



بررسی پاسخ پروتئینی زعفران تحت تنش اسمزی به روش پروتئومیکس

محمد رضا نقوی^{۱*}، ابوالفضل توسلی^۲

۱- استادیار، اصلاح نباتات-ژنتیک بیومتری، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲- استادیار، زراعت-اکولوژی گیاهان زراعی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: [Email: mr_naghavi@pnu.ac.ir](mailto:mr_naghavi@pnu.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶

چکیده

شناسایی مکانیسم مولکولی-پروتئینی زعفران در مقابل تنش اسمزی در ایران که یکی از کشورهای خشک و نیمه‌خشک جهان محسوب می‌شود، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین منظور و برای بررسی پاسخ پروتئینی به تنش اسمزی اعمال شده با غلظت‌های مختلف PEG₆₀₀₀، آزمایشی با استفاده از دو توده زعفران (تربت‌حیدریه و مرند) به روش کشت آبکشت (هیدروپونیک) در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) در گلخانه انجام شد. دو هفته پس از اعمال تنش اسمزی نمونه‌برداری از کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد. بر طبق نتایج بدست آمده از لحاظ واکنش پروتئینی تحت تنش اسمزی توده تربت‌حیدریه نسبت به توده مرند در وضعیت مطلوبتری قرار داشت. همچنین نتایج تجزیه پروتئوم دو توده نشان داد که از بین ۱۷ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمارهای تنش اسمزی، تعداد چهار لکه پروتئینی بین دو توده مشترک و تعداد شش و هفت لکه پروتئینی بترتیب منحصر به توده تربت‌حیدریه و مرند بودند. در تفسیر پاسخ اختصاصی می‌توان اظهار داشت که توده متحمل‌تر تربت‌حیدریه تحت تنش بیشتر در مسیر دفاع آنتی‌اکسیدانی فعالیت داشته و شامل افزایش فعالیت پروتئین‌های peroxiredoxin و harpin binding protein 1 بودند. در حالی که توده حساس‌تر مرند بیشتر آسیب خود را در مسیرهای مختلف بیولوژی از طریق کاهش فعالیت پروتئین‌ها خصوصاً کاهش پروتئین Thylakoid lumenal 29.8 kDa دخیل در واکنش نوری فتوسنتز داشت. در مجموع پاسخ پروتئینی متفاوت دو توده و مهم‌ترین واکنش پروتئینی و مسیرهای متابولیکی مهم توده‌های مورد مطالعه زعفران مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه پروتئوم، تربت‌حیدریه، زعفران، مسیرهای متابولیکی.

مهمی در دریافت علامت تنش، انتقال علامت‌های تنش و تنظیم بیان ژن‌ها، نظیر کنترل بیان ژن‌های کارکردی بر عهده دارند. از این گروه می‌توان به ژن‌هایی که جهت بیان پروتئین کینازها و همچنین عوامل رونویسی اشاره نمود (Shao et al., 2005).

تنش اسمزی در گیاه زعفران به وسیله ژن‌های تنظیمی متعددی کنترل می‌شوند. تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ-گر به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان گزارش شده‌اند. این ژن‌ها در شرایط تنش القاء شده و نه تنها در حفاظت از سلول‌ها در برابر تنش به وسیله تولید پروتئین‌های متابولیکی نقش دارند، بلکه در تنظیم ژن‌ها برای ترانس‌سکریپشنی، در واکنش به تنش‌ها نیز مؤثر هستند. بطور کلی می‌توان بیان کرد که ژن‌ها و پروتئین‌هایی را که در مقاومت به تنش در گیاهان دخیل هستند، به چهار دسته پروتئین‌های کارکردی، ترکیبات فعال اسمزی، عوامل رونویسی و عوامل سیگنالی تقسیم می‌شوند (Shao et al., 2005).

مطالعه پروتئوم ابزار قدرتمندی برای تفکیک بافت‌های پروتئینی و روشی مناسب برای بررسی تغییرات پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌ها و تغییرات محیطی به حساب می‌آید (Zang & Komatsu, 2007). در مطالعات متعدد با استفاده از روش پروتئومیکس، پروتئین‌های القاپذیر از تنش غیرزیستی از جمله تنش اسمزی در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال گزارش شده است که در آزمایشی، تجزیه پروتئوم گیاهچه‌های برنج به روش 2D-PAGE تحت تنش اسمزی انجام شده و نتایج نشان داده است که بعضی از پروتئین‌ها از جمله calreticulin precursor، پروتئین شوک گرمایی و DnaK-type molecular chaperone کاهش بیان نشان داده‌اند (Zang & Komatsu, 2007). از طرف دیگر، در آزمایشی به بررسی ارزیابی تأثیر تنش اسمزی بر تغییرات بیان پروتئین‌های غلاف برگ برنج در مراحل اولیه رشد این گیاه پرداخته شد. در این آزمایش گیاهچه‌های دو هفته‌ای برنج را به مدت دو تا شش روز تحت تنش اسمزی قرار دادند و تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دوبعدی با بعد اول IEF و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی آبی کوماسی و توالی‌یابی کروماتوگرافی مایع انجام دادند. نتایج نشان داد که تعداد ۱۰ پروتئین

زعفران جایگاه خاصی در میان محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد و در حال حاضر تنها در استان خراسان رضوی سطح زیر کشت آن در ربع قرن گذشته از ۳۰۰۰ هکتار به بیش از ۲۵۰۰۰ هکتار افزایش یافته و میزان تولید آن از ۱۸ تن به ۱۴۰ تن رسیده است (Golmohammadi, 2014; Hosseini & Rahimi, 2018). درآمد حاصل از کاشت زعفران برابر یک سوم از فروش محصول آن می‌باشد، لذا درآمد قابل توجهی نصیب زارعین می‌گردد. از این بابت کشت این محصول توجیه اقتصادی داشته و در صورت ایجاد و تحول در زمینه زراعت آن (علی‌الخصوص بهبود روش‌هایی جهت کاهش عوامل محدود کننده عملکرد این محصول) ارزش افزوده آن را چندین برابر کرده که در این بین درآمد چشمگیری نصیب کشاورزان و اقتصاد کشور می‌گردد (Golmohammadi, 2014).

زعفران به لحاظ مصرف آب، گیاه کم مصرفی بوده و معمولاً می‌تواند به بهترین نحو تنش اسمزی حاصل از کمبود آب را تحمل نماید. گرچه زعفران در شرایط گرم و خشک رشد می‌کند، ولی اعمال تنش آبی به این گیاه سبب کاهش عملکرد آن خواهد شد (Pazoki et al., 2015; Khashei Siuki et al., 2013). با شناخت ژن‌های درگیر، در ایجاد تحمل به تنش اسمزی و انتخاب ارقام بومی مناسب، می‌توان از زعفران در اکثر مناطق با شرایط آب و هوایی متفاوت، میزان محصول قابل توجهی تولید نمود (Bery, 2007; Ghorbanpour et al., 2020). بر این اساس اتکاء به پتانسیل ژنتیکی ارقام و تلاش در جهت بهبود و اصلاح ژنتیکی آنها نقش اساسی در القای تحمل به اسمزی ایجاد می‌نماید.

در راهکارهایی که گیاهان برای مقابله با تنش استفاده می‌کنند ژن‌های متعددی دخالت دارند که بر اساس فرآورده‌های پروتئینی به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند: ژن‌های کارکردی یا عملکردی، که فرآورده‌های این ژن‌ها به‌طور مستقیم، مقاومت به تنش در گیاه را بر عهده دارند و شامل ژن‌هایی جهت بیان شدن پروتئین‌های LEA، پروتئین‌های تنظیم‌کننده فشار اسمزی، بتائین، پرولین و آنزیم‌های مؤثر در سم‌زدایی سلولی و غیره می‌باشند (Wilkinson & Davies, 2002). گروه دیگر ژن‌های تنظیمی هستند که فرآورده آنها نقش

پروتئین‌ها مشخص شد که سهم نسبی این پروتئین‌ها بترتیب بصورت دخالت در گلیکولیز، دخیل در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، دخیل در بیوسنتز اسیدهای آمینه، دخیل در چرخه کالوین، درگیر در مکانیسم‌های دفاعی، و دخیل در تنظیم پس از ترجمه بود (Caruso et al., 2009). از طرف دیگر، گزارش شده است که بیان ژن‌های AREB، DREB و MPK در گیاه زعفران با استفاده از تکنیک Real Time-PCR در اندام‌های متفاوت گیاه زعفران تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری داشته است که این افزایش بیان در اندام‌های رویشی و زایشی متفاوت بوده و این نتیجه موجب افزایش فرآورده پروتئینی این ژن‌ها و تحمل در برابر خشکی می‌شود (Yousefi Javan & Gharari, 2018).

در مجموع مهمترین هدف پژوهش حاضر بررسی تفاوت‌های پاسخ پروتئینی دو توده تربت‌حیدریه و مرند تحت شرایط تنش اسمزی مشابه و تعیین مهمترین پروتئین‌های دخیل در این زمینه بود. همچنین در این راستا شناسایی مسیرهای مهم متابولیکی موثرتر در جهت تحمل به تنش اسمزی در زعفران صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر دو توده زعفران تربت‌حیدریه و مرند در مرحله رشد رویشی (گیاهچه‌ای) به روش کشت سیستم آبکشت (هیدروپونیک) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور هشتگرد از نظر پاسخ به تنش اسمزی مورد ارزیابی قرار گرفتند و تنش اسمزی با استفاده از PEG₆₀₀₀ اعمال شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. فاکتور تنش شامل شاهد (بدون استفاده از PEG₆₀₀₀)، 10% PEG₆₀₀₀ (-0.26MP)، 15% PEG₆₀₀₀ (-0.39MP) و 20% PEG₆₀₀₀ (-0.52MP) حجمی بود و فاکتور دیگر شامل توده‌های زعفران در نظر گرفته شد.

