

Research Article

Plant Prod., 2021, 44(2), 211-220
http://plantproduction.scu.ac.ir//


ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

Proteome Analysis of Osage Orange Leaf (*Maclura pomifera*) in Response to Drought Stress

Alireza Khaleghi^{1*}, Rohangiz Naderi², Seyed Alireza Salami³, Mesbah Babalar⁴,
Biancaelena Maserti⁵

- 1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran (khaleghi979@gmail.com)
- 2- Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- 4- Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- 5- National Research Council of Italy, Institute of Sustainable Plant Protection (CNR-IPSP), Sesto Fiorentino, Italy

Citation: Khaleghi, A., Naderi, R., Salami, S. A., Babalar, M., & Maserti, B. (2021). Proteome analysis of osage orange leaf (*Maclura pomifera*) in response to drought stress. *Plant Productions*, 44(2), 211-220.

 10.22055/PPD.2019.30310.1791

Received: 14 July, 2019

Accepted: 2 October, 2019

Abstract

Introduction

Drought stress is one of the most important environmental factors, which limit the growth of plants. By the end of the 21st century, the incidence of drought stress is expected to increase because of the global warming phenomenon. As a consequence, trees growth and viability in the forests and urban greenspace will reduce. Thus, selection of plants that are more tolerant to severe drought stress and are able to cope with such environmental conditions needs to be considered in future silvicultural strategies. This study was carried out to identify candidate drought-tolerance proteins in *Maclura pomifera*. Therefore, we aimed to explore the performance of *Maclura pomifera* under a severe drought stress and analyse the proteome changes of *Maclura pomifera* leaf in response to drought.

Materials and Methods

The experiment was carried out on 4-year-old *Maclura pomifera* saplings genotypes cultivated on a flat field in the Botanical Garden of University of Tehran. Saplings were exposed to irrigation regimes of 100% and 25% field capacity in a completely randomized design. Leaf samples were collected and were frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -80°C to be used for



further analyses. Experiments were performed using the gradient pH 3-10 NL IPG strips for the isoelectric focusing. IEF was carried out using the PROTEAN IEF. Strips were then equilibrated first for 15 min in reducing solution and then 15 min in alkylating solution. Equilibrated IPG strips were then placed and fixed using hot agarose on the top of home-made 12 % SDS-polyacrylamide gels. Separation of proteins in the second dimension was carried out in Protean XL cell. The protein spots were visualized by staining with BioSafe Coomassie gel stains following manufacturer's instructions.

Results and Discussion

After doing two-dimensional gel electrophoresis, 25 protein spots that had displayed significant protein level changes were identified. Differentially expressed, proteins were divided in three groups. The first group included stress and defense proteins such as lipoxygenase, two types of heat shock protein, Allergen, Convicilin and legumin A2 precursor; the second group included oxidative stress proteins such as Catalase, Chloroplast stromal ascorbate Peroxidase, Cytosolic ascorbate peroxidase, Iron superoxide dismutase and Manganese superoxide dismutase. The third group included energy and metabolism proteins such as Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, Ribulose -1,5- bisphosphate carboxylase /oxygenase small subunit, Translation elongation factor, Aldolase, Hydroxy-acid oxidase, Isopentenyl diphosphate isomerase, Dihydrolipoamide dehydrogenase and glyoxalase. The present results indicate that most proteins have been identified and their changes caused an increase in tolerance and adaptation of *Maclura pomifera* to drought stress. Also, our data suggest that drought tolerance of *M. pomifera* might be correlated with diminishing oxidative damage by activation of the antioxidant systems.

Conclusion

The present results indicate that most proteins have been identified and their changes caused an increase in tolerance and adaptation of *Maclura pomifera* to drought stress. Also, our data suggest that drought tolerance of *M. pomifera* might be correlated with diminishing oxidative damage by activation of the antioxidant systems.

