بررسی الگوی الکتروفورز دو بعدی ریشه‌ی کلزای تلقیح شده با باکتری *Pseudomonas fluorescens* FY32 تحت تنش شوری

Proteome Analysis of canola root inoculated with *Pseudomonas fluorescens* FY32 under salinity stress

پویا مطیع نوع پرور[۱]، علی بنده‌حق[۲*]، داود فرج‌زاده[۳] و ابراهیم دورانی علیایی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۴

چکیده

کلزا که به‌منظور استحصال روغن آن تولید می‌گردد، همانند سایر گیاهان زراعی متأثر از شوری می‌شود. شوری خاک به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل نامساعد و تنش‌زای غیرزنده اثر نامطلوب بر عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی دارد. باکتری *Pseudomonas fluorescens* جزو باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشد و در همیاری با گیاهان باعث افزایش رشد مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و محدودکننده محیطی می‌گردد. در این تحقیق شوری در دو سطح صفر و ۳۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl اعمال شد. حضور یا عدم حضور باکتری به‌عنوان تیمارهای دیگر با سه تکرار اعمال گردید و برای تجزیه‌های آماری از طرح کرت‌های خرد شده با طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی استفاده شد. به‌منظور بررسی پروتئین‌های دخیل در بهبود مقاومت گیاه کلزا به شوری در همیاری با باکتری *Pseudomonas fluorescens* الگوی الکتروفورز دو بعدی پروتئوم ریشه آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که از ۲۱۶ لکه‌ی ظاهر شده ۱۶ لکه‌ی پروتئینی در اثر اعمال تنش شوری، ۱۳ لکه‌ی پروتئینی در حضور باکتری محرک رشد گیاه و ۲۳ لکه در صورت اعمال هر دو تیمار تغییر بیان نشان می‌دهند. پس از شناسایی احتمالی پروتئین‌های مربوطه با استفاده از معیارهای وزن مولکولی و نقطه‌ی ایزوالکتریک مشخص شد این پروتئین‌ها که با افزایش یا کاهش بیان همراه بوده‌اند جزو پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیکی/ انرژی‌زایی، پیام‌رسانی، حفاظت و دفاع سلولی، کانالی، ساختار و مکان‌یابی پروتئین‌های دیگر، ساختمان سلولی و رونویسی و ترجمه هستند. با اعمال تیمار شوری یا باکتری یا شوری به‌همراه باکتری، بیشترین تعداد لکه‌های تغییر بیان یافته مربوط به گروه پروتئین‌های متابولیکی/ انرژی‌زایی بود.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز دو بعدی، باکتری محرک رشد، تجزیه پروتئوم، ریشه، کلزا

۱ و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیاران، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

*: نویسنده مسوول Email: bandehhagh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

شوری زمین‌های کشاورزی یک مشکل در حال گسترش برای بسیاری از زمین‌های تحت آبیاری، خشک و نیمه‌خشک جهان است و یک عامل برای کاهش تولید محصولات زراعی به حساب می‌آید *فرانکوئیس* (Francois, 1994). با توجه به مطالعات *دوبی* (Dubey, 1997) و *یئو* (Yeo, 1998) شوری تأثیرات یونی و اسمزی بر روی گیاهان دارد و اکثر پاسخ‌های گیاهان به شوری با این تأثیرات در ارتباط هستند. عمومی‌ترین پاسخ گیاه به شوری، کاهش رشد می‌باشد *رومرو-آراندا* و همکاران (Romero-Aranda *et al.*, 2001). اثرات اسمزی شوری بر گیاهان نتیجه‌ی کاهش پتانسیل اسمزی به خاطر افزایش غلظت نمک در ناحیه‌ی رشد ریشه است *مانس و ترمات* (Munns and Termaat, 1986). اثرات شوری در سطح مولکولی را نیز می‌توان به افزایش گروه‌های آزاد اکسیژن، تغییرات متابولیکی سلول‌ها، افزایش سطح اسموپروتکتان‌هایی مثل پرولین و تغییرات از این قبیل اشاره کرد که نتیجه‌ی تلاش گیاه برای تحمل و بقا می‌باشد *شانون و گریو* (Shannon and Grieve, 1999).

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص گردیده است که در همزیستی با گیاهان باعث افزایش رشد گیاه و افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و محدودگر محیطی می‌گردند *کلوئپر* (Kloepper, 1993). باکتری *Pseudomonas fluorescens* که جزو باکتری‌های PGPR می‌باشد نیز این قابلیت را دارا می‌باشد. این باکتری‌ها حاوی آنزیم ACC- دآمیناز هستند. این آنزیم می‌تواند ACC را به‌عنوان پیش‌ساز اتیلن گیاه تجزیه کرده و در نتیجه سطح اتیلن را در گیاه در حال رشد یا گیاه دچار تنش کاهش دهد. کاهش سطح اتیلن در گیاهِ تحتِ تنش، از اثرات منفی اتیلن ازجمله کاهش رشد ریشه‌ها، عدم رشد ساقه، پیری برگ‌ها و سلول‌های آوند چوب و همچنین افزایش حساسیت به عوامل بیماری‌زا جلوگیری خواهد کرد *ارشد* و همکاران (Arshad *et al.*, 2002).

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از گیاهان روغنی ارزشمند است که به دلیل کیفیت بالای روغن دانه‌های آن در سطح جهانی مطرح می‌باشد. کلزا در مراحل اولیه‌ی رشدی حساس به شوری است ولی در مراحل بعدی مقاوم‌تر شده و حساسیت کمتری به شوری پیدا می‌کند (*فرانکوئیس*، 1994) و از آنجایی که ریشه نخستین اندام گیاه است که با این تنش روبرو خواهد شد، بررسی پروفایل پروتئینی آن کمک می‌کند تا پروتئین‌های درگیر در تحمل به شوری شناخته شوند.

