Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Proteome pattern changes in the leaf of two tolerant and sensitive sugar beet (*Beta Vulgaris* Spp. *Vulgaris*) genotypes under water deficit stress

Milad Ghasemi
Ph.D. Student, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agricultures, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: milad.ghasemi@tabrizu.ac.ir

Mahmoud Toorchi
*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran. E-mail: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

Saeid Aharizad
Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail: s.aharizad@yahoo.com

Abstract

Objective

Sugar beet (*Beta vulgaris L.*), due to its capacity to accumulate sucrose in the storage root, represents one of the most important agronomic crops worldwide. Drought stress, as a major abiotic constraint, triggers a cascade of morphological, physiological, biochemical, and molecular alterations in plants, ultimately leading to a reduction in yield performance. The objective of the present study was to identify drought-responsive proteins associated with tolerance mechanisms using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) coupled with mass spectrometry (MS)-based proteomic analysis.

Materials and methods

In this study, the leaf proteome profiles of two contrasting sugar beet (*Beta vulgaris L.*) genotypes, drought-tolerant (8001-S1-10) and drought-sensitive (8001-S1-6), were investigated under water-deficit stress imposed by the Class A pan evaporation method. A comparative analysis between the drought-tolerant and drought-sensitive genotypes was performed under normal irrigation and water-deficit stress conditions. Total protein was extracted from leaf tissues, separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), and protein spots were quantitatively analyzed using PDQuest software to detect reproducible spots exhibiting significant differential expression under control and drought-stress conditions. Subsequently, mass spectrometry (MS)-based protein identification combined with bioinformatics tools was employed to characterize the drought-responsive proteins.

Results

A total of 85 reproducible protein spots were detected in the drought-tolerant genotype. Based on Student's *t*-test, seven protein spots exhibited significant up-regulation, whereas two spots

showed significant down-regulation under drought stress. In the drought-sensitive genotype, 57 reproducible protein spots were identified, among which four spots displayed statistically significant differential expression; all of them were significantly down-regulated under water-deficit conditions. The identified proteins were functionally categorized into five major groups: photosynthesis-related proteins, proteins involved in energy and primary metabolism, catabolic proteins, stress- and defense-related proteins, and ROS-detoxifying or scavenging proteins. Within the photosynthetic group, Rubisco activase and phosphoribulokinase were up-regulated, whereas 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase and carbonic anhydrase were down-regulated in the tolerant genotype under drought stress. Oxygen-evolving enhancer protein 1 and oxygen-evolving enhancer protein 2 exhibited marked down-regulation in the sensitive genotype. Moreover, hexokinase and glutamine synthetase 2 were up-regulated in the tolerant genotype, whereas malate dehydrogenase and choline monooxygenase were significantly down-regulated in the sensitive genotype under drought conditions. Antioxidant and stress-related proteins such as catalase 2 and heat shock protein 70 were found to be up-regulated under drought stress, while monodehydroascorbate reductase 5 displayed increased abundance specifically in the tolerant genotype.

Conclusions

The results clearly demonstrate that drought tolerance in sugar beet isn't solely dependent on the upregulation of specific proteins, but rather hinges on the precise regulation of a network of biological pathways. This network facilitates survival and stable performance under adverse conditions by maintaining a balance between energy production and consumption, protecting against oxidative damage, and preserving photosynthetic efficiency. Consequently, identifying these proteins as biomarkers could serve as a powerful tool for screening drought-tolerant genotypes and as a target for genetic engineering and breeding programs aimed at developing drought-resistant sugar beet and other crops.

Keywords: leaf tissue, mass spectrometry, protein, two-dimensional electrophoresis

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghasemi, M., Toorchi, M., Aharizad, S. (2026). Proteome pattern changes in the leaf of two tolerant and sensitive sugar beet (*Beta Vulgaris* Spp. *Vulgaris*) genotypes under water deficit stress. Agricultural Biotechnology Journal, 18(1), 1-26.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(1), 1-26. DOI: 10.22103/jab.2025.23888.1589

Received: August 10, 2025. Received in revised form: October 10, 2025.

Accepted: October 11, 2025. Published online: January 15, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

Given the increasing significance of water scarcity in Iran's arid climate and the crucial role of sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) as a major sugar-producing crop, identifying molecular mechanisms underlying water deficit tolerance is of paramount importance. Water deficit is a principal abiotic stress that induces diverse physiological, biochemical, and molecular responses, substantially reducing crop productivity. When occurring during reproductive stages, water deficit shortens the effective photosynthetic period, ultimately leading to yield losses. Advanced technologies such as proteomics have enabled a deeper understanding of plant responses to abiotic challenges. As a high-throughput approach, proteomics provides comprehensive insights into protein-level changes under specific environmental conditions, capturing dynamic responses not evident from transcriptome-level studies alone. Since water deficit not only alters the abundance of pre-existing proteins but may also trigger synthesis of new proteins, proteomic profiling serves as a robust method to reveal molecular markers linked to stress tolerance. Previous research has shown that water deficit–tolerant sugar beet genotypes exhibit superior physiological traits, including higher relative leaf water content, deeper root systems, greater biomass, and enhanced antioxidant enzyme activities compared to sensitive genotypes. Proteomic investigations in these lines have identified several stress-related proteins, such as Rubisco, malate dehydrogenase, choline monooxygenase, and oxygen-evolving enhancer proteins, which function in redox regulation, signal transduction, and cellular protection. These findings underscore the value of identifying differentially expressed proteins as targets for improving water deficit tolerance. Therefore, this study aims to profile drought-responsive proteins in contrasting sugar beet genotypes using proteomics. By comparing protein expression under well-watered and stress conditions, the study seeks to identify candidate biomarkers and elucidate key molecular mechanisms associated with resilience to water deficit. The results may contribute to breeding strategies focused on enhancing sugar beet productivity under limited water availability in arid regions such as Iran.

Materials and methods

The experiment was carried out under semi-arid field conditions in the Karkaj region near Tabriz (10 km east of Tabriz; 1365 m a.s.l.), using a randomized complete block design in a split-plot arrangement with seven replications. Two irrigation regimes were applied: (1) well-watered (irrigation after 80 mm cumulative Class A pan evaporation) and (2) water-deficit stress (irrigation after 180 mm cumulative evaporation), starting from the four-leaf developmental stage. Fully expanded leaves were harvested at maturity, immediately flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until proteomic analysis. Total soluble proteins were extracted from leaf tissues of drought-tolerant (8001-S1-10) and drought-sensitive (8001-S1-6) genotypes and

analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) with three biological replicates per treatment. Protein concentrations were determined using the Bradford assay. First-dimension isoelectric focusing (IEF) was performed in polyacrylamide tube gels, followed by second-dimension separation on SDS–polyacrylamide gradient gels (5–15% acrylamide). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, destained, and scanned at high resolution. Protein spot detection, quantification, and normalization were performed using PDQuest software. The induction factor (IF) was calculated as the ratio of spot volumes under stress versus control conditions, with $IF \geq 2$ and $IF \leq 0.5$ considered thresholds for significant up- and down-regulation, respectively. Statistically validated protein spots were manually excised, in-gel digested with sequencing-grade trypsin, and subjected to MALDI-TOF/TOF mass spectrometric analysis. Peptide mass fingerprints (PMFs) and MS/MS spectra were searched against the SwissProt database using the Mascot search engine, enabling confident identification of drought-responsive proteins.

Results

Comparative proteomic profiling revealed distinct responses between the drought-tolerant and drought-sensitive genotypes. In the tolerant line, 85 reproducible protein spots were detected, with 23 displaying differential abundance (14 upregulated, 9 downregulated); of these, 9 were statistically significant ($p < 0.05$). In contrast, 57 reproducible spots were observed in the sensitive line, of which 29 were differentially expressed (12 upregulated, 17 downregulated), with four showing significant downregulation. Functionally, proteins were categorized into: (1) photosynthesis-related proteins (46.15%), (2) metabolism and energy-related proteins (30.77%), (3) stress-responsive proteins, (4) proteolytic proteins, and (5) ROS-detoxification enzymes (each comprising 7.7%). In the tolerant line, spots 3403 and 3602—identified as Rubisco activase and phosphoribulokinase, respectively—were upregulated, indicating sustained carbon fixation under water deficit. Downregulation of spots 4804 and 5201 (IspG and carbonic anhydrase) in the same genotype suggests a reallocation of metabolic energy and altered CO_2 assimilation strategies. Upregulation of catalase 2 (spot 4601), which scavenges hydrogen peroxide, suggests robust ROS detoxification capacity. Energy metabolism proteins such as hexokinase (spot 1604) and glutamine synthetase 2 (spot 2401) were also induced, highlighting the role of sugar and nitrogen assimilation in drought resilience. Spot 3702, corresponding to HSP70, showed marked induction, indicating its role in protein homeostasis. Additionally, spot 7403, identified as MDHAR5, was upregulated, emphasizing enhanced ascorbate-mediated ROS scavenging in the tolerant genotype. In contrast, the sensitive genotype showed significant downregulation of proteins involved in photosynthetic electron transport (oxygen-evolving enhancer proteins) and energy metabolism, indicating impaired physiological adjustment to water-deficit stress.

Conclusions

The proteomic signatures revealed that the drought-tolerant genotype orchestrates a multifactorial adaptive strategy under water-deficit stress. This involves enhanced photosynthetic efficiency, elevated antioxidative capacity, and strategic metabolic modulation. Key enzymes such as Rubisco activase, phosphoribulokinase, catalase 2, HSP70, and MDHAR5 function synergistically to maintain metabolic homeostasis and mitigate oxidative stress. Downregulation of carbonic anhydrase and IspG suggests energy conservation under limited water availability. Conversely, the sensitive genotype exhibits a proteomic profile indicative of impaired stress perception and inadequate protective responses. These results highlight several drought-inducible proteins as potential biomarkers and molecular targets for developing stress-resilient sugar beet cultivars via marker-assisted selection or transgenic approaches.

Author Contributions

Conceptualization, Milad Ghasemi and Mahmoud Toorchi; methodology, Mahmoud toorchi; investigation, Milad Ghasemi; data curation, Milad Ghasemi; formal analysis, Milad Ghasemi; writing—original draft, Milad Ghasemi; writing—review & editing, Mahmoud Toorchi; supervision, Mahmoud Toorchi; project administration, Mahmoud Toorchi; funding acquisition, Mahmoud Toorchi and Saeid Aharizad. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Proteomic data generated in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors thank the University of Tabriz laboratory staff for technical support.

Ethical Considerations

No human or animal subjects were involved; all procedures complied with institutional biosafety guidelines.

