

ارزیابی تنوع بیان پروتئین‌های محور جنین در دو رقم برنج با استفاده از الکتروفورز دوبعدی

Evaluation of Proteins Expression Differences of Royan Axes in Two Cultivar of Rice with Two-dimensional Electrophoresis

مهدی کاکایی^{۱*} و سارا کیانی^۲

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۳۱

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی و سنجش جامع تغییرات مولکولی ایجاد شده در بیان پروتئین‌های محور جنین برنج، با روش الکتروفورز دوبعدی می‌باشد. تنوع موجود در الگوی پروتئینی محور جنین، در دو رقم برنج متحمل و حساس به شوری (به ترتیب حسنی و سنگ‌جو) طی سه تکرار ارزیابی شد. در نتیجه‌ی آنالیز ژل‌های الکتروفورز دوبعدی در محور جنین برنج، ۳۲۸ لکه تکرارپذیر مشاهده گردید که ۶۳ لکه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. از روش‌های آماری چندمتغیره، نظیر تجزیه خوشه‌ای و تجزیه تابع تشخیص جهت گروه‌بندی لکه‌های بیان شده در دو رقم سنگ‌جو و حسنی، استفاده گردید. اختلاف معنی‌دار بین دو رقم، نشان داد که احتمالاً رقم متحمل جهت مقابله با تنش شوری ویژگی تحمل به تنش را داشته‌اند. آنالیز خوشه‌ای، پروتئین‌ها را (از نظر بیان) در سه خوشه اصلی قرار داد که بیانگر وجود پروتئین‌هایی با بیان مشابه در هر خوشه است. این موضوع بیانگر عملکرد مشابه پروتئین‌های هر خوشه و حضور همه آن‌ها در مسیر بیولوژیکی مشترک می‌باشد. آنالیز تابع تشخیص نتایج حاصل از خوشه‌بندی را ۱۰۰ درصد تأیید کرد که نشان از انطباق داده‌های پروتئینی با شرایط آزمایش دارد. با توجه به تعداد بیش‌تر بیان لکه‌های افزایشی در رقم متحمل حسنی نسبت به تنش شوری، و کاهشی بودن بیان لکه‌ها در رقم حساس سنگ‌جو، می‌توان شناسایی ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها را پیشنهاد نمود. به‌طور کلی، نتایج نشان داد با استفاده از نرم‌افزار و آنالیزهای آماری، به سادگی می‌توان تغییرات بیان معنی‌دار ناشی از تفاوت رقم در سطح پروتئوم جنین را مورد ارزیابی قرار داد و شاخص تغییرات را مشخص نمود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه چندمتغیره، تنش شوری، الکتروفورز پروتئین

مقدمه

۱. استادیار گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

۲. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

Email: M.kakaei@pnu.ac.ir

*: نویسنده مسوول

برنج (*Oryza sativa* L.) غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می‌دهد تورچی (Toorchi, 2015) و علاوه بر این که در عرصه کشاورزی مطرح است در تحقیقات بیولوژی نیز یک گیاه مدل (به دلیل کوچک بودن ژنوم نسبت به دیگر غلات) به حساب می‌آید کوماتسو و همکاران (Komatsu et al., 2003). تکنیک پروتئومیکس روش مطلوبی به منظور شناسایی پروتئین‌های مرتبط با یک سیگنال محیطی یا نموی ویژه ارائه می‌کند و برای بررسی بیوشیمیایی مطلوب می‌باشد؛ بنابراین، تنها مطالعه خود پروتئین‌ها، می‌تواند اطلاعاتی در رابطه با مقادیر واقعی و نیز فعالیت آن‌ها فراهم نماید زیوی و د ویین (Zivy and de Vienne, 2000). درک سازوکارهایی که گیاهان به هنگام مواجهه با تنش به کار می‌برند، کمک شایان توجهی به به‌نژادگران گیاهی خواهد کرد. از مطالعات پروتئومیکس برای بررسی پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی استفاده شده است. امروزه از جنین غلات به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعه تحمل به تنش خشکی و پسابدگی به علت توانایی آن‌ها در زنده ماندن در شرایط کمبود آب در مراحل انتهایی رسیدگی استفاده می‌شود، به گونه‌ای که مشخص شده است رشد جنین با اتمام تحمل به پسابش همبستگی دارد (ینگرام و بارتلت (Ingram and Bartlets, 1996). همان‌طور که بیان شد یکی از روش‌های قدرتمندی که امروزه در کنار بررسی بیان ژن‌ها و ریزآرایه در پاسخ گیاهان به تنش کاربرد دارد، تکنیک پروتئومیکس است که از طریق الکتروفورز ژل دوبعدی مورد بررسی قرار می‌گیرد جورین و همکاران (Jorin et al., 2007). تکنیک الکتروفورز دوبعدی مقایسه‌ای روشی نسبتاً جدید است که می‌تواند فهم مناسبی از کمپلکس پاسخ‌های پیچیده گیاه به تنش‌های محیطی و همچنین تعیین پروتئین‌های مرتبط با تحمل به پسابش و تنش خشکی در گیاهان ایجاد کند وو و همکاران (Wu et al., 2010). الکتروفورز آنزیم‌ها و پروتئین‌های بذر یک روش عالی برای آزمون خلوص ژنتیکی بذرها است. اکثر سیستم‌های الکتروفورزی از ژل‌های نشاسته و یا پلی‌اکریل‌آمید به عنوان محیط مناسب استفاده می‌کنند و در آن‌ها تفکیک پروتئین‌ها براساس اندازه مولکول‌ها و چگالی بار الکتریکی انجام می‌شود. در روش الکتروفورز، پروتئین‌ها و ایزوآنزیم‌های بذر در یک محیط و با ایجاد میدان الکتریکی از هم تفکیک می‌شوند. این روش این امکان را فراهم می‌کند که پروتئین‌ها براساس ماهیت قطبیت خود (بار منفی یا مثبت الکتریکی) آرایش یابند. تکنیک الکتروفورز دوبعدی (2-DE) از جمله گسترده‌ترین روش برای مقایسه تغییرات کمی در سلول‌ها، بافت‌ها یا کلیه ارگانیسم‌ها می‌باشد هربرت و همکاران (Herbert et al., 2001). این روش قادر به تفکیک و جداسازی

