

## **Effect of drought stress on morphological traits and proteome expression patterns in wheat leaf**

**Shaghayegh Aslzad** 

MSc Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: Shaghayeghaslzad@gmail.com

**Mahmoud Toorchi** 

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

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Recent advances in molecular biology methods have raised hopes that by identifying candidate proteins for drought tolerance, significant steps can be taken to increase wheat yield. The aim of this study is to investigate the effect of drought stress on morphological traits and leaf proteome pattern of the new wheat cultivar, Sadra.

#### **Materials and methods**

An experiment was conducted under greenhouse conditions and controlled conditions. Sadra cultivar was grown at two irrigation levels: normal irrigation and water deficit stress with 10 replications. Water deficit stress was applied to the stress treatment pots 20 days after planting. Analysis of wheat leaf tissue proteome was performed using two-dimensional electrophoresis and Coomassie blue staining. After spot detection, the t-test was performed for the volumetric percentage of protein spots as well as morphological data. Moreover, the upregulation and downregulation of protein spots due to water deficit stress were determined based on induction factor. Protein spots with expression changes were identified using mass spectrometry.

#### **Results**

Morphological data analysis showed statistically significant differences between irrigation levels for leaf area, plant height, fresh and dry weight of roots and aerial parts, and root volume. Two-dimensional electrophoresis analysis of leaf tissue proteome revealed that out of 136 discernible

protein spots in Coomassie blue staining, 24 protein spots showed statistically significant expression changes under drought stress compared to normal conditions. Among these, 10 spots exhibited decreased expression, and 14 spots showed increased expression under water deficit conditions compared to the control. These protein spots were identified based on their isoelectric points and molecular weights and further confirmed using mass spectrometry. The identified proteins in this study were categorized into glycolysis, photosynthesis, electron transport chain, Calvin cycle, carbon metabolism, ROS scavenging and detoxification, cellular structure, and stress response pathways.

### Conclusions

The findings suggest that drought stress significantly affects morphological traits and leaf proteome pattern in the Sadra wheat cultivar. Understanding the proteomic changes under drought stress can provide insights into the molecular mechanisms involved in wheat drought tolerance and contribute to the development of more resilient wheat cultivars.

**Keywords:** Leaf, Mass Spectrometry, Proteomics, Two-Dimensional Electrophoresis, Water deficiency

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Aslzad S, Toorchi M (2024) Effect of drought stress on morphological traits and proteome expression patterns in wheat leaf. *Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 167-188.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 167-188. DOI: 10.22103/jab.2024.22025.1504

Received: September 08, 2024.

Received in revised form: October 23, 2024.

Accepted: October 24, 2024.

Published online: December 30, 2024.

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




© the authors

## اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی و الگوی بیان پروتئوم برگ گندم

شقایق اصل زاد 

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز. رایانامه:

Shaghayeghaslzad@gmail.com

محمود تورچی 

\*نویسنده مسوول. استاد، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز. رایانامه:

mtoorchi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳

### چکیده

**هدف:** پیشرفت‌های اخیر در روش‌های بیولوژی مولکولی این امید را بوجود آورده است که با شناسایی پروتئین‌های کاندیدای تحمل به تنش خشکی، بتوان گام‌های اساسی در افزایش عملکرد گندم برداشت. هدف از این مقاله بررسی اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی و الگوی بیان پروتئوم برگ گندم رقم جدید صدرا می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** آزمایشی در شرایط گلخانه‌ای و تحت شرایط کنترل شده انجام گردید. به این منظور رقم صدرا در دو سطح آبیاری عادی و تنش کمبود آب با ۱۰ تکرار کشت شد. تنش کمبود آب ۲۰ روز پس از کاشت، به گلدان‌های تحت تیمار تنش اعمال گردید. تجزیه و تحلیل پروتئوم بافت برگ گندم با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی انجام شد. پس از لکه‌یابی، آزمون t برای درصد حجمی نقاط پروتئینی همانند داده‌های مورفولوژیکی انجام شد. همچنین روند افزایشی و کاهش‌یابی بیان لکه‌های پروتئینی در اثر تنش کمبود آب بر اساس فاکتور القاء مشخص شدند. شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش طیف‌سنجی جرمی صورت گرفت.

**نتایج:** تجزیه داده‌های مورفولوژیکی نشان داد که اختلاف بین سطوح تیمار آبیاری برای صفات سطح برگ، طول بوته، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و حجم ریشه از نظر آماری معنی‌دار است. تجزیه و تحلیل پروتئوم بافت برگ به روش الکتروفورز دوبعدی نشان داد که از بین ۱۳۶ لکه پروتئینی قابل تشخیص در رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی، تعداد ۲۴ لکه پروتئینی تغییرات بیان معنی‌داری از نظر آماری در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط عادی نشان‌دادند. از این تعداد ۱۰ لکه دارای کاهش بیان و ۱۴ لکه دارای

افزایش بیان در شرایط کمبود آب نسبت به شاهد بودند. این لکه‌های پروتئینی بر اساس نقاط ایزوالکتریک و وزن مولکولی مشخص و سپس با استفاده از طیف سنجی جرمی مورد شناسایی قرار گرفتند. پروتئین‌های شناسایی شده در این پژوهش در فرایند گلیکولیز، فستوستز، زنجیره انتقال الکترون، چرخه کالوین، متابولیسم کربن، مهار ROS و سم‌زدایی، ساختار سلولی و درگیر در تنش طبقه‌بندی شدند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنش خشکی بطور معنی داری صفات مورفولوژیکی و الگوی پروتئوم گندم رقم صدرا را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بررسی تغییرات پروتئوم تحت تنش خشکی می‌تواند به فهم سازوکار مولکولی درگیر در تحمل خشکی کمک نموده و گامی موثر در راستای تولید ارقام گندم متحمل به شرایط سخت باشد.

**کلیدواژه‌ها:** الکتروفورز دو بعدی، برگ، پروتئومیکس، طیف سنجی جرمی، کمبود آب

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** اصل زاد شقایق، تورچی محمود (۱۴۰۳) اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی و الگوی بیان پروتئوم برگ گندم. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۶(۴)، ۱۶۷-۱۸۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.

© the authors



## مقدمه

گندم از گیاهان علفی تک‌لپه یک‌ساله، تیره گندمیان، خانواده Gramineae (Poacea) و جنس *Triticum* یکی از محصولات زراعی و سازگار بسیاری از مناطق جهان است. از جمله محصولات اساسی کشاورزی در سراسر جهان غلات است، مثال گندم، برنج و ذرت مهم‌ترین آنها برای تهیه کالری روزانه و پروتئین می‌باشد. از این رو گندم اولین گیاه اهلی شده است که غذای اساسی مردم جهان را تشکیل می‌دهد (Abhinandan et al. 2018). همچنین میزان پروتئین در هر گرم ۱۵-۱۲ درصد می‌باشد که نسبت به برنج و ذرت % ۲-۳ بیشتر است و به همین دلیل بهترین انتخاب از بین غلات می‌باشد (FAO 2023). تنش در گیاه به مفهوم انحراف در فیزیولوژی، نمو و عملکرد طبیعی آن است که اغلب مضر بوده و آسیب‌های برگشت‌ناپذیری به سیستم گیاهی وارد می‌نماید. حدود یک‌سوم از سطح جهان را زمین‌های بایر تشکیل می‌دهد و این موقعیت بر اساس تغییرات اقلیمی جهانی اخیر، تشدید یافته است. اصلاح برای مقاومت به خشکی از موثرترین روش‌های مقابله با کم‌آبی و افزایش عملکرد در واحد سطح است. اصلاح برای مقاومت به خشکی و افزایش عملکرد گندم در مناطق خشک با مشکلات بسیاری روبرو بوده است. بخش عمده این مشکلات به پیچیدگی مکانیسم‌های مقاومت، کمی بودن این صفت، وراثت‌پذیری پایین عملکرد و اثر متقابل ژنوتیپ با محیط ارتباط