با استفاده از رهیافت پروتئومیک و الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراج شده از اندام یا بافت‌های مختلف در شرایط زیستی متفاوت، می‌توان اطلاعات سودمندی از مکانیسم‌های مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها به‌دست آورد. در این مطالعه نیز به‌منظور درک تغییرات پروتئین‌های پاسخ‌گو به تنش شوی در ریشه‌ی رقم مقاوم Hyola308 کلزا *بنده‌حق* و همکاران (Bandeh-hagh *et al.*, 2008) تجزیه‌ی پروتئوم این اندام به‌عنوان نخستین اندامی که با تنش مواجه می‌شود، به روش الکتروفورز دوبعدی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه‌ی گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز اجرا شد. ماده‌ی گیاهی مورد استفاده در این پژوهش رقم Hyola308 کلزا بود که بذور آن پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم برای جوانه‌زنی و کشت در سیستم هیدروپونیک با بستر ماسه‌ای و در قالب طرح کرت‌های خرد شده با طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در سه تکرار آماده شدند. لازم به توضیح است که به دلیل محدودیت در تلقیح باکتری در سیستم کشت هیدروپونیک این طرح مورد استفاده قرار گرفت. بنابر این می‌توان گفت که باکتری عامل محدودکننده در این طرح بوده و هم‌چنین برای تأیید اثر باکتری و هم‌چنین سطوح تنش نمونه‌برداری انجام و تجزیه‌های آماری به اجرا درآمدند. محلول غذایی مورد استفاده هوگلند تغییر یافته بود که برای گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت (*بنده‌حق* و همکاران، 2008). pH مخازن کشت به‌طور منظم کنترل و در بازه‌ی ۰/۵ ± ۶/۵ ثابت نگه داشته شد.

باکتری مورد استفاده در این پژوهش *Pseudomonas fluorescens* سویه‌ی FY32 بود که باکتری گرم مثبت با تاژک‌های قطبی و قدرت تحرک بالا است *پالرونی* (Palleroni, 1984). این باکتری از جنبه‌های کشاورزی و تجزیه‌ی آلاینده‌های محیطی دارای اهمیت ویژه‌ای است *هاس و کیل* (Haas and Keel, 2003). برای کشت این باکتری یک کلنی منفرد از آن در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت LB مایع به‌صورت شبانه کشت شد *فرجزاده* و همکاران (Farajzadeh *et al.*, 2010). برای قرائت OD باکتری رشد یافته از روش کدرسنجی و برای تعیین جمعیت باکتری از داده‌های جدول *مک‌فارلند* (McFarland, 1907) استفاده گردید. با رسیدن جمعیت باکتری به 10^{10} cfu/ml به‌ترتیب مقادیر ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به مخازن ۱۰ و ۲۰ لیتری تزریق شدند. تنش شوری ۲۰ روز پس از انتقال نشاءها به سیستم هیدروپونیک و

پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها و تلقیح با باکتری انجام شد. با توجه به مطالعات پیشین (*بنده‌حق* و همکاران، 2008)، تنش شوری اعمال شده در دو سطح صفر و ۳۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم بود. مدت رشد بعد از اعمال تنش، ۳۰ روز در نظر گرفته شد و اقدامات مربوط به کنترل دما (۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شبانه روز)، رطوبت (رطوبت نسبی ۵۰ درصد در روز و ۶۰ درصد هنگام شب)، آفات و بیماری‌ها و جمعیت باکتری در طول دوره‌ی رشد انجام شد.

به‌منظور استخراج محتوای پروتئین ریشه‌های گیاهی از روش TCA- استون که برای ریشه‌ی کلزا سازگار شده است، استفاده گردید (مطیع نوع‌پرور، ۱۳۹۳). برای بارگذاری مقادیر صحیح نمونه‌ی پروتئین در لوله‌های بعد اول و هم‌چنین در دست داشتن معیار مناسب برای رنگ‌آمیزی ژل‌های بعد دوم، اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول به روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام گردید. ژل‌های بعد اول و دوم تهیه شده و اختلاف پتانسیل الکتریکی برای بعد اول به‌صورت ۲۰۰ ولت، نیم ساعت؛ ۴۰۰ ولت، ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت، یک ساعت و جریان الکتریکی به میزان ۳۵ میلی‌آمپر به اضای هر ژل بعد دوم اعمال گردید. رنگ‌آمیزی ژل‌ها به روش نیترات نقره انجام شده و تصویربرداری از ژل‌ها توسط دستگاه بایورد جی اس-۸۰۰ (Biorad GS-800) به اجرا در آمد. برای تجزیه‌ی لکه‌های حاصل نیز از نرم‌افزار PD-Quest استفاده شد. این نرم‌افزار به کمک موتور قدرتمند خود در تجزیه‌وتحلیل تصاویر دوبعدی حاصل از اسکن امکان تبدیل تصاویر به داده‌های کمی را فراهم می‌آورد و در این راستا هر لکه موجود بر روی تصویر ژل را با توجه به شدت رنگ هر پیکسل به‌صورت سه‌بعدی رسم و با معیار قرار دادن شدت رنگ زمینه عددی را برای هر لکه تعیین می‌کند *برث* و همکاران (Berth *et al*., 2007).

