

شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در ژنوتیپ حساس نخود (*Cicer arietinum* L.)

اکبر شعبانی^۱، علیرضا زبرجدی^{۲*}، علی مصطفایی^۳، محسن سعیدی^۲ و سید سعید پورداد^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- استاد، بخش ایمنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

۴- استاد، معاونت موسسه تحقیقات دیم کشور سرارود، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۳۱)

چکیده

گیاهان قادرند در پاسخ به تنش‌های محیطی مکانیسم‌های سازگاری خود را فعال کنند و با تغییر در بیان ژن‌هایشان به عوامل محیطی پاسخ دهند. تنش خشکی مهم‌ترین تنش غیر زنده در کشاورزی محسوب می‌گردد. در همین راستا از تکنیک پروتئومیکس به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی استفاده گردید. جهت انتخاب ژنوتیپ حساس به تنش رطوبتی، تعداد ۶۴ ژنوتیپ گیاه نخود در قالب طرح لاتیس ساده ۸×۸ در ایستگاه سرارود و سپس در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی در سه سطح نرمال، تنش متوسط و تنش شدید در مرحله غلاف‌دهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت ژنوتیپ SAR 80 JI 09 K12-8 به‌عنوان ژنوتیپ حساس به تنش رطوبتی انتخاب گردید. سپس ارزیابی‌های لازم از نظر پروتئوم‌های القاء شده برگ تحت شرایط تنش‌های رطوبتی در آزمایشگاه به عمل آمد. برای مطالعه و شناسایی پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی، پروتئین کل براساس روش TCA-استون از برگ استخراج و در بعد اول به وسیله ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۷-۴ و در بعد دوم بوسیله ژل‌های اکریل آمید با غظت ۱۲/۵ درصد جداسازی شدند. به همین منظور در ژنوتیپ حساس از مقدار درصد حجمی هر لکه به‌عنوان یک مقدار استاندارد شده استفاده شد. لکه‌های پروتئینی موجود در ژل‌ها پس از اسکن شدن، با استفاده از نرم‌افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز ژل‌های دو بعدی و پروتئین‌های شناسایی شده از ژنوتیپ حساس به خشکی نشان داد که الگوی پروتئوم برگی در شرایط تنش رطوبتی به‌طور وسیعی تغییر نموده است. در ژنوتیپ حساس تعداد ۲۱۲ لکه به‌صورت تکرار پذیر شناسایی شد. تعداد ۱۰ لکه با استفاده از طیف سنج جرمی MALDI-TOF-TOF شناسایی شدند که در چرخه‌های زیستی بر اساس پاسخ به تنش خشکی در گروه‌های مختلف تقسیم بندی شدند.

واژگان کلیدی: الکتروفورز دو بعدی، پروتئومیکس، تنش رطوبتی، نخود

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: zebarjadi@razi.ac.ir

مقدمه

با توجه به پیش‌بینی جمعیت نه میلیارد نفری در سال ۲۰۵۰ و علیرغم افزایش عملکرد محصولات زراعی، همچنان نگرانی‌ها در مورد امنیت غذایی جهانی وجود دارد (Rosegrant and Agcaoili, 2010). بزرگ‌ترین چالش قرن حاضر، افزایش عملکرد در شرایط وجود تنش‌های محیطی است (Chowdhry et al., 2002). در بین گیاهان زراعی مختلف، حبوبات اهمیت فوق‌العاده‌ای در تأمین غذای بشر دارند. این دسته از گیاهان دارای ارزش غذایی زیاد بوده و از مهم‌ترین منابع غذایی سرشار از پروتئین (۱۸ تا ۳۲ درصد) می‌باشند. در بین گیاهان تیره لگومینوز، نخود بعد از سویا دومین لگوم مهم دنیا بوده و در ۶۰ کشور دنیا کشت و کار می‌شود (Ashraf et al., 2009; Varshney et al., 2013). خشکی انتهای فصل که مصادف با مرحله رشد زایشی گیاه است، یکی از محدود کننده‌ترین عوامل تولید آن می‌باشد (Zhang et al., 2000). مقاومت به خشکی یک صفت ساده و منحصر به فرد نبوده، بلکه یک صفت کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف می‌باشد که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود. مقاومت به خشکی یک صفت پیچیده پلی ژنیک است، بنابراین ضروری است که پروتئین‌های مسئول مقاومت شناسایی و با اطلاع از نقش آن‌ها در مکانیزم مقاومت، استراتژی‌های موثر برای اصلاح مقاومت به آن‌ها ایجاد گردد. یکی از راه‌های بررسی الگوی بیان ژن‌ها، اندازه‌گیری میزان رونوشت‌های mRNA کد شده از تک تک ژن‌ها است (Seki et al., 2002). اما این اطلاعات به‌دست آمده به اندازه‌ای نیست که به‌توان به‌وظیفه و عمل ژن‌ها پی برد. بین فراوانی mRNA و فراوانی پروتئین در سلول، بخصوص در مورد پروتئین‌های با فراوانی کم، ارتباط ضعیفی وجود دارد. از سوی دیگر در فاصله بین تبدیل اطلاعات نهفته در یک ژن به یک کنش بیوشیمیایی خاص، مسیر نسبتاً طولانی طی می‌شود و وقایع مختلفی رخ می‌دهد که سرانجام شدت عمل ژن، محل ایفای نقش و نوع آن را تعیین می‌کند. این وقایع که به تغییرات پس از رونویسی و پس از ترجمه موسوم هستند به شکل پیرایش

و تغییرات مختلف در سطح mRNA و پروتئین (مثل فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون) عمل می‌نمایند (Kawasaki et al., 2001). از این رو بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطح پروتئین از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به اینکه بیان پروتئین‌ها در طول نمو، تحت شرایط محیطی مختلف و در بافت‌های مختلف متغیر می‌باشد، همچنین از آنجا پروتئین‌ها بهترین توصیف برای عمل تک‌تک ژن‌ها در سطح مولکولی هستند؛ از این رو مطالعه الگوی پروتئین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Hajheidari et al., 2005).