در مدت آزمایش، دوره روشنایی ۱۴ ساعت در نظر گرفته شد و برای تنظیم نور از روشنایی طبیعی و مصنوعی با استفاده از لامپ‌های فلورسانت و التهایی استفاده شد. دمای روزانه ۲۵±۳ و شبانه ۱۵±۳ سانتی-گراد برای رشد گیاهچه‌ها فراهم گردید. رطوبت نسبی

افزایش بیان و دو پروتئین کاهش بیان معنی‌داری داشتند که با گروه‌بندی این پروتئین‌ها مشخص شد که در فعالیت‌های دفاعی، تأمین انرژی، متابولیسم، ساختار سلولی و ترانس‌مانی پیام نقش دارند (Ali & Komatsu, 2006). همچنین در این راستا، گزارش شده است که در بساک‌های برنج تحت تنش، پروتئین انتقال‌دهنده لیپید تغییر بیان نشان دادند و همچنین Glyoxalase I و GST در رقم متحمل تجمع یافتند که این دو آنزیم وابسته به فرایند گلوکاتایون هستند و در گیاهان در طی تقسیم سلول و در پاسخ به تنش‌های گوناگون از جمله تنش اسمزی افزایش می‌یابند (Imin et al., 2006). از طرف دیگر، در تجزیه پروتئوم ژنوتیپ‌های جو تحت تنش خشکی نیز نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل و حساس پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز همراه با سنتز آمینواسیدها و پروتئین‌های مرتبط با degradation بیان متفاوتی داشتند. این نتایج نشان‌دهنده این است که پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم کلروپلاستی و تولید انرژی نقش مهمی در سازگاری با شرایط تنش کمبود آب در مرحله گیاهچه‌ای جو دارند (Kausar et al., 2013). در آزمایشی دیگر گزارش شد یک نوع پروتئین ۳-۳-۱۴، برخوردار از کاهش میزان شناخته شد که در گروه پروتئین‌های سیگنال قرار داشت. همچنین این پژوهشگران کاهش میزان پروتئین Cu/Zn superoxide dismutase را در سلول‌های محافظ روزه تحت تنش مشاهده کردند (Zhu et al., 2010). در آزمایش تجزیه پروتئوم کلزا تحت تنش خشکی گزارش گردید که گروه‌های پروتئینی مرتبط با متابولیسم سلولی، پروتئین‌های درگیر با تجزیه و پیش‌پروتئین‌ها و ترانس‌مانی پیام تحت تنش کاهش میزان نشان دادند در حالی که پروتئین‌های مرتبط با تولید انرژی (فتوسنتز)، سنتز پروتئین و تولید پروتئین‌های دفاعی در سلول افزایش میزان داشتند (Koh et al., 2015). از طرف دیگر، در آزمایش دیگری روی گندم دوروم، تنش خشکی به مدت هفت روز بر گیاهچه‌های هفت روزه اعمال و با گیاهان شاهد مقایسه گردید. تجزیه پروتئوم توسط الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به صورت IPG و بعد دوم SDS-PAGE، رنگ آمیزی توسط کوماسی و طیف‌سنجی جرمی نشان داد که ۳۶ لکه پروتئینی به صورت تکرارپذیر دارای تغییرات بیان معنی‌دار بین تنش و شاهد بودند. با گروه‌بندی این

سپس تهیه ژل نکه دارنده ۵ درصد انجام گرفت. در ادامه نوارهای بعد اول بر روی ژل‌های بعد دوم قرار گرفته و با استفاده از آگارز ۱٪ به آنها متصل شدند. در نهایت عملیات رانش با جریان ۳۵ میلی آمپر برای هر ژل انجام شد. سپس رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول آبی کوماسی R-250 انجام شد. پس از رنگ‌بری (Destaining) ژل‌ها جهت تصویربرداری مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تصویر برداری ژل‌ها از دستگاه اسکنر GS-800Bio-Rad استفاده شد.

تجزیه کمی لکه‌های پروتئینی با نرم‌افزار PDQuest انجام شد. درصد حجمی لکه‌های پروتئینی تکراردار که توسط نرم افزار کمی شده بودند، مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. برای شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر معنی‌دار توسط نرم‌افزار حجم نرمال شده لکه‌های پروتئینی بدست آمد و پس از تجزیه واریانس (ANOVA)، مقایسه میانگین از روش ($p < 0.05$) LSD انجام شد. از بین نقاط انتخاب شده معنی‌دار، نقاطی که IF آنها بزرگتر از ۲ و یا کوچکتر از ۰/۵ بود، مورد انتخاب نهایی قرار گرفتند. نقطه‌ای دارای IF بزرگتر از واحد است که تحت تنش اسمزی افزایش مقدار نشان داده است. برای کاهش ریسک این مقدار بزرگتر از ۲ گرفته شد. در مقابل، نقاط دارای IF کمتر از واحد دارای کاهش مقدار تحت تنش اسمزی هستند و در اینجا هم برای کاهش ریسک، مقدار کمتر از ۰/۵ مد نظر قرار گرفت.

در نهایت پس از هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی هدف، از دستگاه طیف‌سنجی جرمی دو مرحله‌ای (MS/MS) مدل Optizen 2120 UV plus برای شناسایی لکه‌ها استفاده شد. یک میکرولیتر از پپتیدهای حاصل از هضم پروتئینی به ستون C18 PepMap نانوکروماتوگرافی تزریق شدند. سپس پپتیدها با استفاده از فرمیک اسید ۰/۱ درصد در استونیتریل رقیق شده و در ستون C18 براساس حرکت در فاز معکوس از یکدیگر جدا شدند. بعد از آن پپتیدها به اسپکترومتری جرمی پاشیده شدند. محدوده نسبت جرم بر بار پپتیدها بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از اسپکترومتری با نرم‌افزار بیورکس (Bioworks software ver. 3.3.1) به فرمت قابل استفاده با موتور جستجوگر مسکات تبدیل شد (Twyman, 2004). در ادامه شناسایی پروتئین‌های مربوطه با استفاده از برنامه

گلخانه در طول مدت انجام آزمایش بین ۶۰-۴۵ درصد در نوسان بود. اعمال پلی‌اتیلن گلیکول به صورت تدریجی و از زمان شروع تنش، هر روز مقدار پنج درصد پلی‌اتیلن گلیکول به سطح تنش بود، بطوری که سطح ۲۰ درصد آن پس از چهار روز فراهم شد. دو هفته پس از اعمال تنش اسمزی روی گیاهچه‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز از سبز شدن، نمونه‌برداری برای تجزیه پروتئوم از کلیه واحدهای آزمایشی انجام شد.

پس از نمونه‌برداری تجزیه پروتئوم انجام و نوع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده در توده‌های زعفران تحت تنش مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه پروتئوم، از برگ گیاهچه‌های هر واحد آزمایشی بطور تصادفی به مقدار ۰/۵ گرم وزن شد و درون فویل آلومینیومی در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج پروتئین کل از روش TCA-Acetone (Damerval et al., 1986) استفاده شد. رسوب حاصل از مرحله قبل توسط ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز (4.8 g Urea, NP-40, 0.2ml pH=3.5- Amphotine, 10 0.2ml Polyvinylpyrrolidone-40) حل شده و یک ساعت در دمای اتاق ورتکس گردید. سپس سانتریفوژ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد؛ با انتقال روشنای به تیوب جدید، سانتریفوژ با مشخصات قبل تکرار شده و در نهایت ۱۲۰ میکرولیتر از روشنای جهت بارگذاری در بعد اول به کار رفت.

الکتروفورز بعد اول به روش نوارهای IPG انجام شد. برای انجام بعد اول از PROTEAN IEF focusing tray (Bio Rad) و دستگاه PROTEAN IEF cell ((Bio Rad) استفاده شد. سپس متعادل‌سازی (equilibration) نوارها انجام شد (Herbert, 1999). برنامه زمانی تغییر ولتاژ برای بارگذاری بعد اول شامل: ۵۰ ولتاژ برای ۳۰ دقیقه، ۱۵۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۳۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۷۵۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۱۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۲۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۳۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت، ۴۰۰۰ ولتاژ برای یک ساعت و ۵۰۰۰ ولتاژ برای دوازده ساعت ژل‌های بعد دوم به صورت دو تکه (شامل ژل جدا کننده (Separating gel) و ژل نکه دارنده (Stacking gel) تهیه شدند. ابتدا ژل جدا کننده ۱۵ درصد تهیه گردید.

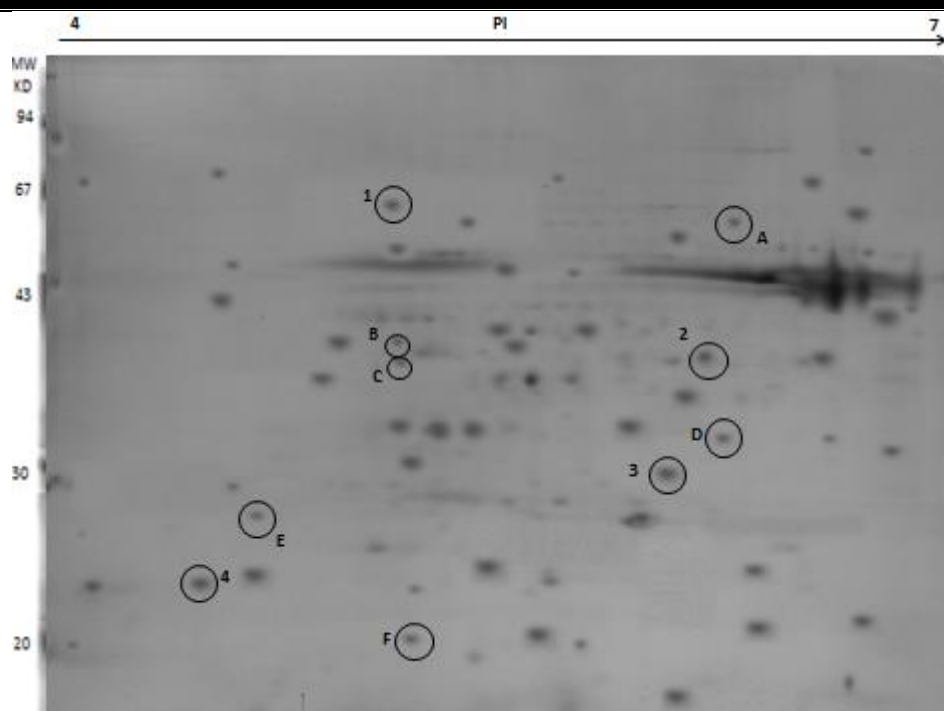
برخط MASCOT انجام شد. مبنای انتخاب، امتیاز بالای ۶۶ ($p < 0.05$) بود و علاوه بر این حداقل ۱۰ درصد همپوشانی توالی‌های پروتئینی در انتخاب پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج حاصله با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی NCBI و Expasy مورد جستجو و بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش توسط اسپکترومتری جرمی و مشخص کردن نوع فعالیت آنها، پروتئین‌های دارای حوزه فعالیت مشابه در گروه مشترک قرار گرفتند و با توجه به تعداد آنها نمودارهای گروه‌بندی پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شدند.