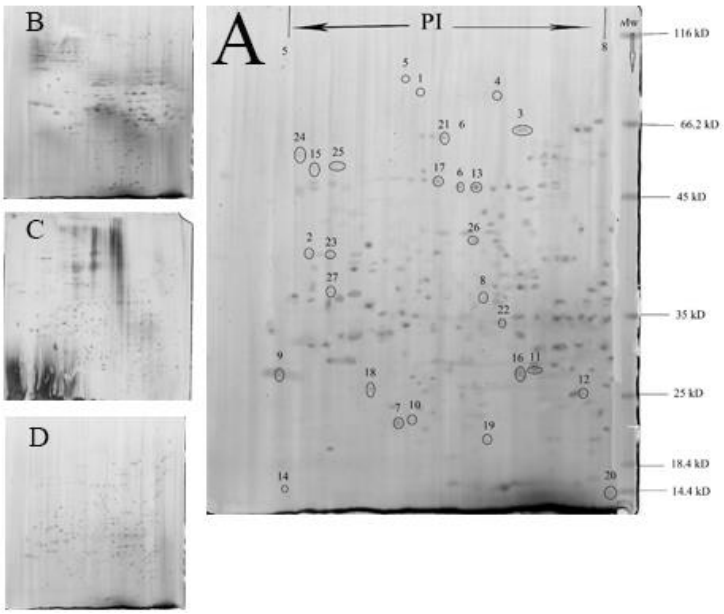
به‌منظور شناسایی احتمالی لکه‌های پروتئینی از دو معیار نقطه‌ی ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین‌ها استفاده شد و بدین‌منظور نرم‌افزار آنلاین Expasy Tag-Ident به‌کار رفت. به کمک نرم‌افزار PD-Quest از آزمون t برای شناسایی لکه‌های پرتئینی با بیان معنی‌دار استفاده گردید هم‌چنین از شاخص IF به‌منظور تعیین نوع تغییرات بیان پروتئین (افزایش یا کاهش) استفاده شد. به‌طوری‌که لکه‌هایی با IF بزرگ‌تر از ۲ با افزایش بیان و لکه‌هایی با IF کمتر از ۰/۵ با کاهش بیان در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

پس از تجزیه‌ی تصاویر ژل‌ها (شکل ۱) مشخص شد که از ۲۱۶ لکه‌ی ظاهر شده‌ی تکرارپذیر، ۱۶ لکه‌ی پروتئینی در اثر تنش شوری و ۱۳ لکه در اثر حضور باکتری تغییر بیان نشان دادند. از بین ۱۶ لکه‌ی دچار تغییر بیان شده، ۱۲ لکه افزایش بیان و ۴ لکه کاهش بیان داشتند. از ۱۳ لکه‌ای که در اثر حضور باکتری تغییر بیان نشان دادند ۹ لکه دچار افزایش بیان و ۴ لکه دچار کاهش بیان شدند (جدول ۱).

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری

پس از شناسایی احتمالی، این پروتئین‌ها براساس فعالیت سلولی در ۵ گروه قرار گرفتند (جدول ۱). بیش‌ترین تغییرات پروتئوم در اثر تنش شوری مربوط به پروتئین‌های درگیر در واکنش‌ها و مسیرهای متابولیسمی و تولید انرژی بود. پس از آن پروتئین‌هایی که با پیام‌رسانی سلولی در ارتباط بودند، بیش‌ترین تغییرات بیان را از لحاظ تعداد لکه‌ها متحمل شدند. در درجه‌ی بعد پروتئین‌های دخیل در حفاظت و دفاع سلولی، پروتئین‌های کانالی و پروتئین‌های مرتبط با ساختار و پیچش قرار داشتند (شکل ۱).



شکل ۱: الگوی الکتروفورز دو بعدی حاصل از پروتئوم ریشه‌ی کلزا رقم Hyola308 در شرایط بدون تنش و بدون باکتری (A)، تلقیح باکتری و شوری (B)، تلقیح باکتری و بدون شوری (C)، اعمال شوری بدون تلقیح باکتری (D)

Fig. 1: 2D-PAGE proteome pattern for control canola (Hyola308) root (A), bacteria inoculation with salinity stress (B), bacteria inoculation without salinity stress (C) and salinity stress without bacteria (D)

جدول ۱: اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده که در اثر تنش شوری، تلقیح باکتری یا تنش- تلقیح تغییر بیان نشان داده‌اند

Table 1: Characterization for identified proteins which are changed under salinity stress, bacteria inoculation and stress-inoculation conditions

