بررسی اثر قارچ *Rhizophagus irregularis* بر بیان پروتئین شوک حرارتی در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش سرب: تکنیک پروتئومیکس

ستاره امانی‌فر [۱]، ناصرعلی اصغرزاد [۲]، محمود تورچی [۳]، مهدی زارعی [۴]
۱ - استادیار گروه علوم خاک دانشگاه زنجان، ۲- استاد گروه علوم خاک دانشگاه تبریز، ۳- استاد گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز، ۴- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه شیراز

چکیده
هدف از این مطالعه بررسی پروتئوم ریشه گیاه گوجه‌فرنگی تلقیح شده با قارچ Rhizophagus irregularis تحت تنش سرب با استفاده از تکنیک پروتئومیکس که ترکیبی از الکتروفورز دوبعدی ژل پلی‌آکریل‌آمید و طیف سنجی جرمی است، بود. گیاه گوجه‌فرنگی (Solanum lycopersicum L.) میکوریزی شده با قارچ Rhizophagus irregularis و گیاهان شاهد غیرمیکوریزی در بستری از شن استریل کشت شد و تیمار سرب از منبع نیترات سرب به همراه محلول غذایی و در چهار تکرار اعمال شد. نتایج حاصل از آنالیز تصاویر ژل‌ها حاکی از بیان متفاوت ۱۱ لکه پروتئینی در ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ تحت تنش سرب در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش بود (افزایش بیان سه لکه و کاهش بیان هشت لکه پروتئینی). پروتئین‌های با بیان متفاوت توسط طیف‌سنجی جرمی nano-HPLC ESI-Q-TOF شناسایی شدند. از این میان دو لکه پروتئینی متعلق به خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (پروتئین BiP-isoform D و پروتئین SGT۱) شناسایی گردیدند که بیان آن‌ها در اثر کلونیزاسیون میکوریزی کاهش به همراه داشت.

واژه های کلیدي: پروتئین شوک حرارتی، پروتئومیکس، سرب، گوجه فرنگی، میکوریز آربوسکولار

مقدمه
گیاهان برای مقابله با تنش فلزات سنگین استراتژی‌های متعددی را بکار می‌گیرند و در این میان گیاهانی که رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزی دارند شانس بیشتری برای بقا و تحمل تنش نشان می‌دهند. دسترسی زیستی فلز سنگین سرب برای گیاهان همانند بسیاری دیگر از فلزات سنگین توسط میکروارگانیسم‌های خاکزی به‌ویژه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار تغییر می‌یابد. اگرچه علائم ماکروسکپی و فیزیولوژیکی این همزیستی تحت تنش فلزات سنگین در گیاهان عالی به ویژه گیاهانی که اهمیت زراعی دارند بررسی شده است با این حال اطلاعات اندکی درباره مکانیسم‌های مولکولی آن وجود دارد. به این منظور در دهه اخیر بررسی تغییرات بیان ژن‌های گیاهان همزیست با قارچ میکوریز و مطالعه و شناسایی پروتئین‌های با بیان متفاوت با استفاده از تکنیک پروتئومیکس به‌عنوان ابزاری قدرتمند، در جهت مطالعات میکروارگانیسم-گیاه مطرح شده است. پروتئومیکس یکی از مهمترین و جدیدترین رهیافت‌های بیوتکنولوژی است که برای تعیین عملکرد پروتئین‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده کاربرد دارد که مبتنی بر الکتروفورز دو بعدی ژل پلی‌آکریل‌آمید (جداسازی پروتئین‌ها در بعد اول براساس نقطه ایزوالکتریک (pI) و بعد دوم به‌صورت SDS-PAGE[۴۸]) و طیف سنجی جرمی است (Ahsan et al. ۲۰۰۷). تحقیقات معدودی در زمینه شناسایی پروتئین‌های مرتبط با همزیستی میکوریزی تحت تنش فلزات سنگین انجام گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات Repetto et al. ۲۰۰۲ (پاسخ گیاه نخود را به تنش ناشی از فلز Cd و تاثیر قارچ AM را بر تغییرات پروتئوم)، Bestel-corre et al. ۲۰۰۴ (تاثیر لجن فاضلاب را بر پروتئوم گیاه یونجهٔ (Medicago truncatula) همزیست با قارچ میکوریز آربوسکولار و سینوریزوبیوم ملیلوتی) و Bona et al. ۲۰۱۱ (تجزیه پروتئوم گیاه Pteris vittata همزیست با قارچ گلوموس موسه با تیمار فلز سنگین آرسنیک) اشاره کرد.