Keywords: Antioxidant enzymes, Heat shock protein, Lipoxygenase

الگوی پروتئوم برگ درخت توت آمریکایی (*Maclura pomifera*) در پاسخ به تنش خشکیعلیرضا خالقی*^۱، روح انگیز نادری^۲، سید علیرضا سلامی^۳، مصباح بابالار^۴، النا مزرتی^۵

۱- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (khaleghi979@gmail.com)

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵- محقق گروه پروتئومیکس مؤسسه CNR فلورانس، ایتالیا

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

چکیده

تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان است. در این تحقیق به منظور شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به خشکی توت آمریکایی، تجزیه پروتئوم برگ بر پایه ژل الکتروفورز دوبعدی انجام گرفت. گلدان‌های چهار ساله توت آمریکایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار آبیاری (شرایط کنترل (۱۰۰ درصد) و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) در سال ۱۳۹۲ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران مرتب شدند. با انجام الکتروفورز ژل دو بعدی، ۲۵ لکه پروتئینی که دارای تغییرات قابل تشخیص بودند، انتخاب، جداسازی و شناسایی شدند و در سه گروه مجزا از لحاظ عملکرد قرار گرفتند. گروه اول پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش و سیستم دفاعی گیاه شامل، پروتئین لیپوکسیژناز، دو نوع پروتئین شوک حرارتی، آلرژن، کانوبیسین و پیش ماده لگومین بودند. گروه دوم شامل پروتئین‌های مسئول در تنش‌های اکسیداتیو از جمله کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز کلروپلاستی، آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی، سوپراکسید دیسموتاز-آهن (Fe-SOD) و سوپراکسیداز دیسموتاز-منیزیم (Mn-SOD) شد و گروه سوم پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و انرژی سلول شامل آنزیم ریبولوز-۱، ۵-بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز زیر واحد کوچک، فاکتور طویل شدن ترجمه، آلدولاز پلاستی، هیدروکسی-اسید اکسیداز، ایزوپنتیل دی فسفات ایزومراز، دی هیدرو لیپوآمید دهیدروژناز و گلی اکسیلاز بودند. نتایج حاضر حاکی از آن بود که عمده پروتئین‌های شناسایی شده و تغییرات آن‌ها در جهت افزایش مقاومت و سازگاری توت آمریکایی به تنش خشکی است به گونه‌ای که این تغییرات باعث حفظ روابط آبی گیاه، کاهش صدمات ناشی از افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن هم‌چنین، حفظ دستگاه فتوسنتزی و تنفسی در شرایط تنش شدید می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی، پروتئین‌های شوک حرارتی، لیپوکسیژناز

مقدمه

بیش از سایر تنش‌ها باعث کاهش رشد و نمو گیاه می‌گردد.

از سویی دیگر، مدل‌های آب و هوایی حاکی از این است

خشکی یکی از مخرب‌ترین تنش‌های محیطی است که

خشکی بررسی کردند و گزارش نمودند که پروتئین‌های شناسایی شده به‌طور عمده متعلق به متابولیسم نیتروژن، کربوهیدرات و فتوسنتز است.

با دانستن این موضوع که کمبود آب و تنش‌های خشکی از عوامل محدودکننده در انتخاب و کشت گیاهان زینتی در فضاهای سبز شهری می‌باشد، ضروری است تا با بررسی و پژوهش‌های علمی، گیاهان مناسب جهت کشت در فضاهای سبز شهری انتخاب شود. در این ارتباط برخی گیاهان از جمله توت آمریکایی پتانسیل بالایی برای مقاومت به تنش‌های محیطی دارند. لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی میزان توانایی سازگاری و تحمل درخت توت آمریکایی به شرایط خشکی با توجه به تغییرات پروتئوم برگ‌های آن تحت شرایط تنش شدید صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی میزان تحمل و توانایی سازگاری گیاهان توت آمریکایی (*Maclura pomifera* (Raf.) Scheid.) به تنش خشکی، مطالعه‌ای روی گیاهان چهار ساله این گونه گیاهی در مرزعه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۲ به اجرا در آمد. گیاهان چهار ساله توت آمریکایی در نیمه دوم اسفند سال ۱۳۹۱ در گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و قطر دهانه و کف به ترتیب ۲۷ و ۲۳ سانتی‌متر حاوی چهار قسمت خاک رس، دو قسمت ماسه شسته شده و یک قسمت خاکبرگ دارای اسیدیته ۷/۴ و هدایت الکتریکی ۱/۳۶ دسی‌زیمنس بر متر کشت و در محوطه فضای باز گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران قرار داده شدند. اواسط خرداد سال ۹۲ آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و شش گلدان در هر تکرار، با دو تیمار آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد، بدون تنش) و ۲۵٪ ظرفیت زراعی (تنش شدید) به روش وزنی انجام شد. با رسیدن رطوبت گلدان‌ها به سطح تنش ذکر شده، نمونه‌گیری از برگ‌های جوان کاملاً رشد یافته شاخه سال جاری به منظور سنجش تغییرات پروتئوم برگ تحت تنش خشکی