Category	O.P.I.	O.M.W.	T.P.I.	T.M.W.	Chg.	Ac. No.	پروتئین شناسایی شده Identified Protein	شماره لکه Spot No.	
Met/Eng	5.9	80.2	5.93	84.28	افزایش Up	NP-001235794.1	Methionin Synthase	1	
Met/Eng	5.1	43	4.96	43.15	افزایش Up	BAD19677.1	S-adenosylmethionine decarboxilase 2	2	
Met/Eng	7.87	66.2	8.19	66.08	افزایش Up	AAB30415.1	Trypsin inhibitor	3	
Met/Eng	7.8	78.3	7.76	74.51	افزایش Up	BAD61238.1	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor 2	4	
Met/Eng	5.8	85	5.07	92.06	کاهش Down	NP-199730.1	Sucrose synthase 2	5	
Met/Eng	6.1	46	6.02	45.41	کاهش Down	AAP04002.1	alpha-Galactosidase	6	
Sig	5.6	21.3	5.57	20.3	افزایش Up	AGG35963.1	Calcium-dependent protein kinase	7	
Sig	6.21	38	6.3	38.82	افزایش Up	CAA64683.1	OSR40c1	8	تنش شوری Salinity stress
Sig	4.86	31.8	4.88	24.05	افزایش Up	Q9FG59.1	Glutathione S-transferase homolog	9	
Mai/Def	5.89	22	5.67	19.99	افزایش Up	NP-173184.2	Nucleoside diphosphate kinase	10	
Mai/Def	7.9.	33	7.76	30.18	افزایش Up	ABR24272.1	Iron- containing Superoxide dismutase	11	
Chan	8.2	30.02	8.22	30.95	افزایش Up	BAB09839.1	Water channel protein	12	
Chan	6.18	46.1	6.3	57.14	افزایش Up	AAO38856.1	vacuolar Na+/H+ antiporter	13	
ProStr	4.6	12.9	4.51	11.01	کاهش Down	AHM23831.1	Heat Shock Protein 70	14	
ProStr	5.13	50.9	5	55.74	کاهش Down	ABB17025.1	Protein disulfide isomerase	15	
Unknown	7.86	78.3	N/A	N/A	افزایش Up		N/A	16	

محفف‌های استفاده شده در جدول: .Ac. No شماره دسترسی؛ .Chg نوع تغییرات پروتئین؛ .T.M.W وزن مولکولی تئوری؛ .T.P.I نقطه‌ی ایزوالکتریک تئوری؛ .O.M.W وزن مولکولی مشاهده شده؛ .O.P.I نقطه‌ی ایزوالکتریک مشاهده شده؛ Category گروه عملکردی پروتئین
.Met/Eng متابولیسم/انرژی؛ .Sig پیام رسانی؛ .Mai/Def حفظ/دفاع سلول؛ .Chan کانالی؛ .Trl/trc رونویسی/ترجمه؛ .ProStr پروتئین‌های دخیل در ساختار و جایگیری پروتئین‌های دیگر؛ .N/A شناسایی نشده

Abstracts in the table: AC. No., Accession Number; Chg., Type of protein expression change; T.M.V., Theoretical Molecular Weight; T.P.I., Theoretical Isoelectric Point; O.M.W., Observed Molecular Weight; O.P.I., Observed Isoelectric Point; Category, Functional group of the protein; Met/Eng., Metabolism/Energy; Sig., Signaling; Mai/Def., Maintenance/Defense; Chan., Channel proteins; Trl/Trc., Translation/Transcription; ProStr, Proteins involved in the structure and placement of other proteins; N/A, Not Available

ادامه‌ی جدول ۱: اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده که در اثر تنش شوری، تلقیح باکتری یا تنش- تلقیح تغییر بیان نشان داده‌اند

Table 1 continued: Characterization for identified proteins which are changed under salinity stress, bacteria inoculation and stress-inoculation conditions

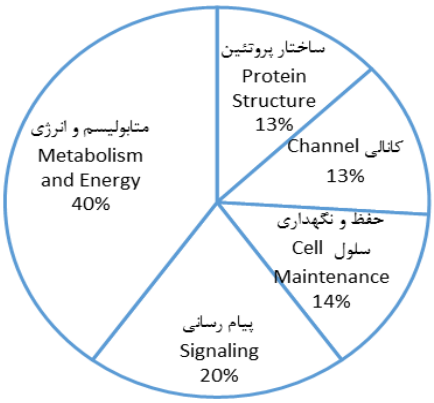
Category	O.P.I.	O.M.W.	T.P.I.	T.M.W.	Chg.	Ac. No.	پروتئین شناسایی شده Identified Protein	شماره لکه Spot No.	
Met/Eng	5.8	85	5.07	92.06	کاهش Down	NP-199730.1	Sucrose synthase 2	5	
Sig	5.6	21.3	5.57	20.03	افزایش Up	AGG35963.1	Calcium-dependent protein kinase	7	
Mai/Def	6.01	47	6.13	49.14	افزایش Up	AAA33978.1	NADPH-specific isocitrate dehydrogenase	17	
Mai/Def	5.64	29.4	5.49	27.55	افزایش Up	CCC55736.1	ascorbate peroxidase 2	18	
Mai/Def	7.6	19.1	7.73	18.95	کاهش Down	AAS01048.1	putative proteasome 20S beta1 subunit	19	حضور باکتری (پروتئین‌های گیاهی) Bacteria presence (Plant proteins)
Met/Eng	8.5	13.5	8.44	13.26	افزایش Up	ABB83611.1	citrate synthase	20	
Met/Eng	6	66	5.98	69.73	افزایش Up	NP_001031061.2	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	21	
Met/Eng	7.84	35	7.75	34.15	افزایش Up	BAD95089.1	putative pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	22	
CellStr	5.19	42.8	5.31	41.73	کاهش Down	AED91450.**1**	actin 7	23	
Unknown	5.29	60.61	N/A	N/A	کاهش Down		N/A	24	
Met/Eng	5.3	42.8	2/5	51.7	افزایش Up	ELQ12593.1	Glutamine synthetase	25	حضور باکتری (پروتئین‌های باکتریایی) Bacteria presence (Bacterial proteins)
Met/Eng	6.1	43.92	6.13	44.66	افزایش Up	EUB87430.1	Serine hydroxymethyltransferase	26	
Trl/Trc	5.2	39	5.31	38.49	افزایش Up	ERP45749.1	Elongation factor Tu	27	