نتایج و بحث

پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی به روش پروتئومیک

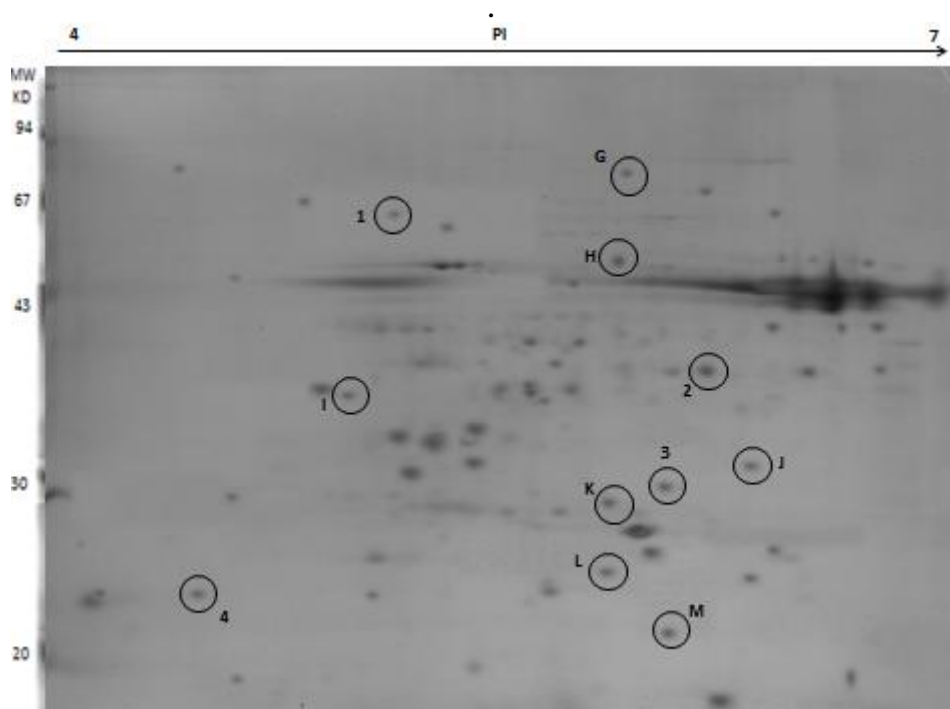
از مجموع لکه‌های شناسایی شده تعداد ۱۷ لکه پروتئینی بر روی ژل‌های رنگ آمیزی شده و با توجه به مقدار IF آنها انتخاب شدند. از بین این لکه‌های پروتئینی چهار لکه پروتئینی بین دو توده مشترک بودند و شش لکه فقط در توده تربت‌حیدریه تغییر مقدار داشت و هفت لکه هم تنها در توده مرند تحت تنش، تغییر مقدار معنی‌دار نشان دادند که در مجموع ۱۷ لکه پروتئینی پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی در هر دو توده شناسایی شد. تصویر ژل مرجع مربوط به دو توده تربت‌حیدریه و مرند در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج می‌توان اظهار داشت که در توده متحمل زعفران (که بر اساس بروز فنوتیپی مشخص شده بود) تعداد پروتئین‌های دارای افزایش مقدار در شرایط تنش اسمزی نسبت به توده حساس بیشتر بود (جدول ۱). بیشتر بودن تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در توده تربت‌حیدریه و همچنین

افزایش مقدار اکثر پروتئین‌های معنی‌دار در این توده نسبت به توده حساس بیانگر این است که این توده با دخالت دادن پروتئین‌های مختلف و با مقدار بیشتر تحت تنش اسمزی عکس‌العمل بهتری نسبت به توده حساس جهت حفظ رشد خود داشته است. در مطالعه پروتئوم ارقام حساس و متحمل برنج نسبت به تنش خشکی، زیاد بودن تعداد پروتئین‌های دارای افزایش مقدار در رقم متحمل مشاهده گردید که مشابه نتایج مطالعه حاضر روی دو توده زعفران می‌باشد (Hosseini, Salekdeh et al., 2002). بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که در طی تنش یکسری از پروتئین‌ها افزایش بیان یا کاهش بیان می‌یابند و برخی از پروتئین‌ها در طی تنش بیان نمی‌شوند (Hashimoto & Komatsu, 2007; Zang & Komatsu, 2007). همچنین گزارش شده است که برخی گیاهان تحت تنش کمبود آب تعداد لکه‌های دارای کاهش بیان بیشتر از لکه‌های دارای افزایش بیان است (Mushtaq et al., 2008). از طرف دیگر، مشخص شده است که تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطوح بالاتر تنش بیش از سطوح پائین است. به عبارتی هر چه سطح تنش بیشتر شود پروتئین‌های بیشتری برای مقابله با تنش واکنش نشان می‌دهند و همچنین رقم متحمل کمتر از رقم حساس تحت تأثیر سوء تنش قرار می‌گیرد (Hashimoto & Komatsu, 2007). پروتئین پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی با استفاده از روش MALDI TOF/TOF MS مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۱). در روش MALDI TOF، شناسایی پروتئین‌ها بروش انگشت-نگاری جرم پپتید (PMF) صورت می‌گیرد (Twyman, 2004). جایگاه پروتئین‌های شناسایی شده در ژل در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱. الگوی الکتروفورز دوبعدی (ژل مرجع) توده تربت‌حیدریه که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.

Fig 1. Two-dimensional electrophoresis pattern (reference gel) of Torbat Heydariieh landrace in which responsive common protein spots to osmotic stress are identified by numbers and non-common spots are identified by English letters



شکل ۲. الگوی الکتروفورز دوبعدی (ژل مرجع) توده مرند که در آن لکه‌های پروتئینی مشترک پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی با شماره و لکه‌های غیر مشترک با حروف انگلیسی مشخص شده است.

Fig 2. Two-dimensional electrophoresis pattern (reference gel) of Marand landrace in which responsive common protein spots to osmotic stress are identified by numbers and non-common spots are identified by English letters.

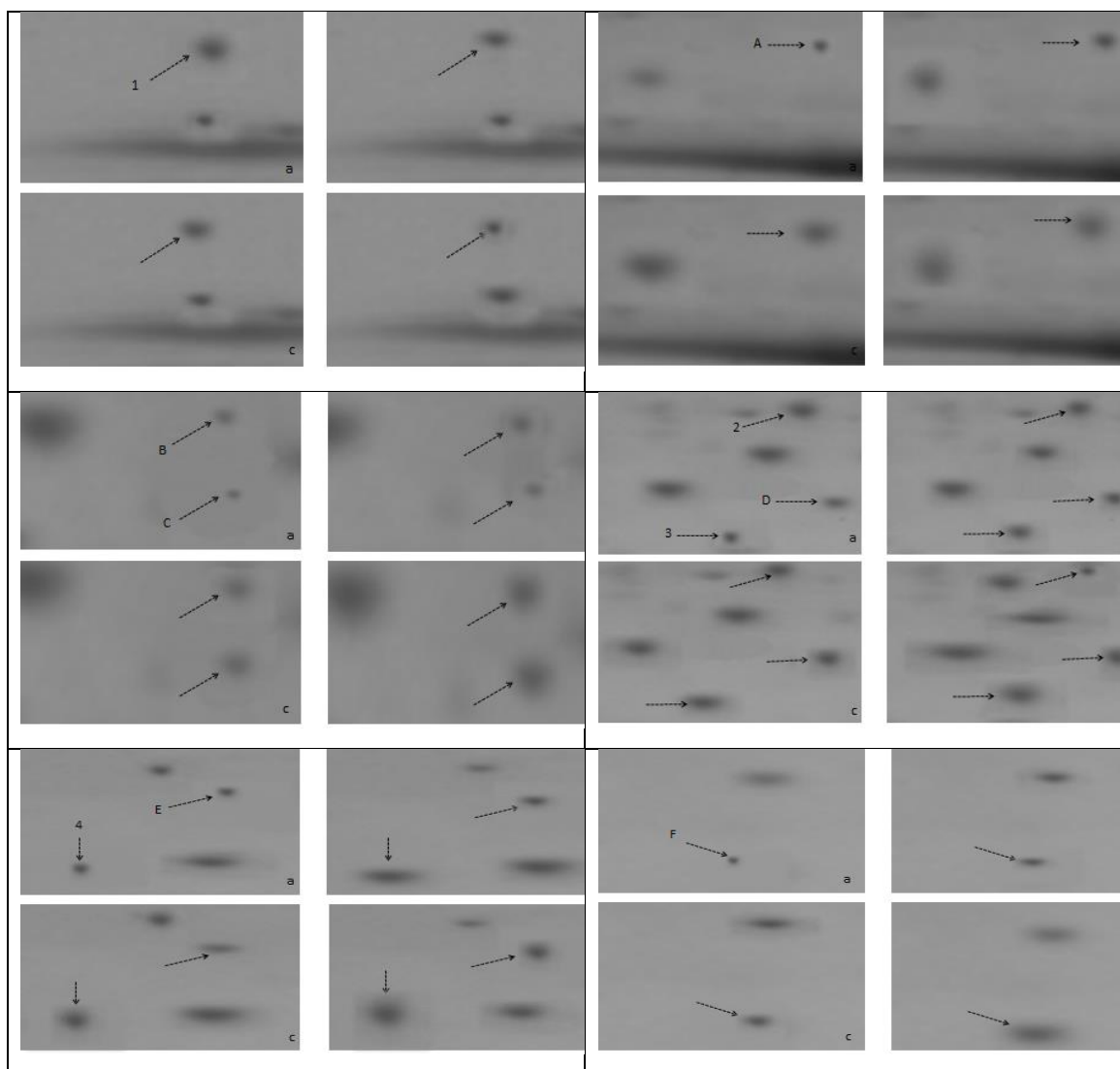
که با توجه به کاهش مقدار آنها نشاندهنده کاهش عملکرد این توده تحت تنش است (جدول ۱ و شکل ۳، ۴ و ۷). علاوه بر آن در مجموع بر اساس الگوی تغییر مقدار پروتئین‌ها در شرایط نرمال و همچنین تنش اسمزی می‌توان پنج گروه (حالت) را برای پروتئین‌ها مشاهده کرد: الف- پروتئین‌هایی که در هر دو توده تربت‌حیدریه و مرند افزایش مقدار داشتند و این افزایش در توده تربت‌حیدریه بیشتر بود (مانند پروتئین شماره ۳ و ۴). ب- پروتئین‌هایی که در هر دو توده تربت-حیدریه و مرند کاهش مقدار داشتند و کاهش آن در توده تربت‌حیدریه بیشتر بود (مانند پروتئین شماره ۱ و ۲). ج- پروتئین‌هایی که فقط در توده تربت‌حیدریه تظاهر از نوع افزایشی داشتند (مانند پروتئین با کد A) و د- پروتئین‌هایی که فقط در توده مرند تظاهر افزایشی داشتند (مانند پروتئین با کد G) و و- پروتئین‌هایی که فقط در توده مرند تظاهر کاهش‌ی داشتند (مانند پروتئین H) (شکل ۳، ۴، ۵، ۶).