که شدت و تعداد وقوع خشکی در حال افزایش است (IPCC, 2007; Li et al., 2009; Shafiei et al., 2019; Saremirad and Mostafavi, 2020). هم‌چنین، علاوه بر افزایش دما در دهه‌های گذشته، دانشمندان پیش‌بینی کرده‌اند که تا پایان قرن اخیر دمای کره زمین ۳ تا ۹ درجه سانتی‌گراد با اثرات گسترده‌ای می‌تواند افزایش یابد و خصوصاً باعث افزایش نیاز آبی گیاهان، افزایش خشکی زمین‌های قابل کشت و محدودیت در استفاده از منابع آب می‌گردد (Wang et al., 2003b).

تنش‌های محیطی از جمله خشکی مسئول تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند که موجب صدمه به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، DNA و ... می‌شوند که در نهایت مرگ سلول را در پی دارد. گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده تحت شرایط تنش خشکی توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و یا متابولیت‌های مولکولی غیر آنزیمی خنثی می‌شوند (Gill and Tuteja, 2010). گیاهان مقاوم به خشکی فعالیت‌های متابولیکی را در بافت‌های خود با پتانسیل آب پائین حفظ می‌کنند. تنظیم اسمزی، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی و تغییرات دینامیک فیتوهورمون‌ها از مهم‌ترین سازگاری‌های فیزیولوژیکی گیاهان تحت تنش خشکی هستند (Koyro et al., 2012). در واقع تغییر الگوی بیان ژن‌ها یکی از اصلی‌ترین راهکارهای کاهش اثرات تنش در گیاهان می‌باشد (Hazen et al., 2005). در این بین، پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای مطالعه جامع بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش است (Dubey and Grover, 2001). گزارش شده است که مقاومت به خشکی هشت گونه صنوبر ارتباط مستقیمی با فراوانی ۴۵ گونه پروتئین دارد که بیشتر آن‌ها متعلق به آنزیم‌های تثبیت‌کننده از جمله رویسکو اکتیواز هستند (Bonhomme et al., 2009). در پاسخ به تنش خشکی گونه‌ای صنوبر (*Populus cathayana*) ۴۰ نوع پروتئین از جمله پروتئین‌های شوک حرارتی، آنزیم‌های لیپوکسیژناز و رویسکو اکتیواز شناسایی شد (Xiao et al., 2009). Echevarria-Zomeno et al. (2009). الگوی پروتئوم برگ بلوط (*Quercus ilex*) را تحت تنش

تیمار تنش خشکی در مقابل تیمار شاهد صورت گرفت. برای مشخص کردن اختلاف بین باندها از نرم افزار NIA Assay مبتنی بر وب استفاده شد. پس از استخراج درصد حجمی لکه‌ها و تجزیه واریانس داده‌های مورد نظر، جهت مقایسه میانگین پروتئین‌های بیان شده در شرایط تنش و نرمال رطوبتی آزمون دانت انجام شد و لکه‌هایی که مقادیر کمی بیان آن‌ها تفاوت معنی داری ($P < 0.01$) با شاهد نشان دادند و تغییرات بیان $\pm 1/5$ برابری و یا بیشتر داشتند به عنوان لکه کاندید انتخاب شدند. به منظور شناسایی پروتئین‌ها به روش LC-MS/MS، لکه‌های انتخاب شده از روی ژل‌ها جدا و به موسسه (National Research Council (CNR)) واقع در شهر پیزا-ایتالیا فرستاده شد.