دارد. تحقیقات نشان داده است، ژنوتیپ‌هایی که تحت شرایط مطلوب با عملکرد بالا ظاهر می‌شوند، ممکن است متحمل به خشکی نباشند. بنابراین لازم است گزینش ژنوتیپ‌ها تحت شرایط تنش انجام شده و مکانیسم تحمل مورد بررسی و شناسایی قرارگیرد. تحمل تنش کم‌آبی یکی از راه‌های مهم برای گیاهان است و در این فرآیند، گیاهان با افزایش ترکیبات اسمزی، همچون پرولین و قندهای محلول، پتانسیل آب سلول را کاهش می‌دهند (Ghasemi et al. 2021). پروتئومیک یکی از بهترین گزینه‌ها برای تجزیه و تحلیل عملکرد مناطق ترجمه شده ژنوم می‌باشد و اطلاعات بسیار دقیقی در مورد مکانیزم‌های ذاتی گیاهان در پاسخ به تنش را ارائه می‌دهد. روش‌های مختلفی به طور گسترده برای شناسایی پروتئین‌های تنظیمی که نقش کلیدی در ادراک تنش و ترانس‌اسی آن دارند در پروتئومیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. دقت و حساسیت این روش مبتنی بر استفاده از الکتروفورز دوبعدی، تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی، لکه‌گذاری و شناسایی پروتئین‌ها به وسیله توالی‌یابی ادمن یا طیف‌سنجی جرمی است. تفکیک و جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز دوبعدی، ابزار پایه‌ای پروتئومیک می‌باشد. در پژوهشی به تأثیر انواع تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی روی چهار رقم گندم پرداختند. یافته‌ها نشان داد که با شناخت ژن‌های مشخص شده توسط پروتئومیک، می‌توان از طریق نشانگرها یا برنامه‌های انتقال ژن نسبت به بهبود عملکرد گیاهی و تحمل به تنش‌های غیرزیستی اقدام کرد (Kamal et al. 2010). به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی هستند (Barazandeh et al. 2016a; Safaei et al. 2022). ماده ژنتیکی یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا این که نیازی به فرآورده آن نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al. 2022; Mohamadipoor et al. 2023). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد (Jafari Ahmadabadi et al. 2021; Mohammadabadi & Asadollahpour Nanaei 2021). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت و چندبعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2024; Shokri et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). در مطالعه دیگری دو رقم حساس (بهار) و متحمل (کویر) گندم را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که دو رقم تفاوت معنی‌دار در صفات مورفولوژیک بجز سطح برگ نشان نداده و میانگین اندازه سطح برگ رقم بهار بیشتر از رقم متحمل می‌باشد. مطالعه پروتئوم به روش 2D-PAGE نشان داد که ۸۵ لکه پروتئینی متفاوت در رقم بهار ولی فقط ۲۰ لکه معنی‌دار در رقم کویر در مقایسه با شاهد وجود دارد. لکه‌های پروتئینی شناسایی شده از ژل استخراج و با روش طیف سنج جرمی از

نوع LC-ESI-MS/MS شناسایی شدند. در رقم بهار ۷۲ پروتئین خاص و در رقم کویر فقط هشت پروتئین خاص شناسایی گردید (Michaletti et al., 2018). بنابراین، این پژوهش با هدف شناخت دقیق الگوی پروتئوم گندم رقم صدرا، در شرایط تنش خشکی و شناسایی مسیرهای متابولیکی درگیر در تحمل/حساسیت گندم در مقابل تنش کمبود آب انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تغییرات الگوی پروتئوم بافت برگی گندم در پاسخ به تنش کمبود آب، واکنش رقم جدید صدرا مورد بررسی قرار گرفت. بذور مربوط به این پژوهش، از مرکز تحقیقات دیم مراغه تهیه گردید. برای اجرای آزمایش از طرح کاملاً تصادفی در ده تکرار استفاده شد. سطوح آبیاری به صورت تنش ملایم و شاهد گروه‌های تیمار را تشکیل دادند. آزمایش در گلدان‌های پلاستیکی به وزن سه کیلوگرم انجام شد که با خاک زراعی معمولی پر شده است. برای این منظور تعداد ۲۰ گلدان آماده گردید و بذور در عمق ۲ سانتی متری خاک کاشته شد و بطور روزانه آبیاری شدند. ۱۵ روز پس از کاشت که گیاهان سبز شدند و به مرحله‌ی سه‌برگی رسیدند آنها را تنک نموده و تعداد ۸ گیاه در هر گلدان حفظ شد. گلدان‌ها به دو گروه تصادفی تقسیم و به یک گروه بطور تصادفی تنش کم‌آبی اعمال گردید. بطوری که گلدان‌های تحت تنش به فاصله ۳ روز یکبار آبیاری شدند. در صورتیکه گلدان‌های گروه شاهد هر روز آبیاری می‌شدند. حدود ۲۰ روز پس از اعمال تنش و مشاهده علائم کمبود آب، صفات رشدی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

### صفات مورد اندازه‌گیری: طول گیاه، از بلندترین برگ تا سطح خاک، همچنین طول و عرض برگ ۸ گیاه بر حسب

سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. پس از نمونه‌برداری وزن تر بوته‌ها بر حسب گرم توزین شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون قرار داده شد و وزن خشک بوته‌ها بر حسب گرم توزین گردید. پس از آن ریشه‌های گیاه را به صورت کامل شست‌شو داده و حجم آن‌ها اندازه‌گیری شد. به این صورت که در یک استوانه مدرج مقداری آب پر کرده سپس ریشه‌ها داخل استوانه قرار داده شد، حجم آب بالا آمده که نشان‌دهنده حجم ریشه می‌باشد اندازه‌گیری گردید. وزن تر ریشه‌ها بر حسب میلی‌گرم اندازه‌گیری و در ادامه ریشه‌ها نیز به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری سطح برگ، طول و عرض برگ بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری گردید و سپس با استفاده از فرمول زیر سطح برگ (LA) به دست آمد:

$$LA = a + b(L * W) \quad \text{رابطه‌ی (۱)}$$

$$a = (L * W)0.583 + 0.62 \quad \text{رابطه (۲)}$$

W : عرض برگ      L : طول برگ      b : شیب

### اندازه‌گیری میزان پرولین: غلظت پرولین به روش نین‌هیدرین اندازه‌گیری شد (Bates et al. 1973). پس از تهیه

محلول‌ها، حدود ۰/۲ گرم از نمونه برگی پس از انجماد در ازت مایع، در هاون پودر گردید و در پنج میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک سه

درصد هموزنیزه و در فالكون ريخته شد. سپس عصاره حاصل با ۶۰۰ دور در دقيقه به مدت ۷ دقيقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و فاز مایع جدا شد. یک میلی‌لیتر از روشناور به دست آمده با همان حجم اسید نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط و درون فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد همراه با تکان‌های ملایم قرار گرفتند. سپس اجازه داده شد تا نمونه‌ها در حمام یخ به مدت ۵ دقیقه خنک شوند. به نمونه‌ها دو میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. محلول‌ها به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه به حالت سکون رها شدند تا فاز قرمز رنگی در بالای لوله تشکیل شود. از این فاز حدود ۱۰۰۰ میکرولیتر برای اندازه‌گیری میزان جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید.

### استخراج و تعیین غلظت پروتئین: برای استخراج پروتئین گیاهی از روش بافر فسفات استفاده شد. به این ترتیب که

نیم‌گرم از بافت برگ همراه با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات خنک در هاون خرد گردید و پس از انتقال نمونه به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روشناور به تیوب جدید منتقل و دوباره عمل سانتریفوژ با همان تنظیمات قبلی تکرار و روشناور به تیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید خالص اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد. پس از آن ورتکس انجام و با تنظیمات قبلی سانتریفوژ انجام شد. این بار روشناور دور ریخته شده و رسوب حاصله با ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتانول خنک شست‌شو داده و سپس به مدت ۲ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب پروتئینی در هاون چینی خشک و ۰/۰۱۲ گرم از نمونه با ۲۳۰ میکرولیتر بافر لیز محلول گردید. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد (Toorchi, Moghaddam & Mohammadi, 2015).

### الکتروفورز دو بعدی: برای تهیه ژل بعد اول از اوره، پلی‌آکرلامید 30 درصد، APS، آمفولین‌های با pH های (10-3)

و (8-5) و NP-40 به مقادیر مشخص استفاده شد. الکتروفورز بعد اول طی سه مرحله با ولتاژهای ۲۰۰ ولت به مدت نیم ساعت، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت اجرا گردید (O'Farrell, 1975). الکتروفورز بعد دوم با استفاده از یک ژل دو قسمتی شامل ژل جداکننده و ژل نگهدارنده انجام شد. قبل از اجرای بعد دوم الکتروفورز، ژل‌های بعد اول طی دو مرحله و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه در بافر SDS متعادل سازی شدند و سپس روی ژل آکریل‌آمید بعد دوم قرار گرفتند. به ازای هر ژل، ۲۰۰ میکرولیتر نشانگر آبی بروموفنول به بافر رانش افزوده شد. سپس عملیات رانش با جریان ثابت ۳۵ میلی‌آمپر برای هر ژل و مدت زمان ۳ ساعت تا رسیدن نشانگر آبی به انتهای ژل جداکننده برقرار گردید. پس از اتمام الکتروفورز رنگ آمیزی ژل‌ها توسط محلول رنگ‌آمیزی آبی کوماسی انجام شد. از دستگاه دانسیومتر GS800 شرکت Bio-Rad برای تصویربرداری استفاده شد. تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار PDQuest انجام شد و لکه‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار از ژل‌ها جدا شدند.

