جهت جلوگیری از تشکیل پیوندهای دی سولفیدی) محلول آیدواستامید (Iodoacetamide (IAA)) با غلظت نهایی ۵۰ میلی مولار اضافه شد. در مرحله آخر آنزیم ترپیسین به نسبت ۱:۲۰ (1 : 20 w/w) اضافه و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد و سپس اندازه گیری غلظت پپتیدها همانند مرحله ی قبل در مورد پروتئین‌ها، انجام پذیرفت.

نشاندارسازی پپتیدها: مراحل نشاندار کردن پپتیدهای حاصله در هردو رقم سویا به شرح زیر بود (به دلیل سمی‌بودن مواد استفاده شده، تمامی مراحل این قسمت زیر هود شیمیایی با تهویه مناسب صورت گرفت):

در ابتدا، دو نمونه پپتیدی تهیه شده از هر دو رقم حساس و متحمل به خشکی به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی مولار استات سدیم (pH:5.5) با غلظت نهایی ۱ میلی گرم در میلی لیتر حل شدند.. پپتیدهای مربوط به ژنوتیپ حساس به خشکی با ایزوتوپ پایدار سبک (12CH2O, 20% Formaldehyde) و پپتیدهای مربوط به ژنوتیپ متحمل به خشکی با ایزوتوپ پایدار سنگین (13CD2O, 20% ^{13}C, formaldehyde) نشاندار شدند. این واکنش‌ها در حضور محلول ۳ مولار ترکیب سدیم سیانوبوروهیدرات (Sodium cyanoborohydride) انجام شد. پس از پایان واکنش، پپتیدهای نشاندار شده هر دو ژنوتیپ با یکدیگر مخلوط شدند. در نهایت پپتیدهای نشاندار شده با استفاده از کارتریج C18 Sep-Pak (Waters, United Kingdom) نمک زدایی شدند.

جداسازی پپتیدها با استفاده از ستون‌های SCX و WAX: جداسازی پپتیدها با استفاده از دو نوع ستون انجام شد. بدین منظور ابتدا پپتیدهای نشان دار شده با استفاده از ستون SCX (Strong Cation Exchange) (BioPureSPN™ Southborough, MA, USA) و سپس با ستون WAX (Weak Anion Exchange) (BioPureSPN™, Southborough, MA, USA) و براساس دستورالعمل‌های شرکت مربوطه جدا شدند. مزیت جداسازی با هردو نوع ستون نسبت به کارگیری فقط یک نوع ستون این است که، باعث افزایش نرخ بازیابی و جلوگیری کردن از دست رفتن تعداد بیشتری از پپتیدها می‌شود. در مجموع تعداد ۷۴ فرکشن برای هر دو نوع ژنوتیپ سویا به دست آمد. فرکشن‌های بدست آمده از هر دو ستون به وسیله‌ی پیپت تیپ‌های حاوی فیلتر به نام ZipTip (Millipore ZipTip Pipette Tips) نمک زدایی شدند. در نهایت تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی مایع با طیف سنجی جرمی‌متوالی دو گانه (LC-MS/MS) برای فرکشن‌های حاصله انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری و کمی‌سازی پپتیدها (Quantitative phosphoproteomic analysis): داده‌های خام حاصل از LC-MS/MS به منظور کمی‌سازی و مشخص کردن نوع پپتیدها و نقش آن‌ها در ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Mascot Daemon (Version 2.6.0 64-bit, Matrix Science) (Chambers et al. 2012)مبتنی برPSM identification و پایگاه اطلاعاتی NCBI به عنوان پایگاه داده و در ادامه توسط نرم‌افزار SQUA-D (Stable isotope-based Quantitation-Dimethyl labeling, Version 1.0) که مبتنی بر Quantitation است، مورد بررسی قرار گرفتند (Liu et al. 2018). از آنجایی که هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئین‌ها و فاکتورهای دخیل در تحمل به خشکی سویا و همچنین بررسی سطوح تغییرات آن‌ها (افزایش و کاهش بیان) بود، بنابراین فقط به بررسی پروتئین‌های رقم متحمل تحت تنش خشکی پرداخته شد. برای بدست آوردن Fold change پپتیدهای رقم متحمل، سطوح تغییرات یک پپتید در رقم متحمل تقسیم بر سطوح تغییرات همان پپتید در رقم حساس به خشکی شد. در واقع Fold change میزان تفاوت میان رقم متحمل و حساس برای یک نوع پپتید را نشان می‌دهد. مقادیر مثبت Fold change نشان‌دهنده‌ی افزایش بیان پپتید در رقم متحمل به خشکی و مقادیر منفی Fold change نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان پپتید در رقم متحمل به خشکی است.

