



بررسی پروتئوم برگ کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط تنش شوری

نیما دولت‌آبادی^۱، محمود تورچی^{۲*}، مصطفی ولیزاده^۲، علی بنده‌حق^۳

^۱ دانشجوی دکتری گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

^۲ استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

^۳ دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۷

چکیده

شوری به عنوان یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی تولید محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک را به شدت کاهش می‌دهد. کلزا به دلیل کیفیت بالای روغن دانه، مقادیر زیاد اسیدهای چرب اشباع نشده و عملکرد بیشتر روغن در واحد سطح نسبت به دیگر دانه‌های روغنی، برتری دارد. گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری، پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیم‌های مسیره‌ای متابولیکی با تنش وارد شده مقابله می‌کنند. جهت شناسایی مکانیسم‌های مولکولی تحمل تنش شوری، تغییرات بیان پروتئین‌های رقم حساس Option500 تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. شوری از نوع کلرید سدیم با سطوح صفر (شاهد)، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، پتاسیم برگ و نسبت K^+/Na^+ برگ و از طرفی باعث افزایش میزان سدیم و پرولین برگ گردید. با انجام الکتروفورز دو بعدی ۱۱۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شناسایی شد، که از بین آنها ۴۴ لکه براساس شاخص فاکتور القا (Induction Factor)، دارای تغییرات بیان معنی‌دار بودند، که هفت لکه پروتئینی همچنین در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شدند. به طور کلی یک لکه افزایش بیان و شش لکه کاهش بیان نشان دادند. با روش طیف سنجی LC-MS/MS این پروتئین‌ها، که در چرخه تولید انرژی و فتوسنتز نقش کلیدی ایفا می‌کنند، شناسایی شدند. در این پژوهش نقش احتمالی پروتئین‌های شناسایی شده در واکنش به تنش شوری مورد بحث قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: کلزا، پروتئومیکس، تنش شوری، الکتروفورز دو بعدی، طیف سنجی جرمی LC-MS/MS.

مقدمه

به اینکه شوری آب و خاک از مهمترین عوامل محدود کننده تولید کلزا به شمار می‌روند (Purty *et al.*, 2008)، اصلاح و به کارگیری ارقام متحمل به تنش شوری می‌تواند راهکاری مناسب جهت حفظ میزان تولید در مواجهه با تنش شوری باشد (Ashraf & Akram, 2009). بنابراین دستیابی به ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. قبل از شروع و اجرای هر برنامه اصلاحی در جهت شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش شوری، شناسایی خصوصیات منعکس کننده مقاومت به شوری در گیاهان و ژنوتیپ‌های آنها مهم خواهد بود (Ashraf, 2004; Gupta & Huang, 2014; Parihar *et al.*, 2014). از اثرات مهم تنش شوری تأثیر آن بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است. شوری، جوانه‌زنی بذرهای اکثر گیاهان زراعی را کاهش داده و یا به تأخیر می‌اندازد (Läuchli & Grattan, 2007; Farhoudi, 2011; Benincasa *et al.*, 2013). همچنین تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای موجب کاهش صفات رشدی نظیر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن و سطح ویژه برگ می‌شود (Miyamoto *et al.*, 2012; Haq *et al.*, 2014). با اینکه تنش شوری تمام مراحل رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای به عنوان حساس‌ترین

شوری خاک مشکلی جهانی است که از طریق تأثیر بر رشد گیاه و محدود کردن بهره برداری از زمین‌های زراعی، تولید محصولات کشاورزی را با مشکل مواجه ساخته است (Joseph *et al.*, 2010). شوری به عنوان یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده در مناطق خشک و نیمه خشک، میانگین عملکرد گیاهان زراعی را تا حدود ۵۰٪ کاهش می‌دهد (Kandil *et al.*, 2012).

دانه‌های روغنی بعد از غلات و حبوبات، جایگاه سوم را در تامین نیازهای غذایی بشر بر عهده دارند و در این بین گونه‌های روغنی متعلق به جنس براسیکا رتبه سوم را در بین دانه‌های روغنی به خود اختصاص داده‌اند (Shirazi *et al.*, 2011). دانه‌های کلزا دارای پروتئین و لیپید بالایی بوده و به خاطر مقدار کم اسید چرب اشباع شده (کمتر از ۴ درصد اسید پالمیتیک) و مقدار نسبتاً زیاد اسید اولئیک (۶۰ درصد) و آلفالینولنیک (۹ درصد) در مقایسه با روغن‌های آفتابگردان، ذرت و سویا از کیفیت تغذیه‌ای بالاتری برخوردارند (Gunstone, 2004). برای استفاده بهینه از خاک‌های مناطق شور، کشت گیاهان و ارقام مقاوم به شوری، یکی از راهکارهای اساسی کنترل شوری به حساب می‌آید، زیرا اصلاح خاک‌های شور به زمان بیشتری احتیاج دارد و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. با توجه