صدها نمونه و در برخی موارد قادر به تفکیک و جداسازی هزاران پروتئین می‌باشد میسکوویتا و همکاران (Mesquita et al., 2012). رسیدگی در بذرها با تحمل به پسابش و ایجاد خواب هم‌زمانی دارد. سلول‌های آندوسپرم نشاسته‌ای طی پسابش و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فاقد حیات می‌شوند یانگ و همکاران (Young et al., 1997). درحالی که جنین و لایه آلورون آن‌ها بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی خود را حفظ می‌کنند لی پرنس و همکاران (Leprince et al., 1993). تجمع پروتئین‌ها در جنین‌های بالغ به‌طور مستقیم با تحمل به از دست دادن آب مرتبط بوده به گونه‌ای که در موارد مشابه مشاهده شده است بسیاری از پروتئین‌ها در دو ناحیه جنین و اندام‌های رویشی گیاه در مقابله با تنش‌های مختلف تجمع می‌یابند گومیز و همکاران (Gomez et al., 1988). با تعیین تفاوت در بیان و تجمع پروتئین‌ها بین گیاهان متحمل و حساس می‌توان به چگونگی سازوکارهای ژنتیکی تحمل به تنش پی برد. در سال‌های اخیر، پیشرفت معناداری در شناسایی و فهرست نمودن پروتئین‌های برنج صورت گرفته است. بیش‌تر از سیزده هزار پروتئین در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بیان و بیش از ۵۷۵۵ عدد از آن‌ها طبقه‌بندی شده و همچنین نقش آن‌ها تعیین شده است کوماتسو (Komatsu, 2006). اطلاعات مربوط به پروتئوم برنج در پایگاه داده‌های موسسه بین‌المللی علوم زیست کشاورزی (National Institute of Aerobiological Science) در دسترس است. با این وجود، اطلاعات کمی در ارتباط با پروتئین‌های ذخیره‌ای در این پایگاه وجود دارد کوماتسو (2006). پروتئین‌های ذخیره‌ای به تعداد زیادی در طول رشد بذر تجمع می‌یابند و به‌طور عمده در ارگانل‌های ویژه‌ای به نام اجسام پروتئین ذخیره می‌شوند هالفورد و شورری (Halford and Shewry, 2002). به‌طوری که کیم و همکاران (Kim et al., 2009) نشان دادند، محتوای پروتئین ذخیره‌ای در آندوسپرم برنج بین ۴/۳ درصد و ۱۸/۲ درصد متفاوت بود. در مطالعه‌ی هی و همکاران (He et al., 2015) روی گندم و مقایسه پروتئوم جنین و آندوسپرم، ابراز نمودند که ۶۳ پروتئین منحصر به جنین و ۲۶ پروتئین منحصر به آندوسپرم می‌باشد. آن‌ها همچنین ابراز نمودند که جوانه‌زنی بذر گندم یک پروسه پیچیده شامل تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و پروتئومیکی می‌باشد. آندوسپرم و جنین بذر، پروتئین‌های متفاوتی را بیان می‌کنند. محققین بسیاری از تکنیک الکتروفورز دوبعدی در مطالعات خود استفاده نموده‌اند از جمله ناتارajan و همکاران (Natarajan et al., 2013) در لوبیا، علوی و همکاران (Alavi et al., 2017) در پروتئوم برگ گندم. از جمله کاربردهای پروتئومیکس مطالعه تنوع لکه‌های بیانی پروتئینی در دانه‌های

مولار تیوره، ۴ درصد چپس (CHAPS)، ۸۰ میلی مولار DTT، ۲ درصد IPG buffer و ۱ میلی مولار PMSF حل شد مصطفایی (Mostafaie, 2002). پروتئین کل نمونه‌ها توسط روش برادفورد (Bradford, 1976)، با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

الکتروفورز بعد اول

در بعد اول از نوارهای IPG به ابعاد $180 \times 3 \times 0.5$ میلی متر و در محدوده pH ۴ تا ۷، استفاده شد که ساخت شرکت Amersham Bioscience بودند. این نوارها طی این مرحله در دستگاه Ettan IPGphor 3 قرار گرفته و به مدت ۱۲ ساعت، ولتاژ به میزان ۴۵ کیلوولت به آن اعمال گردید.

الکتروفورز بعد دوم

جهت انجام بعد دوم از دستگاه تانک الکتروفورز ساخت شرکت پارس ژن استفاده گردید. ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد مناسب انتخاب گردید. بعد از تهیه ژل SDS-PAGE، نوار ژل بعد اول به مدت ۲۰ دقیقه در محلول متعادل کننده قرار داده شد و بعد از اتمام بعد دوم رنگ آمیزی با کمک کوماسی بلوبریلیانت R-250 صورت پذیرفت.

تصویربرداری و تجزیه و تحلیل ژل‌ها و داده‌های حاصل از آن‌ها با نرم افزار

پس از رنگ آمیزی، ژل‌ها با دستگاه Image scanner II ساخت شرکت فارماسیا اسکن گردید و به فرمت Tiff ذخیره شدند. جهت مطالعه کمی و کیفی لکه‌ها در نمونه‌های مختلف از نرم افزار Image Master 2D platinum of Melanie 6.2 (Gene Bio, Geneva, Switzerland) استفاده گردید. پس از شناسایی لکه‌های متناظر در تیمارهای مورد آزمایش، درصد حجمی هر لکه به همراه سایر فاکتورها شناسایی گردید. بدین ترتیب که بعد از شناسایی لکه‌ها روی ژل و ویرایش دستی آن‌ها با کمک نرم افزار به طور اتوماتیک باهم جفت شدند و بر مبنای درصد حجمی لکه‌ها آزمون t استیودنت انجام گردید. لکه‌های معنی دار بین دو تیمار به عنوان لکه‌های کاندید در نظر گرفته شدند. از داده‌های حاصله، جهت تجزیه خوشه‌ای و تجزیه تابع تشخیص (جهت تأیید نتایج گروه بندی تجزیه خوشه‌ای) با کمک نرم افزار SPSS Version 16 استفاده گردید.