پیشرفت‌های اخیر در پروتئومیکس اطلاعات و ابزار مناسبی، جهت درک سریع و بهتر تنش‌های محیطی را فراهم نموده است. تغییرات در بیان پروتئین‌ها ممکن است باعث سازگاری سلول‌ها در پاسخ به شرایط تنش‌های محیطی باشد (Bhushan et al., 2014). پروتئومیکس در گیاهان کاربرد وسیعی داشته و می‌تواند به درک و یافتن ژن‌های مؤثر در فعالیت‌های گیاهی کمک نماید. یکی از این کاربردها درک واکنش گیاه به تنش‌های محیطی می‌باشد. به‌طور مثال با وقوع تنش خشکی و مقایسه الگوی پروتئینی گیاه تحت تنش و شرایط کنترل، امکان بررسی تغییرات الگوی بیان پروتئین‌ها میسر می‌گردد. با شناسایی پروتئین‌های بیان شده و در صورت امکان پروتئین‌های مؤثر در ایجاد مقاومت در گیاه در اثر تنش کم‌آبی، می‌توان در مراحل بعدی اقدام به شناسایی ژن‌های کد کننده آن نموده تا جهت تحقیقات مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان متحمل در مقابل تنش کم آبی مورد استفاده قرار گیرند. پروتئوم شدیداً دینامیک بوده و با دسته پروتئین‌هایی که لحظه به لحظه متناسب با مراحل نمو و فیزیولوژیکی سلول بیان می‌شوند تغییر می‌کند. لذا تحقیق حاضر با هدف شناسایی پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی در ژنوتیپ حساس گیاه نخود اجراء گردید.

مواد و روش‌ها

به‌منظور گزینش ژنوتیپ(های) حساس به خشکی ابتدا طی ۲ سال زراعی (۹۴-۱۳۹۲)، تعداد ۶۴ ژنوتیپ نخود زراعی در قالب طرح لاتیس ساده ۸×۸ در شرایط تنش و

استفاده شد. مراحل رنگ آمیزی طبق پروتوکول Bloom و همکاران (Bloom *et al.*, 1987) انجام شد. پس از رنگ آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دنسیتومتر GS800 ساخت شرکت BioRad اسکن و به فرمت تیف ذخیره شدند. برای بررسی کمی و کیفی لکه‌ها در تیمارهای مختلف از نرم افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا لکه‌ها شناسایی شدند و سپس لکه‌های متناظر در ژل‌های تیمارهای مختلف را علامت زده و پس از استخراج مقدار کمی درصد حجمی (%Vol) لکه‌ها، داده‌ها مورد آنالیز آماری t استیودنت قرار گرفتند. لکه‌هایی که مقادیر کمی بیان آنها در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند (به میزان بیش از ۱/۵ برابر افزایش یا کاهش بیان) به عنوان لکه‌های کانیدیا شناخته شدند.

به منظور شناسایی پروتئین‌ها بوسیله طیف سنج جرمی، لکه‌های کانیدیا از ژل‌های رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو جدا شدند. لکه‌های پروتئینی جدا شده سه بار با آب خالص شستشو داده شدند، سپس با محلول ۵۰ میلی مولار NH_4HCO_3 در ۵۰٪ استونیتریل رنگ زدایی شدند. پس از این مرحله با استفاده از محلول ۱۰ میلی مولار DTT در ۵۰٪ استونیتریل احیاء و با محلول ۴۰ میلی مولار یدواستامید در ۵۰٪ استونیتریل آلکیله شدند. در نهایت دو بار با محلول ۱۰۰٪ استونیتریل خشک شدند. هضم آنزیمی در طول شب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آنزیم تریپسین انجام گرفت. پپتیدها سپس با استفاده از محلول ۰/۱٪ TFA در ۵۰٪ استونیتریل استخراج شدند. آنالیز طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF در دانشگاه یورک انگلستان انجام شد. داده‌های حاصل از طیف سنج جرمی با استفاده از موتور جستجوگر MASCOT و بانک اطلاعاتی NCBI مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج و بحث

لکه‌های پروتئینی موجود در ژل‌ها پس از اسکن شدن، با استفاده از نرم‌افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 مورد شناسایی قرار گرفتند. بر این اساس

نرمال رطوبتی در ایستگاه تحقیقاتی سرارود واقع در معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کرمانشاه به اجراء درآمد. محاسبات آماری لازم بر اساس موازین طرح بکار رفته با نرم افزارهای SAS، Excel و Statistica انجام شد. بر اساس نتایج شاخص‌های مبتنی بر عملکرد در این سال‌ها و ترسیم بای پلات از طریق تجزیه به مولفه‌های اصلی، سه ژنوتیپ حساس به تنش رطوبتی انتخاب انتخاب شدند. بذور آن‌ها، در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کشت و در مرحله غلاف‌دهی در معرض سه سطح مختلف رطوبتی شامل: آبیاری مطلوب، تنش متوسط و تنش شدید قرار گرفتند. سه تیمار رطوبتی شامل: ۱- آبیاری مطلوب (۹۰-۸۵ درصد ظرفیت زراعی)، ۲- تنش متوسط (۶۰-۵۵ درصد ظرفیت زراعی) و ۳- تنش شدید (۳۰-۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بودند. بر اساس نتایج آزمایش‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای ژنوتیپ حساس به تنش رطوبتی (SAR 80 JI 09 K12-8) با استفاده از روش امتیازدهی تحمل تنش (STS) انتخاب گردید. ویژگی روش STS در این است که انتخاب بر مبنای یک شاخص مقاومت نمی‌باشد، بلکه همزمان چندین شاخص مد نظر قرار داده خواهد شد. سپس ارزیابی‌های لازم از نظر پروتئوم‌های القاء شده برگ تحت شرایط نرمال و تنش‌های رطوبتی در آزمایشگاه بیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به عمل آمد.