تجزیه و تحلیل‌های InterPro protein domain و Gene Ontology: بررسی دومین‌ها و فعالیت گروه‌های پروتئینی برای پپتیدهایی که در رقم متحمل و تحت تنش خشکی دارای بیان معناداری بودند، انجام شد. انجام تجزیه و تحلیل دومین‌ها به صورت آنلاین و با استفاده از پایگاه داده DAVID (v6.8) (Database for Annotation, Visualization and Integrated

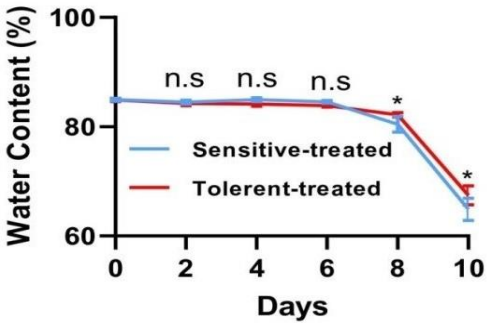
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

Discovery) (https://david.ncifcrf.gov/) صورت گرفت. همچنین تجزیه و تحلیل عملکردی پپتیدها یا Gene Ontology که دارای سه بخش شامل: عملکرد مولکولی (Molecular function:MF) بیان کننده فعالیت‌های صورت گرفته در سلول، جزء سلولی (Cellular component: CC) بیانگر قسمتی از سلول که پروتیین مورد نظر در آن یافت می شود و فرآیندهای زیستی (Biological processes: BP) نشان دهنده فعالیت بیولوژیکی است که ژن در آن شرکت می کند، با استفاده از ابزار آنلاین GENEONTOLOGY (http://geneontology.org/) انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل و کمی‌سازی پروتئین‌های نشاندار شده به روش Dimethyl labeling مربوط به دو ژنوتیپ متحمل و حساس سویا که تحت تنش خشکی قرار گرفته بودند انجام شد. در حین اعمال تنش، میزان آب برگ‌ها هر دو روز یکبار اندازه‌گیری شد (شکل۱). بر اساس نتایج به‌دست آمده در مقایسه با ژنوتیپ حساس ژنوتیپ متحمل به خشکی، آب کمتری در روزهای ۸ و ۱۰ از دست داد ($p < 0.05$) و دارای میزان بیشتری آب در برگ‌هایش بود (شکل۱). در هر تکرار استخراج پروتئین کل از ٤٥ گرم از بافت گیاهان تیمار شده‌ی هر دو نوع ژنوتیپ حساس و متحمل به خشکی (۱۰ روز پس از اعمال تنش)، با استفاده از بافر دناتوره‌کننده پروتئین مبتنی بر اوره و حاوی PVP (Guo *et al.* 2011) انجام شد. میزان پروتئین حاصل حدود ۳۱۰–۱۹۷ میلی‌گرم پروتئین برای هر تکرار و میزان پپتید حاصله بعد از هضم آنزیمی‌حدود ۱۸۰–۱۵۰ میلی‌گرم برای هر تکرار بود.

با نشاندار سازی و فرکشن‌گیری به وسیله‌ی ستون‌های SCX/WAX، ٧٤ فرکشن حاصل شد. میزان پپتیدها در این فرکشن‌ها در دامنه‌ی ۰/۸ تا ۳۲ میکروگرم بود. در نهایت فرکشن‌ها تحت تجزیه و تحلیل LC-MS/MS قرار گرفتند. داده‌های خام حاصل از LC-MS/MS به منظور شناسایی آی‌دی پپتیدها (Peptide ids identification) و کمی‌سازی آن‌ها (Quantification) با استفاده از نرم‌افزارهای Mascot و SQUA-D، مورد بررسی قرار گرفتند.