Funding

This research was funded by the Vice Chancellor for Research, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

تغییرات الگوی پروتئوم برگ دو ژنوتیپ متحمل و حساس چغندر قند (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris*) تحت تنش کم‌آبی

میلاد قاسمی

گروه بـه‌نژادی و بیـوتکـنـولـوژی گـیـاهـی، دانشـــکـده کشـــاورزی، دانشـــگـاه تـبـریـز، تـبـریـز، ایـران. رایـانـامـه: milad.ghasemi@tabrizu.ac.ir

محمود تورچی

*نویســـنده مســـئول: اســـتاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی ، دانشـــکده کشـــاورزی، دانشـــگاه تبریز،تبریز، ایران. رایانامه: mtoorchi@tabrizu.ac.ir

سعید اهری‌زاد

استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: s.aharizad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۹

چکیده

هدف: چغندرقند به دلیل ذخیره قند در ریشـــه یکی از مهمترین گیاهان زراعی به حســـاب می‌آید. تنش کم‌آبی یکی از تنش‌های غیرزنده می‌باشـد که باعث تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشـیمیایی و مولکولی در گیاه شـده و نتیجه این تغییرات کاهش عملکرد محصول است. هدف از این مطالعه شناسایی پروتئین‌های درگیر در تحمل به تنش کم آبی به روش الکتروفورز دو بعدی و طیف سنجی جرمی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش الگوی پروتئوم برگ دو ژنوتیپ متحمل (8001-S1-10) و حسـاس (8001-S1-6) چغندرقند تحت تنش کم‌آبی (روش تشـتک تبخیر کلاس A) مورد بررسـی قرار گرفت. مقایسـه دو ژنوتیپ متحمل و حسـاس بین دو سـطح تنش کم‌آبی و نرمال انجام شـده است. اسـتخراج پروتئین از بافت برگ، جداسازی پروتئین‌ها به روش الکتروفورز دو بعدی و سپس کمی سـازی لکه‌های پروتئینی از طریق نرم افزار PDQuest برای شـناسـایی لکه‌های پروتئین تکرارپذیر و دارای تغییرات بیان معنی‌دار در شرایط عادی و تنش کم‌آبی انجام شد. سپس از روش طیف سنجی جرمی و ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی این پروتئین‌ها استفاده شد.

نتایج: تعداد ۸۵ لکه پروتئینی تکرارپذیر در ژنوتیپ متحمل شناسایی شد. بر اساس آزمون t تعداد هفت لکه پروتئینی با افزایش بیان و دو لکه با کاهش بیان معنی‌دار همراه بودند. در ژنوتیپ حساس تعداد ۵۷ لکه پروتئینی تکرارپذیر شناسایی شد که چهار لکه پروتئینی بر اساس آزمون t دارای تغییر بیان معنی‌دار آماری بودند. هر چهار لکه پروتئینی دارای کاهش بیان معنی‌دار در سطح تنش کم‌آبی بودند پروتئین‌های شناسایی شده از نظر عملکرد بیولوژیکی در پنج گروه قرار گرفتند که شامل پروتئین‌های فتوسنتزی، پروتئین‌های درگیر در انرژی و متابولیسم، پروتئین‌های تخریبی، پروتئین‌های درگیر در تنش و دفاع و پروتئین‌های سم‌زدا یا مهار کننده ROS هستند. پروتئین‌های فتوسنتزی آنزیم روبیسکو اکتیواز و فسفوریبولوکیناز با افزایش بیان و پروتئین 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase و کربنیک انیدراز با کاهش بیان در ژنوتیپ متحمل در اثر تنش کم‌آبی همراه بودند. پروتئین‌های oxygen-evolving enhancer protein 1 و oxygen-evolving enhancer protein 2 در ژنوتیپ حساس در اثر تنش کم‌آبی کاهش بیان نشان دادند. آنزیم‌های هگزوکیناز و گلوتامین سنتتاز ۲ با افزایش بیان در ژنوتیپ محتمل و پروتئین‌های مالات دهیدروژناز و کولین مونوکسیناژ در ژنوتیپ حساس تحت تنش کم‌آبی با کاهش بیان معنی‌دار همراه بودند. آنزیم کاتالاز ۲ و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در اثر تنش کم‌آبی دارای افزایش بیان بودند. پروتئین مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز ۵ در اثر تنش کم‌آبی درژنوتیپ متحمل افزایش بیان همراه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل به‌خوبی بیانگر این نکته است که تحمل به خشکی در چغندرقند نه‌تنها وابسته به افزایش بیان برخی پروتئین‌ها، بلکه مبتنی بر تنظیم دقیق شبکه‌ای از مسیرهای زیستی است که از طریق تنظیم تعادل بین تولید و مصرف انرژی، محافظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و حفظ کارایی فتوسنتزی، امکان بقاء و عملکرد پایدار در شرایط نامطلوب را فراهم می‌کنند. بنابراین، شناسایی این پروتئین‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی می‌تواند ابزار قدرتمندی برای غربالگری ژنوتیپ‌های متحمل و نیز هدفی برای برنامه‌های مهندسی ژنتیک و اصلاح گیاهان مقاوم به خشکی در چغندرقند و سایر محصولات زراعی باشد.

کلیدواژه‌ها: الکتروفورز دو بعدی، بافت برگ، پروتئین، طیف سنجی جرمی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قاسمی میلاد، تورچی محمود، اهری‌زاد سعید (۱۴۰۵) تغییرات الگوی پروتئوم برگ دو ژنوتیپ متحمل و حساس چغندر قند (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris*) تحت تنش کم‌آبی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۱-۲۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris*) متعلق به خانواده اسفناجیان[1] است. چغندرقند گیاهی دوساله می‌باشد که البته تحت شرایطی می‌تواند یک ساله هم باشد. این گیاه به دلیل ذخیره قند در ریشه‌ی خود، یکی از مهمترین گیاهان زراعی به حساب می‌آید (Draycott, 2008). تنش خشکی یکی از تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که باعث تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاه شده و اثرات منفی بر رشد گیاهان داشته و درنتیجه باعث کاهش عملکرد محصول می‌گردد. بروز تنش خشکی طی مراحل مختلف رشد، مخصوصا مرحله زایشی باعث کاهش طول دوره فتوسنتزی و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود (Mathivanan, 2021). در شرایط آب و هوایی ایران یکی از دلایل کاهش تولید محصولات کشاورزی، محدودیت منابع آبی به دلیل قرارگیری در اقلیم خشک می‌باشد. پیش‌بینی می‌شود که از سال‌های ۲۰۲۵ تا ۲۱۰۰ یکی از شدیدترین خشکسالی‌ها را تجربه کند (Afsari et al., 2024 ؛ Agrawal, 2010). در پاسخ به تغییرات محیطی نه تنها بیان پروتئین‌ها تغییر می‌کنند بلکه احتمالا پروتئین‌های جدیدی نیز بیان می‌شوند (Sobhaniyan et al., 2011). این پروتئین‌های جدید احتمالا نقش سازگاری و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی را ایفا نموده می‌توانند به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرند (Joseph & Jini, 2010). تکنولوژی پروتئومیک ابزاری قدرتمند و مناسب برای بررسی تغییرات بیان و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی به شمار می‌رود (Joseph & Jini, 2010 ; Sobhanian et al., 2011). پروتئومیک یکی از رهیافت‌های مهم برای درک اساس مولکولی تحمل تنش است تا تغییرات القا شده توسط تنش در سطح پروتئین‌ها مورد شناسایی و بررسی قرار گیرد (Barkla et al., 2013). پروتئومیکس به بررسی مجموعه‌ی کامل پروتئین‌ها (پروتئوم) در یک سامانه‌ی زیستی مانند سلول، بافت یا ارگانیسم در یک زمان خاص و تحت شرایط محیطی مشخص می‌پردازد (Scumaci & Cuda, 2019 ؛ Kaur et al., 2021) اصطلاح پروتئوم نخستین بار توسط مارک ویلکینز در سال ۱۹۹۴ در یک سمپوزیوم در ایتالیا، معرفی شد و به‌عنوان مجموعه‌ی کامل پروتئین‌هایی که توسط یک ژنوم بیان می‌شوند تعریف گردید (Deutsch et al., 2019 ؛ Pukala & Chen., 2021). نیاز به علم پروتئومیکس از این درک ناشی شد که اگرچه ژنوم نقشه‌ای از محصولات احتمالی ژنی را فراهم می‌کند، اما ساختاری ایستا دارد و اطلاعاتی درباره‌ی عملکرد، محل قرارگیری و اصلاحات پساترجمه‌ای پروتئین‌ها ارائه نمی‌دهد (Kaur et al., 2021). برخلاف ژنوم، پروتئوم ساختاری پویا دارد و ترکیب آن در پاسخ به محرک‌های فیزیولوژیک یا پاتولوژیک خاص، تغییر می‌کند (Scumaci & Cuda, 2019). در سال‌های اخیر از پروتئومیک برای بررسی بیان متمایز پروتئین‌ها در شرایط تنش خشکی استفاده شده است. پژوهش‌گران با ارزیابی و تجزیه پروتئوم برگ دو ژنوتیپ متحمل و حساس چغندرقند در شرایط آبیاری مطلوب و محدود به این نتیجه رسیدند که از بین حدود ۵۰۰ لکه پروتئینی مشاهده شده در ژل آکریلامید، ۷۹ لکه تغییرات قابل توجهی تحت تنش خشکی نشان دادند. تعداد ۲۰ لکه پروتئینی با استفاده از کروماتوگرافی مایع ، طیف سنجی جرمی

[1] . Chenopodiaceae

مورد بررسی قرار گرفت، که منجر به شناسایی روبیسکو و ۱۱ پروتئین دیگر درگیر در تنظیم ردوکس، تنش اکسیداتیو، انتقال سیگنال و فعالیت‌های حفاظتی شد (Hajheidari et al., 2005). در تحقیقی با بررسی دو واریته متحمل و حساس چغندرقند تحت شرایط عادی و تنش خشکی، ارقام متحمل از نظر میزان نسبی آب برگ، طول ریشه، وزن خشک و سطح ریشه نسبت به رقم حساس برتری داشتند. علاوه بر این، رقم متحمل به خشکی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به رقم حساس، جهت جلوگیری از آسیب گونه‌های فعال اکسیژن [۲] در شرایط تنش خشکی داشت. تجزیه و تحلیل پروتئوم منجر به شناسایی ۲۳ و ۲۷ پروتئین پاسخگو به خشکی به ترتیب در ارقام حساس و متحمل شد. مالات دهیدروژناز، choline monooxygenase و oxygen-evolving enhancer proteins، الگوهای مختلفی بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. در حالی‌که پروتئین S-adenosylmethionine synthase در روندی مشابه بین دو ژنوتیپ بطور یکسان تغییر کرد (Wang et al., 2017). Schneider et al. (2019) مطالعه‌ای با وضوح زمانی بالاتر طراحی کردند تا مکانیسم‌های تنظیمی پاسخ چغندرقند به رخدادهای متناوب تنش خشکی را بررسی کنند. در این پژوهش، گیاهان به مدت ۱۱ روز در معرض خشکی تدریجی یا به مدت ۹ روز تحت تنش خشکی و سپس ۱۴ روز تحت آبیاری تدریجی قرار گرفتند. براساس سنجش‌های فیزیولوژیکی مرتبط با روابط آبی در برگ‌ها و شاخص‌های تنش، محققان مشاهده کردند که در فاصله‌ی روزهای ۹ تا ۱۱، شدت تنش از سطح متوسط به شدید انتقال می‌یابد. تحلیل پروتئوم برگ‌ها نشان داد که تنظیمات پیش‌ساز پروتئینی پیش از بروز تنش شدید آغاز شده و فرآیندهای احتمالی تحمل به تنش فعال می‌شوند. بنابراین با توجه به اهمیت و ارزش گیاه چغندرقند و محدودیت منابع آبی در ایران، اصلاح ژنوتیپ‌های چغندرقند با استفاده از تکنولوژی پروتئومیک نیاز می‌باشد. هدف این تحقیق، شناسایی و تحلیل پروتئین‌های مرتبط با تحمل به خشکی در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند با بهره‌گیری از فناوری پروتئومیکس است تا با درک دقیق مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش، امکان به‌کارگیری این پروتئین‌ها در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام مقاوم به خشکی فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرکز تحقیقات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در ۱۰ کیلومتری شرق تبریز در اراضی کرکج با ۴۶ درجه و ۲۶ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجه و دو دقیقه عرض شمالی و با اقلیم نیمه خشک اجرا گردید. تبریز دارای آب و هوای سرد کوهستانی می‌باشد. این شهرستان در ۴۶ درجه و ۱۶ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجه و پنج دقیقه عرض شمالی و در ارتفاع ۱۳۶۵ متر از سطح دریاهای آزاد واقع شده است. میانگین دما در گرمترین ماه سال (تیر) ۲۵/۴ سلسیوس و میانگین بارندگی ۲۹۰ میلی‌متر می‌باشد. آزمایش بصورت گلدانی (گلدان‌ها به‌صورت لوله‌های پلیکا به طول ۱۲۰ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر برای مطالعه صفات ریشه بودند) در مزرعه بر اساس کرت‌های خرد شده بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با هفت تکرار اجرا شد. فاکتور اصلی

