محور مقاله: حاصلخیزی خاک، تغذیه گیاه و کشت گلخانه‌ای

ارزیابی الگوی الکتروفورز دوبعدی برگ گندم (رقم آرتا) تحت تنش شوری در کشت هیدروپونیک

اکبر مرزوقیان[1*]، محمد مقدم[2]، محمود تورچی[2] و محمد رضا شکیبا[3]

[1] بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

[2] گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[3] گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

با توجه به گسترش فزاینده اراضی شور در ایران و اهمیت گندم به‌عنوان مهم‌ترین محصول استراتژیک، اصلاح و بهبود ارقام گندم از اولویت-های اصلی به‌شمار می‌آید. فهم مکانیسم پاسخ به شوری در سطح مولکولی کمک شایانی در اصلاح گندم دارد. در این راستا واکنش رقم آرتا به دو سطح شوری صفر و ۲۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مورد ارزیابی قرار گرفت. اعمال تنش شوری در سیستم کشت هیدروپونیک با بستر شنی انجام شد. برای آزمایش پروتئومیک بعد اول به روش IEF و بعد دوم به روش SDS-PAGE بر روی نمومه‌های برگی انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی و تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی با نرم افزار PDQueast صورت گرفت. نتایج حاکی از وجود ۱۳۲ لکه تکرارپذیر در دامنه pI بین ۵ الی ۸ و وزن مولکولی ۲۰ الی ۱۲۰ کیلو دالتون بود. پنج لکه پروتئینی در تیمار شوری نسبت به شاهد تغییر بیان نشان دادند. چهار پروتیئن افزایش بیان و یک پروتئین کاهش بیان داشت. جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی برای لکه‌های پروتئینی نشان داد که پروتئین‌های دارای تغییرات بیان احتمالا از نوع پروتئین‌های ساختاری مانند پروتئین‌های شوک حرارتی و پروتئین‌های تنظیمی مانند فاکتورهای ترجمه بودند.

کلمات کلیدی: پروتئومیک، تنش کلرید سدیم، گندم نان، گلخانه

مقدمه

فن‌آوری پروتئومیک با جداسازی و تشخیص پروتئین، نقش به‌سزایی در افزایش مطالعه پاسخ گیاهان به تنش شوری دارد (پارکر و همکاران ۲۰۰۶، قریشی و همکاران ۲۰۰۷ و کاروسو و همکاران ۲۰۰۸، ویتزل و همکاران۲۰۰۹، هوانگ و همکاران ۲۰۱۶). هو و همکاران (۲۰۰۴) پنج پروتئین شاخص را با تجزیه پروتئوم در ژنوتیپ‌های جهش یافته گندم پس از اعمال شوری ۱٪ کلرید سدیم پس از ۷۲ ساعت شناسایی کردند. ساکیب و همکاران (۲۰۰۶) واکنش ارقام مقاوم و حساس به شوری در گندم را مطالعه کردند. سطح پروتئین ارقام، ۱۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض ۱۲۵ میلی مولار کلرید سدیم و تنوع تحمل به نمک در میان ارقام ۳۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض ۱۲۵ میلی مولار کلرید سدیم در اتاق رشد ارزیابی شد. سه رقم تفاوت قابل توجهی در میزان‌های مطلق و نسبی وزن ساقه و ریشه خشک بعد از قرار گرفتن در معرض شوری کلرید سدیم به مدت ۳۰ روز