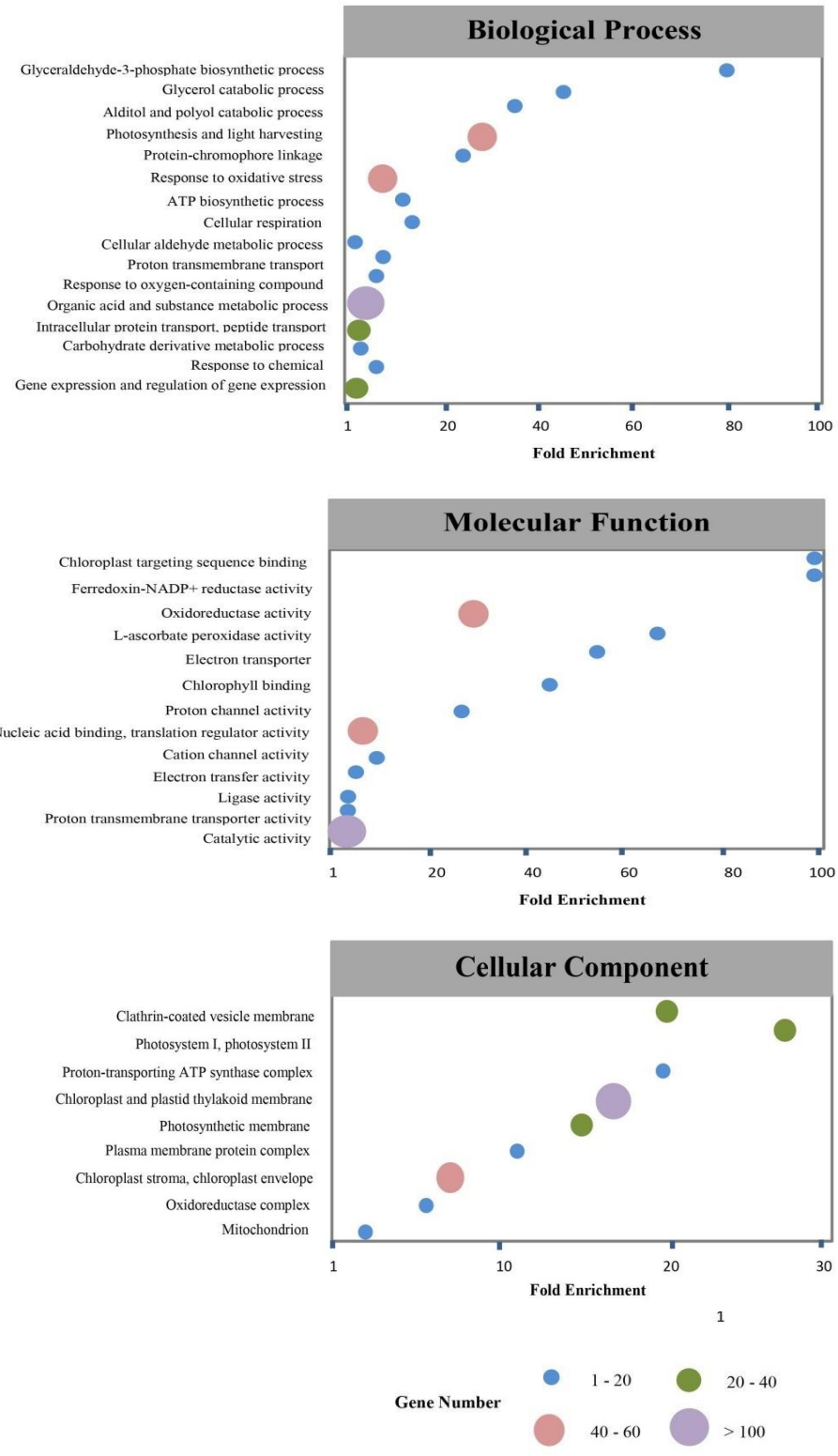
شکل۱- درصد آب در دو رقم سویا مورد مطالعه در طول تنش خشکی.
(n.s : no significant difference و * : معنی‌دار در سطح احتمال $p \leq 0.05$)

Fig1. The water percentage of the two studied soybean cultivars during drought condition. n.s stands for no significant difference and * stands for $p \leq 0.05$.