محففهای استفاده شده در جدول: .Ac. No شماره دسترسی؛ .Chg نوع تغییرات پروتئین؛ .T.M.W وزن مولکولی تئوری؛ .T.P.I نقطه‌ی ایزوالکتریک تئوری؛ .O.M.W وزن مولکولی مشاهده شده؛ .O.P.I نقطه‌ی ایزوالکتریک مشاهده شده؛ Category گروه عملکردی پروتئین Met/Eng. متابولیسم/انرژی؛ .Sig پیام رسانی؛ .Mai/Def حفظ/دفاع سلول؛ .Chan کانالی؛ .Trl/trc رونویسی/ترجمه؛ .ProStr پروتئین‌های دخیل در ساختار و جایگیری پروتئین‌های دیگر؛ .N/A شناسایی نشده

Abstracts in the table: AC. No., Accession Number; Chg., Type of protein expression change; T.M.V., Theoretical Molecular Weight; T.P.I., Theoretical Isoelectric Point; O.M.W., Observed Molecular Weight; O.P.I., Observed Isoelectric Point; Category, Functional group of the protein; Met/Eng., Metabolism/Energy; Sig., Signaling; Mai/Def., Maintenance/Defense; Chan., Channel proteins; Trl/Trc., Translation/Transcription; ProStr, Proteins involved in the structure and placement of other proteins; N/A, Not Available

سانچز و همکاران (Sancez *et al.*, 2004) نشان دادند که تحت تنش شوری، تولید متیونین که نیازمند افزایش بیان متیونین سنتاز و S-آدنوزیل متیونین سنتاز است در گیاه سیب‌زمینی بیشتر می‌شود که با نتایج حاصل از این مطالعه نیز تطابق دارد. طبق یافته‌های *دوماش* و همکاران (Domash *et al.*, 2008) گیاه تحت تنش، سطوح بالاتری از بازدارنده‌های پروتئازی را در Protease inhibitor system بیان می‌کنند که در لگوم‌ها و غلات پایداری بیشتر پروتئین‌ها و تحمل بیشتر تنش را در پی دارد. شاید کاهش بیان آنزیم ساکارز سنتتاز (لکه‌ی شماره‌ی ۵) در راستای افزایش غلظت شیره‌ی سلولی باشد که به دنبال افزایش میزان قندهای محلول اتفاق می‌افتد.

اندازه‌گیری میزان قندهای محلول در همین گیاه انجام گرفته و این نتایج را تایید می‌کند (بازیار، ۱۳۹۲). *ریکارد* و همکاران (Ricard *et al.*, 1991) نیز بیان کردند که تحت انواع تنش‌های غیرزیستی، میزان آنزیم ساکارز سنتاز تغییر کرده و در اکثر موارد در گیاه برنج کاهش می‌یابد. احتمالاً آنزیم متابولیسمی آلفا-گالاکتوزیداز نیز اثرات مشابهی در گیاه و هنگام تنش داشته باشد. زیرا فوق بیان این آنزیم در برگ‌های برنج افزایش حساسیت این گیاه به تنش را در پی داشته است *لی* و همکاران (Lee *et al.*, 2004). بنابراین شاید بتوان کاهش بیان این آنزیم در اثر تنش شوری را مکانیسمی برای مقابله با تنش در رقم مقاوم Hyola308 بیان کرد.



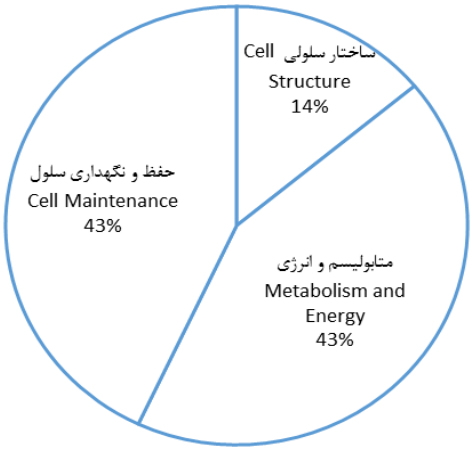
شکل ۲: گروه‌های مختلف عملکردی پروتئین‌های القاءپذیر از تنش شوری
Fig. 2: Categorization of inducible proteins under saline stress

قرارگیری گیاه تحت شرایط مختلف محیطی به غیرقطبی شدن غشای سلول گیاهی می‌انجامد که به‌دنبال آن حرکت یون‌های کلسیم و باز و بسته شدن کانال‌ها انجام می‌گیرند *دنگل* و همکاران (Dangel *et al.*, 1995). نقش CDPKها در پیام‌رسانی سلولی و به‌عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه که در تنش نقش دارند کاملاً مشخص است *شولز* و همکاران (Schulz *et al.*, 2013). شناخته شده‌ترین گیرنده‌های غشای گیاهان برای درک سیگنال‌های محیطی، کینازها و گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G (GPCR) هستند. در این تحقیق پروتئین مربوط به لکه‌ی شماره ۷ که به‌عنوان یک پروتئین پاسخ‌دهنده به اسید آبسیزیک و تنش شوری مطرح است افزایش بیان داشت که با نتایج *مون* و همکاران (Moon *et al.*, 1997) متطابقت دارد. دانشمندان هورمون اسید آبسیزیک (ABA) را یک عامل کلیدی برای تحمل تنش معرفی می‌کنند *فوجیتا* و همکاران (Fjita *et al.*, 2011). پروتئین فسفاتازها نیز در پیام‌رسانی سلول نقش دارند. این پروتئین‌ها که با ترکیبات مختلف اسید آبسیزیک در ارتباطند، در گیاهان عالی به تنش پاسخ داده و گیاهانی که سطوح بالاتری از این پروتئین‌ها را دارا باشند، تحمل نسبی بیشتری از خود نشان می‌دهند *رودریگز* (Rodriguez, 1998). گلوتاتیون ترانسفرازها را به‌طور سنتی به‌عنوان آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی سلول می‌شناسند ولی تحقیقات جدید نقش‌های دیگری نیز برای این گروه از پروتئین‌ها در نظر گرفته‌اند که دخالت در پیام‌رسانی سلولی خصوصاً در زمان تنش جزو این نقش‌ها است *استرنج* و همکاران (Strange *et al.*, 2001).