در مجموع پس از شناسایی لکه‌های پروتئینی دارای تغییر مقدار معنی‌دار با استفاده از طیف‌سنجی جرمی، از مجموع ۱۷ لکه، چهار لکه پروتئینی بطور مشترک بین دو توده متحمل و حساس شناسایی شد که تحت تنش اسمزی تغییر مقدار نشان دادند (جدول ۱). همانطور که در جدول ۱ و شکل ۷ نشان داده شده است بر طبق عملکرد این پروتئین‌ها در داخل سلول و بر اساس روش براردینی و همکاران (Berardini et al., 2004) گروه‌بندی پروتئین‌ها انجام شد و پروتئین‌های مشترک به ترتیب مربوط به گروه دخیل در اسمیلاسیون نیتروزن، واکنش نوری فتوسنتز، تولید انرژی و بیوسنتز نشاسته هر کدام یک پروتئین بودند (جدول ۱ و شکل ۷). علاوه بر آن شش لکه پروتئینی تنها در توده تربت-حیدریه تظاهر داشتند که بیشتر مربوط به دفاع آنتی-اکسیدانی بودند که با توجه به افزایش آنها در جهت تقویت شرایط همئوستازی تحت تنش فعالیت داشتند. در حالی که هفت لکه پروتئینی تنها در توده مرند دیده شدند که بیشتر مرتبط با واکنش نوری فتوسنتز بودند

جدول ۱. مشخصات لکه‌های پروتئینی پاسخ‌دهنده در توده تربت‌حیدریه و مرند زعفران تحت تنش اسمزی

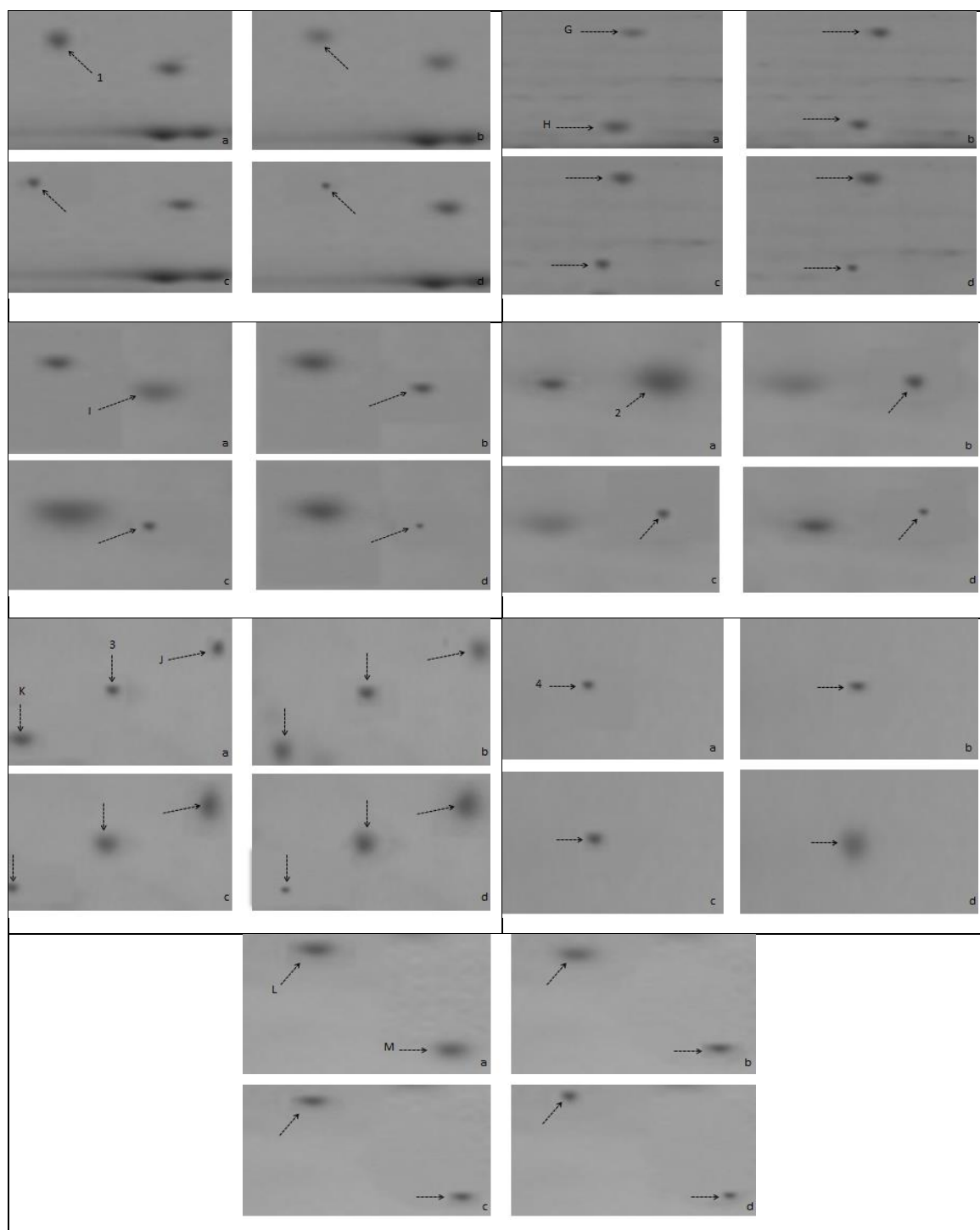
Table 1. Characteristics of responsive protein spots in Torbat Heydariyeh and Marand landraces of saffron under osmotic stress

تغییر مقدار پروتئین در توده مرند	تغییر مقدار پروتئین در توده تربت‌حیدریه	Accession number	اسم پروتئین Protein name	تئوری		تجربی		شماره لکه Spot number	گروه عملکردی پروتئین Protein functional group
				Theoretical		Experimental			
				pI	MW	pI	MW		
افزایش Increase	-	gi 473970552	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	6.16	76.36	5.98	78.8	G	پروتئین شوک گرمایی
کاهش بیشتر More decrease	کاهش کمتر Less decrease	gi 121340	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic	5.11	47.41	5.22	65.14	1	اسمیلاسیون نیتروزن Nitrogen assimilation
-	افزایش Increase	gi 475577109	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	5.26	34.93	6.23	61.18	A	سیستم شایلیک Shuttling system
-	کاهش Decrease	gi 223018643	chloroplast fructose-bisphosphate aldolase	5.90	42.21	5.95	56.5	H	سنتز یا تجزیه پروتئین Synthesis/digest of protein
کاهش بیشتر More decrease	کاهش کمتر Less decrease	gi 357117071	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic-like	5.40	37.01	6.20	40.1	2	واکنش نوری فتوسنتز Photo-reaction of Photosynthesis
-	افزایش Increase	gi 473787383	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic	5.00	31.70	5.23	39.60	B	بیوسنتز نشاسته Starch biosynthesis
-	افزایش Increase	gi 475620929	Alpha-soluble NSF attachment protein	4.96	35.16	5.26	38.51	C	انتقال سلولی Cellular transport
کاهش Decrease	-	gi 473787383	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic	5.00	31.70	5.09	36.15	I	بیوسنتز نشاسته Starch biosynthesis
-	افزایش Increase	gi 1174749	Triose-phosphate isomerase	7.67	33.00	6.21	33.2	D	تولید انرژی Produce of energy
افزایش Increase	-	gi 47607439	mitochondrial ATP synthase precursor	7.71	27.09	6.31	32.15	J	انتقال پروتون Proton transfer
افزایش کمتر Less increase	افزایش بیشتر More increase	gi 1174749	Full=Triosephosphate isomerase, cytosolic	5.24	27.14	6.11	30.15	3	تولید انرژی Produce of energy
کاهش Decrease	-	gi 195656049	Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein	7.70	28.60	5.91	28.9	K	واکنش نوری فتوسنتز Photo-reaction of Photosynthesis
-	افزایش Increase	gi 38679331	harpin binding protein 1	9.51	29.52	4.63	27.5	E	دفاع آنتی‌اکسیدانی Antioxidant defense
کاهش Decrease	-	gi 195656049	Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein	7.70	28.60	5.89	26.3	L	واکنش نوری فتوسنتز Photo-reaction of Photosynthesis
افزایش کمتر Less increase	افزایش بیشتر More increase	gi 21322655	adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase	5.68	21.97	4.42	25.52	4	بیوسنتز نشاسته Starch biosynthesis
کاهش Decrease	-	gi 475620929	Alpha-soluble NSF attachment protein	4.96	35.16	6.10	22.8	M	انتقال سلولی Cellular transport
-	افزایش Increase	gi 473787383	peroxiredoxin	5.37	17.00	5.31	21.1	F	دفاع آنتی‌اکسیدانی Antioxidant defense



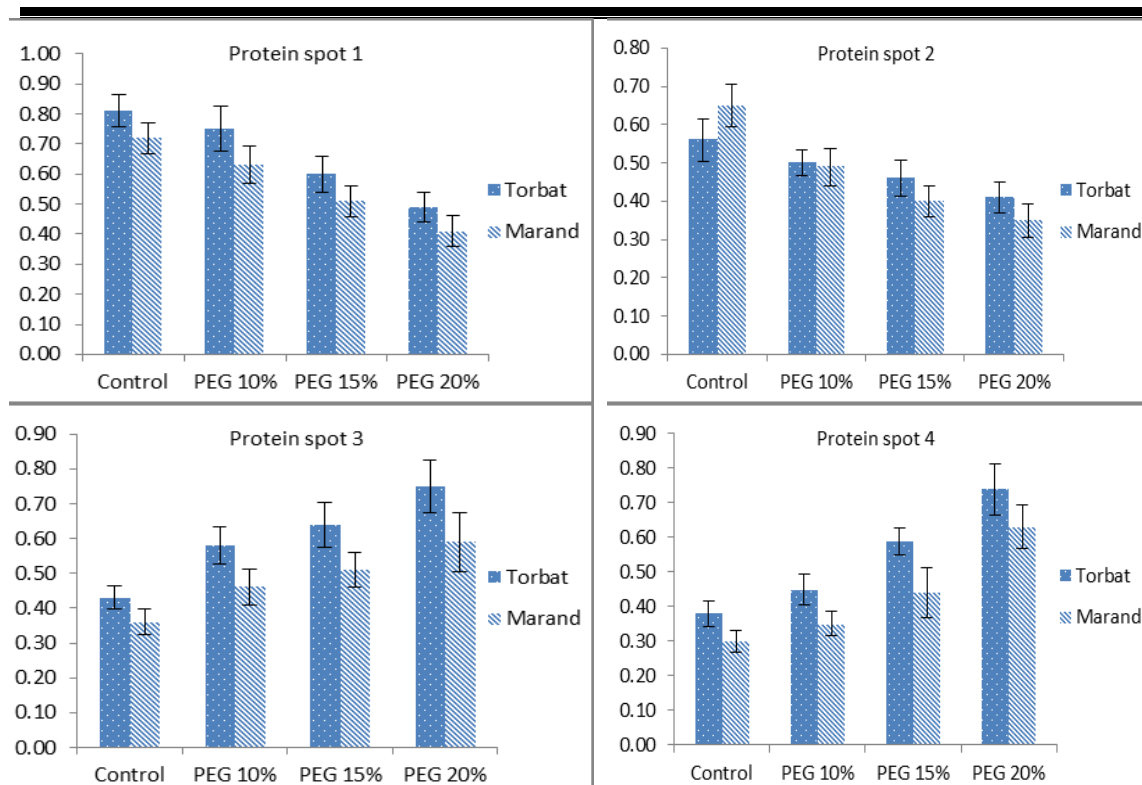
شکل ۳. روند تغییرات لکه‌های پروتئینی شناسایی شده در توده تربت‌حیدریه زعفران تحت شاهد شاهد (a)، تنش اسمزی ۱۰٪ PEG (b)، تنش اسمزی ۱۵٪ PEG (c) و تنش اسمزی ۲۰٪ PEG (d)