یکسری از مواد تنظیم کننده آلی (مثل پرولین) و یا معدنی (مثل Na^+ و K^+) در سلول اتفاق می افتد که جذب آب به درون سلول را موجب شده (Shirazi *et al.*, 2011) و تورژسانس سلول حفظ می گردد (Nayyar, 2003). لازم به توضیح است که جذب یونهای پتانسیم و سدیم تنظیم اسمزی را به صورت کم هزینه تری میسر می کند (Morant-Manceau *et al.*, 2004). مواد آلی محلول همانند مواد قندی، اسیدهای آلی، پلیولها و بسیاری از ترکیبات حاوی نیتروژن مانند اسیدهای آمینه، آمیدها، پروتئینها و ترکیبات آمونیوم در تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیمی گونه های گیاهی حضور فعال و مفیدی دارند و بنابراین، چنین مواد آلی اسمزی می توانند نقش مهمی را در تحمل تنش شوری بر عهده داشته باشند. از آزمایشات اثر شوری بر گیاهان و عکس العمل گیاهان نسبت به این تنش چنین استنباط می شود که اسید آمینه های آزاد در بین محلول های تنظیم کننده اسمزی آلی، نقش حیاتی تری را بر عهده دارند (Ashraf & McNeilly, 2004). پرولین نیز بیشتر از سایر اسیدهای آمینه در گیاهان تحت تنش، یافت می شود (Giannakoula & Ilias, 2013)، و این اسید آمینه در تنظیم تجمع نیتروژن قابل مصرف، تنظیم اسمزی و نیز پایداری غشا نقش مهمی بر عهده دارد (Parida & Das, 2005).

گیاهان به دلیل عدم تحرک در طول چرخه زندگی خود در معرض انواع تنش های محیطی

مرحله های رشدی در اکثر گونه های زراعی شناخته می شوند (Munns, 2002; Athar *et al.*, 2009). میزان فتوسنتز و تعرق، هدایت روزنه ای، میزان کلروفیل و شاخص سطح برگ با افزایش میزان سدیم خاک کاهش می یابند. کاهش میزان فتوسنتز در شرایط تنش شوری می تواند به علت کم شدن هدایت روزنه ای، اختلال در فرآیندهای متابولیکی بویژه جذب کربن، بازدارندگی در ظرفیت های فتوشیمیایی و یا ترکیبی از این موارد باشد (Ashraf & McNeilly, 2004). از دست دادن تورژسانس سلولی در اثر کاهش پتانسیل آبی خاک، موجب بسته شدن روزنه ها و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز می گردد (Gul *et al.*, 2014). ساخت کلروفیل نیز از جمله فرآیندهایی است که تحت تأثیر غلظت بالای نمک قرار گرفته و میزان فتوسنتز و تولید انرژی در گیاه را تحت تأثیر قرار می دهد (Jamil *et al.*, 2014). غلظت بالای کاتیون هایی مثل Na^+ که از عناصر اصلی شوری هستند در بافت های گیاهی فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کرده و یا حتی می توانند از انجام آنها ممانعت به عمل آورده و سنتز پروتئین های لازم را دستخوش تغییرات کمی و کیفی نمایند، که به نوبه خود باعث اختلال در فرآیند رشد می گردد. از طرف دیگر وجود غلظت بالای یون سدیم تعادل غذایی را بر هم می زند و سمیت یونی و اختلال در تنظیم اسمزی را نیز بوجود می آورد (Ashraf & McNeilly, 2004). در پاسخ به تنش شوری، تنظیم اسمزی با تجمع

شناسایی پروتئین‌ها و مسیرهای مولکولی دخیل در ایجاد تحمل به تنش شوری از طیف‌سنجی جرمی به روش LC-MS/MS بهره‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ژنوتیپ حساس کلزای بهاره Option500 در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) به روش کشت هیدروپونیک در محیط گلخانه با دمای روزانه 25 ± 2 و شبانه 2 ± 15 درجه سانتی‌گراد، شدت نور ($PPFD^1$) حدود 1000 میکرومول بر متر بر ثانیه، و دوره روشنایی 14 ساعت در شبانه روز ارزیابی شد (Dolatabadi *et al.*, 2016). تیمار شوری از نوع کلرید سدیم در سه سطح صفر (شاهد)، 150 و 300 میلی‌مولار (mM)، یک هفته پس از استقرار گیاهچه‌ها در بستر کاشت به طور تدریجی (50 میلی‌مولار در روز) اعمال شد. 28 روز پس از اعمال تنش و در پایان مرحله رویشی صفات وزن خشک قسمت هوایی، ارتفاع بوته، میزان یون‌های سدیم و پتاسیم و پرولین برگ اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری پرولین برگ، برگ‌های شماره ۳ در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و داخل ازت مایع به فریزر 20°C انتقال یافتند. غلظت پرولین برگ به روش نین‌هیدرین^۲ (Bates, 1973) اندازه‌گیری شد.

