مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
صفحه ۲۱۶-۲۰۳

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

تاثیر باکتری سودوموناس فلورسنس روی الگوی پروتئوم برگ کلزا تحت تنش شوری

Effect of *Pseudomonas flourescens* FY32 bacteria on leaf proteome pattern of rapeseed under salinity stress

علی بنده‌حق[۱]، محمود تورچی[۱]، داود فرج زاده [۲]، زهرا دهقانیان[۱] و صدیقه پیرزاد[۱]

Ali Bandehagh[1], Mahmoud Toorchi[2], Davoud Farajzadeh[3], Zahra Dehghanian[4] and Sedigheh Pirzad [4]

۱-گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- گروه زیست شناسی- سلولی ملکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

[1]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture,University of Tabriz, Tabriz, Iran. bandehhagh@tabrizu.ac.ir

[2] Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijn Shahid Madani University of Tabriz, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶)

چکیده

جهت مطالعه توان القایی باکتری اندوفیت *Pseudomonas flourescens* FY32 در بهبود رشد و افزایش مقاومت کلزا به تنش شوری، از طریق رهیافت پروتئومیکس، آزمایشی بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سیستم کشت هیدروپونیک با چهار تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش به ترتیب شامل تنش شوری در دو سطح (صفر و ۳۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم)، تلقیح با باکتری و عدم تلقیح بود. نتایج نشان داد که تحت شرایط تنش شوری گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده از وزن خشک بهتری برخوردار باشند. الگوی پروتئین-های بافت برگی به کمک روش الکتروفورز دوبعدی مورد مطالعه قرارگرفت. ژل‌های بعد دوم بعد از تصویر برداری، به کمک نرم افزار PD-quest، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و کمیت و کیفیت بیان پروتئین‌ها در تیمارهای مختلف مقایسه شد. طی این تجزیه تحلیل ۱۵ لکه پروتئینی از نظر بیان معنی‌دار بود که چهار لکه مربوط به پروتئین‌های درگیر در مسیر سم زدایی، چهار لکه مربوط به پروتئین‌های درگیر در مسیر سوخت و ساز و هفت لکه مربوط به پروتئین‌های درگیر در مسیر فتوسنتز بود. بر اساس مقایسه ژل‌های مربوط به باکتری و شاهد (بدون باکتری) در دو محیط تنش و بدون تنش، باکتری باعث افزایش مقاومت گیاه تحت تنش شوری می‌شود.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز دوبعدی،
باکتری PGPR،
تنش شوری،
کلزا.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

مقدمه

از عوامل غیرزیستی محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی در بیشتر مناطق کشاورزی دنیا و ایران، شوری آب و خاک است. تنش شوری، تولیدات گیاهی و کیفیت آن را در نواحی خشک، نیمه خشک و مناطقی با بارش باران محدود را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ashraf, 2009). گیاهان از نظر مقاومت یا حساسیت به شوری متفاوت می‌باشند. افزایش مقاومت گیاهان به شوری و انتخاب گونه‌های مناسب برای کاشت در مناطق شور، اهمیت زیادی از نظر کشاورزی و اقتصادی دارد (Valizadeh *et al.*, 2013). سطح بالای شوری خاک و آب آبیاری، بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد که دلیل آن افزایش فشار اسمزی محلول خاک و عدم تعادل در عناصر مورد نیاز گیاه می‌باشد 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). ROSها بسیار فعال و سمی هستند و می‌توانند از طریق آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌های غشاء و اسیدهای نوکلئیک، منجر به مرگ سلولی شوند و هم‌چنین تنش‌های محیطی به‌طور معمول باعث اختلالات پروتئینی می‌شوند (Guo *et al.*, 2012). گیاهان در مواجهه با شرایط واجد تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری برتنش وارد شده غلبه می‌کنند (Turan *et al.*, 2012). کلزا مهمترین گیاه روغنی خانواده براسیکا بوده و بعد از سویا و نخل روغنی سومین منبع تولید روغن دنیا محسوب می‌شود. دانه‌های کلزا دارای پروتئین و لیپید بالایی بوده و به‌خاطر مقدار کم اسید چرب اشباع شده (کمتر از ٤ درصد اسید پالمتیک) و مقدار زیادی اسید اولئیک (٦٠ درصد) و آلفالینولنیک (٩ درصد) در مقایسه با روغن‌های آفتابگردان، ذرت و سویا از کیفیت تغذیه‌ای بالاتری برخوردارند (Gunstone, 2004). در ایران زراعت کلزا در بین دانه‌های روغنی معمول، پدیده‌ای جدید به شمار می‌آید. بنابراین سازگاری آن در اغلب مناطق، از جمله مناطق متاثر از شوری با انتخاب ارقام و تاریخ مناسب، موفق بوده است. در کشور ما کاشت کلزا به‌طور کلی به مناطق نیمه خشک اختصاص یافته که دارای خاک‌های سدیمی وشور هستند و این پتانسیل تولید گیاه را محدود کرده است (Alyari *et al.*, 2000). کلزا جزء گیاهان نیمه متحمل به شوری طبقه بندی می‌شود (Ashraf and McNeilly 1990). باکتری‌های آزادزی خاک، اغلب با عنوان باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (Planet growth promotinig rhizo bacteria) تعریف می‌شوند و شامل باکتری‌های مختلف نظیر *Azotobacter*، *Azospirillum* و *Pseudomonas* هستند (Glick and Penrose 1998). این باکتری‌ها می‌توانند روی رشد و نمو گیاهان به دو طریق مستقیم و یا غیرمستقیم تاثیر داشته باشند. تحریک غیرمستقیم رشد گیاه موقعی رخ می‌دهد که باکتری‌ها، برخی از اثرهای مضر یک موجود بیماری‌زا را توسط یک یا چند واکنش کاهش داده یا از عمل آن جلوگیری به‌عمل آورند. تحریک مستقیم رشد گیاه توسط این باکتری‌ها به‌طور معمول شامل تامین گیاه با یک ترکیب سنتز شده توسط باکتری یا تسهیل جذب عناصر غذایی از محیط است (Glick and Patten 1999). یک باکتری خاص ممکن است رشد و نمو گیاه را با استفاده از یک یا چند واکنش، تحریک کند. تعدادی از باکتری‌های PGPR حاوی آنزیم آمینو سیکلو پروپان -١- کربوکسیلیک اسید (ACC) دآمیناز هستند. این آنزیم می‌تواند ACC، پیش ماده اتیلن گیاه را تجزیه کرده و در نتیجه سطح اتیلن را در گیاه در حال رشد یا گیاه دچار تنش را کاهش دهد (Glick and Penrose 1998). کاهش سطح اتیلن در گیاه تحت تنش، از اثرات منفی اتیلن از جمله کاهش رشد ریشه‌ها، عدم رشد ساقه، پیری برگ‌ها و سلول‌های آوند چوبی و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