Fig 3. Change trend of identified protein spots in the Torbat Heydariyeh landrace of Saffron under control (a), osmotic stress PEG10% (b), osmotic stress PEG15% (c) and osmotic stress PEG20% (d)



شکل ۴. روند تغییرات لکه‌های پروتئینی شناسایی شده در توده مرند زعفران تحت شرایط شاهد (a)، تنش اسمزی PEG10% (b)، تنش اسمزی PEG15% (c) و تنش اسمزی PEG20% (d)

Fig 4. Change trend of identified protein spots in the Marand landrace of Saffron under control (a), osmotic stress PEG10% (b), osmotic stress PEG15% (c) and osmotic stress PEG20% (d)



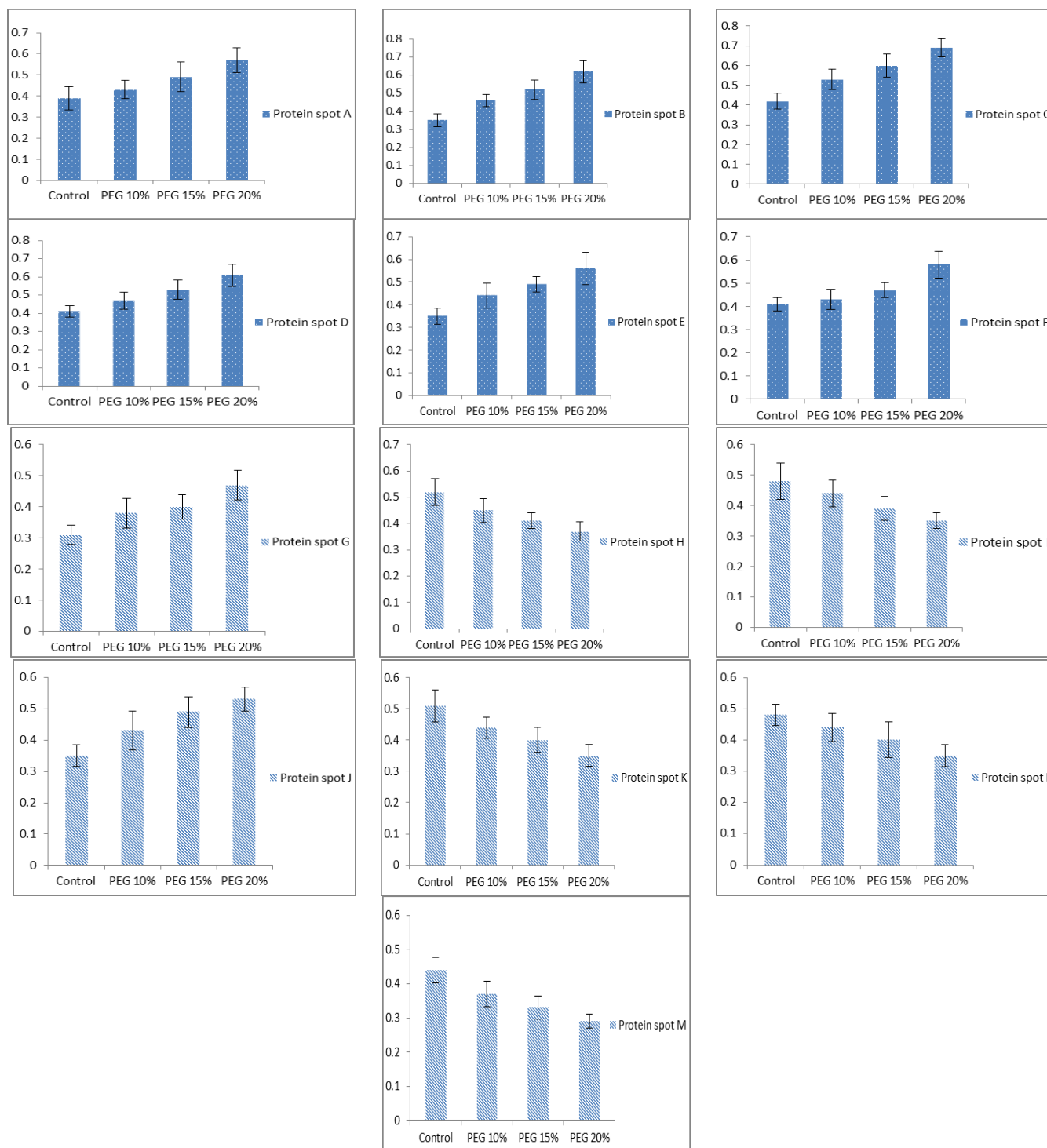
شکل ۵- نحوه تغییرات حجم لکه‌های پروتئینی مشترک بین دو توده تربت‌حیدریه و مرند تحت تیمارهای مختلف تنش اسمزی اعمال شده با PEG₆₀₀₀

Fig 5. How to change the volume of common protein spots between two landraces of Torbat Heydarieh and Marand under different osmotic stress treatments applied with PEG₆₀₀₀

می‌شود و قبلاً تصور بر این بود که در حفاظت سلول‌ها علیه گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد (Panchuk et al., 2005).

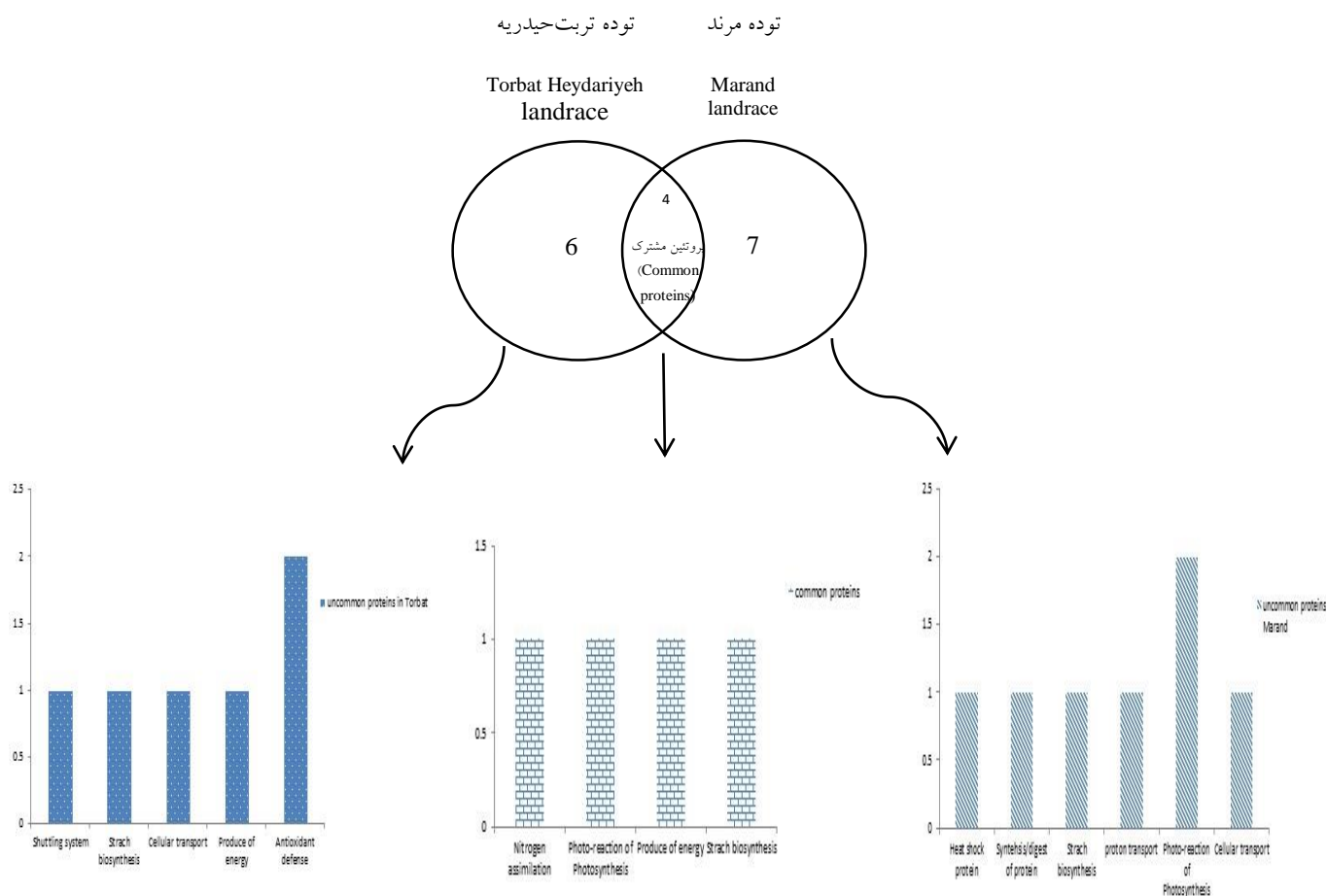
در تحقیقی دیگر گزارش شد که این پروتئین‌ها در ارتباط با فتوسیستم II و بازدارندگی زیان نوری به این فتوسیستم نقش دارند که با توجه به کاهش مقدار این پروتئین‌ها در این توده نشان دهنده این است که با توجه به کاهش فعالیت فتوسنتزی در شرایط تنش و کاهش استفاده از انرژی نوری زیان نوری در این توده بیشتر از توده تربت‌حیدریه می‌باشد (Granlund et al., 2009). از طرف دیگر، پروتئین photosystem II stability/assembly factor (لکه پروتئینی مشترک ۲ با کاهش بیان بیشتر در توده مرند) که یک پروتئین اساسی برای تعمیر، ساخت و پایداری کمپلکس فتوسیستم II می‌باشد (Plucken et al., 2002) و در تجزیه پروتئوم گیاهچه‌ها تحت تنش خشکی کاهش میزان آن گزارش شده است (Ford et al., 2011)، در این آزمایش نیز در توده تربت‌حیدریه نسبت به توده مرند کاهش میزان کمتری نشان داد.