نمونه‌های برگ شماره ۳ تحت شرایط شاهد و تیمار 300 میلی‌مولار کلرید سدیم، در

مانند خشکی، شوری، شرایط غرقابی، دماهای بالا، پایین و... قرار می‌گیرند، که این تنش‌ها معمولا باعث اختلالات پروتئینی می‌گردند (Joseph & Jini, 2010). گیاهان در مواجهه با شرایط تنش، با سنتز برخی متابولیت‌های ضروری بر تنش وارد شده غلبه می‌کنند (Turan *et al.*, 2012). این عمل از طریق تغییر بیان ژن‌ها در جهت کاهش و یا افزایش میزان پروتئین‌های خاص ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی صورت می‌گیرد (Joseph & Jini, 2010). رهیافت پروتئومیک ابزاری قدرتمند و مناسب جهت بررسی تغییرات بیان و شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی است (Joseph & Jini, 2010, Sobhanian *et al.*, 2011). تجزیه پروتئومیک یکی از بهترین راهبردها جهت بررسی دینامیک تظاهر پروتئین‌ها تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (Guo *et al.*, 2012). گیاهان قبل و بعد از تنش، اطلاعات زیادی در مورد چگونگی مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های محیطی ارائه می‌دهد (Kamal *et al.*, 2010). این پژوهش به منظور فهم بهتر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی تحمل به تنش شوری در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) کلزا از طریق بررسی و شناسایی تغییراتی که در اثر تنش شوری در سطح پروتئین‌های ساختاری یا آنزیمی مسیرهای متابولیکی رخ می‌دهد، با استفاده از رهیافت پروتئومیک طراحی و اجرا گردید. برای

¹ - Photosynthetic Photon Flux Density

² - Ninhydrin

بعد دوم به روش SDS-PAGE^۴ با ژل پلی-آکریلامید ۱۵ درصد با جریان ثابت ۳۵ میلی آمپر به ازای هر ژل در مدت زمان حدود ۲/۵-۳ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها پس از اتمام الکتروفورز بعد دوم با آبی کوماسی صورت گرفت.

تصویربرداری از ژل‌ها با استفاده از اسکنر Bio-Rad GS-800 بلافاصله بعد از رنگ‌زدایی انجام شد. سپس ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار PDQuest 8.0.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون t-استیودنت برای داده‌های کمی هر لکه توسط نرم‌افزار انجام و لکه‌های دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند. پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی که دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند، لکه‌های مورد نظر از روی ژل‌ها شناسایی و جهت انجام آزمایشات طیف‌سنجی جرمی به آزمایشگاه (Alberta Proteomics and Mass Spectrometry Facility) دپارتمان بیوشیمی در دانشکده پزشکی و دندانپزشکی دانشگاه آلبرتا در کانادا فرستاده شدند. نمونه‌ها با استفاده از روش LC-MS/MS طیف‌سنجی شده و لیستی از پروتئین‌ها بر اساس انطباق پپتیدهای شناسایی شده با توالی‌های پروتئینی موجود در بانک‌های اطلاعاتی توسط نرم‌افزار Sequest برای هر لکه ارائه گردید. از میان لیست پروتئین‌های ارائه شده برای هر لکه، پروتئینی انتخاب شد، که

سه تکرار به طور جداگانه داخل فویل آلومینیومی بسته‌بندی شده و داخل ازت مایع منجمد و تا استخراج پروتئین جهت الکتروفورز دو بعدی در فریزر °C ۸۰- نگهداری شد. وزن خشک قسمت هوایی بعد از خشک شدن نمونه‌ها بوسیله آن در دمای °C ۷۵ به مدت ۴۸ ساعت، تعیین گردید. اندازه‌گیری یون‌های Na⁺ و K⁺ نمونه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه فلاپم فتومتر (Model PFP/C, Germany) انجام شد. برای حل کردن نمونه‌های گیاهی از اسید نیتریک ۷/۲ نرمال و حرارت دادن روی بلوگ حرارتی استفاده شد.

استخراج پروتئین کل برگ به روش TCA/acetone (Salekdeh et al., 2002) با اندکی تغییر انجام شد (سانتریفوژ در ۲۰۰۰۰g و مرحله شستشو چهار بار تکرار گردید). تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر انجام شد (Bradford, 1976). پروتئین استخراج شده به مقدار ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ژل‌های بعد اول^۳ بارگذاری شد. برای این منظور ژل‌های لوله‌ای با اوره هشت مولار، پلی‌آکریلامید ۳/۵ درصد، NP-40 ۲ درصد، آمفولیت (۸-۵ و ۱۰-۳ pH:)، آمونیوم پرسولفات و TEMED تهیه شده از شرکت مرک (MERCK) آماده گردید. الکتروفورز بعد اول در سه مرحله (۲۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت) صورت گرفت.