همچنین افزایش حساسیت به عوامل بیماری‌زا جلوگیری خواهد کرد (Shaharoona *et al.*, 2006). استفاده از پروتئومیک در مطالعه تنش‌های غیرزیستی در حال گسترش است. دیدگاه‌های جدیدی در خصوص پاسخ‌های گیاه به شوری با استفاده از مطالعات مقایسه‌ای پروتئوم گیاهی از طریق فناوری پروتئومیکس بوجود آمده است. شناسایی پروتئین‌های جدیدی که در ارتباط با تنش شوری هستند، آشکار کردن تغییرات در الگوهای فسفریلاسیون پروتئین‌ها و مکان‌یابی پروتئین‌های پاسخ دهنده به شوری نشان دهنده جایگاه ویژه مطالعات پروتئوم در پاسخ گیاه به شوری بوده است (Komatso, 2007). برای درک کنش بافت‌های مختلف در مواجه با تنش شوری، مطالعه‌ی پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های القاء شده به‌واسطه تلقیح با باکتری‌های PGPR و نحوه عمل و برهم‌کنش آن‌ها با همدیگر ضروری است.

مواد و روش‌ها

رقم کلزای مورد استفاده در این پژوهش Hyola308 بود. این رقم کلزا در دو وضعیت تلقیح شده و تلقیح نشده با باکتری و تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم به همراه شاهد مورد بررسی قرارگرفت. آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. قبل از کشت برای ضد عفونی بذور از روش پنروز و گلیک استفاده شد (Penrose and Glick 2003). در این آزمایش از محلول غذایی هوگلند که با کمی تغییرات برای گیاه کلزا استفاده شد (Bandehagh *et al.*, 2008). در این پژوهش از یکی از سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنس FY32 شد. برای کشت، یک کلنی منفرد از باکتری سودوموناس فلورسنس سویه FY32 در ۲۰ میلی-لیتر محیط کشتLB مایع برای تکثیر به‌صورت شبانه کشت داده شد (Farajzadeh *et al.*, 2009). برای قرائت OD باکتری رشد یافته از روش اسپکتروفتومتری و تعیین جمعیت باکتری‌ها از داده‌های جدول مک فارلند استفاده شد. برای تهیه جدول استاندارد مک فارلند به روش مک فارلند عمل شد (McFarland 1907). باکتری‌ها از روی محیط کشت جامد جمع‌آوری و در ۲۰- و یا ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک هفته بعد از کشت بذور، گیاهچه‌ها در سیستم هیدروپونیک نشاء شدند. پس از استقرار گیاهان، تلقیح انجام گرفت. یک هفته بعد از تلقیح باکتری به سیستم کشت هیدروپونیک، نمونه‌گیری از ریشه گیاهچه‌ها به صورت تصادفی صورت گرفت و بعد از کشت قطعات ریشه و ضد عفونی به‌صورت سطحی، تلقیح این باکتری در ریشه گیاهان نشاء شده تأیید شد. تنش شوری ۲۰ روز پس از انتقال نشاءها به سیستم کشت هیدروپونیک و پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها و تلقیح با باکتری به مدت یک ماه اعمال شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، در اواخر دوره رشد رویشی و اوایل رشد زایشی، نمونه‌های برگی در۳ تکرار کاشت شده جمع آوری شد و داخل پاکت کاغذی در دستگاه آون به مدت ٤٨ ساعت و در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت استخراج پروتئین از روش تغییر یافته دمروال و همکاران استفاده شد (Damerval *et al.*, 1987). برای انجام الکتروفورز بعد اول از ژل‌های لوله‌ای دست ساز استفاده شد که حاوی آب دیونیزه، NP-40، محلول آکریل‌آمید ۳۰ درصد، آمفولین‌های با pH ۳ تا ۱۰ و ۵ تا ۸، ۱۰APS درصد و محلول TEMED می‌باشد. برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌های برگی، از روش بردفورد (۱۹۷٦) استفاده گردید. محلول پروتئینی بر روی ژل بعد اول بارگذاری شد. برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک آن‌ها، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه ولتاژ ۲۰۰ ولت، به مدت ١٦ ساعت ولتاژ ٤٠٠ ولت و به مدت یک ساعت ولتاژ ٦٠٠ ولت اعمال شد. برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی آن‌ها از روش

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

SDS-PAGE استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی طبق دستورالعمل مربوطه رنگ آمیزی شد (Bandehagh *et al.*, 2011). برای تصویربرداری از ژل‌ها دستگاه Bio- Rad GS-800 مورد استفاده قرار گرفت. تصاویر به‌دست آمده توسط نرم‌افزار PD-quest، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژل‌ها به همراه تکرار آن‌ها بررسی شده و لکه‌های مشترک بین تکرارها توسط نرم‌افزار برچسب زده شدند. برای شناسایی لکه‌های پروتئینی معنی‌دار و به‌منظور تعیین نوع تغییرات بیان پروتئین (افزایش یا کاهش بیان) به ترتیب از آزمون تی و شاخص القا (IF) استفاده شد. برای شناسایی نهایی پروتئین‌ها از داده پایگاه UniprotKB استفاده شد.