نتیجه و بحث

تغییرات در بیان پروتئین‌ها با استفاده از ژل‌های الکتروفورز دوبعدی بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی آماری نشان داد، که در ارقام مورد مطالعه از مجموع ۳۲۸ نقطه پروتئینی تکرارپذیر،

گیاهی می‌باشد. هدف از مطالعه انجام شده استفاده از روش الکتروفورز دوبعدی برای ارزیابی و سنجش جامع تغییرات مولکولی ایجاد شده در بیان پروتئین‌ها و گروه بندی پروتئین‌ها براساس روش‌های آماری چندمتغیره در دو رقم متحمل و حساس به شوری در محور جنین است.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

جهت بررسی و مطالعه الگوی پروتئوم محور جنین دانه از ارقام حسنی (متحمل به شوری) و سنگ جو (حساس به شوری) برنج، تهیه شده از مرکز تحقیقات برنج شمال کشور مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج پروتئین محور جنین و تعیین مقدار کمی (غلظت) آن

تهیه نمونه مناسب از جمله مراحل کلیدی پژوهش‌های پروتئومیکسی می‌باشد. استخراج پروتئین از بافت‌های گیاهی محتاج دقت فراوان است که روش‌های گوناگون برای رسیدن به روش استاندارد و مطلوب در این مطالعه بررسی شد. استخراج پروتئین از نمونه بافت محور جنین برنج به روش شین و همکاران (Shen et al., 2002) با تغییرات انجام گردید. ۲۰۰ میلی گرم از آرد محور جنین برنج در بافر تریس ۲۰ میلی مولار حاوی EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) ۱۰ میلی مولار، ۱ میلی مولار (Phenyl Methyl Sulfonyl) PMSF (Fluoride)، ۱ میلی مولار DTT (Dithiothreitol) و ۱ درصد تریتون X-100 قرار گرفت. بعد از هموژن کردن و ورتکس نمودن آردها در دور $14000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید یانگ و همکاران (Yang et al., 2006). در ادامه رسوب خارج شد و مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۵ برابر حجم آن محلول استون حاوی ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA (Tri Chloro Acetic Acid) و ۲۰ میلی مولار DTT اضافه شد. سپس در فریزر -۲۰ به مدت یک شب نگهداری گردید. تیوب‌ها در دور $14000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. در این مرحله مایع رویی خارج شده و رسوب ۵ مرتبه با محلول استون حاوی ۲۰ میلی مولار DTT شسته شد. بعد از پایان هر مرحله مطابق قبل سانتریفیوژ انجام شد و مجدداً شستشو صورت گرفت. بعد از انجام آخرین سانتریفیوژ درب تیوب باز گذاشته شد تا استون اضافه آن تبخیر شود (یانگ و همکاران، 2006). رسوب باقیمانده در بافر تریس ۵۰ میلی مولار حاوی ۸ مولار اوره، ۲

۶۳ نقطه پروتئینی در سطح احتمال ۱ درصد، تغییر بیان نشان دادند. از ۶۳ لکه معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، تعداد ۱۵ لکه کاهش معنی‌دار داشته و تعداد ۴۸ لکه دارای افزایش بیان بودند. جدول ۱ لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار در مقایسه لکه‌های پروتئینی بیان‌شده بین محور جنین دو رقم سنگ‌جو و حسنی را نشان می‌دهد. پراکنش مطلوب لکه‌ها در سطح ژل نشان‌دهنده انتخاب صحیح نوارهای IPG با pH ۴ تا ۷ می‌باشد. از بین کل پروتئوم‌های پاسخ‌دهنده ۷۶/۲ درصد لکه‌ها افزایش بیان و ۲۳/۸ درصد کاهش بیان نشان داده‌اند که احتمالاً این می‌تواند نشان‌دهنده این مطلب باشد که رقم متحمل به شوری (سنگ‌جو) تحمل نسبتاً مطلوبی نسبت به تنش شوری داشته است. همچنین آنالیز لکه‌های پاسخ‌دهنده به نوع رقم نشان داد که بیش‌تر لکه‌ها افزایش بیان داشته‌اند. تورچی (Toourchi, 2015) در مطالعه واکنش ریشه‌ی برنج به کمبود آب با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی نشان داد که از ۱۳۵ لکه پروتئینی قابل تشخیص در رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو، تعداد ۱۴ لکه پروتئینی تغییرات بیان معنی‌دار داشتند. کاهشی بودن میزان بیان پروتئین‌ها نشان از تخریب پروتئین‌ها در رقم حساس می‌باشد. کاکایی و همکاران (Kakaei et al., 2014)، در مطالعه بافت آندوسپرم و محور جنین ارقام مختلف جو بیان داشتند که برخی از باندهای پروتئینی بیان شده (در الکتروفورز یک‌بعدی با ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد) در هر دو بافت در ارقام مورد مطالعه به‌صورت اشتراکی بیان داشتند و برخی در جنین و برخی در آندوسپرم کاهش و افزایش بیان داشتند. شکل ۱ و ۲ به‌ترتیب الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی از محور جنین رقم سنگ‌جو و حسنی، ژل قبل از آنالیز با نرم‌افزار ملانی و ژل بعد از آنالیز را نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، مقدار و حجم لکه‌ها در رقم حسنی (متحمل) بسیار بیش‌تر از رقم سنگ‌جو است و این موضوع با نتایج حاصل از