[1*] ایمیل نویسنده مسئول a.marzooghian@areeo.ac.ir

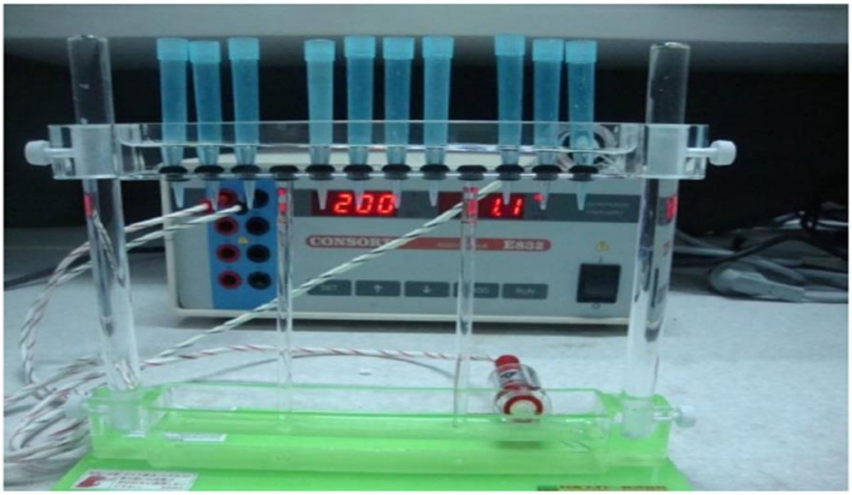
نشان دادند. ارتباط منفی معنی‌داری (r^2= ۰/۹۹) بین تحمل نمک (درصد وزن خشک ساقه تحت شوری نسبت به شاهد) و غلظت Na^+ ساقه در ارقام گندم مورد مطالعه مشاهده شد. کاروسو و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۳۸ پروتئین مرتبط با تنش شوری را در برگ‌های گندم شناسایی کردند که در پاسخ به شوری سطح بیان آن‌ها تغییر کرد. ۱۰ پروتئین با بیان کمتر و ۲۸ پروتئین بیان بیشتری نشان دادند. گائو و همکاران (۲۰۱۱) تجزیه پروتئوم برگ را با اعمال تنش شوری روی دو رقم گندم از لحاظ عملکرد، کیفیت گلوتن و مقاومت بررسی کردند. از ۵۲ لکه پروتئینی با بیان‌های متفاوت، ۲۶ لکه افزایش بیان، ۲۱ لکه کاهش بیان و پنج لکه الگوهای چند بیانی نشان دادند. این پژوهش جهت مطالعه پروتئین‌های مرتبط با تنش شوری و چگونگی ساز و کار مولکولی این پروتئین‌ها، در یکی از ارقام گندم حساس به شوری در سیستم کشت هیدروپونیک بسته با بستر شنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

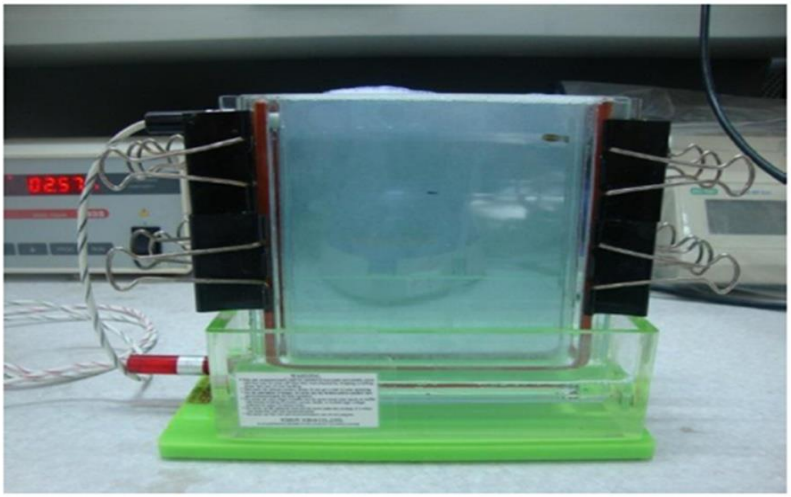
آزمایش با سه تکرار در سیستم کشت هیدروپونیک انجام شد. رقم آرتا با شجره :

(HD2206/Hork//Bul/6/CMH80A.253/2/M2A/CML//Ald/3/Ald*4/5/BH1146/H56.71//BH1146/3/CMH78.390/4/Seri/7/Hel/3 *Cno79//2*Seri 82) دورگ‌گیری گندم نان آرتا در مرکز بین المللی اصلاح ذرت وگندم (CIMMYT) تحت برنامه به‌نژادی گندم برای ایران انجام شد.در این پژوهش از سیستم هیدروپونیک بسته استفاده شد. تنش شوری در مرحله ساقه رفتن اعمال شد و تا زمان برداشت ادامه داشت. شوری از نوع کلرید سدیم با سطوح صفر (شاهد)، و ۲۵۰ میلی مولار بود. الکتروفورز دوبعدی طی پنج مرحله صورت گرفت: ۱- استخراج پروتئین، ۲- تهیه ژل بعد اول (IEF) (شکل ۱)، ۳- تهیه ژل بعد دوم (SDS-PAGE) (شکل ۲)، ۴- رنگ‌آمیزی و تصویربرداری ژل و ۵- تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی. رنگ-آمیزی با استفاده از آبی کوماسی انجام شد، تصویربرداری ژل‌ها با اسکنر Bio Rad GS-800 انجام گردید. تصاویر حاصل در نرم‌افزار PDQuest مورد تجزیه قرار گرفتند. پس از پایان لکه‌یابی، درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به‌دست آمد و آزمون t بین تیمارهای تنش شوری و شاهد انجام شد. لکه‌های پروتئینی که تغییرات معنی‌داری داشتند مشخص شدند و روند کاهشی یا افزایشی آن‌ها بر اثر تنش شوری بر اساس فاکتور القا IF^2 تعیین گردید. به‌این ترتیب که نقاط دارای IF بالاتر یا مساوی ۱/۵ مشخص کننده افزایش بیان[3] و نقاط دارای IF کمتر یا مساوی ۰/۵ مشخص کننده کاهش بیان[4] قابل ملاحظه معرفی شدند. درنهایت، با مراجعه به داده پایگاه‌های اینترنتی پروتئین‌ها مانند NCBI و Swiss Prot براساس نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی، پروتئین‌های احتمالی شناسایی شدند.