[2] Reactive Oxygen Species

آبیاری و فاکتور فرعی ژنوتیپ‌های چغندر قند بودند. در این پژوهش آبیاری شـــامل دو ســـطح نرمال بعد از ۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشـتک کلاسA و تنش کم‌آبی بعد از ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشـتک (هر روز میزان آب تبخیر شـده از تشـتک اندازه‌گیری می‌شـد) بوده اسـت. هر دو سـطح آبیاری تا اسـتقرار کامل گیاهچه‌ها (چهار برگی) به صـورت عادی آبیاری شـدند و بعد از آن تنش کم‌آبی اعمال شد و تا رسیدگی کامل گیاه ادامه داشت. از آخرین برگ‌های توسعه یافته هر گیاه برای استخراج پروتئین در مرحله برداشت نمونه‌برداری انجام شد و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج پروتئین (Wu et al., 2014) نگه‌داری شد. بخاطر عدم اشتراک لکه‌های شناسایی شده در نرم افزار PDQuest، احتمالا به دلیل زمینه ژنتیکی متفاوت، ترجیح داده شد که مقایسه برای هر ژنوتیپ بصورت جداگانه و بین دو شرایط نرمال و تنش کم‌آبی باشد. الگوی پروتئوم نمونه‌های برگ دو ژنوتیپ متحمل (8001-S1-10) و حساس (8001-S1-6) چغندرقند (Ghasemi et al., 2022) در مقایسه دو سطح نرمال و تنش کم‌آبی با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی در سـه تکرار مورد بررسـی قرار گرفت. تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد (Bradford, 1976) با اسـتفاده از دسـتگاه اسـپکتروفتومتر انجام شـد. ژل‌های لوله‌ای بعد اول (اوره، آب دیونیزه، بافر NP-40، آکریلامید ۳۰ ٪، آمفولین PH 5-8، آمفولین PH 3-10، APS 10% و TEMED) تهیه و سپس به دستگاه منبع تغذیه در سه مرحله متصل شد (ولتاژ۲۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ولتاژ۴۰۰ به مدت ۱۶ ســاعت و ولتاژ۶۰۰ به مدت یک ســاعت). پس از تفکیک در ژل‌های بعد اول، بعد دوم الکتروفورز با تهیه ژل جدا کننده با غلظت ۱۵٪ (آکریلامید، بافر ژل جداکننده PH 8.8، آب دیونیزه، APS 10% و TEMED) و ژل نگهدارنده با غلظت ۵٪ (آکریلامید، بافر ژل نگهدارنده PH 6.8، آب دیونیزه، APS 10% و TEMED) با بافر رانش SDS-PAGE روی بعد دوم دســتگاه الکتروفوز با جریان ثابت ۷۰ میلی‌آمپر قرار گرفت. ژل‌های آکریل آمید با آبی کوماســی (غلظت ۲ گرم در لیتر به مدت۱/۵ ســاعت) رنگ آمیزی و بلافاصــله بعد از رنگ‌زدایی (به مدت ۱۲ الی ۱۶ ســاعت)، تصویربرداری از ژل‌ها با استفاده از اسکنر Bio-Rad GS-800 انجام شد. ژل‌ها با استفاده از نرم افزار PDQuest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند نرم افزار PDQuest کلیه تصــاویر ژل‌ها را به همراه تکرارهای آنها به‌طور هم‌زمان مورد بررســی قرار داده و لکه‌های مشترک بین تکرارها شناسایی و تطبیق داده شد. بررسی تفاوت‌های کمی لکه‌های پروتئینی در تیمارهای مختلف بر اساس شدت نسبی هر لکه به صورت اتوماتیک توسط نرم‌افزار انجام گرفت. به این منظور حجم نقاط (حجم یک نقطه از انتگرال بیشترین شـدت پیکسـل نقطه به مسـاحت آن بر حسـب میلی‌متر مربع به‌دسـت می‌آید) توسـط نرم‌افزار محاسـبه شـد. نتایج در قالب یک فایل Excel ذخیره و آزمون t برای داده‌های کمی هر لکه توسط نرم‌افزار SAS انجام و لکه‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشـخص شدند. با استفاده از ژل مرجع، وزن مولکولی [3] و نقطه ایزوالکتریک [4] هر لکه به دست آمد. روند افزایشی و یا کاهشی بیان آن‌ها در اثر تیمار تنش کم‌آبی بر اسـاس شـاخص فاکتور القا [5] مشـخص شـد. یعنی نقاطی که دارای IF بالاتر یا مسـاوی دو بودند، به عنوان

[3] Molecular Weight
[4] Isoelectric Point
[5] Induction Factor

لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که IFکمتر یا مساوی ۰/۵داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند. شاخص IF بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Hajhedari et al., 2005):

رابطه ۱) $$IF=\frac{\text{درصد حجمی لکه پروتئینی در حالت تنش}}{\text{درصدحجمی لکه پروتئینی در حالت شاهد}}$$

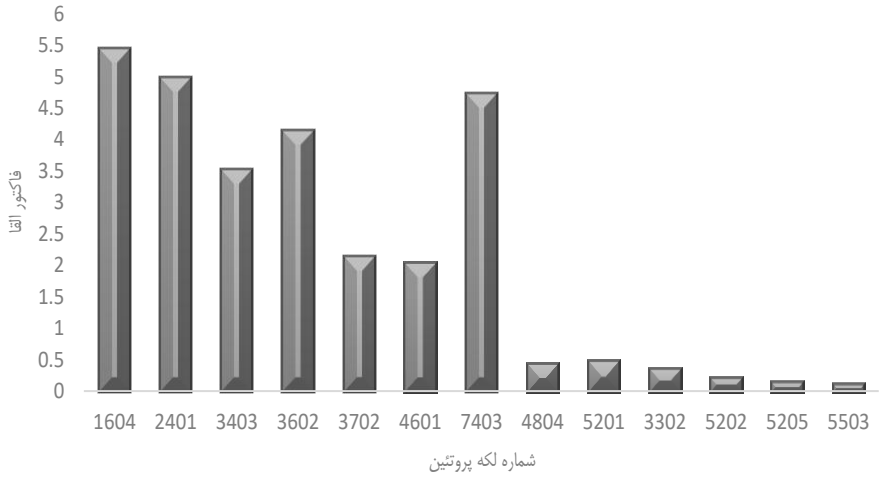
پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی که دارای تغییرات بیان معنی‌داری بیش شرایط عادی و تنش کم آبی بودند، لکه‌ها با استفاده از سرسمپلر، از ژل جدا شده و داخل تیوب‌های ۰/۵میلی‌لیتری حاوی آب دیونیزه قرار داده شدند. نمونه‌ها با استفاده از روش MALDI TOF/TOF MS طیف‌سنجی، در آزمایشگاه پروتئومیک و طیف‌سنجی جرمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران طیف‌سنجی شد. در این روش منبع یونیزه کننده MALDI ولی TOF تحلیل‌گر جرمی است. پروتئین‌ها جداسازی شده از ژل با استفاده از تریپسین هضم و پپتیدهای 2,5-Dihydroxybenzoic یا α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid حاصل با یک ماتریکس مانند مخلوط شدند. ماتریکس‌های ترکیبی با جرم مولکولی کم هستند که با تشکیل کریستال‌هایی اشعه ماورای بنفش را جذب می‌کنند و در طی فرایندی پروتئین آزاد می‌کنند (Patterson, 2004) ترکیبات ماتریکس دارای پپتید، روی صفحه فلزی داغ خشک شده و سپس داخل محفظه خلاء طیف‌سنجی جرمی قرار داده شدند. هنگامی که ولتاژ بالا به محفظه خلاء اعمال شد، مولکول‌های ماتریکس انرژی جذب کرده و همراه با پپتیدها به سمت فاز گازی حرکت می‌کنند. یون‌های تولید شده به تحلیل‌گر جرمی تحویل و این تحلیل‌گر با استفاده از زمان سپری شده (TOF) برای عبور یون از منطقه رانش، جرم مولکول‌های باردار را محاسبه کرد. با استفاده از زمان ثبت شده برای یون‌های مختلف نسبت جرم به بار قطعات پپتیدی محاسبه شد (Westermeier, 2016). خروجی حاصل از دستگاه طیف سنج جرمی به نرم افزار Mascot ارائه و بر اساس انطباق نسبت‌های جرم به بار پپتیدهای حاصل از برش آنزیمی با تریپسین و توالی‌های پروتئینی موجود در بانک اطلاعات Swiss-Prot، لکه‌های پروتئینی مجهول شناسایی شدند.