براساس نتایج به دست آمده با احتساب FDR (False discovery rate) ۱٪، در مجموع تعداد ۱۷۷۸۷ پپتید نشاندار شده با ایزوتوپ‌های سبک یا سنگین (L/H isotopic peptides) شناسایی شدند. با استفاده از فیلترهای مختلف برای شناسایی پپتیدهایی که تغییرات بیان آن‌ها در رقم متحمل معنی‌دار بود، تعداد ۸۷٤ پپتید تکرارپذیر و منحصر به فرد (Non-redundant/ unique repeatable peptides) شناسایی شدند. پپتیدهایی که حداقل دارای دو PSM (Peptide spectrum matching) بودند، بعنوان شاخص جهت تکرار پذیری، در نظر گرفته شدند. این ۸۷٤ پپتید مربوط به ۲٦۰ گروه پروتئینی بوده و در مقایسه با رقم حساس، دارای تغییرات بیان معناداری در رقم متحمل بودند.

ازمیان این ۲٦۰ گروه پروتئینی، در رقم متحمل، ۱٤۲ (٥٥٪) گروه افزایش بیان و ۱۱۸ (٤٥٪) گروه کاهش بیان نشان دادند. مهمترین گروه‌های پروتئینی دارای افزایش بیان معنادار شامل Ferredoxin--، Heat shock 70 kDa protein،lipoxygenase Glycine-rich protein 2-like، NADP reductase Oxygen-، Chlorophyll a-b binding protein،Dehydrin Fructose-، dependent coproporphyrinogen-III oxidase ATPase 11 plasma membrane-،bisphosphate aldolase 1 Cytochrome، Clathrin interactor EPSIN 2-like، type-like Peroxisomal ascorbate peroxidase،Thioredoxin-like، b6 Photosystem I P700 apoprotein A2 بودند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]



شکل ۲- نتایج تجزیه و تحلیل GO برای پپتیدهای دارای تغییرات بیان معنادار تحت تنش خشکی. هر سه قسمت دسته بندی این آنالیز (فرآیندهای زیستی، اجزا سلولی و فعالیت مولکولی) نشان داده شده است. هر دایره ی منحصر به فرد نشان دهنده ی fold enrichment و gene number پروتئین‌های موجود در هر دسته بندی GO است.

2. GO analysis of the peptides illustrating the biological processes, cellular component and molecular function altered significantly by drought stress. Each unique dot represents the fold enrichment and gene number of a protein in each specific GO category. Fig

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

جدول۱- مهمترین دمین‌های اینترپرو دارای افزایش و کاهش بیان معنی دار در ژنوتیپ متحمل.

Table 1. Interpro domains significantly regulated in drought tolerant cultivar

Up regulated domains	Down regulated domains
Photosystem I PsaA/PsaB domain	Nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4 domain
Glutathione S-transferase domain, N-terminal domain	Serine-t hreonine/tyrosine-protein kinase catalytic domain
Cold-shock protein domain	Concanavalin A-like Lectin/glucanase domain
Stm1, N-terminal domain	P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase domain
Hyaluronan/mRNA-binding protein domain	Ribosomal protein L2 domain
Ferredoxin Reductase domain	FAS1 domain
Clathrin light chain domain	Nucleoside diphosphate kinase
ATPase, alpha/beta subunit, nucleotide-binding domain	Disulphide isomerase
Lipoxygenase, plant domain	Chaperonin Cpn60 domain
Annexin, plant domain	Translation protein SH3-like domain
Chlorophyll a/b binding protein domain	lipocalin, ApoD type domain
Oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain	
Zinc finger, CCHC-type domain	
N-terminal domain of remorin	
Dehydrin domain	

همچنین مهمترین گروه‌های پروتئینی که کاهش بیان معناداری نشان دادند عبارت بودند از: Translation elongation factor SPT6، Elongation factor 1-alpha-like isoform X1، Plant RNA polymerase II، Pyruvate kinase، Raf-like kinase 20، degradation factor 1، Bowman-Birk type protease inhibitor-like precursor.