در این مطالعه ابتدا استخراج پروتئین از بافت برگ بر اساس روش Damerval *et al.* (1986) و همکاران (Damerval *et al.*, 1986) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌ها از روش Bradford (1976) استفاده شد. در این آزمایش برای وارد نمودن پروتئین‌ها به داخل ژل‌های IPG با شیب پی اچ ۷-۴، پروتئین‌ها در استوک بازجذب^۱ حل شده و همزمان با عمل بازجذب وارد ژل شدند. عمل باز جذب در طول شب و به طور متوسط ۱۴ تا ۱۶ ساعت طول کشید. برای انجام بعد دوم از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت بیورد

1- Rehydration

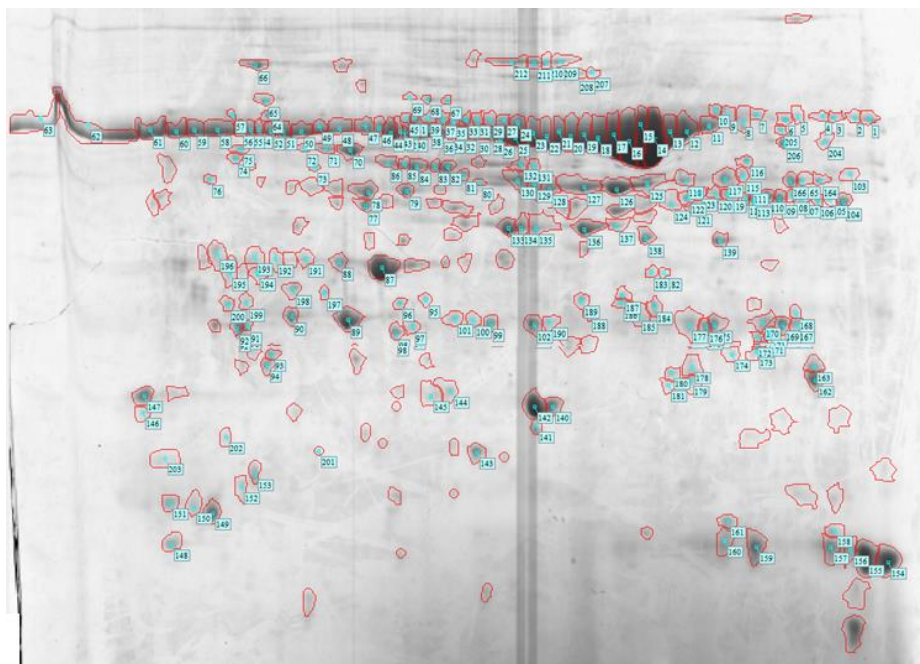
پروفایل پروتئینی برگ ژنوتیپ حساس در سطوح مختلف تنش رطوبتی در مرحله غلاف‌دهی دچار تغییرات چشمگیری بود. همان طوری که شکل‌های شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است لکه‌های پروتئومی متفاوتی از لحاظ بار الکتریکی و وزن مولکولی بر روی ژل پلی‌اکریلامید مشاهده می‌گردند که این امر متأثر از شدت تنش رطوبتی می‌باشد. بطور کلی هر کدام از لکه‌های پروتئینی بیان شده دارای نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی خاصی بوده که در شکل ۴ مشاهده می‌گردند. در ضمن میزان همپوشانی لکه‌های شناسایی شده و مشخصات لکه‌های موجود در بانک اطلاعاتی، نوع لکه پروتئینی را مشخص می‌نماید (جدول شماره ۲).

کمیت حجم لکه‌های متناظر دارای تغییر بیان در ژل‌ها مشخص گردید. به همین منظور در ژنوتیپ حساس از مقدار درصد حجمی هر لکه به‌عنوان یک مقدار استاندارد شده استفاده شد. در ۲۲ لکه موجود در ژنوتیپ حساس به تنش خشکی، ۲۰ لکه پروتئینی ۳، ۳۰، ۴۸، ۵۳، ۵۸، ۶۳، ۶۶، ۷۴، ۷۷، ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۲۱، ۱۲۷، ۱۲۸، ۱۳۱، ۱۶۲، ۱۷۴، ۱۹۲، ۲۰۱ و ۲۰۳ در اثر تیمارهای مختلف تنش رطوبتی دچار تغییر بیان شدند. بنابراین تأثیر تنش رطوبتی بر کمیت لکه‌ها تأثیر گذار بود اما در این ژنوتیپ دو لکه ۲۰۹ و ۲۱۲ دستخوش تغییرات حذف و اضافه گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱- لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان معنی‌دار در ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87)

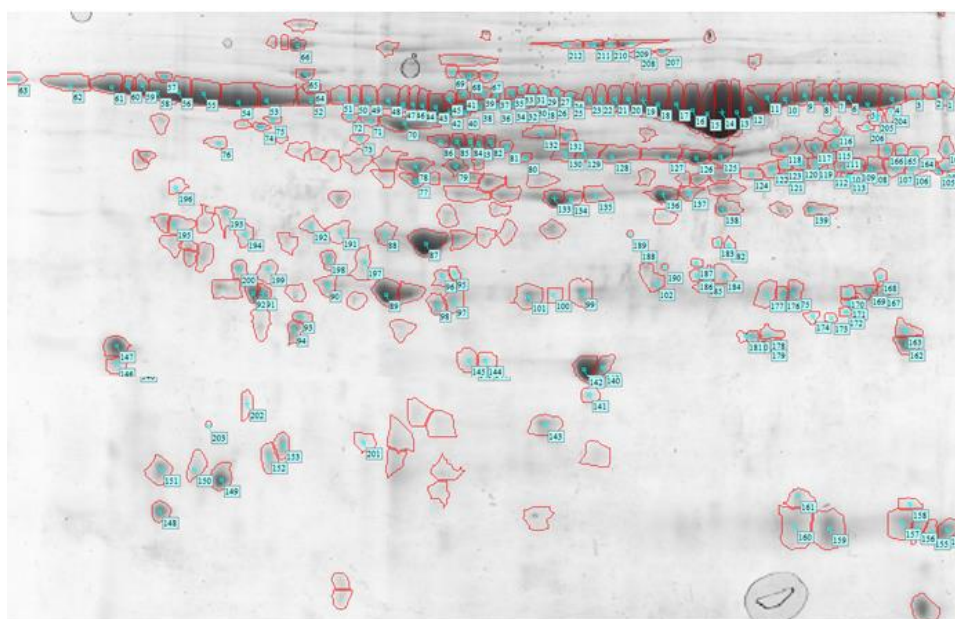
Table 1. Protein spots with significant expression difference in drought susceptible chickpea genotype (SAR 80 JI 09 K12-87)