نتایج و بحث

از پروتئومیکس در شناسایی پروتئین‌های کاندید مسئول در تنش خشکی درخت توت آمریکایی استفاده شد. با انجام الکتروفورز ژل دو بعدی، ۲۵ لکه پروتئینی که دارای تغییرات قابل تشخیص بودند، انتخاب و جداسازی شدند. موقعیت این لکه‌ها در شکل‌های (۱) و (۲) مشخص است. به کمک تجزیه LS-MS/MS با استفاده از جستجوی بانک اطلاعات، تعداد ۱۹ عدد از این پروتئین‌ها شناسایی شدند. از بین پروتئین‌های شناسایی شده، ۱۴ پروتئین افزایش بیان و چهار پروتئین کاهش بیان داشتند (جدول ۱)؛ در حالی که تنها یک پروتئین تغییری نشان نداد. این پروتئین‌ها در سه گروه مجزا از لحاظ عملکرد قرار گرفتند که شامل موارد ذیل بودند:

گروه ۱: پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش و سیستم دفاعی گیاه

کلیه پروتئین‌های شناسایی شده در این گروه که به طور مستقیم مسئول دفاع از سلول در مقابل تنش هستند، افزایش حدود دو الی سه برابری را در گیاهان تحت تنش شدید نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (جدول ۱). از مهم‌ترین پروتئین‌های این گروه پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشد. این پروتئین‌ها از مهم‌ترین دستجات پروتئین‌های اختصاصی تنش رطوبتی هستند. نشان داده شده است که تنش خشکی باعث واسرشت شدن و سلب عملکرد بسیاری

شدید صورت گرفت. در هر تکرار، نمونه برگ از هر شش گلدان تهیه و به عنوان یک نمونه استفاده شد. استخراج پروتئین به روش TCA/Phenol-SDS (Wang et al., 2003a) و سنجش غلظت پروتئین‌های استخراج شده مطابق با روش Bradford (1976) با اندکی تغییر صورت گرفت. جهت انجام الکتروفورز دو بعدی، ابتدا از ژل‌های نواری IPG هفت سانتی متری با شیب pH غیر خطی ۱۰-۳ برای ایزوالکتریک فوکوسینگ (Isoelectric focusing) استفاده شد تا پروتئین‌ها در این مرحله بر حسب نقطه ایزوالکتریک آنها از یکدیگر تفکیک شوند. نوارهای IPG به مدت شش ساعت در مُد خنثی و شش ساعت در مُد فعال (۵۰۷) در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و ۱۲۵ میکرولیتر بافر با جذب حاوی حدود ۱۵۰ میلی گرم پروتئین استخراج شده توت آمریکایی آبگیری شدند. ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) با استفاده از دستگاه PROTEAN IEF (BioRad) طبق دستورالعمل زیر انجام شد: مرحله اول: ۲۵۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه، مرحله دوم: ۵۰۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه، مرحله سوم: ۱۰۰۰ ولت به مدت چهار ساعت، مرحله چهارم: ۸۰۰۰ ولت به مدت چهار ساعت. سپس به منظور متعادل سازی (Equilibration)، نوارها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در محلول کاهنده (Reducing) و سپس ۱۵ دقیقه در محلول آلکیل کننده (Alkylating solution) قرار داده شدند. پس از آن نوارهای IPG متعادل شده در قسمت بالایی ژل‌های پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات ۱۲٪ قرار داده شدند و با استفاده از آگارز ۵٪ گرم ثابت شدند. جداسازی پروتئین‌ها در بعد دوم با استفاده از دستگاه PROTEAN XL Cell (BioRad) انجام شد. در این مرحله پروتئین‌هایی که پیش تر بر حسب بارالکتریکی جدا شده بودند بر حسب جرم مولکولی تفکیک شدند. در پایان رنگ آمیزی لکه‌های پروتئینی توسط کوماسی بلو انجام گردید. آنگاه ژل‌ها پس از رنگ زدایی با استفاده از دنسیتومتر GS-۸۰۰ (BioRad, USA) با وضوح ۶۰۰ dpi اسکن شدند. تجزیه و تحلیل کامپیوتری تصاویر ژل‌ها توسط نرم افزار Quantity One (BioRad) برای مقایسه بین