حفظ و نگهداری سلول در هنگام تنش بیش از هر چیز دیگری مستلزم حذف گروه‌های آزاد اکسیژن است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون دیسموتازها، اکسیدازها، کاتالازها، پلی‌فنول‌اکسیدازها و چندین آنزیم دیگر در آن نقش دارند. در این مطالعه، تنش شوری باعث افزایش بیان معنی‌دار آنزیم آنتی‌اکسیدانی همچون سوپراکسید دیسموتاز (لکه‌ی شماره‌ی ۱۱) گردید. سوپراکسید دیسموتاز نخستین آنزیمی است که در حذف O^{-2} و تبدیل آن به H_2O_2 نقش ایفا می‌کند. در مرحله‌ی بعد یک آنزیم پراکسیداز (برای مثال آسکوربات

پراکسیداز) از یک مولکول احیاکننده مثل اسید آسکوربیک استفاده کرده و آب اکسیژنه را احیا می‌کند. بعداً آنزیم‌هایی همچون مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز و GR اقدام به احیای آسکوربات می‌کنند که با نام واکنش‌های زنجیره‌ای مسیر هالیول-آسادا شناخته می‌شوند *بولر* و همکاران (Bowler *et al.*, 1992). نوکلئوزید دی‌فسفات کیناز (NDFK) (لکه‌ی شماره ۱۰) به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی ژن‌های آنتی‌اکسیدان شناخته می‌شود که افزایش بیان آن در سلول‌های گیاه سیب‌زمینی افزایش تحمل این گیاه به تنش را در پی داشته است *کیم* و همکاران (Kim *et al.*, 2011). Hyola308 نیز به‌عنوان یک رقم متحمل کلزا در شرایط تنش شوری سطوح بیشتری از این پروتئین را بیان می‌کند.

لکه‌های شناسایی شده‌ی شماره‌ی ۱۲و ۱۳ پروتئین‌های کانالی هستند که در اثر تنش شوری تغییر بیان نشان دادند. این پروتئین‌های کانالی که در غشای سلولی گیاه جای گرفته‌اند، مسئول انتقال آب، محلول‌های بدون بار کوچکی مثل اوره، اسید اوریک و اسید سالسیلیک یا گازهایی مانند آمونیاک و دی‌اکسیدکربن هستند *اسکافنر*؛ *تایرمن* و همکاران (Schaffner, 1998; Tyerman *et al.*, 1999). باز و بسته شدن این کانال‌ها می‌تواند مسیر جریان آب را در مسیرهای بین سلولی از ریشه به سمت بالا و یا تقسیم آب در اندام‌های هوایی و ریشه تعیین کند *مورل* و همکاران (Murel *et al.*, 2009). لکه‌ی شماره‌ی ۱۳ به‌عنوان یک پروتئین کانالی در انتقال متقابل یون سدیم مطرح است. انتقال‌دهنده‌های Na^+ تنوع زیادی داشته و نقش مهمی در دفاع از گیاه در برابر شوری بازی می‌کنند *هوری و اسکروئیدر*؛ *اپس و بلوم والد* (Horie and Schroeder, 2004; Apse and Blumwald, 2007). لکه‌ی شماره‌ی ۱۴ (پروتئین Hsp) یکی از پروتئین‌هایی است که بیان آن در اثر تنش‌های دمایی، اسمزی، اکسیداتیو، خشکی، تراکم بالا، شوری، باد و عناصر سنگین افزایش می‌یابد *ژو* و همکاران (Xu *et al.*, 2011). پروتئین دیسولفید ایزومراز (لکه‌ی شماره‌ی ۱۵) یا PDI یک پروتئین با فراوانی بالا در اکثر موجودات از جمله مخمر، پستانداران و گیاهان است *کلاپا* و همکاران؛ *ادمن* و همکاران (Klappa *et al.*, 1998; Edman *et al.*, 1985). از آنجایی‌که این پروتئین دارای دومین فعال شبه تیوردوکسین و سیگنال سکونت در شبکه‌ی آندوپلاسمی است، می‌توان نقش آن را تشکیل باندهای دی‌سولفید و فولدینگ پروتئین دانست *ویلکینسون و گیلبرت* (Wilkinson and Gilbert, 2004). مطالعات دیگری نیز بر نقش چپرونی و جلوگیری از تجمع پروتئین‌های فاقد پیوندهای دی‌سولفید تأکید دارند *گای* و همکاران؛ *تسائی* و همکاران (Gai *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 2001). نقش‌های مختلفی برای PDI در نظر گرفته شده است به‌طوری‌که حتی ممانعت از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول را نیز به آن نسبت می‌دهند *آندمه اوندزیگی* و همکاران (Andeme Ondzighi *et al.*, 2008) و یا نقش آن در ذخیره‌سازی پروتئین‌های واکوئلی مثل پروگلوتلین‌ها و آلفا-گلوبولین‌ها در برنج که به جای‌گیری اختصاصی پروتئین‌ها می‌انجامد را نمی‌توان نادیده گرفت *اوندا* و همکاران (Onda *et al.*, 2011). شاید کاهش بیان این پروتئین تحت تأثیر تنش شوری ناشی از عدم توانایی گیاه در حفظ پروتئین‌ها باشد و یا شاید مکانیسمی است که توسط گیاه برای حذف پروتئین‌های غیرضروری و اختصاص منابع به اعمال حیاتی به اجرا در می‌آید.