بطور کلی در توده تربت‌حیدریه بیشترین تعداد پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش مربوط به همئوستازی سلول و در توده مرند مربوط به واکنش نوری فتوسنتز بود که نشان‌دهنده اهمیت بالای این دسته از پروتئین‌ها در رشد و نمو گیاه و مقابله با تنش اسمزی است (جدول ۱، شکل ۷). این نتایج مشابه نتایج بدست آمده در مطالعه پروتئوم ذرت (Proubleva et al., 2001)، برنج (Nozu et al., 2006)، کلزا (Naghavi, 2010) و گندم (Naghavi, 2014) می‌باشد. در گیاهان مواجه شده با تنش کمبود آب انرژی نوری جذب شده از طریق رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشتر از نسبت مصرف آن در چرخه کالوین است که علت آن کاهش فعالیت چرخه کالوین و کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در این چرخه می‌باشد. از طرف دیگر، 29.8 kDa protein (لکه پروتئینی K و L در توده مرند با کاهش مقدار تحت تنش) که یک پروتئین است که در لومن تیلاکوئید قرار گرفته است (Kieselbach et al., 2000)، بر اساس همولوژی بالایی که با اسکوربات پراکسیداز (APX) دارد APX4 نیز گفته



شکل ۶. نحوه تغییرات حجم لکه‌های پروتئینی غیرمشترک در دو توده تربت‌حیدریه (لکه‌های پروتئینی A, B, C, D, E و F) و مرند (لکه‌های پروتئینی G, H, I, J, K, L و M) تحت غلظت‌های مختلف تنش اسمزی اعمال شده با PEG₆₀₀₀

Fig 6. How to change the volume of non-common protein spots in two landraces of Torbat Heydariyeh (protein spots A, B, C, D, E and F) and Marand (protein spots G, H, I, J, K, L and M) under different concentrations of osmotic stress applied with PEG₆₀₀₀



شکل ۷. تعداد و گروه‌بندی پروتئین‌های مشترک و غیر مشترک پاسخ‌دهنده به تنش اسمزی در توده‌های تربت-حیدریه و مرند زعفران

Fig 7. Number and grouping of common and non-common responsive proteins to osmotic stress in Saffron landraces of Torbat Heydariyeh and Marand

از طرف دیگر، چرخه کالوین دارای سه فاز یا مرحله می‌باشد که عبارتند از فاز کریوکسیلاسیون، فاز کاهش و فاز احیاء. کمبود آب موجب بسته شدن روزنه‌های برگ می‌شود و این امر باعث کاهش جریان دی-اکسیدکربن به داخل برگ شده و باعث افزایش هیدرولیز نشاسته و تجمع قندها و همچنین کاهش بازدهی محصولات فتوسنتزی می‌گردد. همه این تغییرات در نتیجه کاهش فتوسنتز اتفاق می‌افتد (Yordanov et al., 2003). مرحله یا فاز سوم چرخه کالوین توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (Macdonald & Bauchanan, 1997). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این فاز شامل fructose و sedoheptulose-1,7-biphosphate

در توده مرند) می‌باشند. این دو آنزیم با همدیگر واکنشی را کاتالیز می‌کنند که در نهایت نتیجه آن تشکیل ribulose-5-phosphate می‌باشد. سپس ribulose-5-phosphate فسفریله شده و RuBP را تشکیل دهد که این فسفریله شدن توسط فسفوریبولوکیناز انجام می‌شود که در مطالعه حاضر شناسایی شد. بعضی از تریوزفسفات‌های تولید شده در چرخه کالوین برای بیوسنتز قند و نشاسته استفاده می‌شوند (Tamoi et al., 2005). در مجموع با توجه به کاهش میزان پروتئین ذکر شده، توده مرند در مسیر متابولیکی چرخه کالوین تحت تنش اسمزی آسیب بیشتری می‌بیند. نشاسته یک پلی‌ساکارید ذخیره‌ای مهم در گیاهان محسوب می‌شود که منبع انرژی برای فرآیندهای

از طرف دیگر، چرخه کالوین دارای سه فاز یا مرحله می‌باشد که عبارتند از فاز کریوکسیلاسیون، فاز کاهش و فاز احیاء. کمبود آب موجب بسته شدن روزنه‌های برگ می‌شود و این امر باعث کاهش جریان دی-اکسیدکربن به داخل برگ شده و باعث افزایش هیدرولیز نشاسته و تجمع قندها و همچنین کاهش بازدهی محصولات فتوسنتزی می‌گردد. همه این تغییرات در نتیجه کاهش فتوسنتز اتفاق می‌افتد (Yordanov et al., 2003). مرحله یا فاز سوم چرخه کالوین توسط یکسری واکنش‌های آنزیمی شناخته می‌شود که تریوز فسفات را به RuBP تبدیل می‌کند (Macdonald & Bauchanan, 1997). برخی از آنزیم‌های واسطه یا میانجی در این فاز شامل fructose و sedoheptulose-1,7-biphosphate

می‌توانند مقادیر بالایی از نیتروژن را درون آنزیم‌های درگیر در تثبیت کربن مانند روبیسکو ذخیره کنند. مسیر اصلی ساخت نیتروژن معدنی و remobilization آن در گیاهان در سطح بیوشیمیایی به اثبات رسیده است. GS (لکه پروتئینی مشترک ۱) آنزیم کلیدی این مسیر است و آدنوزین تری فسفات وابسته به تثبیت آمونیم را به گروه δ -carboxyl گلوتمات برای تشکیل گلوتمین کاتالیز می‌کند و برعکس آن توسط آنزیم گلوتمات سنتاز انجام می‌شود که تبدیل گلوتمین و 2-oxoglutarate را به دو مولکول گلوتمات برعهده دارد (Stéphanie et al., 2009). گزارش شده است که در پاسخ به تنش خشکی و شوری فراوانی پلی‌پپتیدهای آنزیم GS و فعالیت آن کاهش می‌یابد، در حالی که GS سیتوسولی افزایش بیان نشان داده و یا مقدار سطح بیان خود را در طی تنش در برگ حفظ می‌کند (Santos et al., 2004).

در سلول‌های گیاهی ایزوفرم‌های گوناگونی از MDHs (مالات دهیدروژناز) (لکه پروتئینی A در توده تربت-حیدریه با افزایش مقدار تحت تنش) شناسایی شده است که تفاوت آنها در کوآنزیم اختصاصی، مکان زیرسولی و عمل بیولوژیکی می‌باشد (Minarik et al., 2002; Ding & Ma, 2004). در گیاهان پنج گروه مختلف MDH وجود دارد که عبارتند از: chloroplast NADP-dependent MDH mitochondrial NAD-dependent MDH microbody NAD-dependent MDH chloroplast NAD-dependent MDH cytosolic NAD-dependent MDH و dependent MDH (Ding & Ma, 2004). بطور کلی MDHs تبدیل داخلی اگزالواستات و ملات را با استفاده از سیستم کوآنزیم NAD/NADP کاتالیز می‌کنند (Minarik et al., 2002). ملات دهیدروژناز یک آنزیم مهم متابولیسم سلولی می‌باشد که تبدیل^۵ اگزالواستات و ملات را کاتالیز می‌کند (Musrati et al., 1998). مقدار این آنزیم در شرایط تنش برای فراهم کردن انرژی مضاعفی که گیاه در طی تنش نیاز دارد، افزایش می‌یابد (Guicherd et al., 1997). همانطور که در این آزمایش نیز مشاهده شد، افزایش سطح آنزیم ملات دهیدروژناز در طی تنش در توده متحمل (مانند افزایش مقدار لکه پروتئینی A در تربت‌حیدریه) (جدول ۱ و

متابولیسمی مختلف می‌باشد (Kruger, 1997). در سنتز نشاسته سه آنزیم: آدنوزین بی‌فسفات گلوکز پیروفسفاتاز (AGPase)، نشاسته سنتاز و آنزیم منشعب کننده^۲ فعالیت دارند (Guan & Keeling, 1998). در این آزمایش تنها یکی از این آنزیم‌ها شناسایی شد (لکه پروتئینی با شماره ۴ در دو توده با افزایش مقدار بیشتر در توده تربت‌حیدریه تحت تنش) که AGPase بود. AGPase واکنش تشکیل ADP-glucose و پیروفسفات غیرآلی (لکه پروتئینی B و I در توده تربت-حیدریه با افزایش مقدار تحت تنش) را از ATP و glucose-1-phosphate کاتالیز می‌کند. محصول نهایی این واکنش که ADP-glucose می‌باشد پیش-ماده^۳ برای سنتز نشاسته است (Tetlow et al., 2003). سپس نشاسته سنتاز، گلوکز را از ADP-glucose به انتهای غیر کاهنده زنجیره پذیرای در حال رشد انتقال می‌دهد و باعث طویل شدن زنجیره گلوکان α -1,4 می‌شود. در مرحله سوم آنزیم انشعاب‌دهنده نشاسته زنجیره گلوکان α -1,4 طویل شده را جدا کرده و همزمان آن را به یک زنجیره گیرنده برای تشکیل لینکاز^۶ α -1,6 انتقال می‌دهد (Guan & Keeling, 1998). همچنین اظهار شده است که AGPase یک آنزیم محدود کننده نسبت^۴ بیوسنتز است که شامل دو زیر واحد بزرگ (l-AGPase) و دو زیر واحد کوچک (s-AGPase) می‌باشد که زیرواحدهای کوچک آن نقش catalytic برعهده دارند و نقش کلیدی در سنتز نشاسته اجرا می‌کنند (Kim et al., 2002). در آزمایشی گزارش شد که در طی تنش اعمال شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول، فعالیت آنزیم AGPase کاهش می‌یابد و بنظر می‌رسد که در طی تنش محدودیت‌های بیوسنتزی در جهت افزایش کارایی فتوسنتزی برداشته می‌شود (Ye et al., 2013). از طرف دیگر، لکه پروتئینی مشترک شماره ۱ (کاهش مقدار در توده تربت‌حیدریه و کاهش بیشتر در توده مرنده) بعنوان Glutamine synthetase (GS) دخیل در اسمیلاسیون نیتروژن شناسایی شد. نیتروژن عنصر کلیدی رشد و تولیدمثل می‌باشد و برای ساخت پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ضروری است. گیاهان

^۱ADP-glucose pyrophosphorylase
^۲branching enzyme
^۳precursor
^۴rate

شکل ۳) نشان‌دهنده نقش این آنزیم برای سازگاری با تنش می‌باشد، در حالی که در توده حساس سطح این آنزیم تحت تنش کاهش نشان داده است که مشابه نتایج آزمایش سایر محققان می‌باشد (Guicherd et al., 1997; Kausar et al., 2013). از طرف دیگر، پروتئین Triosephosphate isomerase (لکه پروتئینی مشترک شماره ۳ با افزایش مقدار بیشتر در تربت-حیدریه و لکه پروتئینی D با افزایش مقدار در تربت-حیدریه) یک آنزیم درگیر در مسیر گلیکولیز (مرحله اولیه تولید انرژی) می‌باشد که ایزومریزاسیون dihydroxyacetone phosphate و D-glyceraldehyde-3-P را کاتالیز می‌کند (Cui et al., 2005). در آزمایشی دیگر مشاهده شد که در تجزیه پروتئوم این آنزیم در طی تنش خشکی کاهش بیان نشان داده است (Xue et al., 2008). سایر محققین نیز اظهار داشتند که میزان بیان این پروتئین در رقم حساس کمتر از رقم متحمل می‌باشد (Naghavi, 2014). در حالی که، گزارش شده است که در طی تنش غیرزیستی و در رقم متحمل، این آنزیم افزایش بیان داشته است (Moller et al., 2011) که در این پژوهش نیز مشابه این نتایج بدست آمد (جدول ۱ و شکل ۳).