تجزیه و تحلیل عملکردی یا همان Gene Ontology، با استفاده از ابزار آنلاین GENEONTOLOGY (http://geneontology.org/) و برای هر دو نوع پپتیدهایی که دارای افزایش و کاهش معنی‌دار سطح بیان در ژنوتیپ متحمل بودند انجام شد. در شکل ۲ برای هر قسمت تجزیه و تحلیل GO, مهمترین دسته‌ها به همراه Fold enrichment و تعداد ژن‌های مربوطه نشان داده شده است.

پپتیدهای دسته‌بندی شده در زیرگروه BP در فرآیندها و مسیرهای زیستی بیوسنتز ATP و Glyceraldehyde-3-phosphate، کاتابولیک Alditol و polyol، فتوسنتز و واکنش به نور، پاسخ به استرس اکسیداتیو و مواد شیمیایی، متابولیک مشتقات قندی و آلدهید سلولی، تنفس سلولی، متابولیک مواد و اسیدهای ارگانیک، پاسخ به ترکیبات دارای اکسیژن، انتقال درون سلولی پروتئین و پپتید و انتقال غشایی پروتون دخیل هستند. همچنین مهمترین فعالیت‌های پپتیدهای دسته‌بندی شده در زیرگروه MF شامل: اتصال به کلروفیل و کلروپلاست، فعالیت اکسیدوردوکتاز و Ferredoxin-NADP+ reductase، فعالیت کاتالیکی و لیگازی، انتقال دهنده‌ی الکترون و پروتون غشایی، فعالیت L-ascorbate peroxidase، فعالیت کانال پروتونی و کاتیونی و تنظیم‌کننده‌ی ترجمه و اتصال به نوکلئیک اسید بود. در نهایت پپتیدهای دسته بندی شده در زیرگروه CC یکی از اعضای کمپلکس‌ها و اجزاء سلولی فتوسیستم یک و دو، Clathrin-coated vesicle membrane، غشاء تیلاکوئیدی کلروپلاست و پلاستید، غشاء فتوسنتزی، کمپلکس پروتئینی غشاء پلاسمایی، استرومای کلروپلاست، کمپلکس اکسیدوردوکتاز، Proton-transporting ATP synthase complex و میتوکندری بودند.

بررسی دومین پروتئین‌هایی (InterPro domains) که افزایش و کاهش بیان معنی‌داری در ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس داشته‌اند، در مجموع منجر به شناسایی ۶۱ دومین شد که از میان آن‌ها تعداد ۳۸ دومین افزایش بیان و تعداد ۲۳ دومین کاهش بیان داشتند. از مهمترین دومین‌هایی که دارای افزایش بیان بودند می‌توان به Cold-shock protein domain، Chlorophyll a/b binding protein domain، Zinc finger CCHC-type domain، Ferredoxin Reductase domain و Dehydrin domain و... اشاره کرد. از طرفی دومین‌هایی مانند Serine-threonine/tyrosine-protein kinase catalytic domain، Ribosomal protein L2 domain، P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase domain و... کاهش بیان داشتند (جدول۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

براساس داده‌های Quantitative proteomics و Functional GO این مطالعه، تعدادی از پروتئین‌های به خوبی شناخته شده که نقش اساسی در تحمل خشکی دارند، به طور واضح و جالب شناسایی شدند. از میان این پروتئین‌ها، بیشتر آن‌ها در دسته‌های عملکردی سوخت و ساز انرژی، فتوسنتز، مهاری رادیکال‌های آزاد اکسیژن، فعالیت کانالی و انتقال مواد، تنظیم کننده‌ی بیان ژن و ترجمه، سوخت و ساز مشتقات قندی و مواد ارگانیک و کاتابولیک قندهای الکلی قرار گرفتند. به طور مشابه هنگامی که از روش‌ها و ابزارهای مشابه پروتئومیکس برای شناسایی سازوکارهای تحمل به خشکی در دو رقم متضاد، در گیاهان تک‌لپه‌ای (برنج ، گندم (Wu et al. 2016)، ذرت (Nobuyuki et al. 2010)) و دولپه‌ای (سیب‌زمینی ، لوبیا (Takahashi et al. 2020)، نخود (Kim et al. 2013، تنباکو (Bündig et al. 2016)) استفاده شد، مشخص شد که پروتئین‌هایی که دارای تغییرات معنی‌دار بودند، به طور کلی در تنظیم کربوهیدرات‌ها، گلوتاتیون، اسیدهای آمینه، سوخت‌وساز سوکروز و نیتروژن، ردوکس هومئوستازی و تنظیف اکسیژن‌های آزاد، سنتز پروتئین‌ها، پاسخ‌های دفاعی، فتوسنتز و تولید انرژی نقش ایفا می‌کنند.