Induction Factor.[2]
Up-Regulated.[3]
Down-Regulated.[4]



شکل ۱. الکتروفورز بعد اول و جداسازی پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک[۵] (pI)



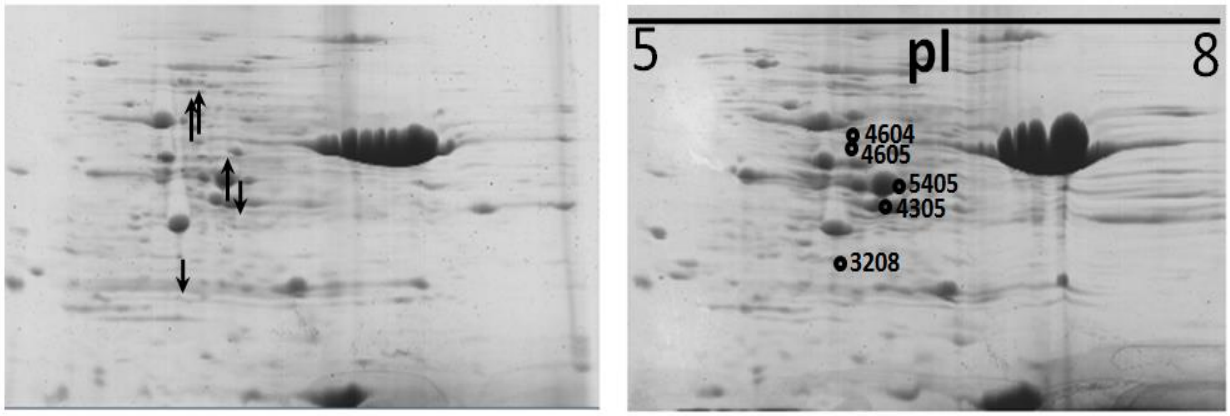
شکل ۲. الکتروفورز بعد دوم و جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی[۶] (MW)

نتایج و بحث

پنج لکه پروتئینی در مقایسه تیمار شوری با شاهد رقم آرتا حداقل تغییر ۱/۵ برابری در بیان داشتند (شکل ۳). همه لکه‌های پروتئینی بجز لکه ۵۴۰۵ افزایش بیان در شرایط شوری نشان دادند. وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و فاکتور القا برای لکه‌های پروتئینی و پروتئین‌های احتمالی شناسایی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. لکه ۴۳۰۵ با احتمال زیاد پروتئین تنظیمی Eukaryotic translation initiation factor 4B یا فاکتور شروع ترجمه 4B بود که افزایش بیان داشت. پروتئین‌های تنظیمی دخیل در انتقال پیام و بیان ژن، در پاسخ به تنش شوری نقش دارند (کائور و گوپتا ۲۰۰۵). به‌طور کلی پروتئین‌های شناسایی شده را بر اساس کارکرد می‌توان به صورت زیر دسته بندی نمود. پروتئین‌های درگیر در تاخوردگی و

Isoelectric Point. [5]
Molecular Weight.[6]

پروتئولیز پروتئین، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای تولید انرژی و پروتئین‌های تنظیمی با کارکرد نامشخص. برخی از این پروتئین‌ها شامل انواع فاکتورهای رونویسی، پروتئین کینازها مانند MAPK، پروتئین فسفاتازها و فسفولیپازها می‌باشند (رسول نیا و همکاران ۲۰۱۱).



ب الف

شکل ۳. ژل الکتروفورز دو بعدی رقم آرتا در شرایط شاهد (الف) و شوری ۲۵۰ میلی مولار کلرید سدیم (ب) و محل لکه‌های پروتئینی با بیان معنی‌دار

جدول ۱. لکه های پروتئینی با تغییر بیان معنی دار در رقم گندم تحت بررسی و پروتئین های احتمالی شناسایی شده

شماره لکه	پروتئین همولوگ	شماره ثبت در NCBI[۷]	MW-pI تئوری	MW-pI آزمایشی	منبع پروتئین	پایگاه اطلاعاتی
3208	ATP-synthase beta sub-units	BAB18833.1	5.5/40.8	6.10/38.76	*Pandorina morum*	GeneBank
4305	Eukaryotic translation initination factor 4B	AAC28254.1	5.7/47.6	6.28/49.29	*Triticum aestivum*	GeneBank
4604	70 kDa Heat shock protein	ACT65562.1	4.9/73.72	6.19/72.26	*Triticum aestivum*	GeneBank
4605	70 kDa Heat shock protein	ACT65562.1	4.9/73.72	6.19/70.37	*Triticum aestivum*	GeneBank
5405	ATP-synthase beta chain	P20858.1	5.6/59.3	6.35/53.7	*Triticum aestivum*	UniProtKB