### شناسایی پروتئین‌ها: تصویربرداری از ژل‌ها توسط دانسیومتر GS800 ساخت شرکت بیوراد و با انتخاب نوع ژل و روش

رنگ‌آمیزی (آبی کوماسی) و نرم‌افزار Quantity one انجام شد. توسط نرم‌افزار PDQuest کلیه تصاویر ژل‌ها به همراه تکرارهای

آنها فراخوانده شدند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برجسب زده‌شد. پس از پایان لکه‌یابی درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون  $t$  برای درصد حجمی هر لکه پروتئینی بین تیمارهای آبیاری انجام شد. بدین ترتیب که لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند و روند افزایشی و کاهش‌ی بیان آنها در اثر تنش کمبود آب بر اساس فاکتور القاء ( $IF^1$ ) مشخص شدند. نقاطی که دارای  $IF$  بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که  $IF$  کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند (Hajheidari et al., 2005). شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش انگشت‌نگاری جرم پپتیدی MALDI-TOF در مرکز ژنومیکس و پروتئومیکس دانشگاه Tucsia ایتالیا صورت گرفت.

## نتایج و بحث

آزمون نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌های درون گروهی برای صفات مورد اندازه‌گیری نشان داد که داده‌ها دارای توزیع نرمال بوده و واریانس‌های درون گروهی در مورد کلیه صفات یکنواخت بودند. آزمون  $t$  برای مقایسه میانگین صفت حجم ریشه بین شرایط شاهد و تنش کمبود آب در سطح احتمال ۵ درصد و برای صفات طول بوته، سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بدست آمدند (جدول ۱). در مطالعات قبلی نیز کاهش ارتفاع بوته، سطح برگ وزن تر و خشک اندام هوایی در ارقام گندم بهار و کویر مشاهده شد (Naghavi et al. 2020). طبق مطالعات گزارش شده حجم و ارتفاع ریشه گیاهان تحت تنش خشکی به منظور نفوذ در پروفیل خاک و انتقال آب توسط آوندهای چوبی ریشه افزایش میابد (Khalily 2016). گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف مکانیسم‌های دفاعی مختلفی دارند. در یکی از این مکانیسم‌ها تنش کمبود آب باعث تجمع بالای محلول‌های سازگار می‌شوند که این ترکیبات بدون تغییر در pH فیزیولوژی و غیرسمی در غلظت بالا باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین تثبیت ساختار پروتئین و غشا تحت تنش می‌شوند و پرولین یکی از مهم‌ترین این نوع ترکیبات می‌باشد که از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین سنتز می‌شود و تحت تنش کمبود آب افزایش می‌یابد (Dolatabadi et al. 2018). در این تحقیقات طبق مطالعات قبلی قاسمی و همکاران مقدار پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی جهت مقابله با تنش کمبود آب افزایش یافته است (Ghasemi et al. 2021).

### تجزیه پروتئوم برگ برگ گندم رقم صدرا تحت تنش کمبود آب: برای بررسی تغییرات پروتئوم، استخراج پروتئین

از بافت برگ گیاهان تحت تنش و شاهد با سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. الکتروفورز دوبعدی با رنگ آمیزی به روش آبی کوماسی و تجزیه تحلیل لکه‌های پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار PDQuest منجر به شناسایی ۱۳۶ لکه پروتئینی تکرارپذیر شد. آزمون  $t$  برای شناسایی لکه‌های با تغییرات بیان معنی‌دار استفاده گردید. از بین لکه‌های پروتئینی ظاهر شده روی ژل دو بعدی، تعداد ۲۴ لکه

<sup>1</sup> - Induction Factor



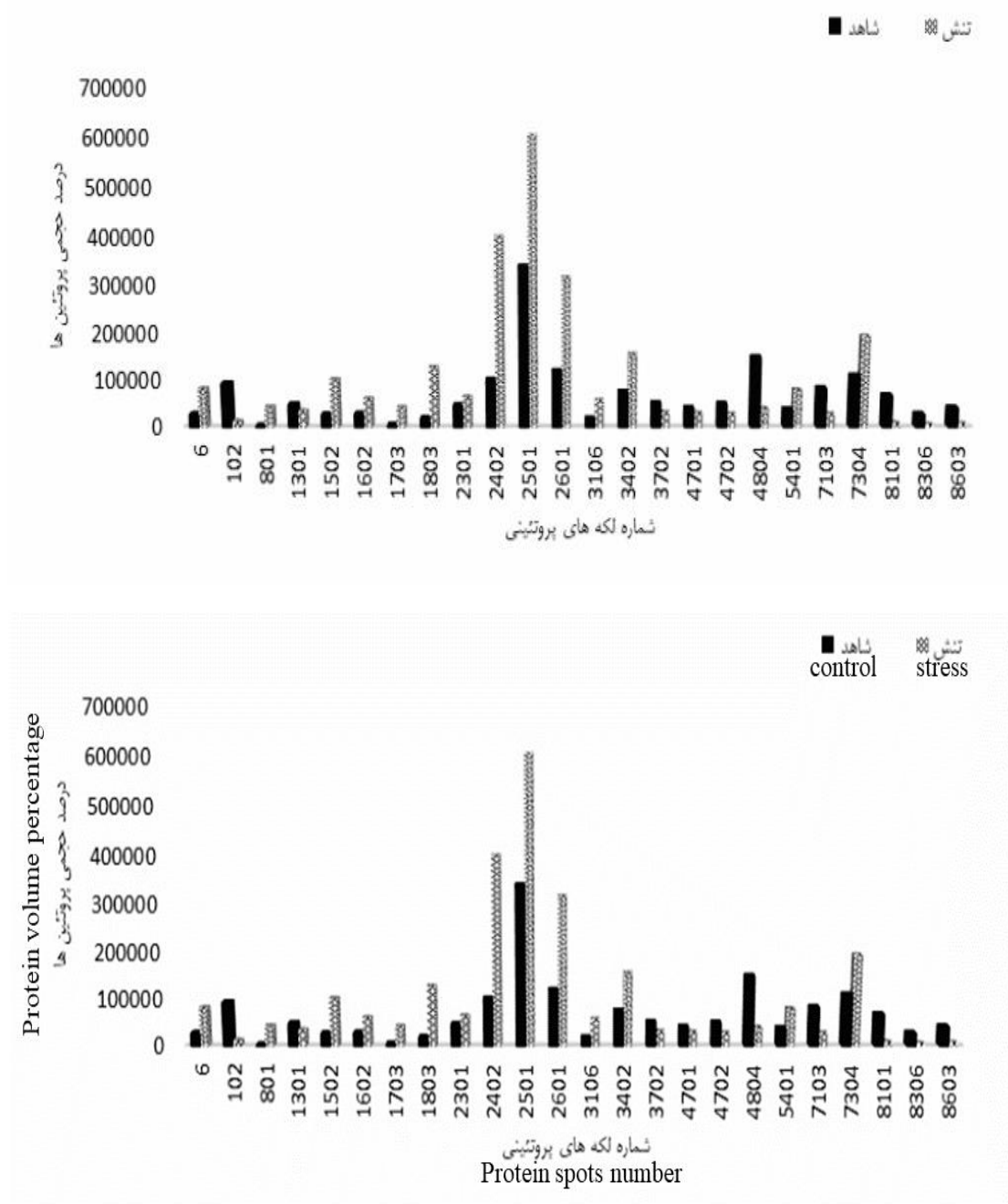
معنی‌دار از نظر آماری به دست آمد. از بین ۲۴ لکه پروتئینی شناسایی شده، ۱۰ لکه دارای کاهش بیان و ۱۴ لکه دارای افزایش بیان در شرایط تنش‌زا نسبت به شاهد بودند. در شکل ۱ میزان افزایش و کاهش بیان لکه‌های انتخابی نشان داده شده است. موقعیت لکه‌های شناسایی شده در روی ژل تصویربرداری شده در شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در رقم صدرا و آماره t برای شرایط شاهد و تنش کمبود آب

**Table 1. Analysis of variance of the studied traits in the 'Sadra' cultivar and t-test for control and water deficit stress**