افزایش سطوح چندین پروتئین مربوط به کانال‌های یونی و سیستم حمل و نقل غشایی، به نحو بارزی بیانگر آن است که این رقم متحمل به خشکی سویا ممکن است سازوکار انتقال یون‌ها و مواد مغذی را به طور موثری توسعه داده باشد که نقش به سزایی در سازگاری گیاهان سویا در پاسخ به تنش خشکی و کم آبی دارند. این فرضیه بر اساس یافته‌های پیشین که نشان دهنده نقش بسیار مهم سیستم حمل و نقل و کانالی در کنترل فعالیت پروتئین‌های تنظیم‌کننده، انتقال سیگنال، حفظ فشار اسمزی و جذب مواد مغذی از خاک هنگام مواجه شدن با تنش‌های زیستی و غیرزیستی است، تایید می‌شود (Nobuyuki et al. 2010). یافته‌های این مطالعه با این فرض که تغییر در فراوانی پروتئین‌های متصل‌شونده به اسیدنوکلئیک و فاکتورهای رونویسی مانند Glycine-rich protein 2-like با سازگاری گیاه به تنش خشکی مرتبط هستند و ممکن است در سوخت‌وساز RNA و تنظیم بیان ژن نقش داشته باشند مطابقت دارد (Marondedze et al. 2019).

پروتئین Glycine-rich protein 2-like یکی از مهمترین یافته‌های این مطالعه است. این پروتئین دارای یک دومین محافظت شده در گیاهان به نام S1-like cold-shock domain است و مشخص شده است که با کاهش دما بیان آن بیشتر می‌شود (Karlson et al. 2003). در آرابیدوپسس چهار پروتئین AtCSP1، AtCSP2، AtCSP3 و AtCSP4 دارای این دومین خاص هستند. مطالعات قبلی پیشنهاد داده‌اند که پروتئین‌های AtCSP1، AtCSP2 و AtCSP3 در تحمل به خشکی در گیاه آرابیدوپسیس شرکت دارند (Kim et al. 2013). همچنین براساس مطالعات بسیار قوی، نشان داده شده است که پروتئین‌های CSP احتمالا نقش چاپرونی دارند و بنابراین بر تنظیم بیان ژن و جوانه‌زنی دانه‌ها در شرایط کم آبی تاثیر می‌گذارند (Kim et al. 2013). این نتایج به طور قوی پیشنهاد می‌دهند که افزایش بیان این پروتئین ممکن است در تنظیم پاسخ تحمل به خشکی در سویا نقش مهمی داشته باشند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پروتئین‌هایی با کاهش بیان معنی‌دار، تعدادی از کینازها را شناسایی کرد که کاهش بیان این کینازها ممکن است در تنظیم سیگنالینگ خشکی و ایجاد تحمل به خشکی در سویا شرکت داشته باشند (Takahashi et al. 2020).

همچنین Glyceraldehyde-3-phosphate که یک پروتئین ubiquitous است نقش‌های مهمی‌در سوخت‌وساز سلولی و پاسخ به تنش‌های غیرزنده ایفا می‌کند (Xixi et al. 2019) و در این مطالعه پروتئین‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آن افزایش بیان نشان دادند. همچنین افزایش سطوح پراکسیدازها و اکسیدازهای مختلف در این مطالعه، به طور قوی پیشنهاد می‌دهد که این رقم متحمل به خشکی سویا ممکن است در کاهش و پاکسازی سلول از گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسید هیدروژن که تحت تنش خشکی افزایش می یابند، به طور موثرتری عمل کند.

