

## Leaf protein pattern of tolerant and susceptible canola cultivars under drought stress

**Bitā Kazemi Oskuei** 

Former PhD student., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: kazemibita87@gmail.com

**Ali Bandehagh** 

\*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: bandehhagh@tabrizu.ac.ir

---

### **Abstract**

#### **Objective**

Drought stress is the main restriction factor in crop production that has an adverse effect on crop quantity and quality. Canola, like many crops, is affected by stress due to water deficit. At the cellular level, plants respond to drought stress by synthesizing specific proteins. Therefore, a research with the aim of studying the response mechanism of canola to drought stress and determining proteins involved in mediating stress tolerance was carried out.

#### **Materials and methods**

In order to comprehend a mechanism of canola plant response to drought stress, the protein profiles of the drought-tolerant Hyola308 and drought-sensitive Sarigol leaf under different drought stress conditions based on a gel-free/label-free proteomic technique were investigated. To validate the content variation of proteins identified in the proteomic analysis, Western blot analysis was used.

#### **Results**

A total of 56 proteins were identified in Sarigol and Hyola308, 16 proteins were specific to Hyola308 and 16 proteins were specific to Sarigol, respectively. Of the identified proteins, 12

proteins were commonly detected between Sarigol and Hyola308. In Sarigol under different drought stress conditions, the abundance of proteins related to protein metabolism, photosynthesis and energy metabolism decreased; whereas, in Hyola308, an enhancement in proteins abundance involved in photosynthesis, energy metabolism and antioxidant defense was observed.

### **Conclusions**

It is inferred that enhancement of these protein abundance in Hyola308 leaf may be a part of tolerance mechanism of this cultivar exposed to stress and decrease in the Kelvin cycle efficiency and production of sugar and energy in Sarigol may justify growth reduction of this cultivar.

**Keywords:** Abiotic stress, canola, Immuno-blot, proteomic.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Kazemi Oskuei B, Bandehhagh A (2021) Leaf protein pattern of tolerant and susceptible canola cultivars under drought stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 1-24.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 1-24.

DOI: 10.22103/jab.2021.16617.1264

Received: July 1, 2021.


Accepted: August 5, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

## الگوی پروتئینی برگ ارقام متحمل و حساس کلزا تحت تنش خشکی

بیتا کاظمی اسکویی 

دانش آموخته دکتری اصلاح نباتات، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه:

kazemibita87@gmail.com

علی بنده حق 

\*نویسنده مسئول: دانشیار گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه:

bandehhagh@tabrizu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۰

### چکیده

**هدف:** تنش خشکی یکی از عمده‌ترین محدودیت‌ها در تولید محصولات زراعی است که اثر نامطلوبی بر کمیت و کیفیت آن‌ها دارد. کلزا همانند بسیاری از گیاهان زراعی از تنش ناشی از کمبود آب متاثر می‌شود. در سطح سلولی گیاهان از طریق سنتز پروتئین‌های خاص به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. از این رو پژوهشی با هدف مطالعه مکانیسم پاسخ کلزا به تنش خشکی و تعیین پروتئین‌های دخیل در تحمل تنش انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** الگوی پروتئینی برگ ارقام Hyola308 و Sarigol بترتیب به عنوان ارقام حساس و متحمل با استفاده از تکنیک پروتئومیک فاقد ژل/فاقد (شاتگان پروتئومیکس) برچسب تحت سطوح مختلف تنش خشکی (۰.۶ و ۱/۲ مگا پاسکال (MPa)) به همراه شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. جهت اعتبار سنجی تغییر محتوای پروتئین‌های شنا سایی شده از و سترن‌بلات استفاده شد.

**نتایج:** در کل ۵۶ پروتئین شامل ۱۶ پروتئین به صورت اختصاصی برای Hyola308، 16 پروتئین به صورت اختصاصی برای Sarigol و ۱۲ پروتئین مشترک بین هر دو شنا سایی شد. در Sarigol فراوانی اکثر پروتئین‌های درگیر در متابولیسم پروتئین،

فتوستتر و انرژی در مواجهه با سطوح مختلف تنش خشکی کاهش نشان داد، در مقابل در Hyola308 افزایش در فراوانی پروتئین‌های درگیر در متابولیسم انرژی، فتوستتر و دفاع آنتی‌اکسیدان به صورت اختصاصی مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** استنباط می‌شود که افزایش فراوانی این پروتئین‌ها در برگ‌های Hyola308 قسمتی از مکانیسم تحمل این رقم در مواجهه با تنش می‌باشد و تقلیل کارایی چرخه کلورین و کاهش تولید قند و انرژی در Sarigol، کاهش رشد این رقم را تحت تنش خشکی می‌تواند توجیه کند.

**کلیدواژه‌ها:** ایمنوبات، پروتئومیک، تنش غیرزیستی، کلزا.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** کاظمی اسکویی بیتا، بنده حق علی (۱۴۰۰) الگوی پروتئینی برگ ارقام متحمل و حساس کلزا تحت تنش خشکی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۲۴-۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

تنش خشکی یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی است که در حال حاضر باعث از بین رفتن مقدار قابل توجهی از عملکرد محصولات کشاورزی در جهان می‌شود (Wassmann et al. 2009). اثرهای زیان‌آور تنش خشکی نه تنها به زمان وقوع تنش بلکه به شدت آن نیز بستگی دارد (Yang et al. 2008). مدل‌های تغییر آب و هوا پیش بینی می‌کنند که گرم شدن کره زمین باعث افزایش شدت و فراوانی تنش‌های خشکی در آینده نزدیک خواهد شد (Hashiguchi et al. 2010). تنش خشکی با محدود کردن دسترسی به آب تنش اسمزی را القا می‌کند (Blum 1989). کمبود آب ناشی از تنش اسمزی با تأثیر بر آماس سلولی و در نتیجه باز و بسته شدن روزنه‌ها، فرآیندهای فتوسنتز، تنفس و تعرق را تحت تأثیر قرار داده و از طرف دیگر با تأثیر بر فرآیندهای آنزیمی که به طور مستقیم با پتانسیل آب کنترل می‌شوند، بر رشد گیاه اثر منفی می‌گذارد (Muller et al. 2011). گزارش‌های بسیاری مبنی بر تأثیر منفی کمبود آب در مختل شدن فرآیندهای فیزیولوژیکی، تغییر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، متابولیسم نیتروژن و نیز تغییر در ساختمان پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های گیاه کلزا ارائه شده است (Bybordi et al. 2010). پاسخ به تنش در گیاهان از طریق تغییرات موقت در بیان ژن‌ها و تولید پروتئین‌های خاص صورت می‌گیرد (Gupta et al. 2010). تجمع بسیاری از پروتئین‌ها مانند چاپرون‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و بازدارنده‌های پروتئین‌سازی در پاسخ به تنش خشکی، گیاه را