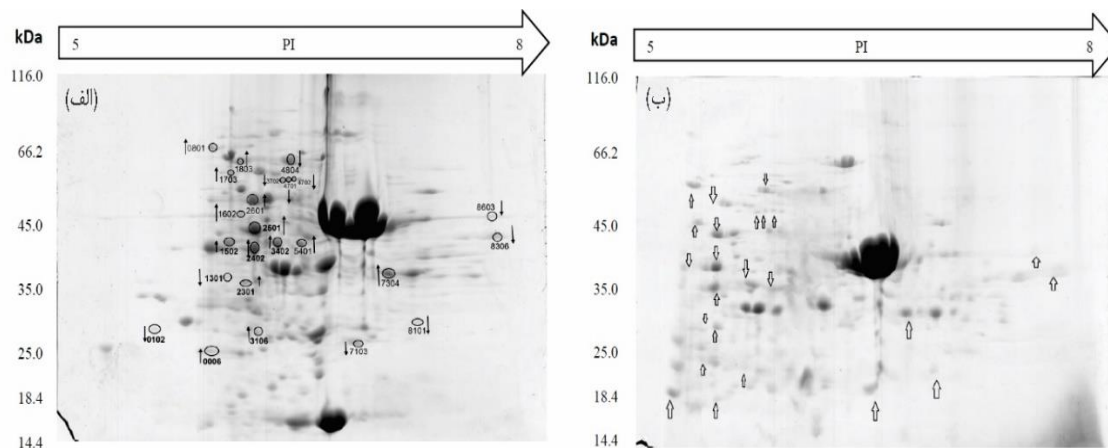
طول بوته (سانتی- متر) Plant heights	سطح برگ (سانتی متر مربع) Leaf area	وزن تر اندام هوایی (گرم) Wet weight of aerial part	وزن خشک اندام هوایی (گرم) Dry weight of aerial part	وزن - تر ریشه (گرم) Wet weight of root	وزن - خشک (گرم) Dry weight of root	حجم ریشه (میلی لیتر) Root volume	
46.95	34.11	0.97	0.11	0.65	0.05	0.47	شاهد control
41.66	18.92	0.53	0.06	0.73	0.1	0.80	تنش stress
3.65**	7.70**	9.35**	9.89**	-7.66**	4.00**	2.85*	آماره t t-statistic
7.44	32.4	32	22.22	8.75	42.85	34.92	ضریب تغییرات Coefficient of variation

با استفاده از نرم افزار PDQuest همانطور که در جدول ۲ و شکل ۲ مشاهده می‌شود پروتئین‌های ۷۳۰۴، ۵۴۰۱، ۳۴۰۲، ۳۱۰۶، ۲۶۰۱، ۲۵۰۱، ۲۴۰۲، ۲۳۰۱، ۱۸۰۳، ۱۷۰۳، ۱۶۰۲، ۱۵۰۲، ۸۰۱، ۶ دارای افزایش بیان در گیاهان تحت تنش خشکی هستند. همچنین پروتئین‌های ۸۶۰۳، ۸۳۰۶، ۸۱۰۱، ۷۱۰۳، ۴۸۰۴، ۴۷۰۲، ۴۷۰۱، ۳۷۰۲، ۱۳۰۱، ۱۰۲ دارای کاهش بیان می‌باشند. پروتئین‌های دارای افزایش یا کاهش بیان به روش طیف سنجی جرمی شناسایی شد و مشخصات آنها در جدول ۲ و عملکردهای بیولوژیکی متفاوت آنها در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱. درصد حجمی پروتئین‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار گیاهان تحت تنش

Figure 1. The volume percentage of proteins with significant expression differences in plants under stress



شکل ۲. موقعیت نسبی و برجستگی لکه‌های پروتئینی انتخابی جهت شناسایی روی ژل الکتروفورز ۲ بعدی از برگ گندم رقم صدرا در شرایط تنش کمبود آب (الف) و شاهد (ب)

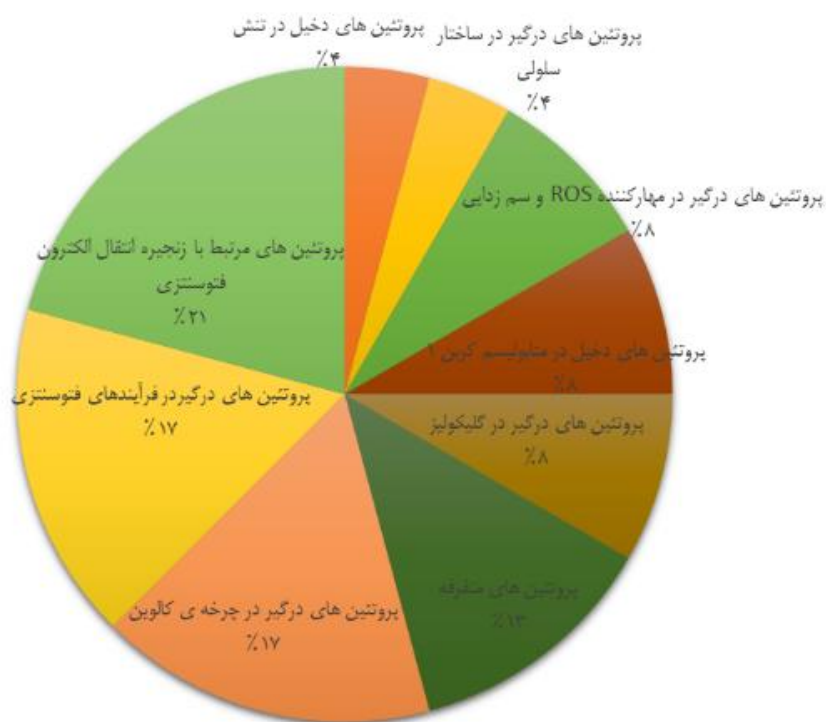
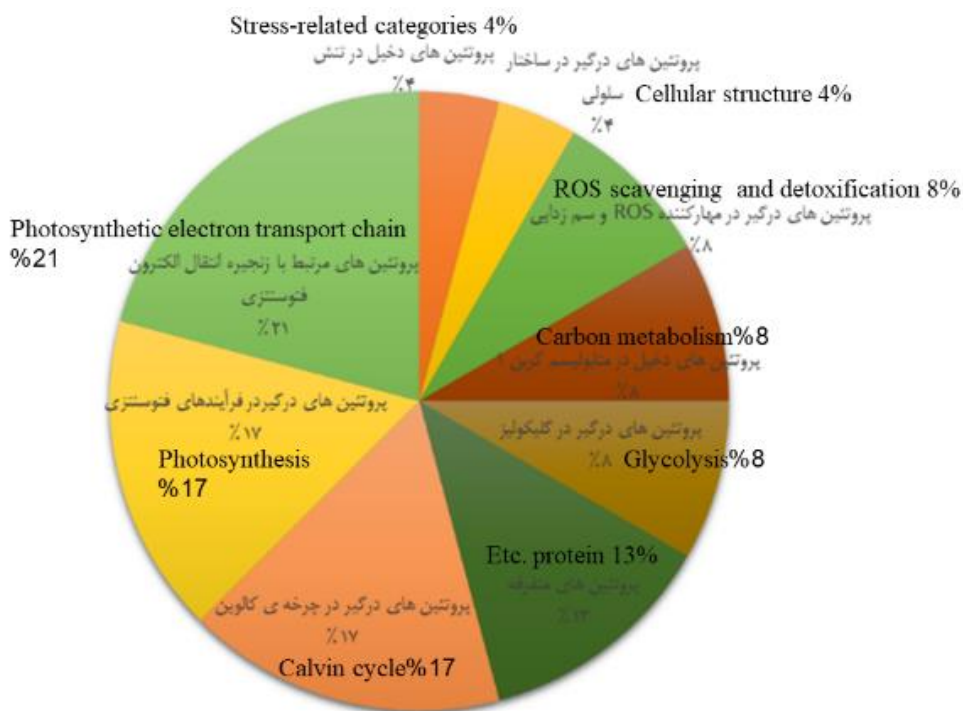
Figure 2. The relative position and label of selected protein spots for identification on 2D electrophoresis gel of wheat leaves of Sadra cultivar under water stress conditions (a) and control (b)

جدول ۲. اسامی و خصوصیات پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب در گندم رقم صدرا

Table 2. Water deficit responsive proteins of wheat (*Triticum aestivum* cv. Sadra) leaves under stress using LC – MS/MS