نتایج

وزن خشک: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش شوری و باکتری برای صفات وزن خشک بخش هوایی، ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین وزن خشک بخش هوایی و ریشه مربوط به سطح شاهد و کمترین آن به تنش شدید تعلق داشت. همچنین بوته‌های تلقیح شده با باکتری وزن خشک بیشتری را نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشتند. در سطح تنش ۳۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم میزان کاهش صفات وزن خشک در بوته های تلقیح شده با باکتری کمتر از سطح تلقیح نشده بود (جدول ۱). کاهش رشد و وزن خشک درشرایط شوری می‌تواند بر اثر تغییر در انتقال فرآورده‌های فتوسنتزی به ریشه‌ها، بسته شدن جزئی یا کلی روزنه‌ها و نیز عدم توازن یونی در گیاهان باشد. از دلایل دیگر این کاهش می‌توان به اثرهای منفی پتانسیل اسمزی بالای محلول خاک اشاره کرد که جذب آب و عناصرغذایی را کاهش داده و در نهایت باعث کاهش رشد ریشه و بخش هوایی می‌شود (Ahmadi and Ceiocemardeh 2004). در این تحقیق تغییرات بیان پروتئین‌های برگ Hyola308 تحت شرایط شوری صفر و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و تلقیح و عدم تلقیح باکتری با رهیافت پروتئومیک و از طریق شناسایی پروتئین‌های با بیان افتراقی در ژل الکتروفورز دو بعدی مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل پروتئوم، روشی مستقیم جهت شناسایی فعالیت ژن‌ها محسوب می‌شود و تجزیه ارتباط پروتئوم با دانسته‌های توالی ژنوم راهبرد مهمی برای ژنومیک کاربردی به شمار می‌آید (Komatsu and Tanaka 2004). درصد حجمی نقاط تکرار داری که توسط نرم افزار PD-quest کمی شده بودند از تکرارهای مختلف گرفته شده و مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. قبل از تجزیه واریانس یک طرفه، نرمال بودن داده‌ها بررسی شده و در مورد برخی از لکه‌های پروتئینی تبدیل داده صورت گرفت. از بین نقاط پروتئینی پاسخ دهنده به تنش شوری و تلقیح و یا عدم تلقیح با باکتری، نقاطی با IF بزرگتر از ۲ و یا کوچکتر از ۰/۵ انتخاب شدند. نقاطی با IF بزرگتر از واحد نقاطی با افزایش بیان تحت تنش شوری و تلقیح و یا عدم تلقیح با باکتری هستند. در مقابل، نقاط دارای IF کمتر از واحد دارای کاهش بیان تحت تنش شوری و تلقیح و یا عدم تلقیح با باکتری بود. از الکتروفورز دو بعدی رقم Hyola308 ۱۱۸ لکه پروتئینی تکرارپذیر به‌دست آمد که از این ۱۱۸ لکه پروتئینی ۱۵ لکه در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بودند. (شکل ۱) و (جدول ۲) .

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

جدول ۱- تجزیه واریانس وزن خشک رقم کلزا Hyola308 تلقیح شده با باکتری در شرایط تنش شوری

Table 1- ANOVA results of dry weight of Hyola308 cultivar inoculated with bacteria under salt stress conditions

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک کل
شوری	۱	۱/۳۸۸**	۲/۹۸۲**	۰/۰۵۳**
باکتری	۱	۰/۲۳٤**	۰/٦٥٤**	۰/۰۲۰**
شوری * باکتری	۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
رقم	۱	۰/۱۸۱**	۰/۳۳۷**	۰/۰۰۵**
شوری * رقم	۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۷	۰/۰۰۲
باکتری * رقم	۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱
شوری * باکتری * رقم	۱	۰/۰۳۸	۰/۰٤۳	۰/۰۰۲
خطا	۱۲	۰/۰۳۲	۰/۰۵۱	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)	–	۲۷/۹٦	۲۳/۰٦	۲٦/۲۸

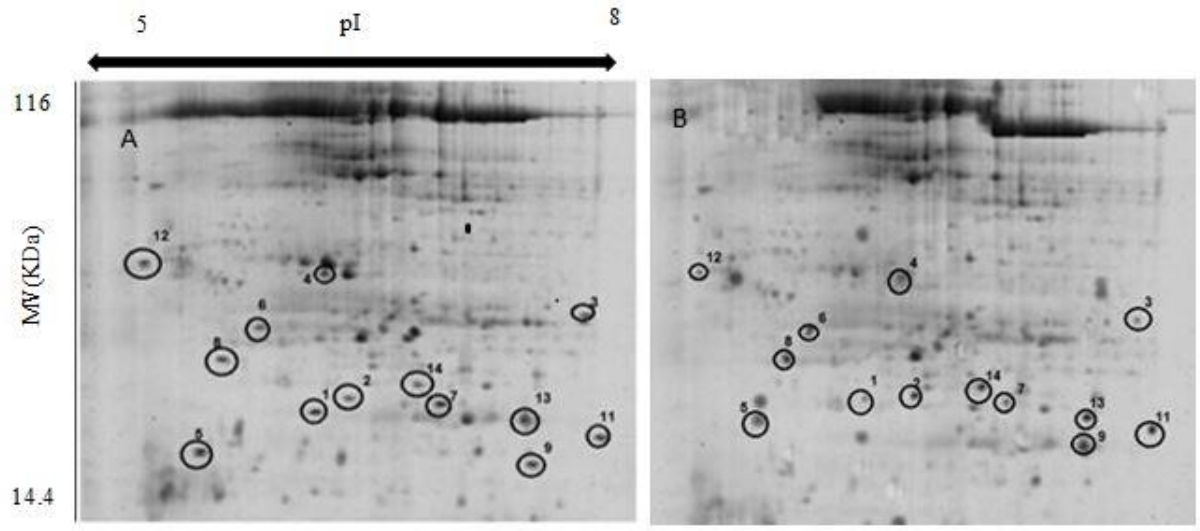
* و ** معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد.