در برابر خسارت‌های ناشی از کاهش پتانسیل آب حفظ می‌کنند (Wang et al. 2004). استفاده از راهکار پروتئومیک امکان مطالعه تغییر در بیان این ژن‌ها و شناسایی مسیرهای واکنش را فراهم می‌کند (Grover and Dubey 2001) و فهم مناسبی را از پاسخ‌های پیچیده گیاه به تنش‌های محیطی و همچنین پروتئین‌های مرتبط با تحمل به تنش خشکی ایجاد می‌کند. از تجزیه و تحلیل پروتئوم برگ‌های گیاهان متعددی نظیر برنج (Ke et al. 2009)، گندم (Caruso et al. 2009)، آفتاب‌گردان (Castillejo et al. 2008)، سویا (Mohammadi et al. 2012) و کلزا (Kazemi Oskuei et al. 2018) پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی گوناگونی شناسایی شدند که عمدتاً در تنظیم ریداکس، پاسخ تنش اکسیداتیو، انتقال سیگنال، پیچش پروتئین‌ها، متابولیسم ثانویه و فتوسنتز درگیر بودند (Vincent et al. 2005). همچنین روش پروتئومیک را برای درک تأثیر تنش خشکی بر روی لیگنینی شدن برگ‌های ذرت استفاده کردند و دریافتند که پروتئین‌های درگیر در لیگنینی شدن و سنتز فلاونوئید مشارکت مهمی در پاسخ گیاه به کمبود آب دارند (Mohammadi et al. 2012). با بررسی تغییرات پروتئین‌ها در گیاهچه‌های ارقام متحمل و حساس سویا تحت تنش خشکی ناشی از القای پلی‌اتیلن‌گلیکول نشان دادند که در رقم متحمل فراوانی پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم و ترانس‌اسانی افزایش یافته و فراوانی پروتئین‌های مربوط به تولید انرژی و سنتز پروتئین کاهش پیدا کردند. تغییرات فراوانی پروتئین‌ها تحت تنش در ارقام متحمل نسبت به حساس بیانگر فعالیت‌های متابولیکی خاص آن‌ها برای مقابله با تنش خشکی است (Kakaei et al. 2010; Irar et al. 2010). Kausar et al. (2013) اظهار داشتند که در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس جو تحت تنش خشکی پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز، سنتز آمینو اسیدها و پروتئین‌های مرتبط با تخریب، بیان متفاوتی داشتند. Hosseini Salkdeh and Nasrabadi (2011) با بررسی و مقایسه روند پروتئین‌های برگ ارقام حساس و مقاوم برنج نشان دادند که در رقم حساس پروتئین‌های بیشتری در مواجهه با تنش اسمزی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، مکانیسم متفاوتی در سطح مولکولی بین این ارقام همانند بیان بالای پروتئین فریتین در رقم متحمل نسبت به رقم حساس وجود دارد که موجب تحمل به تنش در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس می‌شود. در پژوهش حاضر به منظور مطالعه پاسخ کلزا به تنش خشکی، تغییرات در الگوی بیان پروتئین‌های ارقام حساس و متحمل با استفاده از روش پروتئومیک بدون ژل/بدون برچسب مورد بررسی قرار گرفت. اساس کار در روش پروتئومیک بدون ژل/بدون برچسب عبارت است از هضم مخلوط پروتئینی توسط پروتئازها، جدا سازی و ورود پپتیدهای حاصل از هضم به طیف سنجی جرمی و در ادامه با کمک الگوریتم‌های جستجو طیف‌های حاصل با پایگاه‌های اطلاعاتی موجود مقایسه و شناسایی کیفی انجام می‌گردد. جهت اعتبارسنجی تغییر محتوای پروتئین‌های شناسایی شده از وسترن بلات استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی پس از شناخت پروتئین‌های پاسخگو و بررسی نقش احتمالی آن‌ها، در کنار داده‌های حاصل از سایر روش‌های مولکولی، می‌تواند بستر مناسبی را برای مهندسی ژنوتیپ‌ها در راستای حصول گیاهان متحمل‌تر فراهم کند.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل دو رقم کلزای بهاره با نام‌های Hyola308 و Sarigol بترتیب به عنوان ارقام متحمل و حساس بود (Kazemi Oskuei et al. 2018). این ارقام در دو سطح تنش خشکی ۰/۶ و ۱/۲ مگا پاسکال (MPa) به همراه شاهد در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سیستم هیدروپونیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور همگن ارقام کلزا بعد از ضد عفونی به روش Penrose and Glick (2003) با فاصله یکسان بر روی کاغذ صافی استریل در پتری‌دیش‌ها قرار گرفت تا جوانه‌زنی صورت گیرد. گیاهچه‌های هفت روزه کلزا به سیستم هیدروپونیک از نوع بستر جاری و حاوی محلول هوگلد منتقل شدند. اعمال تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه‌ها در سیستم به صورت تدریجی با اضافه کردن پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG 6000) تهیه شده براساس روش Michel and Kaufmann (1973) به محلول غذایی موجود شروع و تا اواخر دوره رشد رویشی ادامه یافت. دما در شبانه روز در  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. در طول مدت انجام آزمایش مقدار رطوبت نسبی موجود در گلخانه در شبانه روز بین ۵۰-۶۰ درصد در نوسان بود. برر سی تفاوت الگوی پروتئینی برگ ارقام متحمل و حساس کلزا تحت سطوح مختلف تنش خشکی در آزمایشگاه پروتئومیک موسسه علوم زراعی نارو<sup>۱</sup> واقع در کشور ژاپن صورت گرفت.

**۱ استخراج پروتئین، خالص سازی و هضم جهت طیف سنجی جرمی:** به منظور استخراج پروتئین ۵۰۰mg گرم بافت برگ در نیتروژن مایع توسط هاون چینی پودر شد و ۱۰ میلی‌لیتر بافر استخراج اول (جدول ۱) به آن اضافه شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در  $9000 \times g$  و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رو شناور جدا شده و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراج دوم (جدول ۱) به آن اضافه شد. رسوب به دست آمده به کمک دستگاه Speed-Vac خشک شد (دستگاه Speed-Vac برای خشک کردن پپتیدهای نمونه اولیه طیف سنجی جرمی استفاده می‌شود. خلاء موجود در محفظه این دستگاه باعث تبخیر حلال و دمای پایین محیط در طول فرآیند باعث جلوگیری از آسیب رسیدن به نمونه‌ها می‌شود). در ادامه ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز (جدول ۱) به نمونه‌های خشک شده اضافه شد. پس از ۶۰ دقیقه انجام ورتکس در دمای اتاق، روشناور برای سنجش غلظت پروتئین جمع‌آوری شد (Komatsu et al. 2013). غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش Bradford (1976) و با استفاده از سرم‌آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد. جهت خالص‌سازی نمونه‌های پروتئینی به ترتیب متانول، کلروفورم و آب به نمونه‌ها اضافه و با ورتکس مخلوط گردید بعد از سانتریفیوژ  $20000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه فاز بالایی نمونه‌ها حذف و فاز پائینی حفظ گردید (Nanjo et al. 2012). جهت احیای پیوندهای دی‌سولفیدی و آلکیلاسیون، ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵۰ میلی‌مولار بی‌کربنات آمونیوم و ۵

۱. The National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

میکرولیتر از محلول ۰/۲۵ میلی مولار DDT در بی کربنات آمونیوم ۵۰ میلی مولار به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. سپس ۵ میکرولیتر از محلول ۰/۳ مولار یدواستامید (IAA) در بی کربنات آمونیوم ۵۰ میلی مولار به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. هضم پروتئین‌های الکیله شده به واسطه آندوپیتیدازهای تریپسین و لیزین به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. در مرحله بعدی ۱۰ میکرولیتر اسیدفرمیک ۲۰ درصد اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با  $20000 \times g$  و در دمای اتاق سانتریفوژ شد (Nanjo et al. 2012).

### جدول ۱. مواد تشکیل دهنده بافرهای مورد استفاده برای استخراج پروتئین

**Table 1. Buffer components for protein extraction**

lysis buffer	Solution II	Solution I
بافر لیز	بافر استخراج دوم	بافر استخراج اول
7 M Urea	Acetone	Acetone
۷M اوره	استون	استون
2 M Thiourea	2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol
۲M تیوره	۲- مرکاپتول اتانول	۲- مرکاپتول اتانول
5% CHAPS	-	10% TCA
۵٪ چپس	-	۱۰٪ تی سی ای
2 mM Tributylphosphine	-	-
۲Mm تری بوتیل فسفین	-	-

**طیف‌سنجی جرمی:** به منظور طیف‌سنجی جرمی از تجهیزات LTQ XL Orbitrap MS (Thermo fisher scientific, san jose, CA, USA)

مجهز به نرم افزار XCalibur با روش هدف‌یابی وابسته به داده استفاده شد. پپتیدها در اسیدفرمیک ۰/۱ درصد با استفاده از کروماتوگرافی مایع، Ultimate 3000 nanoLC system (dionex, germering, Germany) به ستون‌ها C18 PepMan trap column (300  $\mu$ m ID x 5 mm; Dionex) به ستون تله منتقل شده و بعد از شستشو در اسیدفرمیک ۰/۱ درصد در استونیتریل، با سرعت جریان ۲۰۰ نانولیتتر در دقیقه در یک ستون کاپیلاری نانو C18 Tip column (75  $\mu$ m ID x 120 mm; Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) با ولتاژ ۱/۸ کیلو وات پاشیده شدند. طیف‌جرمی کامل با درجه تبیین ۳۰۰۰۰ در Orbitrap با دامنه  $m/z$  ۴۰۰-۱۵۰۰ حاصل شد. ده یون غالب برای تفکیک