گروه عملکردی Functional group	میزان بیان Expression level	شماره لکه Spot number	شماره دسترسی Accession number	نام پروتئین Protein name	PI/MW (Theo.)	PI/MW (Exp.)	گونه Species
گلیکولیز Glycolysis	↑	2501	P12783	Phosphoglycerate Kinase	6.6-49.9	4.24-49.28	<i>Triticum aestivum</i>
	↑	801	P25856	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	6.56-80.79	5.92-80.26	<i>Arabidopsis thaliana</i>
شوکه گرمایی Heat shocked	↓	4804	EMS51416	70-kDa Heat shock Protein	73.3-6.2	-6.45-73.48	<i>Triticum urartu</i>
فرآیندهای فتوسنتزی Photosynthesis	↓	1301	EMS57012	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	6.5-38	6.06-37.45	<i>Triticum urartu</i>
	↑	1502	NP_114267	Ribulose-1, 5 biphosphates	6.5-38	6.07-48.94	<i>Triticum aestivum</i>
	↑	3402	NP_114267	Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	6.35-45	6.38-45.25	<i>Triticum aestivum</i>
	↑	5401	NP_114267	Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	6.35-45	6.53-45.6	<i>Triticum aestivum</i>

انتقال الکترون فتوسنتزی Photosynthetic electron transport chain	↓	102	Q00434.1	Oxygen-evolving enhancer protein 2	6-27.42	5.4- 27.77	<i>Triticum urartu</i>
	↑	3106	Q00434.1	Oxygen-evolving enhancer protein 2	6-27.42	6.25- 27.26	<i>Triticum urartu</i>
	↑	2601	XP_0091 25742	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial	-6.18 59.6	-6.23 58.86	<i>Brassica rapa</i>
	↓	3702	P12112	ATP synthase cf <sub>1</sub> alpha subunit	65-6.41	-6.4 66.12	<i>Triticum aestivum</i>
	↑	7304	CAD3002 5	Ferredoxin NADP (H) oxidoreductase	-7.24 38.9	-7.07 38.22	<i>Triticum aestivum</i>
چرخه کالوین Calvin cycle	↑	1602	NP_1142 67	Rubisco large subunit	53.4-6.2	-6.15 54.36	<i>Triticum aestivum</i>
	↓	8603	NP_1142 67	Rubisco large subunit	53.4-6.2	53.5-7.8	<i>Triticum aestivum</i>
	↑	2402	P93431	Rubisco activase A	-6.43 43.37	-6.23 43.9	<i>Oryza sativa</i>
	↓	8306	ABU5440 6	Fructose 1-6- bisphosphate aldolase	-8.91 40.7	-7.71 40.98	<i>Triticum aestivum</i>
متابولیسم	↓	4701	XP_0106 73528	Formate- tetrahydrofolate ligase	-6.26 67.8	-6.44 66.35	<i>Beta vulgaris</i>
کربن ۱ Carbon metabolism	↓	4702	XP_0106 73528	Formate- tetrahydrofolate ligase	-6.26 67.8	-6.47 66.41	<i>Beta vulgaris</i>
مهارکننده ROS	↓	8101	XP_0101 04788	2-cys peroxiredoxin bas1	29.1-7.7	-7.28 28.84	<i>Morus notabilis</i>
و سم‌زدایی ROS and scavenging detoxification	↑	1803	NP_1716 54	Late embryogenesis abundant protein	75.6-6.3	-6.15 74.04	<i>Arabidopsi s thaliana</i>
ساختار سلولی Cellular structure	↑	6	EMS5115 9	Germin-Like protein	24-6	-5.89 24.39	<i>Triticum urartu</i>
متفرقه Etc.	↑	1703	ACY0192 5	Mitogen-activated protein kinase kinase	-5.81 68.93	-6.09 69.53	<i>Beta vulgaris</i>
	↑	2301	EEE5875 3	50s ribosomal protein L4	-6.08 36.35	-6.18 36.22	<i>Oryza sativa</i>
	↓	7103	EMS5257 0	Putative glutathione S-transferase GSTU1	25-6	25-6.85	<i>Triticum urartu</i>



شکل ۳. فراوانی نسبی گروه های عملکردی پروتئین های پاسخ دهنده به تنش کم آبی گندم رقم صدرا

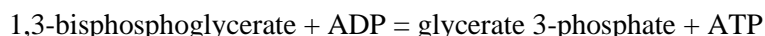
Figure 3. Relative frequency of functional groups of proteins responding to drought stress of 'Sadra' cultivar

### پروتئین درگیر در شوک گرمایی: پروتئین شماره ۴۸۰۴ در این پژوهش جزو خانواده 70-kDa Heat shock Protein

با وزن مولکولی ۷۰ کیلو دالتون است. با توجه به جدول ۲ مقدار این پروتئین در رقم صدرا تحت شرایط تنش کاهش یافته است. تنش کمبود آب به طور غیر مستقیم باعث القای تنش گرمایی می‌شود، بنابراین به دنبال اعمال تنش گرمایی، پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه تغییر می‌یابند. پروتئین‌های شوک حرارتی متعلق به گروه چپرون‌های مولکولی هستند که مسئول پیچش، مونتاژ، جابجایی و تجزیه پروتئین بوده و می‌توانند به پیچش دوباره پروتئین‌ها تحت شرایط تنش کمک کنند و به همین دلیل نقش حیاتی در محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف دارند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در تثبیت و تسهیل بازسازی پروتئین‌هایی دارند که در اثر قرار گرفتن در معرض تنش‌های مختلف حالت طبیعی خود را از دست داده‌اند. مطالعات متعددی، کاهش بیان HSP70 را در ریشه سویا (Toorchi et al. 2009) و برنج (Zang & Komatsu 2007) گزارش کرده‌اند. در مطالعات قبلی در ریشه گندم تحت تنش شوری میزان بیان پروتئین HSP70 کاهش یافته است (Shahbazi et al. 2023).

### پروتئین‌های درگیر در گلیکولیز: پروتئین شماره ۲۵۰۱ که بر اساس جدول ۲ افزایش بیان داشته، مرتبط به آنزیم

فسفوگلیسیرات کیناز است که هفتمین آنزیم چرخه گلیکولیز می‌باشد، واکنش ۱،۳ بیس فسفو گلیسیرات و ADP را برای تولید تری گلیسیرات و ATP کاتالیز می‌کند (Xiong et al. 2017). واکنش این آنزیم را می‌توان به صورت زیر نشان داد.



فسفوگلیسیرات کیناز یکی از آنزیم‌های حیاتی در چرخه گلیکولیز است، افزایش آن در بافت برگ نشان‌دهنده الگوهای تغییر

شکل کربن در پاسخ به افزایش نیاز برای تنظیم اسمزی باشد (Xiong et al. 2017). در مطالعات ریشه جو بیان پروتئین فسفوگلیسیرات کیناز افزایش یافته است (Mohamadiaza & Toorchi 2015). در این تحقیق لکه شماره ۸۰۱ به عنوان آنزیم گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز در این مسیر شناسایی شد. با توجه به جدول ۲ بیان این پروتئین در شرایط تنش افزایش می‌یابد. افزایش بیان این آنزیم مطابق با نتایج حاصل از دیگر آنزیم‌های مسیر گلیکولیز می‌باشد و گیاه با بکارگیری این آنزیم‌ها و استفاده از فرایند تنفس سلولی انرژی مورد نیاز خود را تامین می‌کند. پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیر زنده بوسیله تغییر در بیان ژن‌های دخیل در تنش صورت می‌گیرد و همچنین تنش‌های محیطی موجب القای بیان آنزیم گلیسر آلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز می‌شود. در مطالعات ریشه جو تحت تنش نیز افزایش پروتئین گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز مشاهده شده است (Mohamadiaza & Toorchi 2015).