پروتئین‌های واسرشت‌شده را مجدداً فعال می‌کند. همچنین، نتایج افزایش ۳/۲ برابری آنزیم‌های لیپوکسیژناز تحت شرایط تنش شدید نسبت به گیاهان شاهد را نشان داد. لیپوکسیژناز از آنزیم‌های مؤثر در متابولیسم لیپیدها و هورمون‌ها می‌باشد. به‌عنوان مثال لیپوکسیژناز از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز جاسمونات‌ها می‌باشد که به‌عنوان بازدارنده رشد هستند و در پاسخ‌های دفاعی علیه تنش‌های غیرزنده و پاتوژن‌ها و ایجاد مقاومت سیستمیک گیاهان نقش دارند (Sidow, 1991). افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در برگ و ریشه گیاه زیتون تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Sofa et al., 2004).

از پروتئین‌ها می‌گردد. پروتئین‌های شوک حرارتی از واسرشت شدن سایر پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. همبستگی مثبت بین مقاومت به تنش و سطح بیان پروتئین‌های شوک حرارتی گزارش شده است (Wang et al., 2004). دو نوع پروتئین شوک حرارتی کلروپلاستی و میتوکندریایی شناسایی شده در این تجزیه، تحت تنش خشکی شدید افزایش ۲/۵ و ۱/۵ برابری نسبت به گیاهان فاقد تنش نشان دادند. گزارش شده است که پروتئین‌های شوک حرارتی نقش مهمی در مقاومت یا سازگاری صنوبرها به تنش خشکی بازی می‌کنند (Bonhomme et al., 2009). علاوه بر این، پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتون،

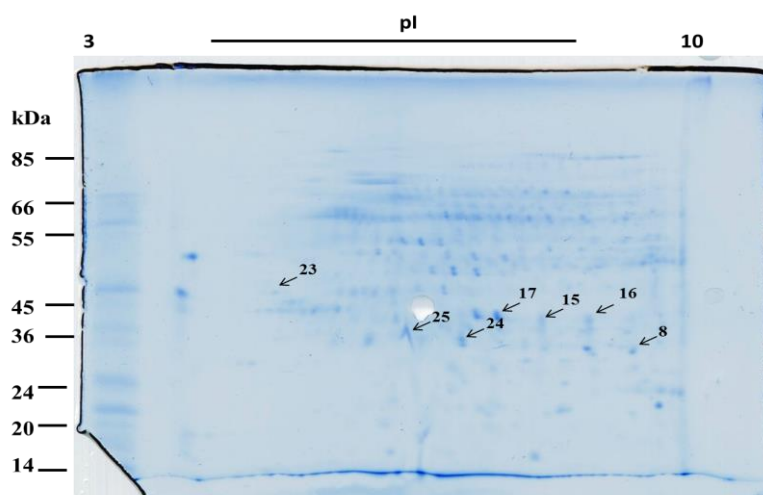


Figure 1. Protein identities of the Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf from normally irrigated plants in compare to drought-stressed plants that show increased expression

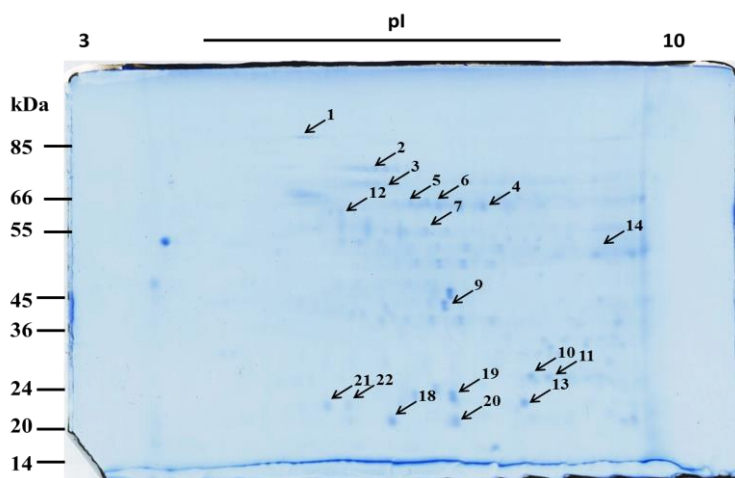


Figure 2. Protein identities of the Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf from drought-stressed plants in compare with normally irrigated plants that show increased expression