نرم‌افزار مطابقت دارد. شکل ۳ لکه‌های دارای تفاوت معنی‌دار بین محور جنین‌های دو رقم برنج سنگ‌جو (حساس) و حسنی (متحمل) را نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌دار آن‌ها در هر دو رقم کاملاً مشخص است. شکل ۴ دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم سنگ‌جو براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها با استفاده از روش WARD را نمایش می‌دهد که براساس جدول ۲ به‌طور ۱۰۰ درصد مورد تأیید تجزیه تابع تشخیص می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد تجزیه خوشه‌ای، لکه‌ها را در سه گروه کلاستری قرار داده است. هم‌چنین بر مبنای شکل ۵ تجزیه خوشه‌ای، لکه‌های معنی‌دار رقم حسنی را براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها در چهار گروه در فاصله ۷ دسته‌بندی کرده است که پروتئین‌هایی که دارای عملکرد احتمالی مشترکی هستند در یک خوشه گروه‌بندی شده‌اند. جدول شماره ۳ این گروه‌بندی را به‌صورت ۱۰۰ درصد مورد تصدیق قرار داده است. براساس شکل ۴، لکه‌ها به سه گروه آماری در فاصله ۳، تقسیم‌بندی شدند که لکه شماره ۸۱ در گروه سوم، لکه‌های شماره ۱۴۹ و ۱۵۱ در گروه دوم و سایر لکه‌ها در گروه اول قرار گرفتند که باتوجه به جدول شماره ۱، درصد میانگین حجم لکه‌ها در رقم سنگ‌جو و تصاویر لکه‌ها در شکل ۳، این هم‌خوانی وجود دارد و لکه شماره ۸۱ دارای میانگین درصد حجم لکه بالایی (۵/۰۱۸) نسبت به سایر لکه‌ها می‌باشد که باعث شد در یک گروه آماری قرار بگیرد. قرار گرفتن لکه‌ها در یک گروه آماری نشان از هم‌خانواده بودن و احتمالاً هم‌نقش بودن این لکه‌های پروتئینی می‌باشد. براساس شکل ۵، دندروگرام به سه گروه آماری تقسیم شده براساس این دندروگرام لکه شماره ۸۱ در گروه سوم آماری، لکه‌های شماره ۷۸، ۳۲۲، ۱۳۴ و ۲۷۳ در گروه دوم آماری و سایر لکه‌ها در گروه اول آماری قرار گرفتند که براساس شکل ۳ و جدول ۱، این نتایج قابل تطبیق هستند.

جدول ۱: لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار در مقایسه لکه‌های پروتئینی بیان‌شده بین محور جنین دو رقم سنگ‌جو و حسنی
Table 1: Significant changes in protein spots expressed protein spots between royan two Barley cultivar Sangjoo and Hassani

شماره لکه Number (Landmark)	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم سنگ جو $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Sangjoo cultivar $\pm$ Standard error	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم حسنی $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Hassani cultivar $\pm$ Standard error	آزمون T-test	تفاوت پروتئین IF (Induction factor)	کاهش یا افزایش بیان Decrease or Increase expression
1	0.017 $\pm$ 0.00005	0.062 $\pm$ 0.002	0.002	3.64	افزایش Increase
3	0.039 $\pm$ 0.0006	0.125 $\pm$ 0.005	0.003	3.21	افزایش Increase
32	0.002 $\pm$ 0.0004	0.011 $\pm$ 0.0003	0.004	5.5	افزایش Increase
35	0.003 $\pm$ 0.0004	0.031 $\pm$ 0.0002	0.0002	10.33	افزایش Increase
43	0.035 $\pm$ 0.0005	0.185 $\pm$ 0.007	0.003	5.28	افزایش Increase
49	0.015 $\pm$ 0.0007	0.046 $\pm$ 0.003	0.008	3.06	افزایش Increase
50	0.23 $\pm$ 0.0002	0.013 $\pm$ 0.0008	0.005	0.06	کاهش Decrease
54	0.323 $\pm$ 0.004	0.231 $\pm$ 0.007	0.007	0.72	کاهش Decrease
70	0.01 $\pm$ 0.003	0.043 $\pm$ 0.002	0.008	4.3	افزایش Increase
71	0.015 $\pm$ 0.004	0.095 $\pm$ 0.006	0.006	6.33	افزایش Increase
78	0.046 $\pm$ 0.0008	0.781 $\pm$ 0.031	0.001	16.97	افزایش Increase
81	5.018 $\pm$ 0.016	2.405 $\pm$ 0.106	0.002	0.47	کاهش Decrease
89	0.747 $\pm$ 0.016	0.091 $\pm$ 0.007	0.0007	0.12	کاهش Decrease
99	0.009 $\pm$ 0.0007	0.112 $\pm$ 0.002	0.0006	12.44	افزایش Increase
106	0.079 $\pm$ 0.009	0.229 $\pm$ 0.007	0.005	2.89	افزایش Increase
107	0.148 $\pm$ 0.003	0.487 $\pm$ 0.019	0.003	3.29	افزایش Increase
108	0.062 $\pm$ 0.005	0.143 $\pm$ 0.005	0.006	2.31	افزایش Increase
112	0.191 $\pm$ 0.001	0.585 $\pm$ 0.006	0.0002	3.06	افزایش Increase
121	0.399 $\pm$ 0.005	0.065 $\pm$ 0.0004	0.0002	0.16	کاهش Decrease
126	0.197 $\pm$ 0.003	0.032 $\pm$ 0.001	0.0003	0.17	کاهش Decrease
127	0.194 $\pm$ 0.002	0.089 $\pm$ 0.002	0.001	0.45	کاهش Decrease
134	0.148 $\pm$ 0.002	0.851 $\pm$ 0.032	0.002	5.75	افزایش Increase
135	0.051 $\pm$ 0.0006	0.161 $\pm$ 0.006	0.003	3.15	افزایش Increase
139	0.509 $\pm$ 0.006	0.027 $\pm$ 0.001	0.0002	0.05	کاهش Decrease

ادامه‌ی جدول ۱: لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار در مقایسه لکه‌های پروتئینی بیان‌شده بین محور جنین دو رقم سنگ جو و

حسنی

Table 1 Cont.: Significant changes in protein spots expressed protein spots between royan two Barley cultivar Sangjoo and Hassani