### پروتئین‌های درگیر در فرآیندهای فتوسنتزی: لکه شماره ۱۳۰۱ تحت تنش کمبود آب متعلق به Ribulose

bisphosphate carboxylase/oxygenase activase می‌باشد که دارای کاهش بیان می‌باشد. تنش کمبود آب باعث کاهش متابولیسم، رشد، نمو و فتوسنتز گیاه می‌شود. تنش کمبود آب باعث کاهش معنی‌دار مقدار ریبولوز بی فسفات در برگ‌ها می‌شود که

در ارتباط با آسیمیلسیون کربن دی اکسید می‌باشند ولی ارتباطی با مقدار و فعالیت آنزیم روبیسکو ندارند. فعال کننده ربیولوز بی فسفات دکربوکسیلاز/اکسیژناز موجب کاربامیلایسیون گروه آمینی اسید آمینه لیزین با استفاده ATP و تشکیل ساختار کاربامات می‌شود که نهایتاً به فعال شدن آنزیم روبیسکو می‌انجامد. کاهش بیان لکه شماره ۱۳۰۱ می‌تواند حاکی از کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو تحت شرایط اسمزی باشد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم روبیسکو در برگ‌های سویا تحت تنش کمبود آب نشان داده است که فعالیت این آنزیم تحت تنش کمبود آب در مقایسه با شاهد حدود ۵۰ درصد کاهش پیدا می‌کند. لکه‌های ۱۵۰۲، ۳۴۰۲ و ۵۴۰۱ که متعلق به Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit می‌باشد طبق جدول ۲ تحت شرایط تنش دارای افزایش بیان می‌باشند. روبیسکو اکتیواز نقش اساسی در تمام سلسله موجودات بازی می‌کند. آنها ممکن است به عنوان مولکول‌های چاپرونی در کمک به تجمع یا جداسازی قطعات پروتئینی فعالیت داشته باشند. نقش اصلی این آنزیم حفظ فعالیت روبیسکو است. این آنزیم با هیدرولیز ATP، سایت فعال روبیسکو را از مهارکننده‌های قند فسفات‌های مانند ربیولوز ۱، ۵- بس فسفات دور نگه می‌دارد به طوری که CO<sub>2</sub> به وسیله کربومیلاسیون، آنزیم روبیسکو را فعال نگه می‌دارد. افزایش بیان روبیسکو اکتیواز در گیاه توت فرنگی (Gu et al. 2013) و گندم نیز تحت تنش سرما گزارش شده است و افزایش آن را مربوط به نقش این آنزیم در حفظ شکل فعال روبیسکو دانسته اند.

#### پروتئین‌های مرتبط با زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی: پروتئین Oxygen-evolving enhancer protein

شامل لکه شماره ۱۰۲ دارای کاهش بیان ولی لکه شماره ۳۱۰۶ دارای افزایش بیان می‌باشد. پروتئین Oxygen-evolving enhancer 2 شامل پلی‌پپتید ۳۳ کیلودالتونی فتوسیستم دو از کمپلکس Oxygen-evolving (OEC) گیاهی می‌باشد. بنابراین، در پایداری فتوسیستم ۲ (PS II) نقش دارد. علاوه بر این، این پروتئین نقش پایدار منگنز را از طریق ارتباط با کمپلکس منگنز OEC نیز بر عهده دارد. عبارت دیگر حاصل فعالیت این پروتئین تولید اکسیژن در چرخه انتقال الکترون می‌باشد. این پروتئین در پلاستید، کلروپلاست و غشای تیلاکوئید کلروپلاست یافت می‌شود. در طی یکسری مطالعات بر روی ذرت تحت تنش‌های مختلف گزارش کردند که پروتئین‌های کلیدی فتوسنتزی که شامل ربیولوز ۱، ۵- بی فسفات، روبیسکو زیر واحد کوچک، Oxygen-evolving enhancer 2 پروتئین و Rubisco activase A کاهش قابل توجهی در بیان داشته‌اند (Li et al. 2019). لکه شماره ۲۶۰۱ به عنوان پروتئین ATP-سنتاز زیر واحد بتا-میتوکندری شناسایی شد، که با انتقال الکترون-میتوکندریایی، در ژنوتیپ گندم رقم صدرا بیان آن تحت تنش کمبود آب افزایش یافته است. پاسخ گیاهی به خشکی باعث افزایش نیاز برای تولید انرژی می‌شود. ATP-سنتاز میتوکندری مجموعه آنزیم کلیدی متابولیسم انرژی است که برای سلول ATP تامین می‌کند. واحدهای این آنزیم در شرایط تنش بیش از حد بیان می‌شوند و انرژی اضافی مورد نیاز را برای حفظ هموستازی سلولی فراهم می‌کنند (Moghadam et al. 2012). در یکسری از مطالعات بر روی چندین رقم کلزا میزان ATP-سنتاز زیر واحد بتا در یکسری از گونه‌های کلزا از جمله *Cyclone*، *Bulbul-98*، *CON-III* افزایش بیان و در یکسری از جمله *Faisal canola* و *CON-II*

کاهش بیان داشته‌اند (Javed et al. 2019). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ATP-سنتاز در برگ‌های تحت تنش کمبود آب نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه ایفا می‌کند. در مطالعات دیگر نیز بیان پروتئین ATP-سنتاز زیر واحد بتا افزایش یافته است (Kamran 2021). لکه شماره ۳۷۰۲ جز پروتئین ATP-سنتاز زیر واحد آلفا شناخته شد. با توجه به جدول ۲ در تحقیق حاضر و در برگ گندم رقم صدرا این پروتئین دارای کاهش بیان می‌باشد. ATP-سنتاز CF-CF<sub>1</sub> موجود در غشای تیلاکوئید نقش کاتالیز مراحل انتهایی فسفریلاسیون نوری و تولید ATP از گرادیان الکتروشیمیایی پروتون در دو سمت غشا را برعهده دارد. ساختار مولکولی این آنزیم در اندامک‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی به شدت محافظت شده است. این آنزیم دارای دو بخش مجزا است، یک بخش هیدروفیل یا قسمت CF<sub>1</sub> که دارای جایگاه اتصال نوکلئوتید بوده و تولید ATP را کاتالیز می‌کند و بخش هیدروفوب یا قسمت CF<sub>0</sub> که کانالی برای حرکت پروتون‌ها از عرض غشا می‌باشد (Ni et al. 2019). در یکی از مطالعات اخیر بر روی برگ رقم حساس *Starozagorski čern* و مقاوم *Tiber* لوبیا چیتی تحت تنش کمبود آب دریافتند که مقدار ATP-سنتاز زیر واحد آلفا و کمپلکس فتوسنتز I و II کاهش یافته که ممکن است نشانگر سرکوب واکنش‌های نوری باشد (Zadražnik et al. 2019). در آزمایشات پروتئوم بر روی برگ کلزا تحت تنش ATP-سنتاز زیر واحد آلفا دارای کاهش بیان بوده‌است که در تولید ATP از ADP در حضور پروتون (H<sup>+</sup>) در سراسر غشا کلروپلاست نقش اساسی دارد (Dolatabadi et al. 2018). پروتئین شماره ۷۳۰۴ جز خانواده اکسیدوردوکتاز می‌باشد، که مطابق جدول ۲ دارای افزایش بیان می‌باشد. از آنجایی که عدم انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی موجب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود، احتمالاً با افزایش تنش کمبود آب بیان آنزیم فرودوکسین اکسیدوردوکتاز افزایش پیدا می‌کند تا از ایجاد ROSها ممانعت شده و از این طریق آسیب وارده به غشای سلولی را کاهش دهد. فرودوکسین NADP<sup>+</sup> اکسیدوردوکتاز (FNR) انتقال الکترون‌ها بین فرودوکسین و NADP<sup>+</sup> انجام می‌دهد. در بررسی اثر تنش کمبود آب بر روی آرابیدوپسیس گزارش کردند که بیان پروتئین‌های FNR (فرودوکسین-NADP اکسیدوردوکتاز) کاهش نشان می‌دهد. در دیگر مطالعات بر روی دانه گندم تحت تنش گرما دریافتند که به دلیل کاهش فتوسیستم I میزان بیان FNR کاهش می‌یابد (Luo et al. 2018).