4 - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

3 - Isoelectric Focusing

یکی از اسمولیت‌های مهم است که در گیاهان در معرض تنش شوری و خشکی سنتز شده و به-عنوان یک محافظ اسمزی در گیاه عمل می‌کند. تجمع پرولین در گیاه تحت تنش شوری به دلیل فعالیت کم آنزیم‌های اکسیداسیونی است (Sudhakar *et al.*, 2001). گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش میزان سدیم در بخش هوایی و ریشه و نسبت سدیم به پتاسیم در اندام هوایی و ریشه در اثر تنش شوری وجود دارد (Ashraf & McNeilly, 2004; Parida & Das, 2005). همین گزارش‌ها بیانگر کاهش میزان پتاسیم در بخش هوایی و ریشه بر اثر تنش شوری است که به دلیل رابطه آنتاگونیستی یون Na^+ با یون K^+ اتفاق می‌افتد، بطوری که حضور یون Na^+ به مقدار فراوان در محیط مانع جذب K^+ می‌شود.

الکتروفورز دو بعدی ژنوتیپ‌ها و تحلیل لکه‌های پروتئینی با استفاده از نرم افزار PDQuest منجر به شناسایی ۱۱۰ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر در هر کدام از ژل‌ها شد (شکل ۲). ۴۴ لکه از میان ۱۱۰ لکه شناسایی شده، براساس شاخص IF، تغییرات بیان معنی‌دار داشتند، که بعد از انجام آزمون t-student، هفت لکه پروتئینی شامل لکه‌ی ۲۴۰۵ با افزایش بیان و لکه‌های ۳۱۰۲، ۳۵۰۲، ۴۱۰۴، ۴۳۰۳، ۴۴۰۴، ۸۵۰۱ با کاهش بیان در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شدند (جدول ۲).

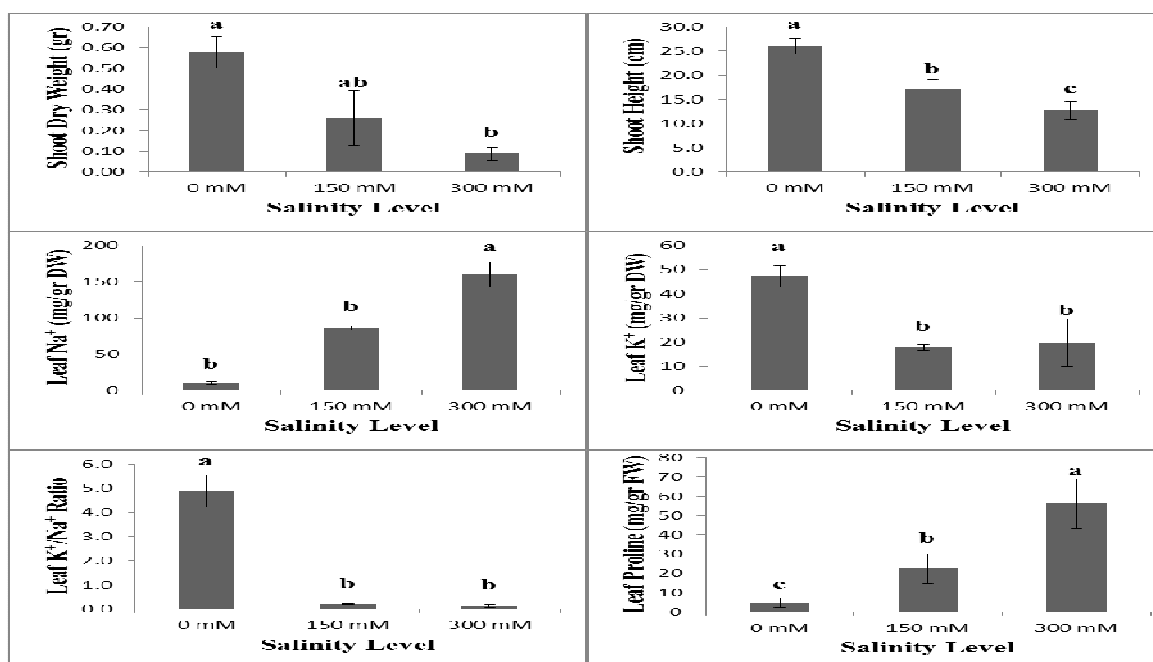
میزان هم‌پوشانی توالی پپتیدی شناسایی شده آن توسط طیف‌سنجی جرمی با توالی پروتئین موجود در داده پایگاه^۵ UniprotKB بیشتر بود.

تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم‌افزارهای کامپیوتری IBM SPSS، MSTAT-C و Statistics 23 و Excel 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین سطوح شوری از نظر همه صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). تغییرات صفات مورد مطالعه تحت تنش شوری در شکل ۱ نشان داده شده است. کاهش وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع بوته در اثر تنش شوری در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Mer *et al.*, 2000; Ashraf & McNeilly, 2004). در اثر تنش شوری، گسترش سطح برگ و ارتفاع خیلی سریعتر از شاخص‌های مورفولوژیکی دیگر کاهش می‌یابند (Bandehagh *et al.*, 2011; Hajiaghahi *et al.*, 2013). افزایش پرولین در بافت‌های گیاهی در اثر تنش شوری نیز توسط سایر محققین گزارش شده است (Sairam *et al.*, 2002; Ashraf & McNeilly, 2004).