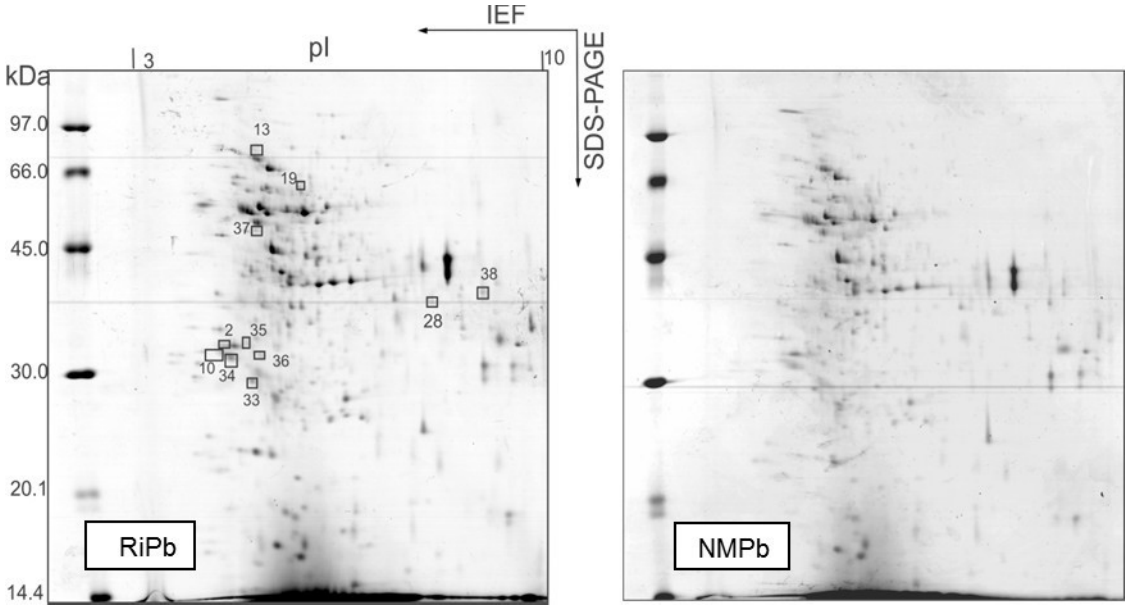
مواد و روش‌ها
به‌منظور تهیه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی (Solanum lycopersicum L.) تلقیح شده و شاهد، بذور بعد از ضدعفونی سطحی، در خزانه‌های جداگانه با بستر ماسه استریل حاوی مایه تلقیح رایزوفاگوس ایرگیولاریس و مایه تلقیح اتوکلاو شده (به میزان ۵۰% حجمی با پرلیت مخلوط شدند) کشت و در شرایط کنترل شده تا مرحله سه تا چهار برگی (نشاء) آبیاری و تغذیه شدند. گیاهچه‌ها به تعداد یک بوته در هر گلدان (حاوی ۵/۱ لیتر شن کوارتز استریل) انتقال یافتند و تیمار ۷۲۰ میکرومولار سرب به‌فرم نیترات سرب به‌همراه محلول غذایی Long-Ashton، یک ماه پس از آغاز کشت، اعمال شد و آزمایش در شرایط گلخانه‌ای به مدت دو ماه اجرا شد. در این مدت گیاهان با محلول Long-Ashton حاوی ۳۲ میکرومولار فسفر (Hewitt ۱۹۶۶)، آبیاری شدند. روش Damerval et al. ۱۹۸۶ برای استخراج پروتئین از ریشه گوجه‌فرنگی بکار گرفته شد که بر اساس استخراج با با محلول استون حاوی ۱۰% تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۰۷/۰ % DTT است. آزمایشات الکتروفورز دوبعدی در چهار تکرار انجام شد. غلظت پروتئین با روش برادفورد