نتایج و بحث

انجام الکتروفورز دو بعدی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی با ژل لوله‌ای و رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی و در نهایت با کمی کردن لکه‌های پروتئینی توسط نرم افزار PDQuest، موجب به وجود آمدن ۸۵ عدد لکه پروتئینی تکرار پذیر در ژنوتیپ متحمل در مقایسه سطح نرمال با تنش کم‌آبی گردید. بر اساس شاخص فاکتور القا تعداد ۲۳ لکه پروتئینی تغییر بیان قابل ملاحظه‌ای نشان دادند که از این تعداد ۱۴ لکه دارای افزایش بیان و ۹ لکه دارای کاهش بیان بودند. به منظور بررسی تفاوت معنی دار بین لکه‌های دارای تغییر بیان در دو سطح آبیاری نرمال و تنش کم‌آبی آزمون T-tset انجام گرفت. بر اساس آزمون T-tset تعداد ۹ لکه دارای تغییرات معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد بودند (شکل ۱) که از این تعداد ۷ لکه (۷۴۰۳، ۲۴۰۱، ۳۴۰۳، ۳۶۰۲، ۱۶۰۴، ۴۶۰۱ و ۳۷۰۲) با افزایش بیان و ۲ لکه (۴۸۰۴ و ۵۲۰۱) با کاهش بیان معنی‌داری همراه بودند (شکل‌های ۳ و ۴). در مقایسه تغییرات الگوی بیان

پروتئین دو سطح آبیاری در ژنوتیپ حساس ۵۷ عدد لکه پروتئینی تکرارپذیر به دست آمد. بر اساس فاکتور القا (IF) تعداد ۲۹ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار قابل ملاحظه ای بودند که از این تعداد ۱۲ لکه دارای افزایش بیان و ۱۷ لکه دارای کاهش بیان بودند. بر اساس آزمون T-test چهار عدد لکه پروتئینی تغییر بیان معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد داشتند (شکل ۱). هر چهار لکه پروتئینی (لکه‌های ۳۳۰۲، ۵۲۰۲، ۵۲۰۵ و ۵۵۰۳) دارای کاهش بیان معنی‌دار در سطح تنش کم‌آبی بودند (شکل‌های ۵ و ۶). پروتئین‌های شناسایی شده شامل پروتئی‌های درگیر در فتوسنتز، متابولیسم و تولید انرژی، سم‌زدا، تاشدگی و تخریب و تنش و دفاع بودند (جدول ۱). Wang et al. (2017) با بررسی الگوی پروتئینی برگ دو ژنوتیپ مختلف چغندرقند تحت تنش کم‌آبی اذعان داشتند که ۲۳ لکه در ژنوتیپ حساس و ۲۷ لکه در ژنوتیپ متحمل دارای تغییرات بیان معنی‌داری بودند، که در ۹ گروه عملکردی طبقه‌بندی شدند. به‌منظور بررسی پاسخ کلزا به تنش کم‌آبی، تغییرات در الگوی پروتئین ریشه لاین‌های حساس به خشکی (RGS-003) و مقاوم به خشکی (SLM-003) و هیبرید F1 آنها با استفاده از تجزیه پروتئومیکس مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد در لاین حساس کلزا، ۳۵ لکه پروتئینی و در لاین متحمل، ۳۲ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار تحت تنش کم‌آبی بودند (Mohammadi et al., 2012).

در تحقیق دیگری پروتئین های برگ دو ژنوتیپ چغندرقند با الکتروفورز ژل دو بعدی تحت تنش کم‌آبی مورد مطالعه قرار گرفت و به صورت کمی آنالیز گردید که بیش از ۵۰۰ لکه پروتئینی شناسایی شد که ۷۹ لکه تغییرات معنی داری را در سطح تنش کم‌آبی نشان دادند (Hajheidari et al., 2005). پروتئین‌های شناسایی شده و دارای تغییرات بیان معنی‌دار در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس چغندرقند از نظر عملکرد بیولوژیکی به پنج گروه شامل: پروتئین‌های فتوسنتزی (۴۶/۱۵ درصد)، پروتئین‌های درگیر در تولید انرژی و متابولیسم (۳۰/۷۷ درصد)، پروتئین‌های تخریبی (۷/۷ درصد)، پروتئین‌های درگیر در تنش و دفاع (۷/۷ درصد) و پروتئین‌های سم‌زدا یا مهارکننده ROS (۷/۷ درصد) تقسیم شدند (شکل ۳). که نتایج نشان داد بیشترین درصد لکه‌های پروتئینی مربوط به پروتئین‌های فتوسنتزی و متابولیسم بودند. مطابق با نتایج این تحقیق در مطالعه Wang et al. (2017) نیز در ژنوتیپ مقاوم به خشکی چغندرقند (T510)، پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم (۴۰٪) و فتوسنتز (۲۳٪) اکثر پروتئین‌های طبقه‌بندی شده را تشکیل دادند. لکه‌های شماره ۳۴۰۳، ۳۶۰۲، ۴۸۰۴ و ۵۲۰۱ مربوط به پروتئین‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ متحمل می‌باشند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۱. کاهش و افزایش بیان لکه‌های پروتئینی بر اساس فاکتور القا در ژنوتیپ متحمل و حساس چغندرقند تحت تنش کم‌آبی (۹ لکه در ژنوتیپ متحمل و ٤ لکه در ژنوتیپ حساس)

Figure 1. Induction factor (IF)–dependent up- and down-regulation of protein spot intensities in drought-tolerant and drought-sensitive sugar beet genotypes under water-deficit stress (tolerant genotype: 9 spots; sensitive genotype: 4 spots).

لکه ۳۴۰۳ مربوط به آنزیم روبیسکو اکتیواز [6]می‌باشد که در اثر تنش کم‌آبی با افزایش بیان معنی‌دار همراه بوده است. ریبولوز–۱،۵–بی فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز اکتیواز ، آنزیمی است که در چرخه کالوین فتوسنتز اولین مرحله تثبیت CO_2 را در گیاهان، جلبک ها و باکتری های فتوسنتزی کاتالیز می‌کند (Dinh et al., 2019). تنش خشکی معمولاً منجر به کاهش فعالیت فتوسنتزی، کاهش تولید انرژی و بی نظمی متابولیسم انرژی می‌شود (Kang et al., 2012). کاهش فتوسنتز مربوط به بسته شدن روزنه و اختلال در فعالیت روبیسکو می‌باشد. (Chen & Murata, 2008). افزایش بیان روبیسکو اکتیواز [7]در چغندرقند تحت تنش خشکی، نقش محوری در حفظ کارایی فتوسنتزی و تثبیت کربن ایفا می‌کند. این امر از طریق فعال‌سازی مجدد روبیسکو، کاهش اثرات اکسیداتیو، تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی و ارتقای بهره‌وری مصرف آب محقق می‌شود. این پاسخ چندلایه، نه‌تنها مقاومت آنی گیاه را در برابر خشکی افزایش می‌دهد، بلکه با ایجاد حافظه تنش، بازیابی سریع و عملکرد بهتر گیاه را در شرایط خشکی مکرر تضمین می‌نماید (Kambona et al., 2022). لکه ۳۶۰۲ مربوط به پروتئین فسفریبولوکیناز [8]بوده است که این پروتئین نیز در اثر تنش کم‌آبی با افزایش بیان معنی‌دار همراه بوده است. فسفریبولوکیناز یک آنزیم مهم در چرخه کالوین برای

[6] Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
[7] Rubisco Activase
[8] Phosphoribulokinase

جذب CO_2 است که فسفریلاسیون ریبولوز-۵-فسفات به ریبولوز-۵،۱-بیس فسفات را کاتالیز می کند (shi et al., 2014). افزایش بیان فسفریبولوکیناز باعث حفظ فعالیت روبیسکو تحت تنش کم‌آبی در ژنوتیپ متحمل چغندرقند شده است. هم‌راستا با نتایج این تحقیق .Khodadadi et al (2017) با بررسی الگوی تغییر بیان پروتئین‌ها در اثر تنش خشکی بر روی رازیانه افزایش بیان آنزیم فسفریبولوکیناز را در ژنوتیپ متحمل به تنش کم‌آبی گزارش کردند. همچنین در تحقیق دیگری نیز در بررسی الگوی پروتئوم برگ گندم بهاره نیز افزایش بیان آنزیم فسفریبولوکیناز تحت تنش کم‌آبی گزارش شده است (Michaletti et al., 2018). دو لکه ۴۸۰۴ و ۵۲۰۱ به ترتیب مربوط به پروتئین (4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase) و کربنیک انیدراز[9] می‌باشد که در اثر تنش کم‌آبی با کاهش بیان معنی‌دار در ژنوتیپ متحمل همراه بودند. در تحقیقی با بررسی تاثیر تنش شوری بر الگوی پروتئین برگ دو ژنوتیپ چغندرقند (S210 و T510) کاهش بیان IsPG گزارش شده است (Wang et al., 2019). بر اساس مطالعات انجام شده انتظار می‌رود که گیاهان تحت تنش کم‌آبی، به دلیل کاهش سطح فعالیت فتوسنتزی و کاهش جذب نیتروژن از خاک، فعالیت‌های متابولیکی خود را کاهش دهند. مطابق با نتایج این پژوهش میزان پروتئین IsPG دارای کاهش بیان بوده است (Lima et al., 2019 ؛Wang et al., 2016). هم‌راستا با نتایج این تحقیق Ghosh et al. (2016) در بررسی الگوی بیان پروتئین‌های اسفناج (*Beta vulgaris var*. all green) کاهش بیان معنی‌دار پروتئین Carbonic anhydrase را گزارش کردند. پروتئین دیگری که در فتوسنتز نقش دارد، کربنیک انیدراز است. این پروتئین در تثبیت CO_2 نقش دارد (Tripp et al.,2001). کربنیک انیدراز در اوایل مسیر سیگنال‌دهی CO_2، که تبادل گاز بین گیاهان و اتمسفر را کنترل می‌کند، عمل می‌کنند. به این منظور که کربنیک انیدراز احتمالا در کنترل باز و بسته شدن روزنه‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. کربنیک انیدرازها شامل سه ایزوفرم مختلف: α، β و γ می‌باشند که نوع بتا اولین بار در گیاهان کشف شده است. مطالعات نشان داده است که کربنیک انیدراز مشابه شناسایی شده در نقاط مختلف می‌تواند به حضور ایزوفرم‌های مختلف مرتبط باشد، که نشان می‌دهد ایزوفرم‌های کربنیک انیدراز ممکن است نقش‌های هم‌پوشانی پیچیده‌ای در طول تنش خشکی داشته باشند. کربنیک انیدرازها در بیشتر بخش‌های درون سلولی مانند کلروپلاست، میتوکندری، غشای پلاسمایی و سیتوپلاسم حضور دارند (DiMario et al., 2017 ؛ Zadražnik *et al*., 2013). در مطالعه‌ای با بررسی میزان بیان پروتئین کربونیک انیدراز در دو رقم حساس لوبیا، نتایج حاکی از آن بود که تحت تنش کم‌آبی میزان بیان این پروتئین در هر دو رقم حساس به تنش کم‌آبی با افزایش بیان همراه بوده است (Zadražnik et al., 2013). با توجه به اینکه ژنوتیپ متحمل به تنش کم‌آبی می‌باشد، بنابراین کاهش بیان کربونیک انیدراز در این تحقیق با نتایج مطالعه ذکر شده در فوق هم‌راستا می‌باشد. کاهش بیان CA و IspG در ژنوتیپ‌های مقاوم با کاهش فعالیت فتوسنتزی و صرفه‌جویی در مصرف انرژی هم‌جهت است. با بسته شدن روزنه‌ها برای جلوگیری از دست رفتن آب، ورود CO_2 به برگ کاهش می‌یابد؛ در این شرایط فعالیت آنزیم CA که به تأمین CO_2 مورد نیاز روبیسکو کمک می‌کند ضروری