شماره لکه Spot No.	کد تطبیق لکه در ژل Match ID	میانگین مقدار درصد حجمی برای هر لکه پروتئینی \pm خطای استاندارد Mean of Vol % for each spot \pm S.E.			میانگین مربعات Mean square	F	Sig (Prob.)
		شرایط عدم تنش Non-stress	تنش متوسط Moderate stress	تنش شدید Intensive stress			
3	168	0.1113 \pm 0.002	0.3405 \pm 0.040	0.3132 \pm 0.045	0.047	12.83	0.007
30	480	0.3236 \pm 0.035	0.3148 \pm 0.034	0.0536 \pm 0.005	0.071	28.18	0.001
48	507	0.3866 \pm 0.118	1.0955 \pm 0.027	0.4323 \pm 0.129	0.472	14.91	0.005
53	502	0.5132 \pm 0.190	0.4810 \pm 0.125	1.6377 \pm 0.018	1.302	24.77	0.001
58	232	0.7346 \pm 0.031	1.5456 \pm 0.053	0.7673 \pm 0.193	0.632	15.38	0.004
63	493	1.3177 \pm 0.199	0.5021 \pm 0.109	0.3696 \pm 0.070	0.791	13.94	0.006
66	149	0.4847 \pm 0.016	0.2161 \pm 0.025	0.4598 \pm 0.052	0.066	18.03	0.003
74	202	0.1353 \pm 0.012	0.0397 \pm 0.008	0.1010 \pm 0.015	0.007	14.67	0.005
77	253	0.2943 \pm 0.003	0.1209 \pm 0.044	0.2795 \pm 0.018	0.028	12.02	0.008
100	314	0.0913 \pm 0.008	0.0106 \pm 0.001	0.0743 \pm 0.008	0.005	37.83	0.000
101	313	0.1249 \pm 0.008	0.2689 \pm 0.029	0.3642 \pm 0.051	0.044	12.21	0.008
102	274	0.3562 \pm 0.057	0.0807 \pm 0.034	0.1101 \pm 0.039	0.069	11.46	0.009
121	257	0.2530 \pm 0.006	0.1285 \pm 0.030	0.1237 \pm 0.021	0.016	11.48	0.009
127	150	0.5837 \pm 0.061	0.2652 \pm 0.004	0.3917 \pm 0.007	0.077	19.81	0.002
128	223	0.4454 \pm 0.035	0.2723 \pm 0.014	0.4536 \pm 0.019	0.031	16.76	0.003
131	210	0.1297 \pm 0.010	0.1473 \pm 0.016	0.2157 \pm 0.005	0.006	14.84	0.005
162	345	0.6521 \pm 0.015	0.5061 \pm 0.012	0.5664 \pm 0.029	0.016	13.11	0.006
174	531	0.0863 \pm 0.009	0.1212 \pm 0.012	0.0330 \pm 0.006	0.006	20.15	0.002
192	541	0.2137 \pm 0.006	0.0919 \pm 0.001	0.1358 \pm 0.023	0.011	19.57	0.002
201	455	0.0526 \pm 0.007	0.144 \pm 0.005	0.0967 \pm 0.005	0.007	61.49	0.000
203	444	0.3443 \pm 0.055	0.0889 \pm 0.012	0.0032 \pm 0.0006	0.094	29.61	0.001
209	530	0.2673 \pm 0.036	0.6639 \pm 0.1171	0.3378 \pm 0.0304	0.016	8.406	0.008
212	488	0.3318 \pm 0.036	0.2543 \pm 0.017	0.1951 \pm 0.006	0.014	8.173	0.009



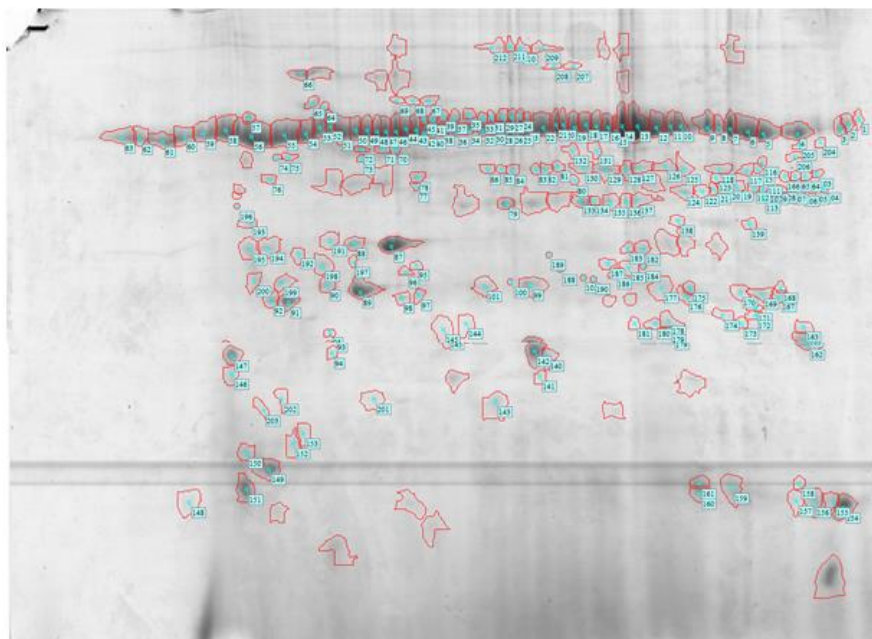
شکل ۱- الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87) در تیمار شاهد (عدم تنش خشکی) در مرحله غلاف دهی، در محدوده pH ۴-۷، بر روی ژل اکریل آمید ۱۲/۵ درصد

Figure 1. Leaf proteome pattern of drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87) in control (non-drought stress) in podding stage, in pH 4-7, on %12.5 acrylamide gel.