شکل ۳: گروه‌های مختلف عملکردی پروتئین‌های القاپذیر از اثر حضور باکتری *P. fluorescens* در کلزا رقم Hyola308

Fig. 3: Categorization of inducible proteins in canola root inoculated with *P. fluorescens*

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به حضور باکتری

از بین تمام لکه‌هایی که در اثر تلقیح باکتری محرک رشد تغییر بیان داشتند، لکه‌های شماره‌ی ۷ و ۵ پروتئین‌هایی بودند که در اثر تنش شوری نیز دچار تغییر بیان شده بودند درحالی‌که لکه‌های شماره‌ی ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ که توسط گیاه تولید شده بودند، فقط در اثر حضور باکتری دچار تغییر بیان شدند. این پروتئین‌ها نیز براساس عملکرد به چند گروه تقسیم شدند و لکه‌های شماره‌ی ۲۰، ۲۱ و ۲۲ به‌عنوان پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی معرفی شدند. لکه‌ی شماره‌ی ۲۳ نیز قابل شناسایی نبود (شکل ۲).

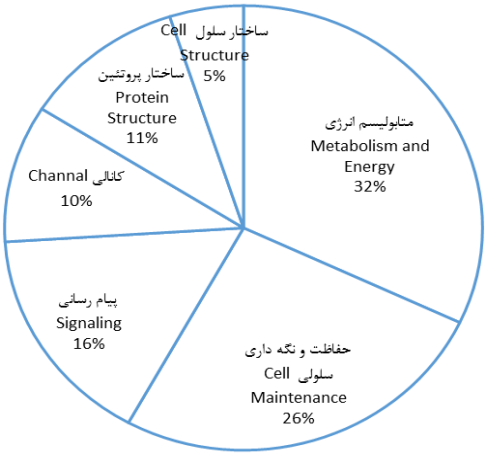
عوامل متعددی می‌توانند به تغییر متابولیسم گیاه منجر شده و به تولید میزان زیاد سیترات انجامد *کویاما* و هماکاران (Koyama *et al*., 1992). حضور باکتری نیز در محیط رشد ریشه می‌توان نتایج مشابهی داشته باشد *دی لا فوئنته* (de la Fuente, 1997). همین نتایج نشان می‌دهند که حضور باکتری چطور می‌تواند به افزایش تولید اسید، اسیدی‌سازی محیط ریشه، جذب بیشتر فسفات از خاک و رشد بیشتر گیاه منجر شود *کویاما* و همکاران (Koyama *et al*., 2000). بنابراین حضور لکه‌ی شماره‌ی ۲۰ (سیترات سنتاز) در حضور باکتری معنی‌دار خواهد بود. لکه‌ی شماره‌ی ۲۱ آنزیمی است که نخستین گام مسیر فسفریلاسیون بیوسنتز سرین را کاتالیز می‌کند. گیاهان در اثر شرایط مختلف ممکن است اقدام به تولید مولکول‌های کوچکی کنند که به اوسموپروتکتان معروفند و اغلب در شرایط شوری سنتز چنین مولکول‌هایی افزایش می‌یابد *وادیتی* و همکاران (Waditee *et al*., 2007). آنزیم 3-PGD نیز در این مسیر حضور دارد *بائوی و کولکیساوغلی* (Bauwe and Kolukisaoghlu, 2003) و احتمالاً افزایش بیان این آنزیم در اثر حضور باکتری القاء شده و مولکول‌های کوچکی که از مسیر یاد شده تولید شده‌اند، علاوه‌بر اینکه می‌توانند در همزیستی گیاه و باکتری به مصرف باکتری برسند، به افزایش تحمل تنش شوری در گیاه نیز کمک کرده‌اند (*وادیتی* و همکاران، 2007). در بین لکه‌های شناسایی شده، ۲ پروتئین نیز در دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش داشتند. لکه‌ی شماره‌ی ۱۷ مربوط به پروتئین Isocitrate dehydrogenase NADPH-specific است. NADPH در اکثر مسیرهای بیوشیمیایی که در آن‌ها حضور دارد به‌عنوان یک احیاکننده مطرح است. آنزیم NADP-ICDH که در سنتز NADPH نقش دارد نیز در گیاهان به‌عنوان یک آنزیم دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول شناخته می‌شود *لترير* و همکاران (Leterrier *et al*., 2007). لکه‌ی شماره‌ی ۱۸ نیز در دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارد و به همراه آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پرواکسی ردوکسین انجام وظیفه می‌کند. رشته‌های اکتین (لکه‌ی شماره‌ی ۲۳) در سلول‌های گیاهی تحت شرایط مختلف بیرونی به سرعت تغییر ساختار می‌دهند */سترنجر* و همکاران؛ */سمرتنکو* و همکاران (Stranger *et al*., 2009; Smertenko *et al*., 2011). همین تغییر ساختار که می‌تواند از حضور میکروارگانیسم‌ها نیز منشاء گرفته باشد به‌عنوان یک سیگنال قوی به‌منظور تغییر فعالیت‌های سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد *هنتی-ریدیلا* و همکاران (Henty-Ridilla *et al*., 2013) و ساختار سلول به گونه‌ای تغییر می‌کند که گیاه بتواند با میکروارگانیسم مبارزه کرده و یا همزیستی برقرار نماید *کاردناس* و همکاران (Cardenas *et al*., 1998). در این تحقیق نیز کاهش بیان اکتین در حضور باکتری شاید پاسخی به همزیستی با این میکروارگانیسم باشد. لکه‌های شماره‌ی ۲۵، ۲۶ و ۲۷ پس از شناسایی به باکتری جنس *Pseudomonas* نسبت داده شدند. این لکه‌ها به‌ترتیب مربوط به Glutamine synthetase، Serine hydroxymethyltransferase و Elongation factor Tu بودند. از آنجایی‌که غلظت باکتری موجود همراه ریشه‌های تجزیه شده بسیار کم می‌باشد این پروتئین‌ها جزو پروتئین‌هایی با سطوح بالای بیان در باکتری هستند.