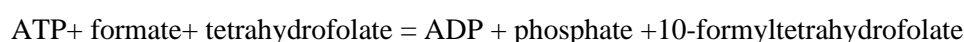
**پروتئین‌های درگیر در چرخه‌ی کالوین:** لکه‌های شماره‌ی ۱۶۰۲ و ۸۶۰۳ جزو زیر واحدهای بزرگ روبیسکو می‌باشد. در برگ گندم در شرایط تنش کمبود آب پروتئین شماره ۱۶۰۲ افزایش بیان و شماره ۸۶۰۳ کاهش بیان نشان داده‌است. روبیسکو آنزیم کلیدی مسئول تثبیت کربن فتوسنتزی است و فراوان‌ترین پروتئین در گیاهان می‌باشد و ۱۲ الی ۳۵ درصد از کل پروتئین‌های برگ و ۵۰ درصد از پروتئین‌های محلول را به خصوص در گیاهان C<sub>3</sub> تشکیل می‌دهد (Zhang et al. 2014). زیر واحد بزرگ روبیسکو در فرآیندهایی مانند مرگ سلولی، تا خوردگی پروتئین‌ها، عکس العمل به تغییر دما و مقاومت اکتسابی نقش ایفا می‌کند (Janmohammadi et al. 2014). بیان پروتئین زیر واحد بزرگ روبیسکو در رقم گندم بهار تحت تنش خشکی در چرخه کالوین مشاهده شده است (Naghavi, Toorchi & Zolla 2020). لکه‌ی شماره ۲۴۰۲ Rubisco activase A است که در



چرخه کالوین دارای افزایش بیان می‌باشد. در مطالعات اخیر بر روی گندم رقم حساس و مقاوم تحت تنش گرما دریافتند که در رقم مقاوم، میزان روبیسکو اکتیواز در طول گرده افشانی افزایش یافته و حضور این آنزیم خالص در تجدید حیات گیاه بسیار مفید بوده است (Kumar et al. 2019). در گندم رقم بهار تحت تنش خشکی پروتئین روبیسکو اکتیواز A جزو بیشترین پروتئین‌ها در چرخه کالوین می‌باشد (Naghavi et al. 2020). همچنین در بررسی گندم رقم کویر و بهار تحت تنش آب مشاهده شده است (Maghsoudlou et al. 2014). لکه شماره ۸۳۰۶ که دارای کاهش بیان در گندم رقم صدرا می‌باشد به جزو پروتئین‌های فروکتوز ۶-۱ بی فسفات آلدولاز است. با توجه به نقش این آنزیم در تثبیت کربن و انتقال الکترون فتوسنتزی در چرخه کالوین و کاهش بیان آن در رقم صدرا بیانگر توانایی کمتر این رقم در تولید آنزیم مذکور دارد. در مطالعات بر روی گوجه فرنگی تحت تنش گرما دریافتند که فروکتوز ۱-۶ بی فسفات آلدولاز که یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در چرخه کالوین می‌باشد نقش مهمی در فتوسنتز و پاسخ به تنش دارد. در این مطالعه با انتقال RNAi وکتور *SIFBA7* به لاین اینبردگوجه فرنگی و انجام توالی پشت‌سر هم، تحت تنش، دریافتند که با کاهش بیان *SIFBA7*، میزان فروکتوز ۱-۶ بی فسفات آلدولاز مانند دیگر آنزیم‌های اصلی چرخه کالوین کاهش می‌یابد (Cai et al. 2018). در یکی دیگر از مطالعات بر روی دانه‌ی گندم تحت تنش گرما دریافتند که میزان فروکتوز ۱-۶ بی فسفات آلدولاز در رقم حساس نسبت به مقاوم به دلیل کاهش کمپلکس فتوسنتزی I کاهش یافته است کربن مهم‌ترین فرآیند فتوسنتز می‌باشد (Luo et al. 2018).

### پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربن ۱: لکه‌های شماره ۴۷۰۱ و ۴۷۰۲ به عنوان پروتئین‌های درگیر در متابولیسم

کربن ۱ شناسایی گردیدند و هردو پروتئین دارای کاهش بیان معنی‌دار بودند. پروتئین Formate-tetrahydrofolate ligase در تبادلات مسیر تتراهیدروفولات دخیل هستند که بخشی از متابولیسم کربن ۱ است و در متابولیسم آمینواسیدها و نوکلئوتیدها درگیر هستند. پروتئین Formate-tetrahydrofolate ligase واکنش زیر را کاتالیز می‌کند:



### پروتئین‌های درگیر در مهارکننده ROS و سم‌زدایی: 2-cys peroxiredoxin از جمله آنزیم‌هایی می‌باشد که در

سم‌زدایی نقش دارند. لکه شماره ۸۱۰۱ جزو این پروتئین‌ها می‌باشد که دارای کاهش بیان می‌باشد. پروتئین‌های peroxiredoxin به صورت گسترده در بافت‌ها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و سیتوسل یافت می‌شوند. مکان سلولی این پروتئین‌ها بیانگر آن است که نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندامک‌های سلولی که منبع اصلی ROS هستند، ایفا می‌کنند در ضمن علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل انتقال سیگنال هم فعال هستند. در بسیاری از مطالعات پروتئین peroxiredoxin به عنوان پاسخ دهنده به تنش‌ها مطرح شده اند. در بررسی پروتئوم‌های برگ گندم در دو رقم مغان (مقاوم) و پیشتاز (حساس) تحت تنش کمبود آب دریافتند که میزان بیان 2-cys peroxiredoxin bas1 در رقم مقاوم افزایش بیان و در رقم حساس دارای کاهش بیان می‌باشد (Khalili et al. 2018). لکه پروتئینی شماره ۱۸۰۳ پروتئین Late embryogenesis abundant protein (LEA) شناسایی شده در این مطالعه، می‌باشد که دارای افزایش بیان است. این پروتئین‌ها در دانه‌های در حال بلوغ، سنتز و ذخیره‌سازی

می‌شوند. این پروتئین‌ها غنی از آمینواسیدهای آب‌دوست بوده و بسیار پایدار هستند. وظایف پروتئین‌های LEA تحت شرایط تنش: ۱- حفاظت از ساختار سلولی ۲- محافظت از غشاها و پروتئین‌ها و ۳- بازگرداندن پروتئین‌های دناتوره شده به فرم طبیعی می‌باشند. تنش کمبود آب، شوری و سرما، تجمع پروتئین‌های LEA فراوان در مرحله جنین‌زایی و شبیه آن‌ها را تحریک می‌کنند. برای شناسایی الگوی بیانی این پروتئین در شرایط تنش، ریزآرایه‌های ژن *TaLEA* در گندم آنالیز شد و دریافتند که تمام ژن‌های LEA حداقل در یک نوع تنش بیان شد. ۱۳۹ ژن از آن در تمام تنش‌ها بیان شدند. در مجموع ۱۷۷ ژن *TaLEA* تحت تنش کمبود آب بیان شده که ۵۰ تا از آنها افزایش بیان داشتند. پنج روز پس از تنش کمبود آب بیشترین افزایش بیان متعلق به *TaDHN18*، *TaDHN31* و *TaDHN23* بوده‌است (Liu et al. 2019). در ریشه گندم تحت تنش شوری نیز بیان LEA نیز افزایش یافته است (Akbari & Toorchi 2016). در پنبه‌های مورد مطالعه‌ی تحت تنش کمبود آب نیز میزان بیان LEA افزایش یافت (Magwanga et al. 2018).

**پروتئین درگیر در ساختار سلولی:** پروتئین Germin-Like، در طی جونه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. در گندم رقم صدرا نیز لکه شماره ۶ جزو این پروتئین‌ها است که دارای افزایش بیان است. در بررسی میزان بیان Germin-Like در گندم *Triticum aestivum* تحت تنش کمبود آب دریافتند که Germin-Like یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی گیاهان عالی است و از طریق تقویت دیواره سلولی و جلوگیری از آسیب بافت، نقش مهمی در دفاع گیاهان دارند. در بررسی‌ها مشاهده کردند که پروتئین فوق در ریشه تحت تنش کمبود آب رقم متحمل ابتدا افزایش و سپس کاهش بیان داشته است. در حالی که در بافت برگ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد و در رقم حساس در بافت برگی تحت شرایط شاهد کاهش بیان نشان داد (Keskin 2019).

**پروتئین‌های متفرقه:** از بین پروتئین‌های شناسایی شده چند لکه به عنوان پروتئین‌های متفرقه شناسایی شدند. که این لکه‌ها شامل ۱۷۰۳، ۲۳۰۱ و ۷۱۰۳ می‌باشند و نام‌های آنها به ترتیب لکه شماره ۱۷۰۳، Mitogen-activated protein kinase، ۲۳۰۱، 50s ribosomal protein L4، Putative، ۷۱۰۳، و لکه شماره ۷۱۰۳، Glutathion S-transferase 1 (GSTU1) دارای کاهش بیان می‌باشند. نقش این پروتئین‌ها در شرایط تنش کمبود آب هنوز به طور کامل مشخص نشده است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که در گندم رقم صدرا میانگین صفات سطح برگ، طول بوته، حجم ریشه، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نشان دادند. تجزیه پروتئوم بافت برگی از طریق الکتروفورز دوبعدی و رنگ‌آمیزی به روش آبی‌کوماسی منجر به تشخیص تعداد ۱۳۶ لکه پروتئینی تکرارپذیر در هر کدام از ژل‌ها شد. از بین این لکه‌های پروتئینی تعداد ۲۴ لکه دارای تفاوت بیان معنی‌دار در شرایط تنش نسبت به شاهد بودند. با شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان توسط طیف سنجی جرمی مشخص شد که این پروتئین‌ها در فرایند گلیکولیز، فتوسنتزی،

زنجیره انتقال الکترون فوتوسنتزی، چرخه کالوین، متابولیسم کربن، مهارکننده ROS و سم‌زدایی، ساختار سلولی و تنش دخالت دارند. پروتئین‌های فسفوگلیسیرات کیناز، گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز، ریبولوز ۱، ۵- بی فسفات، ATP-سنتاز زیر واحد بتا- میتوکندری، فرودوکسین  $NADP^+$  اکسیدوردوکتاز، زیر واحدهای بزرگ روبیسکو، روبیسکوآکتیواز، Late embryogenesis abundant protein، Germin-Like protein، Mitogen-activated protein kinase و 50s ribosomal protein در شرایط تنش خشکی دارای افزایش بیان بودند و نشان‌دهنده اهمیت این دسته از پروتئین‌ها در کاهش اثر تنش اکسیداتیو این رقم تحت شرایط تنش است.