القایی توالی‌ها با انرژی تصادم ۳۵ در صد انتخاب شدند. برای ممانعت از انتخاب تکراری پپتیدها خارج سازی دینامیک در طی ۹۰ ثانیه اعمال شد. طیف حاصل از طیف‌سنجی برای شناسایی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

**شناسایی، تجزیه و تحلیل پروتئین‌های طیف‌سنجی جرمی:** پروتئین‌ها توسط موتور جستجوی Mascot Proteome Discoverer (version 2.5.1; Matrix Science, London, UK) و نرم افزار جستجوی پروتئین Tair10, TAIR (version 1.4.0.288; Thermo Fisher Scientific) در مقابل پایگاه اطلاعاتی (http://www.arabidopsis.org) شناسایی شدند. به این صورت که داده‌های خام حاصل توسط نرم‌افزار جستجوی پروتئین به داده‌های مورد نیاز Mascot تبدیل شد. نرم‌افزار Mascot از داده‌های طیف‌سنجی جرمی و دیتابیس توالی پپتیدها برای شناسایی پروتئین‌ها استفاده می‌کند. کاربامیدومتیلاسیون سیستئین و اکسیداسیون متیونین به ترتیب به عنوان تنظیم‌های ثابت و متغیر، ترتیبی به عنوان آنزیم پروتئولیک، یک برش گمشده، دامنه تحمل جرم پپتید ۱۰ پی‌پی‌ام، دامنه تحمل جرم قطعه ۰/۸ دالتون و ۲، ۳ و ۴+ برای بار پپتید، تنظیمات لازم قبل از شروع جستجو بود. با استفاده از نرم‌افزار SIEVE (version 2.1.49; Thermo Fisher Scientific)، فراوانی نسبی پپتیدها و پروتئین‌ها در بین نمونه‌های مقایسه شده و خروجی اکسل مورد استفاده قرار گرفت.

**تجزیه عملکردی پروتئین‌ها:** برای درک بهتر نقش پروتئین‌ها، با استفاده از کدهای MapMan bin فرآیند جستجوی عملکرد و فراوانی پروتئین‌ها انجام شد (Usadel et al. 2009).

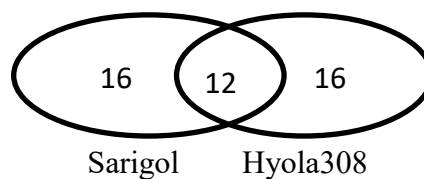
**ایمنوبلات (وسترن بلات):** بدین منظور مقدار مساوی از نمونه‌های پروتئینی (۱۰ μg) روی ژل SDS-پلی‌اکریل‌آمید ۱۷ درصد جدا سازی شده و به غشاء PVDF با استفاده از بلاتر نیمه‌خشک منتقل شد. بلوک کردن غشاء کله‌گذاری شده در بافر انسداد شامل ECL TBS-T و ژلاتین ۳۰ درصد به صورت شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس غشاء به همراه آنتی‌بادی اولیه آنتی‌گلی‌سیرآلدهیدتری فسفات‌دهیدروژناز (Abcam, Cambridge, United Kingdom) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. در ادامه بعد از یک ساعت انکوبه شدن با آنتی‌بادی ثانویه R (Antirabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad) سیگنال‌ها با استفاده از ECL Plus کیت تشخیص وسترن بلات (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) شناسایی شد. سیگنال‌های شناسایی شده با استفاده از تجزیه و تحلیل کننده تصویر (LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan) تصویرسازی شده و شدت نسبی باندها با استفاده از نرم افزار Quantity One (version 4.5; Bio-Rad) محاسبه شد (Yin and Komatsu 2016).



## نتایج و بحث

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش: با توجه به نتایج تجزیه پروتئینی در کل ۵۶ پروتئین در برگ‌های Hyola308 و Sarigol تحت تنش خشکی شناسایی شدند. از این ۵۶ پروتئین ۱۶ پروتئین منحصراً متعلق به Sarigol بودند و دوازده پروتئین به صورت مشترک بین Hyola308 و Sarigol شناسایی شدند (شکل ۱). برای بررسی دقیق‌تر تأثیر تنش بر روی کلزا پروتئین‌های شناسایی شده در تجزیه پروتئوم با استفاده از کدهای MapMan bin نسبت به عملکردشان در سلول‌ها گروه‌بندی شدند. اکثریت پروتئین‌های شناسایی شده در برگ Hyola308 در گروه‌های متابولیسم پروتئین‌ها، فتوسنتز و تنش بودند (جدول ۲)، در حالی که در Sarigol اکثریت پروتئین‌ها از نظر عملکردشان به گروه‌های متابولیسم پروتئین و سازمان‌دهی اختصاص داشتند (جدول ۳). پروتئین‌های مشترک بین دو رقم نیز به گروه‌های عملکردی فتوسنتز و گلیکولیز تعلق داشتند (جدول ۴). تمامی پروتئین‌های مشترک در رقم Hyola308 تحت تنش خشکی افزایش فراوانی نشان دادند، در مقابل در رقم Sarigol همه پروتئین‌های مشترک به جز گلیسرآلدهیدتری فسفات‌دهیدروژناز<sup>۲</sup> (GAPDH) در شرایط تنش متوسط افزایش و با افزایش شدت تنش کاهش فراوانی نشان دادند (جدول ۴).

از میان پروتئین‌های منحصر به Hyola308 پروتئین‌های فیروودوکسین-NADP-ردوکتاز (FNR)<sup>۳</sup> و پروتئاز FtsH<sup>۴</sup> در شرایط تنش متوسط و همچنین شرایط تنش شدید افزایش فراوانی نشان دادند (جدول ۲). فراوانی پروتئین‌های گلو تاتیون‌اس ترانس‌فرازها (GST)<sup>۵</sup>، Granulin repeat cysteine protease، Aldolase superfamily protein، PSB27 \_ photosystem II family protein و cpHsc70 در شرایط تنش متوسط کاهش و با افزایش شدت تنش افزایش فراوانی نشان دادند. فراوانی پروتئین گلو تامات سنتاز (GOGAT)<sup>۶</sup> بر خلاف سایر پروتئین‌ها در شرایط تنش متوسط افزایش و با افزایش شدت تنش کاهش نشان داد (جدول ۲).



شکل ۱. نمودار ون پروتئین‌های شناسایی شده در ارقام Sarigol و Hyola308 تحت تنش خشکی

**Figure 1. Venn diagram of proteins identified from Hyola308 and Sarigol under drought stress**

۲. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
۳. Ferredoxin\_NADPoxidoreductase
۴. FtsH extracellular protease
۵. Glutathione Stransferase
۶. Glutamate synthase

## جدول ۲. لیست پروتئین‌های تغییر یافته در رقم Hyola308 تحت سطوح مختلف تنش خشکی

Table 1. List of changed proteins in Hyola308 under different drought stress levels

No. شماره	ProteinID <sup>a</sup> شناسه پروتئین	Description شرح	MP <sup>b</sup> پپتید	Ratio <sup>c</sup> فراوانی نسبی		Function <sup>d</sup> عملکرد
				0.6MPa	1.2MPa	
1	AT2G30860	ATGSTF9_GLUTTR_ATGSTF7_ GSTF9 _ glutathione S_transferase PHI 9	2	0.54282	2.11199	Misc متفرقه
2	AT5G04140	GLU1_GLS1_GLUS_FD_GOGAT _ glutamate synthase 1 Class I glutamine	23	1.15958	0.96348	N-metabolism متابولیسم ان
3	AT1G53280	amidotransferase_like superfamily protein	3	0.49568	0.66443	not assigned اختصاص داده نشده
4	AT5G30510	RPS1_ ARRPS1 _ ribosomal protein S1	6	0.45680	0.60867	Protein پروتئین
5	AT5G43060	Granulin repeat cysteine protease family protein	3	0.87789	1.76439	Protein پروتئین
6	AT2G30950	VAR2_ FTSH2 _ FtsH extracellular protease family	13	1.02016	2.30552	Protein پروتئین
7	AT3G14415	Aldolase_type TIM barrel family protein	10	0.71490	0.72087	PS فتوستنز
8	AT3G14420	Aldolase_type TIM barrel family protein	18	6.67605	0.94695	PS فتوستنز
9	AT2G13360	AGT_ AGT1_ SGAT _ alanine:glyoxylate aminotransferase	6	0.84731	0.95620	PS فتوستنز
10	AT4G26530	Aldolase superfamily protein	5	0.83909	1.19249	PS فتوستنز
11	AT1G03600	PSB27 _ photosystem II family protein	3	0.65556	1.67771	PS فتوستنز
12	AT1G20020	ATLFNR2_ FNR2 _ ferredoxin_NADP(_)_oxidoreductase 2	6	1.45450	1.77236	PS فتوستنز
13	AT3G11630	Thioredoxin superfamily protein	8	0.82880	1.08520	Redox ریدوکس
14	AT3G52150	RNA_binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	2	0.15784	0.40785	RNA ار ان ای
15	AT5G15450	APG6_ CLPB3_ CLPB_P _ casein lytic proteinase B3	3	0.09582	0.43040	Stress تنش
16	AT5G49910	CPHSC70_2EAT SHOCK PROTEIN 70_2_ HSC70_7_ cpHsc70_2 _ chloroplast heat shock protein 70_2	15	0.76976	1.04794	Stress تنش