Table 1. Proteins differentially expressed under stress conditions in Osage orange (*Maclura pomifera*) leaves

Spot number	Protein name	Fold change DS/C	Accession Number	Theor/exper MW
1	Plant lipoxygenase; Lipase/lipoxygenase, PLAT/LH2,- <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	3.2	Q1SCS9	97 / 100
2	heat shock protein, 70K, chloroplast - <i>cucumis sativa</i>	2.5	T10248	75 / 75
3	Putative heat shock 70 KD protein, mitochondrial- <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	1.9	Q8GTB0	71 / 75
4	Allergen Len c 1,0101 (Fragment)- <i>Lens culinaris</i> (Lentil)	2.3	Q84UI1	48 / 58
5	Convicilin (Fragment)- <i>Lens culinaris</i> (Lentil)	2.6	Q9M3X8	60 / 58
6	legumin A2 precursor - <i>fava bean</i>	1.9	A24942	57 / 58
7	Catalase- <i>Vitis vinifera</i> (Grape)	not changed	Q8S568	55 / 56
8	Chloroplast stromal ascorbate peroxidase- <i>Vigna unguiculata</i> (Cowpea)	-1.5	Q5QHW6	45 / 33
9	Cytosolic ascorbate peroxidase- <i>Capsicum annuum</i> (Bell pepper)	2.9	Q4ZJK2	38 / 33
10	Iron superoxide dismutase (Fragment)-, <i>Pisum sativum</i> (Garden pea)	2.5	Q6TA12	18 / 28
11	Manganese superoxide dismutase (EC 1,15,1,1) (Fragment)- <i>Digitalis lanata</i> (Foxglove)	2.9	Q9FY33	25 / 28
12	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)- <i>Remijia ulei</i> ,	1.7	Q5DRH1	57 / 58
13	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit (Fragment)- <i>Alseis lugonis</i>	1.5	Q9TJZ5	22 / 22
14	Translation elongation factor-1 alpha (Fragment)- <i>Picea abies</i> (Norway spruce) (<i>Picea excelsa</i>)	1.8	Q9AVT7	49 / 45
15	Latex plastidic aldolase-like protein- <i>Hevea brasiliensis</i> (Para rubber tree)	-1.9	Q8LL68	43 / 40
16	(S)-2-hydroxy-acid oxidase (EC 1,1,3,15) – cucurbit	-1.9	T10242	40 / 40
17	Isopentenyl diphosphate isomerase 2- <i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	-2.4	Q9AVG7	27 / 25
18	Dihydrolipoamide dehydrogenase <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	1.8	Q93WQ1	54 / 64
19	Putative glyoxalase <i>Oryza sativa</i>	1.9	Q75GB0	29 / 33
20	Unknown	2.5	–	/ 68
21	Unknown	1.8	–	/ 68
22	Unknown	1.5	–	/ 42
23	Unknown	-1.6	–	/ 48
24	Unknown	-1.5	–	/ 25
25	Unknown	-2.7	–	/ 33

Proteins change in leaves of Saplings under irrigated (100% FC) and droughted (25% FC) conditions.