**سپاسگزاری:** از دانشگاه تبریز برای حمایت مالی و تامین تجهیزات آزمایشگاهی لازم جهت اجرای پژوهش حاضر قدردانی

می شود.

## منابع

- دولت‌آبادی نیما، تورچی محمود، ولیزاده مصطفی، بنده حق علی (۱۳۹۶) بررسی پروتئوم برگ کلزای بهاره تحت تنش شوری. مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، ۶(۱)، ۶۵-۷۵.
- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن MYH7 در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.
- محمدآبادی محمدرضا، گلکار افروز، عسکری حسنی مجید (۱۴۰۲) اثر رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن فاکتور ۱ رشد شبه انسولین در بافت شکمبه گوسفند کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۲۳۹-۲۵۶.

## References

- Abhinandan K, Skori L, Stanic M, et al. (2018) Abiotic stress signaling in wheat—an inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat. *J Front Plant Sci* 9, e734.
- Akbari M, Toorchi M (2016) Proteome analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) root under sodium chloride stress. *J Biod Env Sci* 8(4), 209-220.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016a) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iran J Appl Anim Sci* 6 (3), 571-579 .
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016b) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, 487.

- Bates LS, Waldren Ra, Teare I (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. J Plant Soil 39, 205-207.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. Animals 12 (9), e1103.
- Cai B, Li Q, Liu F, et al. (2018) Decreasing fructose-1, 6-bisphosphate aldolase activity reduces plant growth and tolerance to chilling stress in tomato seedlings. Physiol Plant 163, 247-258.
- Dolatabadi N, Toorchi M, Valizadeh M, Bandehhagh A (2018) The proteomic analysis of leaf in Rapeseed (*Brassica napus* L) under salt stress. Gen Eng Bios J 9, 64-51 (In Persian).
- Food Outlook – Biannual report on global food markets (2023). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 11-16,
- Ghasemi M, Toorchi M, Aharizad S, Khorshid A (2021) Evaluation of Biochemical Indices to Introduce Superior Genotypes of Sugar Beet (*Beta Vulgaris* L.) under Water Deficit Stress. J Crop Breed 13, 219-227.
- Gu X, Gao Z, Zhuang W, et al. (2013) Comparative proteomic analysis of rd29A: RdreB1BI transgenic and non-transgenic strawberries exposed to low temperature. J Plant Physiol 170, 696-706.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S. and Hosseini Salekdeh, G. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics, 5(4): 950-960.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. Agri Biotechnol J 15 (1), 217-234 (In Persian).
- Janmohammadi M, Mock H-P, Matros A (2014) Proteomic analysis of cold acclimation in winter wheat under field conditions. Icel Agric Sci 27, 3-15.
- Javed M, Zafar ZU, Ashraf M (2019) Leaf proteome analysis signified that photosynthesis and antioxidants are key indicators of salinity tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Pak J Bot 51, 1955-1968.
- Kamal AHM, Kim K-H, Shin K-H, et al. (2010) Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. Aust J Crop Sci 4, 196-208.
- Kamran RV, Toorchi M, Moghaddam M, Mohammadi H. (2021) The proteomic analysis of spring barley leaves under short-term cold stress. Int J Plant Biol Res 1, 67-78.
- Keskin BC (2019) Quantitative mRNA Expression Profiles of Germin-Like and Extensin-Like Proteins under Drought Stress in Triticum aestivum. Int J Life Sci Biotechnology 2, 95-107.

- Khalili M, Naghavi MR, Yousefzadeh S (2018) Protein pattern analysis in tolerant and susceptible wheat cultivars under salinity stress conditions. *Acta Agric Slov* 111, 545–558.
- Khalily M (2016) Study of the effect of drought stress on protein patterns and morpho-physiological traits in plants. *J of Biosafety* 9, 22-33.
- Kumar RR, Goswami S, Dubey K, et al. (2019) RuBisCo activase—a catalytic chaperone involved in modulating the RuBisCo activity and heat stress-tolerance in wheat. *J Plant Biochem Biotechnol* 28, 63-75.
- Li Y, Cui J, Zhao Q, et al. (2019) Physiology and proteomics of two maize genotypes with different drought resistance. *Biol Plant* 63, 519-528.
- Liu H, Xing M, Yang W, et al. (2019) Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Sci Rep* 9, 13375.
- Luo Y, Liu H, Fan Y et al. (2018) Comparative chloroplast proteome analysis of exogenously supplied trehalose to wheat seedlings under heat stress. *Photosynthetica* 56, 1123-1133.
- Maghsoudlou AR, Toorchi M, Shakiba MR (2014) Comparative analyses of wheat leaf proteome under drought stress using 2D-PAGE. *J Biodivers Environ Sci* 5, 291-298.
- Magwanga RO, Lu P, Kirungu JN, et al. (2018) Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet* 19, 1-31.
- Michaletti, A., Naghavi, M.R., Toorchi, M., Zolla, L. and Rinalducci, S. (2018) Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci Rep*, 8(1): 5710.
- Moghadam A, Taghavi S, Niazi A, et al. (2012) Isolation and in silico functional analysis of MtATP6, a 6-kDa subunit of mitochondrial F. *Genet Mol Res* 11, 3547-3567.
- Mohamadiaza M, Toorchi M (2015) The proteome response of barley root (*Hordeum vulgare* L.) to cold stress. *J Biodivers Environ Sci*, . 7, 6, 153-161.
- Mohamadipoor L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17 (1), 1-9.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agri Biotechnol J* 15 (4), 239-256 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Kheyroodin H, Afanasenko V, et al. (2024) The role of artificial intelligence in genomics. *Agri Biotechnol J* 16 (2), 195-279.
- Mohammadabadi MR, Asadollahpour Nanaei H (2021) Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agri Biotechnol J* 13(1), 197-214.

- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12 (24), 3471.
- Naghavi MR, Toorchi M, Zolla L (2020) Evaluation of Protein Pattern and Tolerance Mechanism in Two Cultivars of Wheat under Drought Stress in Seedling Stage. *J Crop Breed* 12, 42-56.
- Ni S, Zhou Y, Chen Y, et al. (2019) Identification of ATP synthase  $\alpha$  subunit as a new maternal factor capable of protecting zebrafish embryos from bacterial infection. *FASEB J* 33(11):12983-13001. doi: 10.1096/fj.201901290R.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13 (1), e14.
- Shahbazi S, Toorchi M, Moghaddam M, et al. (2023) Effect of salinity stress on the root proteome pattern of spring bread wheat. *J Plant Physiol Breed*, 119-139.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption on insulin-like growth factor 1 gene expression in the liver tissue of growing lambs. *Gene Expr* 21 (2), 21-26. doi.org/10.14218/GE.2022.00017
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyroodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agri Biotechnol J* 15 (2), 217-236 (In Persian).
- Toorchi M, Yukawa K, Nouri M-Z, Komatsu S (2009) Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. *Peptides* 30(12):2108-17. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.006.
- Valizadeh-Kamran R, Toorchi M, Moghaddam M, Mohammadi H (2015) Proteomic Analysis of Spring Barley Leaves Under Short Term Cold Stress. *Genet Eng Biosaf J* 4, 67-78 (In Persian).
- Xiong J, Sun Y, Yang Q, et al. (2017) Proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Sci* 15:19. doi: 10.1186/s12953-017-0127-z.
- Zadražnik T, Moen A, Šuštar-Vozlič J (2019) Chloroplast proteins involved in drought stress response in selected cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *3 Biotech* 9(9):331. doi: 10.1007/s13205-019-1862-x.
- Zang X, Komatsu S (2007) A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry* 68, 426-437.
- Zhang M, Lv D, Ge P et al. (2014) Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J proteomics* 109, 290-308.