⁵ - www.uniprot.org



شکل ۱- تأثیر تنش شوری (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار) بر وزن خشک بخش هوایی، ارتفاع بوته، میزان سدیم، پتاسیم، نسبت K^+/Na^+ و پرولین برگ ژنوتیپ کلزای بهاره Option500. حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 1- Effects of salt stress (0, 150 and 300 mM NaCl) on shoot dry weight, shoot height, Leaf Na⁺, Leaf K⁺, Leaf K⁺/Na⁺ ratio and Leaf Proline of option500. Columns with the same letters are not significantly different at (P>0.05) levels by Duncan's multiple range test.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ کلزای بهاره Option500 تحت تنش شوری.

Table 1- Analysis of variance for studied traits in Option500 under salinity treatments.

Source of variance	Degrees of freedom	Mean Square					
		Shoot dry weight	Shoot height	Leaf Na ⁺	Leaf K ⁺	Leaf K ⁺ /Na ⁺	Leaf Proline
Replication	2	0.008 ^{ns}	5.7 ^{ns}	271.3 ^{ns}	217.9 ^{ns}	0.488 ^{ns}	468.7 ^{ns}
Salinity (S)	2	0.264*	136.7*	16856.8**	805.6*	22.2**	2056.6**
Error	4	0.022	12.9	323.712	67.040	0.431	105.312
CV%		38.78	19.27	21.02	28.95	37.92	26.96

ns, * و **: بترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* Significant at the 5% probability level; ** significant at the 1% probability level; ns: Not significant.

جدول ۲- پروتئین‌های دارای اختلاف بیان معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ در پروتئوم برگ ژنوتیپ کلزای بهاره Option500.

Table 2- Identification of differentially expressed leaves proteins of Option500 after salt stress.

Spot ID	Protein name	Accession number *	Reference species	Cov. (%)	Theo.	Exp.	IF	Function
					pI/MW	pI/MW		
2405	Phosphoribulokinase	A0A078GC16	Brassica napus	72.29	5.77/44.4	5.5/41.30	14.46	Carbohydrate metabolic
3102	BnaA09g07850D protein	A0A078FW31	Brassica napus	40.93	5.72/23.5	5.92/22.05	0.48	Unknown
3502	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	D1L8P5	Brassica napus	36.75	5.26/53.7	5.82/50.68	0.19	ATP synthesis
4104	Triosephosphate isomerase	A0A078CJ83	Brassica napus	65.35	5.73/27.2	6.03/24.96	0.39	Glycolytic
4303	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	D1L8M3	Brassica napus	13.41	5.20/55.3	6.08/38.02	0.32	ATP synthesis
8404	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A078EFC4	Brassica napus	40.85	7.75/42.7	7.31/43.20	0.20	Glucose metabolic
8501	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Q71SX0	Brassica napus	56.58	6.29/52.9	6.62/52.76	0.22	Carbon fixation

* شماره دسترسی بر اساس داده پایگاه UniprotKB.

متداول در مواجهه با تنش شوری (Tanou *et al.*, 2009) در پژوهش‌های مختلف گزارش شده‌است (Bandeh-hagh *et al.*, 2008; Podda *et al.*, 2013). لکه‌های ۳۵۰۲ و ۴۳۰۳ به ترتیب مربوط به زیر واحد بتا و آلفا ATP سنتاز کلروپلاستی^۷ هستند که در تولید ATP از ADP در حضور پروتون (H⁺) در سراسر غشاء کلروپلاست نقش دارند. کاهش فعالیت این آنزیم در آزمایشات پیشین تحت تنش شوری گزارش شده‌است (Kang *et al.*, 2012; Banaei-Asl *et al.*, 2015). افزایش فعالیت این آنزیم تحت تنش‌های محیطی به عنوان یک راهکار مقابله با تنش

لکه ۳۱۰۲ که تحت تنش شوری کاهش بیان داشت، با اینکه پیش از این در گیاه کلزا گزارش شده است و در داده پایگاه^۶ UniprotKB دارای کد دسترسی می‌باشد، ولی هنوز شناسایی نشده است. بنابراین شناسایی دقیق‌تر ساختار و عملکرد آن مطمئناً به درک بهتر فرآیند تحمل در گیاه کلزا تحت تنش شوری کمک خواهد کرد. لکه ۲۴۰۵ که تحت تنش شوری افزایش بیان داشته، آنزیم فسفوریبولوکیناز می‌باشد که در چرخه تولید کربوهیدرات نقش دارد. کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی درگیر در چرخه کالوین مثل فسفوریبولوکیناز به عنوان یک راهکار