<sup>a</sup>Protein ID, according to Arabidopsis database. <sup>b</sup>MP, number of matched peptides. <sup>c</sup>Ratio, relative abundance of protein. <sup>d</sup>Function, function categorized using MapMan bin codes.

<sup>a</sup>Protein ID شناسه پروتئین بر اساس دیتابیس آرابیدوپسیس. <sup>b</sup>MP, تعداد پپتیدهای همسان. <sup>c</sup>Ratio فراوانی نسبی پروتئین‌ها. <sup>d</sup>Function عملکرد طبقه‌بندی شده بر اساس کدهای مپ‌من بین.

در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، الکترون ها در فتوسیستم I از طریق فیریدوکسین پذیرفته می شوند. آنزیم فیرودوکسین NADP ردوکتاز (FNR) نقش کلیدی در متابولیسم کاهشی کلروپلاست ایفا می کند و بخش عظیمی از فیریدوکسین ها به واسطه این آنزیم جهت القا  $NADP^+$  به NADPH اکسیده می شوند (Zhang et al. 2001). تغییرات در سطوح فیرودوکسین جز مکانیزم های سازگاری در راستای حفاظت از زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در مقابل آسیب های ناشی از گونه های فعال اکسیژن بر شمرده می شود (Ghaffari et al. 2013). علاوه بر نقش کلاسیک این آنزیم در فتوسنتز، ارتباط و همبستگی قوی بین محتوای FNR و تحمل تنش اکسیداتیو نیز گزارش شده است (Palatnik et al. 2003; Rodriguez et al. 2007; Rodriguez et al. 2012). گزارش شده است که آنزیم FNR گیاهان را از اثرهای تنش اکسیداتیو محافظت می کند (Rodriguez et al. 2007). بدین ترتیب که افزایش یا کاهش محتوای آنزیم FNR، تولید و میزان حضور اکسیژن های فعال را در سلول تغییر می دهد و به دنبال آن رونویسی ژن های مربوط به تحمل به تنش را القا می کند (Kozuleva et al. 2016). افزایش بیان ژن های FNR در ژنوتیپ های مقاوم در پاسخ به تنش خشکی به عنوان یک مزیت برای مقاومت به خشکی در نظر گرفته می شود (Krugman et al. 2010).

پروتئاز FtsH کمپلکسی هترومریک می باشد که در فرآیندهای مورد نیاز برای توسعه و نگهداری دستگاه فتوسنتزی نقش دارد و زیر واحدهای آن تا حدی از لحاظ عملکردی زائد هستند (Sakamoto 2006). درگیری پروتئاز FtsH در چرخه ترمیم فتوسیستم II در کلروپلاست تحت تنش از طریق ترمیم تخریب در پروتئین D1 به اثبات رسیده است (Kato and Sakamoto 2009). همچنین FtsH میتوکندریایی در بیوسنتز و نگهداری سیستم فسفریلاسیون اکسیداتیو نقش دارد (Janska et al. 2010). سطوح رونویسی FtsH به شدت تحت تاثیر تنش قرار می گیرد (Adam et al. 2006)، بطوری که تحت تنش سرما، شوری و خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول رونوشت ژن ZmFtsH2B در برگ های گیاه ذرت به طور معنی داری افزایش بیان نشان می دهد (Yue et al. 2010). پروتئاز FtsH همچنین در شکل گیری غشاء تیلاکوئیدی نقش دارد (Zaltsman et al. 2005). با توجه به متلاشی شدن غشاء تیلاکوئیدی در زمان خشکی (Mundree and Farrant 2000)، به احتمال زیاد افزایش فراوانی پروتئاز FtsH در زمان تنش نشان دهنده سنتز و ذخیره این پروتئین برای بازسازی سریع و دوباره غشاء تیلاکوئیدی به محض رفع کمبود آب می باشد. گزارش شده که فراوانی پروتئاز FtsH در گیاه رستاقیز (*Xerophyta viscosa*) به شدت متحمل به خشکی افزایش (Ingle et al. 2007) و در ارقام حساس گیاه چمن مرتعی (*Kentucky bluegrass*) کاهش می یابد (Xu and Huang 2010). افزایش فراوانی FtsH پروتئاز در رقم متحمل ممکن است نشان دهنده توانایی بالای این رقم در ترمیم خسارت وارد شده به پلی پپتید D1 تحت تنش خشکی باشد.

گلوکاتایون اس تراز سفرازاها (GST) خانواده ای چند ژنی از ایزوزیم های متعلق به گروه آنتی اکسیدان های آنزیمی هستند که با افزودن گلوکاتایون به مولکول های فعال، آنها را تسکین می دهند (Kumar and Trivedi 2018). افزایش میزان این پروتئین ها در طی تنش در واقع اثرهای سوء گونه های فعال اکسیژن را خنثی می کند (Ding et al. 2017) و بدین ترتیب سلول را از آسیب

تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند. Anderson and Davis (2004) افزایش رونویسی و فعالیت آنزیم GST را به طور گسترده‌ای در بافت‌های تحت تنش‌های محیطی گزارش کردند. گزارش شده است که میزان GST تحت تنش خشکی در ارقام متحمل در جهت مقابله با اثرات سوء تنش افزایش می‌یابد (Kausar et al. 2013). به همین ترتیب در گیاه توتون تراریخته تغییر بیان ژن‌های GST در جهت افزایش تحمل نسبت به تنش شوری گزارش شده است (Kissoudis, et al. 2015). به نظر می‌رسد گیاهان متحمل، میزان افزایش سطوح بیان ژن GST را در مواجهه با تنش کنترل می‌کنند (Chugh and Khurana 2002).

گلوتامات سنتاز (GOGAT) جز آنزیم‌های کلیدی درگیر در بازیافت نیتروژن در گیاهان بشمار می‌رود، آمونوم حاصل از کاهش نیترات به واسطه این آنزیم در اسیدهای آمینه گنجانده می‌شود. گزارش‌های فراوانی از کاهش مداوم فعالیت آنزیم‌های کلیدی متابولیسم نیتروژن در شرایط تنش آبی عنوان شده است (Xiong et al. 2018; Pawar and Lokhande 2015). گزارش شده است که تنش آبی فعالیت آنزیم GOGAT، جذب نیتروژن و محتوای ترکیبات نیتروژنی موجود در برگ گیاهچه‌های آفتابگردان را کاهش می‌دهد (Singh et al. 2015). افزایش محدودیت آبی ناشی از تنش خشکی، کاهش تقاضای نیتروژن در برگ‌های گیاهان را به دنبال دارد، در نتیجه به دنبال آن کاهش در فعالیت آنزیم‌های متابولیسم نیتروژن از جمله GOGAT اتفاق می‌افتد (Xiong et al. 2018). بررسی اثر تنش اسمزی بر روی فعالیت آنزیم GOGAT در گیاه نخود در ارتباط با تحمل به تنش خشکی نشان داده است که فعالیت این آنزیم در برگ ارقام مقاوم تحت تنش رطوبتی افزایش می‌یابد (Pawar and Lokhande 2015). افزایش در فعالیت آنزیم GOGAT توان تولید اسیدهای آمینه تنظیم‌کننده اسمزی مانند پرولین را در ارقام مقاوم افزایش می‌دهد و بدین ترتیب تحمل به تنش اسمزی را در این گیاهان بهبود می‌بخشد (De la Torre-González et al. 2020).