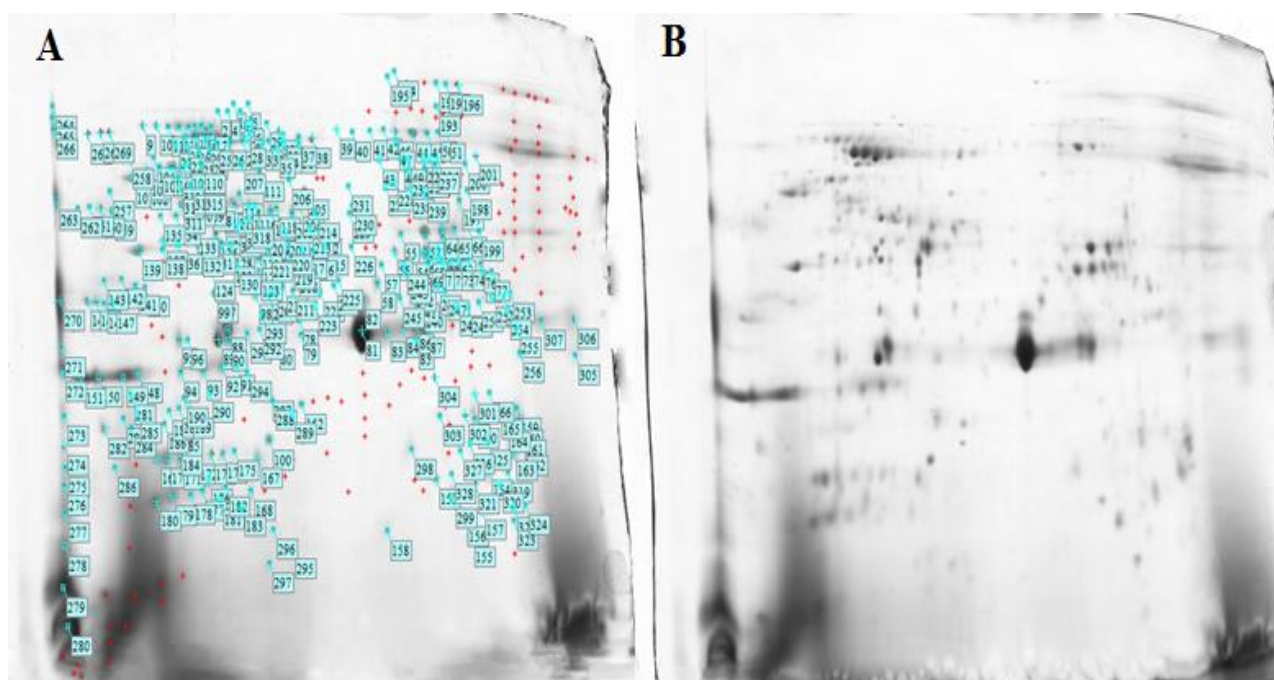
شماره لکه Number (Landmark)	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم سنگ‌جو $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Sangjoo cultivar $\pm$ Standard error	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم حسنی $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Hassani cultivar $\pm$ Standard error	آزمون تی T-test	شاخص تغییرات بیان پروتئین IF (Induction factor)	کاهش یا افزایش بیان Decrease or Increase expression
142	0.077 $\pm$ 0.001	0.143 $\pm$ 0.005	0.007	1.85	افزایش Increase
149	1.265 $\pm$ 0.011	0.261 $\pm$ 0.010	0.0002	0.21	کاهش Decrease
151	1.268 $\pm$ 0.017	0.295 $\pm$ 0.0001	0.0003	0.23	کاهش Decrease
156	0.021 $\pm$ 0.0003	0.092 $\pm$ 0.003	0.002	4.38	افزایش Increase
168	0.088 $\pm$ 0.003	0.323 $\pm$ 0.014	0.004	3.67	افزایش Increase
174	0.151 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.0003	0.0001	0.04	کاهش Decrease
175	0.083 $\pm$ 0.002	0.013 $\pm$ 0.0003	0.001	0.15	کاهش Decrease
177	0.072 $\pm$ 0.013	0.435 $\pm$ 0.001	0.001	6.04	افزایش Increase
190	0.00071 $\pm$ 0.0002	0.049 $\pm$ 0.001	0.001	69.01	افزایش Increase
197	0.138 $\pm$ 0.002	0.309 $\pm$ 0.011	0.005	2.23	افزایش Increase
199	0.021 $\pm$ 0.0005	0.167 $\pm$ 0.011	0.006	7.95	افزایش Increase
201	0.015 $\pm$ 0.0008	0.074 $\pm$ 0.001	0.001	4.93	افزایش Increase
202	0.131 $\pm$ 0.004	0.289 $\pm$ 0.003	0.001	2.21	افزایش Increase
203	0.173 $\pm$ 0.002	0.252 $\pm$ 0.006	0.007	1.45	افزایش Increase
206	0.058 $\pm$ 0.0007	0.142 $\pm$ 0.005	0.004	2.44	افزایش Increase
209	0.0004 $\pm$ 0.000005	0.081 $\pm$ 0.003	0.001	202.5	افزایش Increase
219	0.014 $\pm$ 0.0005	0.049 $\pm$ 0.001	0.003	3.5	افزایش Increase
223	0.022 $\pm$ 0.001	0.0008 $\pm$ 0.00003	0.002	0.03	کاهش Decrease
226	0.038 $\pm$ 0.0005	0.085 $\pm$ 0.003	0.005	2.23	افزایش Increase
227	0.021 $\pm$ 0.0002	0.078 $\pm$ 0.002	0.002	3.71	افزایش Increase
230	0.015 $\pm$ 0.003	0.063 $\pm$ 0.003	0.004	4.2	افزایش Increase
231	0.012 $\pm$ 0.0005	0.029 $\pm$ 0.0004	0.001	2.41	افزایش Increase
237	0.0006 $\pm$ 0.00003	0.023 $\pm$ 0.0008	0.002	38.33	افزایش Increase
238	0.0129 $\pm$ 0.0001	0.0553 $\pm$ 0.002	0.003	4.28	افزایش Increase

ادامه‌ی جدول ۱: لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار در مقایسه لکه‌های پروتئینی بیان‌شده بین محور جنین دو رقم سنگ‌جو و