پس از تجزیه تصاویر ژل‌ها (شکل ۱– B)، ۱۳ لکه پروتئینی تکرارپذیر و معنی‌دار در تیمار باکتریایی در شرایط بدون تنش شوری شناسایی شد، که از بین این پروتئین‌های تغییر بیان یافته، ٦ لکه پروتئینی کاهش بیان و ۷ لکه پروتئینی افزایش بیان نشان دادند (جدول ۲).

در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم به همراه باکتری (شکل ۲ -B) از ۱۵ لکه پروتئینی، ۹ لکه کاهش بیان و ٦ لکه افزایش بیان نشان دادند (جدول ۲). در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، از ۱۵ لکه پروتئینی معنی دار، ۹ لکه بیان کمتر از شاهد یا کاهش بیان و ٦ لکه افزایش بیان نشان دادند (شکل ۲– A).

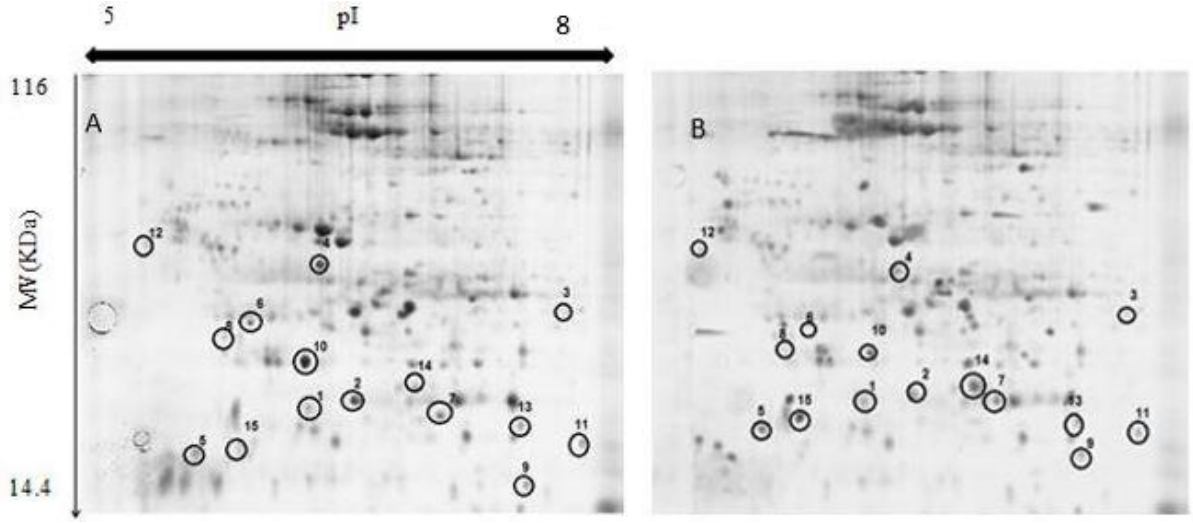
بعد از شناسایی احتمالی پروتئین‌ها که (باتوجه به دو مشخصه نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی) انجام شد، پروتئین‌ها در سه گروه عملکردی ، شامل پروتئین‌های درگیر در مسیر فتوسنتز (٤۷ درصد)، پروتئین‌های مهار کننده ROS و سم زدایی (۲۷ درصد)، پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز (۲۷ درصد) قرار گرفتند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]



شکل ۱- ژل‌های الکتروفورز دوبعدی برگ کلزای رقم Hyola308 بدون تنش شوری در دو حالت بدون باکتری(A) و با باکتری (B)

Figure 1- 2-D gel of protein patterns of Hyola308 leaves under normal conditions. Without bacteria (A) and with bacteria (B).



شکل ۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی حاصل از پروتئوم برگ کلزای رقم Hyola308 (در شرایط تنش شوری در دو حالت بدون باکتری (A) و با باکتری (B)).

Figure 2. 2-D gel of protein patterns of Hyola308 leaves under stress conditions. Without bacteria (A) and with bacteria (B).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

جدول ۲- اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده تحت تنش شوری و تلقیح با باکتری

Table 2. Characterization of identified proteins under salinity stress and bacteria inoculation