[۴۸]. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

اندازه‌گیری شد (Bradford ۱۹۷۶) و ۲۵۰ میکروگرم به ازای هر ژل در هر بار الکتروفورز استفاده گردید. الکتروفورز بعد اول با دستگاه Multiphor Electrophoresis System, Amersham و با استفاده از ژل‌های نواری ۱۳ سانتیمتری آماده IPG با pH =۳-۱۱ انجام شد. جهت اجرای الکتروفورز بعد از ژل های ۱۲% با ابعاد ۲۴×۲۰× ۲/۰ سانتی‌متر استفاده گردید و محفظه دستگاه بعد دوم از بافر رانش SDS-PAGE پر شد. نشانگر رنگی آبی برموفنول برای اطلاع از رسیدن اولین لکه پروتئینی به انتهای ژل استفاده گردید و از جریان ثابت ۳۵ میلی آمپر به ازای هر ژل جهت اجرای آزمایش استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از آبی کوماسی استفاده شد و پس از اجرای مرحله رنگبری تصویربرداری ژل‌ها با اسکنر Bio Rad GS-۸۰۰ انجام شد و آنالیزکمی لکه‌های پروتئینی با نرم افزار PD Quest® انجام گردید. مقایسات بین تیمارها بر اساس آزمون t استیودنت و در سطح احتمال ۵% انجام شد. لکه‌های با تغییرات معنی‌دار پس از جداسازی از ژل و رنگ زدایی توسط بافر هضم حاوی آنزیم تریپسین هضم شدند (Hellman et al. ۱۹۹۵). پس از تکمیل مراحل هضم آنزیمی و استخراج پپتیدها آزمایشات nano-HPLC-MS/MS با nano-HPLC ESI-Q-TOF انجام شد. جستجوی پروتئین هدف براساس شباهت معنی‌دار (در سطح ۵%) در پایگاه‌های بیوانفورماتیکی با استفاده از موتور جستجوگر مسکات انجام شد.

نتایج و بحث

در گیاهان شاهد غیرمیکوریزی هیچ کلونیزاسیونی مشاهده نشد در حالیکه میانگین شدت کلونیزاسیون (M%) برای گیاهان تلقیح شده با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس برابر با ۹۴/۱۲درصد بود. در مقایسه پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی با قارچ رایزوفاگوس ایرگیولاریس تحت تنش سرب (RiPb) با گیاهان غیرمیکوریزی تحت تنش (NMPb) سرب بیان ۱۱ لکه پروتئینی بطور معنی‌داری ($p<0.05$) تغییر یافت (شکل ۱) که از میان آن‌ها سه لکه افزایش بیان و هشت لکه کاهش بیان نشان دادند. از این میان نه لکه توسط دستگاه nano-HPLC ESI-Q-TOF شناسایی شدند. از میان لکه‌های کاهش بیان یافته، لکه شماره ۳۷ مطابق با پروتئین protein SGT۱ homolog و لکه شماره ۱۳ مطابق با پروتئین BiP-isoform D شناسایی شدند (جدول ۱).



شکل ۱- الگوی پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگیولاریس* (RiPb) و گیاهان غیرمیکوریزی (NMPb) تحت تنش سرب

جدول ۱- پروتئین‌های با بیان متفاوت ($p < 0.05$) در مقایسه پروتئوم ریشه گیاهان میکوریزی شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگیولاریس* و گیاهان غیرمیکوریزی تحت تنش سرب

	نام پروتئین	گونه گیاهی مرجع	شماره دسترسی[d]	MW-pI[a] تئوری	MW-pI آزمایشی	فاکتور القا[b]
۳۷	protein SGT۱ homolog	*Solanum lycopersicum*	gi| ۴۶۰۳۷۶۸۳۰	۱۱/۵-۲/۴۱	۵۸/۵- ۱۰/۴۸	-۲۷/۲[c]
۱۳	BiP-isoform D	*Glycine max*	gi|	۹۵/۶-۲/۵۴	۵۸/۵-	-۴/۳