[9] Carbonic anhydrase

نیست، لذا بیان آن کاهش می‌یابد (Egea et al., 2018 ؛ Wang et al., 2016). آنزیم IspG یکی از مراحل پایانی مسیر متیل اریتریتول فسفات [10]در کلروپلاست است که باعث تولید پیش‌ماده‌های ایزوپرنوئیدی[11] می‌شود (مانند پیش‌سازهای کلروفیل، کاروتنوئید و هورمون ABA) و برای عملکرد طبیعی فتوسنتز ضروری است. کاهش فعالیت مسیر MEP با محدود کردن تولید ایزوپرنوئیدهای مشتق از فتوسنتز، مصرف NADPH و ATP را کاهش می‌دهد. این کاهش فعالیت متابولیکی به گیاه اجازه می‌دهد انرژی و منابع کربن خود را برای واکنش‌های حیاتی نگه داشته و از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری کند (Dong et al., 2021). لکه ۴۶۰۱ مربوط به پروتئین‌های سم‌زاد یا مهار کننده در ژنوتیپ متحمل می‌باشد که مربوط به پروتئین کاتالاز ۲[12] است. این پروتئین در اثر تنش کم‌آبی با افزایش بیان معنی‌دار همراه بوده است. هم‌راستا با نتایج این پژوهش با بررسی پروتئوم سه رقم مختلف گندم تحت تنش کم‌آبی گزارش کردند که میزان کاتالاز افزایش بیان معنی‌داری داشته است (Ford et al., 2011). کاتالاز ۲ یک آنزیم تترامریک حاوی گروه هِم است که عمدتاً در پراکسی‌زوم‌ها قرار دارد و واکنش تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (Kumar et al., 2023).

این فعالیت آنزیمی به‌ویژه در شرایط خشکی شدید، که گیاه با فشار اکسیداتیو بالاتری مواجه می‌شود، اهمیت حیاتی دارد (Sofo et al., 2015 ؛ Laxa et al., 2019). کاتالاز ۲ به‌عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، نقش مهمی در جلوگیری از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند؛ ترکیباتی که می‌توانند به اجزای حیاتی سلولی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برسانند (Ullah et al., 2025). لکه‌های ۱۶۰۴ و ۲۴۰۱ مربوط به پروتئین‌های درگیر در تولید انرژی و متابولیسم بوده و به ترتیب شامل هگزوکیناز[13] و گلوتامین سنتتاز۲ [14]می‌باشند که در ژنوتیپ متحمل با افزایش بیان معنی‌دار در اثر تنش کم‌آبی همراه بودند (شکل‌های ۳ و ۴). هگزوکیناز گلوکز را برای سنتز نشاسته فسفریله می‌کند، بنابراین واکنش‌های کاتالیز شده توسط هگزوکینازها منجر به ورود قندهای ۶ کربنه به مسیر گلیکولیتیک می‌شوند. انتظار می‌رود فعالیت‌های هگزوکینازها برای سطوح سلولی گلوکز حیاتی باشد (Xue et al., 2008). هم‌راستا با نتایج این تحقیق در مطالعه تاثیر تنش شوری بر دو ژنوتیپ مختلف چغندرقند گزارش شده است که میزان بیان هگزوکیناز تحت تنش شوری دارای افزایش معنی‌دار بوده است (Wang et al., 2019). آنزیم گلوتامین سنتتاز نقش مهمی در متابولیسم نیتروژن دارد و به عوان یک شاخص مهم در تعیین تخمل به تنش کم‌آبی پیشنهاد شده است (Nagy et al., 2013). گیاهان برای حفظ فشار اسمزی پایدار و محافظت از ماکرومولکول ها در برابر تخریب از مکانیسم‌های مختلفی استفاده می‌کنند (Guo et al., 2010) که یکی از این مکانیسم‌ها تجمع املاح آلی را می‌باشد. گلوتامین سنتتاز ۲ نقش کلیدی در متابولیسم نیتروژن ایفا می‌کند، که مسئول جذب آمونیوم و تبدیل به

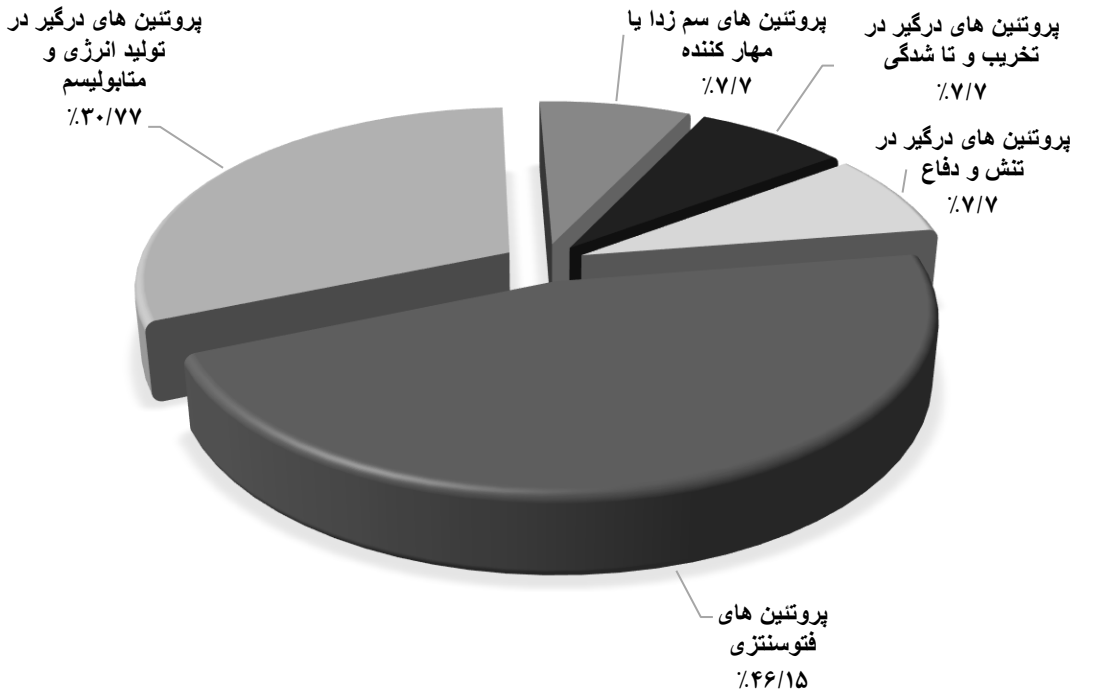
[10] Methylerthritol Phosphate Pathway
[11] Isoprenoids
[12] Catalase2
[13] Hexokinase
[14] Glutamine synthetase 2

گلوتامین اســـت و افزایش فعالیت گلوتامین ســـنتتاز۲ جذب نیتروژن و ازت را افزایش می دهد (Gadaleta et al., 2011). در تحقیقی با بررسی پروتئین گلوتامین سنتتاز تحت شرایط تنش کم‌آبی بر روی گندم، کاهش فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در پاسخ به تنش کم‌آبی در رقم حساس گندم گزارش شده است در حالیکه در رقم متحمل گندم هیچ‌گونه تغییری مشاهده نشد. در این تحقیق از میزان بیان پروتئین گلوتامین سنتتاز ۲ به عنوان شاخص مهم برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش کم‌آبی عنوان شده است (Nagy et al., 2013). لکه ۳۷۰۲ مربوط به پروتئین‌های تخریب و تاشدگی بوده است که شامل پروتئین شوک حرارتی ۷۰ [15] می‌باشد (شکل‌های ۳ و ۴). این پروتئین نیز در اثر تنش کم‌آبی در ژنوتیپ متحمل دارای افزایش بیان معنی‌دار بوده است. ساختار حفاظت شده آن‌ها نشانگر نقش اساسی آن‌ها در فرآیندهای سلولی است و در سلول‌هایی که در معرض شوک حرارتی کشنده هستند، القا می‌شوند. مطالعات نشان داده است که افزایش بیان HSP ها در سلول و بافت‌های کشت شده نقش محافظتی دارد این حفاظت احتمالا به‌واسطه ظرفیت HSP ها برای عملکرد به عنوان چاپرون‌های مولکولی برای جلوگیری از تجمع نامناسب پروتئین و کمک به تخریب و تعمیر نهایی اســت (Multhoff, 2007). در تحقیقی نهال‌های ســویا با رویکرد پروتئومیکس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، نتایج حاکی از آن بود که هم‌راســتا با نتایج این تحقیق پروتئین شــوک حرارتی در اثر تنش کم‌آبی با افزایش بیان معنی‌دار همراه بوده است (Mohammadi et al., 2012). لکه ۷۴۰۳ مربوط به پروتئین‌های درگیر در تنش و دفاع بوده است و شامل پروتئین مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز۵ [16]می‌باشد که این پروتئین نیز در اثر تنش کم‌آبی درژنوتیپ متحمل با افزایش بیان معنی‌دار همراه بوده است (شکل‌های ۳ و ۴). هم‌راستا با نتایج این پژوهش در تحقیقی با بررسی پروتئومیکس ژنوتیپ مونوســـومیک چغندرقند M14 تحت تنش شـــوری به این نتیجه رســـیدند که میزان پروتئین monodehydroascorbate reductase 5 در بافت‌های برگ و ریشـــه چغندرقند تحت تنش شـــوری افزایش بیان معنی‌داری دارد (Li et al., 2015). آسکوربات (AsA) یک آنتی‌اکسیدان اصلی و حذف کننده رادیکال‌های آزاد در گیاهان است. به‌عنوان یک دهنده الکترون برای سم‌زدایی H_2O_2 از طریق APX در سلول‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز برای بازسازی AsA بسیار مهم است (Halliwell & Gutteridge, 2015). عملکرد حفاظتی آنزیم مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز در گیاه چغندرقند، آن را به گزینه‌ای امیدبخش برای مهندسی ژنتیک با هدف بهبود تحمل تنش در محصولات زراعی تبدیل کرده است. توانایی این آنزیم در تقویت چرخه آسکوربات–گلوتاتیون و کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن نشان می‌دهد که می‌توان از این آنزیم به‌عنوان هدفی مؤثر در تولید ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر به تنش‌های محیطی در چغندرقند بهره گرفت (Yolcu et al., 2021). لکه‌های ۵۲۰۲ و ۵۲۰۵ مربوط به پروتئین‌های درگیر در فتوســـنتز بوده و به ترتیب شـــامل پروتئین oxygen-evolving enhancer protein 1 و oxygen-evolving enhancer protein 2 می‌باشـــند که در اثر تنش کم‌آبی با کاهش بیان معنی‌دار در ژنوتیپ حساس همراه بودند (شکل‌های ۵ و ۶). تجزیه نوری آب در oxygen-evolving complex (OEC) اتفاق