شماره لکه Spot No.	پروتئین شناسایی شده Identified Protein	Accession[a] No.	T. MW[b]	T. pI[c]	O. MW[d]	O. pI[e]
1	copper/zinc superoxide dismutase	5689611	22	6/74	25/74	6/10
2	Dehydroascorbate reductase	33285914	24	66/15	28/75	6/45
3	Flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductase	92867789	40	8/38	42/28	7/75
4	Fructose bisphosphate aldolase	18420348	43	6/48	45/69	6/20
5	Glotation S- trsnferase	421976742	16	5/53	18/65	5/41
6	Malate dehydrogenase	15219721	35/60	6/11	39/45	5/75
7	Oxygen- evolving enhancer 2	829289	26/60	6/94	25/12	7/15
8	Oxygen- evolving enhancer protein1- 2	152230324	35	5/92	36/74	5/55
9	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2	1076373	14	9/71	17/80	7/62
10	Photosystem II protein	49359169	37	6/78	35/40	6/10
11	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	406727	20/20	8/24	21/32	7/95
12	Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase activase alpha 2	78100212	46/70	4/84	51/26	5
13	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	11990897	20	8/80	23/50	7/6
14	Triose-phosphate isomerase	15226479	23	7/67	30/45	6/09
15	Type 2 peroxiredoxin	4928472	17	5/37	19/50	5/68

a: Accession number in database NCBI, MASCOT, TagIdent - b: T. MW - c: T.pI - d: O. MW - e: O.pI

a: شماره دسترسی در داده‌پایگاه‌های NCBI،MASCOT،TagIdent؛ b: وزن مولکولی تئوری؛ c: نقطه ایزوالکتریک تئوری؛ d: وزن مولکولی تجربی؛ e: نقطه ایزوالکتریک تجربی

پروتئین‌های مشترک بیان شده در تمام تیمار ها

لکه شماره ۱ مربوط به پروتئین Copper/Zinc Superoxide dismutase جزء پروتئین‌های دخیل در مهارکننده ROS و سم‌زدایی می‌باشد و در هر سه تیمار (باکتری در شرایط بدون شوری، باکتری در شرایط شوری ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و فقط شوری ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) کاهش بیان نسبت به شاهد نشان داد. از اصلی‌ترین مسیرهای حذف ROS در گیاهان، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مثل پروتئین‌های گروه Superoxide dismutase (SOD) هستند که در تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به اکسیژن مولکولی دخالت دارند. در واقع اولین خط دفاعی در برابر ROS محسوب می‌شوند که سوپر اکسید را به

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

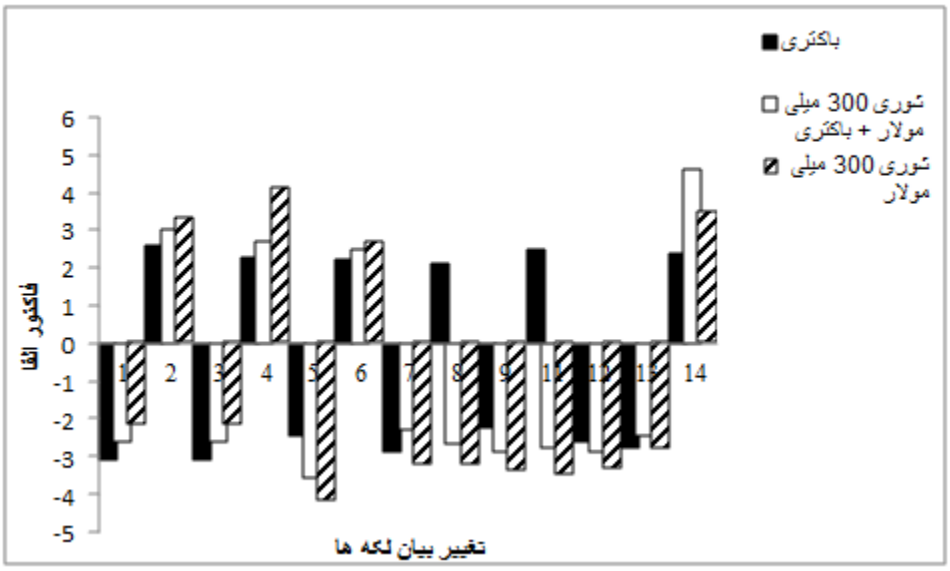
مولکول‌های پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌کنند. فعالیت اصلی این آنزیم وابسته به روی است و اگر بنابه دلایلی میزان دسترسی به این عنصر کم باشد، فعالیت این آنزیم کاهش می‌یابد (Vaidyanathan *et al.*, 2003). لکه شماره ۲ مربوط به پروتئین Dehydroascorbate reductase که جزء پروتئین‌های دخیل در مهارکننده ROS و سم‌زدایی می‌باشد، در هر سه تیمار فوق، بیان بالاتری نسبت به شاهد نشان داد. حضور این پروتئین دلالت بر القای تنش اکسایشی به همراه تنش شوری دارد. لکه شماره ۳ پروتئین Flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductase که جزء پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز می‌باشد، در هر سه تیمار باکتری بدون تنش شوری، باکتری در شرایط تنش شوری و فقط تنش شوری کاهش بیان داشت. این پروتئین در فرایند تنفس در چرخه انتقال الکترون حضور داشته و سیتوکروم را احیاء می‌کند. این پروتئین نخستین گیرنده الکترونی است و در غشای درونی میتوکندری قرار دارد (Zurbriggen *et al* 2007). نقش این پروتئین را در تحمل تنش‌های غیر زیستی در گیاهان مهم دانسته‌اند. بر روی ریشه گیاه *آرابیدوپسیس* تحت تنش کلریدسدیم به این نتیجه رسیدند که ۱۱ پروتئین درگیر در گلیکولیز، چرخه سیترات، مسیرهای پنتوز و حمل و نقل الکترون کاهش یافته است (Jiang and Deyholos 2006). لکه ٤ پروتئین Fructose bisphosphate aldolase که جزء پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز می‌باشد، در هر سه تیمار فوق افزایش بیان داشت، که آنزیم کلیدی در مسیر گلیکولیز قندها است و واکنش شکسته شدن D- فروکتوز ۱و٦- بیس فسفات (D- fructose 1,6 bisphosphate) را به دی هیدروکسی استون فسفات (Dihydroxyaceton phosphate) و D – گلیسرآلدهید ۳- فسفات را کاتالیز کرده و نقش مهمی در تولید انرژی بر عهده دارد (Moller 2001). لکه شماره ٥ Glotation S- trsnferase که جزء پروتئین‌های دخیل در مهارکننده ROS و سم‌زدایی می‌باشد، در هر سه تیمار، کاهش بیان داشت. افزایش فعالیت آنزیم Glotation S- trsnferase نه تنها سبب زدودن ترکیبات سمی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد، بلکه عمل ترکیب گلوتاتیون با دیگر مشتقات سمی حاصل از اکسیداسیون سایر مولکول‌های زیستی نظیر نوکلئیک اسیدها را کاتالیز می‌کند. لکه ٦ پروتئین Malate dehydrogenase که جزء پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز می‌باشد و آنزیم درگیر در چرخه سیترات می‌باشد و در هر سه تیمار افزایش بیان داشت. این آنزیم که واکنش تبدیل مالات به اگزالواستات و بر عکس را کاتالیزمی‌کند، در تولید انرژی نقش دارد. در شرایط ترمودینامیکی استاندارد، تعادل این واکنش بیشتر به سمت تولید مالات می‌باشد، ولی اگزالواستات در سلول‌های سالم به‌طور مداوم توسط واکنش به‌شدت انرژی‌زای سیترات سنتاز برداشت می‌شود و این امر سبب می‌گردد تا غلظت اگزالواستات در مقادیر فوق‌العاده پایین در سلول حفظ شده و در نتیجه واکنش مالات دهیدروژناز را به سمت تشکیل اگزالواستات بکشاند.