شکل ۲- الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87) در مرحله غلاف دهی در شرایط تنش متوسط خشکی، در محدوده pH ۴-۷ بر روی ژل اکریل آمید ۱۲/۵ درصد

Figure 2. Leaf proteome pattern of drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87) in moderate drought stress in podding stage, in pH 4-7, on %12.5 acrylamide gel



شکل ۳- الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87) در مرحله غلاف‌دهی در

شرایط تنش شدید خشکی، در محدوده pH ۴-۷، بر روی ژل اکریل آمید ۱۲/۵ درصد

Figure 3. Leaf proteome pattern of drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87) in intensive drought stress in podding stage, in pH 4-7, on %12.5 acrylamide gel

در شکل ۴ نحوه تعیین نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی هر لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار در بیان آورده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز همزمان نشانگرهای پروتئینی استاندارد^۱ مشخص و در نرم-افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 تخمین زده شد. نقطه ایزوالکتریک نیز برای هر لکه پروتئینی با اندازه‌گیری مهاجرت لکه روی نوار ۱۸ سانتی‌متری IPG با محدوده pH ۴-۷ خطی^۲، در نرم-افزار مشخص شد. از بین لکه‌های پروتئینی که تغییر ۱/۵ برابری در بیان داشتند، تعداد ۱۰ لکه مربوط به ژنوتیپ حساس مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۲). برای غالب پروتئین‌های شناسایی شده، پروتئین‌های با بالاترین میزان رتبه‌دهی^۳ در نظر گرفته شدند. در این مطالعه در یک ژل، گاهی برخی پروتئین‌ها در بیش از یک لکه شناسایی شدند. آنزیم فعال‌کننده روبیسکو و

Oxygen evolving enhancer protein از جمله این پروتئین‌ها بودند. این پروتئین‌ها قبلاً توسط بسیاری از محققین گزارش شده‌اند (Gao *et al.*, 2011; Caruso *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). علت این موضوع را به تعدادی از ویژگی‌های مهم پروتئین‌ها از جمله وجود ایزوفرم‌های پروتئین، تغییرات پس از ترجمه‌ای، ترجمه از mRNA های به هم تابیده جایگزین^۴ و تخریب پروتئین نسبت داده‌اند. تغییرات پس از ترجمه‌ای از قبیل گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون می‌توانند وزن مولکولی یا نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها را تغییر دهند (Caruso *et al.*, 2009). نقش برخی از پروتئین‌های شناسایی شده در تنش به‌خوبی شناخته شده است. کلیه این پروتئین‌ها در تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها، انرژی و پاسخ به تنش دخیل هستند.

4- Alternative spliced mRNA

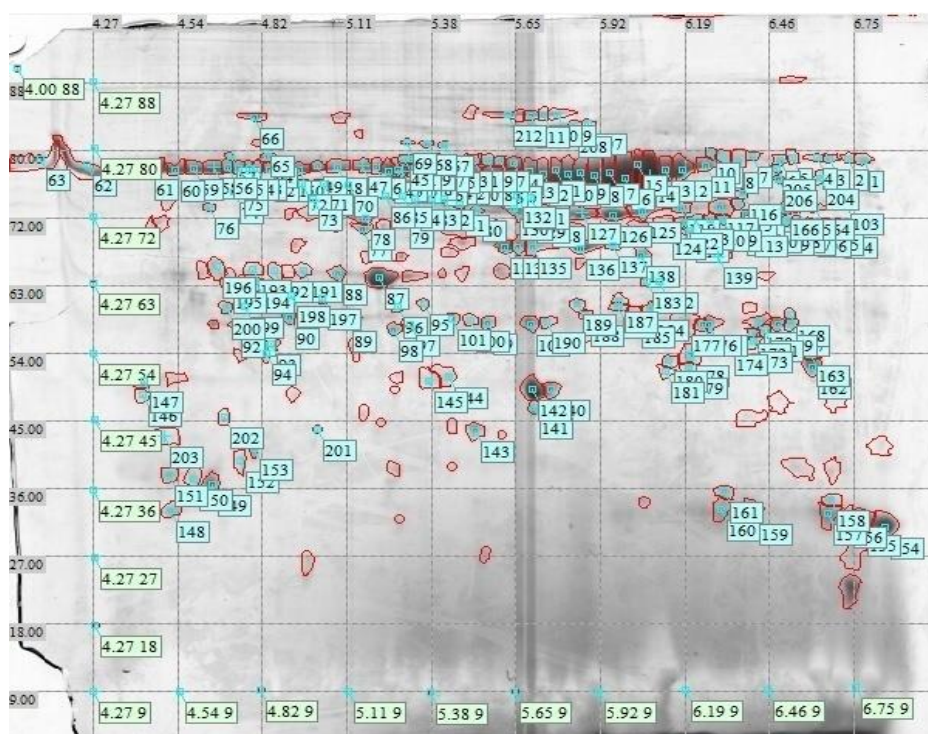
1- Estandard Protein Markers
2- Linear
3- Scoring

جدول ۲- پروتئین‌های شناسایی شده بوسیله MALDI-TOF-TOF در ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87) در گیاه نخود

Table 2. Identified proteins by MALDI-TOF-TOF in drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87) of chickpea