[15] Heat shock protein 70
[16] Monodehydroascorbate reductase 5

می‌افتد. OEC از چهار یون منگنز، یون کلسیم و احتمالا یون کلرید تشکیل شده است که به پروتئین‌های خارجی متصل می‌شوند (McEvoy & Brudvig, 2006). پروتئین‌های OEC فتوسیستم IIدر حفظ یون‌های کلسیم و کلرید به‌عنوان دو عامل مهم در واکنش تجزیه آب نقش دارند (Ifuku et al., 2005). اعتقاد بر این اســت که پروتئین oxygen evolving enhancing protein دارای عملکرد دوگانه می‌باشد: اول گروه‌های یون منگنز را در تجزیه نوری آب تنظیم می‌کند و دوم از آسیب رادیکال‌های اکسیژن به پروتئین‌های فتوسیستم II جلوگیری می‌کند (Heide et al., 2004). محققین با بررسی الگوی بیان پروتئین‌های برگ، ساقه و ریشه روی دو ژنوتیپ متحمل و حساس نیشکر تحت تنش کم‌آبی گزارش کردند که پروتئین oxygen-evolving enhancer protein 1 و oxygen-evolving enhancer protein 2 در ژنوتیپ محتمل افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان معنی‌دار داشته است (Khueychai et al., 2015). لکه‌های ۳۳۰۲ و ۵۵۰۳ مربوط به پروتئین‌های درگیر در تولید انرژی و متابولیســم بودند که به ترتیب شــامل Malate dehydrogenase و Choline monooxygenase می‌باشــند (شکل‌های ۵ و ۶). این پروتئین‌ها در اثر تنش کم‌آبی با کاهش بیان معنی‌دار در ژنوتیپ حساس همراه بودند (جدول ۱). Kausar et al. (2013) در مطالعه‌ای بر روی گیاه جو تحت تنش کم‌آبی بیان داشتند که مالات دهیدروژناز آنزیم مهم متابولیسم سلولی است و تبدیل اگزالواستات و مالات را کاتالیز می‌کند. همچنین افزایش سطح مالات دهیدروژناز در ژنوتیپ جو متحمل نشان دهنده نقش آن در سازگاری با تنش کم‌آبی در این مطالعه است. مطابق با نتایج این تحقیق میزان پروتئین مالات دهیدروژناز در ژنوتیپ حساس با کاهش معنی‌دار همراه بوده است. در تحقیقی دیگر با بررسی تغییرات الگوی بیان پروتئین یونجه تحت شرایط شوری و خشکی (PEG) میزان پروتئین مالات دهیدروژناز در شرایط تنش‌زا با کاهش معنی‌دار همراه بوده است (Ma et al., 2017). پروتئین Choline monooxygenase, chloroplastic در ژنوتیپ حساس تحت تنش کم‌آبی دچار کاهش بیان معنی‌دار شده است. گلایسن بتائین یک ترکیب شیمیایی است که در مواقع تنش برای تحمل بیشتر گیاه در برابر تنش تولید و تجمع می‌یابد. تولید گلایسین بتائین از مسیر ساده دو مرحله‌ای سنتز می‌شود. که در گیاهان عالی مخصوصا خانواده Chenopediaceae تبدیل Cholin به گلایســین بتائین در کلروپلاســت رخ می‌دهد. مرحله اول این تبدیل توســط آنزیم Choline monooxygenase انجام می‌شود. این پروتئین یک آنزیم استرومایی وابسته به فرودوکسین می‌باشد (Wani et al., 2013). Wang et al. (2017) با بررســی الگوی پروتئینی دو ژنوتیپ حســاس و متحمل چغندرقند تحت تنش کم‌آبی بیان داشــت که پروتئین Choline monooxygenase در ژنوتیپ متحمل دارای افزایش و ژنوتیپ حساس دارای کاهش بیان معنی‌دار بودند. در بررسی‌های انجام شده برای تغییر بیان این پروتئین نشان داده که تحت شرایط تنش شوری دارای افزایش بیان معنی‌دار بوده است (Askari et al., 2006). در تحقیقی دیگر با بررسی تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های گیاه سالیکورنیا تحت تنش شوری بیان داشتند که در اثر تنش شوری میزان پروتئین Choline monooxygenase دارای افزایش بیان معنی‌دار بوده است (Wang et al., 2009). Katam et al. (2016) با تحقیق بر روی الگوی بیان پروتئین‌های گیاه بادام زمینی تحت تنش کم‌آبی گزارش کردند که پروتئین

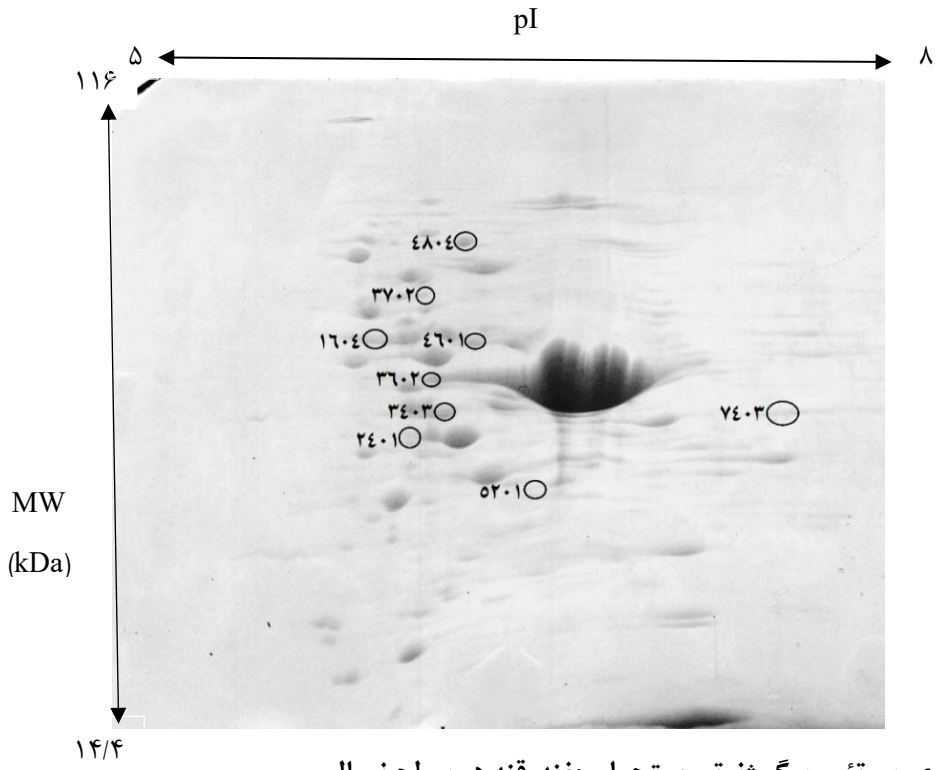
Choline monooxygenase در اثر تنش کم‌آبی در ژنوتیپ متحمل دچار افزایش بیان و همچنین ژنوتیپ حســـاس دارای کاهش بیان معنی‌دار بودند.



شکل ۲. طبقه‌بندی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان بر اساس عملکرد

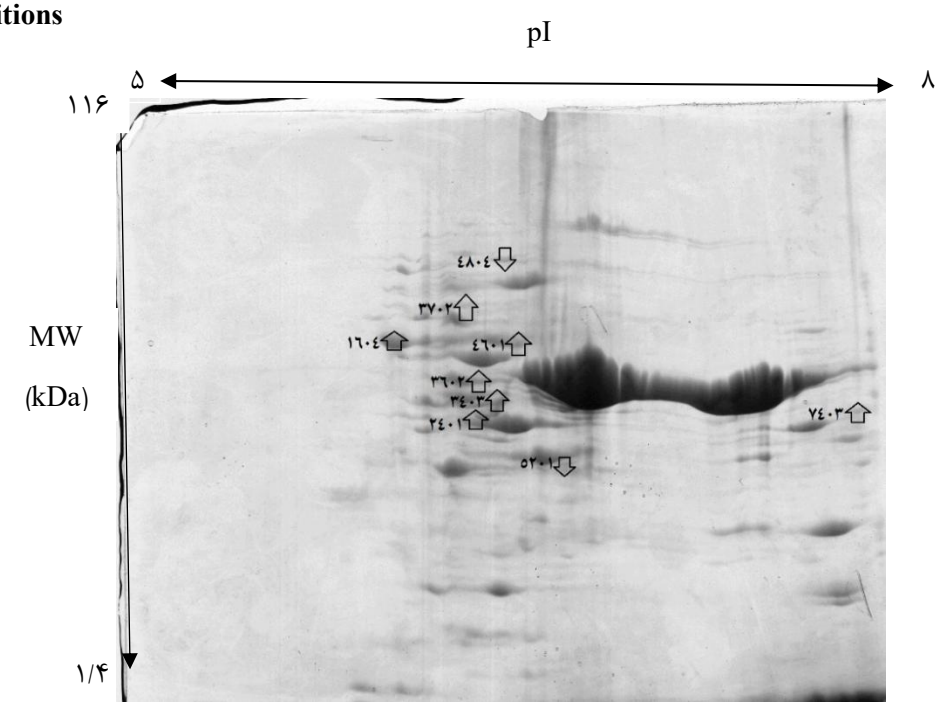
Figure 2. Classification of differentially expressed proteins based on function

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر با رویکرد پروتئومیکس مقایسه‌ای بین دو سطح آبیاری نرمال و تنش کم‌آبی در دو ژنوتیپ متحمل و حساس، درک عمیقی از پاسخ‌های مولکولی چغندرقند به تنش کم‌آبی در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس ارائه می‌دهد. نتایج حاصل از تحلیل تغییرات بیان پروتئین‌ها نشان داد که سازوکار تحمل به خشکی در ژنوتیپ متحمل، پاسخی چندلایه و سازمان‌یافته شامل حفظ عملکرد فتوسنتز، تنظیم متابولیسم انرژی، سم‌زدایی مؤثرROS و تنظیم اسمزی است. پروتئین‌های گروه‌های مختلف عملکردی، به‌ویژه آن‌هایی که در فتوسنتز، متابولیسم و دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارند، بیشترین تغییرات بیان را نشان دادند. افزایش بیان آنزیم‌هایی مانند روبیسکو اکتیواز، فسفریبولوکیناز و کاتالاز ۲ در ژنوتیپ متحمل، حاکی از نقش کلیدی آن‌ها در حفظ کارایی فتوسنتزی و خنثی‌سازی تنش اکسیداتیو بود. همچنین افزایش بیان هگزوکیناز و گلوتامین سنتتاز ۲ بیانگر تلاش گیاه برای تأمین انرژی و حفظ تعادل نیتروژن در شرایط کم‌آبی است.