گروه دیگر از پروتئین‌ها از نظر نوع عمل لکه پروتئینی J با افزایش مقدار در توده مرنده مربوط به پروتئین‌های دخیل در انتقال پروتون نقش دارند. بیشتر انرژی مورد نیاز سلول‌ها در میتوکندری و از طریق فرآیند فسفریلاسیون-اکسیداتیو تشکیل می‌شود. مرحله نهایی این فرآیند توسط F1F0-type ATP synthase (لکه پروتئینی J در توده مرنده با افزایش مقدار تحت تنش) که در غشای داخلی میتوکندری قرار گرفته است انجام می‌شود. این آنزیم که همچنین کمپلکس V نامیده می‌شود از انرژی حاصل از شیب پروتون ایجاد شده بین دو غشای میتوکندری استفاده کرده و از ADP و فسفات معدنی ATP می‌سازد. این شیب پروتون در طی کاهش اکسیژن توسط زنجیره انتقال الکترون (کمپلکس I-IV) مستقر در غشای داخلی میتوکندری ایجاد می‌شود (Saraste, 1999). ATP synthase (لکه پروتئینی J با افزایش مقدار در توده مرنده) دارای یک دامنه هیدروفوبیک (F0) دربرگیرنده کانال عبور پروتون است و همچنین دارای یک

hydrophilic ATPase (دامنه F1) که شامل نوکلئوتید آدنین انجام‌دهنده اتصال بین ADP و فسفات معدنی می‌باشد (Stock et al., 2000). در تحقیقی با مطالعه پروتئوم برگ پرچم ژنوتیپ‌های برنج ۳۰ روزه تحت تنش خشکی نشان دادند که بعد از ۲۰ روز تنش میزان پروتئین mitochondrial F1-ATPase در ژنوتیپ حساس Zhenshan97B افزایش کمتری نسبت به رقم متحمل داشتند (Ji et al., 2012). از طرف دیگر، افزایش مقدار پروتئین‌های مرتبط با سنتز ATP تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی شامل خشکی و شوری در چند مطالعه قبلی گزارش شده است (Wang et al., 2008; Guo et al., 2012). از طرف دیگر، پروتئین Alpha-soluble NSF attachment protein (لکه پروتئینی C در توده تربت‌حیدریه و لکه پروتئینی M در توده مرنده) یا SNAPs برای اتصالات درون ارگانی و همچنین نقل و انتقالات وزیکولی ضروری می‌باشد (Stenbeck, 1998). همچنین مطالعات اخیر نقش این گونه پروتئین‌ها را در رشد لوله‌های گرده نشان می‌دهد زیرا گیرنده‌های SNAP که SNRE نامیده می‌شوند به عنوان واسطه انتقال اجزای خارجی و داخلی رشد نوک دانه‌های گرده شناخته شده‌اند (Guo & Mccubbin, 2012). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش مقدار پروتئین (شکل ۳) در توده تربت‌حیدریه و کاهش مقدار آن در توده مرنده (شکل ۴) تحت تنش بترتیب نشان-دهنده افزایش و کاهش فعالیت درون سلولی و تغییرات ارتباطات بین اندامی باشد و می‌تواند در شرایط تداوم تنش در مرحله زایشی روی رشد یا عدم رشد لوله‌های گرده و در نهایت روی تولید مثل گیاه تأثیر بگذارد.

پروتئین‌های peroxiredoxin (لکه پروتئینی F در توده تربت‌حیدریه با افزایش مقدار تحت تنش) بصورت گسترده در بافتها بیان می‌شوند و در میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و سیتوسول یافت می‌شوند. تولید peroxiredoxin که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد در بسیاری از مطالعات در اثر تنش‌های غیرزیستی صورت گرفته است (Samaj & Thelen, 2007; Dehghani, 2019). مکان سلولی این پروتئین‌ها بیانگر آن است که نقش بسیار مهم آنتی‌اکسیدانی در اندامک‌های سلولی که منبع اصلی ROS هستند، ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در کنترل انتقال سیگنال هم فعال هستند.

پایداری پروتئین‌ها و غشاءها می‌باشند و همچنین به پیچش دوباره پروتئین‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کنند. این پروتئین‌ها اغلب درگیر پیچش پلی‌پپتیدهای مجدد سنتز شده و انتقال یا وارد کردن پروتئین‌های مورد نیاز برای سنتز آنها می‌باشند (Wang et al., 2004). القای زیاد پروتئین شوک حرارتی در طی تنش گرما توسط محققین گزارش شده است (Han et al., 2009). علاوه بر این برخی محققین پروتئین شوک حرارتی را به عنوان یکی از پروتئین‌های مهم و موثر در تحمل به تنش سرما عنوان کردند (Cui et al., 2005). در تحقیقی دیگر کاهش این پروتئین در طی تنش اسمزی در ارقام حساس سویا گزارش شد (Toorchi et al., 2009). همچنین کاهش بیان این پروتئین در رقم حساس گندم تحت تنش خشکی گزارش شده است (Naghavi, 2014). از طرف دیگر پروتئین Heat shock cognate 70KDa در مطالعه پروتئوم ارقام جو تحت تنش در رقم متحمل افزایش و در رقم حساس کاهش نشان داد که با توجه به نقش این پروتئین‌ها می‌تواند نشان دهنده نقش آنها در تحمل به تنش باشد (Kausar et al., 2013).

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج بدست آمده توده تربت‌حیدریه نسبت به توده مرند از لحاظ واکنش پروتئینی تحت تنش اسمزی در وضعیت مطلوبتری قرار داشت. همچنین نتایج تجزیه پروتئوم دو توده نشان داد که تعداد ۱۷ لکه پروتئینی معنی‌دار بین گیاهان شاهد و تیمارهای تنش اسمزی، تشخیص داده شدند که از این تعداد چهار لکه پروتئینی بین دو توده مشترک بودند و تعداد شش و هفت لکه پروتئینی بترتیب منحصر به توده تربت‌حیدریه و مرند بودند. توده تربت‌حیدریه با دخالت دادن پروتئین‌های متعددی و با مقدار بیشتر تحت تنش اسمزی عکس-العمل بهتری نسبت به توده حساس تر توده مرند جهت حفظ رشد خود داشته است. همچنین در پاسخ اختصاصی، توده متحمل‌تر تحت تنش بیشتر در مسیر دفاع آنتی‌اکسیدانی فعالیت داشته و توده حساس‌تر بیشتر آسیب را در مسیرهای مختلف بیولوژی با کاهش فعالیت پروتئین‌ها مواجه می‌شود. بر پایه این توده‌های متحمل‌تر و حساس‌تر زعفران با داشتن مقدار پروتئینی

انتهای N این پروتئین که حاوی سیستئین می‌باشد، به اسید سولفونیک اکسیده شده که این خود پلی برای واکنش با پراکسیدها است. در واقع می‌توان گفت بر اثر فعالیت آنزیم copper/zinc superoxide dismutase تبدیل ROS به H₂O₂ انجام شده و آنزیم type 2 peroxiredoxin مولکول H₂O₂ را احیا می‌کند و در بسیاری از مطالعات پروتئین peroxiredoxin بعنوان پروتئین پاسخ دهنده به تنش مطرح شده است (Hashimoto et al., 2009). حضور بیشتر و فعالیت این پروتئین در توده متحمل‌تر تربت‌حیدریه (لکه پروتئینی F) نقش این پروتئین را در تحمل تنش شوری نشان می‌دهد (شکل ۳). از سوی دیگر، شواهدی از کاهش کلی مکانیسم‌های دفاعی علیه تنش در گیاهچه‌های رقم حساس به وسیله شناسایی فراوانی کمتر پروتئین harpin binding protein-1 شناخته شده است که پاسخ حساسیت را در گیاهان ایجاد می‌کند (Michaletti et al., 2018). از طرف دیگر، افزایش بیان بیشتر ژن hrf1 که کدکننده پروتئین harpin می‌باشد (لکه پروتئینی E) با افزایش بیان در توده تربت‌حیدریه، در گیاهچه‌های برنج متحمل خشکی گزارش شده است که این امر موجب بسته‌شدن روزنه‌ها، افزایش آب‌سیزیک اسید، پرولین و محتوای قند محلول شده است (Zhang et al., 2011). مشاهدات چندگانه مستقل در بهبود و توسعه تحمل تنش غیرزیستی توسط ژن‌های وابسته به بیماری‌زا، یک همپوشانی تنظیم‌کننده‌ای را بین تنش‌های غیرزیستی و زیستی نشان می‌دهد (Sharma et al., 2013). علاوه بر این، پروتئین‌های شوک حرارتی (لکه G) در توده متحمل‌تر تربت‌حیدریه با افزایش بیان (جدول ۱ و شکل ۳) در زمرهٔ چاپرون‌های مولکولی بوده و باعث پایداری و بهبود پیچ‌خوردگی دوباره پروتئین‌هایی که در طی تنش‌های گوناگون باز و تجزیه شده‌اند می‌گردد (Zang & Komatsu, 2007) و نقش تعیین کننده در حفاظت گیاه علیه تنش برای برگرداندن پروتئین‌ها به شکل طبیعی اولیه آنها و در نتیجه همئوستازی سلول برعهده دارند (Wang et al., 2004). این پروتئین‌ها مسئول پیچش پروتئین، بازسازی آنها، ترامکانی^۱،

می‌باشد، بدین وسیله نویسندگان از مسئولین محترم دانشگاه تربت‌حیدریه و پژوهشکده زعفران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

متفاوت و اثر این پروتئین‌ها در ساختار سلولی بنحوی متفاوت به مقابله با تنش اسمزی پرداختند.