پروتئین‌های شوک حرارتی<sup>y</sup> (Hsp) به عنوان چاپرون‌های مولکولی خانواده بزرگی از پروتئین‌ها هستند که دارای ساختمانی شدیداً محافظت شده می‌باشند (Juliann et al. 1998). این پروتئین‌ها در تاخوردگی پروتئین‌های تازه سنتز شده، تراسانی پیام، تخریب و جابجایی پروتئین‌ها از هسته به سایر اندام‌ها نقش دارند (Yu et al. 2015). همچنین تحت شرایط تنش خشکی نقشی حیاتی در حمایت از گیاهان ایفا کرده (Yu et al. 2015) و سبب حفظ هموستازی سلولی می‌شوند (Klein and Luo 2010). یوکاریوت‌های فتوسنتزی دارای چهار تیپ از Hsp70 هستند که در موقعیت‌های مختلف سلولی (سیتوپلاسم، میتوکندری، کلروپلاست و شبکه آندوپلاسمی) متمرکز شده‌اند (Karlin and Brocchieri 1998). Hsp70های کلروپلاستی نقش مهمی در توسعه کلروپلاست در زمان تنش بازی می‌کنند (Kim and An 2013). حضور Hsp70های کلروپلاستی برای رشد گیاه ضروری بوده و بیان بالاتری در برگ‌ها نسبت به سایر Hspها دارند (Su and Li 2008). گزارش شده است که بیان

#### V. Heat shock proteins

ژن Hsp70B در موقعیت کلروپلاست تحت تنش‌های حرارتی و اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Schroda et al. 1999). در مطالعه حاضر فراوانی پروتئین Hsp70 کلروپلاستی با افزایش شدت تنش در رقم متحمل Hyola308 نیز افزایش یافت. گفته می‌شود که تحمل بالا به تنش اسمزی گیاهان با تولید انبوه پروتئین‌های Hsp دارای همبستگی مثبت است (Alvim et al. 2001; Mohammadi et al. 2012). پی‌شنهاد می‌شود که این افزایش به عنوان یک مکانیسم تحمل، دفاع گیاه Hyola308 را در مقابل تنش خشکی تسهیل می‌کند.

در رقم حساس Sarigol همه ۱۶ پروتئین اختصاصی شناسایی شده از جمله پروتئین‌های Hsp70، هم در شرایط تنش متوسط و هم در شرایط تنش شدید کاهش فراوانی نشان دادند (جدول ۳). بیان بالای Hsp70‌های سیتوزولی (AtHsp70) منجر به احیای مقاومت به تنش در گیاهان می‌شود (Cazale et al. 2009)، در مقابل کاهش بیان بیش از یک AtHsp70 سیتوزولی برای گیاهان کشنده است (Sung and Guy 2003). در مطالعه حاضر فراوانی خانواده پروتئین‌های Hsp70 از جمله AtHsp70 در رقم حساس با افزایش شدت تنش کاهش معنی‌داری را نشان داد (Lee and Schoeffl 1996). کاهش پروتئین‌های AtHsp70 در رقم حساس می‌تواند نشان‌دهنده وجود اختلالات ناشی از تنش در متابولیسم پروتئین‌ها باشد. شواهدی دل بر اهمیت AtHsp70 سیتوزولی در سازگاری گیاه تراریخته آراییدوپ سیس ارائه شده که نشان می‌دهد، کاهش این پروتئین باعث کاهش تحمل گیاه به تنش می‌شود (Jungkunz et al. 2011).

پروتئین‌های Hcf136<sup>۸</sup> آنگریز و واقع در لومن استرمای تیلاکوئیدها هستند که برای اتصال دوباره و یا پایداری زیر واحدهای فتوسیستم II و در کل برای زیست‌زایی فتوسیستم‌ها مورد نیاز می‌باشد. اختلال در این پروتئین‌ها باعث زیان‌آوری به فتوسیستم II شده (Takahashi and Murata 2008) و غیرفعال شدن و جهش در ژن‌های پروتئین Hcf136، فتوتیپ‌هایی با فتوسیستم ناقص را بدنبال دارد (Plucken et al. 2002). مطابق با یافته‌های حاضر Ford et al. (2011) کاهش در محتوای پروتئین Hcf136 را در ارقام حساس گندم تحت تنش خشکی گزارش کردند، همچنین عنوان کردند که ترمیم فتوسیستم II در رقم متحمل با توجه به افزایش در محتوای پروتئین Hcf136 سریع‌تر نسبت به سایر ارقام گندم اتفاق می‌افتد.

**پروتئین‌های مشترک:** مهمترین دلیل حساسیت و تحمل ارقام کلزا به تنش خشکی بیان متفاوت و القای منحصر بفرد پروتئین‌های مشترک آن‌ها عنوان شده است (Khalili and Naghavi 2017a). پروتئین sedoheptulose bisphosphate (SBPase) و فروکتوزبیس فسفات‌آلدولاز<sup>۹</sup> (FBPA) جزء پروتئین‌های مشترک بین Hyola308 و Sarigol بودند (جدول ۴). بر خلاف سایر پروتئین‌ها SBPase هم در شرایط تنش متوسط و هم شدید در رقم حساس Sarigol افزایش بیان نشان داد، در مقابل فراوانی FBPA به طور معنی‌داری تحت تنش اسمزی شدید کاهش نشان داد (جدول ۴).

۸. High chlorophyll fluorescence 136

۹. Fructose-bisphosphate aldolase

## جدول ۳. لیست پروتئین‌های تغییر یافته در رقم Sarigol تحت سطوح مختلف تنش خشکی

Table 2. List of changed proteins in Sarigol under different drought stress levels

No. شماره	ProteinID <sup>a</sup> شناسه پروتئین	Description شرح	MP <sup>b</sup> پپتید	Ratio <sup>c</sup> فراوانی نسبی		Function <sup>d</sup> عملکرد
				0.6MPa	1.2MPa	
1	ATCG00720	PETB _ photosynthetic electron transfer B	2	0.47999	0.41334	PS. فتوسنتز
2	AT4G38740	ROC1 _ rotamase CYP 1	2	0.79463	0.73852	Cell سلول
3	AT3G08530	Clathrin_ heavy chain	5	0.54250	0.54425	Cell سلول
4	AT3G11130	Clathrin_ heavy chain	5	0.54250	0.54425	Cell سلول
5	AT1G79550	PGK _ phosphoglycerate kinase	5	0.67228	0.80829	Glycolysis گلیکولیز
6	AT1G43670	Inositol monophosphatase family protein	6	0.74501	0.80177	major CHO metabolism متابولیسم کربوهیدرات
7	AT2G27680	NAD(P)_linked oxidoreductase superfamily protein	3	0.79706	0.81887	major CHO metabolism متابولیسم کربوهیدرات
8	AT5G23120	HCF136 _ photosystem II stability/assembly factor_ chloroplast (HCF136)	6	0.77864	0.81428	Protein پروتئین
9	AT1G11750	CLPP6_ NCLPP1_ NCLPP6_ CLP protease proteolytic subunit 6	2	0.84961	0.72341	Protein پروتئین
10	AT1G14980	CPN10 _ chaperonin 10	3	0.76452	0.75633	Protein پروتئین
11	AT5G02490	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	6	0.83699	0.79310	Protein پروتئین
12	AT3G06050	PRXIIIF_ ATPRXIIF _ peroxiredoxin IIF	3	0.81888	0.93081	Redox ریدوکس
13	AT3G12580	HSP70_ ATHSP70_ heat shock protein 70	9	0.76599	0.79607	Stress تنش
14	AT3G09440	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	8	0.83206	0.79173	Stress تنش
15	AT3G01500	CA1_ ATBCA1_ SABP3_ ATSABP3 _ carbonic anhydrase 1	11	0.69321	0.82791	TCA چرخه اسیدسیتریک
16	AT2G20420	ATP citrate lyase (ACL) family protein	2	0.72090	0.74694	TCA چرخه اسیدسیتریک

<sup>a</sup>Protein ID, according to Arabidopsis database. <sup>b</sup>MP, number of matched peptides. <sup>c</sup>Ratio, relative abundance of protein. <sup>d</sup>Function, function categorized using MapMan bin codes.