حسنی

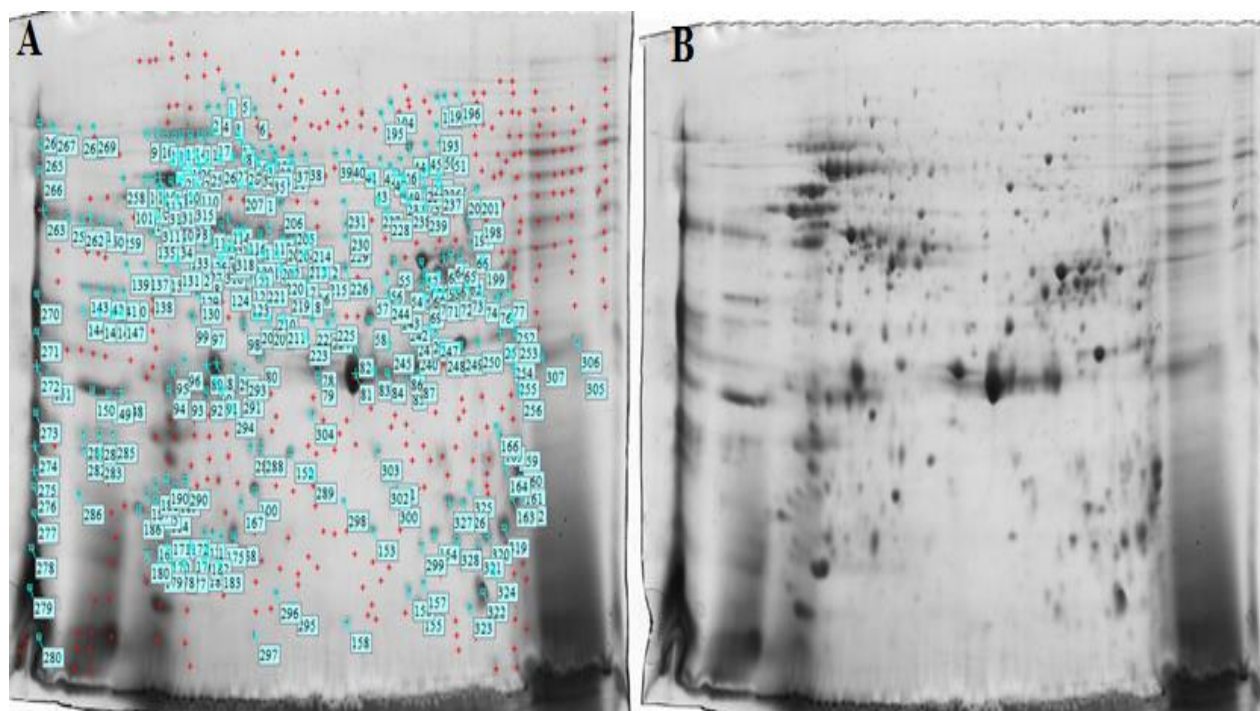
Table 1 Cont.: Significant changes in protein spots expressed protein spots between royan two Barley cultivar Sangjoo and Hassani

شماره لکه Number (Landmark)	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم سنگ‌جو $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Sangjoo cultivar $\pm$ Standard error	میانگین درصد حجمی لکه‌ها در رقم حسنی $\pm$ خطای استاندارد Vol % mean spots in Hassani cultivar $\pm$ Standard error	آزمون تی T-test	شاخص تغییرات بیان پروتئین IF (Induction factor)	کاهش یا افزایش بیان Decrease or Increase expression
248	0.079 $\pm$ 0.001	0.137 $\pm$ 0.003	0.005	1.73	افزایش Increase
253	0.071 $\pm$ 0.006	0.177 $\pm$ 0.006	0.007	2.49	افزایش Increase
264	0.109 $\pm$ 0.0002	0.341 $\pm$ 0.013	0.003	3.12	افزایش Increase
273	0.405 $\pm$ 0.005	1.398 $\pm$ 0.006	0.0001	3.45	افزایش Increase
290	0.065 $\pm$ 0.0002	0.128 $\pm$ 0.004	0.006	1.96	افزایش Increase
294	0.023 $\pm$ 0.0003	0.203 $\pm$ 0.007	0.001	8.82	افزایش Increase
298	0.181 $\pm$ 0.016	0.011 $\pm$ 0.0004	0.009	0.06	کاهش Decrease
308	0.0148 $\pm$ 0.0003	0.1093 $\pm$ 0.004	0.002	0.74	کاهش Decrease
313	0.078 $\pm$ 0.001	0.312 $\pm$ 0.012	0.003	4	افزایش Increase
315	0.099 $\pm$ 0.003	0.226 $\pm$ 0.005	0.002	2.28	افزایش Increase
319	0.032 $\pm$ 0.004	0.467 $\pm$ 0.015	0.001	14.59	افزایش Increase
320	0.0009 $\pm$ 0.0001	0.331 $\pm$ 0.012	0.001	367.77	افزایش Increase
322	0.033 $\pm$ 0.0005	0.759 $\pm$ 0.029	0.002	23	افزایش Increase
327	0.0481 $\pm$ 0.011	0.211 $\pm$ 0.0041	0.005	4.38	افزایش Increase
328	0.019 $\pm$ 0.002	0.143 $\pm$ 0.004	0.002	7.52	افزایش Increase



شکل ۱: الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی از محور جنین برنج رقم سنگ‌جوه، ژل قبل از آنالیز با نرم‌افزار ملانی (B) و ژل بعد از آنالیز (A)، در محدوده pH ۴-۷ بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد

Fig. 1: Two-dimensional electrophoresis pattern of rice, Sangjoo cultivar, before analysis with Melani software (A) and after analysis with Melani software (B) in pH 4-7, on 12% acrylamide gel