شماره لکه Spot No.	نقطه ایزوالکتریک / وزن مولکولی (kDa) Isoelectric point/molecular weight	رتبه‌دهی بر اساس اسپکترومتری جرمی MS Score	درصد هم- پوشانی % Coverage	نقش و عملکرد پروتئین شناسایی شده Function of identified protein	نام پروتئین شناسایی شده Name of identified protein	پپتید Peptide
66	5.22/75.583	701	13	Stress	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic [<i>Pisum sativum</i>]	R.QAVVNPENTFFSVK.R K.SFAAEEISAQVLR.K K.AVVTVPAYFNDSQR.T R.IINEPTAASLAYGFER.K R.AKFEELCSDLLDR.L K.FEELCSDLLDR.L K.DIDEVILVGGSTR.I R.LDGIPPAPR.G K.KLDVVSNEVFSNCLR.S K.LDVVSNEVFSNCLR.S K.DPGPSGKPYAR.Y R.YIGSLVGFHR.T
74	5.40/44.874	364	9	Synthesis	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic [<i>Brassica napus</i>]	K.FFVGGNWK.C K.GGAFTGEISVEQLK.D K.WVILGHSER.R R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
77	7.64/33.733	195	9	Energy and carbon metabolism	Triosephosphate isomerase, chloroplastic [<i>Fragaria ananassa</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
101	7.67/33.553	156	9	Energy and carbon metabolism	Triosephosphate isomerase, chloroplastic [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
121	8.30/36.024	183	6	Synthesis	Malate dehydrogenase 2, mitochondrial [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
128	8.04/51.383	349	10	Energy	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase A, chloroplastic [<i>Hordeum vulgare</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
131	5.83/38.747	46	2	Synthesis	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (Fragment) [<i>Pisum sativum</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
162	6.38/52.450	241	6	Energy	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic [<i>Larrea tridentate</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
209	5.90/64.931	60	2	Metabolism	Glutamine-tRNA ligase [<i>Neisseria gonorrhoeae</i>]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F
212	8.54/24.211	204	12	Photosynthesis	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic [<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica]	R.IIYGGSVNGGNSAELAK.E K.GPEFATIVNSVTSK.K R.DDLFNINAGIVK.N K.LFGVTTLDVVR.A K.GLAYDISDDQQDITR.G R.VPIVVTGNDFSTLYAPLIR.D K.IVDTFPGQSIDFFGALR.A R.SAAYYQQGAR.F

نقاط در توالی پپتید نشان دهنده محل برش پروتئین هدف توسط آنزیم تریپسین می‌باشد
Dots in peptide sequence indicates cleavage site by trypsin enzyme



شکل ۴- تصویر شماتیک نحوه تعیین نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی برای لکه‌های پروتئینی بیان شده در ژل با

استفاده از نرم‌افزار Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0

Figure 4. Schematic image for determination of isoelectric point and molecular weight of expressed protein spots in the acrylamide gel by Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 software

جدول ۳- مشخصات پروتئین‌های شناسایی شده به وسیله جستجو در پایگاه داده‌ها در ژنوتیپ حساس به تنش خشکی

(SAR 80 JI 09 K12-87)

Table 3. characteristics of identified proteins by searching in data base in drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87)

شماره لکه	نام پروتئین شناسایی شده	نقطه ایزوالکتریک	وزن مولکولی (kDa)	گیاه	نقش و عملکرد پروتئین شناسایی شده	منابع
Spot No.	Name of identified protein	Isoelectric point	Molecular weight	Plant	Function of identified protein	References
3	Ribulose1,5 biphosphate carboxylase /oxygenase	6.88	83	<i>Hordeum vulgare</i>	Energy	Mehrabi, 2013
30	Heat Shock protein hsp 70	5.22	75.40	<i>Medicago sativa</i>	stress	Chen <i>et al.</i> , 2009
48	Vacuolar invertase I (GIN-1)	4.6	71.786	<i>Vitis vinifera</i>	Energy and carbon metabolism	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
53	Vacuolar invertase I (GIN-1)	4.6	71.786	<i>V. vinifera</i>	Energy and carbon metabolism	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
58	Vacuolar invertase I (GIN-1)	4.6	71.786	<i>V. vinifera</i>	Energy and carbon metabolism	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
100	Aspartate aminotransferase (AsAT)/	5.62	59.69	<i>V. vinifera</i>	Aminoacid metabolism	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
102	b subunit of ATP synthase	5.25	52.68	<i>Eurya sp</i>	Energy	Aranjuelo <i>et al.</i> , 2011
127	Putative phenylalanine ammonia lyase	6.07	76.02	<i>Oryza sativa</i>	stress	Hashimoto and Komatsu, 2007
192	Proxiredoxin(PRX 5)	5.15	73.09	<i>V. vinifera</i>	Stress response	Di Carli <i>et al.</i> , 2011
201	Phosphoribulokinase	5.41	39.23	<i>Pisum sativum</i>	Energy	Xu and Giannakakou, 2006
203	Putative calreticulin precursor	4.47	48.45	<i>O. sativa</i>	stress	Hashimoto and Komatsu, 2007

نقش پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی

پروتئین‌های درگیر در سنتز و پروتئین‌های درگیر در متابولیسم آمینواسیدها (شامل: فروکتوز- بیس فسفات آلدولاز^۹ و اسپاراتات آمینوترانسفراز^{۱۰}).

در این تحقیق دو لکه شماره ۳۰ و ۶۶ در ژنوتیپ حساس به خشکی، پروتئین‌های شوک حرارتی شناخته شدند. این پروتئین‌ها، خانواده بزرگی از پروتئین‌ها هستند که ساختمان شدیداً محافظت شده‌ای دارند. این ساختمان محافظت شده نشان‌دهنده ایفای نقش مهم آن‌ها در فرآیندهای اصلی سلول بوده و به‌عنوان مولکول‌های همراه سایر پروتئین‌ها عمل می‌کنند (Julian et al., 1998). این پروتئین‌ها بخش مهمی از ابزارهای سلولی بوده که در تاخوردگی‌های اولیه و مجدد پروتئین‌ها کمک کرده و باعث محافظت هسته سلول‌ها و غشای لپیدی در مقابل آسیب می‌شوند. همچنین این پروتئین‌ها از سلول در برابر تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند (Hooper and Hooper, 2005). این خانواده از پروتئین‌ها، حساس‌ترین گروه به دما بوده و تقریباً در همه موجودات زنده و در ۸۰-۶۰ درصد سلول‌های یوکاریوت وجود دارد (Gupta et al., 2010).