پروتئین‌های درگیر در مسیر فتوسنتز: لکه شماره ۷ پروتئین Oxygen- evolving enhancer 2 در هر سه تیمار فوق، کاهش بیان داشت. این پروتئین در پایداری فتوسیستم ۲ (PS II) نقش دارد. علاوه بر این، پایداری منگنز را از طریق ارتباط با کمپلکس منگنز (OEC) Oxygen evolving complex نیز بر عهده دارد. به‌عبارت دیگر حاصل فعالیت این پروتئین تولید اکسیژن در چرخه انتقال الکترون می‌باشد (Sun *et al.*, 2006). لکه شماره ۸ پروتئین Oxygen- evolving enhancer protein1- 2 در تیمار باکتری در شرایط بدون تنش، افزایش بیان و در تیمار باکتری در شرایط تنش و فقط تنش شوری کاهش بیان داشت. این پروتئین میل ترکیبی جایگاه اکسیداسیون آب را برای یون کلر افزایش داده و همچنین شرایط لازم برای اتصال یون

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

کلسیم را فراهم می‌سازد. این پروتئین در پلاستید، کلروپلاست وغشای تیلاکوئید کلروپلاست یافت می‌شود (Jacobs *et al.*, 2000). در پژوهشی که روی پروتئوم کلزا تحت تنش شوری و تلقیح با باکتری سودوموناس پوتیدا انجام شد، نشان داد که این پروتئین در شرایط تلقیح با باکتری افزایش بیان دارد (Kumara *et al.*, 2003). لکه شماره ۹ پروتئین Photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 در هر سه تیمار فوق کاهش بیان داشت. لکه شماره ۱۱ و۱۳ پروتئین Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit است که در تیمار باکتری در شرایط بدون تنش افزایش بیان و در تیمار باکتری در شرایط تنش و فقط شوری کاهش بیان داشت. لکه ۱۲ پروتئین Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase activase alpha 2 در هر سه تیمار فوق کاهش بیان داشت. آنزیم Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) دارای دو نوع عملکرد بوده و در مراحل اولیه دو مسیر متابولیکی متضاد یعنی تثبیت کربن فتوسنتزی (در چرخه کالوین) و در تنفس نوری شرکت می‌کند (Vaidyanathan *et al.*, 2003). در آزمایشی که بر روی پروتئوم کلزا در شرایط تنش شوری و تلقیح با باکتری سودوموناس پوتیدا انجام شد، مشاهده کردند که این آنزیم در شرایط تنش شوری کاهش بیان نشان می‌دهد که هنگام تلقیح گیاه با باکتری کاهش بیان کمتری نشان می‌دهد (Kumara *et al.*, 2003). این نتایج نشان می‌دهد که تنش شوری یکی از اجزای مهم ماشین فتوسنتز یعنی آزادی اکسیژن و کمپلکس فتوسیستم ۲ را به‌شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد و ازاین‌رو، در پیری برگها و احتمال دارد در مرگ تدریجی سلولی مشارکت کند. با تجزیه پروتئوم غلاف برگهای برنج تحت تنش شوری کلرید سدیم کوماتسو و همکاران گزارش کردند که فراوانی این گروه از پروتئین‌ها در پاسخ به تنش شوری افزایش داشت که بیانگر نقش حفاظتی این پروتئین‌ها در برابر تنش است (Komatsu and Tanaka 2004). از دیگر پروتئین‌های دخیل در سوخت وساز لکه ١٤ پروتئین‌های Riose-phosphate isomerase (TIM) می‌باشد که در هر سه تیمار افزایش بیان نشان داد و در پلاستیدها و کلروپلاست یافت می‌شود، از نوع آنزیم گلیکولیتیک بوده و در تبدیل متقابل D-Phosphate glyceraldehde-3- و DHAP عمل می‌کنند. به‌عبارتی در بیوسنتز کربوهیدرات‌ها و در چرخه کالوین حضور دارد. پروتئین TIM در لیست پروتئین‌های شناسایی شده در پروتئوم برگهای برنج تحت تنش خشکی وجود دارند (Hosseini Salekdeh *et al*., 2002b). پروتئین TIM در برخی از مطالعات تنش شوری بعنوان پروتئین پاسخ دهنده شناسایی شد. البته در تنش خشکی نیز این پروتئین در تحمل تنش دخالت داشت و افزایش بیان آن گزارش شده است (Riccardi *et al*., 1998) (شکل ۳).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]