نتیجه‌گیری

از پروتئین‌های پاسخ به تنش شوری، دو گروه اصلی پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی قابل ذکر هستند. پروتئین‌های ساختاری مانند HSP ها که در حفاظت گیاه در برابر تنش و بازسازی خسارات وارده فعالیت دارند. از جمله دیگر پروتئین‌های دفاعی گیاه، پروتئین‌های غشایی مثل انتقال دهنده‌ها هستند. دسته دوم پروتئین‌های تنظیمی هستند، مثل فاکتورهای پروتئینی مرتبط با انتقال پیام و بیان ژن‌هایی که به تنش شوری پاسخ می-دهند. لکه‌های پروتئینی ۴۶۰۴ و ۴۶۰۵ که احتمال دارد پروتئین شوک حرارتی hsp 70 باشد، در شرایط تنش شوری افزایش بیان بیش‌تری داشت. همانند آزمایش گلخانه‌ای، در آزمایش پروتئومیک نیز حساس بودن رقم آرتا تحت تنش شوری تائید شد.

منابع

Castillejo, M., Maldonado, A.M., Ogueta, S. and Jorrín, J.V., 2008. Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (Helianthus annuus) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. The Open Proteomics Journal 1: 59-71.

[1]. Protein ID

Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, G., Hu, Y., Ma, W. and Yan, Y., 2011. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). Phytochemistry 72: 1180-1191.

Huang L, Raats D, Sela H, Klymiuk V, Lidzbarsky G, Feng L, Krugman T and Fahima T., 2016. Evolution and Adaptation of Wild Emmer Wheat Populations to Biotic and Abiotic Stresses. Phytopathology. 54:279-301.

Huo, C.-M., Zhao, B.-C., Ge, R.-C., Shen, Y.-Z. and Huang, Z.-J., 2004. Proteomic analysis of the salt tolerance mutant of wheat under salt stress. Yi Chuan Xue Bao 31: 1408-1414.

Kaur, N. and Gupta, A.K. 2005. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. Current Science 88: 1771-1780.

Parker, R., Flowers, T.J., Moore, A.L. and Harpham, N.V. 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. Journal of Experimental Botany57: 1109-1118.

Qureshi, M.I., Qadir, S. and Zolla, L. 2007. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. Journal of Plant Physiology 164: 1239-1260.

Rasoulnia, A., Bihamta, M.R., Peyghambari, S.A., Alizadeh, H. and Rahnama, A., 2011. Proteomic response of barley leaves to salinity. Molecular Biology Reports 38: 5055-5063.

Saqib, M., Zörb, C. and Schubert, S., 2006. Salt-resistant and salt-sensitive wheat genotypes show similar biochemical reaction at protein level in the first phase of salt stress. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 169: 542-548.

Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G.-K., Börner, A. and Mock, H.-P. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. Journal of Experimental Botany 60: 3545-3557.

Topic for submission: Soil Fertility, Plant Nutrition and Greenhouse Cultivation

Evaluation of two dimensional electrophoresis pattern of wheat leaf (Arta cultivar) under salt stress in Hydroponic culture

Akbar Marzooghian[1*], Mohammad Moghaddam[2], Mahmoud Toorchi[2] & Mohammad Reza Shakiba[3]

[1] Crop and Horticultural Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahvaz, Iran

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

[3] Department of Eco-Physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author, email: a.marzooghian@areeo.ac.ir

Abstract

Considering to the expansion of saline lands in Iran and the importance of wheat as the most important strategic crop, wheat cultivar breeding and improvement is the main priority. The understanding of response to salinity in molecular level can be useful to wheat breeding. In order to study, the reaction of Arta was evaluated for two levels of NaCl (0 and 250 mM) in the sand culture in hydroponic system. For proteomics protein pattern of leaf tissues was studied by IEF as first dimensional and SDS-PAGE as second dimensional, respectively. Quantity of spot proteins was analyzed by PDQueest software after staining by comassi blue. About 132 replicable spots were observed in 5-8 pI and 20-120 kD molecular weight range. Five spots had significant expression. Four spots were up-regulated while, one spot was down-regulated. Search for proteins spots in data base showed mentioned spots probably were structural proteins such as heat shock proteins, and regulation proteins such as translation factors.

Keywords: Bread Wheat, Greenhouse, NaCl stress, Proteomics