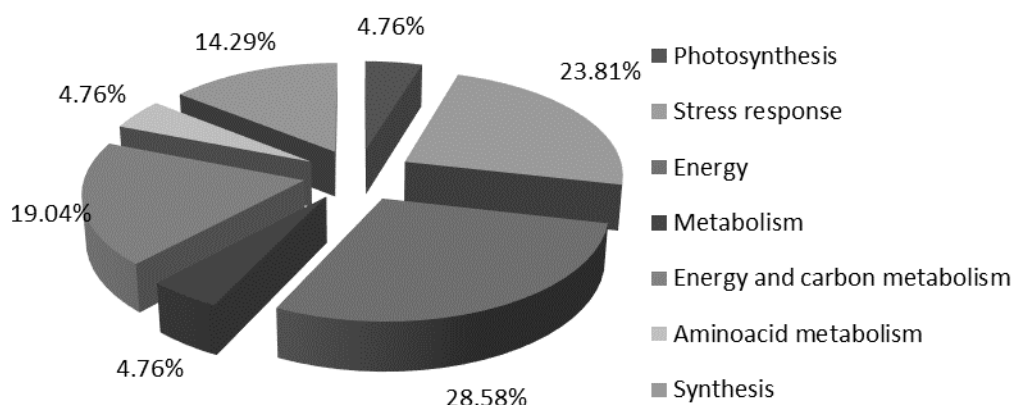
لکه ۲۱۲ در رقم حساس به تنش خشکی در گیاه نخود با وزن مولکولی ۶۴/۹۳ و نقطه ایزوالکتریک ۵/۹۰ با درصد هم‌پوشانی ۲٪ با پروتئینی به نام کمپلکس سیتوکروم b6-F با زیر واحدهای آهن-گوگرد از طریق MALDI TOF-TOF مورد شناسایی قرار گرفت. با توجه به پایین بودن هم‌پوشانی برای هر دو لکه پروتئینی شناسایی شده، پیشنهاد می‌شود با توالی‌یابی، جدید بودن آن اثبات گردد. یوبی کوئینول سیتوکروم C- ردوکتاز^{۱۱} که با عناوینی مانند bc1 Complex و یا Complex III نیز شناخته می‌شود، یک کمپلکس

در ژنوتیپ حساس به خشکی (SAR 80 JI 09 K12-) از بین ۲۳ لکه پروتئینی بیان شده با تغییر بیان معنی‌دار، بیشترین مقدار آن‌ها یعنی ۲۸/۵۸ درصد مربوط به پروتئین‌های درگیر در متابولیسم انرژی، ۲۳/۸۱ درصد مربوط به پروتئین‌های بیان‌شده در پاسخ به تنش ناشی از خشکی، ۱۹/۰۴ درصد مربوط به انرژی و متابولیسم کربن و ۱۴/۲۹ درصد مربوط به سنتز گلوکز بود. مقادیر ۴/۷۶ درصد نیز مربوط به هرکدام از پروتئین‌های درگیر در متابولیسم آمینواسید، فتوسنتز و متابولیسم مشاهده شد (شکل ۵). در مجموع به ترتیب، لکه‌های پروتئینی بررسی شده با توجه به نقش آن‌ها در سلول و عکس‌العمل به تنش‌های محیطی، از جمله تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفتند. این پروتئین‌ها عبارتند از:

- پروتئین‌های درگیر در پاسخ به تنش (شامل پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی، پیش‌ماده فنیل آلانین آمونیالاز^۱ و پروکسی ردوکسین^۲).
- پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز (از جمله کمپلکس سیتوکروم b6-F با زیر واحدهای آهن-گوگرد^۳).
- پروتئین‌های درگیر در متابولیسم انرژی (همچون: فعال‌کننده ریبولاز بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز^۴ (فعال‌کننده ریبسکو)، زیر واحد β کمپلکس ATP سنتتاز^۵ و فسفو ریبولوکیناز^۶).
- پروتئین‌های درگیر در متابولیسم (گلوتامین t-RNA لیگاز).
- پروتئین‌های درگیر در انرژی و متابولیسم کربن (اینورتاز واکوئلی^۷ و تریوز فسفات ایزومراز^۸).

- 1- Putative Phenylalanine ammonialyase (PAL)
- 2- Peroxiredoxin
- 3- Cytochrome b6-F complex Iron-Sulfur subunit
- 4- Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
- 5- b subunit of ATP synthase
- 6- Phosphoribulokinase
- 7- Vacuolar invertase I(GIN-1)
- 8- Triose phosphate isomerase

- 9- Fructose-bisphosphate aldolase 1
- 10- Aspartate aminotransferase (AsAT)
- 11- Ubiquinol-cytochrome-c reductase



شکل ۵- دسته‌بندی لکه‌های پروتئینی با تغییرات بیانی معنی‌دار در ژنوتیپ حساس به تنش خشکی (SAR 80 JI 09 K12-87) بر اساس عملکرد و نقش آن‌ها

Figure 5- Classification of protein spot with significant changes in expression in drought susceptible genotype (SAR 80 JI 09 K12-87) based on their role and function

دارد (Link, 1997).

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند سپاسگزاری نموده و از اساتید محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه رازی، اعضای محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و از پرسنل معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور کمال تشکر را داریم.

آنزیمی باکتریایی و میتوکندریایی است که در سیستم فسفوریلاسیون اکسیداتیو نقش دارد (Brown *et al.*, 2008). این کمپلکس آنزیمی واکنش اکسیداسیون-کاهش سیستوکروم C و ترکیبات یوبی کوئینول همراه را در تولید اختلاف پتانسیل الکتریکی که با سنتز ATP در ارتباط است، کاتالیز می‌کند. این پروتئین در گیاهان، حیوانات و باکتری‌ها در ایجاد طیف وسیعی از اختلاف پتانسیل الکتریکی از ۱۵۰- تا +۴۰۰ میلی‌ولت نقش

References

- Aranjueli, I., Molero, G., Erice, G., Avicé, J.C. and Nogues, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, **62**(1): 111-123.
- Ashraf, N., Ghai, D., Barman, P., Basu, S., Gangisetty, N., Mandal, M.K., Chakraborty, N., Datta, A. and Chakraborty, S. (2009). Comparative analyses of genotype dependent expressed sequence tags and stress-responsive transcriptome of chickpea wilt illustrate predicted and unexpected genes and novel regulators of plant immunity, *BMC Genomics*, **10**, 415.
- Bhushan, D., Pandey, A., Choudhary, M. K., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2014). Comparative Proteomics Analysis of Differentially Expressed Proteins in Chickpea Extracellular Matrix during Dehydration Stress. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**(111): 868-885.
- Bloom, H., Beier, H. and Gross, H. S. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brown, E.N., Friemann, R., Karlsson, A., Parales, J.V., Couture, M.M., Eltis, L.D. and Ramaswamy, S. (2008). "Determining Rieske cluster reduction potentials *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **13**(8): 1301-1313.

- Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. and Lagana, A.** (2009). Identification of change in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**: 381-390.
- Chen, A. P., Wang, G. L., Qu, Z. L., Lu, C.X., Liu, N., Wang, F. and Xia.** 2007. Ectopic expression of ThCYP1, a stress-responsive cyclophilin gene from *Thellungiella halophila*, confers salt tolerance in fission yeast and tobacco cells. *Plant Cell Reports*, **26**: 237-245.
- Chowdhry, M.A., Ambreen, A. and Khaliq, I.** (2002). Genetic control of some polygenic traits in aestivum species. *Asian Journal of Plant Science*, **1**: 235-237.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H.** (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, **7**: 52-54.
- Di Carli, M., Zamboni, A., Enrico, P. M., Pezzotti, M., Lilley, S., Benvenuto, E. and Desiderio, A.** (2011). Two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis of grape berry proteome during post-harvest withering. *Journal of Proteome Research*, **10(1)**: 429-446.
- Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, Y., Hua, G., Ma, W. and Yan, Y.** (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, **72(10)**: 91-1180.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. and Chowdhuri, D.K.** (2010). Heat shock proteins in toxicology: How close and How far? *Life Sciences*, **86**: 377-384.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E.S. and Salekdeh, G.H.** (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, **5(4)**: 950-60.
- Hashimoto, M. and Komatsu, S.** (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*, **7(8)**: 1293-302.
- Hooper, P.L. and Hooper, J.J.** (2005). Loss of defense against stress: Diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technology & Therapeutic*, **7**: 204-208.
- Juliann, G., Kiang, G. and Tsokos, C.** (1998). Heat shock protein 70 Kda: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology & Therapeutics*, **80(2)**: 183-201.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M. and Wang, H.** (2001). Gene expression profiles during the Initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, **13**: 889-905.
- Link, T.A.** (1997). The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome bc1 complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism. *FEBS Letters*, **412 (2)**: 257-64.
- Mehrabi, A.M.** (2013). *Effect of drought stress on protein profile of hexaploid wheat in heading stage*. Ph.D. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran (In Persian).
- Rosegrant, M.W. and Agcaoili, M.,** (2010). *Global food demand, supply, and price prospects to 2010*. Washington, DC: International Food Policy Research Institute.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Sakurai, T.** (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, **31**: 279-92.
- Varshney, R.K., Song, C., Saxena, R.K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A.G., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B.D., Tar'an, B., Millan, T., Zhang, X., Ramsay, L.D., Iwata, A., Wang, Y., Nelson, W. and Farmer, A.D.** (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnology*, **31(3)**: 240-249.
- Wang, M.C., Peng, Z.Y., Li, C.L., Liu, C. and Xia, G.M.** (2008). Proteomics analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*. *Proteomics*. **8**: 1470-1489.
- Xu, J. and Giannakakou, P.** (2006). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, **5 (1)**: 65-71.
- Zhang, H., Pala, M., Oweis, T. and Harris, H.** (2000). Water use and water-use efficiency of chickpea and lentil in a Mediterranean environment. *Australian Journal of Agriculture Research*, **51**: 295-304.

Identification of Drought Stress Responsive Proteins in Susceptible Genotype of Chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Akbar Shabani¹, Alireza Zebarjadi^{2,*}, Ali Mostafaei³, Mohsen Saeidi² and Seyad Saeid Poordad⁴

- 1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
- 3- Professor, Institute of Medicinal Biology Research, University of Medicinal Sciences of Kermanshah, Kermanshah, Iran
- 4- Professor, Deputy of Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Sararood Branch, Kermanshah, Iran

(Received: February 27, 2016 – Accepted: August 21, 2016)

Abstract

Plants are capable of responding to environmental stresses by activating their adaptation mechanisms and their response to environmental factors by changing their gene expression. Drought stress is considered as the most important abiotic stress in agriculture. In this regard, in present research, proteomics techniques used to detect proteins were responding to drought stress. To select drought susceptible genotype, 64 chickpea genotypes were assessed by simple lattice design 8×8 at the Sararood station (Iran) and then in the greenhouse of College of Agriculture and Natural Resources of Kermanshah Razi University (Iran) in three levels of stress including normal, medium and intensive stress conditions at podding stage. Finally, SAR 80 JI 09 K12-8 genotype was selected as susceptible to drought stress. Then, the evaluations consisted of a leaf proteome induced under drought stress conditions were performed. To study and identify the proteins associated with drought, total protein was extracted from the leaves by TCA- acetone method and isolated in the first dimension by IPG gels with pH gradient 7-4 and in second dimension after by 12.5% concentration polyacrylamide gels. Therefore, in the drought susceptible genotype the value of each spot was used as a standard amount. Protein spots on the gel were scanned and identified by using Image Master 2D Platinum of Melanie 6.0 software. The results of two-dimensional gel analysis and protein identification of drought susceptible genotypes showed that leaf proteome pattern has been widely changed in drought stress condition. In susceptible genotype, 212 protein spots repeatable were identified. 10 spots were detected by using MALDI-TOF-TOF mass spectrometry which were divided in different groups based on response to drought stress in biological cycles.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis, Proteomics, Drought stress, Chickpea

* Corresponding Author, E-mail: zebarjadi@razi.ac.ir