(چپرونی) دارد. هم‌چنین، تنش‌های محیطی از عوامل اصلی غیرفعال شدن قابل برگشت یا غیرقابل برگشت رویسکو می‌باشند. رویسکو غیرفعال شده به وسیله ستر نسخه‌های جدید جایگزین می‌شود. عنوان شده است که گیاهان متحمل با افزایش بیان ژن‌های کدکننده رویسکو، ناپایدار بودن زیرواحدهای آن را جبران می‌کنند (Bonhomme et al., 2009). لکه شماره ۱۸ به عنوان دی‌هیدرولیوآمید دی‌هیدروژناز شناخته شد که در گیاهان تحت تنش شدید افزایش ۱/۸ برابری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. این آنزیم یکی از سه جزء اصلی کمپلکس آنزیمی پیرووات دی‌هیدروژناز است که دکربوکسیلاسیون پیرووات به استیل کوآنزیم آ و NADH را کاتالیز می‌کند. بنابراین نقش حیاتی در متابولیسم انرژی یوکاریوت‌ها دارد. نشان داده شده است که کاهش متابولیسم انرژی ناشی از کاهش فعالیت آنزیم دی‌هیدرولیوآمید دی‌هیدروژناز منجر به افزایش صدمات اکسیداتیو می‌شود (Xia et al., 2001). در دو گونه حساس و مقاوم به خشکی سیب‌زمینی نیز نشان داده شد که بیان آنزیم دی‌هیدرولیوآمید دی‌هیدروژناز در گونه مقاوم در طی تنش خشکی شدید افزایش، اما در گونه حساس سرکوب می‌شود (Vasquez-Robinet et al., 2008). هم‌چنین، نتایج نشان داد که گلی‌اکسالاز (لکه شماره ۱۹) در گیاهان تحت تنش شدید نسبت به گیاهان شاهد افزایش ۱/۹ برابری داشت. این آنزیم در سمیت زدایی متیل‌گلیو کسال، یکی از فرآورده‌های جانبی گلیکولیز نقش دارد. گزارش شده است که افزایش بیان این پروتئین باعث افزایش تحمل به خشکی در جو می‌شود (Bonsager et al., 2007).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج حاصل از ژل‌های دو بعدی توت آمریکایی نشان داد که الگوی پروتئوم برگ در هنگام پاسخ گیاه به تنش خشکی شدید در مقایسه با شاهد به‌طور قابل توجهی تغییر کرد. این تغییرات حاکی از طیف وسیع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در ساعات اولیه پس از اعمال این تنش محیطی است. از

گروه ۲: پروتئین‌های مسئول در تنش اکسیداتیو

در این گروه از پروتئین‌های شناسایی شده، کاتالاز تغییری نشان نداد. در حالی که آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی افزایش ۲/۹ برابری در گیاهان تحت تنش شدید داشتند. در مطالعات پروتئومیکس مربوط به تنش خشکی در چغندر قند (Hajheidari et al., 2005) و شوری در برنج (Yan et al., 2005) افزایش در سطح بیان آسکوربات پراکسیداز گزارش شده است. هم‌چنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سوپراکسید دیسموتاز که یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مسئول در تنش‌های اکسیداتیو است در تنش شدید نسبت به گیاهان شاهد میزان بیان بیشتری دارد. لکه‌های شماره ۱۰ و ۱۱ (شکل ۲) به ترتیب به عنوان Fe-SOD و Mn-SOD شناسایی شدند که در گیاهان تحت تنش شدید توت آمریکایی به ترتیب افزایش ۲/۵ و ۲/۹ برابری نسبت به گیاهان شاهد داشتند. افزایش سطوح ایزوفورم‌های مختلف سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است (Ushimaru et al., 2006).

گروه ۳: پروتئین‌های دخیل در متابولیسم انرژی

از مهم‌ترین پروتئین‌های این گروه آنزیم رویسکو است، چراکه از آنزیم‌های مهم در فعالیت فتوسنتزی گیاه بوده که حدود ۵۰٪ از پروتئین‌های برگ را شامل می‌شود. لکه پروتئینی ۱۲ و ۱۳ (شکل ۲) به ترتیب زیر واحد بزرگ و کوچک رویسکو شناسایی شد که در گیاهان تحت تنش به ترتیب افزایش ۱/۷ و ۱/۵ برابری نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. (Bonhomme et al., 2009) تغییرات بیان پروتئینی هشت گونه صنوبر مرتبط با مقاومت به خشکی را مورد آنالیز قرار دادند. آن‌ها دریافتند که ارتباط خطی معنی‌داری بین مقاومت به خشکی و فراوانی ۴۵ پروتئین وجود دارد که بیشتر آن‌ها متعلق به آنزیم‌های تثبیت کربن از جمله رویسکو اکتیواز هستند. افزایش زیر واحدهای بزرگ و کوچک رویسکو می‌تواند ناشی از افزایش آنزیم رویسکو اکتیواز باشد که نقش محافظت پروتئینی

فتوسنتزی و تنفسی در شرایط تنش شدید می‌گردد. لذا توت آمریکایی از جمله درختانی است که به احتمال از گونه‌های مقاوم به خشکی بوده و می‌توان از آن در فضای سبز شهری و مناطق کم آب بهره برد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و مؤسسه CNR-IPSP فلورانس ایتالیا به واسطه حمایت‌های مالی اعلام می‌دارد.