			۱۳۳۹۸۵۳۷		۸۷/۷۵	

[a] MW و pI عبارتند از وزن مولکولی و pH نقطه ایزوالکتریک.
[b] فاکتور القا حاصل تقسیم شدت نسبی لکه مورد نظر در گیاهان میکوریزی تحت تنش سرب به شدت نسبی همان لکه در گیاهان بدون همزیست تحت تنش می‌باشد.
[c] علامت - بیانگر کاهش بیان می‌باشد.
[d] شماره دسترسی مربوط به داده پایگاه NCBI می‌باشد.

همزیستی میکوریزی سبب کاهش بیان پروتئین SGT۱ تحت تنش سرب شد. به نظر می‌رسد که SGT۱ یک co-chaperone ضروری برای اتصال به HSP۷۰ و HSP۹۰ باشد (Zabka et al. ۲۰۰۸). SGT۱ در پاسخ‌های ایمنی و پاسخ‌های دفاعی گیاه به شوک حرارتی نقش دارد. بسیاری از پاسخ‌های فیزیولوژیک دفاعی گیاه وابسته به پروتئین‌های LRP[۴۹] هستند. SGT۱ به عنوان فاکتور ضروری برای تاخوردگی صحیح این پروتئین مطرح است (Cazale et al. ۲۰۰۹). SGT۱ توسط دو ژن *sgt۱a* و *sgt۱b* کد می‌شود و در پاسخ ایمنی گیاه در مقابل پاتوژن‌ها (Azevedo et al. ۲۰۰۶)، شوک حرارتی (Noel et al. ۲۰۰۷) و تنظیم هورمون‌های گیاهی اکسین و جاسمونیک اسید (Gray et al. ۲۰۰۳) نقش دارد. در نتیجه SGT۱ علاوه بر ایجاد مقاومت به شوک حرارتی و ایمنی گیاه در تعیین ساختار ریشه و انشعابات جانبی ریشه‌ها، به واسطه نقش آن در تنظیم هورمون‌های گیاهی، نقش دارد و فعالیت‌های SGT۱ با HSP۷۰ در این زمینه‌ها همپوشانی نشان داده است. بنابراین می‌توان اظهار کرد که کمپلکس SGT۱ و HSP۷۰ در موارد ذکر شده مشارکت دارند (Cazale et al. ۲۰۰۹). در اینجا اشاره به این نکته لازم است که اکسین در پاسخ دفاعی گیاه به پاتوژن‌ها و همزیست‌ها نقش دارد و کاهش سیگنالینگ اکسین یک استراتژی دفاعی برای گیاه محسوب می‌شود (Mathesius et al. ۲۰۱۰). در نتیجه کاهش بیان پروتئین SGT۱ می‌تواند در ارتباط با نیاز گیاه به همزیست قارچی تحت تنش فلز سنگین باشد، چراکه با کاهش بیان این پروتئین و افزایش سیگنالینگ اکسین به نظر می‌رسد استقرار همزیست قارچی در ریشه میزبان با سهولت بیشتری صورت بگیرد. همزیستی میکوریزی سبب کاهش بیان ایزوفرم D پروتئین BiP شد. این پروتئین به گروه HSP۷۰ تعلق دارد و تحت عنوان پروتئین متصل شونده به لومینال[۵۰] نیز شناخته می‌شود. این پروتئین نیز همانند سایر HSP۷۰ ها در تصحیح تاخوردگی‌های نادرست پروتئین‌ها نقش دارد و فعالیت ATPase دارد که نتایج ما کاهش بیان آنرا در اثر کلونیزاسیون میکوریزی در گیاهان تحت تنش سرب نشان می‌دهد. پس می‌توان اظهار داشت که سمیت سرب در گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی تحت تنش تعدیل می‌گردد.

منابع

Ahsan, N., Lee, D.G., Alam, I., Kim, P.J., Lee, J.J. and Ahn, Y.O. ۲۰۰۸. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. Proteomics, ۸:۳۵۶۱-۳۵۷۶.

Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J. and Shirasu, K. ۲۰۰۶. Role of SGT۱ in resistance protein accumulation in plant immunity. European Molecular Biology Organization Journal, ۲۵: ۲۰۰۷-۲۰۱۶.

Bestel-Corre, G., Gianinazzi, S. and Dumas-Gaudot, E. ۲۰۰۴. Impact of sewage sludges on Medicago truncatula symbiotic proteome. Phytochemistry, ۶۵: ۱۶۵۱-۱۶۵۹.

Bona, E., Marsano, F., Massa, N., Cattaneo, C., Cesaro, P., Argese, E., Sanita di Toppi, L., Cavaletto, M. and Berta, G. ۲۰۱۱. Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in *Pteris vittata* roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis. Journal of Proteomics, ۷۴: ۱۳۳۸-۱۳۵۰.

Bradford, M. M. ۱۹۷۶. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, ۷۲(۱), ۲۴۸-۲۵۴.

Cazale, A.C., Clément, M., Chiarenza, S., Roncato, M.A., Pochon, N., Creff, A., Marin, E., Leonhardt, N. and Noel, L.D. ۲۰۰۹. Altered expression of cytosolic/nuclear HSC۷۰-۱ molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, ۶۰: ۲۶۵۳-۲۶۶۴.

Damerval, C., Vienne, D.D., Zivy, M. and Thiellement, H. ۱۹۸۶. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, ۷: ۵۲-۵۴.

[۴۹] . Leucine Rich Proteins
[۵۰] .Luminal binding protein

Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.W. and Parker, J.E. ۲۰۰۳. *Arabidopsis* SGT۱b is required for SCFTIR۱-mediated auxin response. The Plant Cell, ۱۵: ۱۳۱۰-۱۳۱۹.

Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J. and Heldin, C. H. ۱۹۹۵. Improvement of an" In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. Analytical biochemistry, ۲۲۴(۱), ۴۵۱-۴۵۵.

Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anollé s, G., Rolfe, B.G. and Bauer, W.D. ۲۰۱۰. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. PNAS, ۱۰۰(۳):۱۴۴۴-۱۴۴۹.

Noel, L.D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmuller, L., Betsuyaku, S.,Witte, C.P., Bhat, R., Pochon, N., Colby, T. and Parker, J.E. ۲۰۰۷. Interaction between SGT۱ and cytosolic/nuclear HSC۷۰ chaperones regulates Arabidopsis immune responses. The Plant Cell, ۱۹: ۴۰۶۱-۴۰۷۶.

Repetto, O., Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Berta, G., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. ۲۰۰۳. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae* -inoculated pea roots. New Phytologist, ۱۵۷: ۵۵۵-۵۶۷.

Zabka, M., Lesniak, W., Prus, W., Kuznicki, J. and Filipek, A. ۲۰۰۸. Sgt۱has co-chaperone properties and is up-regulated by heat shock. Biochemical and Biophysical Research Communications, ۳۷۰ : ۱۷۹-۱۸۳.

Abstract

The aim of this study was to investigate the root proteome of the tomato plant that had been inoculated with *Rhizophagus irregularis* treated with lead treatment in comparison to non-mycorrhizal plants using a proteomic approach that is the combination of two-dimentional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. Inoculated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants with *Rhizophagus irregularis* and non-inoculated ones were potted in plastic container filled with sterile quartz sand. Pots treated with lead (۷۲۰ μmolar as $Pb(NO_3)_2$) to impose heavy metal stress and the study was performed with four experimental replicates. Image analysis showed that ۱۱ spots were differently affected by mycorrhization (۳ up-regulated and ۸ down-regulated). Differently expressed protein spots were identified by nano-HPLC ESI-Q-TOF mass spectrometry. Among them two proteins belonging to the family of heat shock proteins (protein SGT۱ homolog and BiP-isoform D) were differently down-accumulated in lead treated tomato roots by mycorhizal inoculation.

Key words: heat shock protein, proteomics, lead, tomato, arbuscular mycorrhiza