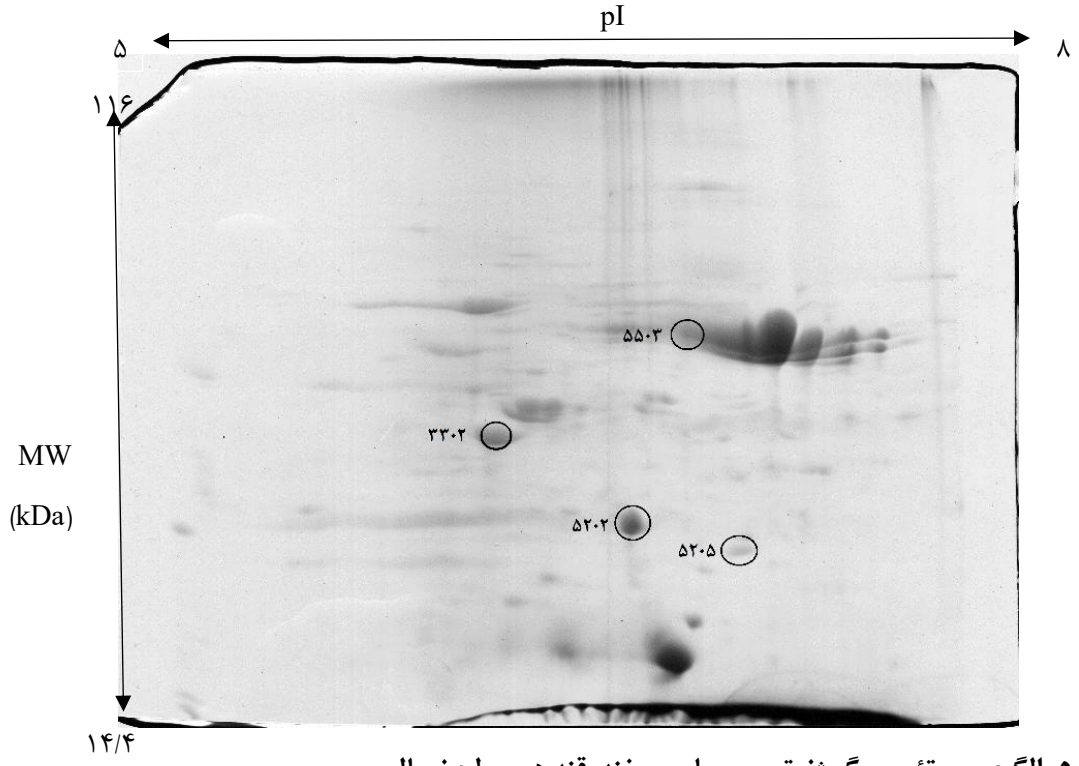
شکل ۳. الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ متحمل چغندرقند در سطح نرمال

Figure 3. Leaf proteome pattern of the tolerant sugar beet genotype under normal conditions



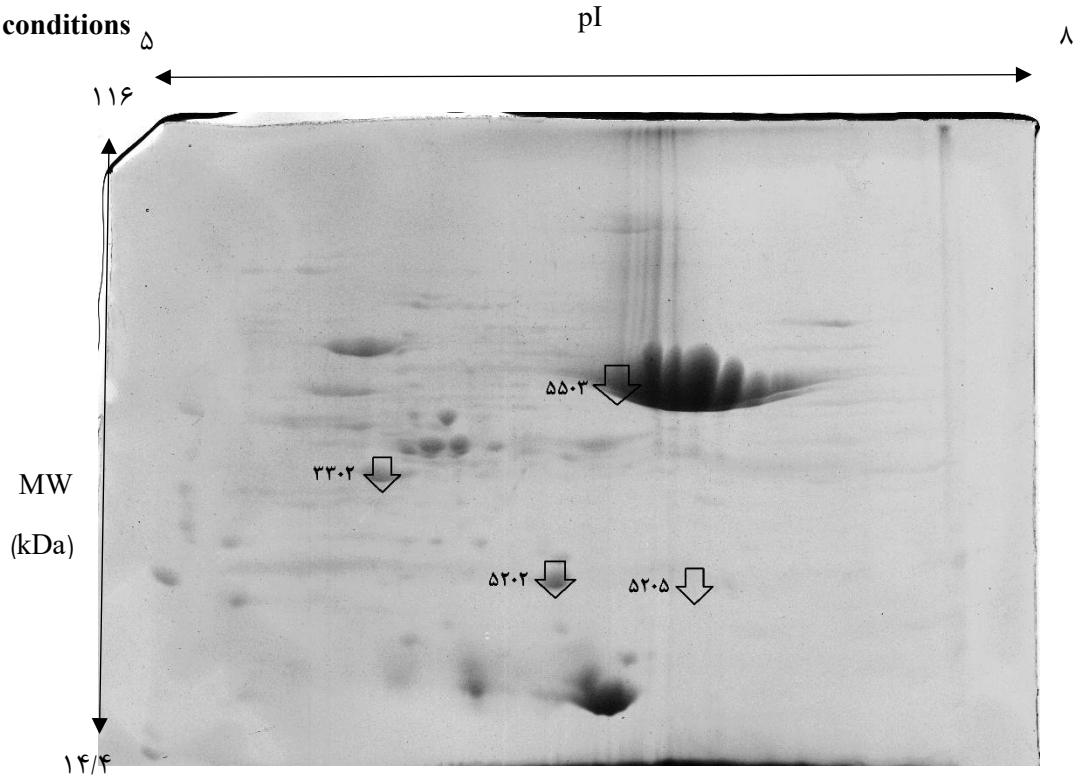
شکل ٤. الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ متحمل چغندرقند در سطح تنش کم‌آبی

Figure 4. Leaf proteome pattern of the tolerant sugar beet genotype under water deficit stress



شکل ۵. الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ حساس چغندرقند در سطح نرمال

Figure 5. Proteome pattern of the leaf of a sensitive sugar beet genotype under normal conditions



شکل ٦. الگوی پروتئوم برگ ژنوتیپ حساس چغندرقند در سطح تنش کم‌آبی

Figure 6. Proteome pattern of the leaf of a sensitive sugar beet genotype under drought stress conditions

جدول ۱. مشخصات لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس چغندرقند تحت تنش کم‌آبی

Table 1. Characteristics of protein spots with altered expression in drought-tolerant and sensitive sugar beet genotypes under drought stress conditions

تغییر بیان Gene expression change	آزمایشی experimental		تئوری Theory		شماره دسترسی accession No	گونه مرجع reference organism	نام پروتئین protein name	کد لکه Spot No	گروه عملکردی functional group
	pI	MW	[۱۸]pI	[۱۷]MW					
3.52 افزایش up	6.50	47.04	6.56	47.93	EMS61907	*Triticum urartu*	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	3403	پروتیئن‌های فتوسنتزی Photosynthetic proteins
4.14 افزایش up	6.47	53.13	6.28	45.2	A0A0J8CH28	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	Phosphoribulokinase	3602	
0.45 کاهش down	6.54	87.75	6.14	82.56	A0A0J8BQ23	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate (synthase (IsPG	4804	
0.48 کاهش down	6.74	34.48	5.93	32.3	A0A0J8B744	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	Carbonic anhydrase	5201	
0.22 کاهش down	6.45	27.27	6.34	26.6	A0A0K9RJ24	*Spinacia oleracea*	oxygen-evolving enhancer protein 1	5202	
0.15 کاهش down	6.88	25.99	6.96	27.8	A0A0K9RJ56	*Spinacia oleracea*	oxygen-evolving enhancer protein 2	5205	
2.03 افزایش up	6.78	60.58	7.15	67.35	P25819	*Arabidopsis thaliana*	Catalase-2	4601	پروتئین‌های سم‌زدا یا مهارکننده Detoxifying or inhibitory proteins

Up: up-regulation

Down: down-regulation

از سوی دیگر، کاهش هدفمند بیان برخی پروتئین‌ها مانند کربنیک انیدراز و IspG در ژنوتیپ مقاوم، حاکی از یک استراتژی بهینه برای کاهش مصرف انرژی و محدود کردن آسیب‌های ناشی از ROS است. به طور خاص، بیان بیشتر پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP70) و مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز ۵ در ژنوتیپ متحمل، اهمیت مکانیسم‌های محافظتی در سطوح پروتئینی برای حفظ پایداری ساختاری و کاهش آسیب اکسیداتیو را نشان می‌دهد. در مقابل، کاهش بیان پروتئین‌های مهم فتوسیستم مانند

[17]. Molecular Weight
[18]. Isoelectric Point

oxygen-evolving enhancer proteinsدر ژنوتیپ حساس، ضعف در حفظ عملکرد فتوسنتزی و آسیب‌پذیری بیشتر را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۱

Continuation of Table 1

گروه عملکردی functional group	کد لکه Spot No	نام پروتئین protein name	گونه مرجع reference organism	شماره دسترسی accession No	تئوری Theory		آزمایشی experimental		تغییر بیان Gene expression change
					MW	pI	MW	pI	
	1604	Hexokinase	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	A0A0J8BT88	53.78	5.9	62.24	6.05	5.44 افزایش up
پروتئین‌های درگیر در تولید انرژی و متابولیسم Energy metabolism proteins	2401	Glutamine synthetase 2	*Spinacia oleracea*	ABL89188	47.9	5.73	43.25	6.41	4.98 افزایش up
	3302	Malate dehydrogenase	*Beta vulgaris subsp. vulgaris*	A0A0J8BJ08	41.16	6.06	40.53	5.85	0.36 کاهش down
	5503	Choline monooxygenase, chloroplastic	*Beta vulgaris (*Sugar beet*)*	O22553	50.2	6.02	56.23	6.6	0.11 کاهش down
پروتئین‌های درگیر در تخریب و تا شدگی Protein Folding and Degradation	3702	Heat shock protein 70	*Spinacia oleracea*	A0A1I9TK81	72.5	5.54	72.8	6.38	2.13 افزایش up
پروتئین‌های درگیر در تنش و دفاع Stress and defense proteins	7403	Monodehydro ascorbate reductase 5	*Beta vulgaris subsp. Vulgaris*	A0A0J8F7Z1	53.66	7.59	45.97	7.73	4.73 افزایش up

Up: up-regulation

Down: down-regulation

این نتایج به‌خوبی بیانگر این نکته است که تحمل به خشکی در چغندرقند نه‌تنها وابسته به افزایش بیان برخی پروتئین‌ها، بلکه مبتنی بر تنظیم دقیق شبکه‌ای از مسیرهای زیستی است که از طریق تنظیم تعادل بین تولید و مصرف انرژی، محافظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و حفظ کارایی فتوسنتزی، امکان بقاء و عملکرد پایدار در شرایط نامطلوب را فراهم می‌کنند. بنابراین، شناسایی این پروتئین‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی می‌تواند ابزار قدرتمندی برای غربالگری ژنوتیپ‌های متحمل و نیز هدفی برای برنامه‌های مهندسی ژنتیک و اصلاح گیاهان مقاوم به خشکی در چغندرقند و سایر محصولات زراعی باشد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به دلیل همکاری و حمایت از انجام این پژوهش صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

Afsari, R., Nazari-Sharabian, M., Hosseini, A., & Karakouzian, M. (2024). A CMIP6 Multi-Model Analysis of the Impact of Climate Change on Severe Meteorological Droughts through Multiple Drought Indices Case Study of Iran's Metropolises. *Water*, 16(5), 711. https://doi.org/10.3390/w16050711.