⁷ - ATP synthase subunit beta, chloroplastic

⁶ - Database

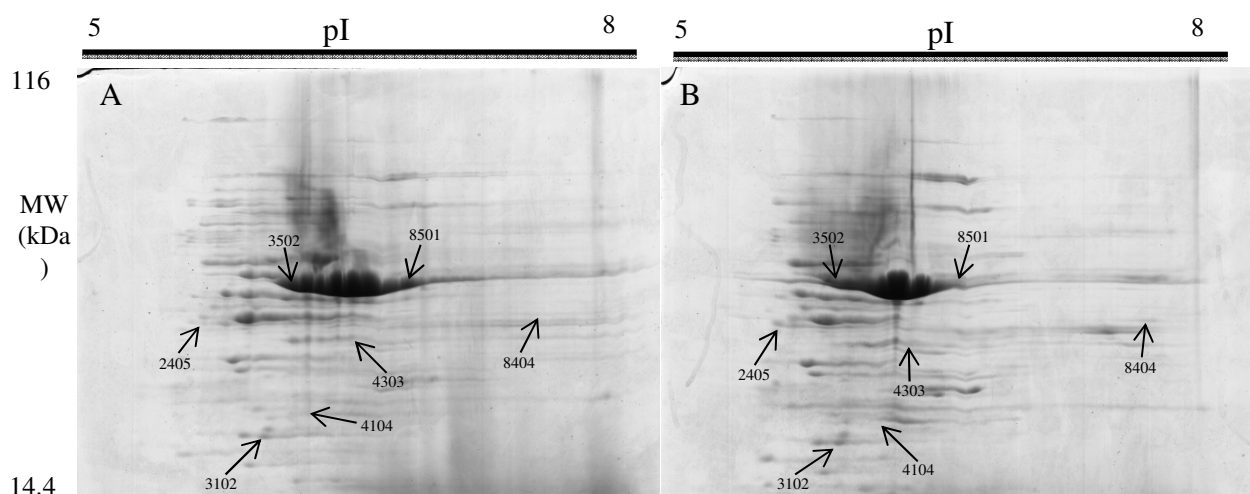
میزان آسمیلاسیون تحت تنش شوری در گیاهان RuBisCo، گلیکوفیت باعث کاهش فراوانی large/small subunit و به تبع کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو با افزایش تخریب زیر واحدهای آن می‌شود (Aghaei et al., 2008; Pang et al., 2010; Sobhanian et al., 2010; Bandehagh et al., 2011). برخی از گیاهان در مواجهه با تنش شوری نرخ تولید ATP را در جهت کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^10) که یکی از محصولات جانبی فرآیند تولید انرژی هستند، کاهش می‌دهند (Jiang et al., 2007). با این حال تولید بیشتر انرژی از یک طرف در مراحل اولیه به رشد سریع گیاه کمک می‌کند (Murad et al., 2014)، از طرف دیگر فعال‌سازی مسیرهای تولید انرژی جهت تامین انرژی مورد نیاز بیوستنز پروتئین‌های پاسخ دهنده و اسمولیت‌ها و به همان نحو انتقال فعال یون‌های نمک تحت تنش شوری لازم و ضروری می‌باشد (Banaei-Asl et al., 2015). در حالی که ژنوتیپ Option500 با کاهش تولید این آنزیم‌ها سعی در کاهش تولید انرژی و به تبع ROS ها دارد تا از اثرات مخرب تنش خود را حفظ کند، که این موضوع بیانگر تاثیرپذیری بیشتر این ژنوتیپ از اثرات افزایش نمک در محیط در اثر اعمال تنش شوری می‌باشد.

شناخته شده‌است (Khalili & Naghavi, 2017; Guo et al., 2012) و ارقام حساس کاهش فعالیت بیشتری را تحت تنش نشان می‌دهند (Huseynova et al., 2007). لکه ۴۱۰۴ مربوط به پروتئین تریوز فسفات ایزومراز، که در چرخه تولید انرژی نقش اساسی بر عهده دارد، کاهش بیان نشان داده است. کاهش بیان این پروتئین در تنش‌هایی که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند گزارش شده‌است (Sharma et al., 2012). لکه ۸۴۰۴ مربوط به پروتئین گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز^۸ از آنزیم‌های مهم مسیر آسمیلاسیون دی اکسید کربن می‌باشد که افزایش فعالیت آن تحت تنش‌های محیطی به عنوان یک راهکار موثر تحمل تنش (Tanou et al., 2009) در گندم (Kang et al., 2012)، سویا (Sobhanian et al., 2010) و ریشه کلزا (Banaei-Asl et al., 2015) گزارش شده‌است. لکه ۸۵۰۱ مربوط به آنزیم ریبولوز بیسفسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز^۹ (RuBisCO) می‌باشد، که نقش اساسی در چرخه تثبیت دی اکسید کربن برعهده دارد. کاهش فعالیت این آنزیم تحت تنش شوری قبلا در گندم (Gao et al., 2011) و کلزا (Toorchi et al., 2014) گزارش شده‌است. تنش شوری اثر مهمی بر متابولیسم انرژی گیاه دارد. تنش اسمزی باعث بسته شدن روزنه‌ها و کاهش دسترسی به دی اکسید کربن می‌شود. کم شدن

⁸ - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

⁹ - Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase

¹⁰ - Reactive oxygen species



شکل ۲- ژل‌های الکتروفورز دوبعدی برگ ژنوتیپ گلزای بهاره Option500 تحت شرایط فاقد تنش (A) و شوری ۳۰۰ میلی مولار (B). شماره لکه‌های با تغییرات بیان معنی‌دار که طیف‌سنجی شدند در ژل‌ها نشان داده شده‌اند.