به طور کلی براساس یافته‌های این مطالعه، پروتئین‌های بسیار مهمی که در تحمل به تنش خشکی در گیاه سویا نقش دارند، شناسایی شدند. این پروتئین‌ها علاوه بر دارا بودن دومین‌های با ارزش، در فرآیندهای زیستی مختلفی شرکت دارند که می‌توان از مهم ترین آن‌ها به سوخت و ساز انرژی، فعالیت‌های فتوسنتزی،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

گونه‌های فعال اکسیژن، فعالیت کانالی و انتقال مواد، تنظیم کننده‌ی بیان ژن و ترجمه، سوخت و ساز مشتقات قندی و مواد ارگانیک و کاتابولیک قندهای الکلی اشاره کرد.

منابع

Brookes G, Barfoot P. 2020. GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. GM Crops Food 11:242–261.

Bündig C, Jozefowicz AM, Mock HP, Winkelmann T. 2016. Proteomic analysis of two divergently responding potato genotypes (*Solanum Tuberosum L.*) following osmotic stress treatment in vitro. Jornal of Proteomics 143: 227–241.

Demiral T, Turkan I, Sekmen AH. 2011. Chapter 8 - signalling strategies during drought and salinity, recent news. in plant responses to drought and salinity stress, Turkan, I. B. T.-A. in B. R, Ed. Academic Press 57: 293–317.

Dronne Y. 2018. Agricultural raw materials for food and feed: the world. INRA Productions Animales 31:165–180.

Guo G, Li N. 2011. Relative and accurate measurement of protein abundance using 15N stable isotope labeling in arabidopsis (SILIA). Phytochemistry 72:1028–1039.

Hossain MM, Liu X, Qi X, Lam HM, Zhang J. 2014. Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting. Crop Journal 2:366–380.

Jiang H, Todorova N, Roca E, Su JJ. 2019. Agricultural commodity futures trading based on cross-country rolling quantile return signals. Quant Financ 19:1373–1390.

Karlson D, Imai R. 2003. Conservation of the cold shock domain protein family in plants. Plant Physiology 131:12–15.

Katam R, Sakata K, Suravajhala P, Pechan T, Kambiranda DM, Naik KS, Guo B, Basha SM. 2016. Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and-susceptible peanut in response to water stress. Journal of Proteomics 143: 209–226.

Katam R, Shokri S, Murthy N, Singh SK, Suravajhala P, Khan MN, Bahmani M, Sakata K, Reddy KR. 2020. Proteomics, physiological, and biochemical analysis of cross tolerance mechanisms in response to heat and water stresses in soybean. PLoS One 15:233–905.

Khan MN, Komatsu S. 2016. Proteomic analysis of soybean root including hypocotyl during recovery from drought stress. Journal of Proteomics 144: 39–50.

Khatabi B, Gharechahi J, Ghaffari MR, Liu D, Haynes PA, McKay MJ, Mirzaei M, Salekdeh G H. 2019. Plant–microbe symbiosis: what has proteomics taught us? Proteomics 19:1800105.

Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H. 2007. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from arabidopsis thaliana can promote the cold adaptation process in escherichia coli. Nucleic Acids Research 35:506–516.

Kim MH, Sato S, Sasaki K, Saburi W, Matsui H, Imai R. 2013. Cold shock domain protein 3 is involved in salt and drought stress tolerance in arabidopsis. FEBS Open Bio 3: 438–442.

Liu S, Yu F, Hu Q, Wang T, Yu L, Du S, Yu W, Li N. 2018. Development of in planta chemical cross-linking-based quantitative interactomics in arabidopsis. Journal of Proteome Research 17:3195–3213.

Liu, S, Yu, F, Yang, Z, Wang, T, Xiong, H, Chang, C, Yu, W, Li, N. 2018. Establishment of dimethyl labeling-based quantitative acetylproteomics in arabidopsis. Molecular and Cell Proteomics, 17 (5): 1010 LP – 1027.

Makbul S, GÜLER NS, DURMUŞ N, GÜVEN S. 2011. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. Turkish Journal Botany 35:369–377.

Marondedze C, Thomas L, Gehring C, Lilley KS. 2019. Changes in the arabidopsis RNA-binding proteome reveal novel stress response mechanisms. BMC Plant Biology 19:1–11.

Nobuyuki Uozumi, Julian I. 2010. Schroeder. ion channels and plant stress: past, present, and future. In book: Ion Channels and Plant Stress Responses 74:10–104.