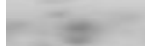
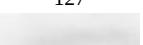
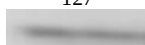
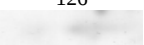
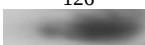
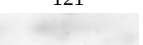
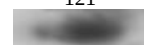
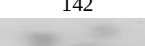
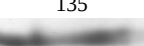
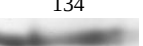
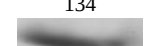
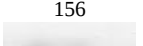
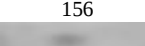
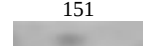
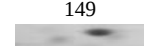
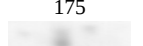
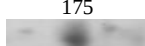
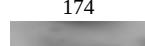
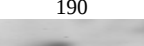
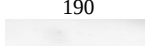
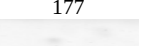
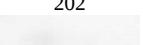
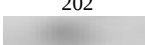
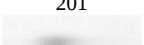
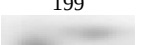
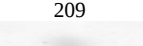
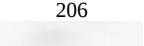
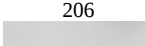
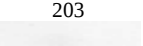
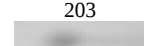
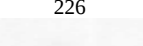
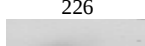
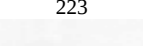
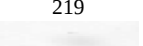
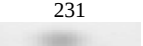
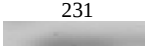
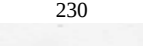
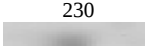
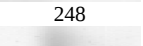
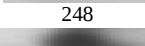
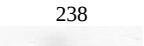
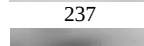
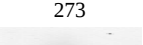
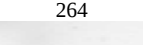
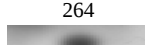
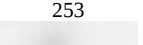
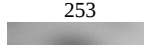
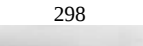
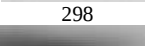
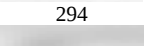
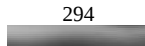
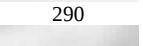
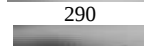
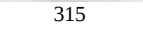
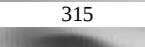
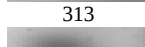
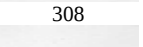
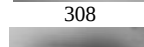
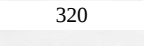
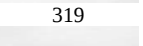
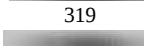


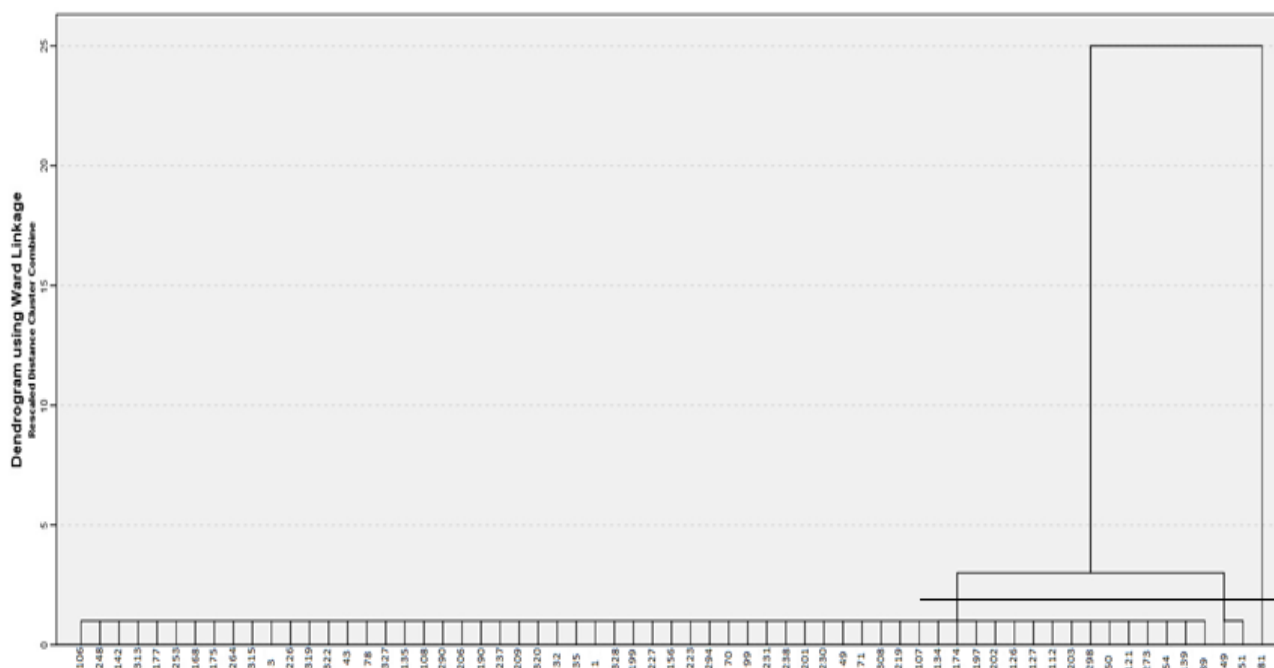
شکل ۲: الگوی حاصل از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های استخراجی از محور جنین برنج رقم حسنی، ژل قبل از آنالیز با نرم‌افزار ملانی (B) و ژل بعد از آنالیز (A)، در محدوده pH ۴ تا ۷ بر روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد

Fig. 2: Two-dimensional electrophoresis pattern of rice, Hassani cultivar, before analysis with Melani software (A) and after analysis with Melani software (B) in pH 4-7, on 12% acrylamide gel

شکل ۳: لکه‌های دارای تفاوت معنی‌دار بین محور جنین‌های دو رقم برنج سنگ‌جو (حساس) و حسنی (متحمل)

Fig. 3: Spots a significant difference between the axis of embryos crops barley rice cultivars Sangjoo (susceptible) and Hassani (resistance)

رقم سنگ‌جو Sangjoo cultivar	رقم حسنی Hassani cultivar	رقم سنگ‌جو Sangjoo cultivar	رقم حسنی Hassani cultivar	رقم سنگ‌جو Sangjoo cultivar	رقم حسنی Hassani cultivar
					