Figure 2- Representative 2-DE gels of Option500 leaves under 0 (A) and 300 mM (B) NaCl treatment. Numbered spots correspond to salt-responsive proteins, which analyzed by LC-MS/MS.

نتیجه‌گیری

رویسکو تولید گلوکز با محدودیت روبرو است، به‌نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم فسفوریبولوکیناز تحت تنش شوری یکی از دلایل اصلی حساسیت این ژنوتیپ به تنش شوری باشد. بنابراین رویکرد این ژنوتیپ جهت مقابله با تنش موفق نبوده و کاهش شدید عملکرد این ژنوتیپ تحت تنش شوری را موجب شده است، که نتایج بررسی صفات فیزیولوژیکی ارزیابی شده در این پژوهش نیز حساس بودن این رقم را تأیید می‌کند.

ژنوتیپ Option500 با کاهش فراوانی آنزیم‌های درگیر در مسیر تولید انرژی سعی در مقابله با اثرات مخرب ROSها به‌عنوان محصولات جانبی فرآیند تولید انرژی دارد و با افزایش فراوانی آنزیم فسفوریبولوکیناز که یک آنزیم مهم در مسیر پنتوز فسفات است، تولید NADPH به‌عنوان یک کاهنده را افزایش داده است. از آنجایی که این مسیر وابسته به گلوکز ۶- فسفات می‌باشد، و با توجه به اینکه با بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به تنش اسمزی و کاهش دی‌اکسید کربن در دسترس و کاهش فراوانی آنزیم

- Aghaei K, Ehsanpour AA, Komatsu S (2008). Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research* 7: 4858–4868.
- Ashraf M (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 376: 361–376.
- Ashraf M, Akram NA (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances* 27: 744–752.
- Ashraf M, McNeilly T (2004). Salinity Tolerance in *Brassica* Oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 157–174.
- Athar HR, Ashraf M, Wahid A, Jamil A (2009). Inducing salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) by exogenous application of glycinebetaine and proline: Response at the initial growth stages. *Pakistan Journal of Botany* 41: 1311–1319.
- Banaei-Asl F, Bandehagh A, Uliaei ED, Farajzadeh D, Sakata K, Mustafa G, Komatsu S (2015). Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *Journal of Proteomics* 124: 88–111.
- Bandeh-hagh A, Toorchi M, Mohammadi A, Chaparzadeh N, Salekdeh GH, Kazemnia H (2008). Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 6: 201–208.
- Bandehagh A, Salekdeh GH, Toorchi M, Mohammadi A, Komatsu S (2011). Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics* 11: 1965–1975.
- Bates LS (1973). Rapid determination of free proline for water - stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207.
- Benincasa P, Pace R, Quinet M, Lutts S (2013). Effect of salinity and priming on seedling growth in rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Del.). *Acta Scientiarum. Agronomy* 35: 479–486.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254.
- Dolatabadi N, Toorchi M, Valizadeh M, Bandehagh A (2016). Effect of salinity stress on some physiological traits of spring rapeseed genotypes at seedling stage. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 9: 135–142.
- Farhoudi R (2011). Effect of Cold Stress on Germination and Growth of Wheat Cultivars. *Advances in Environmental Biology* 5: 2051–2508.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W, Yan Y (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72: 1180–1191.
- Giannakoula A, Ilias IF (2013). The effect of water stress and salinity on growth and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mil.). *Archives of Biological Sciences* 65: 611–620.
- Gul H, Ahmed R, Hamayun M, Qasim M (2014). Growth Performance of Canola Grown Under Different Salinity Regimes. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 4: 59–68.
- Gunstone FD (2004). Rapeseed and canola oil: production, processing, properties and uses. London: Blackwell Publishing Ltd. 222.
- Guo G, Ge P, Ma C, Li X, Lv D, Wang S, Ma W, Yan Y (2012). Comparative proteomic

- analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *Journal of Proteomics* 75: 1867–1885.
- Gupta B, Huang B (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* 2014.
- Hajiaghaei Kamrani M, Hosseiniya H, Azam R chegeni (2013). Effect of salinity on the growth characteristics Of canola (*Brassica napus* L.). *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 3: 2327–2333.
- Haq TU, Akhtar J, Ali A, Maqbool MM, Ibrahim M (2014). Evaluating the response of some canola (*Brassica napus* L.) cultivars to salinity stress at seedling stage. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 51: 571–579.
- Huseynova IM, Suleymanov SY, Aliyev JA (2007). Structural–functional state of thylakoid membranes of wheat genotypes under water stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767: 869–875.
- Jamil M, Rehman S ur, Rha ES (2014). Response of Growth, PSII Photochemistry and Chlorophyll Content to Salt Stress in Four *Brassica* Species. *Life Science Journal* 11: 139–145.
- Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany* 58: 3591–3607.
- Joseph B, Jini D (2010). Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 307–313.
- Joseph B, Jini D, Sujatha S (2010). Biological and physiological perspectives of specificity in abiotic salt stress response from various rice plants. *Asian Journal of Agricultural Sciences* 2: 99–105.
- Kamal AHM, Kim KH, Shin KH, Choi JS, Baik BK, Tsujimoto H, Heo HY, Park CS, Woo SH (2010). Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science* 4: 196–208.
- Kandil AA, Sharief AE, Abido WAE, Ibrahim MMO (2012). Response of some canola cultivars (*Brassica napus* L.) to salinity stress and its effect on germination and seedling properties. *Journal of Crop Science* 3: 95–103.
- Kang G, Li G, Zheng B, Han Q, Wang C, Zhu Y, Guo T (2012). Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824: 1324–1333.
- Khalili M, Naghavi MR (2017). Evaluation of spring canola cultivars in terms of some morphological and physiological traits under drought stress and proteome analysis of the most tolerant and susceptible ones. *Journal of Agricultural Biotechnology* 9: 59–82.
- Läuchli A, Grattan S (2007). Plant growth and development under salinity stress. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant*: 1–32.
- Mer RK, Prajith PK, Pandya DH, Pandey AN (2000). Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 209–217.
- Miyamoto S, Oster MF, Rostle CT, Lenn EG (2012). Salt Tolerance of Oilseed Crops during Establishment. *Journal of Arid Land Studies* 22: 147–151.
- Morant-Manceau A, Pradier E, Tremblin G (2004). Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of plant physiology* 161: 25–33.
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Environment* 25:239–250.
- Murad AM, Molinari HBC, Magalhães BS, Franco AC, Takahashi FSC, De Oliveira NG, Franco OL, Quirino BF (2014). Physiological and proteomic analyses of *Saccharum* spp.

- grown under salt stress. PLoS ONE 9: 1–12.
- Nayyar H (2003). Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental and Experimental Botany 50: 253–264.
- Pang Q, Chen S, Dai S, Chen Y, Wang Y, Yan X (2010). Comparative Proteomics of Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* research articles. Journal of Proteome Research 9: 2584–2599.
- Parida AK, Das AB (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324–349.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2014). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. Environmental Science and Pollution Research 22: 4056–4075.
- Podda A, Checcucci G, Mouhaya W, Centeno D, Rofidal V, Del Carratore R *et al.* (2013). Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na⁺ and Cl⁻ accumulation behaviour. Journal of Plant Physiology 170: 1101–1112.
- Purty RS, Kumar G, Singla-Pareek SL, Pareek A (2008). Towards salinity tolerance in *Brassica*: An overview. Physiology and Molecular Biology of Plants 14: 39–49.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava G. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163: 1037–1046.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002). A proteomic approach to analyzing drought-and salt-responsiveness in rice. Field Crops Research 76: 199–219.
- Sharma S, Mustafiz A, Singla-Pareek S, Shankar Srivastava P, Sopory S (2012). Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice. Plant Signaling & Behavior 7: 1337–1345.
- Shirazi MU, Rajput MT, ANSARI R, Khan MA, TAHIR SS (2011). Salt tolerance in *Brassica* species at early seedling stage. Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series) 43: 203–208.
- 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: 1323–1337.
- Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, Ehsanpour AA, Jazii FR, Motamed N, Komatsu S (2010). Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome science 8: 19-33.
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science 161: 613–619.
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. Plant Journal 60: 795–804.
- Toorchi M, Dolati M, Adalatzadeh-Aghdam S (2014). Differentially expressed proteins in canola leaf induced by salt stress-a proteomic approach. International Journal of Biosciences 5: 433–442.
- Turan S, Cornish K, Kumar S (2012). Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering. Australian Journal of Crop Science 6: 1337–1348.

The proteomic analysis of leaf in Rapeseed (*Brassica napus* L) under salt stress

Dolatabadi N.¹, Toorchi M.^{2*}, Valizadeh M.², Bandehagh A.³

¹ Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

² Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³ Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

Salinity is one of the most important problems in arid and semi-arid areas that causes serious decrement in agricultural productions. Rapeseed is a superior oilseed due to the high quality of oil, large amounts of polyunsaturated fatty acids and oil yield. To deal with abiotic stress conditions, plants synthesize some essential metabolites, special structural proteins or metabolic enzymes pathways to overcome the stress. To identify the molecular mechanisms of salt responsiveness in rapeseed, proteome changes of Option500 a salt-sensitive genotype under salt stress was studied. An increase in proline and the Na⁺ of leaf and a reduction in shoot dry weight, plant height, K⁺ and K⁺/Na⁺ were observed under salt stress (0, 150, 300 mM). Over 110 protein spots were identified by two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels. 44 spots showed significant expression changes based on induction factor, which 7 spots were recognized significantly at 5% probability level. 1 and 6 spots were up and down-regulated, respectively. By using LC-MS/MS mass spectrometry analysis proteins that involved in energy production and photosynthesis were identified. Role of these proteins to salt stress response will be discussed.

Key words: rapeseed, proteomics, salt stress, two-dimensional electrophoresis, LC-MS/MS.

* Corresponding Author: Toorchi M.

Tell: 041-33392035

Email: toorchi@tabrizu.ac.ir