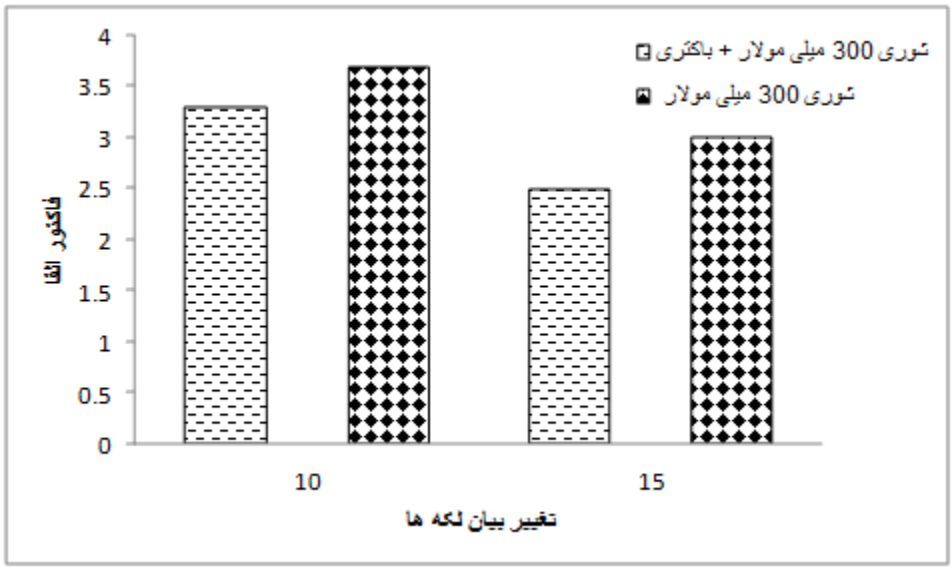
شکل ۳- میزان بیان (افزاش یا کاهش) پروتئین‌های شناسایی شده در تمام تیمار ها نسبت به شاهد

Figure 3- Proteins with quantitative ratio in all treatments compared to normal conditions (up- and down-regulated ratio)

پروتئین‌های مشترک بیان شده در دو تیمار تنش شوری به همراه باکتری و بدون باکتری

لکه شماره ۱۰ پروتئین Photosystem II protein در تیمار فقط باکتری ردیابی نشد و در تیمار تنش شوری به همراه باکتری و بدون باکتری کاهش بیان نشان داد (شکل ٤). این پروتئین متعلق به خانواده Oxygen evolving بوده و گروه منگنز را که محل اصلی شکسته شدن مولکول آب است، را پایدار نگه می‌دارد (Kumara *et al*., 2003). لکه شماره ۱۵ پروتئین Type 2 peroxiredoxin که ازپروتئین‌های دخیل در مهارکننده ROS و سم‌زدایی می‌باشد، در تیمار فقط باکتری شناسایی نشد و در تیمار های تنش شوری به همراه باکتری و بدون باکتری افزایش بیان نشان داد. پروتئین‌های peroxiredoxin بصورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. مکان سلولی این پروتئین‌ها بیانگر آن است که نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندامک‌های سلولی که منبع اصلی ROS هستند، ایفا می‌کنند. در ضمن علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل انتقال سیگنال هم فعال هستند. انتهای N این پروتئین که حاوی سیستئین می‌باشد، به اسید سولفنیک اکسیده شده که این خود پلی برای واکنش با پراکسیدها می‌باشد. مسیر سم‌زدایی این پروتئین به‌صورت یک چرخه متناوب water/water و چرخه Ascorbate peroxidase-dependent water-water در کلروپلاست گیاهی می‌باشد (Komatso, 2007).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]



شکل ٤- میزان بیان (افزایش یا کاهش) پروتئین‌های شناسایی شده در دو تیمار تشن شوری (با باکتری و بدون تلقیح با آن) نسبت به شاهد

Figure 4- Proteins with quantitative ratio in salinity treatments (with and w/o bacteria) compared to normal conditions (up- and down-regulated ratio)

بحث

به‌طور کلی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تحت شرایط تنش شوری گیاهان تلقیح شده با باکتری در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده از وزن خشک بهتری برخوردار باشند. تجزیه پروتئوم برگ، نشان داد که ۳ پروتئین درگیر در مسیر فتوسنتز (لکه های شماره ۸، ۱۱،۱۳) در حضور باکتری افزایش بیان دارند. درحالی که در شرایط تنش شوری همراه با تلقیح با باکتری کاهش بیان کمتری نسبت به شرایط فقط تنش شوری داشتند. این امر بیان‌گر این است که باکتری باعث افزایش مقاومت گیاه تحت تنش شوری شده است. لکه‌های شماره ۲، ٤، ٦، ١٤، ١٥ در هر سه وضعیت فقط شوری، شوری و تلقیح با باکتری و فقط باکتری نسبت به شاهد افزایش بیان داشتند که می‌توان تحمل بالای رقم Hyola308 را تا حد زیادی به این پروتئین‌ها نسبت داد. درصد پروتئین‌های دارای افزایش بیان در تیمار فقط باکتری بیشتر از پروتئین‌های دارای کاهش بیان است، در مقابل در دو تیمار تنش شوری به همراه باکتری و بدون باکتری درصد افزایش بیان کمتر از کاهش بیان است و این اختلاف نشان دهنده اثر تلقیح با باکتری در تغییر الگوی بیان پروتئین‌ها در گیاه بوده طوری که باعث تقویت بیان پروتئین‌های خاصی در گیاه می‌شود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

منابع

Ahmadi A, Ceiocemardeh A. 2004. Effect of drought stress on soluble carbohydrate, chlorophyll and proline in four adopted wheat cultivars with various climate of Iran. Journal of Agricultural Sciences 35: 753-763.