مهمترین این تغییرات در جهت افزایش مقاومت و سازگاری توت آمریکایی به تنش خشکی، می‌توان به افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم‌های دخیل در متابولیسم انرژی سلول از جمله دی‌هیدرولپوآمید دهیدروژناز هم‌چنین، آنزیم‌های لیپوکسیژناز اشاره کرد. همگی این تغییرات به گونه‌ای باعث حفظ روابط آبی گیاه، کاهش صدمات ناشی از افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن و حفظ دستگاه

References

- Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Lomenech, A. M., Plomion, C., Brignolas, F., & Morabito, D. (2009). Leaf proteome analysis of eight *Populus×euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics*, 9(17), 4121-4142.
- Bonsager, B. C., Finnie, C., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2007). Spatio-temporal changes in germination and radicle elongation of barley seeds tracked by proteome analysis of dissected embryo, aleurone layer, and endosperm tissues. *Proteomics*, 7(24), 4528-4540.
- 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), 248-54.
- Dubey, H., & Grover, A. (2001). Current initiatives in proteomics research: The plant perspective. *Current Science*, 80(2), 262-269.
- Echevarria-Zomeno, S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz C., Jorin, J., & Navarro, R. (2009). Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Plant Physiology*, 166(3), 233-245.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., & Askari, H. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), 950-60.
- Hazen, S. P., Pathan, M. S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H. S., Zhu, T., Kreps, J. A., & Nguyen, H. T. (2005). Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional and Integrative Genomics*, 5(2), 104-116.
- IPCC. (2007). *Executive summary of the intergovernmental panel on climate change*. Retrieved from <http://www.ipcc.com.ch>.
- Koyro, H., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic stress responses in plants: an overview. In Ahmad, P., & Prasad, M.N.V. (Eds.), *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change* (pp.1-28). NY :Springer.
- Li, Y., Ye, W., Wang, M., & Yan, X. (2009). Climate change and drought: a risk assessment of crop-yield impacts. *Climate research*, 39(1), 31-46.

- Saremirad, A., & Mostafavi, K. (2020). Genetic diversity study of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for agro-morphological traits under normal and drought stress conditions. *Plant Productions*, 43(2), 227-240. [In Farsi]
- Shafiei, N., Khaleghi, E., & Noorollah Moallemi, M. (2019). Effect of salicylic acid on some morphological and biochemical characteristics of Olive (*Olea europaea* cv. 'Konservalia') under water stress. *Plant Productions*, 42(1), 15-30. [In Farsi]
- Sidow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 145-188.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, 166(2), 293-302.
- Ushimaru, T., Nakagawa, T., Fujioka, Y., Daicho, K., Naito, M., Yamauchi, Y., Nonaka, H., Amako, K., Yamawaki, K., & Murata, N. (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Plant Physiology*, 163(11), 1179-1184.
- Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., De Koeyer, D., Schafleitner, R., Willmot, D. B., Bonierbale, M., Bohnert, H. J., & Grene R. (2008). Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Experimental Botany*, 59 (8), 2109-2123.
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003a). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003b). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). A: Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252.
- Xia, L., Björnstedt, M., Nordman, T., Eriksson, L. C., & Olsson, J. M. (2001). Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *European Journal of Biochemistry*, 268 (5), 1486-90.
- Xiao, X., Yang, F., Zhang, S., Korpelainen, H., & Li, C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 136(2), 150-168.
- Yan, S., Tang, Z., & Su, w. (2005). Proteomic analysis of salt stress- responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 5(2), 235-244.