<sup>a</sup>Protein ID شناسه پروتئین بر اساس دیتابیس آرابیدوپسیس. <sup>b</sup>MP تعداد پپتیدهای همسان. <sup>c</sup>Ratio فراوانی نسبی پروتئین‌ها. <sup>d</sup>Function عملکرد طبقه‌بندی شده بر اساس کدهای مپ‌من‌بین.

چرخه کلورین دارای سه مرحله است که در مرحله سوم آن مولکول‌های RuBP دوباره احیا می‌شوند و چرخه کلورین دوباره آغاز می‌شود. مرحله احیا RuBP از تریوز فسفات به واسطه یکسری آنزیم واسطه از جمله SBPase و FBPA صورت می‌گیرد (Tamoi et al. 2005). این دو آنزیم، واکنشی را کاتالیز می‌کنند که محصول نهایی آن RuBP می‌باشد. گزارش شده است که فراوانی SBPase در رقم حساس کلزا افزایش (Khalili and Naghavi 2017b) و فراوانی FBPA در ریشه و برگ چمن خزنده<sup>۱۰</sup> و ارقام برنج حساس به تنش خشکی کاهش پیدا می‌کند (Ghaffari et al. 2014; Xu et al. 2010). اما در ارقام مقاوم فراوانی این آنزیم افزایش می‌یابد (Gong et al. 2010). کاهش یکی از آنزیم‌های واسطه فرآیند احیا RuBP در رقم حساس منجر به کاهش کارایی چرخه کلورین و کاهش تولید قند و انرژی می‌شود (Khalili and Naghavi 2017b; Dolatabadi et al. 2018). آنزیم ATP سنتتاز از مهمترین اجزای سلول تحت تنش خشکی می‌باشد (Khalili and Naghavi 2016). وظیفه فیزیولوژیکی اصلی ATP سنتتاز تولید ADP از ATP در حضور شیب پروتون است که در نتیجه واکنش نوری فتوسنتز ایجاد می‌شود (Von Ballmos and Dimtoth 2007). مولکول‌های ATP چرخه کلورین را در طی رشد و نمو سلولی گیاه فعال می‌کنند. گزارش شده است که کاهش میزان زیر واحد بتای ATP در تنش خشکی اعمال شده توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول موجب کاهش تولید ATP و کاهش نسبت فتوسنتزی و کارایی چرخه کلورین می‌شود (Ye et al. 2013). افزایش کارایی ATP سنتتاز باعث کاهش اثرهای سوء تنش شوری و خشکی بر گیاه کلزا می‌شود (Khalili and Naghavi 2016). در واکنش Hyola308 و Sarigol به تنش خشکی فراوانی پروتئین ATP سنتتاز در هر دو سطح متوسط و شدید تنش خشکی به شدت افزایش یافت. افزایش سطح ATP سنتتاز را در گیاهان به پاسخ سازگاری برای تأمین انرژی در شرایط تنش خشکی نسبت می‌دهند (Tran et al. 2020). افزایش فراوانی ATP سنتتاز همزمان با افزایش فراوانی پروتئین‌های Hsp در حفظ تعادل بین تولید و مصرف ATP نقش دارد، به این ترتیب افزایش کارایی فتوسنتز و چرخه کلورین را سبب می‌شود. به احتمال فراوان این وضعیت قسمتی از مکانیسم تحمل در رقم Hyola308 در مواجهه با تنش می‌باشد. به منظور اعتبارسنجی تغییر محتوای پروتئین‌های شناسایی شده در تجزیه و تحلیل پروتئومیک پروتئین GAPDH مربوط به متابولیسم انرژی به صورت تصادفی برای وسترن بلات انتخاب شد. آنزیم GAPDH مرحله‌ای کلیدی در مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند که شکسته شدن گلوکز به کربن و انرژی را در پی دارد. GAPDH همبستگی بسیار مثبتی با درجه تحمل به تنش داشته (Degenkolbe et al. 2013) به طوری که بیان بیش از حد GAPDH حاکی از افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاه است (Kappachery et al. 2015). تجزیه و تحلیل ایمنوبلاست، نتایج پروتئومیک برای افزایش فراوانی GAPDH در رقم مقاوم و کاهش فراوانی برای رقم حساس را با افزایش سطوح تنش خشکی تأیید کرد (شکل ۲). افزایش فراوانی GAPDH در برگ‌های Hyola308 در مقایسه با Sarigol احتمالاً متابولیسم انرژی را در این رقم ثابت نگه داشته و تحمل به تنش را در آن بهبود بخشیده است.

۱۰. Creeping bent grass

## جدول ۴. لیست پروتئین‌های مشترک تغییر یافته در ارقام Hyola308 و Sarigol تحت تنش خشکی

Table 3. List of common changed proteins in Hyola308 and Sarigol under drought stress

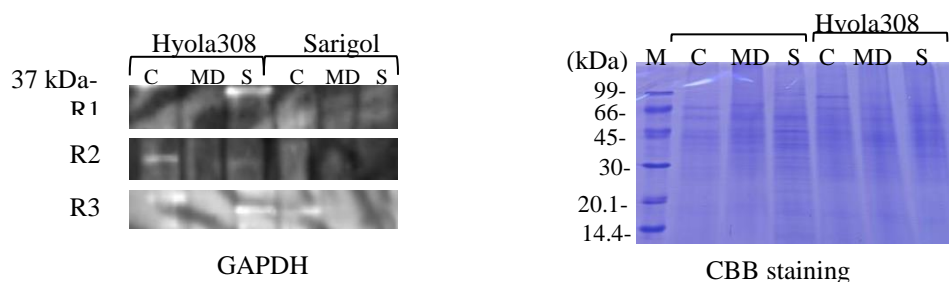
No. شماره	ProteinID <sup>a</sup> شناسه پروتئین	Description شرح	Ratio <sup>b</sup> - Sarigol فراوانی نسبی در ساریگل		Ratio <sup>b</sup> -Hyola308 فراوانی نسبی در هایولا ۳۰۸		Function <sup>c</sup> عملکرد
			0.6 MPa	1.2 MPa	0.6 MPa	1.2 MPa	
1	AT1G13440	GAPC_2_ GAPC2 _ glyceraldehyde_3_phospha te dehydrogenase C2	20.766	16.225	0.724	0.860	Glycolysis گلیکولیز
2	AT1G56190	Phosphoglycerate kinase family protein	35.959	20.760	1.055	0.944	PS فتوستنتز
3	AT2G45290	Transketolase	11.544	35.086	1.183	0.944	PS فتوستنتز
4	AT3G04120	GAPC_ GAPC_1_ GAPC1 glyceraldehyde_3_phospha te dehydrogenase C subunit 1	20.766	16.225	0.724	0.860	Glycolysis گلیکولیز
5	AT3G11630	Thioredoxin superfamily protein	20.620	23.077	1.279	0.896	Redox ریدوکس
6	AT3G12780	PGK1 _ phosphoglycerate kinase 1	56.599	221.55	1.081	0.935	PS فتوستنتز
7	AT3G50820	PSBO2_ PSBO_2_ OEC33 _ photosystem II subunit O_2	43.373	88.036	1.199	0.811	PS فتوستنتز
8	AT3G55800	SBPASE_ sedoheptulose_bisphosphat ase	24.750	2.674	1.446	1.074	PS فتوستنتز
9	AT3G60750	Transketolase	14.376	33.173	1.212	0.961	PS فتوستنتز
10	AT4G38970	FBA2_ fructose_bisphosphate aldolase 2	49.046	56.554	1.117	0.830	Glycolysis گلیکولیز
11	AT5G66570	PSBO_1_ OEE1_ OEE33_ OE33_ PSBO1_ MSP_1 _ PS II oxygen_evolution complex 1	61.051	41.850	1.219	0.818	PS فتوستنتز
12	ATCG00480	ATPB_ PB_ ATP synthase subunit beta	22.055	20.052	1.424	1.477	PS فتوستنتز

<sup>a</sup>Protein ID, according to Arabidopsis database. <sup>b</sup>Ratio, relative abundance of protein. <sup>c</sup>Function, function categorized using MapMan bin codes.