Agrawal, A. (2010). Local institutions and adaptation to climate change. *Social dimensions of climate change: Equity and vulnerability in a warming world*, 2, 173-178.

Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., & Salekdeh, G. H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of Suaeda aegyptiaca leaves. *Proteomics*, 6(8), 2542-2554. https://doi.org/10.1002/pmic.200500328.

Barkla, B. J., Castellanos-Cervantes, T., Diaz de Leon, J. L., Matros, A., Mock, H. P., Perez-Alfocea, F., Salekdeh, G.H., Witzel, K. and Zörb, C. (2013). Elucidation of salt stress defense and tolerance mechanisms of crop plants using proteomics—current achievements and perspectives. *Proteomics*, 1*3*(12-13), 1885-1900. https://doi.org/10.1002/pmic.201200399.

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(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Chen, T. H., & Murata, N. (2008). Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 13(9), 499-505. 10.1016/j.tplants.2008.06.007.

Deutsch, D. R., Fröhlich, T., & Arnold, G. J. (2019). Proteomics of bovine endometrium, oocytes and early embryos. *Bioscientifica Proceedings*, 8(10.1530). https://doi: 10.1530/biosciprocs.8.003.

Dinh, H., Nakata, E., Lin, P., Saimura, M., Ashida, H., & Morii, T. (2019). Reaction of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase assembled on a DNA scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(22), 115120. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115120.

Dong, C., Ponciano, G., Huo, N., Gu, Y., Ilut, D., & McMahan, C. (2021). RNASeq analysis of drought-stressed guayule reveals the role of gene transcription for modulating rubber, resin, and carbohydrate synthesis. *Scientific Reports*, 11(1), 21610. https://doi.org/10.1038/s41598-021-01026-7.

Draycott, A.P. (2008). Sugar Beet. *Blackwell Publishing Ltd*. Oxford. UK.

Egea, I., Albaladejo, I., Meco, V., Morales, B., Sevilla, A., Bolarin, M. C., & Flores, F. B. (2018). The drought-tolerant Solanum pennellii regulates leaf water loss and induces genes involved in amino acid and ethylene/jasmonate metabolism under dehydration. *Scientific Reports*, 8(1), 2791. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21187-2.

Ford, K. L., Cassin, A., & Bacic, A. (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2, 44. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00044.

Gadaleta, A., Nigro, D., Giancaspro, A., & Blanco, A. (2011). The glutamine synthetase (GS2) genes in relation to grain protein content of durum wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 11, 665-670. https://doi.org/10.1007/s10142-011-0235-2.

Ghasemi, M., Toorchi, M., Aharizad, S., & Khorshid, A. (2022). Evaluation of physiological indices of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes under water deficit stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 53(3), 77-91. (In persian). 10.22059/ijfcs.2021.326319.654838.

Ghosh, S., Narula, K., Mittal, P. K., Sarkar, M. P., Chakraborty, N., & Chakraborty, S. (2016). Proteomic profile reveals the diversity and complexity of leaf proteins in spinach (*Beta*

vulgaris var. all green). *Journal of Proteins and Proteomics*, 7(2), 121-131. https://www.researchgate.net/publication/323258730.

Guo, L. Q., Shi, D. C., & Wang, D. L. (2010). The key physiological response to alkali stress by the alkali-resistant halophyte Puccinellia tenuiflora is the accumulation of large quantities of organic acids and into the rhyzosphere. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(2), 123-135. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00397.x.

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S., & Hosseini Salekdeh, G. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), 950-960. https://doi.org/10.1002/pmic.200401101.

Halliwell, B. & Gutteridge,,J.M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA, New York.

Heide, H., Kalisz, H. M., & Follmann, H. (2004). The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology*, 161(2), 139-149. https://doi.org/10.1078/0176-1617-01033.

Ifuku, K., Nakatsu, T., Shimamoto, R., Yamamoto, Y., Ishihara, S., Kato, H., & Sato, F. (2005). Structure and function of the PsbP protein of photosystem II from higher plants. *Photosynthesis Research*, 84, 251-255. https://doi.org/10.1007/s11120-004-7160-3.

Joseph, B., & Jini, D. (2010). Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(6), DOI: 10.3923/ajps.2010.307.313.

Kambona, C. M., Koua, P. A., Léon, J., & Ballvora, A. (2023). Stress memory and its regulation in plants experiencing recurrent drought conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 136(2), 26. https://doi.org/10.1007/s00122-023-04313-1.

Kang, G., Li, G., Xu, W., Peng, X., Han, Q., Zhu, Y., & Guo, T. (2012). Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6066-6079. https://doi.org/10.1021/pr300728y.

Katam, R., Sakata, K., Suravajhala, P., Pechan, T., Kambiranda, D. M., Naik, K. S., ... & Basha, S. M. (2016). Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and-susceptible peanut in response to water stress. *Journal of Proteomics*, 143, 209-226. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.031.

Kaur, B., Sandhu, K. S., Kamal, R., Kaur, K., Singh, J., Röder, M. S., & Muqaddasi, Q. H. (2021). Omics for the Improvement of Abiotic, Biotic, and Agronomic Traits in Major Cereal Crops: Applications, Challenges, and Prospects. *Plants*, 10(10), 1989. https://doi.org/10.3390/plants10101989.

Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A., & Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44, 345-359. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1338-3.

Khodadadi, E., Fakheri, B. A., Aharizad, S., Emamjomeh, A., Norouzi, M., & Komatsu, S. (2017). Leaf proteomics of drought-sensitive and-tolerant genotypes of fennel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(11), 1433-1444. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.012.

Khueychai, S., Jangpromma, N., Daduang, S., Jaisil, P., Lomthaisong, K., Dhiravisit, A., & Klaynongsruang, S. (2015). Comparative proteomic analysis of leaves, leaf sheaths, and roots of drought-contrasting sugarcane cultivars in response to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-16. https://doi.org/10.1007/s11738-015-1826-7.

Kumar R, Sagar V, Verma VC, Kumari M, Gujjar RS, Goswami SK, Kumar Jha S, Pandey H, Dubey AK, Srivastava S, Singh SP, Mall AK, Pathak AD, Singh H, Jha PK and Prasad

PVV (2023) Drought and salinity stresses induced physio-biochemical changes in sugarcane: an overview of tolerance mechanism and mitigating approaches. *Frontiers in Plant Science*. 14:1225234. doi: 10.3389/fpls.2023.1225234.

Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94. https://doi.org/10.3390/antiox8040094.

Li, H., Pan, Y., Zhang, Y., Wu, C., Ma, C., Yu, B., ... & Chen, S. (2015). Salt stress response of membrane proteome of sugar beet monosomic addition line M14. *Journal of Proteomics*, 127, 18-33. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.025.

Lima, L. L., Balbi, B. P., Mesquita, R. O., da Silva, J. C. F., Coutinho, F. S., Carmo, F. M. S., ... & Ramos, H. J. O. (2019). Proteomic and metabolomic analysis of a drought tolerant soybean cultivar from Brazilian savanna. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 1(2). e190022. https://doi.org/10.20900/cbgg20190022.

Ma, Q., Kang, J., Long, R., Zhang, T., Xiong, J., Zhang, K., ... & Sun, Y. (2017). Comparative proteomic analysis of alfalfa revealed new salt and drought stress-related factors involved in seed germination. *Molecular Biology Reports*, 44, 261-272. https://doi.org/10.1007/s11033-017-4104-5.

Mathivanan, S. (2021). and Physiological Changes and Adaptive Mechanisms in Plants. *Abiotic Stress in Plants*.

McEvoy, J. P., & Brudvig, G. W. (2006). Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical Reviews*, 106(11), 4455-4483. https://doi.org/10.1021/cr0204294.

Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports*, 8(1), 5710. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24012-y.

Mohammadi, P. P., Moieni, A., & Komatsu, S. (2012). Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids*, 43, 2137-2152. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1299-6.

Mohammadi, P. P., Moieni, A., Hiraga, S., & Komatsu, S. (2012). Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1906-1923. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.041.

Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, 43(3), 229-237. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.06.006.

Nagy, Z., Németh, E., Guóth, A., Bona, L., Wodala, B., & Pécsváradi, A. (2013). Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.001.

Patterson, S. D. (2004). How much of the proteome do we see with discovery-based proteomics methods and how much do we need to see?. *Current Proteomics*, 1(1), 3-12. https://doi.org/10.2174/1570164043488306.

Pukala, T. L., & Chen, H. (2021). Technical and Methodological Advances in Proteomics. *Frontiers in Chemistry*, 9, 795426. https://doi.org/10.1080/14789450.2022.2070477.

Schneider,S., Turetschek,R., Wedeking, R., Wimmer, M.A. and Wienkoop, S. (2019). A Protein-Linger Strategy Keeps the Plant On-Hold After Rehydration of Drought-Stressed *Beta vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, 10,381. doi: 10.3389/fpls.2019.00381.

Scumaci, D., & Cuda, G. (2019). 2D Gel Electrophoresis to Address Biological Issues. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.86211.

Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2014). Comparative proteomic responses of two bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.) varieties contrasting in drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 218-228. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.006.

Sobhanian, H., Aghaei, K., & Komatsu, S. (2011). Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerant crops?. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1323-1337. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.018.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *International journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561–13578. https://doi.org/10.3390/ijms160613561.

Thiellement, H., Zivy, M., & Plomion, C. (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography* B, 782(1-2), 137-149. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00553-6.

Ullah, F., Ali, S., Siraj, M., Akhtar, M. S., & Zaman, W. (2025). Plant Microbiomes Alleviate Abiotic Stress-Associated Damage in Crops and Enhance Climate-Resilient Agriculture. *Plants*, 14(12), 1890. https://doi.org/10.3390/plants14121890.

Wang, L., Jin, X., Li, Q., Wang, X., Li, Z., & Wu, X. (2016). Comparative proteomics reveals that phosphorylation of β carbonic anhydrase 1 might be important for adaptation to drought stress in Brassica napus. *Scientific Reports*, 6(1), 39024. https://doi.org/10.1038/srep39024.

Wang, X., Fan, P., Song, H., Chen, X., Li, X., & Li, Y. (2009). Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in shoots of Salicornia europaea under different salinity. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3331-3345. https://doi.org/10.1021/pr801083a.

Wang, Y., Peng, C., Zhan, Y., Yu, L., Li, M., Li, J., & Geng, G. (2017). Comparative proteomic analysis of two sugar beet cultivars with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 3*6*, 537-549. https://doi.org/10.1007/s00344-017-9703-9.

Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. John Wiley & Sons.

Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., & Cresti, M. (2014). Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nature Protocols*, 9(2), 362-374. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.022.

Xue, G. P., McIntyre, C. L., Glassop, D., & Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 67, 197-214. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9311-y.

Yolcu, S., Alavilli, H., Ganesh, P., Panigrahy, M., & Song, K. (2021). Salt and Drought Stress Responses in Cultivated Beets (*Beta vulgaris* L.) and Wild Beet (*Beta maritima* L.). *Plants*, 10(9), 1843. https://doi.org/10.3390/plants10091843.