Alyari H, Shekari F, Shekari F. 2000. Oil Seed Crops (Agronomy and Physiology). Amidi Press, Tabriz. 182 P. (In Farsi with English abstract).

Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology advances 27: 84-93.

Ashraf M, McNeilly T. 1990. Responses of four Brassica species to sodium chloride. Environmental and Experimental Botany 30: 475-487.

Bandehagh A, Salekdeh GH, Toorchi M, Mohammadi A, Komatsu S. 2011. Comparative proteomeic analysis of canola leaves under salinity stress. Proteomics 11:1965-1975. (In Farsi with English abstract).

Bandehagh A, Toorchi M, Mohammadi A, Chaparzadeh N, Salekdeh GH, Kazemnia H. 2008. Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. Journal Food Agricultural Environmental 6:201-208. (In Farsi with English abstract).

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Damerval C, Hebert Y, De Vienne D. 1987. Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensionalelectrophoresis data with morphological traits in maize.Theoritical and Applied Genetics 74:194–202.

Farajzadeh D, Aliasgharzad N, Sokhandan Bashir N, Yakhchali B. 2009. Cloning and characterization of a plasmid encoded ACC deaminase from an indigenous Pseudomonas sp. FY32. Journal Current Microbiology 61:33-38. (In Farsi with English abstract).

Gama PB, Inanaga Tanaka K, Nakazawa R. 2007. Physiological response of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. African Journal Biotechnology 6:79-88.

Glick BR, Patten CL, Hoguin G, Penrose DM. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Journal Theoretical Biology190:63-8.

Glick BR, Penrose DM, Li JA. 1998. Model for the lowering of plant ethylene concentrationsby plant growth-promoting bacteria. Journal Theoretical Biology 190:71-79.

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.

Hosseini Salekdeh G, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. 2002b. Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2:1131-1145. (In Farsi with English abstract).

Jacobs DI, Van Der Heijden R, Verpoorte R. 2000. Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. Phytochemical Analysis 11:277–287.

Jiang Y-Q, Deyholos MK. 2006. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biology 6:25.

Khan M, Panda S. 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. Acta Physiologiae Plantarum 30: 81.

Komatsu S, Tanaka N. 2004. Rice proteome analysis: a step toward functional analysis of the rice genomics Proteomics 5: 938-949.

Kumara SG, Reddya AM, Sudhakar C. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Science 165:1245–1251.

McFarland J. 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number ofbacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association 49:1176-1178.

Moller IM. 2001. Plant mitochondoria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 561-591.

Penrose DM, Glick BR. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118:10-5.

Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D. Zivy M. 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. Plant Physiology 117:1253–1263

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

Shaharoona B, Arshad M, Zahir Z A, Khalid A. 2006. Performance of Pseudomonas spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biology and Biochemistry 38: 2971-2975.

Sun Y, Ahokas RA, Bhattacharya SK, Gerling IC, Carbone LD, Weber KT, 2006. Oxidative stress in aldosteronism. Cardiovascular Research 71:300 – 309.

Turan S, Cornish K, Kumar S, 2012. Salinity tolerance in plants: breeding and genetic engineering. Australian Journal of Crop Science 6:1337.

Valizadeh M, Moharamnejad S, Ahmadi M, Mohammadzadeh JH. 2013. Changes in activity profile of some antioxidant enzymes in alfalfa half-sib families under salt stress. Journal of Agricultural and Technology Sciences 15:503-508. (In Farsi with English abstract).

Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Sciences 165:1411–1418.

Zang X, Komatso S. 2007. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochemistry 68:426-437.

Zurbriggen M, Tognetti VB, Valle EM, Carrillo N, 2007. Cyanobacterialflavodoxin provides multiple stress tolerance. ISB News Report.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

Effect of *Pseudomonas flourescens* FY32 bacteria on leaf proteome pattern of rapeseed under salinity stress

Ali Bandehagh[1], Mahmoud Toorchi[1], Davoud Farajzadeh[2], Zahra Dehghanian[1] and Sedigheh Pirzad[1]

[1] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture,University of Tabriz, Iran.

[2] Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijn Shahid Madani University of Tabriz, Iran.

Corresponding Author: bandehhagh@tabrizu.ac.ir

Abstract

The ability of endophyte bacteria *Pseudomonas flourescens* FY32 in growth improving and increasing the resistance of rapeseed to salinity stress, through proteomic approach was investigated. This research was arranged in a factorial experiment on the basis of completely randomized design with four replications in hydroponic culture system. First factor was inoculation with bacteria and non- inoculation and the second factor was salinity stress in two levels (0 and 300 NaCl mM). The results showed that the effects of salinity stress, bacteria inoculation and canola cultivars were significant for dry weight, shoot and root ($P< 0.01$). The highest weight was related to the control and the lowest to severe stress. Inoculated plants had also the highest dry weight comparing to non-inoculated plants that indicates the positive effect of bacterial inoculation on canola in reducing the negative effects of salinity stress. Protein pattern of leaf tissue was determined by 2 dimensional electrophoresis. After scanning, second dimensional gels were analyzed through PD-quest software, then quality and quantity of protein expression in different treatment was compared. A total of 15 spots were significantly changed. Among them, four spots were related to oxidative stress, four spots were involved in metabolism pathway and seven spots were related to photosynthesis. Based on the comparison between bacteria and control gels under both stressed and non-stressed environments, the bacteria increased the tolerance of the plant under salinity stress.

Key words: Canola, PGPR, Salt stress, Two- dimensional electrophoresis

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.8.9]