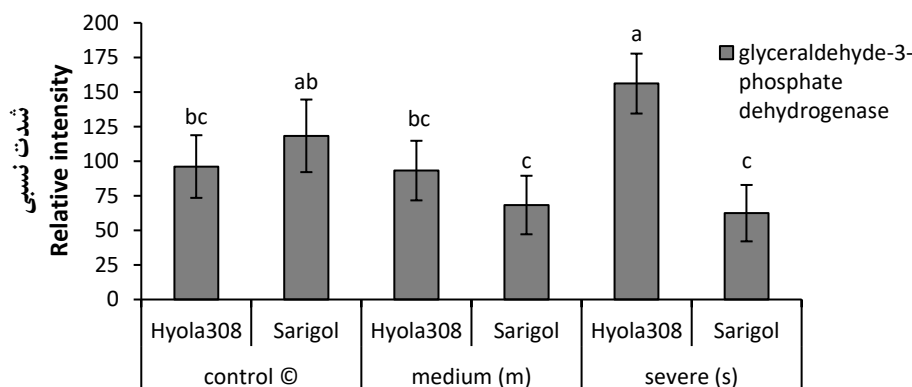
<sup>a</sup>Protein ID شناسه پروتئین بر اساس دیتابیس آرابیدوپسیس. <sup>b</sup>MP, تعداد پپتیدهای همسان. <sup>c</sup>Ratio فراوانی نسبی پروتئین‌ها. <sup>d</sup>Function عملکرد طبقه‌بندی شده بر اساس کدهای مپ‌من‌بین.



(الف)



(ب)



شکل ۲. الف) تجزیه و سترن بلات پروتئین گلیسرآلدهیدتری فسفات دئیدروژناز GAPDH در برگ ارقام Hyola308 و Sarigol تحت سطوح مختلف تنش خشکی (C: شرایط بدون تنش، MD: تنش متوسط و S: تنش شدید). به منظور انجام و سترن بلات بعد از تفکیک پروتئین‌ها با استفاده از SDS-PAGE به همراه یک نشانگر وزن مولکولی (M) انتقال پروتئین‌ها به غشاء PVDF صورت گرفت. لکه‌گذاری CBB نشان دهنده کیفیت و مقدار بارگذاری نمونه‌های پروتئینی می‌باشد لذا از آن به عنوان کنترل بارگذاری استفاده شد. جهت شناسایی پروتئین هدف انکوباسیون غشا با آنتی بادی GAPDH در سه تکرار صورت گرفت. ب) تغییرات فراوانی پروتئین GAPDH در برگ ارقام Hyola308 و Sarigol تحت سطوح مختلف تنش خشکی. مقادیر حاصل، میانگین میزان شدت نسبی سه ایمنوبلات مستقل می‌باشد. حروف متفاوت تغییرات معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد را نشان می‌دهد. علامت باردر نمودار نشان دهنده انحراف استاندارد (SD) است.

Figure 2. A. Immuno-blot analyses of GAPDH in leaf of Sarigol and Hyola308 under different drought stress conditions (C: control, Me: medium stress, and S: sever stress). Protein were separated on a SDS-PAGE with reference molecular weight markers (M) then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. CBB stained SDS-PAGE showing the quality and loading quantity of protein samples so, CBB staining was used as loading control. To identify the target protein, the membrane was incubated with GAPDH antibody in three replications. B. The alterations in GAPDH abundance in leaf of Sarigol and Hyola308 under different drought stress. The values are average of relative intensities from three independent immunoblots. Different letters indicate significance at  $p < 0.05$ . Error bars indicate standard deviation (SD) in figure.

**نتیجه گیری:** به طور کلی چنین نتیجه گیری می شود که سطوح مختلف تنش خشکی باعث تغییر بیان پروتئین های مشترک و اختصاصی برگ ارقام مقاوم و حساس کلزا به صورت افزایش و کاهش می شود. بر این اساس، تفاوت در روند هم بیانی و طیف وسیع پروتئین هایی که منحصراً تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته اند نشان می دهد که فرآیندهای متفاوتی در این دو رقم از تنش خشکی متأثر می شود. از میان پروتئین های منحصراً القا شده در رقم مقاوم Hyola308 فراوانی پروتئین های GST، FNR، Hsp70 و FrtH، GOGAT که جزء پروتئین های القا کننده و بهبود دهنده تحمل به تنش بر شمرده می شوند با افزایش شدت تنش افزایش بیان نشان دادند، همچنین برای آنزیم های GAPDH و FBPA در گیر در مسیر گلیکولیز قندها که موجب تولید انرژی بیشتر و افزایش کارایی چرخه کلوبین در رقم Hyola308 می شود نیز افزایش بیان مشاهده شد. چنین به نظر می رسد که Hyola308 با فعال سازی آنزیم های در گیر در مسیر متابولیسم انرژی، فتوسنتز و دفاع آنتی اکسیدان به تنش خشکی پاسخ می دهد، افزایش بیان این پروتئین ها می تواند ملاک توانایی بالای این رقم در مقابله و تحمل تنش خشکی باشد. در هر دو رقم آنزیم ATP سنتاز احتمالاً به علت درخواست بالای انرژی توسط سلول ها برای مقابله با تنش خشکی از طریق القا فرآیندهای دفاعی افزایش بیان نشان می دهد. باین وجود کاهش در محتوای همه پروتئین های منحصراً به رقم حساس Sarigol از جمله پروتئین های HSP70، Hcf136 و آنزیم های GAPDH و FBPA در گیر در مسیر گلیکولیز می تواند نشان دهنده اختلال در متابولیسم پروتئین، فتوسنتز و انرژی در رقم Sarigol در مواجهه با تنش خشکی باشد و کاهش رشد این رقم تحت سطوح مختلف تنش خشکی را توجیه کند.

**سپاسگزاری:** نگارندگان بر خود فرض می دانند از راهنمایی و مساعدت پروفیسور کوماتسو و دکتر وانگ متخصصین

بخش پروتئومیک موسسه علوم زراعی نارو ژاپن تشکر و قدردانی نمایند.

## References

- Adam Z, Rudella A, van Wijk KJ (2006) Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* 9, 234-240.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM et al. (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* 126, 10420-11054.
- Anderson JV, Davis DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia Esula*. *Physiol Plant* 120, 421-433.
- Blum A (1989) Breeding methods for drought resistance. In: *Plant Under Stress*. Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (eds). Cambridge University Press, UK, pp. 195-215.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

- Bybordi A, Tabatabaei SJ, Ahmade A (2010) Effect of drought on the growth and peroxidase and IAA oxidase activities in canola. *J Food Agri Environ* 8, 109-112.
- Cazale AC, Clement M, Chiarenza S et al. (2009) Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60, 2653-2664.
- Caruso G, Cavaliere C, Foglia P et al. (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Sci* 177, 570-576.
- Castillejo MA, Maldonado AM, Ogueta S, Jorrín JV (2008) Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. *Open Proteomics J* 1, 59-71.
- Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during drought stress recent advances. *Curr Sci* 83, 6-25.
- Degenkolbe T, Do PT, Kopka J et al. (2013) Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. *PLoS One* 8, 63637.
- De la Torre-González A, Navarro-León E, Blasco B, Ruiz JM (2020) Nitrogen and photorespiration pathways, salt stress genotypic tolerance effects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Physiol Plant* 42, 2.
- Ding N, Wang A, Zhang X et al. (2017) Identification and analysis of glutathione S-transferase gene family in sweet potato reveal divergent GST-mediated networks in aboveground and underground tissues in response to abiotic stresses. *BMC Plant Biol* 17, 225.
- Dolatabadi N, Toorchi M, Valizadeh M, Bandehagh A (2018) The proteomic analysis of leaf in Rapeseed (*Brassica napus* L) under salt stress. *J Agric Biotech* 9, 51-64.
- Dubey H, Grover A (2001) Current initiatives in proteomics research: The plant perspective. *Curr Sci* 80, 262-269.
- Ford KL, Cassin A, Bacic A (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Front Plant Sci* 2, 44.
- Ghaffari M, Toorchi M, Valizadeh M, Komatsu S (2013) Differential response of root proteome to drought stress in drought sensitive and tolerant sunflower inbred lines. *Funct Plant Biol* 40, 609-617.
- Ghaffari A, Gharechahi J, Nakhoda B, Salekdeh GH (2014) Physiology and proteome responses of two contrasting rice mutants and their wild type parent under salt stress conditions at the vegetative stage. *J Plant Physiol* 171, 31-44.