Saxena I, Srikanth S, Chen Z. 2016. Cross talk between H2O2 and interacting signal molecules under plant stress response. Frontiers in Plant Science 7:570.

Takahashi F, Kuromori T, Sato H, Shinozaki K. 2018. Regulatory gene networks in drought stress responses and resistance in plants. Advanced in Experimental Medicine and Biology 1081:189–214

Takahashi F, Kuromori T, Urano K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2020. Drought stress responses and resistance in plants: from cellular responses to long-distance intercellular communication. Frontiers in Plant Science 765:11–10.

Vogel E, Donat MG, Alexander LV, Meinshausen M, Ray DK, Karoly D, Meinshausen N, Frieler K. 2019. The effects of climate extremes on global agricultural yields. Environmental Research Letter 14:145–76.

Wang L, Jin X, Li Q, Wang X, Li Z, Wu X. 2016. Comparative proteomics reveals that phosphorylation of β carbonic anhydrase 1 might be important for adaptation to drought stress in *Brassica napus*. Science Report 6:1–16.

Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S. 2016. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. International Journal of Molecular Science 17:1706.

Wang X, Jiang GL, Green M, Scott RA, Song Q, Hyten DL, Cregan PB. 2014. Identification and validation of quantitative trait loci for seed yield, oil and protein contents

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

in two recombinant inbred line populations of soybean. Molecular Genetic and Genomics journal 289:935–949.

Wang X, Khodadadi E, Fakheri B, Komatsu S. 2017. Organ-specific proteomics of soybean seedlings under flooding and drought stresses. Journal of Proteomics 162:62–72.

Wang X, Komatsu S. 2018. Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. Journal of Proteomics 172:201–215.

Wu Y, Mirzaei M, Pascovici D, Chick JM, Atwell BJ, Haynes PA. 2016. Quantitative proteomic analysis of two different rice varieties reveals that drought tolerance is correlated with reduced abundance of Photosynthetic machinery and increased abundance of ClpD1 protease. Journal of Proteomics 143:73–82.

Wu Y, Mirzaei M, Pascovici D, Haynes PA, Atwell BJ. 2019. Proteomes of leaf-growing zones in rice genotypes with contrasting drought tolerance. Proteomics 19:1800310.

Xixi Li, Wenjie Wei, Fangfang Li, Lin Zhang, Xia Deng, Ying Liu and Shushen Yang. 2019. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for abiotic stress response in wheat. International Journal of Molecular Science 20:1104.

Yao L, Cheng X, Gu Z, Huang W, Li S, Wang L, Wang YF, Xu P, Ma H, Ge X. 2018. The AWPM-19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice. Plant Cell 30: 1258–1276.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53: 247–273.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Analysis of Soybean Drought-Tolerant Cultivar Proteome Using Dimethyl Labeling Method

Atieh Moradi[1], Alireza Afsharifar[2] and Ali Niazi[1]

1. Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
*Corresponding Author, Email: afshari@shirazu.ac.ir

Abstract

Soybean (*Glycine Max (L.) Merr*), like those maize, wheat, rice and cotton crops, is an important agricultural crop traded in the global commodity markets. the production of soybean has been curtailed by numerous harsh environmental stresses, especially drought, a water deficit state of soil. The isotopic dimethyl labeling was applied to study the proteomic changes associated with the drought responses of two contrasting soybean cultivars. A total of 874 non-redundant and repeatable peptides were identified among 17787 peptides in tolerant cultivar (these peptides changed significantly to compare with sensitive cultivar) by using MS/MS analysis which corresponding to 260 of protein groups. Among these 260 protein groups, there were 142 groups being up-regulated in the drought-tolerant cultivar under drought treatment and in contrast, there were 118 groups being down-regulated by drought-tolerant cultivar. InterPro protein domain enrichment and Gene Ontology were performed for functional analysis. According to the results most of these proteins are related to photosynthesis activity, energy metabolism, ROS-scavenging activity, channel and transporter activity, gene expression and translation regulation, Carbohydrate derivative metabolic process, Organic acid and substance metabolic process and sugar alcohols catabolic process.

Keywords: Domain, Gene Ontology, labeling، Proteomics, Soybean Drought-tolerant cultivar

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.10.5]