سپاسگزاری: این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره قرارداد ۱۱۹۳۴۱/پ و از محل اعتبارات پژوهشکده زعفران دانشگاه تربت‌حیدریه

منابع

- Ali, G. M., & Komatsu, S. (2006). Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. *Journal of Proteome Research*, 5 (2), 396-403.
- Berardini, T. Z., Mundodi, S., Reiser, R., Huala, E., Garcia-Hernandez, M., Zhang, P., Mueller, L. M., Yoon, J., Doyle, A., Lander, G., Moseyko, N., Yoo, D., Xu, I., Zoeckler, B., Montoya, M., Miller, N., Weems, D., & Rhee, S. Y. (2004). Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiology*, 135, 745-755.
- Bery, E. A. (2007). Molecular and Physiological Responses to Water Deficit Stress. Department of Genetics and Cell Biology, University of Chicago, USA.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177, 570-576.
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y., & Liu, J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5 (12), 3162-3172.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., & Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling rotein. *Electrophoresis*, 7, 52-4.
- Dehghani Bidgoli, R., Salari, A., & Bashiri, M. (2019). The Effect of Various Irrigation Regimes on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Saffron Stigma Extract. *Journal of Saffron Research*, 7 (1), 109-122. [in Persian].
- Ding, Y., & Ma, Q. H. (2004). Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie*, 86, 509-518.
- Ford, K. L., Cassin, A., & Bacic, A. (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Plant Science*, 2 (44), 1-11.
- Ghorbanpour, M., Ahmadian, A., & Yousefijavan, I. (2020). Interaction effects of salt stress and salicylic acid levels on physiological trials of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 8 (2), 359-373. [in Persian].
- Golmohammadi, F. (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in south Khorasan province-east of Iran. *International Journal of Farming Allied Science*, 3 (5), 566-596.
- Granlund, I., Storm, P., Schubert, M., Garcia-Cerdi, J. G., Funk, C., & Wolfgang, P. S. (2009). The TL29 Protein is Lumen Located, Associated with PSII and Not an Ascorbate Peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 50 (11), 1898-1910.
- Guan, H. P., & Keeling, P. L. (1998). Starch Biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple isoenzymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 10, 307-319.
- Guicherd, P., Peltier, J. P., Gout, E., Bligny, R., & Marigo, G. (1997). Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L. malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees*, 11, 155-161.
- 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 (6), 1867-1885.
- Guo, F., & Mccubbin, A. G. (2012). The pollen-specific R-SNARE/longin PiVAMP726 mediates fusion of endo- and exocytic compartments in pollen tube tip growth. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3083-3095.
- Han, F., Chen, H., Yan, M. F., Liu, G. S., & Shen, S. H. (2009). A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794 (11), 1625-1634.
- Hashimoto, M., & Komatsu, S. (2007). Proteomic analysis of rice seedling during cold stress. *Proteomics*, 7, 293-302.
- Hashimoto, M., Toorchi, M., Matsushita, K., Iwasaki Y., & Komatsu, S. (2009). Proteome analysis of rice root plasma

- membrane and detection of cold stress responsive proteins. *Protein & Peptide Letters*, 16, 685-697.
- Herbert, B. (1999). Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 20 (4-5), 660-663.
- Hosseini, M., & Rahimi, H. (2018). Effect of moisture stress on yield and qualitative indices of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 5 (2), 247-255. [in Persian].
- Hosseini Salekdeh, Gh., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., & Bennett, J. (2002). Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2, 1131-1145.
- Ji, K., Wang, Y., Sun, W., Lou, Q., Mei, H., Shen, S., & Chen, H. (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, 169, 336-344.
- Kausar, R., Arshad, M., Shahzad, A., & Komatsu, S. (2013). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids*, 44, 345-359.
- Khashei Siuki, A., Hashemi, S. R., & Ahmadede, M. (2015). The effect of pottasic zeolite and irrigation scheduling on saffron yield. *Reserch Project in University of Birjand, Iran*. [in Persian].
- Kieselbach, T., Bystedt, M., & Zentgraf, U. (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the Arabidopsis chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Letters*, 480, 271-276.
- Kim, S. H., Mizuno, K., & Fujimura, T. (2002). Regulated expression of ADPglucose pyrophosphorylase and chalcone synthase during root development in sweet potato. *Plant Growth Regulation*, 38, 173-179
- Koh, J., Chen, G., Yoo, M-J., Zhu, N., Dufresne, D., Erickson, J. E., Shao, H., & Chen, S. (2015). Comparative proteomic analysis of *Brassica napus* in response to drought stress. *Journal of Proteome Research*, 14 (8), 3068-3081.
- Kruger, N. J. (1997). Carbohydrate synthesis and degradation. In: *Dennis, D. T., Turpin, D. H., Lefebvre, D. D., & Layzell, D. B.* (Eds.), *Plant Metabolism* (pp. 83-104). Essex: Addison Wesley Longman.
- Macdonald, F. D., & Buchanan, B. B. (1997). The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. In: *Dennis, D. T., Turpin, D. H., Lefebvre, D. D., & Layzell, D. B.* (Eds.), *Plant Metabolism* (pp. 299-313). Essex: Addison Wesley Longman.
- Michaletti, A., Naghavi, M. R., Toorchi, M., Zolla L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports*, 8, 1-18.
- Minarik, P., Tomaskova, N., Kollarova, M., & Antalík, M. (2002). Malate dehydrogenases-structure and function. *General Physiology and Biophysics*, 21, 257-265.
- Moller, A. L., Pedas, P., Andersen, B., Svensson, B., Schjoerring, J. K., & Finnie, C. (2011). Responses of barley root and shoot proteomes to longterm nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, Cell & Environment*, 34 (12), 2024-2037.
- Mushtaq, R., Katiyar, S., & Bennett, J. (2008). Proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in rice endosperm affecting grain quality. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11, 227-232.
- Musrati, R. A., Kollarova, M., Mernik, N., & Mikulasova, D. (1998). Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiology and Biophysics*, 17, 193-210.
- Naghavi, M. R. (2010). Response and 2-Dimensional electrophoresis pattern of spring rapeseed genotypes under osmotic stress (Master's thesis). University of Tabriz, Iran. [in Persian].
- Naghavi, M. R. (2014). Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones (Ph.D's thesis). University of Tabriz, Iran. [in Persian].
- Nozu, Y., Tsugita, A., & Kamijo, K. (2006). Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. *Proteomics*, 6, 3665-3670.
- Panchuk, I. I., Zentgraf, U., & Volkov, R. A. (2005). Expression of the Apx gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. *Planta*, 222, 926-932.
- Pazoki, A., Kariminejad, M., & Foladi Targhi, A. (2013). Effect of planting patterns on yield and some agronomical traits in saffron (*Crocus sativus* L.) under different irrigation intervals in Shahr-e-Rey region. *International Journal of Farming and Allied Science*, 2 (S2), 1363-1368.
- Plucken, H., Muller, B., Grohmann, D., Westhoff, P., & Eichacker, L. A. (2002). The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 532, 85-90.
- Porubleva, L., Vander Velden, K., Kothari, S., Oliver, D. J., & Chitnis, P. R. (2001). The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide

- mass fingerprints. *Electrophoresis*, 22, 1724-1738.
- Samaj, J., & Thelen, J. J. (2007). Plant proteomics. In: *Samaj, J., & Thelen, J. J.* (Eds.). *Plant proteomics*. Institute of Plant Genetics and Biotechnology (pp. 42-98)., Slovak Republic.
- Santos, C., Pereira, A., Pereira, S. & Teixeira, J. (2004). Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Scientia Horticulturae*, 103, 101-111.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283, 1488-1493.
- Shao, H. B., Liang, M. A., Shao, M. A., & Wang, B. C. (2005). Changes of some physiological and biochemical indices for soil water deficits 10 wheat (*Triticum aestivum*) genotypes at seedling stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42 (2), 107-113.
- Sharma, R., De Vleeschauwer, D., Sharma, M. K., & Ronald, P. C. (2013). Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice. *Molecular Plant*, 6, 250-260.
- Stenbeck, G. (1998). Soluble NSF-attachment proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30, 573-577.
- Stéphanie, M., Bernard, Z., & Habash, D. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, 182, 608-620.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 672-679.
- Tamoi, M., Nagaoka, M., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2005). Carbon metabolism in the Calvin cycle. *Plant Biotechnology*, 22, 355-360.
- Tetlow, I. J., Davies, E. J., Vardy, K. A., Bowsher, C. G., Burrell, M. M., & Emes, M. J. (2003). Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *Journal of Experimental Botany*, 54, 715-725.
- Toorchi, M., Yukawa, K., Nouri, M. Z., & Komatsu, S. (2009). Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybeans roots. *Peptides*, 30, 2108-2117.
- Wang, M. C., Peng, Z. Y., Li, C. L., Li, F., Liu, C., & Xia, G. M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics*, 8, 1470-1489.
- Wang, W., Vinocur, B., Soseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 244-52.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Environment*, 25 (2), 195-210.
- Xue, G. P., McIntyre, C. L., Glassop, D., and Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 67, 197-214.
- Ye, J., Wang, S., Zhang, F., Xie, D., & Yao, Y. (2013). Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG₆₀₀₀ stress and rewatering. *Plant Omics*, 6(4), 286-294.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsoney, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*, 187-206.
- Yousefi Javan, I. and Gharari, F., (2018). Extraction and isolation of three genes of saffron (*Crocus sativus* L.) such as AREB, DREB and MPK to drought resistance. *Journal of Saffron Research*, 6 (2), 251-267. [in Persian].
- Zang, X., & Komatsu, S. (2007). A proteomic approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68, 426-437.
- Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z., Gao, X., Liu, F., & Shao, M. (2011). Overexpression of a Harpin-encoding gene hrf1 in rice enhances drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 62 (12), 4229-4238.
- Zhu, M., Simons, B., Zhu, N., David, G., Oppenheimer, M., & Chen, S. (2010). Analysis of abscisic acid responsive proteins in Brassica napus guard cells by multiplexed isobaric tagging. *Proteomics*, 73, 790-805.

COPYRIGHTS

© 2022 by the authors. Published by University of Birjand – Saffron Research Group. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)





Original Article:

Evaluation of Protein Response of Saffron Under Osmotic Stress by Proteomics Method

Mohammad Reza Naghavi^{1*}, Abolfazl Tavassoli²

1- Assistant Professor, Plant Breeding-Biometrical Genetics, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Agronomy-Crops Ecology, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

*Corresponding author Email: mr_naghavi@pnu.ac.ir

Received 26 September 2021; Accepted 15 February 2022

Abstract

Identifying the molecular-protein mechanism of saffron against osmotic stress in Iran which is one of the arid and semi-arid countries in the world is of particular importance. For this purpose and to investigate the response to osmotic stress applied with different concentrations of PEG₆₀₀₀, an experiment is performed using two saffron landraces of Torbat Heydarieh and Marand by hydroponic culture at the vegetative growth stage (seedling) in the greenhouse. Two weeks after osmotic stress, sampling was performed from all experimental units. According to the results, Torbat Heydarieh landrace was in a better condition than Marand landrace in terms of protein reaction under osmotic stress. Also, the results of proteomic analysis of two landraces showed that among 17 significant protein spots between control and osmotic stress treatments, four protein spots between two common landraces and six and seven protein spots were unique to Torbat Heydarieh and Marand landraces, respectively. In interpreting the specific response, it can be stated that the more tolerant landrace of Torbat Heydarieh under stress was more active in the path of antioxidant defense and included increased activity of harpin binding protein 1 and peroxiredoxin. While the more sensitive landrace Marand had more damage in different biological pathways by reducing the activity of proteins, especially the reduction of Thylakoid luminal protein 29.8 kDa protein involved in photosynthetic light reaction. In general, the different protein responses of the landraces and the most important protein reactions and important metabolic pathways of the studied landraces of saffron were identified.

Keywords: Metabolic pathways, Proteome analysis, Saffron, Torbat Heydarieh.