32	32	3	3	1	1
					
49	49	43	43	35	35
					
70	70	54	54	50	50
					
81	81	78	78	71	71
					
106	106	99	99	89	89
					
112	112	108	108	107	107
					
127	127	126	126	121	121
					
142	142	135	135	134	134
					
156	156	151	151	149	149
					
175	175	174	174	168	168
					
197	197	190	190	177	177
					
202	202	201	201	199	199
					
209	209	206	206	203	203
					
226	226	223	223	219	219
					
231	231	230	230	227	227
					
248	248	238	238	237	237
					
273	273	264	264	253	253
					
298	298	294	294	290	290
					
315	315	313	313	308	308
					
ث					
322	322	320	320	319	319
					
		328	328	327	327



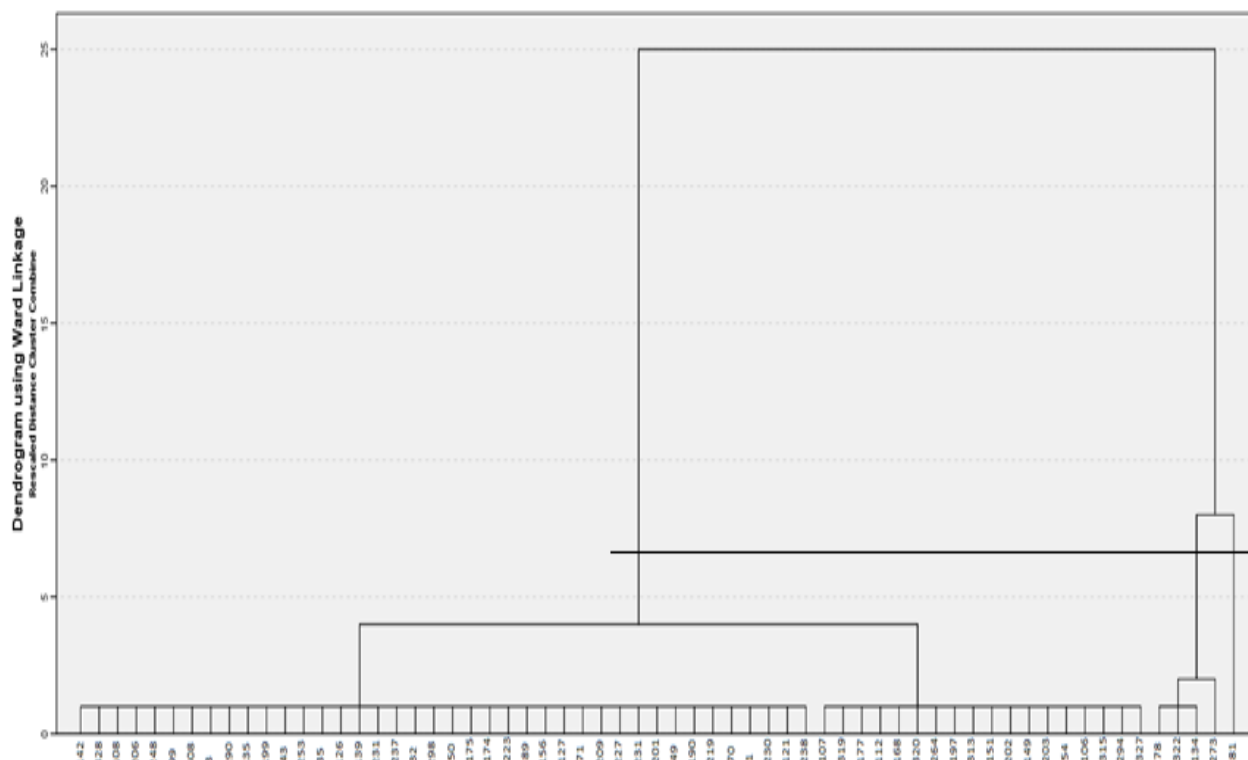
شکل ۴: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم سنگ‌جو براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها با استفاده از روش WARD
Fig. 4: The dendrogram of cluster analysis of Sangjoo cultivar based on the average volume percent of spots using WARD

جدول ۲: نتایج تابع تشخیص برای گروه‌بندی براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها در ژنوتیپ سنگ‌جو
Table 2: Result of discrimination analysis for grouping based on the average volume percent of spots in Sangjoo cultivar

Predicted group membership								گروه‌ها بر مبنای تجزیه خوشه‌ای Groups based on cluster analysis
3		2		1				
درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	
100	60	0	1	0	0	100	59	1
100	1	0	0	100	1	0	0	2
100	2	100	2	0	0	0	0	3

جدول ۳: نتایج تابع تشخیص برای گروه‌بندی براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها در ژنوتیپ حسنی
Table 3: Result of discrimination analysis for grouping based on the average volume percent of spots in Hassani cultivar

اعضای گروه								گروه‌ها بر مبنای تجزیه خوشه‌ای Groups based on cluster analysis
مجموع Total	Predicted group membership							
	3		2		1			
درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	درصد Percent	تعداد Number	
100	58	0	0	0	1	100	57	
100	4	0	0	100	4	0	0	
100	1	100	1	0	0	0	0	



شکل ۵: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای رقم حسنی براساس میانگین درصد حجمی لکه‌ها با استفاده از روش WARD
Fig. 5: Dendrogram of the cluster analysis based on the spots volume percentage of average with using WARD in Hassani cultivar

نتیجه‌گیری کلی

پروتئومیکس در گیاهان کاربرد وسیعی داشته و می‌تواند به یافتن ژن‌های تأثیرگذار در فعالیت‌های گیاهی کمک نماید. پروتئین‌های موجود در محور جنین رقم حسنی که به‌عنوان یک رقم متحمل محسوب می‌شود از تعداد ۶۳ لکه معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، تعداد ۱۵ لکه کاهش معنی‌دار داشته و تعداد ۴۸ لکه دارای افزایش بیان بودند که در ۷۶/۲ درصد نسبت به رقم حساس به شوری سنگ‌جو، افزایش بیان داشتند. این موضوع نشان‌دهنده افزایش پروتئین‌ها در رقم متحمل برای

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۵-۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

مقابله با تنش شوری می‌باشد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که برای شناسایی ژن‌های متحمل به تنش شوری می‌توان از رقم مذکور استفاده کرد. بین این پروتئین‌ها تنوع قابل‌قبولی از نظر واکنش به تنش شوری مشاهده می‌گردد. کاهش بودن میزان بیان لکه‌ها در رقم حساس به شوری نشان از تخریب پروتئین‌ها دارد. هدف از این مطالعه، دسته‌بندی آماری لکه‌های پروتئینی بیان شده به صورت افزایشی و کاهشی و نیز مقایسه این لکه‌های بیان شده در دو رقم حساس و متحمل برنج بوده است و در مطالعات آتی نتایج بررسی خانواده پروتئین‌ها ارائه خواهد شد.