- Gong P, Zhang J, Li H et al. (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *J Exp Bot* 61, 3563-3575.
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M et al. (2010) Heat shock proteins in toxicology: How close and How far? *Life Sci* 86, 377-384.
- Hashiguchi A, Ahsan N, Komatsu S (2010) Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food Res Int* 43, 1803-1813.
- Hosseini Salkdeh GH, Nasrabadi D (2011) Proteomic analysis of root and leaf in rice under salinity stress. *J Crop Biotechnol* 1, 1-11.
- Ingle RA, Schmidt UG, Farrant JM et al. (2007) Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant Cell Environ* 30, 435-446.
- Irar S, Brini F, Goday A et al (2010) Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D)--a wider perspective of the proteome. *J Proteomics* 73, 1707-1721.
- Janska H, Piechota J, Kwasniak M (2010) ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1071-1075.
- Juliann G, Kiang G, Tsokos C (1998) Heat shock protein 70 Kda: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol Ther* 80, 183-201.
- Jungkunz I, Link K, Vogel F et al. (2011) AtHSP70-15-deficient Arabidopsis plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV. *Plant J* 66, 983-95.
- Kakaei M, Zabarjadi, A Mostafaei A (2010) Comparison of genetic and morpho-physiological distance via SDS-PAGE marker in some rapeseed genotypes. *J Agric Biotech* 1, 79-94.
- Kappachery S, Baniekal Hiremath G, Yu JW, Park SW (2015) Effect of over-and under-expression of glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase on tolerance of plants to water-deficit stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 121, 97-107.
- Karlin S, Brocchieri L (1998) Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol* 47, 565-577.
- Kato Y, Sakamoto W (2009) Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J Biochem* 146, 463-469.
- Kausar R, Arshad M, Shahzad A, Komatsu S (2013) Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *J Amino Acids* 44, 345-359.

- Kazemi Oskuei B, Bandehagh A, Sarikhani MR, Komatsu S (2018) Protein profiles underlying the effect of plant growth-promoting rhizobacteria on canola under osmotic stress. *J Plant Growth Regul* 37, 560-574.
- Ke Y, Han G, He H, Li J (2009) Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 133-138.
- Khalili M, Naghavi MR (2016) Evaluation of responsive common proteins in tolerant and sensitive spring wheat cultivars under drought stress. *J Crop Biotechnol* 16, 31-44.
- Khalili M, Naghavi M (2017a) Evaluation of spring canola cultivars in terms of some morphological and physiological traits under drought stress and proteome analysis of the most tolerant and susceptible ones. *J Agric Biotech*, 9, 59-82.
- Khalili M, Naghavi MR (2017b) Assessment of changes in protein expression pattern in tolerant and sensitive cultivars of rapeseed under salt stress. *Iranian J Field Crop Sci* 48, 721-735.
- Kim SR, An G (2013) Rice chloroplast-localized heat shock protein 70, OsHsp70CP1, is essential for chloroplast development under high-temperature conditions. *J Plant Physiol* 170, 854-863.
- Kissoudis C, Kalloniati C, Flemetakis E et al. (2015) Stress-inducible GmGSTU4 shapes transgenic tobacco plants metabolome towards increased salinity tolerance. *Acta Physiol Plant* 37, 128.
- Klein WL, Luo Y (2010) Heat shock treatment reduces beta amyloid toxicity in vivo by diminishing oligomers. *Neurobiol Aging* 31, 1055-1058.
- Komatsu S, Han C, Nanjo Y et al. (2013) Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding. *J Proteome Res* 12, 4769-4784.
- Kozuleva M, Goss T, Twachtmann M et al. (2016) Ferredoxin:NADP(H) Oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance. *Plant physiol* 172, 1480-1493.
- Krugman T, Chagué V, Peleg Z et al. (2010) Multilevel regulation and signalling processes associated with adaptation to terminal drought in wild emmer wheat. *Funct Integr Genomics* 10, 167-186.
- Kumar S, Trivedi PK (2018) Glutathione S-Transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Front Plant Sci* 9, 751.
- Lee JH, Schoeffl F (1996) An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 252, 11-19.

- Lintala M, Lehtimäki N, Benz JP et al. (2012) Depletion of leaf-type ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase results in the permanent induction of photoprotective mechanisms in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant J* 70, 809-817.
- Michel BE, Kaufmann MR (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol* 51, 914-916.
- Mohammadi PP, Moieni A, Komatsu S (2012) Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *J Amino Acids* 43, 2137-2152.
- Muller B, Pantin F, Génard M et al. (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Biol* 62, 1715-1729.
- Mundree SG, Farrant JM (2000) Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In: *Plant tolerance to abiotic stresses in agriculture: role of genetic engineering*. Cherry JH, Locy RD, Rychter A (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 201-222.
- Nanjo Y, Skultety L, Uváčková L et al. (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J Proteome Res* 11, 372-385.
- Palatnik JF, Tognetti VB, Poli HO et al. (2003) Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant J* 35, 332-341.
- Pawar VV, Lokhande PK (2015) Effect of osmotic stress on osmolyte accumulation and ammonia assimilating enzymes in chickpea cultivars. *Indian J Plant Physiol* 20, 276-280.
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. *J Plant Physiol* 118, 10-18.
- Plucken H, Müller B, Grohmann D et al. (2002) The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532, 85-90.
- Rodriguez RE, Lodeyro A, Poli HO et al. (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxinNADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol* 143, 639-649.
- Sakamoto W (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol* 57, 599-621.
- Schroda M, Vallon O, Wollman FA, Beck CF (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11, 1165-1178.

- Singh NB, Singh D, Singh A (2015) Biological seed priming mitigates the effects of water stress in sunflower seedlings. *Physiol Mol Biol Plants* 21, 207-214.
- Su PH, Li HM (2008) Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol* 146, 1231-1241.
- Sung DY, Guy CL (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol* 132, 979-987.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photo inhibition? *Trends Plant Sci* 13, 178-182.
- Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S (2005) The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J* 42, 504-513.
- Tran DQ, Konishi A, Morokuma M et al. (2020) NaCl-stimulated ATP synthesis in mitochondria of a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Prod Sci* 23, 129-135.
- Usadel B, Obayashi T, Mutwil M et al. (2009) Co-expression tools for plant biology: opportunities for hypothesis generation and caveats. *Plant Cell Environ* 32, 1633-1651.
- Vincent D, Lapierre C, Pollet B et al. (2005) Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol* 137, 949-960.
- Von Ballmoos C, Dimroth P (2007) Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry* 46, 11800-11809.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9, 244-252.
- Wassmann R, Jagadish SVK, Sumfleth K et al. (2009) Regional vulnerability of climate change impacts on Asian rice production and scope for adaptation. *Adv Agron* 3, 91-133.
- Xiong X, Chang L, Khalid M et al. (2018) Alleviation of Drought Stress by Nitrogen Application in *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* L. *Agronomy* 8, 66.
- Xu Ch, Huang B (2010) Comparative analysis of drought responsive proteins in Kentucky bluegrass cultivars contrasting in drought tolerance. *Crop Sci* 50, 2543-2552.
- Xu C, Sibicky T, Huang B (2010) Protein profile analysis of salt responsive proteins in leaves and roots in two cultivars of creeping bent grass differing in salinity tolerance. *Plant Cell Rep* 29, 595-615.
- Yang Y, Han C, Liu Q et al. (2008) Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol Plant* 30, 433-440.

- Ye J, Wang S, Zhang F et al. (2013) Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG6000 stress and rewatering. *Plant Omics* 6, 286-294.
- Yin X, Komatsu S (2016) Nuclear proteomics reveals the role of protein synthesis and chromatin structure in root tip of soybean during the initial stage of flooding stress. *J Proteome Res* 15, 2283-2298.
- Yu A1, Li P, Tang T et al. (2015) Roles of Hsp70s in stress responses of microorganisms, plants, and animals. *Biomed Res Int* 2015, 510319.
- Yue G, Hu X, He Y et al. (2010) Identification and characterization of two members of the FtsH gene family in maize (*Zea mays* L.). *Mol Biol Rep* 37, 855-863.
- Zaltsman A, Ori N, Adam Z (2005) Two types of FtsH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and photosystem II repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2782-2790.
- Zhang H, Whitelegge JP, Cramer WA (2001) Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *J Biol Chem* 276, 38159-38165.