پروتئین‌هایی که در اثر تنش شوری و حضور باکتری تغییر بیان داشتند

تغییر بیان پروتئین‌ها تحت تیمار شوری و تلقیح باکتری مشابه با مجموع تغییرات انجام شده در اثر تنش شوری یا تلقیح باکتری بود. با این تفاوت که در حضور هر دو تیمار لکه‌های شماره‌ی ۱، ۴، ۵ و ۱۴ بر روی ژل تغییر بیان نداشتند. تغییر بیان لکه‌های مشترک (۷ و ۵) مانند حالتی بود که در اثر تنش شوری ملاحظه گردید (شکل ۳).

شواهد نشان می‌دهند که با اعمال تنش شوری مسیرهای پیام‌رسانی گوناگونی از جمله مسیرهای مرتبط با پروتئین G، پروتئین کیناز، مسیرهای مرتبط با یون کلسیم و گیرنده‌های اتیلن فعال می‌شوند چنگ و همکاران (Cheng *et al*., 2009) که می‌تواند تغییر بیان پروتئین‌های کانالی در این مطالعه را نیز توجیح نماید. تغییر بیان آنزیم‌های درگیر در متابولیسم ازجمله آنزیم‌های چرخه اسید سیتریک، انتقال الکترون و تولید انرژی تحت تأثیر تنش شوری نیز دور از ذهن نمی‌باشد و مسلم است که تغییر در محصولات این مسیرهای بیوشیمیایی پایه منجر به تغییرات اندک یا وسیع در پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های

ساختاری سلول و هم‌چنین مولکول‌ها و ساختارهای درگیر در حفاظت سلولی خواهد شد (Ghosh and Xu, 2014 ،*قوش و ژو*).



شکل ۴: گروه‌های مختلف عملکردی پروتئین‌های القاپذیر از تنش شوری و حضور باکتری *P. fluorescens* در کلزا رقم Hyola308

Fig. 4: Categorization of inducible protein in canola (Hyola308) root under saline stress and inoculated with *P. fluorescens*

نتیجه‌گیری

تجزیه‌ی پروتئوم بافت ریشه از طریق الکتروفورز دوبعدی و رنگ‌آمیزی نیترات نقره منجر به آشکار شدن ۲۱۶ لکه‌ی پروتئینی تکرارپذیر شد. براساس آزمون t، ۲۷ لکه دارای تغییرات بیان بودند. با اعمال تنش شوری اکثر پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیسمی ریشه‌ی کلزا افزایش و تعدادی نیز کاهش بیان نشان دادند. درحالی‌که تمام پروتئین‌های مرتبط با پیام‌رسانی، حفاظت و نگهداری سلول و پروتئین‌های کانالی افزایش بیان داشتند و پروتئین درگیر در ساختار و جای‌گیری پروتئین‌های دیگر کاهش بیان نشان داد. با اعمال تیمار باکتری اکثر پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیسمی و انرژی‌زایی ریشه‌ی کلزا افزایش بیان داشتند و فقط یک لکه کاهش بیان نشان داد. در رابطه‌ی همیاری ریشه‌ی کلزا و باکتری *P. fluorescens* دو لکه پروتئینی مرتبط با حفاظت و دفاع سلولی افزایش بیان داشتند و یک لکه نیز کاهش بیان نشان داد. یک لکه‌ی پروتئینی دخیل در پیام‌رسانی سلولی نیز با اعمال این تیمار افزایش بیان داشت. این درحالی است که پروتئین مرتبط با ساختار سلول کاهش بیان نشان داد. با توجه به این‌که رقم Hyola308 یکی از ارقام مقاوم به شوری کلزا می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که گیاه برای جبران خسارات ناشی از تنش شوری از ریشه به‌عنوان منبع استفاده کرده و با افزایش نسبی پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و تولید انرژی سعی می‌کند تا میزان متابولیسم را افزایش دهد. بدین منظور از پروتئین‌های دخیل در پیام‌رسانی نیز بهره می‌برد. پروتئین‌های دخیل در حفاظت و دفاع سلولی نیز وظیفه‌ی مقابله با اثرات نامطلوب شوری ازجمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن را بر عهده دارند. اثر مثبت باکتری بر رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش نیز با مقاومت گیاه همراه شده و اثرات نامطلوب تنش را نسبت به حالت عدم‌تلقیح کاهش می‌دهد. افزایش بیان اکثر پروتئین‌های دخیل در متابولیسم و حفاظت سلول نیز بر این مطلب تأکید دارد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۳-۲۵ متن انگلیسی مراجعه شود.